

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE
ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE CONSTANTINE 1



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
جامعة قسنطينة 1

N° d'ordre :.....
N° de série :.....

Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de biologie et écologie végétale
Année universitaire 2013/2014

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention
Du diplôme de Master
Filière : Biologie et physiologie végétale
Option : Métabolisme secondaire des plantes

Thème

Les activités antifongiques et antioxydantes
Des huiles essentielles d'artimisia herba alba et
Eucalyptus globulus

Présenté par :
KERMICHE NASSIM
CHOUGUI MOHAMED EL-AMINE

Soutenu le : 22/06/2014

Devant le jury :
- **Président : Mme HAMOUDA DOUNIA**
- **Encadreur : Mme BOUCHIHA HANANE**
- **Examineur : Mr KEBAILI ZOUBIR.**

MCB- Université Constantine 1
MAA- Université Constantine 1
MAA- Université Constantine

- Remerciment

-
-
- *Louange à **DIEU**, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux de nous avoir aidé à finir ce modeste travail de recherche.*
-
- *Merci infiniment à notre encadreur **Dr. BOUCIHA Hanene** qui a dirigé ce travail et veillé à ce qu'il soit mené à terme. Nous tenons surtout à vous remercier pour vos conseils qui nous avons été de grande utilité.*
-
- *Grand et respectueux remerciement va au **Md HAMOUDA Dounia** d'avoir accepté de présider le jury de notre mémoire.*
-
- *Merci à le membre du jury **Pr KBAILI Zoubir** pour leur présence nécessaire et utile au sein du jury.*
-
- *Je n'oublie pas de remercier vivement les membres de l'équipe laborantin, pour leur aide et soutien morale ainsi que notre collègue **LAADJIMI Abdelaali** qui a partagé avec nous la vie quotidienne au sein du laboratoire. Je remercie aussi tous mes collègues de la promotion 2013-2014 et les étudiants de master et je leur souhaite beaucoup de réussite.*

I.1. Introduction

Les huiles essentielles avaient une place importante dans la vie quotidienne des hommes qui les utilisaient autant pour se parfumer, aromatiser la nourriture ou même se soigner. La connaissance des huiles essentielles remonte à fort longtemps puisque l'homme préhistorique pratiquait déjà, à sa manière, l'extraction des principes odorants des plantes. Il plongeait, dans un même récipient rempli d'eau, des plantes odorantes et des pierres brûlantes.

La vapeur dégagée entraînait les molécules volatiles, puis le tout était recueilli à l'aide d'une peau d'animal dont l'essorage donnait quelques gouttes d'huile essentielle (**Robert, 2000**).

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

La présence de molécules puissantes de propriétés anti oxydantes et antiseptiques, favorise leur utilisation comme agents de conservation dans les produits alimentaires, elles servent à la protection de ces produits contre la dégradation radicalaire, et sont également employées comme agents antimicrobiens.

Et aussi un nombre important d'huiles essentielles est utilisé dans la parfumerie et de la cosmétique, Elles peuvent rentrer dans la composition de produits élaborés (savons, crèmes, parfums, bougies,...), grâce à leur pouvoir antiseptique et antioxydant, tout en leur assurant leur odeur agréable.

L'utilisation des huiles essentielles devrait être basée sur les connaissances fiables et suffisantes apportées par la recherche scientifique bien menée. Il est donc indispensable de connaître les principes actifs des plantes afin d'en étudier l'efficacité, le mode d'action et les effets secondaires. Les huiles essentielles des plantes sélectionnées pour cette étude ont été sujettes à plusieurs travaux antérieurs. Ces différents travaux ont montré une grande variabilité de leur profil chimique qui dépend de plusieurs facteurs tel que: la période de récolte, la partie de la plante ainsi que du site de récolte. Ce fait a suscité l'intérêt pour l'étude des espèces poussant dans notre région. Dans ce contexte, nous nous sommes fixés comme objectif principal l'évaluation des activités biologiques de ces essences.

Partie I
Etude bibliographique

Chapitre I.
Artimesia herba alba
Eucalyptus globulus

I.1. Matériel végétale

I.1.1. *Artemisia herba-alba*.

I.1.1.1 taxonomie:

Règne : Plantae

Division: Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Asterales

Famille : Asteraceae

Genre : *Artemisia*

Espèce : *Artemisia herba-alba*.



Photo 1: *Artemisia herba-alba* (djebel Grouz) .

I.1.1.2. Description

L'Armoise herbe blanche est une plante herbacée à tiges ligneuses et ramifiées, de 30 à 50 cm, très feuillées avec une souche épaisse. Les feuilles sont petites, sessiles, pubescentes et à aspect argenté. Les fleurs sont groupées en grappes, à capitules très petites (3/1,5mm) et ovoïdes. L'involucre est à bractées imbriquées, les externes orbiculaires et pubescentes. Le réceptacle floral est nu avec 2 à 5 fleurs jaunâtres par capitule toutes hermaphrodites.

I.1.1.3. Répartition géographique

Les peuplements les plus importants de cette espèce se rencontrent dans les zones bioclimatiques arides et semi arides.

L'Artemisia Herba-Alba est largement répandue depuis les îles Canaries et le sud-Est de l'Espagne jusqu'aux steppes d'Asie centrale (Iran, Turkménistan, Ouzbékistan) et à travers l'Afrique du Nord, l'Arabie et le Proche-Orient. En Afrique du nord, cette espèce couvre d'immenses territoires évalués à plus de dix millions d'hectares, *l'Artemisia herba-alba* est absente des zones littorales nord. Cependant, l'espèce se raréfie dans l'extrême sud (Nabli, 1989).

I.1.2. Eucalyptus globulus

I.1.2.1. Nomenclature et taxonomie:

Eucalyptus vient du grec **eu** : bien et **Kaluptos** : couvert, car les étamines sont enfermées dans un étui formé par des pétales modifiés qui tombent à l'ouverture de la fleur.

Français : eucalyptus, arbre à la fièvre, gommier bleu.

Anglais : blue gum tree, fevertree, tasmanian bluegum.

Arabe : Kalitus, kalatus, كالاتوس.

Taxonomie:

Règne:	Plantae
Division:	Magnoliophyta
Classe:	Magnoliopsida
Ordre:	Myrtales
Famille:	Myrtaceae
Genre:	<i>Eucalyptus</i>
Espèce :	<i>Eucalyptus globulus</i>

I.1.2.2.Description

Cet arbre, d'une rapidité de croissance remarquable, est connu maintenant, dans le monde entier ; sous le nom de gommier bleu de Tasmanie ; il atteint fréquemment 30 à 40 mètres d'hauteur. On le rencontre sur les collines pierreuses, souvent exposées à toutes les fureurs des tempêtes. Il forme aussi des arbrisseaux touffus, portant des fleurs et des fruits.

Le tronc, dont les lames corticales extérieures sont souvent détachées, est lisse, cendré, quelquefois entouré à la base d'ancienne écorce fibreuse. Son bois est lourd, dur, très-utile.

Les feuilles sont plus ou moins étalées, longues quelquefois de 10 à 20 cm, obliques à la base, presque aiguës ou légèrement obtuses, larges de 3 à 6 cm ; terminées en pointe aiguë.

Les feuilles les plus jeunes sont amplexicaules à base, apiculées au sommet ou courtement acuminées, pruinées, blanchâtres sur les deux faces du limbe, souvent ponctuées, transparentes dans leur plus jeune âge, longues de 9 cm à 15 cm et de larges de 9 cm. Bractées très-caduques, coriaces, composées de deux parties ovales acuminées à demi soudées, embarrassant la jeune fleur, fauves lisses longues de 12 à 18 cm. Le tube du calice est long de 9 mm à 2.4 cm.

Les fruits sont souvent larges de 3 cm environ, quelquefois très-petits. Les graines stériles sont brunes, claviformes et filiformes à la fois, et longues d'environ 2 mm à 3 mm. D'autres, plus courtes, sont rhomboidales ou trapézoïdes. Les fertiles sont ovales ou arrondies, opaques, et présentent 3 mm de largeur. (**Gimbert J.L., 1870**)



Photo 2: *Eucalyptus globulus*.

I.1.2.3. Répartition géographique

Les Eucalyptus représentent des arbres forestiers originaires d’Australie et plus de 700 espèces sont répertoriées à ce jour. Parmi ces espèces un grand nombre est originaire de l’île de Tasmanie et de l’île principale d’Australie et seulement quelques espèces ont pour origine l’Indonésie.

Les Eucalyptus furent introduits dans le reste du monde par le célèbre botaniste Sir Joseph Banks. Ils ont donc été successivement introduits dans différentes parties du monde, notamment Californie, Brésil, Afrique du nord, Portugal, Afrique du Sud. Il a été introduit en 1857 en Algérie pour drainer les terrains de régions touchées par la malaria (**Treiner, 2000**).

Chapitre II.

Les huiles essentielles

I.2. Historique

Le mot aromathérapie est un néologisme créé dans les années 1930 par le chimiste René-Maurice Gattefossé, un pharmacien français. En 1918, ce dernier se brûle la main lors d'une explosion dans son laboratoire. Il a alors le réflexe de la plonger dans un récipient rempli d'HE de Lavande vraie. Le soulagement est immédiat et la cicatrisation de la plaie est d'une rapidité déconcertante. Il va alors consacrer de longues années de recherche à l'étude des propriétés des HEs. Dans les années 1960, le Docteur Jean Valnet reprend les travaux de Gattefossé et publie des ouvrages de référence. Il crée la Société française de, phytothérapie et d'aromathérapie, après avoir utilisé abondamment les plantes pendant la guerre d'Indochine en tant que chirurgien militaire. Tous deux sont considérés comme les pères de l'aromathérapie moderne. Par la suite, les technologies avancées de chimie analytique ont permis d'identifier, inventorier et quantifier avec la plus grande exactitude les constituants pouvant entrer dans la composition d'une HE.

I.3. Que ce qu'un l'huile essentielle ?

Les H.Es sont définies comme étant des extraits volatils et odorants, que l'on extrait de certains végétaux par distillation à la vapeur d'eau, pressage ou incision des végétaux qu'ils les contiennent. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous produits du métabolisme secondaire. Les H.Es ont des propriétés et des modes d'utilisation particulières et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie. **(BRUNETON, 1999)**

Il s'agit d'un mélange de composés lipophiles, volatils et souvent liquides, synthétisés et stockés dans certains tissus végétaux spécialisés. Extraites de la plante grâce à des procédés physiques tels l'hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur ou par expression à froid dans le cas des agrumes, les huiles essentielles sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante. **(AFNOR, 2000).**

Contrairement à ce que le terme pourrait laisser penser, les huiles essentielles ne contiennent pas de corps gras comme les huiles végétales obtenues avec des presseurs (huile de tournesol, de maïs, d'amande douce, etc.)

Le terme « huile » s'explique par la propriété que présentent ces composés de se solubiliser dans les graisses et par leur caractère hydrophobe. Le terme « Essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante.

I.4. Localisation des huiles essentielles dans la plante

Les HEs n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Les genres capables d'élaborer les constituants qui composent les HEs sont répartis dans un nombre limité de familles. (ex : *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Cupressaceae*, *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae*, *Poaceae*, *Rutaceae*, etc.).

Les HEs peuvent être accumulées dans tous les types d'organes végétaux par exemple des fleurs (oranger, rose, lavande) mais aussi des feuilles (citronnelle, eucalyptus, laurier noble) et, bien que cela soit moins habituel, dans des écorces (cannelier), des bois (bois de rose, camphrier, santal), des racines (vétiver), des rhizomes (curcuma, gingembre), des fruits secs (anis, badiane, persil), des graines (muscade).

Si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une huile essentielle, la composition de cette dernière (qualitative et quantitative) peut varier selon sa localisation dans la plante.

La biosynthèse et l'accumulation des molécules aromatiques sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées (cellules à essence, poches sécrétrices, canaux sécréteurs ...), souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante (**BRUNETON, 1999**).

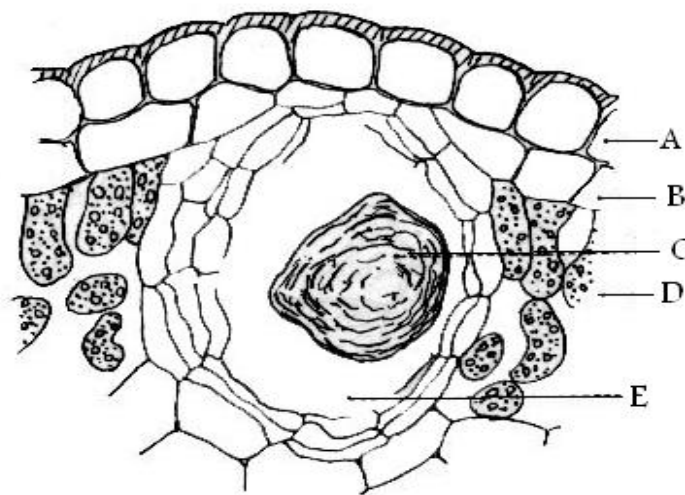


Figure 1: poche sécrétrice (feuille de lavande).

(A): épiderme ; (B): hypoderme; (C):huile essentielle ;(D): cellules chlorophyllienne; (E): poche sécrétrice.

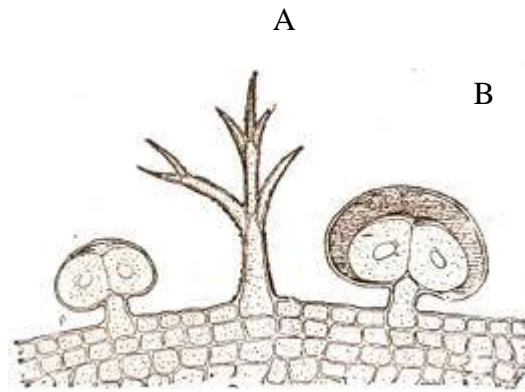


Figure 2 : Deux glandes bicellulaires à essence avec un poil ramifié.
A : poile ramifiée ; B : glande

Les glandes proprement dites sont constituées dans les plantes par une cavité entourée d'une couche de cellules. Dans cette cavité s'accumule la liqueur sécrétée. On nomme glandes vésiculaires de petits réservoirs remplis d'huile essentielle et qu'on observe dans l'enveloppe herbacée des végétaux.

Le contenu des glandes est épanché au dehors, soit par une sorte de sécrétion de la surface extérieure, soit par une transsudation à travers les cellules de l'enveloppe de la glande.

I.5. Rôle physiologique

Beaucoup de plantes produisent les huiles essentielles en tant que Métabolites secondaires, mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante est inconnu (**Rai et al., 2003**).

Il y a beaucoup de spéculations au sujet du «rôle» d'huiles essentielles des plantes.

Certainement plusieurs effets apparents «utiles» ont été décrits: protection contre la flore microbienne infectieuse par les propriétés fongicides et bactéricides et contre les herbivores par goût et effets défavorables sur le système nerveux (**Porter, 2001**).

