

## Résumé

Les différents résultats publiés indiquent que les huiles essentielles extraites des plantes aromatiques sont douées de plusieurs propriétés biologiques. Dans ce contexte, nous avons essayé d'évaluer *in vitro* les activités antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle extraite des feuilles des plantes: *Myrtus communis* et *Pistacia lentiscus*.

L'extraction a été réalisée par hydrodistillation, le rendement a été voisin de 0.15% pour l'huile essentielle de *Myrtus communis* et de 0.05% pour les feuille de *Pistacia lentiscus*.

Concernant l'activité antiradicalaire, la CE<sub>50</sub> obtenue est de 954.37 µg/ml pour le *M. communis* et de 976.82 µg/ml pour le *P. lentiscus*. Les huiles essentielles des deux plantes ont montré aussi une activité antioxydante intéressante par la méthode de pouvoir réducteur (CR<sub>0.5</sub>=657.28 µg/ml pour *M. communis* et 570.75 µg/ml pour *P. lentiscus*).

La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été estimée par la méthode d'aromatogramme. Les CMI obtenues sont de 100µg/ml vis-à-vis d'*Escherichia coli* et de *klebsiella pneumoniae* avec l'huile essentielle de *Myrtus communis*, et 1000µg/ml vis-à-vis d'*Escherichia coli* et 100µg/ml vis-à-vis de *klebsiella pneumoniae* avec l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus*.

Nos résultats suggèrent aussi que l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* peut réduire la toxicité induite par le plomb.

**Mots clés:** Huile essentielle, activité antioxydante, activité antibactérienne, *Myrtus communis*, *Pistacia lentiscus*.

## Abstract

The various results published have indicated that the essential oils extracted from the aromatic plants are endowed with several biological properties. In this context, we tried to evaluate antioxidant and antibacterial activities of essential oils extracted from *Myrtus communis* and *Pistacia lentiscus*.

The extraction was carried out by water distillation Clevenger's type apparatus, the yield was 0.15% for *M. communis* and 0.05 for *P. lentiscus*. Concerning antiradical activity, the EC<sub>50</sub> obtained was 954.37 µg/ml for *M. communis* and 976.82 µg/ml for *P. lentiscus*. The *M. communis* and *P. lentiscus* essential oils show also an interesting antioxidant activity (RC<sub>50</sub>=657.28 for *M. communis* and 570.75 for *P. lentiscus* =81.74± 3.92%) by the reducing power method.

Inhibiting minimal concentration (CMI) was estimated by the method of aromatogramme. The CMI obtained are of 100µg/ml with both *Escherichia coli* and *klebsiella pneumoniae* with the essential oil of *Myrtus communis*, and 1000µg/ml with *Escherichia coli* and 100µg/ml for *klebsiella pneumoniae* with the essential oil of *Pistacia lentiscus*.

With the rise of this study, we can conclude that the *M. communis* and *P. lentiscus* essential oil could be regarded as antioxidant and antibacterial.

Our results suggest that essential oil of *Pistacia lentiscus* can reduce toxicity induced by lead.

**Keywords:** Essential oil, biological activity, *Myrtus communis*, *Pistacia lentiscus*.

## ملخص

توضح معظم نتائج هذه الأبحاث أن الزيوت الطيارة تملك فعاليات بيولوجية مهمة. في هذا الإطار حاولنا دراسة الفاعلية المضادة للأوكسدة و البكتيريا للزيوت الطيارة المستخلصة من نباتي الطرو و الريحان.

لاستخلاص الزيوت الطيارة استعملنا التقطير المائي و كانت المرودية تساوي 0.15 بالمائة لنبات الريحان و 0.05 بالمائة لنبات الطرو. لتقييم الفاعلية المضادة للجدور الحرة" استعملنا طريقة "DPPH" حيث تمكنا من تقدير التركيز الفعال ب 954.37 ميكروغرام على المليلتر بالنسبة لنبات الريحان و 976.82 بالنسبة لنبات الطرو. كما تم تقييم الفاعلية المضادة للأوكسدة باستعمال طريقة "عامل الإرجاع" فكانت نسبة الفاعلية 657.28 بالنسبة لنبات الريحان و 570.75 بالنسبة لنبات الطرو.

فيما يخص الفاعلية المضادة للبكتيريا بينت طريقة "الأروماتوغرام" أن الزيوت الطيارة لنباتتي الطرو و الريحان لها فاعلية مضادة للبكتيريا عالية كما أن التراكيز الصغرى المثبطة كانت أقل من 200 ميكروغرام للمليلتر لنبات الريحان بالنسبة لإشيريشيا كولي و كليسييلا و 1000 ميكروغرام للمليلتر لنبات الطرو بالنسبة لإشيريشيا كولي و أقل من 200 ميكروغرام للمليلتر بالنسبة لكليسييلا. إنطلاقا من النتائج المتحصل عليها يمكننا الاستنتاج أن الزيوت الطيارة لنباتتي الطرو و الريحان لها فعالية مضادة للأوكسدة و مضادة للبكتيريا.

تشير نتائج هذه الدراسة إلى أن الزيوت الطيارة لنبات الطرو يمكن أن تقلل السمية الناجمة عن الرصاص.

الكلمات المفتاحية: الزيوت الطيارة، الفاعلية البيولوجية، الريحان، الطرو.

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحي جيجل-  
Université M<sup>ed</sup> Seddik Benyahia-Jijel-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences de l'Environnement  
et des Sciences Agronomiques



كلية علوم الطبيعة و الحياة  
قسم علوم المحيط و العلوم الفلاحية

## Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme : Master Académique en Biologie

Option : Toxicologie de l'Environnement

### Thème

Etude des huiles essentielles de *Myrtus communis* L. et *Pistacia lentiscus* L. de la région de Chahna -Jijel- et évaluation de leurs activités biologiques.

#### Jury de soutenance

Président: M<sup>r</sup> Sebti M.

Examinatrice: M<sup>me</sup> Khennouf H.

Encadrante: M<sup>me</sup> Benterrouche I.

#### Présenté par

Boudjada Selma.

Boufelgha Amira.

Année Universitaire 2014-2015

Numéro d'ordre à la bibliothèque :.....

## Remerciements

*Avant tous, nous remercions dieu tout puissant qui nous a donné la santé, la volonté, et la force pour réaliser ce modeste travail.*

*Tous d'abord, nous tenons à remercier notre encadreur m<sup>elle</sup> « BENTERROUCHE Ilhem » pour sa bonne direction, nos membres de jury, qui ont accepté d'évaluer notre travail, à s'avoir,*

*M<sup>r</sup> Sebtí Mohammed*

*M<sup>me</sup> Khennouf Hanene*

*Nos remerciements s'adressent aussi, à tous le personnel du laboratoire de l'hôpital Bachir Mentori d'Elmilia et l'équipe de l'laboratoire de biologie.*

*Enfin, nous remercions tous ceux qui nous ont aidés de près ou loin à réaliser ce travail.*

*Selma et Amira.*

# Dédicace

*A l'aide d'Allah tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

*A mon cher père qui ma appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements.*

*A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère qui ma apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité. Merci d'avoir été des parents aussi disponibles et ouverts à toutes mes envies.*

*A mes sœurs Kenza, Amina et Fatima  
A mon frère : Abdallah*

*A Tous mes proches, mes amis, Mes camarades de promotion, Tous mes enseignants  
Tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de ce mémoire.*

*Pour finir, merci a ceux avec qui j'ai partagé des moments d'amitié, Bouchra, Asma, Amira et Soumia.  
Encore merci pour votre soutien et bien sûr pour les bons et opportuns moments qu'on a passé ensemble.*

*SELMA*

## Dédicaces

*Je Dédie ce modeste travail à*

*Mes chers parents, pour leur endurance et leurs  
sacrifices sans limites*

*Mes frères Abd elhakim, Imad et Kheled  
Ma sœur Wafa*

*Je tiens à remercier la personne la plus chère au  
monde pour m'avoir donné confiance, à des moments  
où j'en avais besoin  
Mon marie Bilal  
Et leur famille*

*En reconnaissance de leur affection toujours  
constante*

*Tous mes proches  
Mes amis Saïda, Wassila, Fatima, Bouchra, Asma,  
Afaf, Nafissa, selma et Keltoum  
Mes camarades de promotion  
Tous mes enseignants*

*Tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de ce  
mémoire.*

*Amira*

Liste des tableaux.....	i
Liste des abréviations.....	ii
Liste des figures.....	iii
<b>Introduction.....</b>	<b>01</b>

## **PARTIE 1: RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE.**

### **Chapitre I : généralité sur les huiles essentielles**

I-1 Définitions.....	02
I-2 Les propriétés physico-chimiques des huiles essentielles.....	02
I-3 La composition chimique des huiles essentielles.....	03
I-4 Facteurs de variabilité de la composition des huiles essentielles.....	04
I-5 Répartition et localisation.....	05
I-6 Les méthodes d'extraction et d'identification des huiles essentielles.....	06
I-7 Rôle, Utilisation et Importance.....	09
I-8 La toxicité des huiles essentielles.....	11

### **Chapitre II: Activité biologique des huiles essentielles**

II.1 Activité antioxydante .....	12
II.1.1 Espèces réactives de l'oxygène (ERO) .....	12
II.1.1.1 Définition.....	12
II.1.1.2 Les principales espèces réactives d'oxygène.....	12
II.1.1.3 Les sources des ERO.....	13
II.1.1.4 Conséquences des espèces réactive de l'oxygène.....	13
II.1.2 Le stress oxydant.....	14
II .2 Le système antioxydant .....	14
II.2.1 Définition.....	14
II.2.2 Type des systèmes de défense antioxydant.....	15
II.2.2-1 Antioxydants enzymatiques.....	15
II.2.2.2 Antioxydants non enzymatiques.....	16
II.2.3 Modes d'action des antioxydants.....	18
II.2.4 Les principales sources d'antioxydants.....	18
II.2.5 Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante.....	19
II.2.5.1 Réduction du DPPH• (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl) .....	19
II.2.5.2 Pouvoir Réducteur.....	19
II.3 Activité antibactérienne.....	20
II.3.1 Définition d'un antibiotique .....	20

II.3.2 Modes d'action antibactérienne des huiles essentielles.....	20
II.3.3 Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne.....	21
II.3.3.1 Méthode de l'aromatogramme.....	21
II.3.3.2 Méthode de microatmosphères.....	21
II.3.3.1 Méthode de dilution.....	22

### Chapitre III: Plantes étudiée

III-1 <i>Pistacia lentiscus</i> .....	23
III-1-1 Description.....	23
III-1-2 Classification.....	23
III-1-3 Utilisation médicinale.....	23
III-2 <i>Myrtus communis</i> .....	24
III-2-1 Description.....	24
III-2-2 Classification.....	24
III-2-3 Utilisation médicinale.....	24

## PARTIE2: ETUDE EXPERIMENTALE

### Chapitre IV: Matériel et méthodes

IV.1 Matériel végétal.....	25
IV.1.1 Echantillonnage.....	25
IV.1.2 Séchage et stockage .....	26
IV.1.3 Extraction de l'huile essentielle.....	26
IV.1.4 Détermination du rendement d'extraction.....	27
IV.1.5 Conservation des huiles essentielles obtenues.....	27
IV.1.6 Analyse des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse CPG/SM.....	27
IV.1.7 Evaluation de l'activité antioxydante in vitro.....	28
IV.1.7.1 Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH•.....	29
IV.1.7.2 Méthode de pouvoir réducteur .....	29
IV.1.8 Evaluation de l'activité antimicrobienne .....	30
IV.1.8.1 Méthode d'aromatogramme.....	30
IV.2 Evaluation de l'effet protecteur des HE contre la toxicité du Pb .....	32
IV.2 Matériel animal.....	32
IV.2.1 Elevage des rats.....	32
IV.2.2 Traitement des rats.....	33
IV.2.3 Prélèvement sanguin, sacrifice et prélèvements des organes .....	34

---

IV.2.3.2 Prélèvement sanguin .....	35
IV.2.3.1 Sacrifices des animaux et prélèvement de certains organes.....	36
IV. 3 Exploitation statistique des résultats.....	37

### Chapitre V: Résultats et discussion

V.1 Rendement en huile essentielle.....	38
V.2 Analyse chromatographique des huiles essentielles.....	39
V.2.1 Analyse chromatographique des huiles essentielles de <i>Myrtus communis</i> .....	39
V.2.2 Analyse chromatographique des huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	40
V.3 Evaluation de l'activité antioxydante.....	43
V.3.1 Evaluation de l'activité anti radicalaire contre le radical libre DPPH•.....	43
V.3.2 Evaluation de pouvoir réducteur .....	46
V.4 Evaluation de l'activité antibactérienne.....	48
V.5 Evaluation de l'effet protecteur des HE contre la toxicité du Pb.. ..	51
V.5.1 Effets sur les paramètres pondéraux.....	52
V.5.2 Effets sur les paramètres hématologiques.....	55
V.5.3 Effets sur les paramètres biochimiques.....	57
Conclusion.....	61
Références bibliographiques.....	63
Annexes	

**HE:** Huiles Essentielles.

**AFNOR:** Association Française de Normalisation

**ANOVA :** analyse de la variance

**CPG:** Chromatographie en Phase Gazeuse.

**PM:** Poids Moléculaire.

**CPG/SM:** Chromatographie en Phase Gazeuse / Spectrométrie de Masse.

**DL<sub>50</sub>:** Dose Létal 50.

**ERO:** Espèces Réactives d'Oxygène.

**ROS:** Reactive Oxygen Species.

**SOD:** Superoxide Dismutase.

**GST:** Glutathion S Transférase.

**DPPH:** 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl.

**FRAP:** Ferric Reducing Ability of Plasma.

**CMI:** Concentration Minimal Inhibitrice.

**RHE:** Rendement en Huile Essentielle.

**FRAP:** Ferric Reducing Ability of Plasma.

**PR:** Pouvoir Réducteur.

**CE:** Concentration Efficace.

**HEB:** Huile Essentielle Brute.

**CR:** Concentration Réductrice.

**GR:** Globules Rouges.

**GB:** Globules Blancs.

**HGB:** hémoglobine.

**HCT:** hématocrite.

**VGM:** Volume Globulaire Moyen.

**TCMH:** Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine.

**CCMH:** Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine.

**ASAT:** Aspartate Amino-Transférase

**ALAT:** Alanine Amino-Transférase.

**TGO:** Glutamate Oxaloacétate Transaminase

**TGP:** Glutamate Pyruvate Transaminase

**PAL:** Phosphatase Alcaline.

Figure	Titre	Page
1	Principaux sesquiterpènes	4
2	Quelques organes sécréteurs des huiles essentielles	5
3	Schéma d'un montage de distillation	6
4	Dégâts des radicaux libres	14
5	les ERO et le système antioxydant	15
6	Espèces réactives oxygénées et systèmes de protection permettant de limiter leur effet toxique	17
7	Forme libre et réduite du DPPH	19
8	Structures de la membrane et de la paroi de peptidoglycane chez les bactéries Gram+/Gram-	21
9	Carte géographique de la région de Chahna	25
10	Localités de la commune de Chahna	25
11	Dispositif d'extraction des huiles essentielles (Clévenger)	26
12	Préparation des dilutions de l'huile essentielle des deux espèces	34
13	Schéma récapitulatif du protocole expérimental	36
14	Rendements en huiles essentielles des espèces étudiées	37
15	Chromatogramme des huiles essentielles de <i>M. communis</i>	40
16	Chromatogramme des huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus</i>	44
17	Activité antiradicalaire des deux plantes testées en comparaison avec l' $\alpha$ tocophérol	45
18	Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations utilisées de l'alpha tocophérol	45
19	Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations utilisées d'HE du <i>Myrtus communis</i>	45
20	Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations utilisées d'HE du <i>Pistacia lentiscus</i>	45
21	Pouvoir réducteur des HE de <i>Myrtus communis</i> et <i>Pistacia lentiscus</i> en comparaison avec l'alpha tocophérol	46
22	Pouvoir réducteur en fonctions des concentrations de l'alpha tocophérol	47
23	Pouvoir réducteur en fonction des concentrations en HE de <i>Myrtus communis</i>	48
24	Pouvoir réducteur en fonction des concentrations en HE de <i>Pistacia lentiscus</i>	48

25	Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles de <i>M. communis</i> et <i>P. lentiscus</i> vis-à-vis de la souche <i>E coli</i>	49
26	Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles de <i>M. communis</i> et <i>P. lentiscus</i> vis à vis de la souche <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	50
27	Changement du poids corporel des rats témoins et les rats traités	52
28	Poids du foie, du cœur et des reins.	54
29	Le poids de la rate, des poumons et de pancréas.	54
30	Nombre des globules blancs, globules rouges et le taux d'hémoglobine.	56
31	Le taux d'hématocrite, VGM, TGMH et CCMH.	56
32	Concentration du glucose, de l'urée et de la créatinine.	57
33	Concentration du cholestérol total et des triglycérides.	57
34	Concentration sérique de la TGO, de la TGP et de l'ALP.	58

Tableau	Titre	Page
1	Principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques	12
2	Principales sources de production des radicaux libres	13
3	Principaux modes d'action de quelques antioxydants	18
4	Altitude de la région de récolte	26
5	Rendements obtenus en huiles essentielles	37
6	Chromatogramme des huiles essentielles de <i>M.communis</i>	38
7	Taux des composés majeurs des huiles essentielles de <i>Myrtus communis</i>	40
8	Comparaison entre la composition chimique de l'HE de <i>Myrtus communis</i> de Jijel, de la France et de la Tunisie	40
9	Chromatogramme des huiles essentielles de <i>P.lentiscus</i>	41
10	Taux des composés majeurs des huiles essentielles de <i>P.lentiscus</i>	43
11	Comparaison entre la composition chimique de l'HE de <i>P.lentiscus</i> de Jijel, du Japon et de l'Espagne	43
12	Pourcentage d'inhibition de $\text{DPPH}\cdot$ par l' $\alpha$ tocophérol, de l'HE de <i>M.communis</i> et de <i>P.lentiscus</i>	44
13	Pouvoir réducteur de l' $\alpha$ tocophérol, de l'HE de myrtus communis et de Pistacia lentiscus et $\text{CR}_{0.5}$	47
14	Evaluation de l'activité antibactérienne des HE en fonction de diamètre d'inhibition	50
15	Diamètre des zones d'inhibition de la croissance des <i>E.coli</i> en présence de différentes concentrations en huiles essentielles	50
16	Diamètre des zones d'inhibition de la croissance des <i>Klebsiella pneumoniae</i> en présence de différentes concentrations en huiles essentielles	51

# Introduction

Les plantes ont toujours fait partie de la vie quotidienne de l'homme. Un grand nombre de plantes, aromatiques, médicinales, des plantes épicées et autres, possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture. elles ont constitué la source majeure de médicament grâce à leur richesse de ce qu'on appelle le métabolisme secondaire (Fouché et al., 2000).

Les métabolites secondaires ont fait l'objet de nombreuses études, leur teneur dans les différentes parties de la plante et son profil présentent une importante variabilité génétique (Les hybridations, Les facteurs de mutation...). À celle-ci s'ajoute une variabilité due à l'environnement (température, lumière..) aux conditions de culture, de récolte (mois, journée), d'extraction et d'analyse (Oussou et al., 2010).

Parmi les métabolites secondaires, les huiles essentielles qui ont fait l'objet de notre étude sont douées de propriétés antimicrobiennes et antioxydantes à des degrés divers, suivant leur richesse biochimique en terpènes, aldéhydes et alcool. Ces composés se trouvent dans toutes les parties de la plante selon leurs rôles défensifs (Oussou et al., 2010).

A cet effet, on s'est intéressé aux huiles essentielles de deux espèces appartenant à la famille des Myrtacées et Anacardiacees: *Myrtus communis* et *Pistacia lentiscus* afin de rechercher de leurs activités biologiques.

A cet effet, notre étude est divisée en deux parties:

- La première partie propose une revue bibliographique qui est articulée en trois chapitres. Le premier chapitre aborde des généralités sur les huiles essentielles. Le deuxième chapitre traite les activités biologiques des huiles essentielles et le troisième chapitre expose la monographie des plantes étudiées. Cet aperçu bibliographique a été un appui pour réaliser la partie expérimentale et l'interprétation de nos résultats.
- La deuxième partie illustre le matériel et les méthodes mis en œuvre pour l'évaluation des activités biologiques de l'huile essentielle extraite à partir des feuilles des plantes étudiées:
  - Activité antioxydante évaluée par deux méthodes différentes (piégeage du radical DPPH et pouvoir réducteur)
  - Activité antibactérienne évaluée par la méthode des disques vis à vie de deux souches bactériennes (*Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*).
  - Evaluer l'effet protecteur contre l'intoxication des rats par l'acétate de plomb.

Les résultats obtenus seront confrontés aux études d'autres auteurs, afin de faire une corrélation entre l'activité de l'huile essentielle de chaque plante et sa composition chimique. Le travail sera clôturé par une conclusion.

# Partie I

## Recherche bibliographique

# Chapitre I

## Les huiles essentielles

## I.1 Définition

Une huile essentielle (HE) est la fraction odorante volatile extraite des végétaux. C'est le parfum concrétisé de la plante, un véritable concentré. Elle peut être extraite de différentes parties d'un végétal: les feuilles (ex: Eucalyptus), les fleurs (ex: camomille), l'écorce (ex: la cannelle), le bois (ex: le cèdre), le zeste (ex: le citron) et bien d'autre encore: les graines, les baies, les fruits, le bulbe...etc (**Festy, 2007**).

Selon **Bruneton (1993)**, les huiles essentielles sont « des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation ».

Selon la norme **AFNOR NF T 75-006 (1987)**, une huile essentielle est un: « 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 physiques».

Et d'après **Lubinic (2006)**, les huiles essentielles sont des substances végétales, principalement des terpènes, apparentés à l'éther, aux alcools et aux aldéhydes.

## I.2 Propriétés physico-chimiques

- Les HE sont habituellement liquides à température ambiante, huileuses, odorantes et volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes (**AFSSAPS, 2008**).
- Leurs couleurs sont variées, beaucoup sont jaunâtres ou incolores mais les couleurs peuvent aller du jaune vert au brun rouge (**Chabert, 2014**).
- Leurs densité est en général inférieure à celle de l'eau (**Chabert, 2014**).
- Elles sont insolubles dans l'eau mais soluble dans l'alcool, dans l'éther et dans les corps gras (**Rubin, 2004**). Sauf exception comme l'HE de giroflier par exemple (**Chabert, 2014**).
- Elles sont composées de molécules à squelette carboné, le nombre d'atomes de carbone étant compris entre 5 et 22 (le plus souvent 10 ou 15) (**AFSSAPS, 2008**).
- Leurs composition chimique est très complexe et on les classe habituellement suivant leur fonction principale qui peut être éther, aldéhyde, phénol, acétone ou alcool (**Rubin, 2004**).
- On constate dans la plupart des huiles essentielles la présence de terpènes auxquels on attribue leur très grand pouvoir antimicrobien; elles sont par ailleurs digestives, antalgiques, stimulantes et cardiotonique (**Rubin, 2004**).
- Elles sont très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux, il convient alors de les conserver à l'abri de la lumière et de l'air (**Bruneton, 1993**).

### I.3 Composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes, contenant de nombreuses espèces chimiques appartenant au domaine de la chimie organique (Degryse et al., 2008).

On y trouve en plus des terpènes, des hydrocarbures, des esters, des lactones, des aldéhydes, des alcools, des acides, des cétones, des phénols, des oxydes et autres (Chouitah, 2012).

Le nombre des molécules chimiquement différentes qui constituent une huile essentielle est variable. La plupart sont poly-moléculaires, c'est-à-dire composées d'une grande diversité de composés (jusqu'à 500 molécules différentes dans l'huile essentielle de Rose). A côté des composés majoritaires (entre 2 et 6 généralement), on retrouve des composés minoritaires et un certain nombre de constituants sous forme de traces (Pibiri, 2005).

#### I.3.1 les terpénoïdes

Les terpénoïdes renferment plus de 40 000 structures et forment la plus grande classe de tous les métabolites connus. Ils répondent dans la plupart des cas à la formule générale  $(C_5H_8)_n$  (Chouitah, 2012; Fillatre, 2011).