Certains auteurs pensent que la plante utilise l'huile pour repousser ou attirer les insectes, dans ce dernier cas, pour favoriser la pollinisation. D'autres considèrent l'huile comme conservateur de l'humidité des plantes dans les climats désertiques (**BELAICHE, 1979**).

I.6. Caractéristiques physique

Les HES sont habituellement liquides à température ambiante et volatiles, rarement colorées et leur densité est en général inférieure à celle de l'eau. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée.

Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels, entraînaibles à la vapeur d'eau, très peu solubles dans l'eau. (**AFSSAPS, 2008**).

I.7. Composition chimique des HEs

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

I.7.1.1. Les terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels issus d'une voie métabolique secondaire de l'acide mévalonique, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte : leur formule brute est $(C_5H_8)_n$ dont le x est variable en fonction du degré d'insaturation de la molécule et n peut prendre des valeurs (1-8) sauf dans les polyterpènes qui peut atteindre plus de 100(le caoutchouc). La molécule de base est l'isoprène de formule C_5H_8 . Le terme terpénoïde désigne un ensemble de substances présentant le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc.)

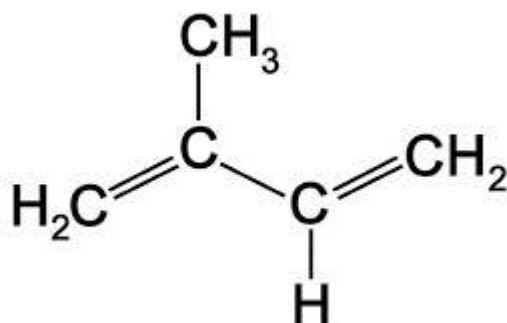


Figure 3: Unité isoprène

I.7.1.2. Classification des terpènes

Dans le règne végétal, les tetrpénoïdes sont classés dans la catégorie des métabolites secondaires (avec les flavonoïdes et les alcaloïdes). Leur classification est basée sur le nombre de répétitions de l'unité de base isoprène : hémiterpènes (C_5), monoterpènes (C_{10}), sesquiterpènes (C_{15}), diterpènes (C_{20}), sesterpènes (C_{25}), triterpènes (C_{30}), tetraterpènes (C_{40}) et polyterpènes. Dans une huile essentielle, nous retrouvons presque exclusivement des mono- et sesquiterpènes.

Monoterpènes : Ces terpènes proprement dits sont des hydrocarbures en C_{10} . Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. A ces terpènes se rattachent un certain nombre de produits naturels à fonctions chimiques spéciales, surtout alcool et aldéhyde.

Les sesquiterpènes : Un groupe particulier de sesquiterpènes est représenté par les azulènes, composés instables dont le nom vient de leur coloration bleue et qui sont importants en

pharmacognosie en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires. Ces composés, non saturés, sont constitués par deux cycles penta et hepta carbonés. Nous retrouvons dans ce groupe le chamazulène (des essences de camomille et de matricaire).

I.7.2.1. Les phénols

L'expression de « composés phénoliques » est utilisée pour toutes substances chimiques possédant dans sa structure un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles. Les polyphénols naturels peuvent donc être des molécules simples comme les acides phénoliques, mais aussi des composés hautement polymérisés comme les tanins.

I.7.2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent la classe la plus abondante et la plus étudiée des phénols, Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Structuralement, les flavonoïdes possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B), reliés par une chaîne en C3.

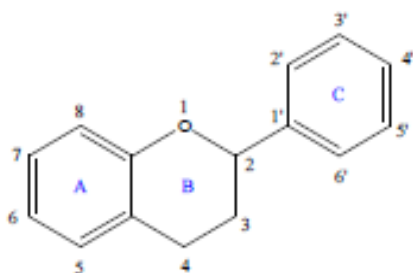


Figure 4: Structure de base des flavonoïdes.

Les flavonoïdes sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, citons par exemple les activités antivirales, anti-inflammatoires et anticancéreuses. Ces activités sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($\cdot\text{OH}$) et superoxydes (O_2).

I.7.2.3. Les tanins

Les tanins sont un large groupe de composés polyphénoliques naturellement produits par les plantes. Ces composés, solubles dans l'eau, se caractérisent par leur faculté à se combiner aux protéines et à d'autres polymères organiques. Ce sont des molécules assez volumineuses avec un poids moléculaire généralement compris entre 500 et 3000 Da. (*Haslam, 1998*)

Les polyphénols sont des produits de la condensation de molécules d'acétyl-coenzyme A et de phénylalanine. Cette biosynthèse a permis la formation d'une grande diversité de molécules qui sont spécifiques d'une espèce de plante, d'un organe, d'un tissu particulière.

I.8.Facteurs de variabilité de chimotype

Au sein d'une même espèce de plante, la composition de l'huile essentielle des divers individus peut présenter des profils chimiques ou chémotypes différents.

I.8.1. Chimotype

C'est une classification chimique, biologique et botanique qui désigne la molécule majoritairement présente dans une huile essentielle (**Bruneton, 1999**).

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

I.8.2.Les facteurs intrinsèques

I.8.2.1. Le cycle végétatif

Des variations importantes peuvent se produire au cours du cycle végétal autant en ce qui concerne le rendement et la composition chimique des substances bioactives (**GARNERO, 1991**).

I.8.2.2.L'organe producteur

Les cellules productrices d'huile essentielle pouvant se situer dans différents organes, il est possible d'obtenir différentes huiles selon les parties sélectionnées d'une même plante.

I.8.3. Les facteurs extrinsèques

I.8.3.1. facteur de l'environnement

Il s'agit de l'incidence des facteurs de l'environnement tels que la température, l'humidité relative, la durée totale d'insolation, le régime de vents exercent une influence directe et les pratiques culturales (l'apport d'engrais et le régime hydrique) (**Bruneton, 1999**). Les facteurs géographiques et édaphiques influencent aussi la composition des substances bioactives (**Garnero, 1991**).

I.8.3.2. Les transformations du matériel végétal

Le matériel végétal qui va subir l'extraction n'est pas toujours traité immédiatement. Des modifications physiques et biochimiques dues à l'action de l'air, du soleil et l'échauffement en tas peuvent se produire et se révéler fâcheuses pour la qualité de l'extrait (**Garnero, 1991**).

I.9. Procédés d'extraction des huiles essentielles

Le choix de la technique dépend principalement de la matière première

I.9.1. Distillation à l'eau ou "hydrodistillation"

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. Cette méthode est conseillée pour les matières premières qui, par nature, s'agglutinent facilement et donc empêchent la pénétration de la vapeur dans la masse végétale, telles que les pétales de roses, les fleurs d'orangers, etc. (**Mathiewe et all., 1968**).

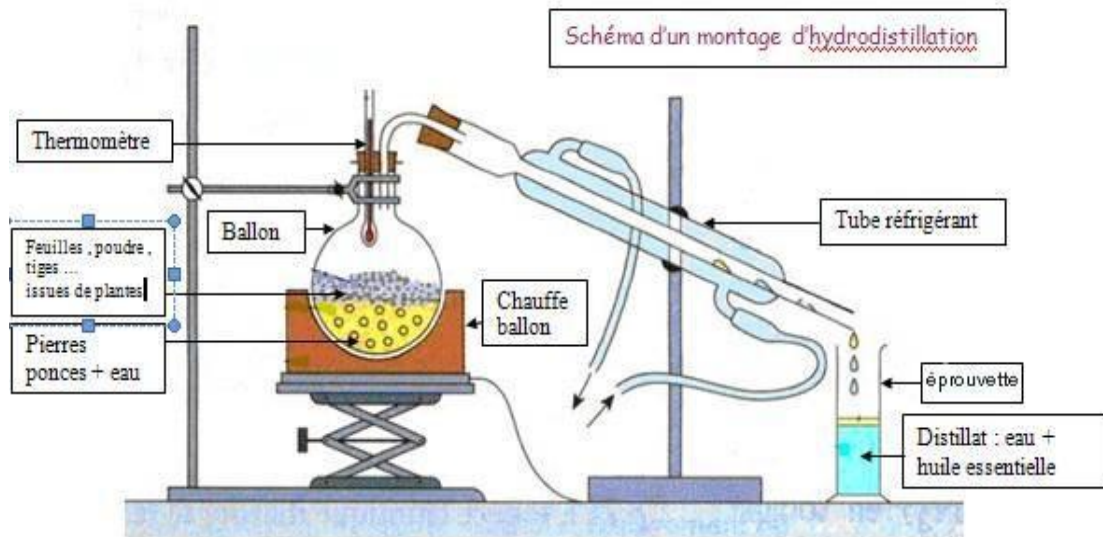


Figure 5: schéma d'un montage d'hydrodistillation

I.9.2. Entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau correspond à la vaporisation en présence de vapeur d'eau d'une substance peu ou pas miscible à l'eau. La matière première est mise en présence d'eau portée à ébullition ou de vapeur d'eau dans un alambic. La vapeur d'eau entraîne la vapeur d'huile essentielle qui est condensée dans le réfrigérant pour être récupérée en phase liquide dans un vase florentin (ou essencier) où l'huile essentielle est séparée de l'eau par décantation (AFSSAPS, 2008).

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



Photo 3: un montage d'entraînement à la vapeur d'eau

I.9.3. Distillation sèche

L'huile essentielle est obtenue par distillation des bois, écorces ou racines, sans addition d'eau ou de vapeur d'eau (AFSSAPS, 2008).

I.9.4. Expression à froid

Ce mode d'obtention ne s'applique qu'aux fruits d'agrumes (*Citrus spp.*) par des procédés mécaniques à température ambiante.

Le principe de la méthode est le suivant : les « zestes » sont dilacérés et le contenu des poches sécrétrices qui ont été rompues est récupéré par un procédé physique. Le procédé classique consiste à exercer sous un courant d'eau une action abrasive sur toute la surface du fruit. Après

élimination des déchets solides, l'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par centrifugation (AFSSAPS, 2008).

I.9.5.Extraction par micro-ondes

Au début des années 1990 est apparue une toute nouvelle technique appelée « hydrodistillation par micro-ondes sous vide » (Figure 7). Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation. Ce procédé permet un gain de temps (temps d'extraction divisé par 5 à 10) et d'énergie (température plus basse) considérable (Piochon, 2008).

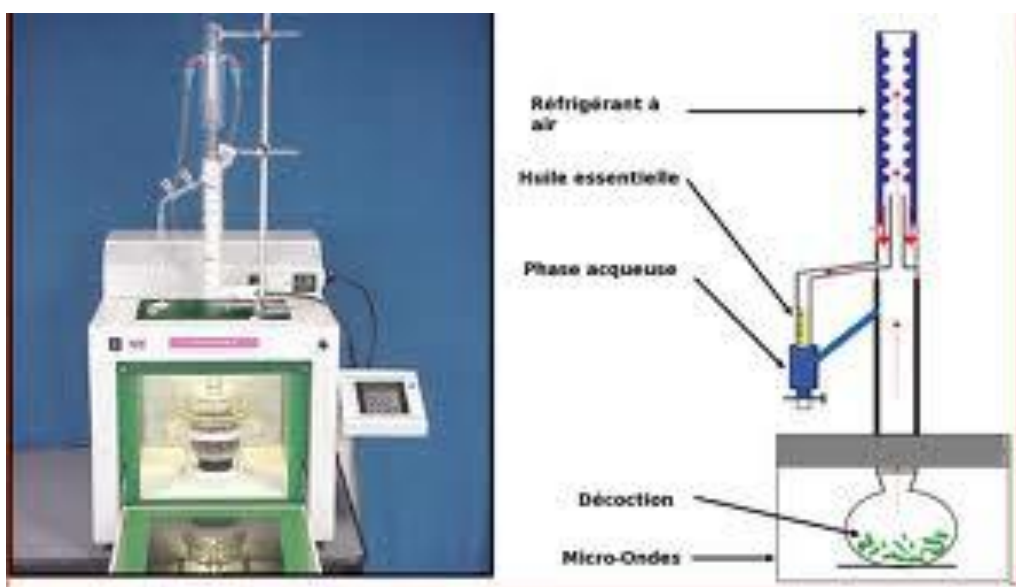


Figure 7 : Extraction par micro-ondes.

I.10. Méthodes d'identification chimique des huiles essentielles

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

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

I.10.1. La chromatographie en phase gazeuse (CPG/DIF)

Les progrès technologique réalisés dans le domaine des colonnes capillaires, des phases stationnaires et des détecteurs (DIF) ont fait de la chromatographie en phase gazeuse la méthode de référence dans l'analyse des huiles essentielles. Cette technique permet l'analyse qualitative et quantitative des mélanges très complexes de composé gazeux ou susceptibles d'être vaporiser par chauffage sans décomposition.

La CPG repose sur le principe de migration différentielle des constituants d'un mélange à travers une phase stationnaire (liquide ou solide) et une phase mobile gazeuse.

Durant leur passage à travers la colonne, les composés analysés se répartissent entre la phase stationnaire et la phase gazeuse suivant les règles physico- chimique de partition (gaz liquide) ou d'adsorption (gaz solide). Les constituants du mélange analysés parcourent la colonne chromatographique dans des temps de rétention différent. Ces derniers sont liés aux conditions opératoires de l'analyse et pour s'affranchir de leur variabilité, des indices calculés à partir d'une gamme étalons d'alcane, en isothermes ou en programmation de température ont été mis en place. Ceci a la publication de banques de données d'indices de rétention relatifs à différent phases stationnaires .pour réaliser une identification en CPG/DIF, les indices de rétention polaire ($I_r p$) et apolaire ($I_r a$) d'un constituant donné sont comparés à ceux d'échantillons authentiques, contenus dans des bibliothèques de référence ou répertorié dans la littérature.

Cependant, une reproductibilité parfaite des indices de rétention est difficile à obtenir et ne peut être observée que sur des chromatogrammes réalisés sur une période courte avec des conditions expérimentales rigoureusement identiques. **(El-kalamouni, 2010)**

I.10.2. La chromatographie gazeuse couplée à la spectroscopie de masse CPG/SM

La conception d'un appareil **CPG** correspond schématiquement à l'association de différents modules spécialisés : l'injecteur, la colonne, et le détecteur, intégrés dans un même bâti. La phase mobile nécessaire pour entrainer l'échantillon dans la colonne est un gaz, appelé gaz vecteur ou gaz porteur **(Rouessac, 1995.)**

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

I.10.3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à l'olfactométrie (CPG/O)

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

Chapitre III

Les champignons

Les champignons sont des contaminants fréquents de nombreux substrats végétaux et de certains produits d'origine animale. Leur présence peut améliorer les qualités organoleptiques du produit ou, au contraire, l'altérer et conduire à l'accumulation de métabolites secondaires toxiques.

II.1.Définition

Les champignons Appelés aussi mycètes, représentent l'un des plus importants groupes d'organismes sur Terre et jouent un rôle clé dans un grand nombre d'écosystèmes.

D'un point de vue structural, on trouve une grande variété de champignons. Ils sont classés en deux grandes catégories : Certaines espèces ont la capacité d'adopter les deux formes :

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

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

Une autre de leur caractéristique remarquable est leur reproduction. Ils produisent en effet un grand nombre de spores, ce qui leur assure un pouvoir de diffusion (et de contamination) considérable. Ces spores sont issues de plusieurs modalités de reproduction sexuée ou asexuée qui seront la base de leur classification (**Chabasse et al, 2002**)

II.2.Modes de vie

Les champignons ont un rôle très important dans la dégradation de la matière organique et constituent une part importante des décomposeurs sur Terre. De plus, certains champignons peuvent être phytopathogènes ou provoquer des mycoses chez les animaux (**Lutzoni et al., 2004**). Un troisième mode de vie, symbiotique, est également très répand.

II.3.Classification des champignons

La classification des champignons est essentiellement basée sur des caractères purement morphologiques (**Meyer et al., 2004**).

La classification de **Kwon Chung et Bennett (1992)** est la plus utilisée actuellement (Figure7).

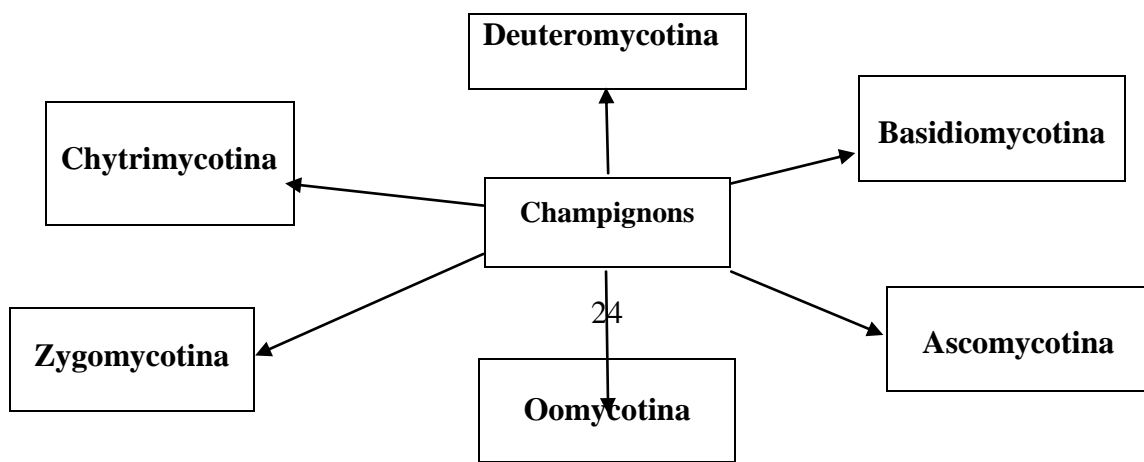


Figure 8 : Classification des champignons (Kwon Chung et Bennett, 1992).

II.4. Identification morphologique

L'identification d'une espèce fongique repose sur l'analyse de critères culturels (température et vitesse de croissance, milieux favorables) et morphologiques. Ces derniers sont constitués des paramètres macroscopiques (aspect des colonies, de leur revers) et microscopique (aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophores,...) (**Cahagnier et Richard Molard, 1998**).

II.4.1. Critères d'identification macroscopique

L'aspect des colonies représente un critère d'identification. Les champignons filamenteux forment des colonies duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses ; parfois certaines colonies peuvent avoir une apparence glabre (l'absence ou pauvreté du mycélium aérien).

Le relief des colonies: il peut être plat ou plissé et la consistance des colonies peut être variable (molle, friable, élastique ou dure).

La taille des colonies: Elle peut-être très variable en fonction des genres fongiques : petites colonies (*Cladosporium*) ou au contraire, colonies étendues, envahissantes (*Mucor*, *Rhizopus*).

La couleur des colonies : est un élément très important d'identification ; les couleurs les plus fréquentes sont le blanc, le crème, le jaune, l'orange, le rouge allant jusqu'au violet ou le bleue, le vert, le brun allant jusqu'au noir. Les pigments peuvent être localisés au niveau du mycélium (*Aspergillus*, *Penicillium*) ou diffuser dans le milieu de culture (*Fusarium*).

Les structures de fructification : la présence ou l'absence, au centre de la colonie, des structures de fructification sexuée (cléistothèces) ou asexuée (pycnides) est aussi un élément important de diagnose (**Botton et al., 1990**).

II.4.2. Critères d'identification microscopique

L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle et coloration de la préparation au Bleu Cotton. Généralement, un examen à l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants de diagnose (**Cahagnier et Richard-Mollard, 1998**).

Le thalle : tous les champignons possèdent un appareil végétatif constitué de filaments (hyphes) qui, ensemble, forment le thalle filamenteux ou le mycélium ; le thalle peut être siphonné ou septé.

Les spores : qui sont le produit de la reproduction asexuée peuvent être endogènes ou exogènes, L'examen des spores et de leur organisation est une étape importante de l'identification fongique (**Campbell et al., 1996**).

II.5. Modes de reproduction

Les champignons se reproduisent de deux manières :

- ❖ Par voie sexuée: suite à la fusion de deux cellules gamétiques.
- ❖ Par voie asexuée ou végétative, la plupart d'entre eux étant rencontrés dans le groupe des imparfaits.

II.5.1. La reproduction sexuée

Des champignons se reproduisent selon un cycle de reproduction sexuée. La reproduction sexuée implique la production d'organes sexués et de gamètes, la fusion des gamètes ou des organes sexués suivie par la fusion nucléaire ou caryogamie et la méiose, le développement des organes de fructification (**Larpent J. et Larpent G., 1990**).

II.5.2. La reproduction végétative

Elle est beaucoup plus répandue que la précédente, et si elle ne fait pas intervenir de transformation génétique, elle joue un grand rôle dans la dissémination des espèces. Elle se fait, soit par une fragmentation du thalle, soit par la production de spores asexuées (**Branger et al., 2007**)

III. Activités biologiques des huiles essentielles

Chapitre VI

Les activités

biologiques des huiles

essentielles

Les huiles essentielles sont connues pour être douées de propriétés antiseptiques et antimicrobiennes. Beaucoup d'entre elles, ont des propriétés antitoxiques, antivenimeuses, antivirales, anti-oxydantes, et antiparasitaires. Plus récemment, on leur reconnaît également des propriétés anticancéreuses (Valnet, 2005).

III.1. L'activité antioxydante

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales s'intéresse beaucoup au concept de stress oxydatif, en référence à une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygènes toxiques.

Ces dernières années, l'intérêt porte aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires (**Popovici et al., 2009**).

Les HEs possèdent une propriété antioxydante importante. Cette propriété est notamment attribuée, à la présence dans la composition de ces HEs de composés phénoliques et des monoterpènes oxygénés et aussi des monoterpènes hydrocarbonés.

L'activité antioxydante de ces composés est exploitée dans la prévention et la lutte contre les maladies comme l'Alzheimer, l'artériosclérose et le cancer (**Gardner P., 1997**).

III.1.1. Stress oxydant

Le stress oxydatif, appelé aussi stress oxydant, se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes de l'organisme en faveur des premiers, ce qui conduit à des dommages cellulaires irréversibles (**Pincemail et al., 1999**).

III.1.2. Les radicaux libres

Se sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un électron célibataire, résultant soit d'un gain soit de la perte d'un électron (**Twedt 2001**). Cette structure électronique déséquilibrée leur confère une grande réactivité sur les constituants organiques et sur les structures cellulaires.

Radical	Formule
Anion superoxyde	O ₂
Peroxyde d'hydrogène	H ₂ O ₂
Hydroxyle	OH.
Peroxyle	ROO.

Hydroperoxydes	ROOH
Alcoxyles	RO.
Oxygène singulet	1/2O ₂
Oxyde nitrique	NO.

Tableau 1: Liste des principaux radicaux libres.

III.1.3. Les sources de production des radicaux libres

Des radicaux libres sont produits par un grand nombre de mécanismes tant endogènes qu'exogènes. Sans vouloir faire du finalisme, nous pouvons considérer que certaines de ces productions sont volontairement programmées par l'organisme à des fins de défense ou d'envoi des signaux. **(Hininger-Favier)**.

- a) La mitochondrie est la source de production majeure d'O₂[°]- dans la cellule intacte.
- b) L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés
- c) Plusieurs autres systèmes enzymatiques produisent des radicaux libres au cours de réaction biochimiques
- d) Les métaux toxiques (chrome, vanadium, cuivre) mais aussi le fer libres.
- e) Les rayonnements sont par différents mécanismes des sources de radicaux.

III.1.4. Les antioxydants

Un antioxydant est défini comme toute substance ayant la capacité de retarder, prévenir ou réparer un dommage oxydatif d'une molécule cible **(Halliwell et Gutteridge, 2007)**. Ainsi, les antioxydants servent à contrôler le niveau des espèces réactives pour minimiser le dommage oxydatif **(Tang et Halliwell, 2010)**.

III.1.5.1. Les antioxydants endogènes

Ce sont des enzymes ou protéines antioxydantes (Superoxyde dismutase, Catalase et Glutathion peroxydase) élaborés par notre organisme avec l'aide de certains minéraux. Elles sont présentes en permanence dans l'organisme mais leur quantité diminue avec l'âge **(Mika et al., 2004)**.

- Les superoxydes dismutases (SOD) : sont des métallo-enzymes se retrouvant dans l'ensemble du monde du vivant. Elles catalysent la dismutation de deux anions superoxydes en dioxygène et peroxyde d'hydrogène (Arora et al., 2002).
- Les catalases (CAT) : Sont des enzymes majoritairement peroxysomales catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène (Arora et al., 2002).
- Les peroxydases (POX): Sont une large famille multigénique d'enzymes hémiques catalysant la réduction d'un substrat oxydé en utilisant de nombreux co-substrats comme donneurs d'électrons.
- Les peroxyredoxines (PRX), aussi appelées thiorédoxines peroxydases, sont des peroxydases non hémiques contenant un résidu cystéine au niveau de leur site catalytique. Les PRX sont des éléments essentiels du système de détoxification des espèces réactives de l'oxygène.
- Glutathion peroxydase (GPX) : Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H₂O₂ en H₂O et O₂.

III.1.5.2. Les antioxydants exogènes

Ils sont présents dans l'alimentation tels que les vitamines A, C, E et les polyphénols en particulier les flavonoïdes, ainsi que les cofacteurs des enzymes impliquées dans les systèmes antioxydants endogènes comme le sélénium, le zinc et le manganèse (tableau).

Ces antioxydants nutritionnels sont indispensables mais leur action est limitée jusqu'à ce qu'ils soient régénérés.

Antioxydant	Protège contre
Vitamine C	Les maladies cardiovasculaires, les cataractes, et certains types de cancer
Vitamine E	Les maladies cardiaques et cancer de la prostate, ralentit la maladie d'Alzheimer
Caroténoïdes	Les cancers, en particulier le cancer du poumon, et les maladies cardiovasculaires
Flavonoïdes	Cancer
Sélénium	Réduction de l'incidence des cancers de la prostate, du côlon et du poumon

Tableau 2 : rôle des antioxydants contre les maladies

III.1.6. Mode d'action des HEs

Le pouvoir antioxydant de ces huiles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Ce sont surtout les phénols et les polyphénols qui sont responsables de ce pouvoir

(Richard, 1992).

les polyphénols, et, en particulier, les flavonoïdes. En effet, de nombreuses revues leur confèrent le rôle d'excellents piègeurs d'espèces réactives directement issues de l'oxygène ($O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} , NO^{\bullet} , H_2O_2 , $1O_2$, $HOCl$, RO^{\bullet} et ROO^{\bullet}) provenant de biomolécules telles que les lipoprotéines, les protéines et les acides oligonucléiques (ADN, ARN) **(Quideau *et al.*, 2011).**

D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneurs d'atome d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatiques cas de dérivés du phénol.

III.1.7.Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Les méthodes d'évaluation du pouvoir antioxydant peuvent être qualitatives ou quantitatives. Les méthodes qualitatives, utilisées pour repérer l'activité antioxydante de composés, sont relativement peu nombreuses et font intervenir en général, la coloration ou la décoloration d'un réactif spécifique en présence d'agents antioxydants. Une des méthodes utilisées pour la détection d'antioxydants est la chromatographie sur couche mince (CCM), qui donne naissance à des réactions colorées en présence de tels composés **(Li Peiwu *et al.*, 1999).**

Une autre méthode a été proposée par **Glavind et Holmer (1967)** qui combine la méthode précédente avec la détection visuelle pour l'évaluation de l'activité de balayage de radical libre des fractions antioxydantes en employant le 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

III.2.Activité antibactérienne

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des HEs, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire **(Carson *et al.*, 2002).**

De façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxiques des HEs sur les bactéries comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force motrice de proton, fuite d'électron et la coagulation du contenu protéique des cellules **(Davidson, 1997).**

Le mode d'action des HEs dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane **(Carson *et al.*, 2002).**

Une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez *Enterobacter aerogenes* a aussi été rapportée (**Wendakoon et Sakaguchi, 1995**). Les HES peuvent aussi inhiber la synthèse de DNA, ARN, des protéines et des polysaccharides (**Cox et al., 1991**).

III.3. Activité antifongique

Dans le domaine phytosanitaire et agro alimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant la denrée alimentaire (**Lis-Balchin, 2002**).

L'action antifongique des huiles essentielles est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure. En effet, les composés terpéniques des huiles essentielles et plus précisément leurs groupements fonctionnels tels que les phénols et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique des levures (**Giordani et Kaloustian, 2006**).

Freeman et Carel (2006), ont signalé que les groupes moléculaires avec les plus puissantes actions antibactériennes sont également des antifongiques efficaces, mais ils doivent être utilisés sur de plus longues périodes. Expérimentalement, les H.E. des plantes aromatiques et médicinales ont fait preuve de leur efficacité antifongique parfois même supérieure à celle des agents antifongiques commerciaux.

III.4. Activité antivirale

De nombreuses familles de molécules chimiques rencontrées dans les extraits végétaux ont montré "in vivo" une activité antivirale et, parmi elles, les monoterpénols et les monoterpénals (**Freeman et Carel, 2006**).

Selon les travaux d'**Inouye et Abe, (2007)**, il existe des HEs de plantes exotiques très puissantes qui ont un fort pouvoir antiviral et qui sont connues pour leur efficacité.

III.5. Toxicité des huiles essentielles

Alors que de nombreux ouvrages font référence à la toxicité de nombreux produits sur le marché, la toxicité des huiles essentielles est moins investiguée. La plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que

représente leur emploi. Les interactions de ces produits avec les médicaments sont aussi peu mentionnées (**Pibiri, 2006**).

Cependant quelques informations sur certaines toxicités sont décrites par la littérature :

En règle générale, les huiles essentielles d'usage commun ont une toxicité par voie orale faible ou très faible avec des DL50 supérieures à 5g/kg. En ce qui concerne la lavande la toxicité est faible autour des 5g/kg (donnée observée chez l'animal) (**Bruneton, 1993**). Chez l'homme des intoxications aiguës sont possibles. Les accidents graves, les plus souvent observés chez les petits enfants, sont provoqués par l'ingestion en quantité importante d'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 (**Smith et al., 2000**)).