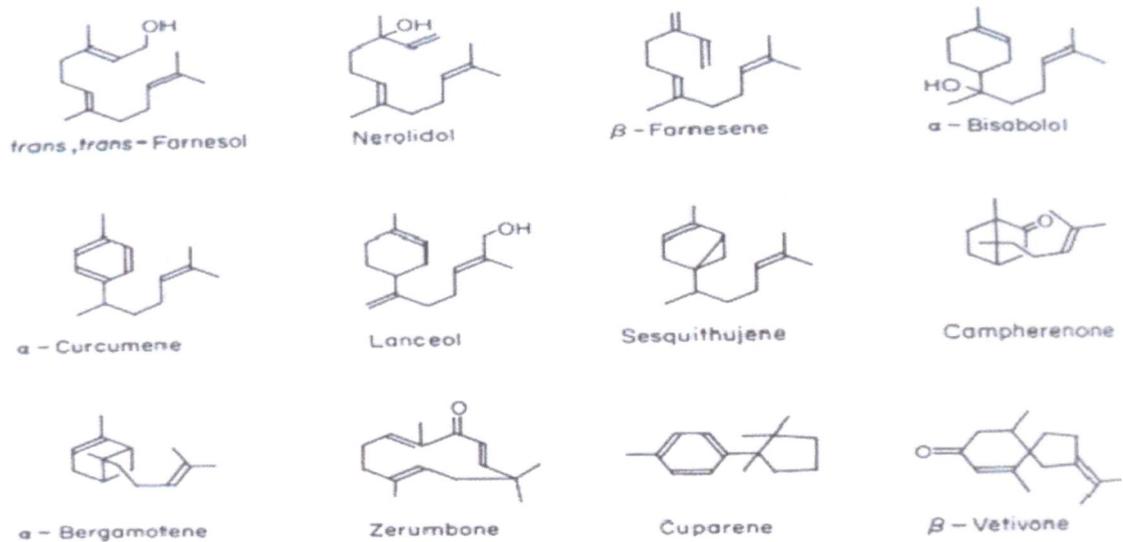
Tous les terpénoïdes sont synthétisés par la condensation des unités d'isoprène ( $C_5$ ) et sont classifiées par le nombre d'unités de cinq-carbone présent dans la structure de noyau (Tânia et al., 2012). En raison de leurs activités biologiques et leurs propriétés physico-chimiques, les terpénoïdes ont été exploitées par les humains sous forme de mélanges complexes ou sous forme de composés plus ou moins purs depuis des périodes antiques (Bohlmann et Keeling, 2008).

##### I.3.1.1 les monoterpènes

Ce sont des hydrocarbures en  $C_{10}$ . Plus de 900 monoterpènes connus se trouvent principalement dans 3 catégories structurales: les monoterpènes linéaires (acyclique), les monoterpènes avec un cycle unique (monocycliques) et ceux avec deux cycles (bicycliques) (Aba Tournou, 2012).

##### I.3.1.2 Les sesquiterpènes

Ce sont des hydrocarbures en  $C_{15}$ . Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes. Les sesquiterpènes se divisent en plusieurs catégories structurales, acyclique, monocyclique, bicyclique, tricyclique, polycyclique (figure 1) (Aba Tournou, 2012; Baser et Buchbuer, 2010).



**Fig.1:** Principaux sesquiterpènes (Aba toumnou, 2012).

### I.3.2 Les composés aromatiques

Les composés aromatiques des huiles essentielles sont principalement des dérivés du phénylpropane ( $C_6-C_3$ ), parmi lesquels se trouvent des aldéhydes (cinnamaldéhyde), des alcools (alcool cinnamique), des phénols (chavicol, eugenol), des dérivés méthoxy (anethol, estragol) ou méthylène dioxy (myristicine, safrol) (Fillatre, 2011).

### I.3.3 Les composés d'origine diverses

Les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatique, généralement de faible masse moléculaire: carbure (linéaires et ramifiés, saturés ou non, rarement spécifique) acides ( $C_3$  à  $C_{10}$ ), alcools, aldéhyde (octanal, décanal des citrus) ester acyclique (principalement dans les fruits), lactones ( $\gamma$ -décylactone)... Il n'est pas rare de trouver des produits de masses moléculaires plus importantes: homologues des phénylpropanes, diterpènes, coumarines (Bruneton, 1993).

### I.4 Facteurs de variabilité de la composition des huiles essentielles

Les huiles essentielles présentent une très grande variabilité qui peut s'expliquer par différents facteurs:

- **L'origine géographique** : par exemple on parle de HE d'origan, il s'agit-il de l'origan de Grèce (*origanum vulgare L*), de l'origan d'Espagne (*corydothymus capitatus L*) ou l'origan de Turquie (*origanum onites L*) (Bruneton, 1993).
- **Influence de chimiotypes** : les chimiotypes ou la race chimique permet de définir la ou les molécules biologiquement actives présentes dans les HEs. Associée à la dénomination latine, la

précision du chimiotype permet la compréhension précise du mode d'action des HE (**Lahlou, 2004**).

- **L'influence du cycle végétative:** pour une espèce donnée la proportion des différents constituants d'une HE peut varier le long de son développement (**Bruneton, 1993**).
- **L'influence des facteurs extrinsèques:** il s'agit là de l'incidence des facteurs de l'environnement et des pratiques culturales. La température, l'humidité relative, la durée totale d'insolation, le régime hydrique et le régime des vents exercent une influence directe, surtout chez les espèces qui possèdent des structures histologiques de stockage superficielles. Lorsque la localisation est plus profonde la qualité des HE est beaucoup plus constante (**Bruneton, 1993**).
- **L'influence du procédé d'obtention:** la labilité des constituants des HE explique que la composition du produit obtenu par hydrodistillation est le plus souvent différente de celle du mélange de constituants initialement présent dans les organes sécréteur du végétale. Au cours de l'hydrodistillation, l'eau, l'acidité et la température peuvent induire l'hydrolyse des esters mais aussi des réarrangements, des isomérisations, des racémisations, des oxydations etc (**Bruneton, 1993**).

### I.5 Répartition et localisation

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs, les plantes capables d'élaborer les constituants qui composent ces huiles essentielles sont connues sous le nom de plantes aromatiques, réparties dans un nombre limité de familles, ex: Myrtacées, Lauracées, Rutacées, Lamiacées, Astéracées, Apiacées, Cupressacées, Poacées, Zingibéracées, Pipéracées,...etc. (**Bruneton, 1993**).

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux: feuilles, fleurs, écorces, bois, racines, des rhizomes, fruits et des graines. La synthèse et l'accumulation sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées à proximité de la surface de la plante (**Mohammedi, 2006**).

Les HE s'accumulent dans les cellules à essences des Lauraceae ou des Zingiberaceae, poils sécréteurs des Lamiaceae, poches sécrétrices des Myrtaceae ou des Rutaceae, canaux sécréteurs des Apiaceae ou des Asteraceae (figure 2) (**Bruneton, 1993**).

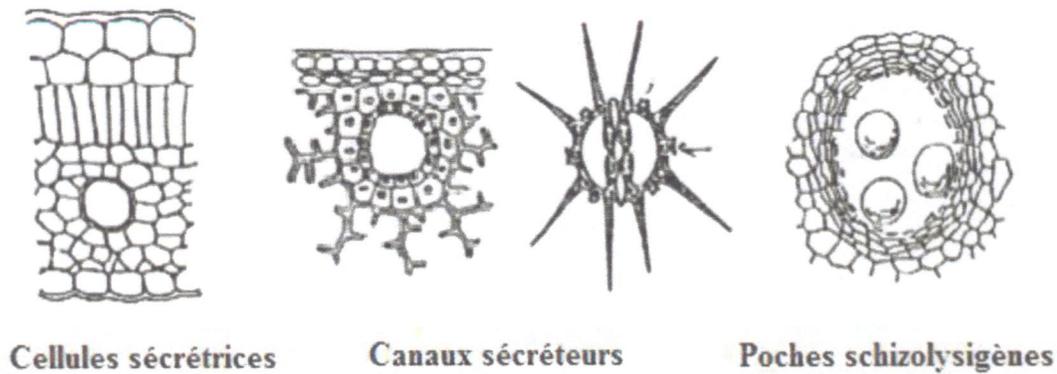


Fig.2: Quelques organes sécréteurs des huiles essentielles (Ngakegni-Imbili, 2012).

## I.6 Les méthodes d'extraction et d'identification des huiles essentielles

### I.6.1 Méthodes d'extraction

Il existe plusieurs techniques d'extraction des produits de haute valeur présents dans les plantes. Ces techniques peuvent être dites conventionnelles (utilisées depuis longtemps) et nouvelles (développées plus récemment) (Penchev, 2010).

#### I.6.1.1 Distillation

C'est la méthode la plus courante et la plus efficace (Gawelik, 2011). La technique d'extraction des huiles essentielles utilisant l'entraînement des substances aromatiques grâce à la vapeur d'eau. La méthode est basée sur l'existence d'un azéotrope de température d'ébullition inférieure aux points d'ébullition des deux composés, l'huile essentielle et l'eau, pris séparément. Ainsi, les composés volatils et l'eau distillent simultanément à une température inférieure à 100 °C sous pression atmosphérique normale (figure 3). En conséquence, les produits aromatiques sont entraînés par la vapeur d'eau sans subir d'altérations majeures (Franchomme et al., 1990 in Piochon, 2008).

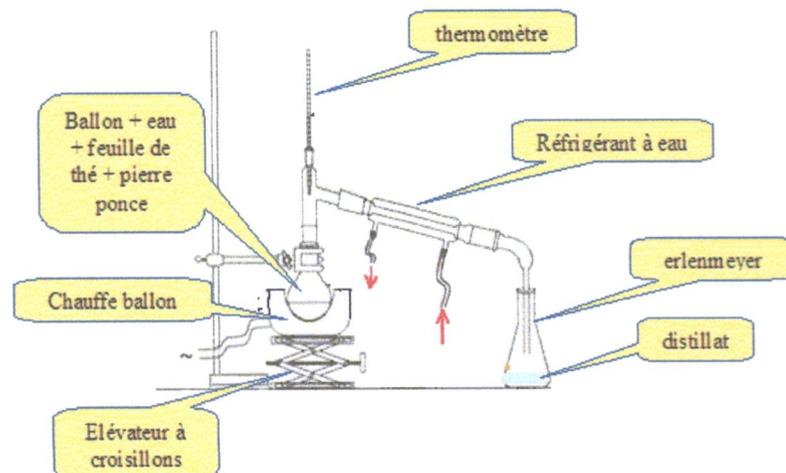


Fig.3: Schéma d'un montage de distillation (El haib, 2011).

### \*Hydrodistillation

L'hydrodistillation consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition et l'opération est généralement conduite à pression atmosphérique (El kalamouni, 2010). Le matériel végétal à distiller se trouve en contact direct avec l'eau bouillante. Il peut flotter ou être complètement immergé selon sa densité et la quantité de matière manipulée. L'évaporation de l'eau dans l'alambic peut être réalisée par chauffage direct (alambic à feu nu) ou par injection de vapeur surchauffée (Benjilali, sd).

### \*Distillation par l'entraînement à la vapeur d'eau

Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau. La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques: le matériel végétal ne baignant pas directement dans l'eau bouillante (Franchomme et al., 1990 in Piochon, 2008).

### \*Hydrodiffusion

Cette technique relativement récente est particulière. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas (*per descendum*) et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils. Cependant, l'huile essentielle obtenue avec ce procédé contient des composés non volatils ce qui lui vaut une appellation spéciale: « essence de percolation » (Franchomme et al., 1990 in Piochon, 2008).

#### I.6.1.2 Extraction par les corps gras

La méthode d'extraction par les corps gras est utilisée en fleurage dans le traitement des parties fragiles de plantes telles que les fleurs, qui sont très sensibles à l'action de la température. Elle met à profit la liposolubilité des composants odorants des végétaux dans les corps gras. Le principe consiste à mettre les fleurs en contact d'un corps gras pour le saturer en essence végétale. Le produit obtenu est une pommade florale qui est ensuite épuisée par un solvant qu'on élimine sous pression réduite (Chouitah, 2012).

### I.6.1.3 Extraction par micro-ondes

L'extraction assistée par micro-ondes est également une alternative aux méthodes d'extraction conventionnelles. Elle utilise de plus petites quantités de solvant, n'est pas coûteuse et est considérablement rapide. Cependant, la température opératoire de cette technique est relativement haute (100 – 150 °C), ce qui pose des problèmes quand il s'agit de l'extraction d'antioxydants. Les autres inconvénients de cette technique sont d'une part le rendement faible lorsque les solutés ou les solvants sont apolaires et d'autre part le besoin de l'étape postérieure de filtration ou de centrifugation pour éliminer le résidu solide de l'extrait (**Penchev, 2010**).

### I.6.1.4 Extraction par pression à Froid

Ce procédé d'extraction des HE est réservé aux zestes tels que citron, orange, mandarine ou pamplemousse. De nos jours, on utilise un procédé utilisant des éponges naturelles. Les zestes sont pressés à froid et l'HE (qui n'en est en fait pas vraiment une) est récupérée par les éponges. Il suffit alors de presser les éponges pour récupérer l'HE en la séparant de l'eau qui lui est restée attachée et en la filtrant (**Pielquin, sd**).

## I.6.2 Méthodes d'identification

La séparation et l'identification des constituants volatils d'un extrait présente bien moins d'alternatives que sa préparation. En effet, la chromatographie en phase gazeuse (CPG) est la méthode de référence dans l'analyse des huiles essentielles et des composés organiques volatiles; elle permet l'analyse de mélanges, qui peuvent être très complexes, de nature et de volatilité très variées (**El kalamouni, 2010**).

### I.6.2.1 La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Est une méthode séparative parmi les plus employées car elle allie rapidité et efficacité de séparation. Elle permet d'analyser des mélanges complexes de gaz ou des composés qui peuvent être volatilisés sans être décomposé (**Teissier et Madet, 2004**).

Elle s'applique à des échantillons gazeux ou susceptibles d'être volatilisés par élévation de la température, aux molécules de bas poids moléculaires ( $PM < 500 \text{ g mol}^{-1}$ ) et aux composés stables avec la température (**Jacob, 2010**).

L'échantillon est vaporisé et injecté au sommet de la colonne. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile (**Folco et al., 1999**).

### I.6.2.2 Le couplage Chromatographie phase gazeuse/Spectrométrie de masse

Dans le secteur particulier des huiles essentielles, le couplage CPG/SM est, aujourd'hui, la technique de référence. Il s'agit d'un mode d'ionisation plus doux que l'impact électronique dans lequel il est recherché des réactions ions-molécules entre les molécules de l'échantillon en phase gazeuse et les ions d'un plasma obtenus à partir d'un gaz réactant. La réaction plasma/molécule produit des ions positifs ou négatifs qui sont repérés sur des spectres de masse. L'ionisation peut se faire par transfert de proton, réactions d'association ou formation d'adduits, perte ou abstraction d'un hydrure ou échange de charge. La contribution à chacune de ces réactions d'ionisation dépend de la nature de la substance à analyser et du gaz réactant. La faible quantité d'énergie transférée lors de l'ionisation limite les fragmentations et permet ainsi une meilleure différenciation des isomères (Muselli, 2007).

## I.7 Rôle, utilisation et importance

### I.7.1 Rôle des huiles essentielles chez la plante

Les huiles essentielles jouent un rôle important dans la protection des plantes à cause de leurs activités antibactériennes, antiviral, antifongique, insecticides et également contre des herbivores. Elles peuvent également attirer quelques insectes pour favoriser la dispersion de pollen et des graines, ou repousser autres indésirables (Bakkali *et al.*, 2008).

### I.7.2 Utilisation et Importance

Outre l'emploi strictement médical des huiles essentielles, celle-ci sont utilisées dans de nombreux domaines tels que la parfumerie, la cosmétologie, l'agro-alimentaire et l'industrie chimique (Chouitah, 2012).

Les huiles essentielles interviennent dans la fabrication:

- Des produits alimentaires: jus de fruits, crèmes glacées, bonbons, etc.
- De tabac pour cigarette,
- Des produits d'hygiène et de beauté,
- Des parfums, la désinfection des locaux (elles sont antiseptiques),
- Des colles et vernis dans l'industrie chimique (Chouitah, 2012).

### I.7.2.1 Domaine pharmacologique

Les propriétés pharmacologiques des HE confèrent une utilisation médicale (**Couderc, 2001**). Elles agissent surtout par l'intermédiaire de l'odorat ou du contact avec la peau et les muqueuses par onction, application de compresses ou bains, mais certaines conviennent aussi à l'usage interne.

Les huiles essentielles sont des: Anti-infectieuses, régulatrices du système nerveux, Drainantes respiratoires, Cicatrisantes (**Mayer, 2012**) et Anti-inflammatoires (**Piochon, 2008**).

### I.7.2.2 Domaine cosmétique

C'est le principal débouché des huiles essentielles. La cosmétologie et le secteur des produits d'hygiène sont aussi consommateurs, même si le cout élevé des produits naturels conduit à privilégier parfois les produits synthétiques. Elles sont intégrées dans des analgésiques pour la peau, les produits solaires ainsi que de nombreux produit d'ambiance comme les liquides pour pots-pourris (**Couderc, 2001**).

Les huiles essentielles appliquées directement sur la peau, elles fortifient les tissus, maintiennent leur souplesse et éclairent le teint. Certaines huiles essentielles riches en antioxydants, favorisent le renouvellement des cellules retardant ainsi le vieillissement cellulaire (**Buronzo, 2008**).

### I.7.2.3 Domaine alimentaire

Les études faites à travers le monde, montrent que les huiles essentielles peuvent être ajoutées à peu près à tous les aliments (**Caillet et Lacroix, 2007**). L'utilisation d'huiles essentielles dans les préparations culinaires est plus anecdotique. Cependant, on constate que l'on trouve depuis de nombreuses années des produits alimentaires industriels contenant des huiles essentielles et que de plus de livres de cuisine proposent de les utiliser, en faible quantité, pour relever certains plats: assaisonnement à l'huile végétale additionnée d'huile essentielles (thym, basilic, romarin, origan, ...) et parfum de desserts (huile essentielle d'agrumes, vanille,...) (**Degryse et al., 2008**). Ainsi que leur utilisation dans: les boissons non alcooliques, les confiseries, les produits laitiers ou carnés, les soupes, les sauces, les snacks, les boulangeries, ainsi que la nutrition animale (**Couderc, 2001**). Les huiles essentielles sont le plus souvent utilisées pour aromatiser les aliments (**AFSSPS, 2008**).

En cuisine, les huiles essentielles permettent de remplacer les herbes fraîches lorsqu'elles ne sont pas disponibles tout en apportant aux recettes leurs vertus médicinales (**Buronzo, 2008**).

### I.8 La toxicité des huiles essentielles

Certaines huiles essentielles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leur pouvoir irritant (huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde) ou phototoxique (huiles de *citrus* contenant des furocoumarines. D'autres huiles essentielles ont un effet neurotoxique. (Piochon, 2008).

En règle générale, les huiles essentielles ont une toxicité aiguë faible ou très faible par voie orale: une  $DL_{50}$  comprise entre 2 et 5 g/kg pour la majorité des huiles couramment utilisées (anis, eucalyptus, girofle, etc.) ou le plus fréquemment supérieure à 5 g/kg (camomille, citronnelle, lavande, marjolaine, vétiver, etc.); d'autres ont une  $DL_{50}$  inférieure à 1g/kg: l'huile essentielle de boldo (0.13 g/kg); l'essence de moutarde (0.34 g/kg); les essences d'origan et de la sarriette (1.37 g/kg); les huiles essentielles du basilic, de l'estragon et de l'hysope (1.5 ml/kg). Tandis que la toxicité chronique est assez mal connue (Buckle, 2003).

## Chapitre II

# Activité biologique des huiles essentielles

## II.1 Activité antioxydante

### II.1.1 Espèces réactives de l'oxygène (ERO)

#### II.1.1.1 Définition

Les "espèces réactives de l'oxygène" (**ROS**, de l'anglais Reactive Oxygen Species) sont des dérivés de l'oxygène dont certains électrons se trouvent dans un état énergétique excité, donc très réactionnel, certains de ces dérivés portent un électron non apparié (radicaux libres) (**Mercan, 2010**).

#### II.1.1.2 Les principales espèces réactives d'oxygène

Les espèces réactives oxygénées (ERO) incluant les radicaux libres comme le radical hydroxyl ( $\text{OH}^\bullet$ ), le radical superoxyde ( $\text{O}_2^\bullet$ ) et sa forme protonnée ( $\text{HO}^{2\bullet}$ ), le radical peroxy ( $\text{ROO}^\bullet$ ) et les espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ), Acide hypochlorique  $\text{HOCl}$  et Peroxynitrite  $\text{NOO}^-$  (Tableau 1) (**Baser et Buchbuer, 2010**). Il ne faut pas penser que tous les radicaux de l'oxygène sont extrêmement réactifs, cette réactivité étant très variable selon la nature du radical (**Favier, 2003**).

**Tableau 1:** Principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques (**Baser et Buchbuer, 2010**).

Nom	Symbole
Espèces radicalaires	
Anion superoxyde	$\text{O}_2^\bullet$
Radical hydroxyle	$\text{OH}^\bullet$
Monoxyde d'azote	$\text{NO}^\bullet$
le radical peroxy	$\text{ROO}^\bullet$
Espèces non radicalaires	
Peroxyde d'hydrogène	$\text{H}_2\text{O}_2$
Acide hypochlorique	$\text{HO Cl}$
Oxygène singulier	$^1\text{O}_2$
Peroxynitrite	$\text{NOO}^-$

### II.1.1.3 Les sources des ERO

Les ERO peuvent être produites par toute réaction impliquant de l'O<sub>2</sub>. Les sources principales des ERO sont (tableau 2):

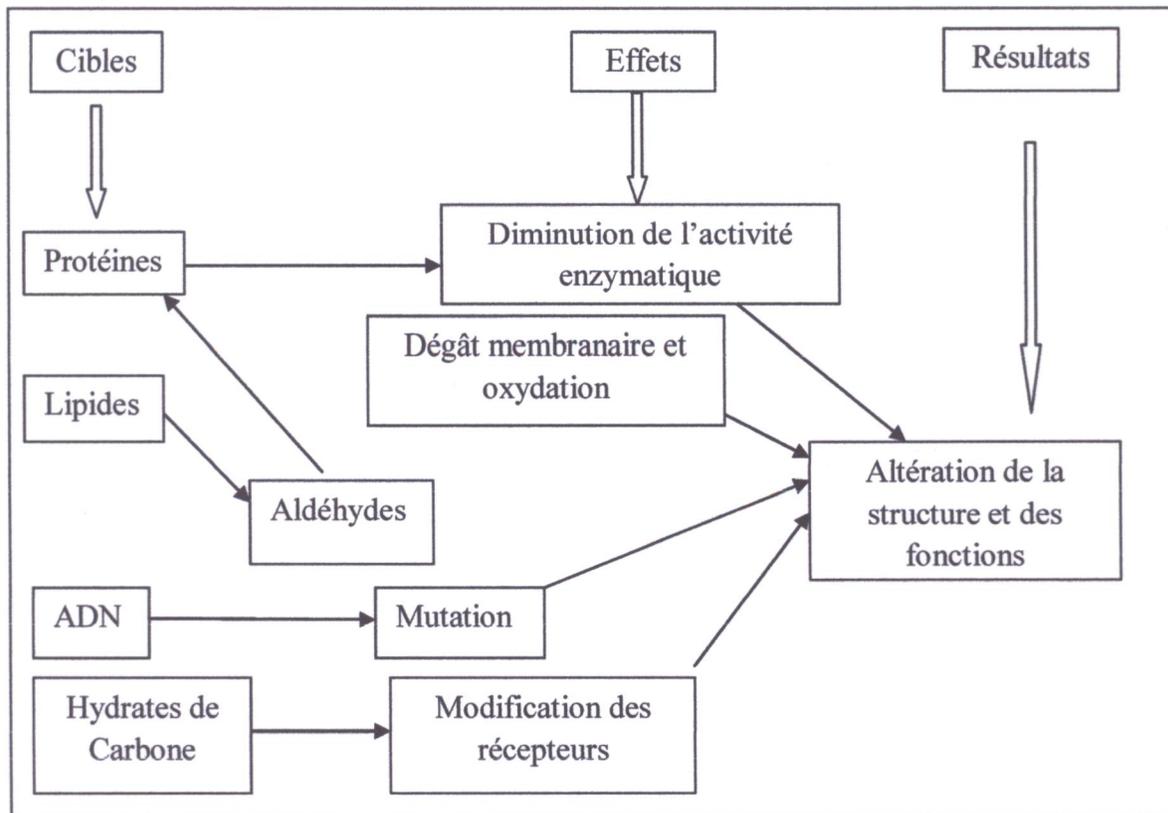
**Tableau 2:** Principales sources de production des radicaux libres (**Pastre, 2005**).

Sources endogènes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Production de radicaux libres lors des respirations</li> <li>• oxydatives (mitochondries)</li> <li>• Cellules phagocytaires</li> <li>• Métabolisme de l'acide arachidonique</li> <li>• Système xanthine/Xanthine oxydase</li> </ul>
Sources exogènes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rayonnement électromagnétique</li> <li>• Métaux de transition</li> <li>• Pesticides</li> <li>• Médicaments...</li> </ul>

### II.1.1.4 Conséquences des espèces réactives de l'oxygène

La production excessive des espèces réactives de l'oxygène provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides) (figure 5) (**Wang et al., 2010**) mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (**Favier, 2003; Pincemail et al., 1999**).

L'organisme peut aussi réagir contre ces composés anormaux par production d'anticorps, qui malheureusement peuvent aussi être des auto-anticorps créant une troisième vague d'attaque chimique (**Favier, 2003**).



**Fig.4 :** Dégâts des radicaux libres (Tacchini, sd).

### II.1.2 Le stress oxydant

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène et la destruction par des systèmes de défenses anti-oxydantes. Les radicaux libres peuvent engendrer des dommages importants sur la structure et le métabolisme cellulaire en dégradant de nombreuses cibles: protéines, lipides et acides nucléiques. Les radicaux libres sont une forme particulière d'espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un électron célibataire (ou non apparié) (Hamadi, 2010; Barouki ,2006; Defraigne et Pincemail, 2007).