Partie II
Etude expérimentale

Chapitre I

Matériels et méthode

I.2. Zone de récolte

La plante d'*Artemisia herba alba* a été récoltée au moins de mars 2014, de la région de Oued Athmania (Djebel Grouz) à l'est algérien (40 km à l'ouest de Constantine). Latitude: 36.2498, 36° 14' 59" Nord, 6° 17' 10" Est

La plante d'*Eucalyptus globulus* a été récoltée au moins d'avril 2014, de jardin Annexe de campus de l'Université de Mentouri constatine.

L'identification des plantes a été réalisée par Mr. Boughada Samir, cadre à la direction général de protection des forêts.



Figure 11 : carte géographique de zone de récolte.

I. 3.Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par Hydrodistillation, dans un appareil de type Clevenger. Il est constitué d'un chauffe ballon qui permet la distribution homogène de la chaleur dans un ballon en verre de 1 litres surmonté d'une colonne reliée à un réfrigérant La distillation a été réalisée pendant 1h30 par ébullition de 100 g du matériel végétal (fraiche) avec 500 ml d'eau distillée. Les huiles essentielles sont séparées de l'hydrolat par décantation. La quantité d'essence obtenue est pesée pour le calcul du rendement.

On a utilisé 850 g de partie aérienne (tiges et feuilles) d'*artemisia heba alba*, et 400 g d'*Eucalyptus globulus*.

L'huile essentielle a été stockée et conservée de façon optimale à 4 °C à l'abri de la lumière.



Figure 11 : appareille d'hydrodistillation de type Clavenger.

I.4. Détermination de rendement d'extraction

Selon la norme **AFNOR (2000)**, 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 :

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

RHE : rendement en huile essentielle;

M' : masse d'huile essentielle en gramme;

M : masse de la matière végétale utilisée en gramme.

I.5. Etude physique et chimique des H.Es

Les différentes mesures effectuées sur des huiles essentielles fraîchement distillées donnent des résultats d'une constance très utile pour vérifier leur qualité, ainsi que pour déterminer leurs pouvoirs thérapeutique.

I.5.1. La densité

On utilise le terme densité ou la masse volumique, représentée par P_{20} , qui est le rapport de la masse d'un volume de liquide à 20°C par le volume de ce même liquide à 20°C (**Kaloustian, Hadji-Minaglou, 2012**).

I.2.2. Indice de réfraction

La réfraction est le changement de direction subi par un rayon lumineux lorsqu'il passe d'un milieu optique donné (par exemple l'air) à un autre milieu (par exemple une huile essentielle). L'indice de réfraction (n) d'un milieu est le rapport entre la vitesse de la lumière dans le vide (c) et la vitesse de la lumière dans la substance à analyser (V) (**Kaloustian, Hadji-Minaglou, 2012**). Les indices de réfraction des HEs d'armoise et l'eucalyptus, ont été calculées et déterminées à l'aide d'un réfractomètre de laboratoire de chimie.

I.2.3. Miscibilité à l'éthanol

Plusieurs tests de solubilité sont réalisés avec des volumes croissants d'alcool par rapport à la même quantité d'huile essentielle. Il suffira de déterminer la limite de solubilité de l'huile essentielle à analyser par rapport à l'éthanol (**Kaloustian, Hadji-Minaglou, 2012**).

Le test de miscibilité a été réalisé dans le laboratoire par versement des quantités égales des deux liquides (HE et éthanol) dans une éprouvette (50%/50%), puis agitation et décantation.

I.2.4. Le facteur pH

Le pH (potentiel hydrogène) mesure le nombre de H^+ , c'est-à-dire le degré d'acidité d'une solution. Les huiles essentielles qualité présente un pH voisin de 5, elles constituent donc des solutions acide (**AFSSAPS, 2008**).

Dans notre travail, on a utilisé le papier pH pour déterminé le pH de deux H.Es.

I.2.5.L'analyse chromatographique

Les analyses chromatographiques de l'HE d'*Artemisia herba alba* ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse, équipé d'une colonne capillaire (30 m x 0,32 mm) avec une épaisseur du film Polyéthylène glycol de 0,25 μm , d'un détecteur FID réglé à 260 °C et alimenté par un mélange de gaz H_2 /Air et un injecteur split réglé à 275 °C. Le volume injecté est de 1 μl . Le gaz utilisé est l'azote avec un débit de 1,7 ml/min. La température de la colonne est programmée de 50 à 250 °C à raison d'une montée de 4 °C/min et un palier de 5 minutes à la température finale. L'appareille est de type AGC serie 600 piloté manuellement.

Et l'analyse chromatographique de *L'Eucalyptus globulus* ont été effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse. La colonne utilisée est une colonne capillaire en silice fondue et une couche de Polyéthylène glycol de 30 m de longueur et de 0,32 mm de diamètre intérieur, le gaz vecteur est l'azote (N₂) avec une pression de 0,6 bar à l'entrée de l'injecteur, son débit est à l'ordre de 1 ml/min, le détecteur est alimenté par un mélange d'H₂ avec une pression d'entrée de 0,8 bar et d'air synthétique avec une pression d'entrée de 1 bar, la température de four a été programmée au début à 50°C pendant 5 min puis montée jusqu'à 200°C à raison de 4°C/min, la température de l'injecteur est de 220°C, la température de détecteur est de 230°C, le volume injecté est de 1 µl.



Photo 4: appareillage de la chromatographie en phase gazeuse

I.3. L'activité antifongique

I.3.1. Culture des champignons dans l'infusoire

-Mettre la paille du blé dans un bol et ajouter l'eau distillée ; laisser quelques jours (4j-7j).

-Technique d'isolement :

La préparation des dilutions jusqu'à l'interprétation des résultats (**Rapilly, 1968**).

- On dépose un volume de 1ml de chaque dilution dans un boîte de pétri et verser par-dessus le milieu sabouraud, quand les maintient dans les conditions suivantes :

Température : ambiante 27°C.

Durée d'incubation : 4j.

I.3.2. Purification des échantillons

La purification des souches est effectuée par prélèvement d'un hyphe terminal après culture en boîte de Pétri sur un milieu neuf. La souche estensemencée au centre de la boîte.

Le prélèvement a lieu lorsque le développement de la souche est suffisant. L'étude approfondie d'une souche est effectuée à partir d'une culture issue d'une seule spore (**Guiraud, 1998**).

I.3.3 Identification des souches de champignon

I.3.3.1. Etude des caractères macroscopique des champignons

Les caractères cultureux ainsi étudiés sont :

- * Vitesse de croissance.
- * Couleur des colonies et variation des couleurs en fonction du temps.
- * Structure du thalle.
- * Couleur de l'envers des colonies.
- * Couleur et changement de couleur du milieu.
- * Présence de gouttes de transpiration sur le mycélium aérien.
- * Odeurs.

I.3.3.3. Etude des caractères microscopiques

La détermination des moisissures fait appel aux caractères morphologiques. Elle nécessite le montage de préparations microscopiques, parfois une coloration du matériel à examiner et des mesures micrométriques sont nécessaires (**Botton et al., 1990**).

I.3.5. La méthode appliquée pour tester l'activité antifongique

- on a utilisé la technique des puits qu'est l'une des méthodes de diffusion en milieu solide, et c'est la technique la plus utilisée et la plus simple pour évaluer l'activité antifongique des huiles essentielles.

On suit les étapes suivantes:

- Le milieu utilisé pour la culture des champignons c'est le milieu de Saboreaux traité par un antibiotique.

- on coule 15 ml de milieu Saboreaux dans les boîtes de pétries, on laisse refroidir et solidifier, et on étale 1 ml de suspension de culture fongique sur le milieu de culture, puis on réalise un puits de 5mm au centre de chaque boîte de pétrie.

- pour chaque souche de champignon, on utilise quatre boîtes, trois pour des différentes doses de l'H.E (1µl, 5.51µl, et 10.51µl) et la dernière comme témoin.

- Enfin les boîtes de pétries après une fermeture hermétique sont mises à une étuve de température 25°C. Puis on suit, dans le temps, le développement des cultures en fonction de la concentration en HE.

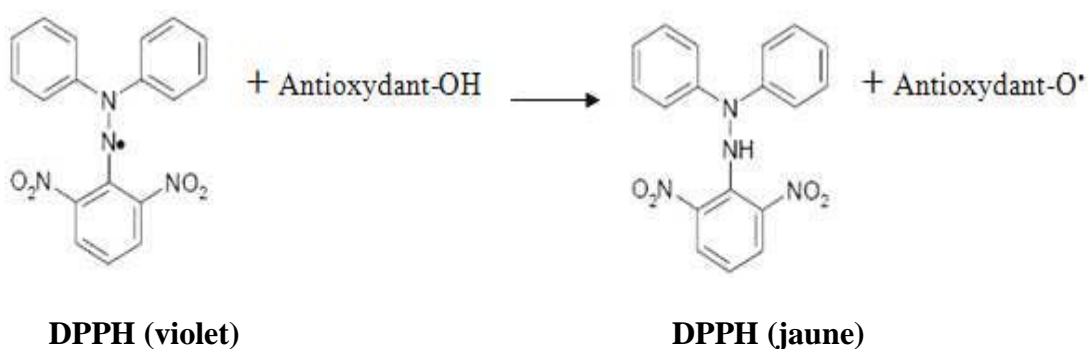
Le travail est appliqué sur les cinq souches fongiques obtenues dans l'infusoire, l'*alternaria* et le *penicillium*, *rhizopus*, *penicillomyces*, *penicillium*. Toujours en présence du bec benzine, afin d'éviter toute contamination. Cependant pour les cinq souches fongiques, sont les souches préparées dans un infusoire (des pailles et de l'eau). Le milieu utilisé est le saboreaux.

L'effet des H.Es sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. La souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante. Les mesures sont effectuées, la première après trois jours d'incubation et la deuxième après sept jours et la troisième après dix jours.

I.4. Evaluation d'activité antioxydante de deux plantes

I.4.1. Méthode appliquée (DPPH)

Pour tester l'activité antioxydante des HEs, nous avons utilisé la méthode au DPPH, dont le DPPH est un radical libre, stable, qui possède une bande d'absorbance à 517 nm, employé pour évaluer l'activité antioxydante des composés purs ou de mélange complexe. Ce radical libre présente une coloration violet foncé, lorsqu'il est piégé par les antioxydants, il apparaît sous sa forme réduite de couleur jaune pâle.



La solution de DPPH est préparée par dissoudre de 1.2 mg de poudre de DPPH dans 50 ml de méthanol.

Pour les H.Es et le vC, on prépare des solutions mères de concentration (1 mg/ml). Des dilutions sont préparées à partir de cette solution.

Les préparations des dilutions de ces solutions sont réalisées par préparer 5 tubes dans chaque tube 2 ml de DPPH, on ajoute 1ml de solution mère (HEs et vC) dans le premier tube, et on prend 1 ml de premier tube et on met dans le deuxième, et on répète l'opération jusqu'à le cinquième tube, à la fin on obtient 5 concentration.

On obtient les concentrations suivantes : 0.33 g/ml ; 0.11g/ml ; 0.03 g/ml ; 0.01 g/ml, et 0.004g/ml.

Le pourcentage d'inhibition antiradicalaire est calculé à partir d'une solution témoin (ou contrôle)

I.4.2. Détermination du pourcentage d'inhibition

Selon **Sharififar et al., (2007)**, l'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage (I%) est calculée de la manière suivante :

$$I\% = (A \text{ blanc} - A \text{ échantillon}) \times 100 / A \text{ blanc}$$

A blanc : Absorbance du blanc (DPPH dans le méthanol).

A échantillon : Absorbance du composé d'essai.

Tous les essais ont été effectués en triple

I.5. Dosage des Protéines totales

Les protéines sont dosées par colorimétrie selon la méthode de **Bradford (1976)**. Le principe de la méthode est basé sur la fixation d'un colorant acide (bleu de coomassie) sur les protéines au niveau de résidus basiques et aromatiques, cette fixation provoque un transfert de sa couleur qui passe du rouge au bleu. Ce changement de coloration est mesuré à une longueur d'onde de 595nm par spectrophotomètre (JENWAY 6400).

I.6. Dosage des lipides

Le taux de lipides est déterminé selon la méthode de **Goldsworthy et al., (1972)** qui utilise la vanilline comme réactif et une solution mère de lipides à 2,5 mg/ml comme standard. Le dosage est réalisé sur des prises aliquotes de 100 µl des extraits lipidiques ou de la gamme étalon auxquelles on ajoute 1 ml d'acide sulfurique (96 %). Après agitation et chauffage dans des bains à sec à 100 °C pendant 10 mn, puis refroidissement, 200 µl sont repris auxquels sont ajoutés 2,5 ml de la réactive vanilline. Une fois agités et mis à l'obscurité pendant 30 minutes, une coloration rose se développe dont l'intensité est lue à une longueur d'onde de 530 nm par spectrophotomètre (JENWAY 3600).

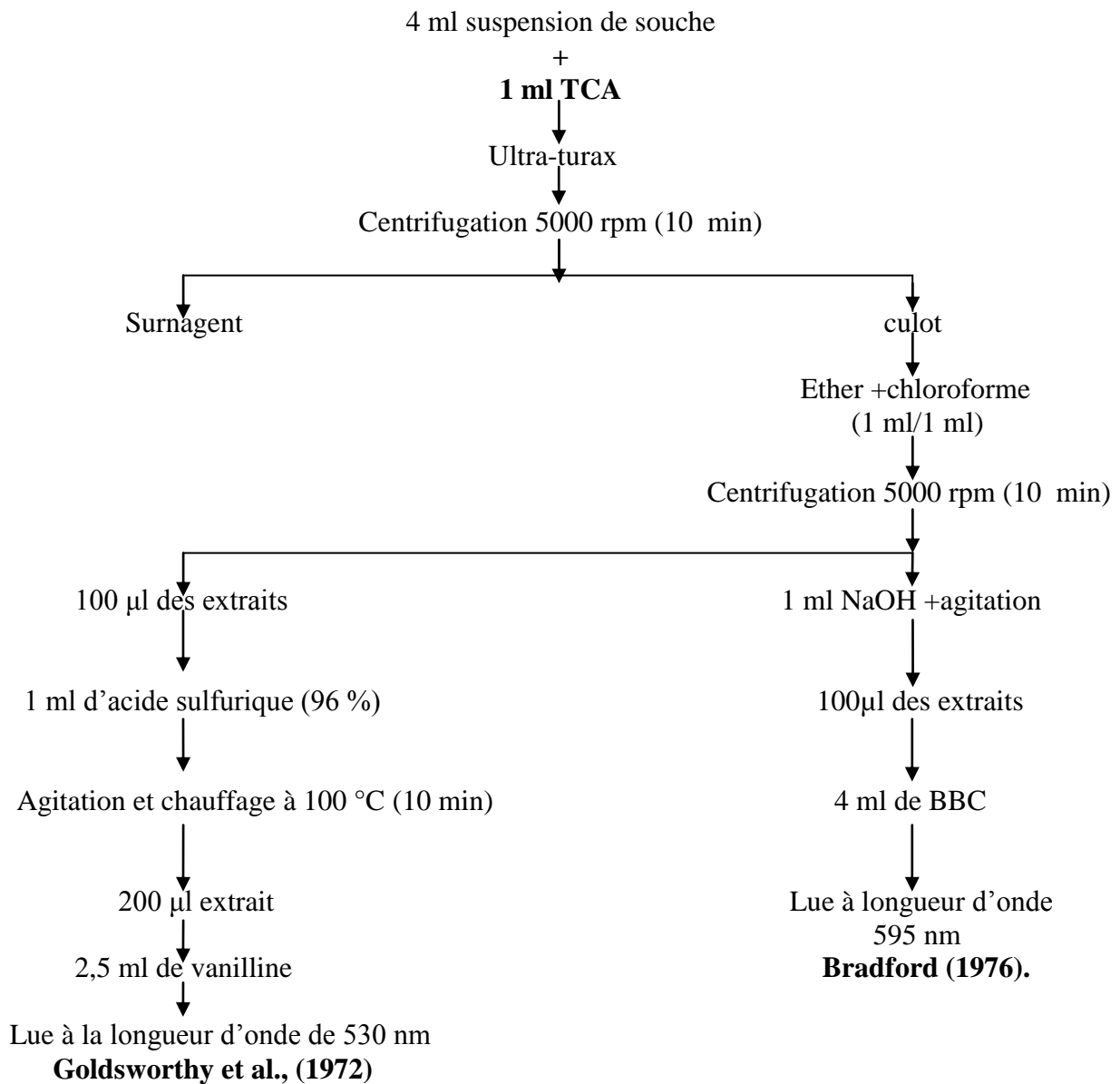


Figure 13: Principe de dosage des protéines et lipides totaux.

Chapitre II

Résultats et discussions

II.1. Le rendement

Le rendement des huiles essentielles extraites a été calculé en fonction de la matière végétale fraîche de la partie aérienne des plantes étudiées. De ce fait le rendement en huile essentielle d'*Artemisia herba alba* a donné un taux de 0,19%. Cependant pour l'*eucalyptus globuluse* a marqué la valeur 0.48%.

Pour l'espèce d'armoise, notre rendement est faible comparativement à celui de 18 provenances d'armoise blanche en Tunisie (0,68 %-1,93 %) (**Houari, 2009**). Et de même pour le rendement d'armoise blanche qui a été notée en Espagne (0.41 % - 2.30 %) pour 16 échantillons de 4 provenances (**Salido, 2004**). Bien que pour l'*eucalyptus globuluse* On remarque que notre rendement est plus élevée que celui de la rose (0,1-0,35 %) et plus faible que celui de la menthe poivrée (0,5-1 %), le néroli (0,5-1 %), l'anise (1-3 %), la lavande (0,8-2,8 %), le romarin (1-2,5 %) et le thym (2-2,75 %) (**Edward et al. 1987**). Cette différence de rendement entre les même espèces peut être attribuée à de nombreux facteurs : stade de croissance, conditions pédoclimatiques et édaphiques de la région, technique d'extraction, etc..... (**Fellah, 2006**).

II.2. Caractéristiques physique et chimique des HEs

H.E/caractère	pH	IR	miscibilité à l'éthanol	densité	couleur
Armoise H.B	6	1.657	4/5	0.819 g/ml	Jaune pâle
Eucalyptus	7	1.653	4/5	0.877 g/ml	brun

Tableau 3 : caractères physique et chimique des deux H.Es d'*Artemisia herba alba* et *Eucalyptus globulus*.

Selon les critères fournis par l'AFNOR les caractéristiques physiques et chimiques des HEs obtenus sont sur les normes.

Pour le pH pour l'armoise blanche (pH= 6). L'Eucalyptus (pH= 7) ce pH est Probablement élevé est ça peut être due a la conservation ou la manipulation qui peuvent influencées le pH de nos huiles essentielles.

Pour l'indice de réfraction, on a un enregistré un indice plus au moin élevé. A signalé que l'indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé. Pour certains auteurs (**Kanko, 2004**). En fin, la détermination des propriétés physico-chimiques est une étape nécessaire mais demeure non suffisante pour caractériser l'HE. Il sera donc primordial de déterminer le profil chromatographique de l'essence aromatique.

II.3. La chromatographie en phase gazeuse (CPG) des HEs

Les analyses chromatographiques des HE d'*Artemisia herba alba* ont révélé la présence de soixante quatre composés volatils. La plante présente une grande variabilité chimique.

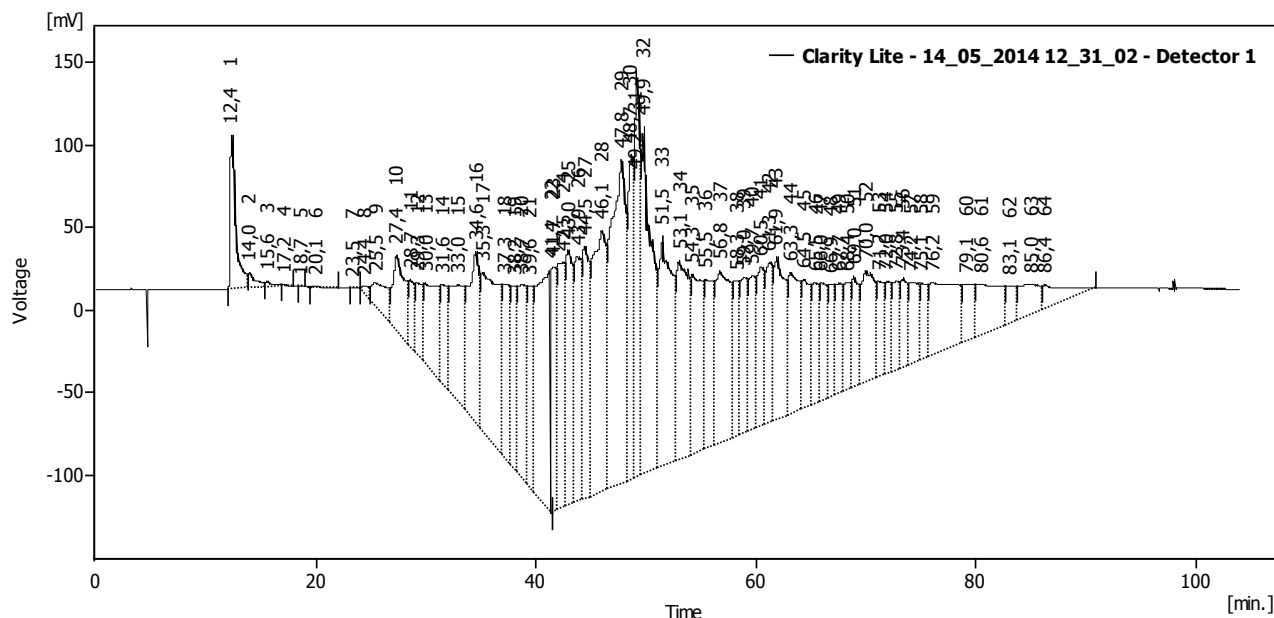


Figure 14 : chromatogramme de l'HE d'*Artemisia herba alba*.

Tout ces variations au niveau de composé majoritaire attribuent à de nombreux facteurs : (stade de croissance, conditions pédo-climatiques et édaphiques de la région, technique d'extraction ect...). Pour l'HE d'*Eucalyptus globulus* Les analyses chromatographiques ont révélé la présence de soixante-dix composés volatils. De ce fait notre plante présente une grande variabilité chimique.

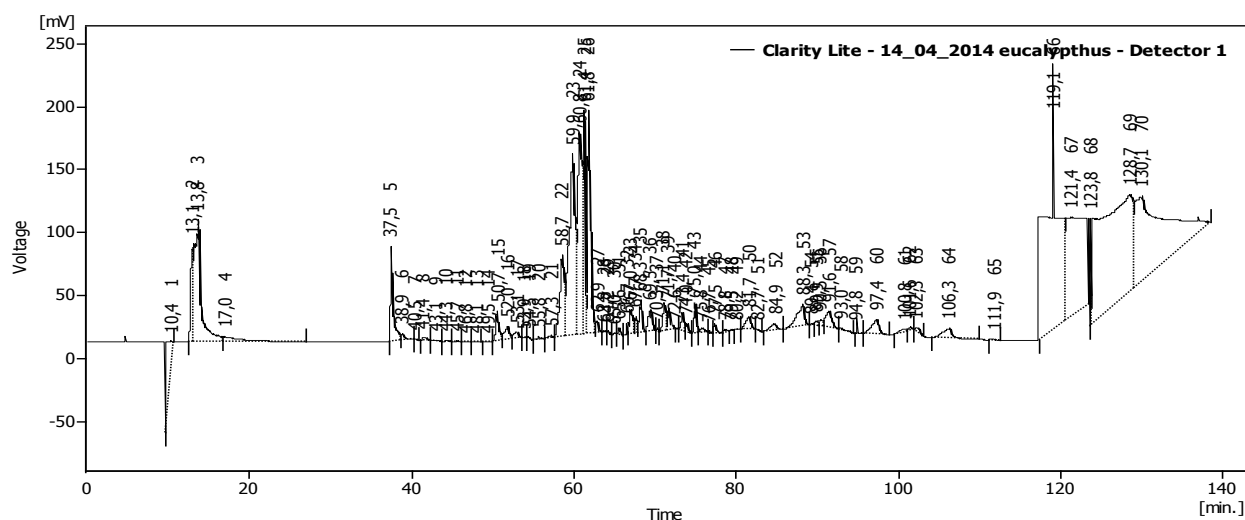


Figure 15 : chromatogramme de l'HE d'*Eucalyptus globulus*.

Les deux HEs étudié on une très large variabilité chimique, qui lui donne un très large intervalle des activités biologique.

II.4. Teste de l'activité antifongique des deux HEs

II.4.1. Identification des souches

Après la culture et l'isolement des souches fongique, on a trouvé cinq souches. L'identification de ces souches fongique a été réalisées par M^{elle} Baaziz Wided, au laboratoire de microbiologie, où on déterminé les genres.

- S1: *Rhizopus* : est un genre de moisissures communes qui se développent sous forme de filaments dans les sols, Il fait partie de l'ordre des Mucorales. Il produit à la fois des spores sexuées et des spores asexuées.

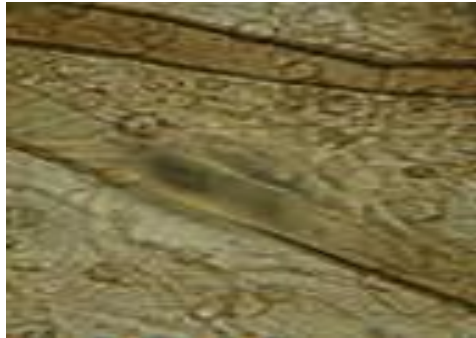


Figure 16 : observation microscopique de *Rhizopus* (x400).

- S2 et S3 : *penicillium* sp1 et sp2 : Les *Penicillium* sont des champignons filamenteux, Le conidiospore ramifié possède une forme ressemblant à celle d'un pinceau. Les conidies sont disposées en longues chaînes. Le thalle est vert ou blanc. Ce sont des champignons pour la plupart très communs dans l'environnement pouvant être responsables de nombreuses dégradations.



Figure 17 : observation microscopique de *Penicillium* (x400).

- S4: *Alternaria* : est le nom d'un genre de champignons à reproduction asexuée (Deutéromycètes). Ce genre renferme un grand nombre d'espèces (plus de soixante) parasites ou saprophytes.

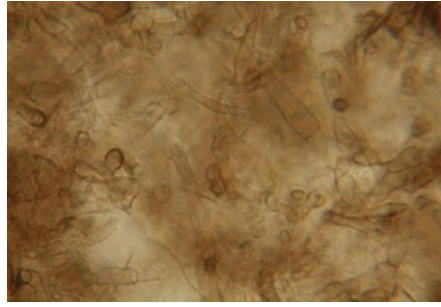


Figure 18 : observation microscopique de *l'Alternaria* (x400).

- S5: *Penicillomyces*, sont des champignons imparfait généralement de couleur claire disposée en très longue chaînes.

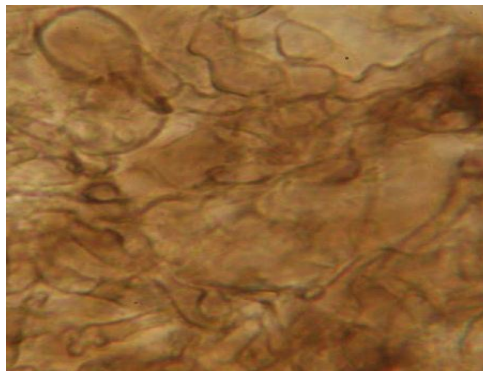


Figure 19 : observation microscopique de *l'Penicillomyces*(x400).

II.4.2. Evaluation de L'activité antifongique

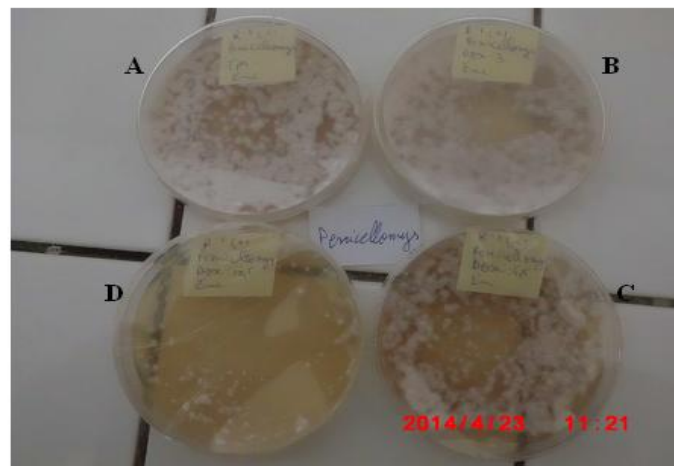


Figure 20 : montrant l'effet du HE de *l'Eucalyptus globulus* sur le *Penicillomyces*.
A: le témoin ; B: dose 1 ; C : dose 2 ; D dose 3

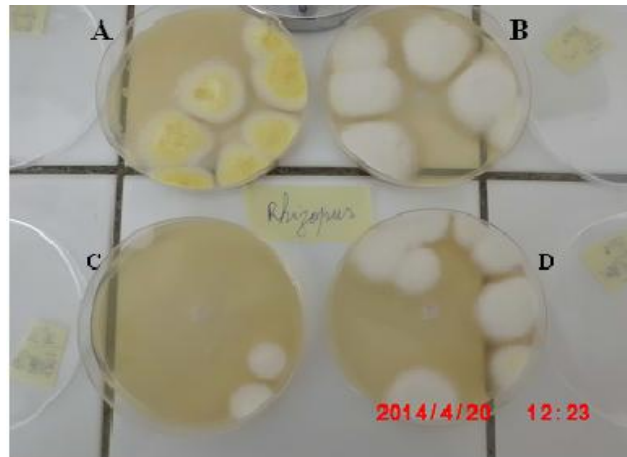


Figure 21 : montrant l'effet du HE de *l'Artemisia herba alba* sur le *Rhizopus*.
A: le témoin ; B: dose 1 ; C : dose 2 ; Dose 3

Les observations effectuées sur l'effet des H.Es *d'Artemisia herba alba* et *l'Eucalyptus globulus* sur des souches fongique, sont représentées dans les tableaux (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13).