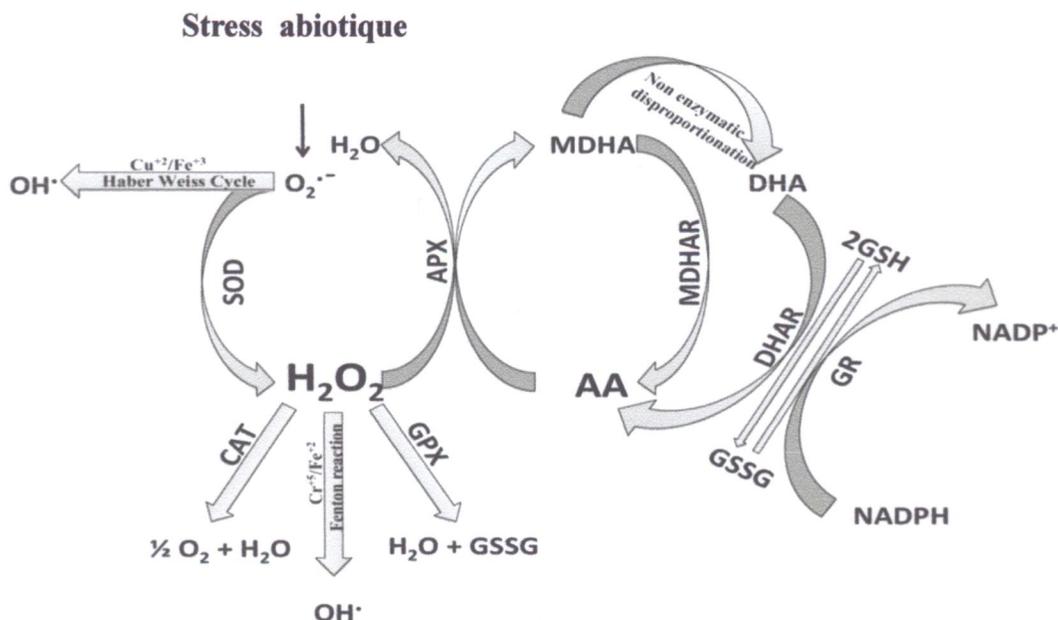
## II .2 Le système antioxydant

### II.2.1 Définition

Les antioxydants sont des substances qui, lorsqu'elles sont présentes à une concentration faible par rapport à un substrat oxydable, retardent de façon significative ou empêchent l'oxydation du substrat (Mercan, 2010).

## II.2.2 Type des systèmes de défense antioxydant

Les cellules possèdent des mécanismes de défense qui utilisent de nombreuses stratégies anti-oxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (**Figure 9**) (**Gill et Tuteja, 2010**). Les défenses antioxydantes peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques (**Wang et al., 2010**).



**Fig.5:** les ERO et le système antioxydant (**Gill et Tuteja, 2010**).

### II.2.2.1 Antioxydants enzymatiques

#### A- Superoxyde dismutase (SOD)

Le superoxyde dismutase est l'enzyme antioxydante la plus importante dans la défense contre le stress oxydatif; est une metalloenzyme qui dismute l'anion superoxyde en oxygène moléculaire et peroxyde d'hydrogène (**Hamadi, 2010**).

Il existe trois différentes classes de SOD, catalysant toutes la même réaction. La SOD à cuivre et à zinc (Cu, Zn SOD), la SOD à fer (FeSOD), Et la SOD à manganèse (MnSOD) (**Zhiri, 2006**).

#### B- Catalase

La catalase est une enzyme responsable de la détoxification du peroxyde d'hydrogène produit dans les conditions physiologiques.

C'est un tétramère dont chaque unité porte une molécule d'hème et une molécule de NADPH. La fixation du NADPH sur la catalase augmente son efficacité et le protège contre l'inactivation (**Gill et Tuteja, 2010**). Elle est principalement située dans les peroxyosomes de tous les types cellulaires de mammifères où  $H_2O_2$  est généré par les différentes oxydases. Cette enzyme est présente dans les cellules de presque tous les organismes vivants, c'est-à-dire les bactéries, les champignons, les plantes et les animaux (**Haleng et al., 2007**).

### C- Glutathione-S-transférase (GST)

Le glutathion S-transférase est une famille des enzymes multifactorielles présentes chez tous les organismes. La glutathion-S-transférases (GST) est un système très important dans la protection de la cellule contre les espèces réactives de l'oxygène, par sa capacité de conjuguer le glutathion avec les composés électrophiles et la réduction des peroxydes (**Gill et Tuteja, 2010**).

### II.2.2.2 Antioxydants non enzymatiques

Certaines substances ont la propriété de piéger et de détruire les espèces réactives de l'oxygène. Il s'agit de composés facilement oxydables présents dans le cytoplasme (glutathion, acide ascorbique) ou dans les membranes cellulaires (alpha-tocophérol, caroténoïdes) (**Haleng et al., 2007**).

#### A- Vitamine E

Sous le terme vitamine E est regroupée la famille des tocophérols ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ). Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines, où elle joue un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par un stress oxydant (**Bührer et al., 2011**).

#### B- Vitamine C (acide ascorbique)

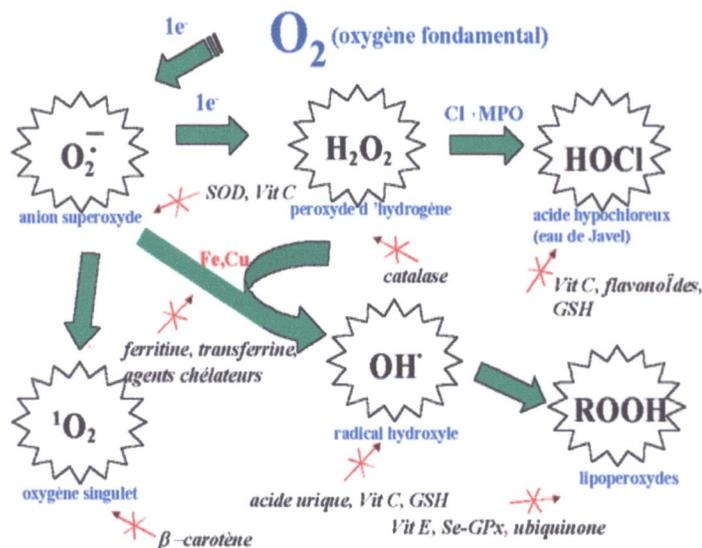
La vitamine C (acide ascorbique) n'est pas synthétisée par l'organisme. Elle est hydrosoluble à la concentration physiologique. Lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, elle prend une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E oxydée (**Blog, 2006**).

#### C- Glutathion

Le Glutathion est le principal agent responsable de la bonne santé du corps. Produite naturellement dans le corps (**Gutman, 2000**).

C'est un tripeptide, dont les propriétés réductrices et nucléophiles jouent un rôle majeur dans la protection contre les altérations oxydantes des lipides, des protéines et des acides nucléiques (Hamadi, 2010).

En situation de stress oxydant, son rôle protecteur et détoxifiant réside principalement dans sa fonction de co-substrat des glutathion peroxydases. Mais il fait aussi l'objet d'interactions synergiques avec d'autres composants du système de protection antioxydante tels que la vit C, la vit E et les superoxydes dismutases ( Hamadi, 2010).



**fig.6:** Espèces réactives oxygénées et systèmes de protection permettant de limiter leur effet toxique (Pincemail et al., 1999).

#### D- Les composés phénoliques

L'appellation polyphénols ou composés phénoliques regroupe un vaste ensemble de plus de 8000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun: la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 atome de carbone, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (Hennebelle et al., 2004).

Les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants dans le régime alimentaire. Leurs principales sources alimentaires sont les fruits, les légumes, les céréales, le chocolat, les boissons d'origine végétale tels que les jus de fruits, le thé, le café et bien d'autres (Scalbert et al, 2005).

#### D- Oligoéléments

Les oligoéléments servent de cofacteurs aux enzymes antioxydantes, ont aussi des propriétés antioxydantes. Des métaux tels que le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn) et dans certains micro-organismes le nickel (Ni) et le fer (Fe), jouent un rôle important en tant que catalyseur de la SOD. De la même façon le sélénium (Se) et le fer (Fe) qui sont les éléments catalyseurs de la GPx et la catalase, respectivement (De moffarts et al., 2005).

## E- Les huiles essentielles

Les composés chimiques retrouvés dans les huiles essentielles responsables de l'odeur de celles-ci sont des substances actives (terpènes, alcools, aldéhydes) dotées de propriétés antioxydantes et antibactériennes (Nguemtchouin, 2012).

### II.2.3 Modes d'action des antioxydants

Dans l'organisme, il existe plusieurs types de molécules à activité antioxydante dont les mécanismes d'action sont différents (Tableau 3).

**Tableau 3:** Principaux modes d'action de quelques antioxydants (Pastre, 2005).

	Nature	Mode d'action
Défenses non enzymatiques	Vitamine E	
	Vitamine C	
	Bêta carotène	Fixation des métaux de transition
	Ubiquinone,acide urique...	
Défenses enzymatiques	Superoxyde dismutase	Catalyse la dismutation de l'anion superoxyde
	Catalase	Métabolise H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Action réductrice sur H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> et
	Glutathion peroxydase	hydroperoxydation



### II.2.4 Les principales sources d'antioxydants

#### A- Les médicaments

Certains médicaments (exemple du probucol (lurselle) fait diminuer le taux du cholestérol dans le sang et, la N- acétylcystéine agit dans la régénération du glutathion en pénétrant les cellules.

Les propriétés de la glutathionne ont été reconnues lors d'études sur les phospholipides des feuilles de certains végétaux. En effet les thiols sont beaucoup plus actifs que les hydrocarbures, les alcools ou les phénols comme agents de capture radicalaire (Muanda, 2010).

#### B- Les vitamines

- La vitamine C: En règle générale, C est abondante dans les végétaux à chlorophylle et caroténoïdes (légumes: chou-fleur, brocoli, poivron, pomme de terre et le persil, salades, et fruits: groseilles, fraises, citron, oranges, kiwis) (Blog, 2006).

- La vitamine E: On la retrouve dans les huiles végétales (arachides, soja, chardon, tournesol, olive pressé à froid), les amandes, les graines, le lait, les œufs, les légumes à feuilles vertes (Muanda, 2010).
- $\beta$ -carotène: Il est présent dans les légumes verts, la salade, les carottes, l'abricot, le melon, les épinards, la papaye (Muanda, 2010).

### C- Les antioxydants naturels

Ils sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures. Ce sont des composés phénoliques et des huiles essentielles (Muanda, 2010). Ils constituent une source importante d'antioxydants (Aouissa, 2002).

## II.2.5 Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

### II.2.5.1 Réduction du DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl)

Une méthode rapide, simple et peu coûteuse pour mesurer la capacité antioxydante des substances comporte l'utilisation du radical libre, 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Prakash et al., sd). Ce test, largement utilisé; il permet de comparer un grand nombre de composés. Les résultats peuvent être exprimés en pourcentage de réduction de DPPH $\bullet$ , pour une concentration en antioxydant donnée et un temps donné (Portes, 2008).

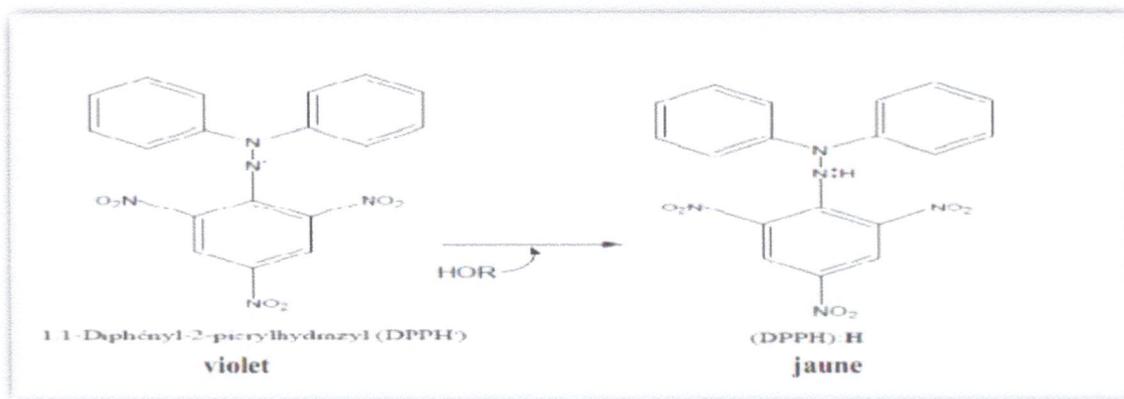


Fig.7: Forme libre et réduite du DPPH (Prakash et al., sd ).

### II.2.5.2 Pouvoir réducteur

Cette technique a été développée pour mesurer la capacité du plasma à réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). En effet le  $\text{Fe}^{3+}$  participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. Le  $\text{Fe}^{2+}$  à un pH faible forme un complexe avec la 2, 4,6-tris (2-pyridyl)-1, 3,5-s-triazine de couleur bleue qui a une absorption maximale à 700 nm. Ainsi, la formation de ce

complexe indiquera un pouvoir réducteur et déterminera la capacité d'un composé à se comporter comme un antioxydant.

Les valeurs sont obtenues par comparaison de l'absorbance à 700 nm du mélange réactionnel contenant l'échantillon à tester avec celle d'un mélange réactionnel contenant une concentration connue en  $\text{Fe}^{2+}$  (**Pulido et al, 2000**).

### II.3 Activité antibactérienne

Plusieurs études ont montré que les huiles essentielles sont capables de s'attaquer aux microbes les plus puissants, comme le staphylocoque, le bacille de koch (tuberculose) ou le bacille typhique (typhoïde) (**Buronzo, 2008**).

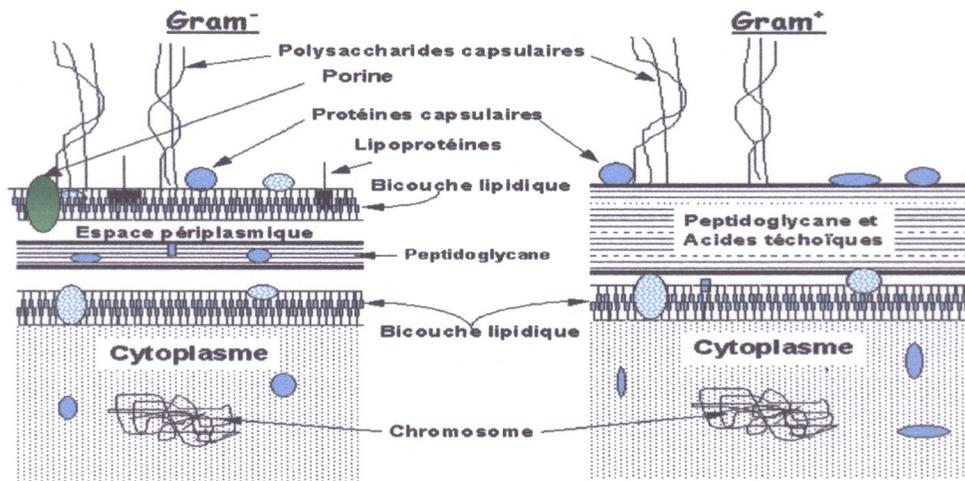
#### II.3.1 Définition d'un antibiotique

Un antibiotique est une substance antimicrobienne d'origine biologique, c'est-à-dire produite par un microorganisme (champignon microscopique et bactérie) ou de synthèse chimique et qui est capable d'inhiber la multiplication ou de détruire d'autres microorganismes (**Boulaïbal, 1993; Favet, 2014; Archambaud, 2009**).

#### II.3.2 Modes d'action antibactérienne des huiles essentielles

Les huiles essentielles possèdent plusieurs modes d'action sur les différentes souches de bactéries, mais 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 (**Eberlin, 1994**).
- 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 (**Caillet et Lacroix, 2007**).



**Fig.8 :** Structures de la membrane et de la paroi de peptidoglycane chez les bactéries Gram<sup>+</sup>/Gram<sup>-</sup> (Malecky, 2007).

### II.3.3 Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne

La majorité des recherches se fait par l'une des trois méthodes suivantes: méthode de l'aromatogramme, méthode de microatmosphères et la méthode de dilution.

#### II.3.3.1 Méthode de l'aromatogramme

C'est la méthode utilisée dans notre travail (page 31). Elle consiste à mesurer *in vitro* le pouvoir antibactérien des huiles essentielles. Différents types d'aromatogrammes, en milieu solide, liquide ou gazeux, sont exploitables. Cependant, en pratique quotidienne, c'est le milieu solide qui est le plus simple et le plus facilement reproductible (Zhiri, 2006).

La limite de ces tests est bien sûr celle de l'*in vitro*. L'aromatogramme représente cependant un point de repère essentiel puisque cette technique est identique à celle utilisée pour mesurer l'activité bactéricide des antibiotiques (Zhiri, 2006), généralement cette méthode est employée comme contrôle préliminaire pour activité antibactérienne avant des études plus détaillées (Burt, 2004), Et repose sur le pouvoir migratoire des substances sur le milieu gélosé (Ouelhadj et al., sd).

#### II.3.3.2 Méthode de microatmosphères

Cette méthode est rarement citée. C'est une technique d'étude en phase vapeur, son principe est d'ensemencer une boîte de Pétri avec les germes testés, tandis que l'on dépose quelques gouttes d'HE sur un papier filtre au fond et au centre du couvercle. La boîte est incubée couvercle en bas. Il se produit une évaporation des substances volatiles et on lit après incubation, la croissance des germes ou l'inhibition de leur croissance (Rhayour, 2002).

La différence entre cette méthode et l'aromatogramme réside principalement dans la position du disque imprègne. Ce dernier est déposé au centre du couvercle de la boîte Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience. Celui-ci n'est donc plus en contact avec le milieu gélose (Boukhatem et *al.*, 2014).

### II.3.3.3 Méthode de dilution :

La méthode par dilution a pour but d'évaluer des concentrations minimales inhibitrices (CMI). Elle consiste à déterminer la plus faible concentration d'un agent antimicrobien, nécessaire pour inhiber la croissance d'un microorganisme (Derwich et *al.*, 2010).

chapitre III

Plantes étudiées

### III.1 *Pistacia lentiscus*

#### III.1.1 Description

*Pistacia lentiscus* est un arbrisseau thermophile de 1 à 3 mètres, appartenant à la famille des Anacardiaceae. Il est vivace, ramifié, à petites feuilles elliptiques et coriaces, à fleurs rougeâtres en grappes et à fruits ronds, lumineux et rouges qui noircissent en mûrissant. Originaire du bassin méditerranéen, le lentisque pousse à l'état sauvage dans la garrigue et sur les sols en friche. On le cultive pour sa résine à odeur forte, que l'on récolte, après incision de l'écorce, en été et en automne (Benhammou et al., 2008; Gardeli et al., 2008; Longo et al., 2007; Palacio et al., 2005; Castola et al., 1999; Delili, 2007).

#### III.1.2 Classification

La classification qu'occupe *Pistacia lentiscus* dans la systématique est la suivante:

- Embranchement: Spermatophytes.
- Sous-embranchement: Angiospermes.
- Classe: Magnoliopsida-Dicotylédones.
- Ordre: Sapindales.
- Famille: Anacardiaceae.
- Genre: *Pistacia*.
- Espèce: *Pistacia lentiscus* L.

Noms vernaculaire: -Anglais: Chios mastic tree.

-Français: Lentisque.

-Arabe: الظرو

#### III.1.3 Utilisation médicinale

Le *Pistacia lentiscus* a une longue tradition dans la médecine folklorique depuis les Grecs anciens. La partie aérienne a été traditionnellement employée comme stimulant, pour ses propriétés diurétiques, et pour traiter l'hypertension, les toux, les gorges endolories, l'eczéma, les maux d'estomac, les pierres de rein et pour soigner la diarrhée (Benhammou et al., 2008; Larousse, 2001; Delili, 2007). L'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* est intensivement employée dans l'industrie pharmaceutique (Longo et al., 2007).

## III.2 *Myrtus communis*

### III.2.1 Description

C'est un arbuste aromatique appartenant à la famille des Myrtacées de la région méditerranéenne de 1 à 3 mètres de haut à écorce rousse, des feuilles persistantes, vert foncé, ovale et coriaces. Des fleurs odorantes, qui sont de couleur blanches, des fruits, ovoïdes et charnus, sont noir bleuâtre. Ce sont les feuilles qui ont un intérêt thérapeutique. L'huile essentielle du Myrte est à base d'alpha-pinène, de cinéol et de myrténol (Larousse, 2001; Carlo et al., 2006; Ghasemi et al., 2011; Gardeli et al., 2008; Cakir, 2004; Aidi Wannas et al., 2010; Barboni et al., 2010; Beloued, 2009; Girre, 2006; Ledru, 2001). Les fruits de la plante apparaissent à partir de novembre à décembre (Barboni et al., 2010; Delili, 2007).

### III.2.2 Classification

La classification qu'occupe *Myrtus communis* dans la systématique est la suivante:

- Embranchement: Spermaphytes
- Sous –embranchement: Angiospermes
- Classe: Dicotylédones
- Ordre: Myrtales
- Famille: Myrtaceae
- Genre: *Myrtus*
- Espèce:

Noms vernaculaire: -Anglais: Common Myrtle

-Français: Myrte commun

-Arabe: الريحان

### III.2.3 Utilisation médicinale

Les feuilles de myrte sont astringentes, toniques et antiseptiques. Une infusion à partir des feuilles sert, en usage externe, à guérir les blessures et les ulcères ou, en usage interne, à soigner les troubles digestifs et urinaires. L'huile essentielle de myrte est antiseptique, expectorante, et utilisée en cas d'affections respiratoires (Larousse, 2001; Beloued, 2009; Girre, 2006). Il est traditionnellement employé comme désinfectante et agent hypoglycémique (Gardeli et al., 2008).

# Partie II

## Étude expérimentale



# Chapitre VI

## Matériel et Méthodes

### IV.1 Matériel végétal

#### IV.1.1 Echantillonnage

Les feuilles des deux plantes ont été récoltées dans la région de Chahna (Elkalâa) qui se situe au sud de la wilaya de Jijel (figure 9 et 10). La récolte était entreprise manuellement, d'une manière aléatoire, au mois d'avril de l'année en cours.



Fig.9: Carte géographique de la région de Chahna (www.google.com).

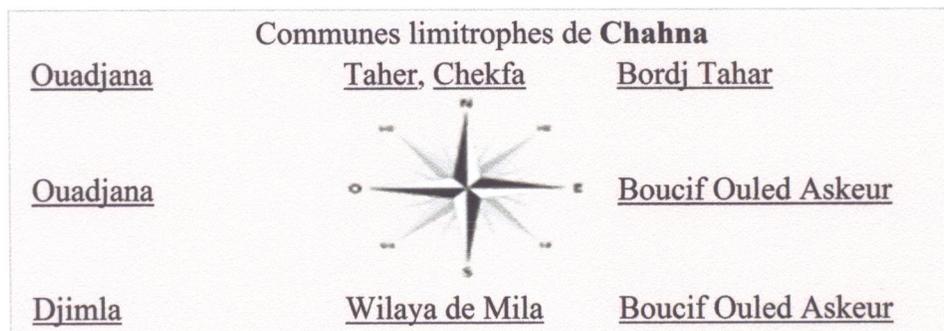


Fig.10: Localités de la commune de Chahna (Wikipedia, 2012).

L'échantillonnage a été fait après la disparition de la rosée du matin, à une altitude indiquée dans le tableau 4.

Tableau 4: Altitude de la région de récolte.

Espèce	Altitude(m)
<i>Myrtus communis</i>	110
<i>Pistacia lentiscus</i>	112

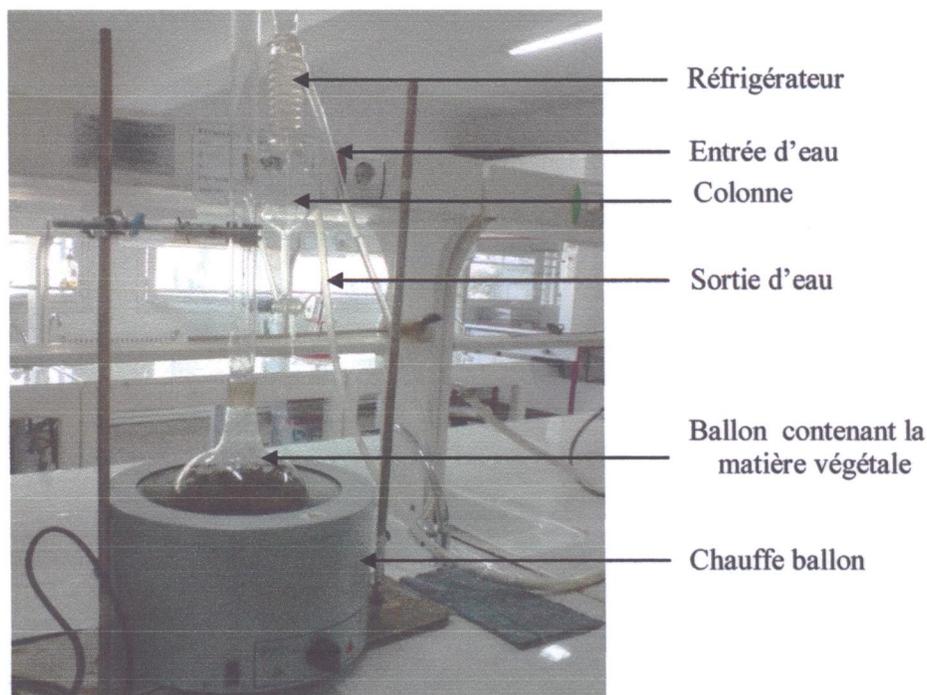
### IV.1.2 Séchage et stockage

Les feuilles, fraîchement récoltées, sont séchées à l'ombre pendant environ 8 jours. Devenues sèches, elles sont récupérées dans des sacs propres pour servir ultérieurement à l'extraction de l'huile essentielle.