Tableau 4 : zone d'inhibition de HEs *d'Artemisia herba alba*, (*Rizopus sp.*)

souches	doses d'HE	3 jours	7 jours	10 jours
<i>Rhizopus</i>	0 μ L	-	-	-
	3 μ L	25 mm	15 mm	7.5 mm
	5,5 μ L	32 mm	21 mm	10 mm
	10,5 μ L	+++	56 mm	23 mm

Tableau 5: zone d'inhibition de HEs *d'Eucalyptus globulus*, (*Rizopus sp.*)

souches	doses d'HE	3 jours	7 jours	10 jours
<i>Rhizopus</i>	0 μ L	-	-	-
	3 μ L	10 mm	6 mm	-
	5,5 μ L	13 mm	8 mm	-
	10,5 μ L	36 mm	27.5 mm	16 mm

Tableau 6: zone d'inhibition de HEs *d'Artemisia herba alba*, (*Alternaria sp.*)

souches	doses d'HE	3 jours	7 jours	10 jours
<i>Alternaria</i>	0 μ L	-	-	-
	3 μ L	-	-	-
	5,5 μ L	+	-	-
	10,5 μ L	+	+	-

Tableau 7: zone d'inhibition de HEs *d'Eucalyptus globulus* (*Alternaria sp.*)

souches	doses d'HE	3 jours	7 jours	10 jours
<i>Alternaria</i>	0 μ L	-	-	-
	3 μ L	-	-	-
	5,5 μ L	+	-	-
	10,5 μ L	+	-	-

Tableau 8 : zone d'inhibition de HEs *d'Eucalyptus globulus* (*Penicillomyces sp.*)

souches	doses d'HE	3 jours	7 jours	10 jours
<i>Penicillomyces</i>	0 µL	-	-	-
	3 µL	15 mm	9.3 mm	7.5 mm
	5,5 µL	14 mm	11 mm	9.5 mm
	10,5 µL	18 mm	14 mm	11 mm

Tableau 9 : zone d'inhibition de HEs *d'Artemisia herba alba*, (*Penicillomyces sp.*)

souches	doses d'HE	3 jours	7 jours	10 jours
<i>Penicillomyces</i>	0 µL	-	-	-
	3 µL	20 mm	11 mm	8.5 mm
	5,5 µL	19 mm	11.5	9 mm
	10,5 µL	32 mm	12.5 mm	10 mm

Tableau 10 : zone d'inhibition de HEs, *d'Artemisia herba alba* (*Penicillium sp I.*)

souches	doses d'HE	3 jours	7 jours	10 jours
<i>Penicillium</i> I	témoin	-	-	-
	3 µL	6 mm	-	-
	5,5 µL	8 mm	-	-
	10,5 µL	15 mm	10 mm	-

Tableau 11 : zone d'inhibition de HEs *d'Eucalyptus globulus*, (*Penicillium sp I.*)

souches	doses d'HE	3 jours	7 jours	10 jours
<i>Penicillium</i> I	0 µL	-	-	-
	3 µL	12 mm	-	-
	5,5 µL	10 mm	-	-
	10,5 µL	12 mm	-	-

Tableau 12 : zone d'inhibition de HEs, *d'Artemisia herba alba* (*Penicillium sp II.*)

souches	doses d'HE	3 jours	7 jours	10 jours
<i>Penicillium</i> II	0 µL	-	-	-
	3 µL	11mm	8 mm	-
	5,5 µL	14 mm	9 mm	6 mm
	10,5 µL	13 mm	9 mm	6.5 mm

Tableau 13 : zone d'inhibition de HEs *d'Eucalyptus globulus*, (*Penicillium sp II.*)

souches	doses d'HE	3 jours	7 jours	10 jours
<i>Penicillium</i> II	0 µL	-	-	-
	3 µL	-	-	-
	5,5 µL	-	-	-
	10,5 µL	14 mm	12 mm	-

Le test antifongique des huiles essentielles montrent que parmi les souches étudiés le *Rhizopus* et le *penicillomyces* sont les plus influencés en suite le *penicillium* II puis le *penicillium* I, et enfin l'*Alternaria*. Où l'effet des doses des HEs est aussi très clair. Parmi les deux HEs, l'efficacité de l'huile essentielle d'Armoise est relativement plus élevée.

Selon ces résultats on peut classer les souches fongiques testées en trois groupes :

1- deux souches sensibles : sont le *Rhizopus* et *Penicillomyces*.

2- deux souches peu sensibles : sont le *penicillium* I et le *penicillium*.

3- une souche résistante : c'est l'*Alternaria*.

L'étude de l'activité antifongique des HEs d'*Artemisia herba alba* et d'*Eucalyptus globulus* sur les souches fongique de *Rhizopus* et *Penicillomyces*, *penicillium* I et le *penicillium* II et l'*Alternaria* par la méthode de puis en milieu solide a révélé que les H.Es des deux plantes possèdent une remarquable activité antifongique relativement qui se diffère selon les deux HEs et aussi selon la souche testé, cette activité antifongique liée à la richesse de ces huiles en composés bioactifs largement répandus dans les plantes médicinales. Mais les résultats révèlent qu'il y a des souches fongique résistantes à ces HEs comme celle de l'*Alternaria*.

II.5. L'activité antioxydante des l'HEs

Nous avons choisi la méthode DPPH en raison de sa simplicité, rapidité, sensibilité et de sa reproductibilité, mais aussi parce que les mesures IC₅₀ exprimées en mg/mL sont comparables entre elles et non pas seulement à celle d'une référence. (El kalamouni, 2010)

concentration de vC	DO RépétitionI	DO RépétitionII	DO répétitionIII	moyenne	% d'inhibition
C1	0,351	0,341	0.349	0.347	40.48%
C2	0,493	0,473	0.480	0.482	17.32%
C3	0.534	0,523	0.525	0.527	9.60%
C4	0,563	0,548	0.558	0.556	4.63%
C5	0.575	0,573	0.574	0.574	1.54%

Tableau 13 : le pourcentage d'inhibition antioxydante de l'HE d'*Artemisia h.a*

concentration de vC	DO RépétitionI	DO RépétitionII	DO répétitionIII	moyenne	% d'inhibition
C1	0,374	0,365	0.366	0.368	36.37%
C2	0,492	0,474	0.485	0.483	17.15%
C3	0.536	0,535	0.535	0.535	8.20%
C4	0,550	0,548	0.549	0.549	5.83%
C5	0.577	0,576	0.578	0.577	1.02%

Tableau 14 : le pourcentage d'inhibition antioxydante de l'HE d'*Eucalyptus globulus*.

concentration de vC	DO RépétitionI	DO RépétitionII	DO répétitionIII	moyenne	% d'inhibition
C1	0,007	0,004	0,005	0.0053	99%
C2	0,263	0,265	0,256	0.262	55%
C3	0,471	0,483	0,481	0.478	18%
C4	0,552	0,547	0,546	0.548	6%
C5	0,579	0,565	0,568	0.571	2%

Tableau 15 : le pourcentage d'inhibition antioxydante de vitamine C

La diminution de l'absorbance du radical DPPH est expliquée par sa réduction en présence des extraits des HEs. D'une manière générale, les deux HEs ont provoquées une diminution plus ou moins importante de l'absorbance à 515nm selon les doses étudiées. Pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant, nous avons introduit le paramètre d'IC50 :

- Le calcul d'IC50 : il définit la concentration efficace du substrat qui cause la réduction de 50% du DPPH en solution. Les valeurs de IC50 des deux espèces ont été estimées en utilisant la courbe de régression linéaire : $y = ax + b$ Où $y = 50\%$ (pourcentage de réduction de DPPH) et x : IC50 (la concentration en extrait et de l'acide ascorbique)

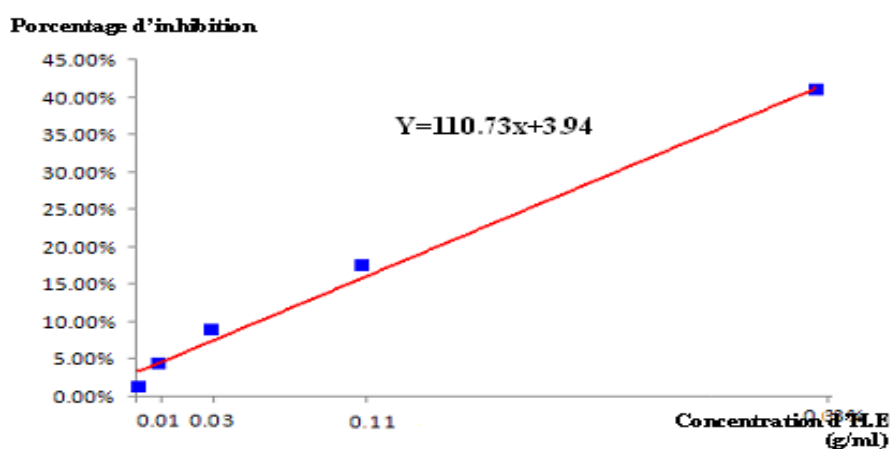


Figure 22 : Evolution d'activité antioxydante en fonction de différentes concentrations de l'H.E d'*Artemisia h.a*

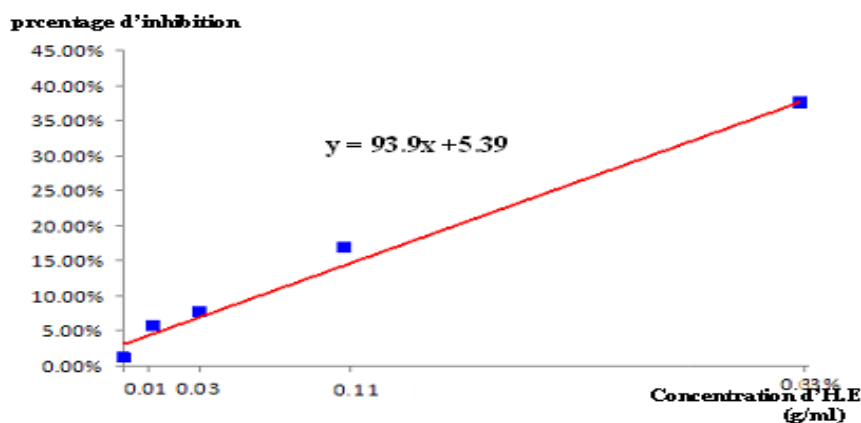


Figure 23 : Evolution d'activité antioxydante en fonction de différentes concentrations de l'H.E *d'eucalyptus globulus*

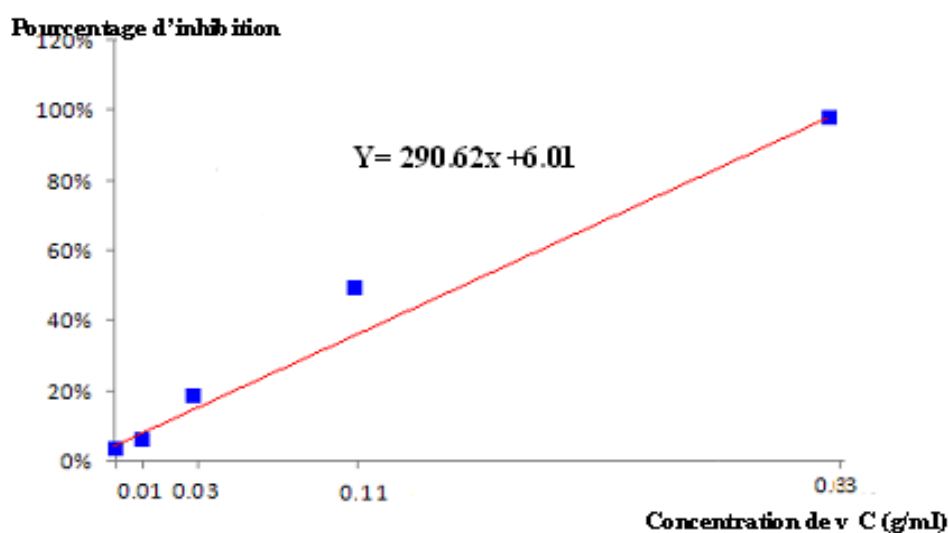


Figure 24 : Evolution d'activité antioxydante en fonction de différentes concentrations de vitamine C.

Les figures 15, 16, 17, représentent la variation du pouvoir antioxydant en fonction de la concentration des huiles essentielles, ainsi que de celle du vC. Nous avons remarqué qu'il n'y a aucune différence d'effet antioxydant entre les trois échantillons pour la concentration 0.004 mg/ml, à partir de 0,03 mg/ml, par contre nous avons remarqué une différence entre le vC et les deux huiles *d'Artemisia h.a* et *l'Eucalyptus globulus*.

L'extrait	IC50 (mg/ml)
H.E <i>d'artemisia h.a.</i>	0.42
H.E <i>d'eucalyptus g.</i>	0.47
Acide ascorbique	0.15

Tableau 16 : Valeurs des IC50 des HE.s *d'Artemisia h.a* et *d'Eucalyptus g.*

L'acide ascorbique (vitamine C) est un antioxydant standard utilisé à des fins comparatives. Il a montré une activité antiradicalaire très puissante avec IC50 de l'ordre de 0,15mg/ml. D'après le (tableau 16), il semble que les huiles essentielle d'*Artemisia herba alba* et l'*Eucalyptus globulus* ont une activité antioxydante, mais elle est moins efficace que celle de la vitamine C, et que l'HE de l'*Artemisia herba alba* a une activité antioxydante plus au moins supérieure à celle d'*Eucalyptus globulus*.

Malgré que l'activité antioxydante des huiles essentielles testés considère faible devant celle de vC, mais elle reste considerable. Ce pouvoir antioxdant due à la richesse en composés phénoliques où Les groupements hydroxyle dans les composés phénoliques peuvent servir comme donneur d'électron. Et des monoterpènes oxygénés et aussi des monoterpènes hydrocarbonés. Et précisément les flavonoïdes qui sont, reconnus comme d'excellents antioxydants (**Bruneton, 1999**).

Le pouvoir antioxydant de ces huiles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Ce sont surtout les phénols et les polyphénols qui sont responsables de ce pouvoir (**Richard, 1992**).

II.6. Le dosage de protéine

Plusieurs auteurs ont montrés que les microorganismes sont capables de synthétiser une multitude de protéines et d'enzymes spécifiques à la détoxification leur permettant de maintenir à un niveau suffisamment bas les concentrations intracellulaires de polluant. De nombreuses études confirment le rôle des protéines du stress chez les microorganismes (**Piccini et al, 1994 ; Masaya et al , 2002 ; Redouan- Salah , 2004**).