### IV.1.3 Extraction de l'huile essentielle

#### ➤ Description du dispositif d'extraction

L'appareil utilisé pour l'hydrodistillation est de type Clévenger, il est constitué d'un chauffe ballon qui permet la distribution homogène de la chaleur dans le ballon, un ballon en verre pyrex où l'on place les feuilles séchées et l'eau distillée, une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant) qui vient de l'échauffement du ballon, un collecteur en verre pyrex également qui reçoit les extraits de la distillation (figure 11).



**Fig.11:** Dispositif d'extraction des huiles essentielles (Clévenger).

Laboratoire d'écotoxicologie université de Jijel

#### ➤ Procédé d'extraction

100g de feuilles sèches de chaque plantes, sont mis dans un ballon de 2l contenant 1l d'eau distillé, l'ensemble est porté à ébullition pendant 02 heures. Les vapeurs chargées d'huile essentielle, en traversant le réfrigérant, se condensent et chutent dans une ampoule à décanter.

Après repos, ils se forment deux couches bien distinctes en fonction de leurs densités, la couche supérieure représente la couche huileuse.

#### IV.1.4 Détermination du rendement d'extraction

Selon la norme AFNOR (1987), le rendement en huile essentielle (RHE) est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). Le rendement est exprimé en pourcentage, et il est donné par la formule suivante:

$$\text{RHE (\%)} = \text{M}' / \text{M} * 100$$

RHE: rendement en huile essentielle des feuilles sèches;

M': masse d'huile essentielle en gramme à partir des feuilles;

M: masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme.

#### IV.1.5 Conservation des huiles essentielles obtenues

Les huiles essentielles obtenues sont mises dans des tubes en verre bien fermés à l'obscurité pour les préserver de l'air, et de la lumière (agents de dégradation). L'ensemble est conservé dans un réfrigérateur à 4°C.

#### IV.1.6 Analyse des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse-CPG-

La chromatographie en phase gazeuse s'applique à des échantillons gazeux ou susceptibles d'être vaporisés sans la décomposition dans l'injecteur. La phase mobile est alors un gaz (hélium, azote, argon ou hydrogène), appelé gaz vecteur qui balaie en permanence la colonne. Cette dernière placée dans un four thermo staté, est un tube de faible section enroulé sur lui-même et contenant la phase stationnaire. Un grand choix des détecteurs permet l'analyse sélective et parfois l'identification de mélange très complexe comme dans le cas des huiles essentielles.

Si la phase stationnaire est un liquide non ou peu volatil, possédant des propriétés de solvant vis-à-vis des composés à séparer, on parle de chromatographie gaz-liquide ou chromatographie de partage; si la phase stationnaire est un solide adsorbant (silice, alumine,...), c'est la chromatographie gaz-solide ou chromatographie d'adsorption (Satrani et al., 2005).

L'analyse des HE obtenues est caractérisée par un chromatographe type GCMS d'un détecteur relative et d'un injecteur split/splitless. La colonne utilisée est de type SE-30 de 25 cm long et de 0.25 mm de diamètre intérieur. La phase stationnaire à une granulométrie de 0.25 m. le gaz vecteur est l'Hélium (He) avec un débit de 0.77 ml/min, vitesse linéaire de 35.0 cm/sec et une pression de 24.4 Kpa et avec le rapport fondu 20.0. Le temps de coupe dissolvant est 2.00 min et la vitesse de balayage est 625. Les conditions d'analyse sont:

- ❖ Température de l'injecteur : 250.00°C
- ❖ Température de four de la colonne : 55.00°C

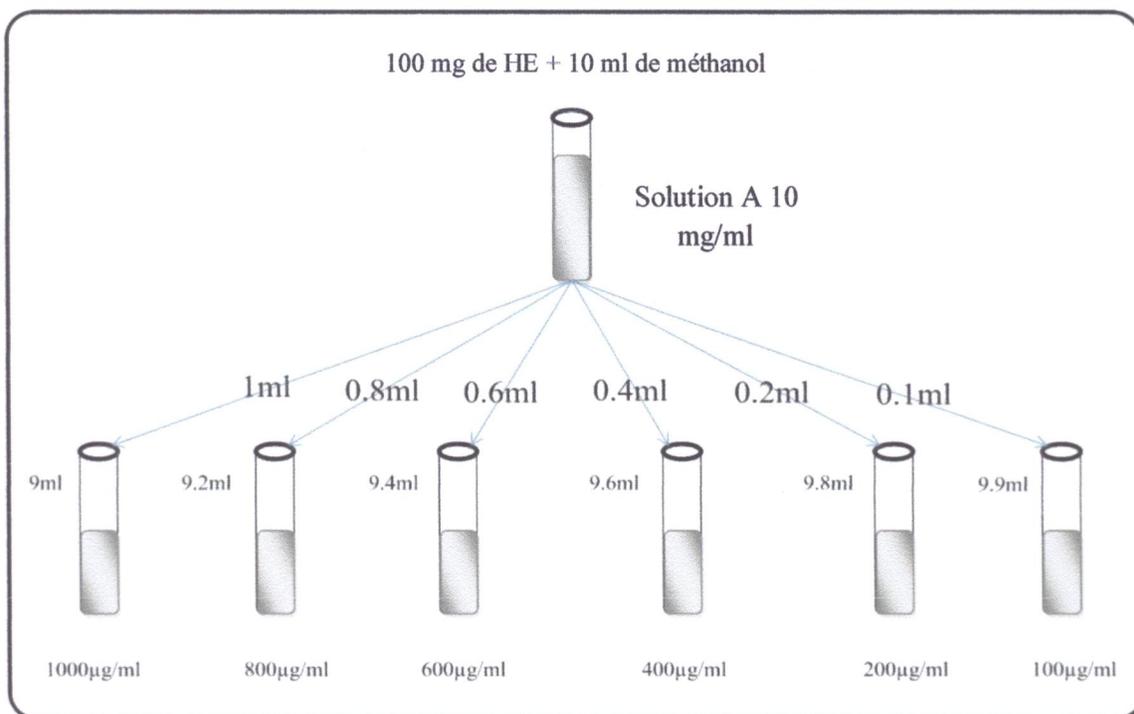
- ❖ Température d'ion source : 200.00°C
- ❖ Température d'interface : 250.00°C
- ❖ Gradient de température : 55 à 120°C à 3°C/min et de 120 à 180°C à 5°C/min.

#### IV.1.7 Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

L'activité antioxydante *in vitro* a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH• et la méthode de pouvoir réducteur. Le pouvoir antioxydant de l'huile essentielle testée a été estimé par comparaison avec un antioxydant naturel ( $\alpha$ -tocophérol). Tous les tests ont été réalisés avec 3 répétitions pour chaque concentration.

##### ▪ Préparation des dilutions des huiles essentielles des deux espèces

En se basant sur des essais préalables, une gamme de dilutions de concentrations allant de 100 $\mu$ g/ml à 1000 $\mu$ g/ml a été préparée (figure 12).



**Fig.12:** Préparation des dilutions de l'huile essentielle des deux espèces.

#### IV.1.7.1. Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH•

##### ▪ Principe

La capacité de donation des électrons par les huiles essentielles est mise en évidence par une méthode spectrophotométrique, en suivant la disparition de la couleur violette d'une solution méthanolique contenant le radical libre DPPH• (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl).

##### ▪ Mode opératoire

L'activité antiradicalaire de l'huile essentielle des deux plantes a été mesurée par la méthode décrite par **Chua et al., (2008)**. Cent microlitres (100µl) de différentes dilutions d'huiles essentielles (200 µg/ml, 400 µg/ml, 800 µg/ml, 1000 µg/ml) ont été mélangés avec 2.9ml de la solution méthanolique du DPPH• (0.004%) dans des tubes à essai secs. Après 30min d'incubation à une température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 510nm.

Le contrôle négatif est composé de 100 µl de méthanol et de 2.9ml de la solution de DPPH•.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard (l'alpha tocophérol).

##### ▪ Expression des résultats

L'activité antiradicalaire est exprimée par le pouvoir de réduction de la solution méthanolique du DPPH• (**Athamena et al., 2010; Mohammadi et Atik, 2011**).

Le pouvoir de réduction est déterminé en appliquant la formule suivante:

$$PR = (Ac - Ae) / Ac * 100$$

**PR:** pouvoir de la réduction en %;

**Ae:** absorbance de la solution de DPPH• en présence de l'huile essentielle ou de la vitamine E;

**Ac:** absorbance de la solution de DPPH• en absence de l'huile essentielle et de la vitamine E (blanc).

#### IV.1.7.2 Méthode de pouvoir réducteur

##### ▪ Principe

Le pouvoir réducteur est basé sur la réduction des ions de fer ferrique  $[Fe(CN)_6]^{3-}$  en ions de fer ferreux  $[Fe(CN)_6]^{4-}$  et qui est donné par l'absorbance de l'échantillon à une longueur d'ondes de 700 nm (**Oyaizu 1986**).

### ▪ Mode opératoire

1 ml de chaque solution de HE et de l' $\alpha$  tocophérol, à des concentrations de 200 ,400 ,800 ,1000  $\mu$ l/ml ont été introduits à l'aide d'une pipette dans des tubes à essai, suivis de l'addition de 1 ml d'une solution ferricyanure de potassium ( $K_3Fe$ , 1%), 1 ml de solution tampon phosphate (PH=6.6 C=0.2M). Les solutions ont été agité immédiatement et bien mélangées, puis ils sont maintenus dans un bain marie pendant 20 minutes à une température de 50 °C.

Ensuite, on ajoute 1 ml de l'acide trichloracétique (TCA 10%). 1.5 ml de chaque tube a été prélevé et introduit dans d'autres tubes à essai et l'on ajoute 1.5 ml de l'eau distillé, 150 $\mu$ l de solution de chlorure ferrique ( $FeCl_3$ , 0.1 %). L'évolution de l'activité antioxydante des HE est comparée par rapport à l' $\alpha$  tocophérol (vitamine E) et cela en traçant une courbe d'étalonnage. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 700 nm contre un blanc.

## IV.1.8 Evaluation de L'activité antibactérienne

### IV.1.8.1 Méthode d'aromatogramme

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des deux espèces est réalisée d'abord par la méthode de diffusion des disques (méthode d'aromatogramme), en raison de sa simplicité et son efficacité pour tester la sensibilité des bactéries (**Boukhatem et al., 2014 et Burt, 2004**).

### ▪ Choix des bactéries

Les souches bactériennes choisies pour cette étude sont des bactéries pathogènes à Gram négatif *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* provenant de l'hôpital de Constantine.

- ❖ *E. coli* est un bacille à Gram négatif mobiles avec ciliature péritriche poussant sur des milieux de culture ordinaires, aérobies-anaérobies facultatifs, fermentant le glucose avec ou sans production de gaz, réduisant les nitrates en nitrites (**Wikipedia, 2013**). Elle appartient à la famille des Enterobacteriaceae (**Hart et Shears, 2002**), hôte normale du tube digestif de l'homme et des animaux (**Chakou et al., 2007**), responsable des infections urinaires, septicémie méningite du nourrisson, de plaies opératoires et gastro-entérites (**Hart et Shears, 2002**).
- ❖ *Klebsiella pneumoniae* genre de la famille des entérobactéries, elle est la plus fréquente des bactéries à Gram négatif impliquée dans les cas de pneumonies nosocomiales (dont le taux de mortalité atteint souvent environ 50 %) (**Li et al., 2004**).

- **Choix des milieux de culture**

Le milieu de culture utilisé pour étudier l'activité antibactérienne est l'Agar de Muller Hinton (AMH) parce que c'est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens.

- **Enrichissement des bactéries**

Une aliquote bactérienne (*Escherichia Coli* et *Klebsiella pneumoniae*) est mise en culture dans des tubes à essais contenant 5 ml de boillon nutritif, ces derniers sont ensuite incubés à l'étuve pendant 24 h à 37° C.

- **Préparation des disques**

Les disques sont fabriqués à partir du papier Wattman, avec un diamètre de 6 mm. A l'aide d'un perforateur. Ensuite, ces disques sont placés dans un tube à essais et stérilisés à l'autoclave pendant 20 minutes à 120C°, puis stockés à une température ambiante dans un tube à essai hermétiquement fermé.

- **Préparation des boîtes de Pétri**

La gélose de Muller-Hinton stérile prête à l'usage a été coulée dans des boîtes de pétrie stériles. L'épaisseur de la gélose est de 4-5 mm répartie uniformément dans les boîtes, ces derniers sont placés à côté du bec bunsen jusqu'à la solidification de la gélose.

- **Ensemencement des souches**

L'ensemencement consiste à prélever quelques gouttes de suspension fraîchement préparée par une pipette pasteur stérile puis l'étaler sur la totalité de la surface gélosée.

- **Dépôt des disques**

Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, des disques du papier Wattman imbibé par 20 µl de l'huile essentielle de chaque plantes à différentes concentrations (200µg/ml, 400µg/ml, 800µg/ml, 1000µg/ml et l'huile pur) sont déposés sur la gélose, précédemment inoculé avec le microorganisme choisi. Les boîtes sont maintenues à 4C° pendant 1 heure pour assurer une bonne diffusion de l'extrait dans la gélose.

Le disque d'antibiotique, utilisé pour les essais de diffusion par disque est l'amoxicilline qui représente notre test positif. Aussi, la solubilisation des HE est effectuée dans du méthanol.

### ▪ Incubation des boîtes

Les boîtes sont ensuite incubées à l'étuve pendant 17-24h à 37C°.

### ▪ Lecture

La lecture des résultats s'effectuant par mesure des diamètres d'inhibitions autour des disques.

### ▪ Détermination de CMI en milieu solide

Le paramètre le plus souvent utilisé pour évaluer l'effet d'un antibiotique est sans conteste la concentration minimale inhibitrice ou CMI. Cette concentration correspond à la concentration minimale d'antibiotique qui inhibe la croissance visible du germe. Cette valeur correspond:

-à une notion macroscopique, d'où une lecture très simple;

-à un germe particulier.

On ne saurait donc parler d'une seule CMI pour un antibiotique mais de toute une série de CMI selon un panel de germes testés, choisis parmi les plus représentatifs. La CMI est un paramètre de l'effet bactériostatique de l'antibiotique, puisque l'effet analysé concerne la croissance. Un antibiotique est d'autant plus intéressant que sa CMI est basse (Eberlin, 1994).

## IV.2 Evaluation de l'effet protecteur des HE contre la toxicité du Pb

### IV.2.1 Matériel animal

L'étude expérimentale a été réalisée sur des rats femelles blancs (*Albinos wistar*). Ce sont des mammifères nocturnes de l'ordre de rongeurs fréquemment utilisés dans les recherches.

### IV.2.2 Elevage des rats

Des rats provenant de l'institut Pasteur d'Alger avec un poids de 200±10 g ont été utilisés. Les animaux sont élevés au sein de l'animalerie de l'université Mouhamed Saddik Benyahia- Jijel. Ils ont été soumis à une période d'adaptation aux conditions de l'animalerie, un mois environ à une température de 22±1 °C, une photopériode de 12 h/24 h. Les rats sont logés dans des cages en polyéthylène, tapissés d'une litière composée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées et la litière changée une fois tous les trois jours.

### IV.2.3 Traitement des rats

Après la période d'adaptation (30 jours), les rats ont été répartis au hasard en six groupes de deux rats chacun, les rats ont été traités pendant 72 heures comme suit:

- ❖ Lot 1 (**T**): le groupe témoin a reçu l'eau distillée par gavage (per os).
- ❖ Lot 2 (**Pb**): les rats ont été traités par l'acétate de plomb dissout dans l'eau distillée per os à raison de 233.25 mg/kg du poids corporel ( $DL_{50}$  orale=4665 mg/kg).
- ❖ Lot 3 (**L**): les rats ont été traités par l'huile essentielle du Lentisque dissout dans le DMSO 1ml per os à raison de 0.5 ml/kg du poids corporel.
- ❖ Lot 4 (**M**): les rats ont été traités par l'huile essentielle du Myrte dissout dans le DMSO 1ml per os à raison de 0.5 ml/kg du poids corporel.
- ❖ Lot 5 (**PbL**): les rats ont été traités par l'acétate de plomb et l'Huile essentielle du Lentisque.
- ❖ Lot 6 (**PbM**): les rats ont été traités par l'acétate de plomb et l'Huile essentielle du Myrte.

### IV.2.4 Prélèvement sanguin, sacrifice et prélèvements des organes

#### IV.2.4.1 Prélèvement sanguin

Les prélèvements sanguins sont effectués directement par ponction au niveau du sinus recto-orbital de l'œil à l'aide de tubes capillaires à hématocrite. Les échantillons du sang, d'environ 3ml, sont recueillis dans 2 tubes à EDTA utilisées pour l'examen des paramètres hématologiques et biochimiques.

#### ➤ Dosage des paramètres hématologiques

L'examen des paramètres hématologiques a été effectué au niveau du Laboratoire Centrale de l'Hôpital d'El Milia. La formule de numération sanguine est composée de GR (Globules rouges), GB (Globules blancs), HGB (Hémoglobine), HCT (Hématocrite), VGM (Volume globulaire moyen), TCMH (Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine), CCMH (Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine).

#### ➤ Dosage des paramètres biochimiques

Les analyses biochimiques ont été réalisées au niveau du Laboratoire Centrale de l'Hôpital d'El Milia. Les paramètres dosés sont: glycémie, l'urée, la créatinine, l'acide urique, le cholestérol, les triglycérides, TGO (aspartate aminotransférase), TGP (alanine aminotransférase), Phosphatase Alcaline (PAL).

#### IV.2.4.2 Sacrifices des animaux et prélèvement de certains organes

A la fin de la période du traitement, les rats sont mis à jeun pendant une nuit. Ils sont sacrifiés le matin, sous anesthésie par l'éther diéthylique. Le foie, les reins, le cœur, la rate, le pancréas et les poumons ont été prélevés et débarrassés de leurs tissus adipeux puis pesés.

La figure 13 résume les différentes étapes du protocole expérimental:

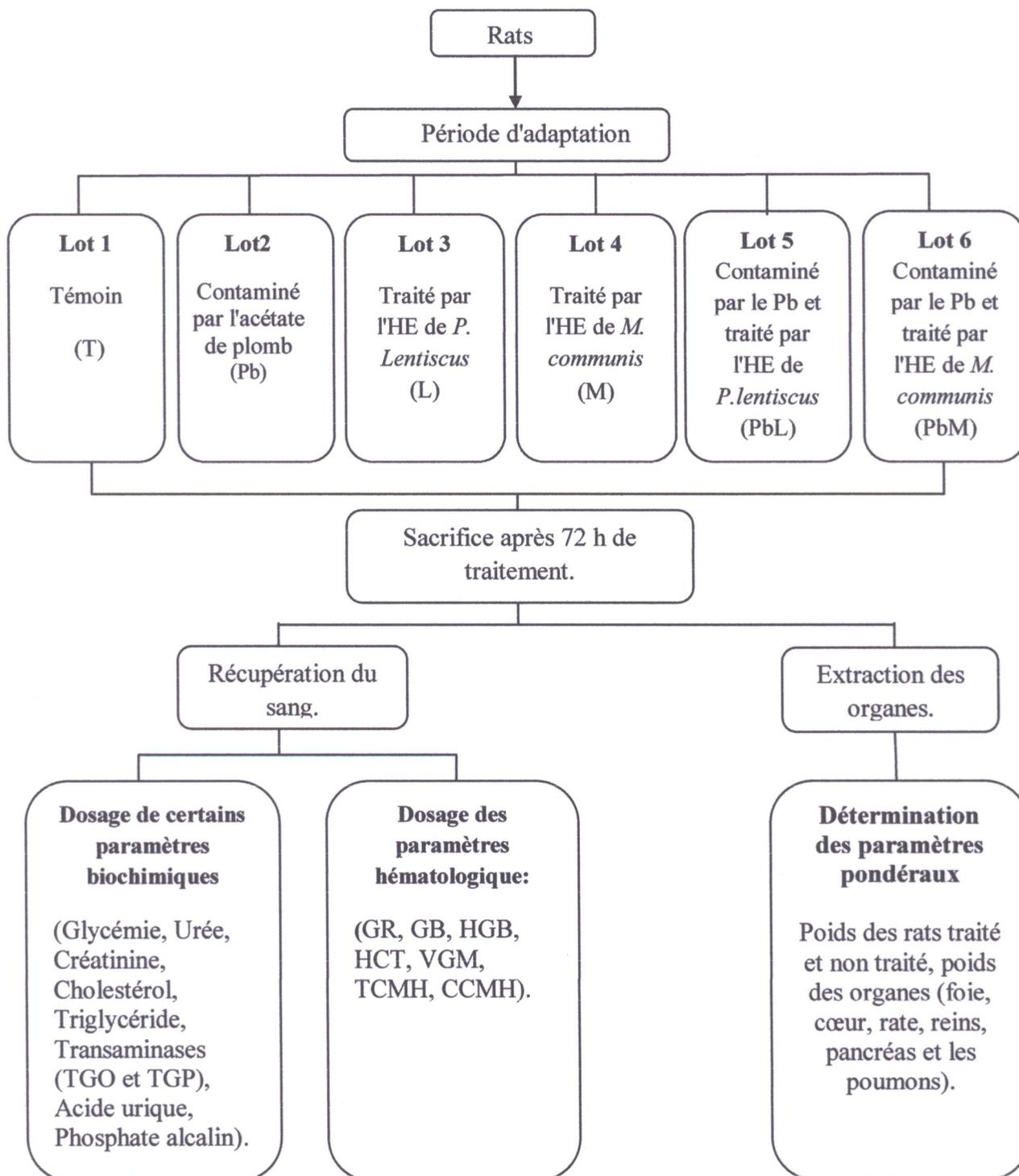


Fig. 13: Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

**IV.3- Exploitation statistique des résultats**

Les résultats ont été présentés par la moyenne avec son écart type. Les analyses de la variance «ANOVA» ont été réalisées par le logiciel statistique Minitab Ver.13.31. Les différences ont été considérées significatives à  $P \leq 0,05$ .

# Chapitre V

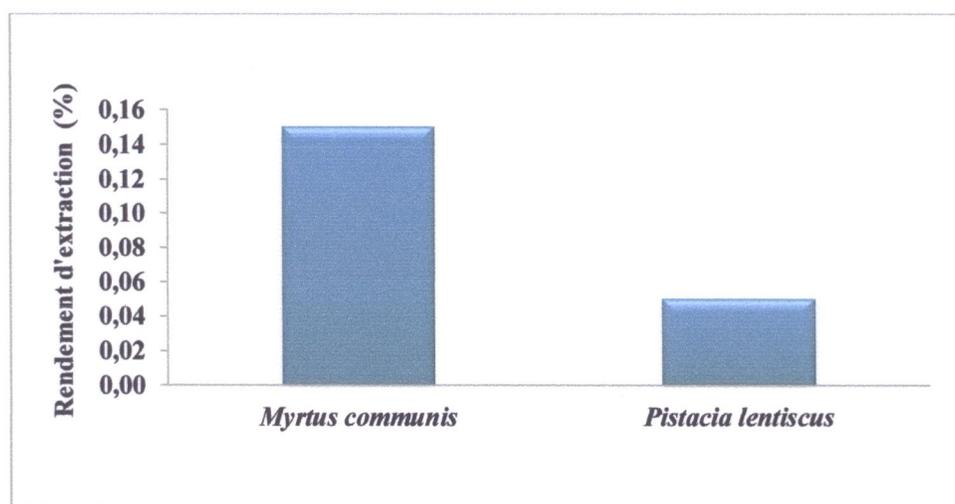
## Résultats et Discussion

### V.1 Rendement en huile essentielle

Les huiles essentielles ont été extraites des feuilles de *M.communis* et de *P.lentiscus* par un hydrodistillateur de type Clevenger, nous avons obtenu une huile de couleur jaune pâle avec une odeur aromatique. Nous n'avons pas pu récupérer une quantité huileuse importante, le rendement est illustré dans le tableau 5 et la figure 14.

**Tableau 5:** Rendements obtenus en huile essentielles.

Plantes	Masse végétale (g)	Masse d'HE (g)	Rendement (%)
<i>Myrtus communis</i>	400	0,603	0,15
<i>Pistacia lentiscus</i>	2400	1,208	0,05



**Fig.14:** Rendements en huiles essentielles des espèces étudiées.

Les résultats obtenus montrent que le rendement en HE des feuilles de *M.communis* (0.15%) est supérieur à celui des feuilles de *P.lentiscus* (0.05%) (Figure 14).

En comparant le rendement en huile essentielle de *M. communis* avec ceux donnés par la littérature, on constate qu'il est inférieur à celui donné par **Messaoud et al. (2011)** (Algérie) qui est 0.44-0.52% et à celui donné par **Ghasmi et al., 2011** (Iran) qui est 0.47% et il est supérieur de celui donné par **Barboni et al., (2010)** (France) qui est 0.04 %.

Les résultats obtenus par **Duru et al., (2002)**, **Arab et al., (2014)**, **Castola et al., (1999)**, indiquent que les feuilles de *Pistacia lentiscus* provenant de la région de Türkiye, Algérie et France présentent un rendement en HE respectivement de 0,3%, 0.253% et 0,1% et sont tous supérieurs à notre résultat (0,05%).

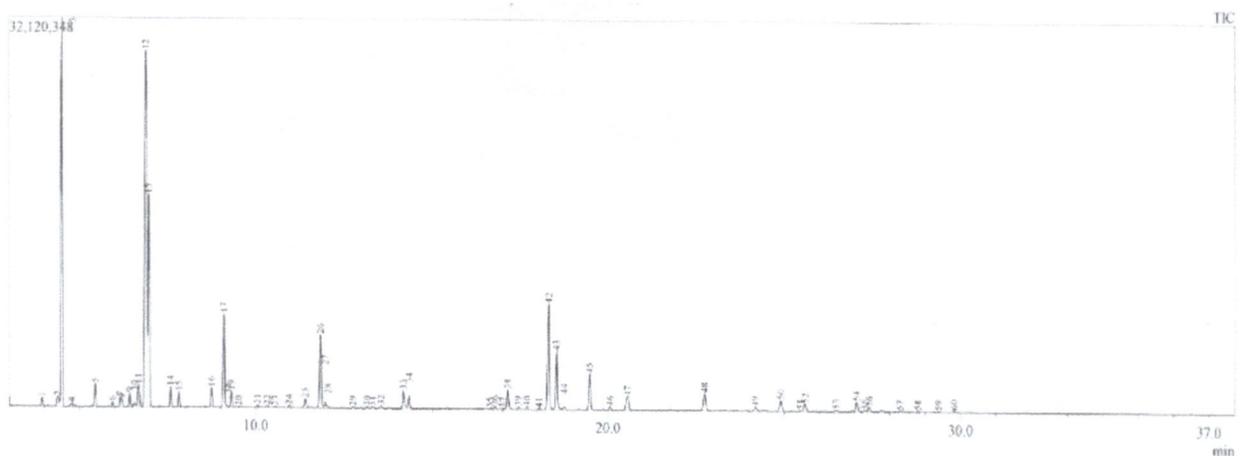
Ces variations peuvent être dues à plusieurs facteurs notamment le degré de maturité des feuilles, le moment de la récolte, les facteurs de l'environnement (type de climat, sol) et la méthode d'extraction (**Botton et al., 1990**).

## V.2 Analyse chromatographique des huiles essentielles

Les huiles essentielles des deux plantes ont été analysées par la technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse. Les résultats de la chromatographie sont représentés sous forme de graphes avec une série de pics, où chaque pic représente un composé chimique bien défini. Les chromatogrammes obtenus lors de l'analyse en chromatographie en phase gazeuse de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* et *Myrtus communis* sont illustrés en figure (15 et 16) et dont la composition est regroupée dans les tableaux (6 et 9).

### V.2.1 Analyse chromatographique des huiles essentielles de *Myrtus communis*

Comme le montre la figure 15 et le tableau 6, l'analyse par CPG/SM nous a permis d'identifier 60 composés de l'huile essentielle de *M. communis*.



**Fig.15:**Chromatogramme des huiles essentielles de *M.communis*.

**Tableau 6:** Chromatogramme des huiles essentielles de *M.communis*

N° de Pic	Composés	Taux (%)
1	2-methylpropyl	0.51
2	Thujone	0.60
3	Alpha-pinene	23.08
4	Camphene	0.22
5	beta-pinene	1.36
6	Beta-myrcene	0.30
7	Butanoic acid, 2-methyl-, 2-methylpropyl ester	0.58
8	Alpha-phellandrene	0.45
9	2-methylbutyl	0.82
10	NI	0.22
11	o-Cymene	1.34
12	Eucalyptol	21.15
13	D-limonene	12.53
14	(Z)-Ocimene	1.22
15	Terpinene	0.92

16	2-Carene	1.17
17	Linalool	5.57
18	Isopentyl ester	0.09
19	Butanoic acid, 2-methyl-, 2-methylbutyl ester 2-Methylbutyl, Butyric acid	0.98
20	Campholenic aldehyde	0.06
21	Trans-pinocarveol	0.18
22	Cis-verbenol	0.13
23	Cis-3-hexenyl butyrate	0.09
24	Isoborneol	0.16
25	Terpinen-4-ol	0.54
26	alpha-Terpineol	4.34
27	Estragole	0.32
29	Carveol	0.10
30	Pulegone	0.11
31	Nerol	0.09
32	Cis-3-hexenyl isoovalerate	0.16
33	Geraniol	1.06
34	Linalyl acetate	0.74
35	6-Methyl-bicyclo[4.2.0]octan-7-ol	0.06
36	exo-2-Hydroxycineole acetate	0.19
37	Valeric acid	0.07
38	Terpinyl acetate	1.18
39	Borneol	0.15
40	(Z)- Geranyl acetate	0.16
41	Butanoic acid, 3-methyl-, phenylmethyl ester	0.08
42	Geranyl acetate	6.26
43	Methyl eugenol	3.48
44	beta-Elemene,	0.16
45	Caryophyllene	2.11
46	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2-(1-methylethenyl)-4-(1-methylethylidene)-	0.22
47	alpha.-Caryophyllene	0.80
48	Durohydroquinone	1.02
49	2,4-Hexanedione, 5-methyl-3-(2-methyl-1-propenyl)-	0.24
50	1,5-Cyclodecadiene, 1,5-dimethyl-8-(1-methylethylidene)-, (E,E)-	0.65
51	Germacrene	0.08
52	Caryophyllene oxide	0.44
53	Caryophyllene oxide	0.10
54	Ketoisophorone	0.58
55	Cubenol	0.08
56	(-)-Camphanic acid	0.27
57	E,Z-5,7-Dodecadien-1-ol acetate	0.09
58	Juniper camphor	0.10
59	Spatulenol	0.08
60	(2-Isopropyl-5,5-dimethyl-cyclohexyl)-[1,2,4]triazol-1-yl-methanone	0.12
		100.00

NI : Non identifié

Les principaux composés de l'huile essentielle de *M. communis* après l'analyse par CPG/SM sont présentés dans le tableau 7:

**Tableau 7:** Taux des composés majeurs des huiles essentielles de *Myrtus communis*.

Constituants	Numéro de Pic	Taux (%)
Alpha pinene	3	23,08
Eucalyptol	12	21,15
D-limonene	13	12,53
Linalool	17	5,57
alpha-Terpineol	26	4,34
Geranyl acetate	42	6,26
Methyl eugenol	43	3,48

**Tableau 8:** Comparaison entre la composition chimique de l'HE de *Myrtus Communis* de Jijel, de la France (Barboni et al., 2011) et de la Tunisie (Aidi Wannas et al., 2008)

Région Composant (%)	Jijel	France	Tunisie
Alpha-pinene	23.08	45.9	12.64
Eucalyptol	21.15	-	-
D-limonene	12.53	-	-
Linalool	5.57	1.5	0.74
alpha-Terpineol	4.34	2.0	4.10
Geranyl acetate	6.26	2.1	20.54
Methyl eugenol	3.48	0.5	1.14
Camphene	0.22	0.1	-
Beta-Myrcene	0.3	-	-
Trans-pinocarveol	0.18	0.3	-
beta-pinene	1.36	0.6	3.2
Alpha-phellandrene	0.45	0.5	-
(Z)-Ocimene	1.22	-	-
Geraniol	1.06	0.04	0.68
Linalyl acetate	0.74	-	1.49
beta-Elemene	0.16	0.3	0.36
Caryophyllene oxide	0.44	0.3	0.78

L'HE de *Myrtus communis* récoltée à Jijel comporte des composés communs variables quantitativement et d'autres constituants totalement absents dans l'HE de la même espèce récoltée dans différents pays.

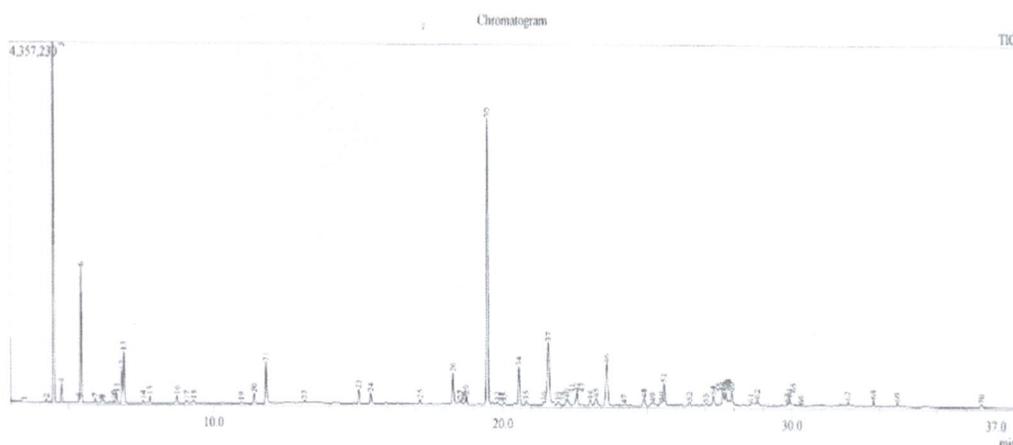
L'analyse du tableau montre que l'HE de *Myrtus* de la région de Jijel d'Algérie a permis de caractériser 7 composants majoritaires dont 2 composants sont absents dans l'HE de la même espèce récoltée en France et en Tunisie.

Beaucoup de constituants majeurs sont présentés dans plus d'un pays comme: l'Alpha pinène dans la région de Jijel, en France et en Tunisie (23.08%, 45.9%, et 12.64%) d'autres constituants comme le Camphene sont présents uniquement dans les deux pays : Algérie et France.

Les études réalisées sur *M. communis* cueillie en France et en Tunisie, montrent une variation de la composition chimique de l'huile essentielle de *M. communis* comparée à nos résultats.

### V.2.2 Analyse chromatographique des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus*

Comme le montre la figure 16 et le tableau 9, l'analyse par CPG/SM nous a permis d'identifier 70 composés de l'huile essentielle de *P. lentiscus*.



**Fig.16:** Chromatogramme des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus*.

**Tableau 9:** Chromatogramme des huiles essentielles de *P. lentiscus*

N° de Pic	Composés	taux %
1	NI	0.20
2	Cyclohexene	0.27
3	Alpha-pinene	25.32
4	Camphene	1.36
5	Beta terpinene	0.35
6	beta-Pinene	9.51
7	Beta-Myrcene	0.34
8	4-Hexen-1-ol, acetate, (Z)-	0.23
9	$\alpha$ -thujiene	0.26
10	Isoterpinolene	0.18
11	p cymene	0.71

12	Beta-Phellandrene	2.31
13	D-limonene	3.67
14	Béta-cis-ocimene	0.20
15	$\gamma$ -Terpinen	0.52
16	(+)-4-Carene	0.55
17	Linalol	0.20
18	Hexyl octyl ether	0.24
19	Ethanone	0.13
20	Alpha Terpineol	0.71
21	Pulegone	2.94
22	Pulegone	0.20
23	Bomyl acetate	0.99
24	2-Undecanone	0.75
25	Sigma Terpinene	0.36
26	Neryl acetone	2.25
27	Isoeugenol methyl ether;	0.31
28	(+)-Epi-bicyclosquiphellandrene	0.14
29	Cyclohexane	0.63
30	Caryophyllene	20.03
31	Isoamyl benzoate	0.18
32	Germacrene D	0.20
33	Gamma-Elemene	0.17
34	alpha.- Caryophyllene	2.71
35	Spatulenol	0.32
36	Bicyclo[4.4.0]dec-1-ene, 2-isopropyl-5-methyl-9-methylene	0.28
37	Beta cubebene	4.41
38	Eudesma-4(14),11 diene	0.28
39	(+)-Epi-bicyclosquiphellandrene	0.27
40	$\gamma$ -Gurjunene	0.47
41	Butanimidamide	0.05
42	alpha.-Muurolene	0.92
43	tetradecyl ester	0.11
44	Sigma Cadinene	0.36
45	L-calamenene	0.50
46	Beta Cadinene	2.94
47	Bicyclo[4.2.0]-3-heptene. 2-isopropenyl-5-isopropyl-7,7-dimethyl-	0.10
48	Gamma-Elemene	0.52
49	Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl-	0.18
50	Allopregnane-3B	0.22
51	Caryophyllene oxide	1.54
52	Acroval	0.26
53	4'-Ethoxy-2'-hydroxyoctadecanophenone	0.16
54	Alpha Cedrene	0.69
55	<i>NI</i>	0.12
56	$\delta$ -Cadinol	0.98
57	(-)- $\delta$ -Cadinol	0.95
58	Benzylamine, .alpha.-carboxy-n-heptyl-	0.36
59	<i>NI</i>	0.30
60	alpha-Cadinol	0.90

61	11-tridecatetrene	0.17
62	alpha-Bisabolol	0.45
63	8-Dimethylundecane	0.19
64	Tetrasiloxane	0.49
65	Cyclohexane, (1,2,2-trimethylbutyl)-	0.11
66	Urea, 1-methylcyclopropyl-	0.04
67	Phthalic acid	0.29
68	Hexasiloxane	0.45
69	Hexadecanoic acid, methyl ester	0.27
70	Tetrasiloxane	0.22
		100.00

NI : Non identifié

Les principaux composés de l'huile essentielle de *M. communis* après l'analyse par CPG/SM sont présentés dans le tableau 10:

**Tableau 10:** Taux des composés majeurs des huiles essentielles de *P. lentiscus*.

Constituants	Numéro de Pic	Taux (%)
Alpha pinene	3	25,32
Caryophyllen	30	20,03
beta-Pinene	6	9,51
beta cubebene	37	4,41
D-Limonene	13	3,67
Pulegone	21	2,94
Beta Cadinene	46	2,94
alpha-caryophyllene	34	2,71

**Tableau 11:** Comparaison entre la composition chimique de l'HE de *P. lentiscus* de Jijel, du Japon (Duru et al., 2002) et de l'Espagne (Djenane et al., 2011).

Région Composants (%)	Jijel	Japon	Espagne
Caryophyllene	20.03	-	4.03
beta cubebene	4.41	-	-
D-Limonene	3.67	-	-
beta.-Myrcene	0.34	-	15.18
beta-Cadinene	2.94	-	-
alpha pinene	25.32	4.2	5.54
beta-phellandrene	2.31	-	-
alpha-cubebene	-	0.6	-
alpha-Murolene	0.92	-	-

Pulegone	0.20	-	-
Alpha-phyllendrene	2.31	-	3.83
Camphene	1.36	1.0	3.15
beta- Pinene	9.51	1.9	5.10
Terpinen-4-0l	-	29.9	6.41

Beaucoup de constituants majeurs sont présentés dans plus d'un pays (Jijel en Algérie, Japon et l'Espagne), comme Alpha pinène qui présente respectivement les pourcentages suivants (25.32 %, 4.2 % et 5.54%). Il ya aussi le beta- Pinene (jijel 9.51%, Japon 1.9% et Spain 5.10%).

Il se trouve que le Pulegone est faible dans le lentisque de Jijel avec 0.2 % et absent dans lentisque des autres pays. L'alpha pinene est élevé dans la station de Jijel (25.32%) et un taux faible dans le lentisque de Japon (4.2%) et de l'Espagne.

Terpinen-4-0l représente un composé majoritaire dans le lentisque de Japon et de Spain avec un taux de 29.9% et 6.41 et qui est absent chez le lentisque de Jijel.

Donc, la composition chimique des huiles essentielles présente un grand nombre de composés majoritaires dont le taux change d'une région à une autre.

Les variations rencontrées dans la composition chimique des huiles essentielles, du point de vue qualitatif et quantitatif, est dues à certains facteurs écologiques, l'âge de la plante, à la période du cycle végétatif et au cortège floristique. Cette variation n'est que le reflet de la biodiversité moléculaire rencontrée chez les deux espèces.

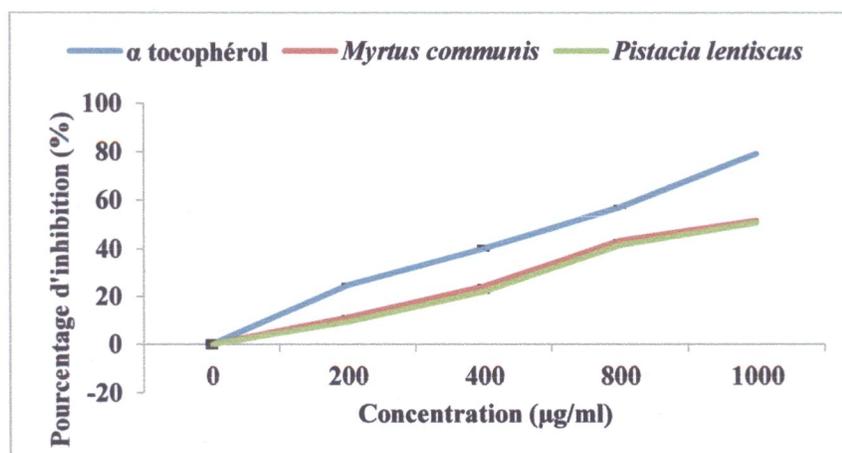
### V.3 Evaluation de l'activité antioxydante

#### V.3.1 Evaluation de l'activité anti radicalaire contre le radical libre DPPH•

L'activité antiradicalaire de l'huile essentielle de *Myrtus communis* et de *Pistacia lentiscus* est évaluée par la méthode de DPPH•. Cette activité est déterminée par la diminution de l'absorbance d'une solution alcoolique de DPPH• à 515 nm, qui est due à sa réduction à une forme non radicalaire DPPH-H par les antioxydants donneurs d'hydrogène présent dans les HE. Cette activité a été comparée à un standard (alpha tocophérol).

**Tableau 12:** Pourcentage d'inhibition du DPPH• par l'α tocophérol, l'HE de *M.communis* et de *P.lentiscus* et IC<sub>50</sub>.

C (µg/ml)	200	400	800	1000	IC <sub>50</sub>
α tocophérol	24.864	40.351	57.169	79.068	503.61
<i>M.communis</i>	11.071	24.319	43.557	51.664	954.37
<i>P. lentiscus</i>	9.256	22.142	41.500	51	976.82



**Fig.17:** Activité antiradicalaire des deux plantes testées en comparaison avec l'α-tocophérol.

Les résultats montrent que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour l'α-tocophérol ou pour l'huile essentielle de *M.communis* et de *P.lentiscus*.

Le pourcentage d'inhibition du radical libre pour l'huile essentielle de *M.communis* et de *P.lentiscus* est inférieur à celui de l'α-tocophérol pour toutes les concentrations utilisées.

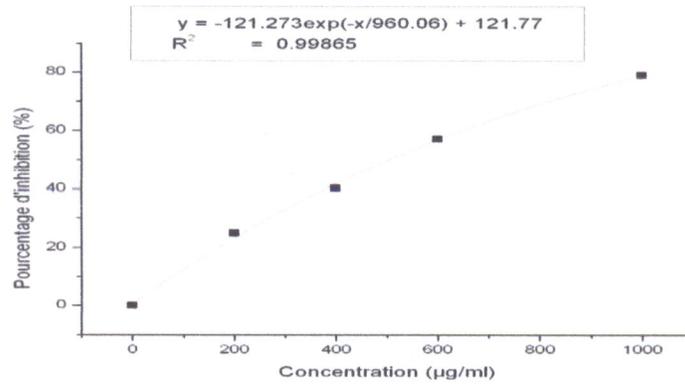
L'HE de *Myrtus communis* a montré un pouvoir de piégeage du radical DPPH• significativement plus élevé par rapport à l'HE de *Pistacia lentiscus* (tableau 1 en annexe), ceci est démontré par l'allure des graphes qui trace une courbe en exponentielle (figure 19).

Les HE de *Myrtus communis* et de *pistacia lentiscus* ont présenté à des concentrations élevées des pourcentages d'inhibition faibles, à une concentration de 1000 µg/ml les pourcentages d'inhibitions sont de l'ordre respectivement 51.664 % et 51%, elles sont très significativement inférieures à celui de l'α-tocophérol (79.068 %) (Tableau 2 en annexe).

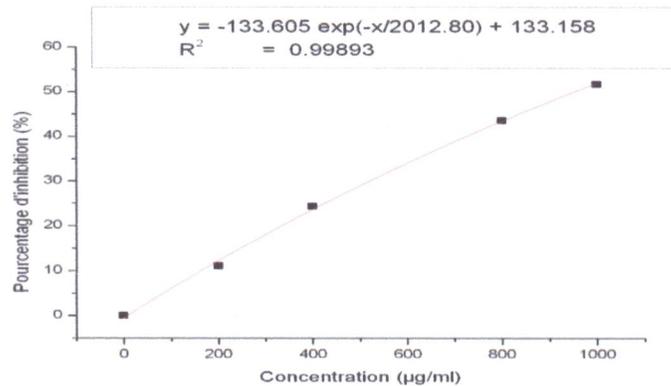
#### ➤ Calcul des $CI_{50}$

L' $IC_{50}$  est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur de l' $IC_{50}$  est basse, plus l'activité antioxydante est grande.

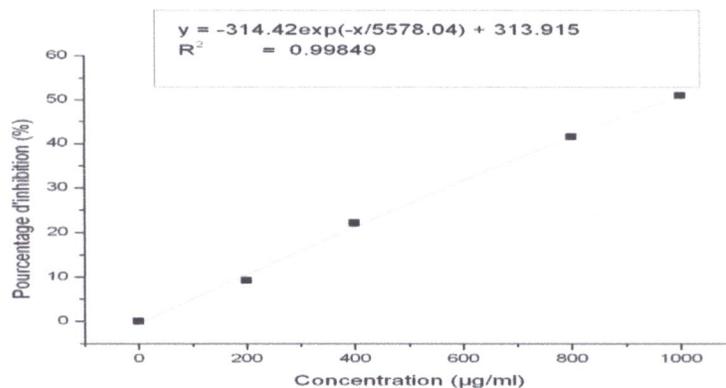
Les valeurs  $IC_{50}$  sont déterminées graphiquement, en utilisant les courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'α-tocophérol et des HE de *M.communis* et de *P.lentiscus* testées (figures 20, 21, 22).



**Fig.18:** Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations utilisées de l'alpha tocophérol.



**Fig.19:** Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations utilisées d'HE du *Myrtus communis*.



**Fig.20:** Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations utilisées d'HE du *Pistacia lentiscus*.

Parmi les deux HE de plantes étudiées, l'HE de *M.communis* représente l'HE le plus actif avec une  $IC_{50}$  de l'ordre de  $959.37\mu\text{g/ml}$  suivi par l'HE de *P. lentiscus* avec une  $IC_{50}$  de  $976.82\mu\text{g/ml}$ . En comparaison avec l' $\alpha$  tocophérol ( $IC_{50}= 503.61\mu\text{g/ml}$ ), l'HE de *P.lentiscus* et *M.communis* sont moins actifs.

L'activité antiradicalaire des HE de *M. commuins* ( $IC_{50} = 600 \mu\text{g/ml}$ ) obtenue par **Aidi Wannas et al., (2010)** est plus importante que celle rapportée dans le présent travail ( $IC_{50} = 954.37\mu\text{g/ml}$ ).

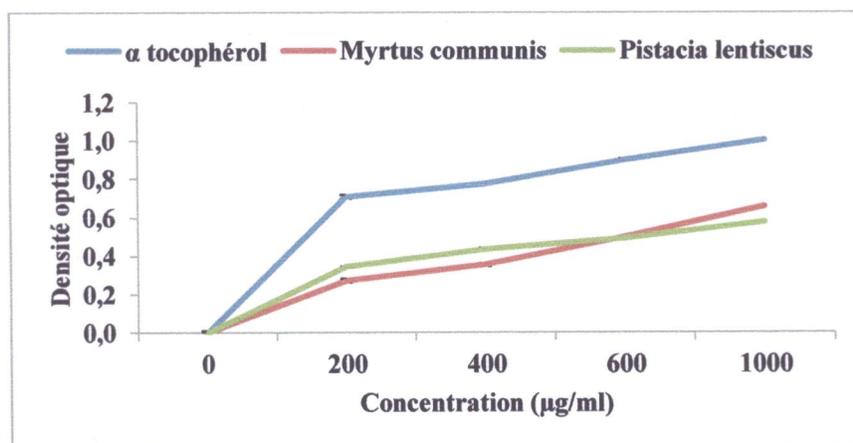
Donc, le rôle des huiles essentielles comme réducteurs des radicaux libres est souligné dans plusieurs travaux (**Abid, 2009; Arab, 2014; Mohammedi et Atik, 2011; Laib, 2012**).

### V.3.2 Evaluation de pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur est basé sur la réduction de l'ion ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en ion ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) par les composés antioxydants. Une augmentation de l'absorbance est indicatrice d'un pouvoir réducteur élevé.