Le BBC est un pigment existe sous forme cationique, neutre et anionique. Sa longueur d'onde d'absorbance maximale est 465 nm. Le pigment forme un complexe avec les protéines, sa structure est modifiée par cette interaction et sa longueur d'onde d'absorbance maximale est déplacée de 465 à 595 nm. La valeur d'absorbance dépend de la concentration de protéine de la suspension porale. On a choisi les deux souches qui ont présenté une sensibilité vis-à-vis les huiles essentielles étudiées (d après les résultats des activités antifongiques) qui sont le *Rhizopus* et *Penicillomyces*.

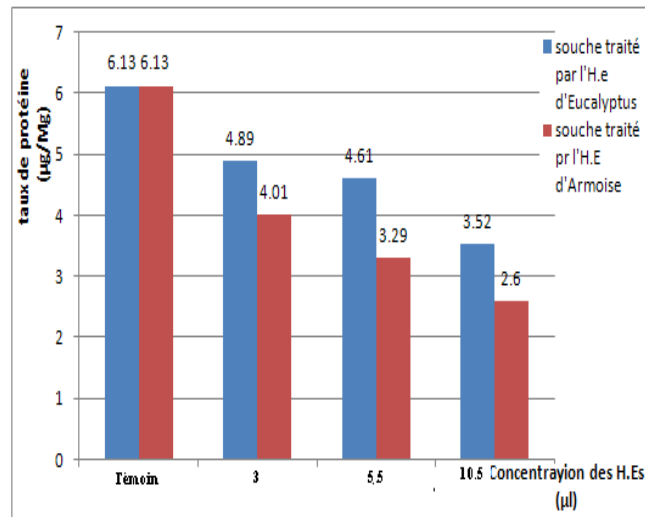


Figure 25 : Evolution du taux de protéines totales en fonction des concentrations Des HEs d’Armoise et l’Eucalyptus, (*penicillomyces*).

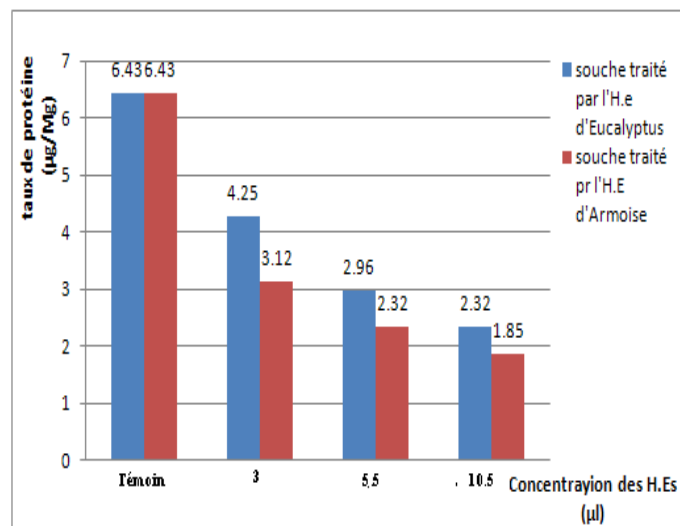


Figure26 : Evolution du taux de protéines totales en fonction des concentrations Des HEs d’Armoise et l’Eucalyptus, (*Rhizopus*).

Les variations des taux de protéines totales obtenues après 15 jours de traitement sont représentées dans les histogrammes (Figure 17 et 18). On constate que le taux de protéines chez les traités tend à diminuer de manière dose –dépendante d une façon descendante et significative ($p < 0.001$) par rapport au témoin, il est de 4,25 µg /mg avec la dose 3 µL et atteint la valeur de 2,32 µg/ mg avec la dose 10,5 µl des huiles essentielles de l’armoise blanche et ca pour le genre *Rhizopus*. Tout de même Pour le genre *penicillomyces* qui a marqué les valeurs 4,89, 4,61 et 3,62 ave les doses 3 µl, 5,5 µl et 10,5 µl respectivement.

Pour les taux de protéines des suspensions sporale des champignons traités par les huiles essentielles extraites d'eucalyptus. D'après les histogrammes (Figure 17 et 18) on remarque il y a des variations remarquables sur les taux des protéines totales entre le témoin et les traités.

En effet ce taux passe de 1.85µg/mg chez les traités avec la dose élevée 10.5µl de H.E d'armoise à la valeur 2.32µg/mg pour les traités avec la faible dose .chez les traités par 10.5µl de H.E d'Eucalyptus et le témoin avec 6.43µg/mg, pour la souche de *Rhizopus*.

Et pour la souche de *Penicillomyces* le taux de protéine passe de 2.6 µg/mg pour les traités par 10µl de l'H.E de l'Armoise et 3.52µg/mg pour les traités par 10µl de l'H.E 'Eucalyptus, à 6.13µg/mg pour les témoins. Les concentrations des protéines sont inversement proportionnelles avec les concentrations des HEs. Ces études révèlent aussi que les protéines sont plus influencées par l'H.E de l'Armoise que celle d'Eucalyptus et l'effet des doses semble plus clair. Ces résultats sont compatibles avec les résultats obtenus au test antifongique, où l'activité anti fongique d'Armoise est plus forte que celle d'Eucalyptus.

L'influence des doses des HEs d'*artemisia herba alba* et d'*Eucalyptus globulus* sur les protéines des champignons est très clair, ça prouve le pouvoir antioxydant de ces HEs, et la présence des composés capable de dénaturer et dégrader les protéines.

Les composés terpéniques des huiles essentielles et plus précisément leurs groupements fonctionnels tels que les phénols et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires (protéines) et dégradent la membrane plasmique des champignons (**Giordani et Kaloustian, 2006**).

La teneur en protéines solubles totales est un test souvent utilisé pour mettre en évidence un stress chez un bioindicateur. En effet, lorsque les contraintes environnementales (stress hydrique, thermique, oxydant, exposition à une pollution, infection par des agents pathogènes...) sont fortes, la plupart des protéines subit une dénaturation (**John et al., 2009**).

II.7. Le dosage des lipides

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiées de l'attaque par le radical OH, réaction appelée la peroxydation lipidique (**Lee et al., 2006 ; Ré et al., 2005**). L'attaque des phospholipides membranaires modifie la fluidité la perméabilité de la membrane, aboutissant à la désorganisation complète de la membrane, et altérant de ce fait le dysfonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

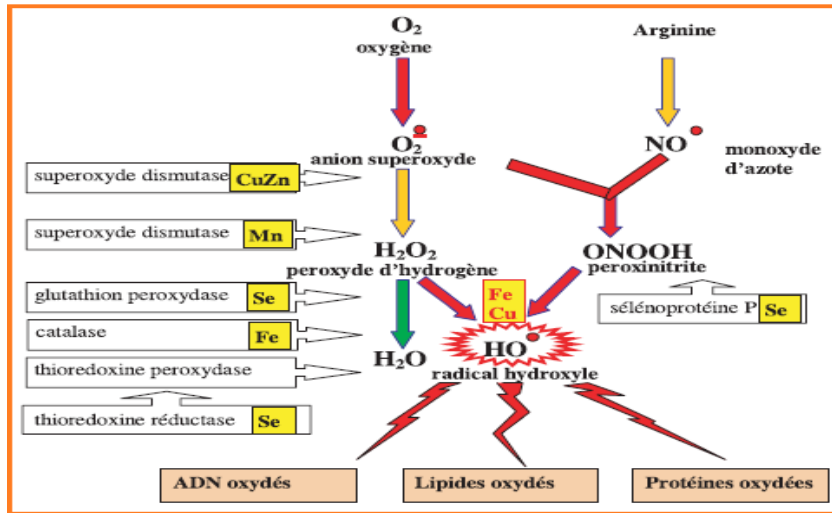


Figure 27: Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (Favier, 2003).

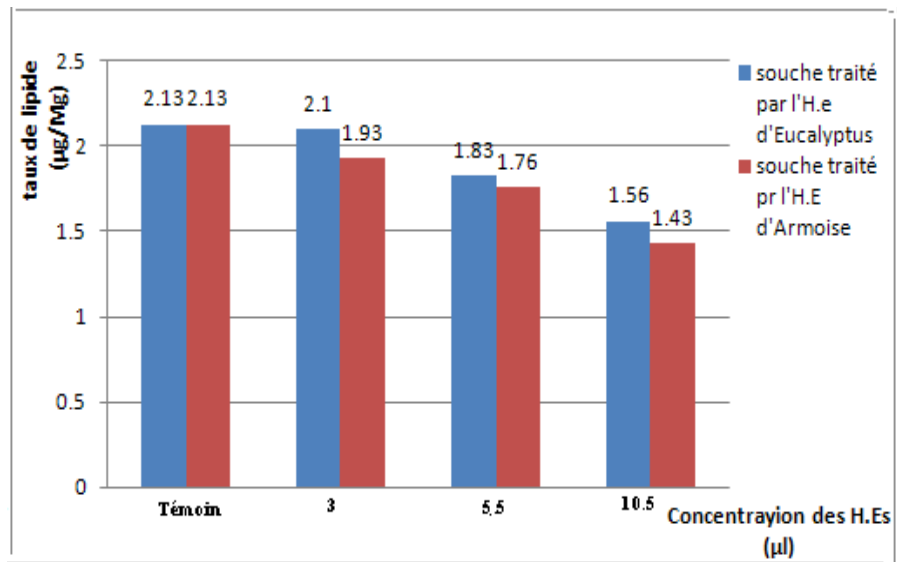


Figure 28 : Evolution du taux de lipides totales en fonction des concentrations Des HES d'Armoise et l'Eucalyptus, (*Rhizopus*).

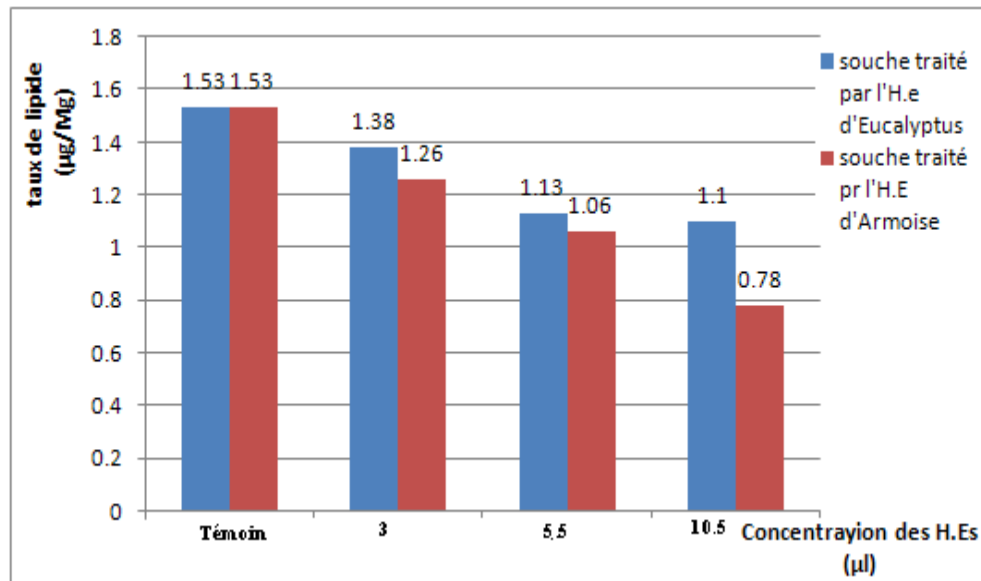


Figure 29: Evolution du taux de lipides totales en fonction des concentrations Des HEs d'Armoise et l'Eucalyptus, (*Penicillomyces*).

Les figures 22 et 23 illustrent les variations du taux de lipides en fonction des différentes concentrations étudiées pour les HEs d'Armoise et l'Eucalyptus. Dès le traitement par la plus faible concentration (3µl), nous enregistrons une diminution considérable du taux de lipides par rapport au témoin, et on remarque une autre fois que l'HE de l'armoise a la fort effet par rapport au l'HE de l'Eucalyptus. Et que cet effet dépend la dose utilisé.

Les études de dosage de protéine et de lipide considéré comme des référence sur les effets toxique des HEs étudiés, car les constituants des cellules du monde vivant sont presque les même (protéine, glucide, lipide, ...), avec des pourcentages différents.

CONCLUSION GENERAL

La disparition de nombreuses substances actives de synthèse en protection des cultures a entraîné un regain d'intérêt pour les substances d'origine naturelle.

En parallèle à ces disparitions, le contexte réglementaire incite fortement à développer l'utilisation des méthodes alternatives à la lutte chimique : directive cadre sur l'utilisation durable des pesticides, règlement 1107/2009 sur la mise en marche des produits phytosanitaires, plan Ecophyto 2018. Parmi ces méthodes, on peut citer l'emploi de bio-pesticides et en particulier des huiles essentielles.

De ce fait Un autre secteur a vu la lumière ces dernières années c est les biopesticides a base des HES

Bien qu'accessibles à tous, les huiles essentielles peuvent représenter certains dangers et malgré leur image de produits naturels elles ne sont pas dépourvues de toxicité. En effet, les chercheurs signalent chaque année des problèmes de santé dus à l'utilisation des huiles essentielles.

Les effets biologiques bénéfiques des composés volatils (huiles essentielles) est bien étudiés par rapport aux effets toxiques pour cela on a basé dans ce modeste travail sur l'évaluation de la toxicité des huiles essentielles et de mieux comprendre les réponses biologiques induites suite à l'ajout des huiles essentielles a l échèle des microorganismes.

La croissance constitue avec la reproduction et la survie les critères de base qui peuvent faire d'un organisme un modèle d'étude en écotoxicologie (**Flammarion et Péry, 2004**).

L'accroissement des micro-organismes peut être quantifié par une augmentation de la taille, du poids ou du nombre. Néanmoins, il existe plusieurs agents limitants. Le facteur limitant est celui qui conditionne la vitesse ou l'amplitude d'un phénomène qui dépend de plusieurs autres paramètres (**Liebig, 1844**).

Généralement, les facteurs écologiques sont utilisés pour décrire, analyser ou modéliser une fonction physiologique d'un organisme biologique. Parmi ces derniers nous on peut citer les facteurs abiotiques (physico-chimiques et pollutions) qui ont des effets directs et rapides sur le développement des organismes vivants (**Wehner et Gehring, 1999 ; Branger et al., 2007**). Cependant, La compréhension des effets produits par les paramètres conditionnant la croissance d'une espèce donnée semble être primordiale pour son utilisation expérimentale en écotoxicologie (**Schopfer, 1935 ; Ershov et al, 1999**).

Le présent travail est consacré à la détermination du rendement, de la composition chimique et des propriétés antioxydante et antifongique de l'huile essentielle extraite de

l'*Artemisia heba alba* récoltée dans la région Oued Athmnia (djebel grouz) en Mars 2014, et l'*Eucalyptus globulus* récoltée dans la zone de Constantine en moins de Avril 2014 .

Le rendement moyen en huile essentielle est 0,19 % pour l'*Artemisia heba alba*, et de 048% pour l'*Eucalyptus globulus*. Les tests de qualité confirmeent une qualité acceptable pour les huiles axtractés. Et Les analyses chimiques, par CPG montre la présence de grande variabilité chimique pour les deux HEs.