**Tableau 13:** Pouvoir réducteur de l' $\alpha$  tocophérol, de l'HE de *M. communis* et de *P. lentiscus* et  $CR_{0,5}$ .

C ( $\mu\text{g/ml}$ )	200	400	800	1000	$CR_{0,5}$
$\alpha$ -tocophérol	0.709	0.776	0.899	1.003	121.33
<i>M.communis</i>	0.272	0.355	0.499	0.657	657.28
<i>P. lentiscus</i>	0.346	0.437	0.492	0.578	570.75



**Fig.21:** Pouvoir réducteur des HE de *Myrtus communis* et *Pistacia lentiscus* en comparaison avec l'alpha tocophérol.

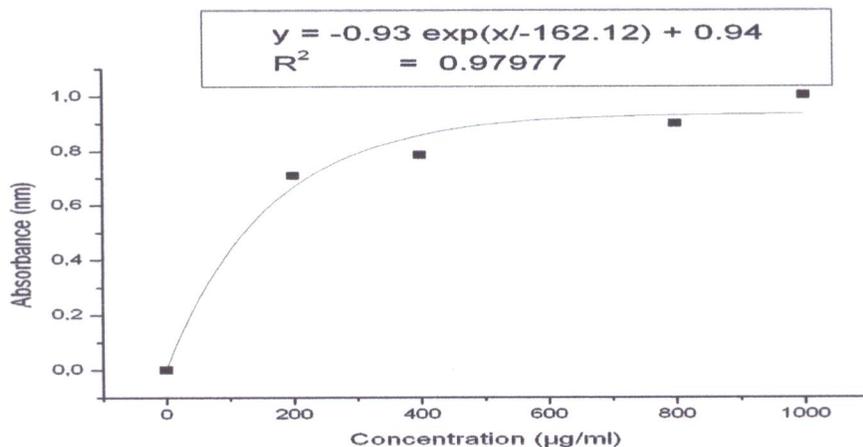


D'après la figure 21, on constate que plus la concentration des extraits est élevée, l'activité réductrice est meilleure. L'HE de *Myrtus communis* a montré un pouvoir très significativement important par rapport à l'HE de *Pistacia lentiscus* (Tableau 3 en annexe).

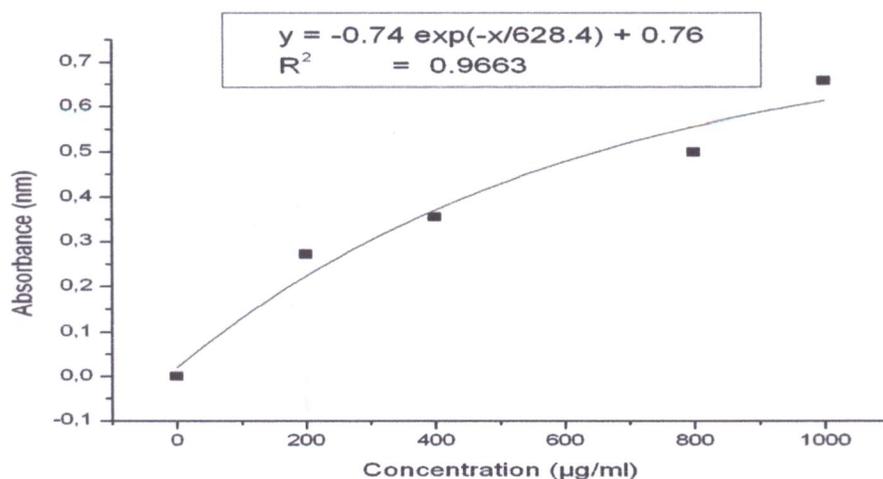
On constate aussi, que la capacité à réduire le fer par l' $\alpha$  tocophérol est très significativement élevée par rapport au l'HE de *Myrtus communis* et *Pistacia lentiscus* (Tableau 4 en annexe). Une chélation maximale de 66 % du fer ferreux est obtenue avec une concentration de 1000 $\mu$ g/ml d'HE de *Myrtus communis*. L'HE de *Pistacia lentiscus* à 1000 $\mu$ g/ml exerce une chélation maximale de 58 % tandis que l' $\alpha$  tocophérol donne une chélation maximale de 100 % à une concentration de 1000 $\mu$ g/ml.

#### ➤ Calcul des $CR_{0,5}$

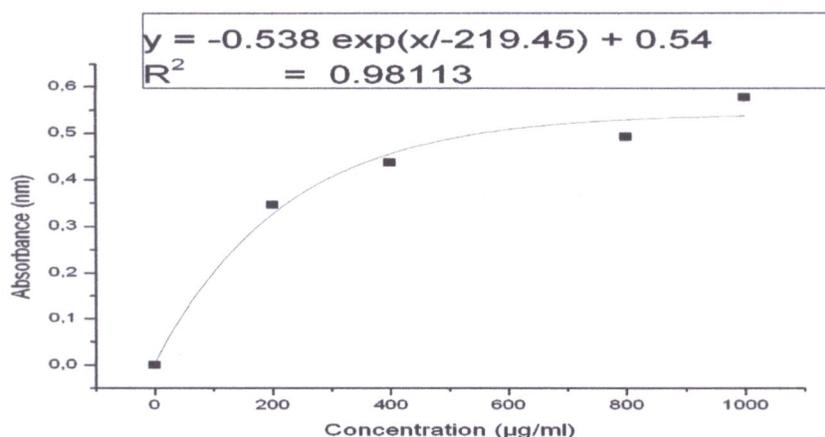
Afin de comparer l'activité antioxydante des extraits, la  $CR_{0,5}$  a été calculé. Cette dernière est définie comme la concentration du substrat qui donne une absorbance de 0,5 à 700 nm (c'est la réduction de 50 % du fer). Elle est déduite à partir des équations représentées dans les figures 22, 23 et 24).



**Fig.22:** Pouvoir réducteur en fonctions des concentrations de l' $\alpha$  tocophérol



**Fig.23:** Pouvoir réducteur en fonction des concentrations en HE de *Myrtus communis*.



**Fig.24:** Pouvoir réducteur en fonction des concentrations en HE de *Pistacia lentiscus*.

L' $\alpha$  tocophérol est la substance la plus active par rapport aux HE de *M. communis* et *P. lentiscus* avec une  $CR_{0,5}$  égal à 121,33 µg/ml.

Les résultats de la  $CR_{0,5}$  montrent que l'HE de *P. lentiscus* avec une  $CR_{0,5}$  égal à 570,75 µg/ml est la plus active comparativement à l'HE de *M. communis* avec une  $CR_{0,5}$  de 657,28 µg/ml.

#### V.4 Evaluation de l'activité antibactérienne des HEs de *M. communis* et de *P. lentiscus*

L'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *M. communis* et de *P. lentiscus* par l'estimation du diamètre de la zone d'inhibition, exprimé en mm, a montré que les huiles essentielles manifestent une activité qui varie en fonction de la sensibilité des souches testées (tableau 14).

Le résultat peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des huiles essentielles selon le tableau donné par Ponce et al. (2003).

**Tableau 14:** Evaluation de l'activité antibactérienne des HEs en fonction des diamètres d'inhibition (Ponce et al., 2003).

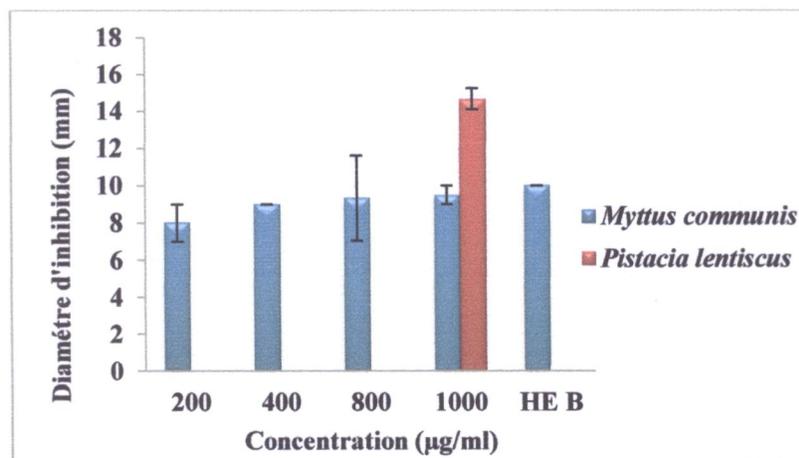
Zone d'inhibition	Transcription	Résultat
< 8 mm	-	Non sensible ou résistante
9 à 14mm	+	Sensible
15 à 19 mm	++	Très sensible
20mm	+++	Extrêmement sensible

Pour mieux expliquer, les résultats sont présentés sous forme d'une comparaison entre les diamètres moyens obtenus, et les concentrations utilisées vis-à-vis des souches bactériennes testées.

➤ **Pour la souche *E. coli***

**Tableau 15:** Diamètre des zones d'inhibition de la croissance des *E. coli* en présence de différentes concentrations en huiles essentielles:

Concentration (µg/ml)	200	400	800	1000	HEB
<i>M.communis</i>	8	9	9,33	9,5	10
<i>P.lentiscus</i>	0	0	0	14,66	0
L'amoxicilline	7,07	7,33	7,67	8	0
Méthanol	0	0	0	0	0



**Fig. 25:** Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles de *M. communis* et *P. lentiscus* vis-à-vis de la souche *E coli*.

D'après le tableau 15 et la figure 25, le diamètre d'inhibition de l'HE de *P. lentiscus* à une concentration de 1000µg/ml est significativement plus important que celui de *M. communis* (14,66 mm contre 8mm) ( $p \leq 0,001$ ) (tableau 5 en annexe).

Toutefois, on constate qu'à des concentrations plus faibles, l'HE de *P. lentiscus* n'a manifesté aucune activité contrairement à l'HE de *M. communis* qui a marqué un effet antibactérien contre la souche *E. coli* avec un diamètre de 8 mm à la concentration 200µg/ml.

En ce qui concerne l'HE brut, *P. lentiscus* n'a manifestée aucune activité contrairement à l'HE brut de *M. communis* qui donne un diamètre de 10 mm.

Contrairement à notre étude, **Bammo et ses collaborateurs (2014)** travaillant sur l'activité antibactérienne de l'HE de *P. lentiscus* contre la souche *E. coli* n'ont trouvé aucune activité. Ceci est peut être du à la composition chimique des HEs.

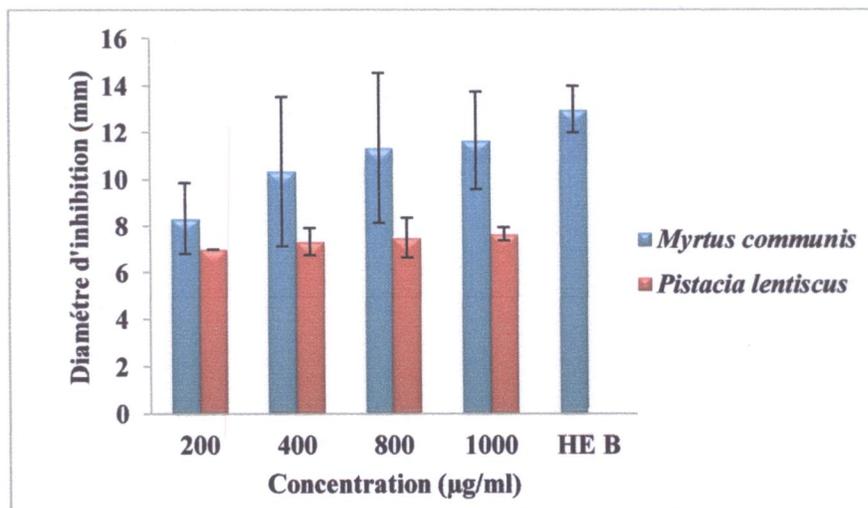
#### ➤ Pour la souche *Klebsiella pneumoniae*

Les résultats de l'effet antibactérien des HE de *M. communis* et *P. lentiscus* contre la souche *Klebsiella pneumoniae* sont représentés dans le tableau 17 et illustrés par la figure 28.

Le diamètre d'inhibition diffère significativement entre les HE de *M. communis* et *P. lentiscus* ( $p \leq 0,05$ ) (tableau 6 en annexe).

**Tableau 16:** Diamètre des zones d'inhibition de la croissance de *Klebsiella pneumoniae* en présence de différentes concentrations en huiles essentielles.

Concentration (µg/ml)	200	400	800	1000	HEB
<i>Myrtus communis</i>	8,33	10,33	11,33	11,67	13
<i>Pistacia lentiscus</i>	7	7,33	7,5	7,67	0
Amoxicilline	15	15,33	15,67	27	/
Méthanol	0	0	0	0	/



**Fig. 26:** Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles de *M. communis* et *P. lentiscus* relatives de la souche *Klebsiella pneumoniae*.

Les diamètres les plus importants ont été enregistrés par les extraits en HE de *M. communis* (13 mm) comparativement aux extraits de *P. lentiscus* (7.66 mm), mais restent inférieurs à ceux de l'amoxicilline (27mm).

En outre, à une concentration inférieure à 400 µg /ml, la souche *Klebsiella pneumoniae* présente une résistance (diamètre = 7.000mm) aux huiles essentielles des *P. lentiscus*.

On marque aussi l'absence de diamètre d'inhibition concernant l'HEB de *P. lentiscus* qui est peut être du à la nature des composants très volatils de cette espèce.

L'activité antibactérienne de l'HE de *M. communis* est plus importante que celle de *P. lentiscus*, donc la sensibilité de *Klebsiella pneumoniae* est différente par rapport aux HEs des deux espèces étudiées. Ceci pourrait être du à la présence de l'Eucalyptol (21.15%) qui est un constituant majoritaire de l'HE de *M. communis*.

Comme le cas d'*E. coli*, **Bammo et ses collaborateurs (2014)** n'ont trouvé aucune activité de l'HE de *P. lentiscus* vis-à-vis de la souche *Klebsiella pneumoniae*.

#### ➤ Détermination de CMI

La concentration minimale inhibitrice de l'HE de *Myrtus communis* est inférieure à 200 µg/ml pour les deux souches bactériennes (*E coli* et *K. pneumoniae*) par contre la CMI de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* est inférieure à 200µg/ml pour *E coli* et égale à 800µg/ml pour *K. pneumoniae*.

D'après les résultats obtenus dans la présente étude, la souche *Escherichia coli* est la souche la plus résistante vis à vis des HE des deux plantes testées, essentiellement l'HE de *Pistacia lentiscus* qui ne présente aucune inhibition jusqu'à la concentration 1000 µg /ml.

Ceci peut être expliqué par la capacité de cette bactérie à synthétiser et à sécréter des agrégats structurés, appelés biofilms ou matrice composée de polysaccharides. Ces biofilms forment une barrière physique contre l'entrée d'HE, et elle sécrète aussi un complexe enzymatique extracellulaire qui peut dégrader les HE (Scalbert *et al.*, 2005).

#### IV.5 Evaluation de l'effet protecteur des HEs contre la toxicité aiguë du Pb

L'intoxication par le plomb est un problème d'une importance considérable et qui n'est pas encore résolu. Il exerce des effets indésirables même à faible niveau d'exposition. Notre objectif est de tester les effets protecteurs des huiles essentielles vis-à-vis de l'intoxication aiguë par ce métal.

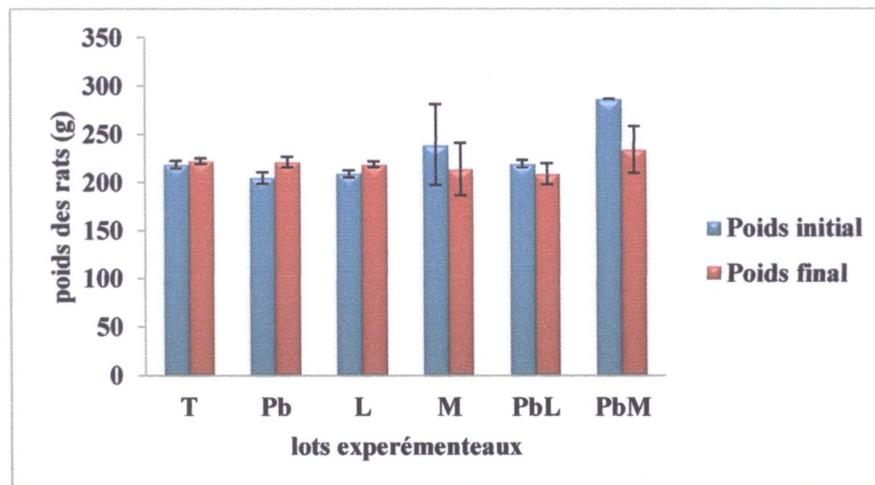
### ➤ Remarque

A la fin de la période d'expérimentation (à 72 heures), nous avons signalé une mortalité chez les rats du groupe PbM (intoxiqué par le plomb et traité par l'HE de *M. communis*). A part cette remarque, tous les animaux des six groupes expérimentaux (Pb, L, M, PbL et PbM) et témoin (T) ont été cliniquement et physiologiquement normaux pendant la période expérimentale.

### V.5.1 Effets sur les paramètres pondéraux

#### ➤ Effets sur le poids corporel

Le changement du poids corporel est utilisé comme un indicateur des effets indésirables des composés chimiques (Hilaly *et al.*, 2004).



T: Témoins, Pb: Contaminés par l'acétate de plomb, L: Traités par l'HE de *Pistacia lentiscus*, M: Traités par l'HE de *Myrtus communis*, PbL: Contaminés par l'acétate de plomb et traités par l'HE de *Pistacia lentiscus*, PbM: Contaminés par l'acétate de plomb et traités par l'HE de *Myrtus communis*.

**Figure 27:** Changement du poids corporel des rats témoins et les rats traités.

La figure 27 représente les résultats obtenus de la variation du poids corporel des rats. On constate que ce dernier n'a pas été affecté par l'acétate de plomb, l'HEs de *Pistacia lentiscus* ou l'EHs de *Myrtus communis* par rapport à celle des rats témoins ( $P > 0,05$ ) (tableau 7 en annexe). Le régime n'a pas changé et les rats ont maintenu un appétit normal, ce qui a retenu leur croissance.

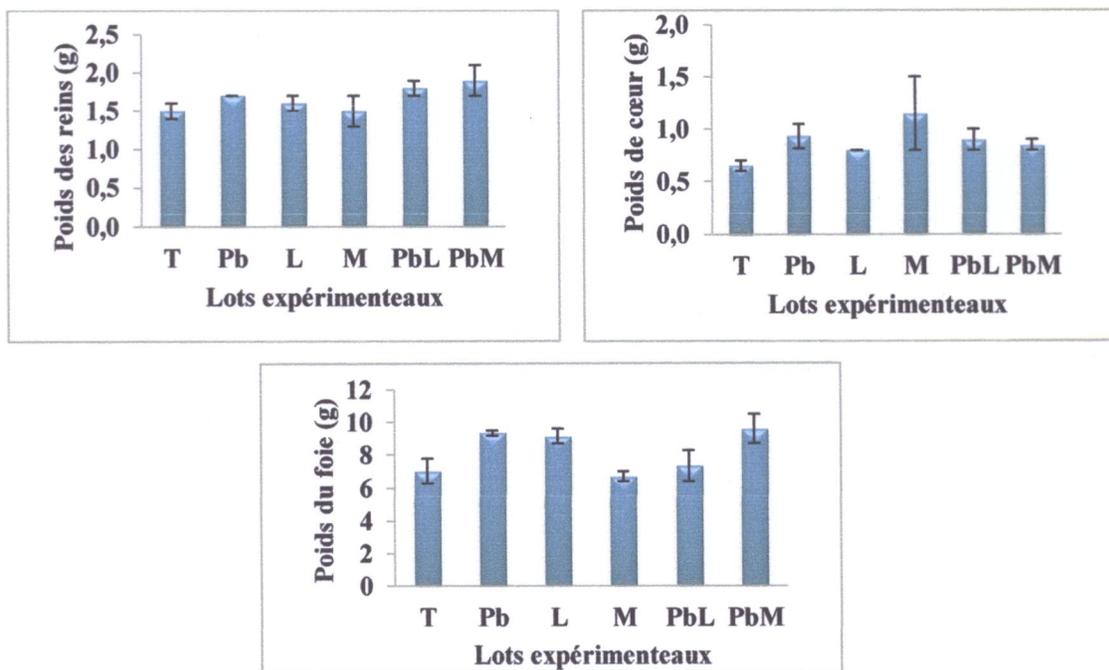
➤ **Effets sur le poids des organes**

D'après la figure 28 et la figure 29, nous avons constaté une augmentation significative du poids des reins et du cœur ( $P \leq 0,05$ ), et hautement significative du foie, du pancréas et de la rate ( $P \leq 0,01$ ) chez les rats traités par l'acétate de plomb, tandis que nous n'avons enregistré aucune différence significative pour le poids des poumons ( $p > 0,05$ ) (tableau 8 en annexe).

Contrairement au poids, la taille et la forme des différents organes prélevés in situ sont normales. Ces résultats suggèrent que le traitement par l'HE et l'acétate de plomb a des effets sur les organes.

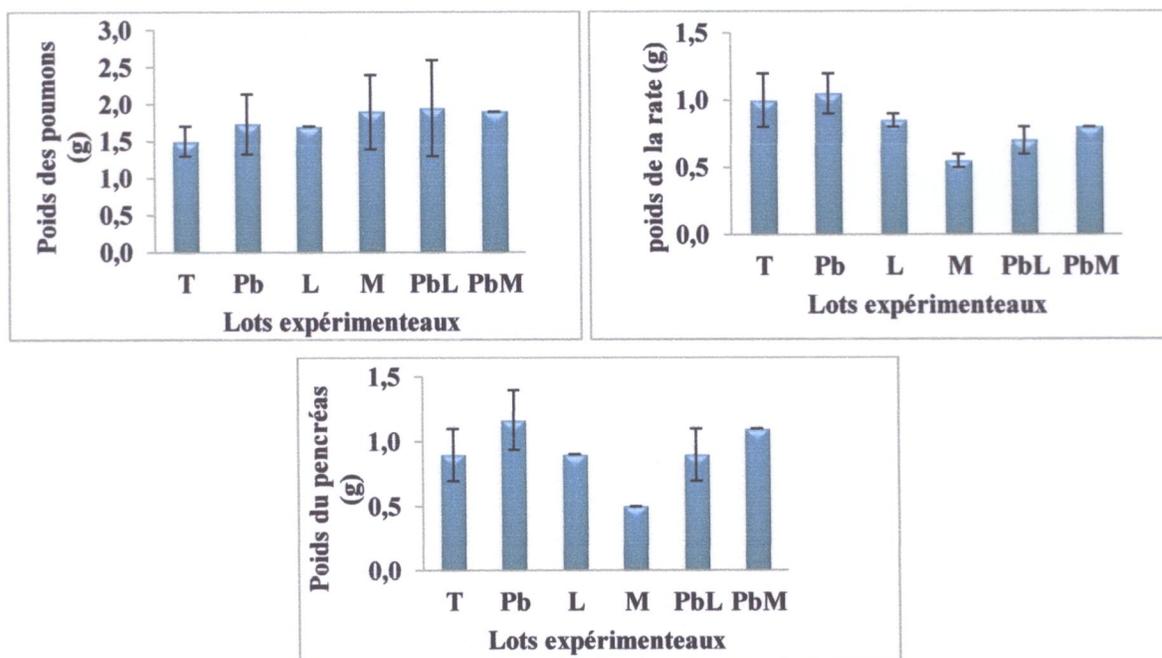
Généralement, le changement du poids des organes internes est un indice de toxicité après l'exposition à une substance toxique (**Raza et al., 2002; Teo et al., 2002**).

L'augmentation du poids du foie peut être liée à une congestion par réservation du sang dans le foie (**Rasekh et al., 2008**).



T: Témoins, Pb: Contaminés par l'acétate de plomb, L: Traités par l'HE de *Pistacia lentiscus*, M: Traités par l'HE de *Myrtus communis*, PbL: Contaminés par l'acétate de plomb et traités par l'HE de *Pistacia lentiscus*, PbM: Contaminés par l'acétate de plomb et traités par l'HE de *Myrtus communis*.

Fig. 28: Poids du foie, du cœur et des reins des rats témoins et les rats traités.



T: Témoins, Pb: Contaminés par l'acétate de plomb, L: Traités par l'HE de *Pistacia lentiscus*, M: Traités par l'HE de *Myrtus communis*, PbL: Contaminés par l'acétate de plomb et traités par l'HE de *Pistacia lentiscus*, PbM: Contaminés par l'acétate de plomb et traités par l'HE de *Myrtus communis*.

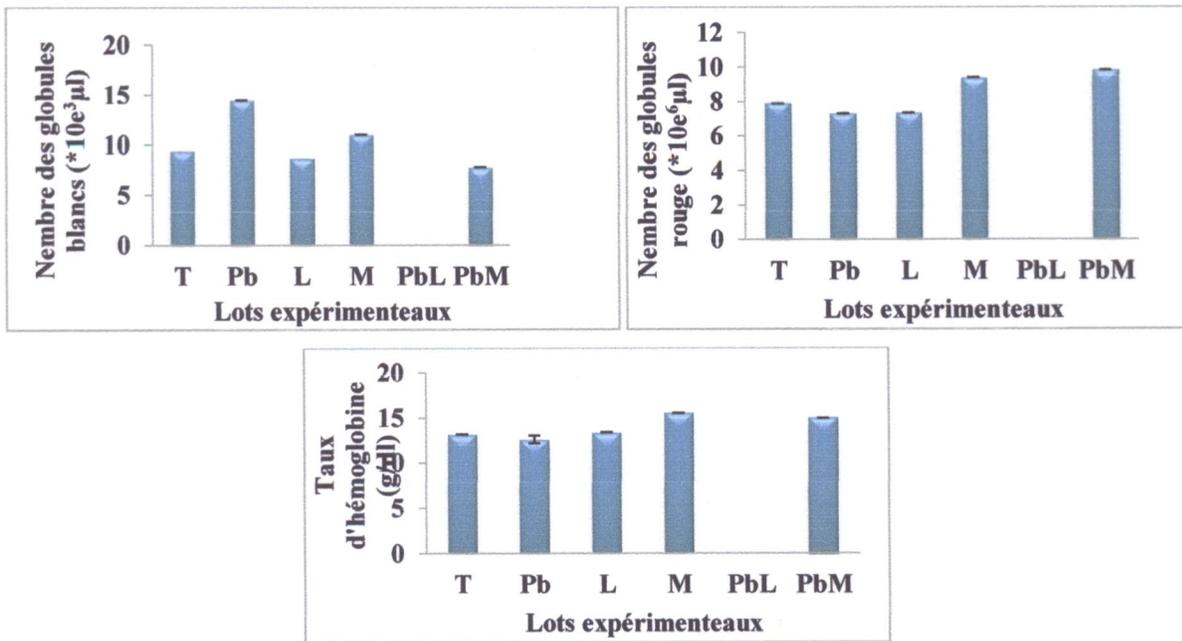
Fig. 29: Poids de la rate, des poumons et du pancréas.

### V.5.2 Effets sur les paramètres hématologiques

Au cours de l'expérience, les échantillons du sang prélevés des rats contaminés par l'acétate de plomb et traités par l'HE de *Pistacia lentiscus* (PbL) ont été coagulés ce qui explique le manque de données concernant ce groupe (figure 30 et 31).

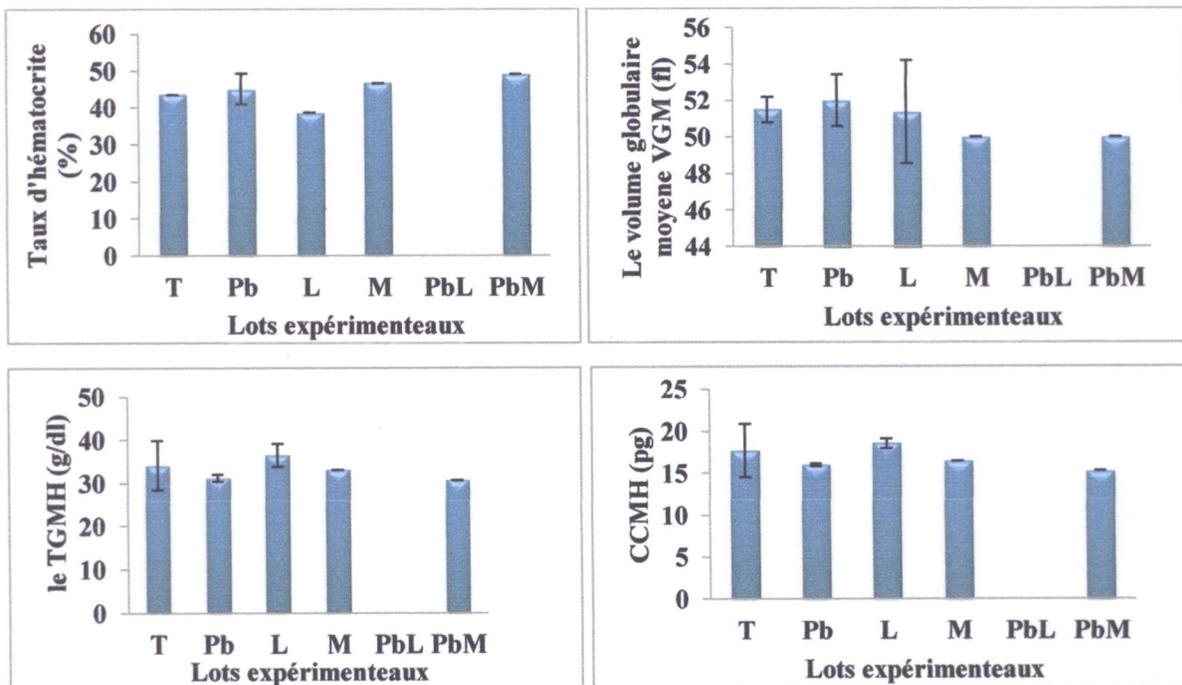
Les résultats hématologiques obtenus illustrés dans la figure 32 et la figure 33, révèlent les observations ci-après:

- une augmentation du nombre des globules blanc du groupe Pb et du groupe M par rapport à celui du groupe témoin (T) ce qui peut être expliqué par une réponse immunitaire (amplification des cellules immunitaires) contre les érythrocytes modifiés par le plomb: le cas d'altération membranaire (**Passow, 1980**). Mais cette augmentation reste non significative ( $p>0,05$ ) (Tableau9 en annexe).
- une diminution du nombre des globules rouges chez le groupe Pb et du groupe L par rapport au groupe T. Donc, le plomb peut conduire à un effet hémolytique car sa fixation sur la membrane des globules rouges provoque le blocage des groupements SH de la pompe à potassium et entraîne une hémolyse et une diminution de la durée de survie des érythrocytes (**Raghavan et al., 1981**).
- Une diminution très hautement significative du taux d'hémoglobine ( $p\leq 0,001$ ) (Tableau9 en annexe)) chez le groupe Pb par rapport à celui du groupe T, conséquence de l'action du Pb sur les enzymes de la biosynthèse de l'hème, surtout au niveau de l'enzyme l'hème synthétase (ferrochélatase) qui subit soit une inhibition importante lors de l'intoxication au plomb soit l'anabolisme de l'hème par une inhibition sévère de l'ALAD (**Baloh, 1974; Kisser, 1977**).
- Les résultats exposés dans la figure 34 ont montrés qu'il n'y a pas d'importantes modifications sur les indicateurs hématologiques qui restent (Hématocrite, VGM, TGMH et CCHM) ( $p>0,05$ ) (tableau9 en annexe).



T: Témoins, Pb: Contaminés par l'acétate de plomb, L: Traités par l'HE de *Pistacia lentiscus*, M: Traités par l'HE de *Myrtus communis*, PbL: Contaminés par l'acétate de plomb et traités par l'HE de *Pistacia lentiscus*, PbM: Contaminés par l'acétate de plomb et traités par l'HE de *Myrtus communis*.

Fig. 30: Nombre des globules blancs, globules rouges et le taux d'hémoglobine.

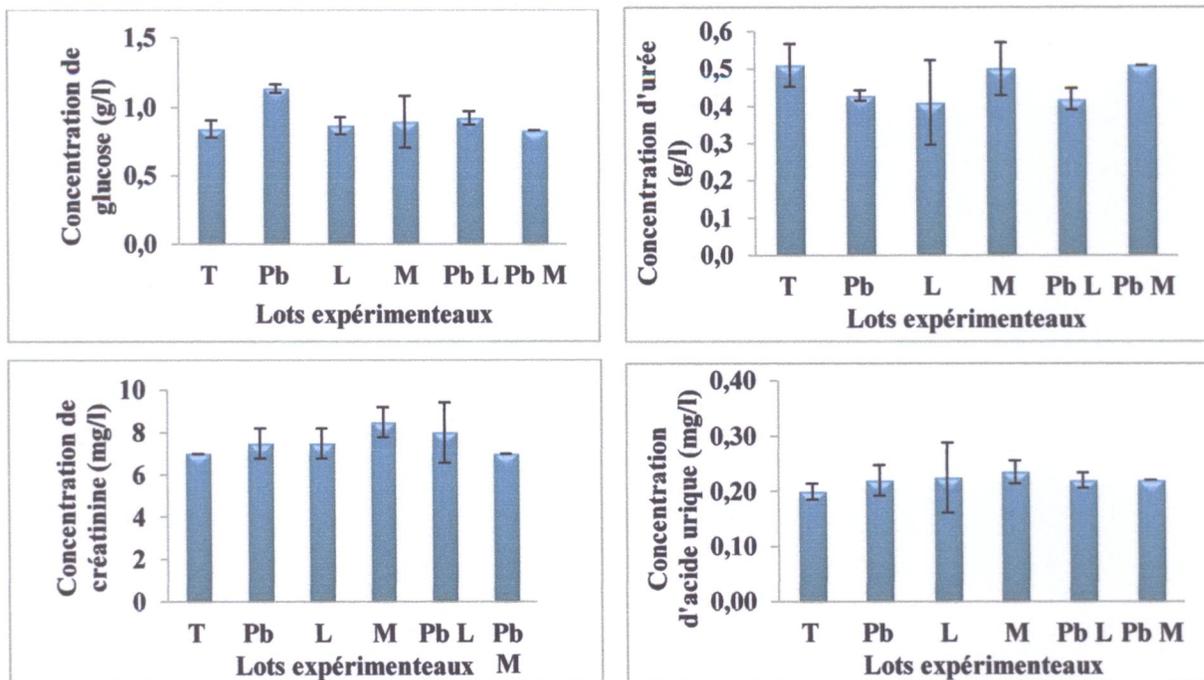


T: Témoins, Pb: Contaminés par l'acétate de plomb, L: Traités par l'HE de *Pistacia lentiscus*, M: Traités par l'HE de *Myrtus communis*, PbL: Contaminés par l'acétate de plomb et traités par l'HE de *Pistacia lentiscus*, PbM: Contaminés par l'acétate de plomb et traités par l'HE de *Myrtus communis*.

Fig.31: le taux d'hématocrite, VGM, TGMH et CCHM.

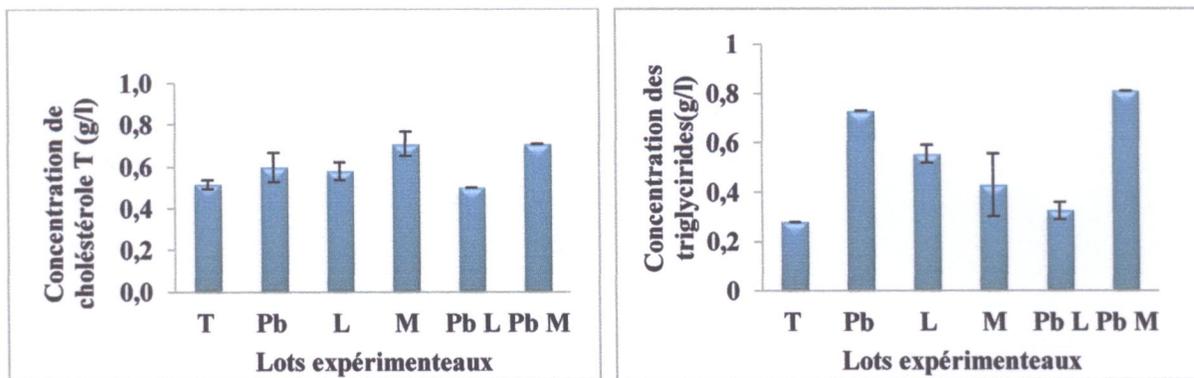
V.5.3 Effets sur les paramètres biochimiques

Les figures (32, 33 et 34) représentent les principaux résultats de l'analyse biochimiques des rats.



T: Témoins, Pb: Contaminés par l'acétate de plomb, L: Traités par l'HE de *Pistacia lentiscus*, M: Traités par l'HE de *Myrtus communis*, PbL: Contaminés par l'acétate de plomb et traités par l'HE de *Pistacia lentiscus*, PbM: Contaminés par l'acétate de plomb et traités par l'HE de *Myrtus communis*.

Fig.32: Concentration du glucose, de l'urée, de la créatinine, et de l'acide urique.



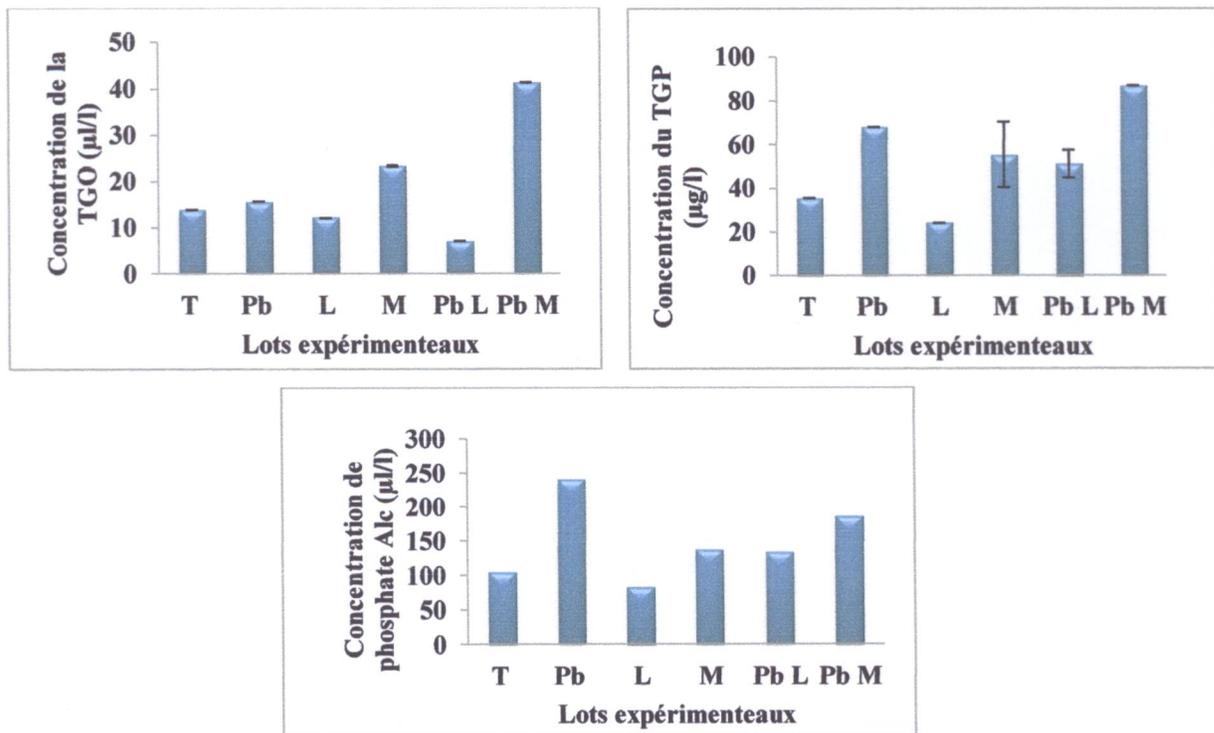
T: Témoins, Pb: Contaminés par l'acétate de plomb, L: Traités par l'HE de *Pistacia lentiscus*, M: Traités par l'HE de *Myrtus communis*, PbL: Contaminés par l'acétate de plomb et traités par l'HE de *Pistacia lentiscus*, PbM: Contaminés par l'acétate de plomb et traités par l'HE de *Myrtus communis*.

Fig.33: concentration du cholestérol total et des triglycérides.

Les résultats illustrés dans la figure 32 montrent bien qu'il n'y a pas d'importantes modifications sur le glucose et les indicateurs rénaux (l'urée, la créatinine, et l'acide urique) ( $p > 0,05$ ) (tableau 10 en annexe).

En ce qui concerne les résultats relatifs au cholestérol et aux triglycérides représentés dans la figure 35, on note une augmentation hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) pour le cholestérol chez les groupes Pb, L, M et PbM par rapport aux témoins et une augmentation très hautement significative pour les triglycérides ( $p \leq 0,001$ ) chez les groupes Pb, PbM, par rapport aux témoins.

Aussi, ces résultats montrent une diminution du taux de cholestérol chez les rats du groupe PbL par rapport aux témoins et tous les autres groupes ce qui indique un effet protecteur de l'huile essentielle de *P. lentiscus*. De même pour les triglycérides où on a enregistré une diminution chez les rats PbL par rapport aux rats intoxiqués par le plomb ce qui indique toujours un effet protecteur de l'huile essentielle du *P. lentiscus*. En revanche, le traitement des rats par l'huile essentielle de *M. communis* à une dose de 0,5 ml/Kg a montré une augmentation de la concentration du cholestérol et des triglycérides par rapport au groupe témoin.



T: Témoins, Pb: Contaminés par l'acétate de plomb, L: Traités par l'HE de *Pistacia lentiscus*, M: Traités par l'HE de *Myrtus communis*, PbL: Contaminés par l'acétate de plomb et traités par l'HE de *Pistacia lentiscus*, PbM: Contaminés par l'acétate de plomb et traités par l'HE de *Myrtus communis*.

**Fig. 34:** Concentration sérique de la TGO, la TGP et de l'ALP.

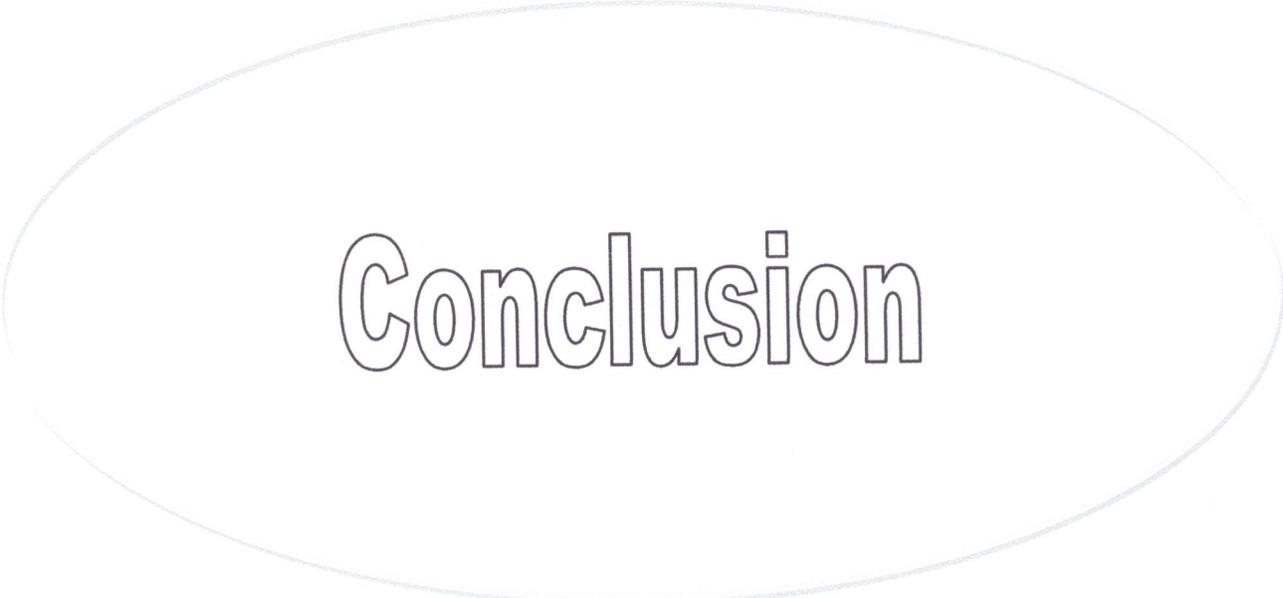
Le dosage TGO (ASAT), TGP (ALAT) et PAL consiste à évaluer l'effet hépato protecteur des huiles essentielles chez les rats *Wistar* intoxiqués par l'acétate de plomb.

Les résultats illustrés par la figure 34 ont montré une augmentation significative de la TGO de la TGP et des ALP dans les groupes Pb (intoxiqués par le Pb), M (traités avec l'HE de *M. communis*) et PbM (intoxiqués par le Pb et traités par l'HE de *M. communis*) par rapport au groupe témoin. En revanche, le traitement des rats par l'HE de *M. communis* à la dose de 0,5 ml/Kg a montré une augmentation des paramètres hépatiques, ce qui indique une toxicité des rats par le *M. communis*. En effet, le traitement avec l'huile de *M. communis* à la dose de 0.5ml/Kg (PbM) n'a montré aucun effet hépato protecteur comme en témoignent les paramètres hépatiques élevés. Donc le plomb et l'HE de *M. communis* ont induit une augmentation des activités enzymatiques hépatiques

En revanche, le traitement des rats intoxiqués par l'HE de *P. lentiscus* à la dose de 0,5ml/Kg a montré une diminution de la TGO, la TGP et des ALP par rapport au groupe des rats intoxiqués par le plomb, en effet, on observe une stabilisation des paramètres hépatiques près de la normale. Donc on peut dire que l'HE de *P. lentiscus* possède un effet hépato protecteur vis-à-vis du Pb.

Le foie est un organe vital, qui joue un rôle majeur dans le métabolisme des xénobiotiques de l'organisme. Les lésions hépatiques ou le dysfonctionnement du foie est un problème de santé majeur qui interpelle non seulement les professionnelles de la santé mais aussi l'industrie pharmaceutique et les organismes de réglementation des médicaments (**Ramkanth et al., 2010**).

Nous pouvons conclure qu'une dose de 0,5 ml/Kg d'une HE de *P. lentiscus* de la région de Chahna-Jijel- peut être recommandée dans la prévention des maladies du foie.



Conclusion

Les résultats obtenus nous ont permis de tirer les conclusions suivantes :

Le rendement en huiles essentielles des feuilles de *M. communis* (0.15%) est nettement supérieur à celui des feuilles de *P. lentiscus* (0.05%). L'analyse chromatographique par la technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse a permis d'identifier 60 composés de l'huile essentielle de *M. communis* dont les composés majoritaires sont:  $\alpha$ -pinène (23,08%), Eucalyptol (21,15%) et D-limonène (12,53%), et 70 composés de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* dont les composés majoritaires sont:  $\alpha$ -pinène (25.32%), Caryophyllène (20.03%) et  $\beta$ -Pinène (9.51%),.

L'activité antioxydante des huiles essentielles de *M. communis* et *P. lentiscus* est faible par rapport à celle des composés de référence. Mais les valeurs trouvées présentent un intérêt pour l'utilisation de ces huiles à des fins thérapeutiques. Les résultats ont montré que l'huile essentielle de *Myrtus communis* a un pouvoir de piégeage du radical DPPH• plus élevé par rapport à l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* avec des IC<sub>50</sub> de l'ordre de 959.37 $\mu$ g/ml et 976.82 $\mu$ g/ml comparativement à l' $\alpha$  tocophérol (IC<sub>50</sub>= 503.61 $\mu$ g/ml). Un pouvoir réducteur de l'HE de *Pistacia lentiscus* plus important par rapport au pouvoir réducteur de l'HE de *Myrtus communis* avec des CR<sub>0,5</sub> égal à 570,75 $\mu$ g/ml et 657,28 $\mu$ g/ml mais qui restent moins importants que celle de l' $\alpha$ -tocophérol (CR<sub>0,5</sub> égal à 121,33 $\mu$ g/ml).

La méthode de l'aromatogramme nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle des feuilles du *Myrtus communis* et *pistacia lentiscus* vis-à-vis des deux souches bactériennes. Ce pouvoir est relativement élevé pour l'huile essentielle de *M. communis* et moins important pour l'huile essentielle de *P. lentiscus*.

L'huile essentielle des feuilles de *M. communis* inhibe la croissance de *K. pneumoniae*, les CMI sont < à 200  $\mu$ g/ml (100  $\mu$ g/ml). L'inhibition est plus faible pour *E. coli*, les CMI obtenues sont de l'ordre de 100 et 800 $\mu$ g/ml respectivement pour *M. communis* et *P. lentiscus*. L'huile essentielle brute de *P. lentiscus* n'a manifesté aucune activité vis-à-vis d'*E. coli* et de *K. pneumoniae*. Contrairement à l'huile essentielle brute de *M. communis* qui donne un diamètre de 10mm et 13mm pour les deux souches respectivement.

En effet, les diamètres d'inhibition, générés par les huiles essentielles, sont inférieurs à ceux produits par l'amoxiciline et variables selon l'huile utilisée. L'activité antibactérienne des HE qui sont des mélanges complexes de molécules, généralement inférieure à celle exercée par les molécules antibiotiques, isolés des microorganismes. Elles sont aussi considérées comme actives si elles produisent des diamètres d'inhibition supérieurs ou égaux à 14mm. Avec des diamètres d'inhibitions compris entre 9 mm à 15 mm, les huiles essentielles de *M. communis* et *P. lentiscus* sont considérées comme peu actives.

D'autre part, l'intoxication au plomb est un problème d'une importance considérable et qui n'est pas encore résolu. Il exerce des effets indésirables même à faibles niveau d'exposition.

L'objectif est de tester les effets protecteurs des huiles essentielles de l'intoxication par ce métal. En effet, l'intoxication aiguë par le plomb des jeunes rats *Wistar* sous forme d'acétate de plomb par voie orale pendant 72 heures conduit à un ensemble de perturbation qui sont :

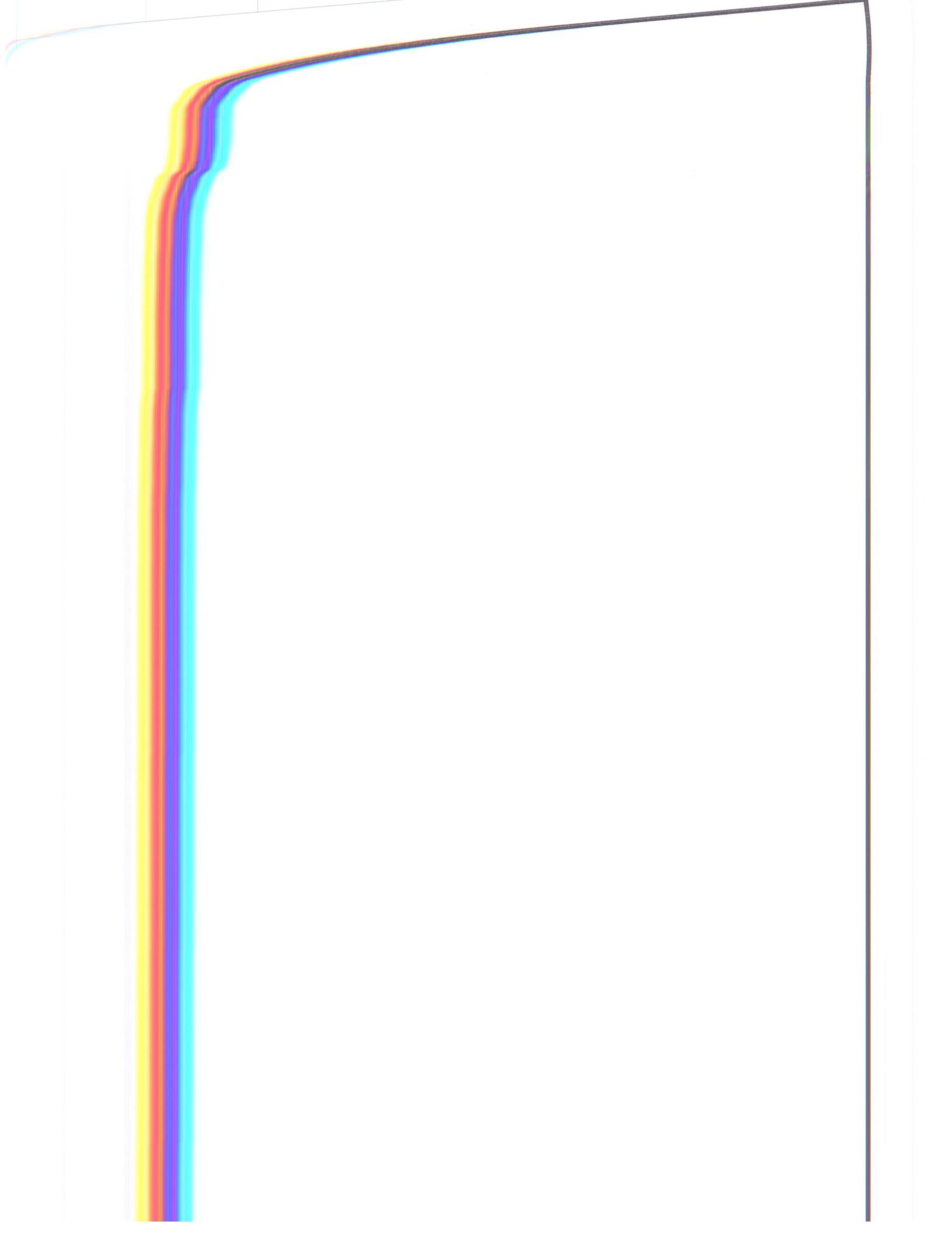
- l'augmentation des poids des organes.
- l'altération de la fonction hématologique
- l'altération de la fonction hépatique (l'augmentation du cholestérol, des triglycérides et l'activité enzymatique des enzymes ASAT, ALAT, PAL).

La supplémentation de l'huile essentielle de *M. communis* ne semble pas avoir diminué ou neutralisé la toxicité du Pb.

Tandis que la supplémentation de l'huile essentielle de *P. lentiscus* a restauré la fonction hépatique, et hématologique et le profil lipidique. Nos résultats suggèrent que l'huile essentielle de *P. lentiscus* peut réduire la toxicité induite par le plomb. Les supplémentassions de l'huile essentielle de *P. lentiscus* pourrait être une méthode simple, peu coûteuse et utile pour protéger quiconque exposé au Pb de ses effets toxiques.

Comme perspective de recherche, on propose :

- Déterminer le niveau des métaux lourds au niveau des organes
- Dosage des biomarqueurs de stress (GST, GSH, GSPx, catalase....)
- Utiliser différentes doses pour déterminer le DL50 de ces huiles essentielles
- Etaler l'étude sur d'autre éléments traces métalliques
- Etaler l'étude phytochimique sur d'autres parties de cette plante.



- Abatoumnou L, 2012.** Gestion intégrée des principaux insectes ravageurs des céréales par l'utilisation des métabolites secondaires des plantes indigènes du Sénégal et de Centrafrique [En ligne], thèse de doctorat, Dakar, 163 p.
- Abid L, 2009.** Recherche des activités antimicrobiennes et antioxydantes de *schinus molle L* et *Pistacia vera L* de la région de Tlemcen [En ligne], mémoire de magister en biologie, université Abou Bakr Belkaid-Tlemcen, 100 p.
- AFNOR:** Association Française de Normalisation, 1987. Tour Europe, Cedex 7 - 92080 Paris.
- Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (AFSSPS), 2008.** Recommandation relatives aux critères de qualité des huiles essentielles: contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles, France, disponible sur "www. Afssaps. Sante. Fr", 18 p.
- Aidi Wannas W, Mhamdi B, Sriti J, Ben Jemia M, Ouchikh O, Hamdaoui G, Kchouk M E et Marzouk B, 2010.** Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis var. italica L.*) leaf stem and flower in Food and Chemical Toxicology, 48, Tunisie, disponible sur [www.elsevier.com/locate/foodchemtox](http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox), pp 1362-1370.
- Aouissa, 2002.** Etude des activités biologiques et de la toxicité aiguë de l'extrait aqueux des feuilles de *mangifera indica l.* (Anacardiaceae) [En ligne], thèse de doctorat, Mali. Université de Bamako.
- Arab K, Bouchenak O, Yahiaoui K, 2014.** Phytochemical study and evaluation of the antimicrobial and antioxidant activity of essential oils and phenolic compounds of *pistacia lentiscus*, *journal of fundamental and applied sciences* 6(1), Algérie, pp 79-93.
- Archambaud M, 2009.** Méthodes d'évaluation de l'activité des antibiotiques *in vitro*, Cour, laboratoire bactériologie-hygiène CHU Rangueil, Toulouse, pp 29.
- Athamena S, Chalghem I, Kassah-Laouar A, Laroui S et Khebri S, 2010.** Activité antioxydante et Antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum L* In Lebanese Science Journal, Université de Batna, Vol 11, No 1, Disponible sur [athamenasouad@yahoo.fr](mailto:athamenasouad@yahoo.fr), 81 p.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D et Idaomar M, 2008.** Biological effects of essential oils in food and chemical toxicology, 46, disponible sur [www.Elsevier.Com](http://www.Elsevier.Com), pp 446-475.
- Baloh RW, 1994.** Laboratory diagnostic of increased lead absorption Arch ENVI, health, 23, pp 198-208.
- Beloued A, 2009.** Plantes médicinales d'Algérie, l'office des publications universitaire, ISBN 9961-0-0304-7, Algérie, 281 p.

- Barboni T, Venturini N, Paolini J, Desjobert JM, Chiaramonti N et Costa J, 2010.** Characterisation of volatiles and polyphenols for quality assessment of alcoholic beverages prepared from Corsican *Myrtus communis* berries in Food Chemistry, 122, France, disponible sur [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem), pp 1304-1312.
- Barouki R, 2006.** Stress oxydant et vieillissement, medecine/sciences, N° 3, vol 22, paris, disponible sur [robert.barouki@univ-paris5.fr](mailto:robert.barouki@univ-paris5.fr), pp 266-272.
- Baser K H C et Buchbauer G, 2010.** Handbook of essential oils: science, technology, and applications, Taylor & Francis Group, New York, Disponible sur [www.taylorandfrancis.com](http://www.taylorandfrancis.com), ISBN: 978-1-4200-6315-8, 994 p.
- Benhammou N, Atik Bekkara F et Kadifkova Panovska T, 2008.** Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts, African Journal of Pharmacy and Pharmacology, Vol 2(2), disponible sur <http://www.academicjournals.org/ajpp>, pp 22-28.
- Bekhechi C et Abdelouahid D, 2010.** Les huiles essentielles, ISBN978 9961 0 1394 6, 1.04.5145. Algérie.
- Benjilali B, (sd).** Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements, sciences alimentaires et nutritionnelles, (I.A.V) Hassan II, rabat, Maroc, " b, [benjilali@iav.ac.ma](mailto:benjilali@iav.ac.ma)", 43 p.
- Benteaud E, 2011.** Les techniques d'extraction, Comité française du parfum, France, pp 7.
- Blog, 2006.** vitamine C, biofficine. Com, 5p.
- Bohlmann J et Keeling C I, 2008.** Terpénoïde biomaterials, the plant journal, N°54,656-669, disponible sur "e-mail [Bohlmann @ interchange. Ubc.ca](mailto:Bohlmann@interchange.Ubc.ca)", 14 p.
- Botton B, Bertron A, Fevere M, Gauthier S, Guph D, Larpent JP, Reymond P, Sanglier JJ, Vaysser Y, et Veau S, 1990.** Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle, Masson collection biotechnologies, 10 p.
- Bougandoura N et Bendimerad N, 2013.** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta (L.) Briq*, Nature & Technologie, n° 09, disponible sur " [bougandouranabila@yahoo.fr](mailto:bougandouranabila@yahoo.fr). pp14-19.
- Boukhatem M N, Ferhat M A, Kameli A, Saidi F, Taibi H, et Teffahi D, 2014.** Valorisation de l'essence aromatique du thym (*thymus vulgaris L.*) en aromathérapie anti-infectieuse, international journal of innovation and applied studies, vol 8, N° 4, disponible sur [www. Ijias. Issr- journals. Org/](http://www.Ijias.Issr-journals.Org/), Algérie, ISSN 2028-9324, pp 1418-1431.
- Boulehbai F, 1993.** Microbiologie S1 clinique, Alger, 127 p.

- Bruneton J, 1993.** Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales, Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 915 p.
- Buckle J, 2003.** Clinical aromatherapy: essential oils in practice, 2<sup>ème</sup> Ed, Elsevier science, America, ISBN 443-07236-1, 424 p.
- Buhrer-Astfalk E, Buehrer H N et Kleinandelfingen, 2011.** Information spécialisées de la vitamine E, disponible sur [www](http://www.swissmilk.ch), Swissmilk. Ch, pp 4.
- Buronzio A M, 2008.** Grand guide des huiles essentielles, hachette pratique, ISBN: 978-2-0123-7362-4, 244 p.
- Burt S, 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review, International Journal of Food Microbiology, n° 94 (2004) 223-253, disponible sur [www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro](http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro).
- Caillet S et Lacroix M, 2007.** Les huiles essentielles: leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire, disponible sur "Monique, Lacroix @ iaf. Inrs. Ca", 8 p.
- Cakir A, 2004.** Essential oil and fatty acid composition of the fruits of *Hippophae rhamnoides L.* (Sea Buckthorn) and *Myrtus communis L.*, from Turkey in Biochemical Systematics and Ecology, 32, Türkiye, disponible sur [www.elsevier.com/locate/biochemsys](http://www.elsevier.com/locate/biochemsys), pp 809-816.
- Carlo I G T, Melis M, Angioni A, Pala M et Cabras P, 2006.** Myrtle hydroalcoholic extracts obtained from different selections of *Myrtus communis L.*, Food Chemistry, 101, Italie, disponible sur [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem), pp 806-811.
- Castola V, Bighelli A et Casanova J, 1991.** Biochemical Systematics and Ecology, 28, France, disponible sur [isdcasanova@vignola.univ-corse.fr](mailto:isdcasanova@vignola.univ-corse.fr). pp 79-88.
- Chabert G, 2014.** Myrtacées et aromathérapie [En ligne], thèse de doctorat, France, disponible sur <http://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00925796>, pp 13-107.
- Chakou M, Bassou K, 2007.** Efficacités antibactériennes et antifongiques des huiles essentielles obtenues par extraction de la menthe verte *Mentha Spicata L.* issue de la région de Ouargla sur quelques germes pathogènes: *Echerichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *ccandida albicans*, Etude supérieures, Université de Kasdi Merbah Ouargla, 69 p.
- Chouitah O, 2012.** Composition chimique et activité antibactériennes des huiles essentielles des feuilles de *Glycyrrhiza glabra*, Biochimie [En ligne], thèse de doctorat, université d'Oran, pp 143.
- Chua M T, Tung Y T et Chang S T, 2008.** Antioxidant activities of ethanolic extracts from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum*, Bioresource Technology, n° 99, Taiwan, disponible sur "[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)", pp 1918-1925.

- Couderc V L, 2001.** Toxicité des huiles essentielles [En ligne], thèse de doctorat, ministre de l'agriculture et de la pêche, université Paul-Sabatier de Toulouse, 84 p.
- Defraigne J O et Pincemail J, 2007.** Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités, Rev Med Liege 62 : 4, Belgique, 10 p.
- Degryse A C, Delpla I et Voinier M A, 2008.** Atelier santé environnement risque et bénéfices possibles des huiles essentielles, IGS-EHESP, 87 p.
- Delili L, 2007.** Les plantes médicinales d'Algérie, Berti, Alger, ISBN 9961-69-131-8, 240 p.
- De Moffarts B, Kirschvink N, Pincemail J, Lekeux P, (2005).** Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval 149, 9 p.
- Derwich E, Benziane Z, & Boukir A, 2009.** Chemical composition and antibacterial activity of leaves essential oil of *Laurus nobilis* from Morocco. *Aust. J. Basic & Appl. Sci.*, 3 (4), pp 3818-3824.
- Djenane D, Yangüela J, Montañés L, Djerbal M, Roncalés P, 2011.** Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: Efficacy and synergistic potential in minced beef. *Food Control* 22, Espagne, pp 1046-1053.
- Drochner W, Kerler A, Zacharias B, 2004.** Pectin in pig nutrition, a comparative review. *J Amin. Physiol Amin Nutr (Berl)* 88. pp 241-252.
- Duru M E, Cakir A, Kordali S, Zengin H, Harmandar M, Izumi S, Hirata T, 2003.** Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three *pistacia* species, *Fitoterapia* 74, Turkey, pp 170-176.
- Duval L, 2012.** Les huiles essentielles à l'officine, Rouen, disponible sur <http://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas>, 137 p.
- Eberlin T, 1994.** Les antibiotiques, Nathan, paris, ISBN 2-09-190639-5, 128 p.
- El Haib A, 2011.** Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques, chimie organique et catalyse [En ligne], thèse de doctorat, université de Toulouse, 159 p.
- El kalamouni C, 2010.** Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées, thèse du doctorat, science des agroressources, université de Toulouse, 263 p.
- Favet J, 2014.** Antibiotiques et résistance bactérienne: offensives et contre-offensives, Séminaire de bactériologie. 16 p.

- Favier A, 2003.** Le stress oxydant, l'actualité chimique, pp 109-111.
- Festy D, 2007.** Ma bible des huiles essentielles, Leduc-s, France, ISBN 978-284899-175-7, 549 p.
- Fillatre Y, 2011.** Produits phytosanitaires: Développement d'une méthode d'analyse multi-résidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem, France, Disponible sur <https://tel.archives-ouvertes.fr>, 266 p.
- Folco L, Anja H, Laurent T, Robert M, Guillaume G et Benjamin D, 1999.** Dossier couplage.
- Fouché M, Zunino M, Handrik H, 2000.** Plantes aromatiques et médicinales, In texte Edition, Toulouse, 242 p.
- Gardeli C, Papageorgiou V P, Mallouchos A, Theodosis K et Komaitis M, 2008.** Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L and *Myrtus communis* L: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts, Food Chemistry, 107, Grèce, Disponible sur [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem), pp 1120-1130.
- Gawelik K, 2011.** Comment bien utiliser les huiles essentielles? Ou l'art de l'aromathérapie, katisa édition, disponible sur "<http://www.katisa.Editions.com>", 12 p.
- Ghasemi E, Raofie F et Mashkouri N, 2011.** Application of response surface methodology and central composite design for the optimisation of supercritical fluid extraction of essential oils from *Myrtus communis* L leaves in Food Chemistry, 126, Iran disponible sur [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem), pp: 1449-1453.
- Gill SS et Tuteja N, 2010.** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, Plant Physiology and Biochemistry journal 48, India, Disponible sur [www.elsevier.com/locate/plaphy](http://www.elsevier.com/locate/plaphy), pp: 909-930.
- Girre L, 2006.** Les plantes et les médicaments, Nathalie Rachline, Paris, ISBN 2-603-01377-7, 553 p.
- Gutman J, 2000.** Glutathione: aide essentielle à une bonne santé In le Guide Ultime du Glutathion, Gutman & Schettini, G&S Health Books Inc, Montréal, Canada, 12 p.
- Haleng J, Pincemail J, Defraigne J O, Charlier C et Chapelle J P, 2007.** Le stress oxydant, vol: 62: 10: 628-638, 11 p.
- Hamadi N, 2010.** Effet du resveratrol sur les défenses antioxydantes chez les rats rendus diabétiques par l'injection de la streptozotocine, thèse de doctorat. Université de constantine. 58 p.
- Hennebelle T, Sahpaz S, Bailleul F, 2004.** Polyphénols végétaux, source, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif, Phytothérapie 1, pp 3-6.

- Hilaly, J E, Israili Z H, Lyouss B, 2004.** Acute and chronic toxicological studies of *Ajuva Iva* in experimental animals, *Journal of Ethnopharmacology* 91, 50 p.
- Hart T, et Shears P, 2002.** Atlas de poche de Microbiologie, Flammarion Médecine Sciences. Paris, 213 p.
- Jacob V, 2010.** Chromatographie en Phase Gazeuse CPG, TP Présentation théorique de la chromatographie en phase gazeuse, <http://www.flavornet.org>.
- Kisser W, 1977.** Biochemische Methoden Zum Nachweis von Bleivergiftung Arch. Toxicol, pp 173-193.
- Lahlou M, 2004.** Method of study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy research*, N°18. pp 435-448.
- Laib I, 2012.** Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis*: application aux moisissures des légumes secs, *Nature & Technologie*, n° 07, pp 45-51, disponible sur " [mina.laib@gmail.com](mailto:mina.laib@gmail.com)".
- Larousse, 2001.** Encyclopédie des plantes médicinales identification, préparation, soins, ISBN: 2-03-560252-1, Paris, 335 p.
- Ledru D, 2001.** Reconnaissance des végétaux, Tec & Doc, Paris, ISBN 2-7430-0476-2, 531 p.
- Li X, Zhang D, Chen F, Ma J, Dong Y, et Zhang L, 2004.** *Klebsiella singaporensis* sp, a novel isomaltulose-producing bacterium, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(Pt 6), pp 2131/2136.
- Longo L, Scardino N et Vasapollo G, 2007.** Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus L*, *Phillyrea latifolia L*, and *Rubia peregrina L*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, Italie, disponible sur [www.elsevier.com/locate/ifset](http://www.elsevier.com/locate/ifset), pp 360-364.
- Lubinic E, 2006.** Manuel pratique d'aromathérapie, Les huiles essentielles et leur utilisation, Vigot, France, ISBN(10) 2-7114-1569-4, 270 p.
- Malecky M, 2007.** Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins, *Physiologie de la Nutrition et Alimentation*. Paris, pp 3-35.
- Mayer F, 2012.** Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles: étude de cas en maison de retraite [En ligne], thèse du doctorat, pharmacie, Université de Lorraine, 107 p.
- Meddour A, Yahia M, Benkiki N et Ayachi A, 2013.** Étude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du *capparis spinosa* L, *Lebanese Science Journal*, Vol 14, No 1, disponible sur " [bioasmed@yahoo.fr](mailto:bioasmed@yahoo.fr)".

- Mercan D, 2010.** Le stress oxydatif, Lausanne, disponible sur " dany. Mercan @ unilabs. Com", 53 p.
- Messaoud C, Béjaoui A et Boussaid M, 2011.** Fruit color, chemical and genetic diversity and structure of *Myrtus communis* L, var. *italica* Mill, *Biochemical Systematics and Ecology* 39, Tunisia, pp 570-580.
- Mohammedi Z et Atik F, 2012.** Pouvoir antifongique et antioxydant de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* L, *Nature & Technologie*, n ° 06, disponible sur " mdi3zhr@gmail.com", pp 35-39.
- Mohammedi Z, 2006.** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen [En ligne], thèse de magister, produit naturels, activités biologiques et synthèse, université Abou Bakr Belkaid Tlemcen, 155 p.
- Muanda F N, 2010.** Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques, chimie organiques [En ligne], thèse de doctorat, université de Paul Verlaine-Metz, 294 p.
- Musselli A, 2007.** Analyse des mélanges complexes de volatils issus des végétaux, diplôme d'habilitation a diriger des recherches, Université de Corsica Pascal Paoli (UCPP), 31<sup>ème</sup> section, pp 32 -85.
- Ngakegni-Imbili A C, 2012.** Etude de synergie des effets chimiques et biologiques des lipides de réserves et des huiles essentielles des fruits et graines saisonniers de la sous-région Afrique Centrale [En ligne], thèse de doctorat, Toulouse, pp 169.
- Nguemtchouin, 2012.** Formulation d'insecticides en poudre par adsorption des huiles essentielles de *Xylopiya aethiopica* et d'*Ocimum gratissimum* sur des argiles camerounaises modifiées, Thèse de doctorat. Université de Ngaoundere, Montpellier, pp 269.
- Ouelhadj A, Beddar K, Djenane D, (sd).** Chemical composition and Antifungal activity of the *Myrtus communis* and *Pistacia lentiscus* essential oils of Mediterranean regions in laboratory medium and Strawberry fruit, Algeria.
- Oyaizu M, 1986.** Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine, *Japanese Journal of Nutrition*, 44, pp 307-315.
- Palacio S, Milla R et Montserrat-Marti G, 2005.** A phenological hypothesis on the thermophilous distribution of *Pistacia lentiscus* L, *Flora*, 200, Spain, disponible sur [www.elsevier.de/flora](http://www.elsevier.de/flora), pp 527-534.
- PassowJ, 1980.** Effet of metals in cells subcellular elements and macromolecules THOMAS, *Springled (ILINCIS)*, 291 p.

- Pastre J, 2005.** Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques, ministre de l'agriculture et de la pêche, thèse de doctorat, université paul-sabatier de toulouse, 120 p.
- Penchev P I, 2010.** Etude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions [En ligne], thèse de doctorat, génie des procédés et de l'environnement, université de Toulouse, 239 p.
- Pibiri M C, 2005.** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles [En ligne], thèse de doctorat, France, disponible sur [marie-cecile.pibiri@epfl.ch](mailto:marie-cecile.pibiri@epfl.ch), 161 p.
- Pielquin P, (sd).** Secrets huiles essentielles, tous les secrets et les bienfaits des huiles essentielles enfin révélés, Action web, disponible sur [www.action-web-marketing.com](http://www.action-web-marketing.com). 122 p.
- Pincemail J, Meurisse M, Limet R et Defraigne JO, 1999.** L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin, Vaisseaux, Cœur, Poumons, Vol 4, N°5, USA, 7 p.
- Piochon M, 2008.** Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse [en ligne], thèse de doctorat, Université du Québec, 213 p.
- Ponce A G, Fritz R, De Lvalle C. et Roura S I, 2003.** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard, *Lebensm.-Wiss.u.-Technol*, 36, pp 679-684.
- Portes E, 2008.** Synthèse et Etudes de Tétrahydrocurcuminoïdes Propriétés Photochimiques et Antioxydantes, Applications à la Préservation de Matériaux d'Origine Naturelle, chimie organique, Université bordeaux I, 52 p.
- Prakash A, Rigelhof F et Eugene Miller, (sd).** Antioxidant Activity, [www.medallionlabs.com](http://www.medallionlabs.com), 2 p.
- Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F, 2000.** Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay, *J Agric Food Chem*, 48 (8), pp 3396 -3402.
- Ragavan SRV, 1981.** Erythrocyte lead binding protein after occupational exposure; en lead lead inhibition of mambrane  $Na^+$ ,  $K^+$ , ATP, *J.Toxic and environ of health*, 7, pp 561-568.
- Rasekh, H.R, Nazari, P, Kamli-Nejad, M, Hosseinzadeh, L, 2008.** Acute and subchronic oral toxicity of *Galega officinalis* in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 116, 26 p.

**-Zhiri A et Baudoux D, 2005.** Huiles essentielles hémotypes et leurs synergies, biotechnologie végétale, pharmacien aromatalogue, Luxembourg, ISBN: 2-919905-27-9, 84 p.

**-Zhiri A, 2006.** Science, nutrition, prévention et santé, Nutra News, disponible sur "www.Nutranews.Org".

**-Wikipedia.org/wiki/Chahna.2012.**

**-Wikipedia.org/wiki/E.coli.2013.**