En plus, dans cette étude, montrent que l'huile essentielle *d'Artemisia herba alba* et *d'Eucalyptus globulus* présente, in vitro, une activité antioxydante remarquable et une activité inhibitrice importante sur quatre souches des champignons testés parmi cinq. Les performances antioxydante et antifongique mises en évidence méritent d'être étudiier avec plus de détails afin d'envisager des perspectives d'application de cette essence comme agent de bioconservation. Et les testes de dosage de lipides et de protéines donnent une idée sur l'effet toxique des HEs. Où l'effet de ces huiles peut être le même sur une cellule humain.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **AFNOR ,2000.** Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 1. Echantillonnage et méthodes d'analyse. AFNOR, Paris, 440 p.
- **AFSSAPS, 2008.** Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. Saint-Denis, p12.
- **Arora A., Sairam R., Srivastava G.; 2002.** Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, **82**, 1227-1238.
- **Baudoux D. 2001,** L'aromathérapie - Se soigner par les huiles essentielles, Atlantica.
- **Belaïche P., 1979.** Traité de phytothérapie et l'aromatothérapie.Tome: L'aromatogramme. Ed: maloine S.A., Paris, 204 p.
- **Bezzal, L.; Mannarinol, A.; Fattarsil, C.; Mikaaïl, C.; Aboul, L.; Hadji-Minaglou, F.; Kaloustian J., 2010.** *Phytothérapie*, **8**, 277-281.
- **Branger M., Bresler G., Vaamonde G., Degrossi C. & Pinto V. F., 2007.** Moisissures etrisques alimentaires (mycotoxicoses). *Revue Française des Laboratoires*.p : 373.
- Bruneton J. 1993.** Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.p: 915.
- **Bruneton J.1999**, Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3ème édition, Lavoisier Tec et Doc, Paris, 1120.
- Botton B., Breton A., Fèvre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P., (1990),** Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, Ed. Masson, Paris.
- **Cahagnier B. & Richard-Molard D., 1998.**Moisissures des aliments peu-hydratés, les moisissures. Collection sciences et techniques agroalimentaires. Ed. : Lavoisier. p : 39-41.
- **Campbell C.K., Johnson E.M., Philpot C.M., Warnock D.W., (1996),** Identification of pathogenic fungi, Public Health Laboratory Service.
- **Chabasse D., Bouchara J.P., Gentile L., Brun S., Cimon B., Penn P., 2002.** Les moisissures d'intérêt médical Ouvrage réalisé par le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, BIOFORMA, Paris. P11.
- **Djoukeng, 2005.** Etude phytochique et activité biologiques de quatre espèces cameronaïse de la famille des Myrtaceae.Univercitéde Neuchtl.
- **Duval L. ,2012.** Les Huiles Essentielles à l'officine. UFR de médecine etde pharmacie de Rouen. P54.
- **Edward P.Claus., Varro E.T., Lynn R. B. (1987).** Pharmacognosy, sixth edition. LEA et Febiger (ed):184-187.

- **El-kalamouni C., 2010**, Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées, thèse de doctorat, l'Institut National Polytechnique de Toulouse, p55.
- **Francis Joannès, 2001**. Dictionnaire de la civilisation mésopotamienne. Ed Robert Laffont, Paris, 974p.
- **Freeman L., CAREL Y., 2006**. Aromathérapie. *NUTRA NEWS* Science, Nutrition, Prévention et Santé. [http:// www. nutranews.org](http://www.nutranews.org)
- **Gardner P., 1997**. Superoxide-driven aconitase FE-S center cycling. *Bioscience Rep.*17, 33-42.
- **Garnero, J., 1991**. Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. Encyclopédie des médecines naturelles, phytothérapie, Aromathérapie, Paris, pp. 2-20.
- **Gimbert J.L., 1870**, L'Eucalyptus globulus: son importance en agriculture, en hygiène et en médecine, Université Harverd ,102p.
- **Giordani R. Kaloustian J., 2006**. Action anticandidosique des huiles essentielles : leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques *J Phytotherapie*, Numéro 3,121-124
- **Halliwell B. et Gutteridge J. M. C. 2007**. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford (fourth edition).
- **Haouari M. et Ferchichi A., 2009**, *Molecules 14*, 1585-1594: « Essential Oil Composition of *Artemisia herba-alba* from Southern Tunisia”.
- **Haslam E., 1998**. *Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action*. Cambridge University Press, Cambridge (UK).
- **Hininger-Favier I.**, Maître des Conférences des Universités. Laboratoire de Biologie du stress Oxydant. Faculté de Pharmacie. Grenoble
- **Hyodo, S., H. Etoh, N. Yamashita, K. Sakata, and K. Ina. 1992**. Structure of resinosides from *Eucalyptus resinifera* as repellents against the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 56: 138.
- **John R., Ahmad P., Gadgil K., Sharma S., 2009**. Heavy metal toxicity: Effect on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by *Brassica juncea* L. *International Journal of Plant Production* 3: 65-75.
- **Kaloustian J., Hadji-Minaglou F., 2012**, La connaissance des huiles essentielles: qualilogie et aromathérapie, Springer-verlag France, Paris, p 28,29,37.
- **Koechlin-Ramonatxo. 2006**, C., *Nutrition clinique et métabolisme*, 20, 165-177.
- **Li Peiwu., Hopia A., Jaris S., Teijo Y. et Heikki V., 1999**. TLC method for evaluation of free radical scavenging activity of rapeseed meal by video scanning technology. *Chemistry and Nutrition*, (10): 123-187.

- **Kwon Chung W. & Bennett J.W., 1992:** Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review* .16, p: 497-516.
- **Larpent J.J. et Larpent G. M., 1990-** Mémento technique de microbiologie. Ed Lavoisier. P : 76-89, 255-258, 327-328.
- **Lefloc'he. 1989,** Biologie et écologie des principaux taxons dans “ Essai de synthèse sur la végétation et la phyto-écologie tunisienne: I. Eléments de botanique et de phyto-écologie”. p.193
- **Lis-Balchin M., 2002.** Lavender: the genus *Lavandula*. Taylor and Francis, London.p: 37, 40, 50, 155-200.
- **Lutzoni F., Kauff F., Cox C.J., McLaughlin D., Celio G., 2004.** Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany*. 91: 1446–1480.
- **McDonagh, B. Requejo, R. Fuentes-Almagro, C.A. Ogueta, S. Bárcena, J.A. Padilla C.A. (2011).** Thiol redox proteomics identifies differential targets of cytosolic and mitochondrial glutaredoxin-2 isoforms in *Saccharomyces cerevisiae*. Reversible Sglutathionylation of DHBP synthase (RIB3). *Journal of Proteomics*, 74(11), 2487-2497.
- **Malecky M., 2008.** Métabolisme des trapénoïdes chez les Caprins, (AgroParisTech), Paris, p13.
- **Martini, M.-C., 2006,** Cosmétologie et Dermatologie esthétiques, 50, 120-E-10, édition Elsevier Masson SAS, Paris.
- **Marque G., 2008.** Isolement et caractérisation chez l'Eucalyptus de gènes codant les facteurs de transcription CBF impliqués dans la réponse au froid. Thèse de doctorat, l'université de Toulouse.p6.
- **Mathiews V. S. A. et Ames G. R., 1968** et The Distillation of Essential Oils, Tropical Products Institutes, 136-149.
- **Meyer, A., Deiana, J. & Bernard, A., 2004.** Cour de microbiologie générale. *J.Appl.Microbiol.* 66 (4), p:1523-1526.
- **Mika A., Minibayeva F., Beckett R., Lüthje S.; 2004.** Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry Reviews*, 3, 173-193.
- **Nabli M. A.,** Essai de synthèse sur la végétation et la phyto-écologie tunisiennes, tome I. Ed. MAB 1989 (Faculté des sciences de Tunis) ; 186-188 p.
- **Kanko C, Sawaliho Be, Kone S, Koukoua G, N'guessan Yt., 2004** « Étude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus* ». *Comptes rendus Chimie* 7 1039–1042.
- **Ourcival J. M., 1992.,** Réponse de deux chamaephytes de la Tunisie présaharienne à différentes contraintes et perturbations. Thèse Doc. USTL, Montpellier, p167.

- **Pibiri M.C, 2006.** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. thèse de Doctorat, Lausanne, Canada, p : 177.
- **Pincemail J., Meurisse M., Limet R. et Defraigne J. O., 1999.** L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumons*.
- **Piochon M., 2008.** Étude des huiles essentielles d'espèce végétales de la flore laurentienne: composition chimique activité pharmacologique et hémi-synthèse. (thèse de doctorat),p7.
- **Porter N., 2001.** Essential oils and their production. Crop & Food Research. Number 39.
- **Popovici C., Saykova I. Tylkowski B.,2009.** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel* **2009**, *4*, 25-39.
- **Quideau S., Deffieux D. Douat-Casassus C. et Pouységü L. (2011).** "Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis." *Angewandte Chemie - International Edition* **50**(3): 586-621.
- **Rai M.K., Acharya D. et Wadegaonkar P., 2003.** Plant derived-antimycotics : potential of Acteraceous plants. In: Plantb-derived antimycotics: Current trends and future prospects, Haworth Press, N-York, Londin, Oxford. 165-185.
- **Richard H. et Peyron F., 1992.**Epices et aromates. Ed .Tec & Doc-Lavoisier.Paris.p :339.
- **Rouessac, F. ; Rouessac, A., 1995** Analyse chimique méthodes et techniques instrumentales modernes,, 2.Ed. Masson, Paris.(in Khebri Souad 2011)
- **Salido, S., Valenzuela. L.R., Altarejos. J., Noguerras. M., Sanchez, A., Cano. E., 2004,** *Biochemical Systematics and Ecology*, *32*, 265-277.
- **Setzer, W.N., Vogler, B., Schmidt, J.M., Leahy, J.G., Rives, R., 2004** *Fitoterapia*, *75*, 192–200.
- **Sharififar F., Moshafi M.H., Mansouri S.H., Khodashenas M. & Khoshnoodi M., 2007.** In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora Boiss.* *Food Control* *18*, p: 800–805.
- **Smith, C.K.; Moore, C.A.; Alahi, E.N.; Smart, Â.T.; Hotchkiss, S.A. 2000.** Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde and cinnamic alcohol. *ToxicoS. Appl. Pharmacol.* *168*,189-99.
- **Tang S. Y. et Halliwell B., 2010.** Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and Caenorhabditis elegans studies? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **394**, 1-5.
- **Treiner J. (2000).** Extrait du Bulletin officiel n° 6 du 12 août 1999, France. 39-143.
- **Twedt, D. C., (2001).** Antioxydants and liver disease. 19th ACVIM forum, DENVER, CO. (in these DJEKOUN Mohamed, 2011).

- **Valnet M., 2005.**Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth International. Journal of Food Microbiology. 85, p: 73-81.
- **Zouari, S.; Zouari, N.; Fakhfakh, N.; Bougatef, A.; Ayadi, M.A.; Neffati, M., 2010,** Journal of Medicinal Plants Research, 4 (10), 871-880.

Annexe

<i>Rhizopus</i>	Absorbance (dose1)	Absorbance (dose2)	Absorbance (dose3)	Absorbance (témoin)
échantillon traité par d'Eucalyptus G	4.25 µg/mg	2.96 µg/mg	2.32 µg/mg	6.43 µg/mg
Echantillon traité par d'Armoise H.B	3.12 µg/mg	2.32 µg/mg	1.85 µg/mg	6.43 µg/mg

Tableau : taux de protéine rhizopus

<i>Paecilomyces</i>	Taux de protéine (dose1)	Taux de protéine (dose2)	Taux de protéine (dose3)	Taux de protéine (témoin)
Echantillon traité par d'Armoise H.B	4.01 µg/mg	3.29 µg/mg	2.60 µg/mg	6.13 µg/mg
échantillon traité par d'Eucalyptus G	4.89 µg/mg	4.61 µg/mg	3.52 µg/mg	6.13 µg/mg

Tableau : taux de protéine *Paecilomyces*

<i>Rhizopus</i>	Taux des lipides (dose1)	Taux des lipides (dose2)	Taux des lipides (dose3)	Taux des lipides (témoin)
Echantillon traité par d'Eucalyptus G	2.10 µg/mg	1.83 µg/mg	1.56 µg/mg	2.13 µg/mg
Echantillon traité par d'Armoise H.B	1.93 µg/mg	1.76 µg/mg	1.43 µg/mg	2.13 µg/mg

Tableau : taux de lipides *Rhizopus*

<i>Paecilomyces</i>	Absorbance (dose1)	Absorbance (dose2)	Absorbance (dose3)	Absorbance (témoin)
Echantillon traité par d'Armoise H.B	1.26 µg/mg	1.06 µg/mg	0.78 µg/mg	1.53 µg/mg
échantillon traité par d'Eucalyptus G	1.38 µg/mg	1.13 µg/mg	1.10 µg/mg	1.53 µg/mg

Tableau : taux de lipides *Paecilomyces*

Milieu de culture

GÉLOSE SABOURAUD

Neopeptone10 g
 Glucose.....20 g
 Agar20 g
 Eau1000 ml
 pH final 7,0

Lactophénol

Phénol pur cristallisé.....20g
 Acide lactique.....20g
 Glycérine.....40g
 Eau distillée.....20ml

A conserver en flacon coloré à l'abri de la lumière.

Liste des photos

- **Photo 1:** *Artemisia herba-alba*. P2
- **Photo 2:** *Eucalyptus globulus*. P23
- **Photo 3:** un montage d'entraînement à la vapeur d'eau. P9
- **Photo 4 :** appareillage de la chromatographie en phase gazeuse. P36
- **Photo 5 :** l'effet du H.E de *Eucalyptus globulus* sur le *Paecilomyces*. P37
- **Photo 6 :** l'effet du H.E de *Artemisia herba alba* sur le *Rhizopus*. P38
- **Photo 16 :** observation microscopique de *Rhizopus* x400. P36
- **Photo 17 :** observation microscopique de *Penicillium* x400. P36
- **Photo 18 :** observation microscopique de *Alternaria* x400. P36
- **Photo 19 :** observation microscopique de *Paecilomyces* x400. P36

Liste des figures

- **Figure 1:** poche sécrétrice (feuille). P2
- **Figure 2 :** Deux glandes bicellulaires à essence avec un poil ramifié. P3
- **Figure 3:** Unité isoprène. P4
- **Figure 4:** Structure de base des flavonoïdes. P5
- **Figure 5:** schéma d'un montage d'hydrodistillation. P8
- **Figure 6 :** Extraction par micro-ondes. P10
- **Figure 7 :** Classification des champignons. P13
- **Figure 8 :** carte géographique de zone de récolte. p24
- **Figure 9:** Principe de dosage des protéines et lipides totaux. 40
- **Figure 10:** chromatogramme de l'H.E d'*artemisia herba alba*. P43
- **Figure 11:** chromatogramme de l'H.E d'*Eucalyptus globulus*. p44
- **Figure 12 :** Evolution d'activité antioxydante en fonction de différentes concentrations de l'H.E d'*Artemisia h.a.* p41
- **Figure 13 :** Evolution d'activité antioxydante en fonction de différentes concentrations de l'H.E d'*eucalyptus globulus* p41
- **Figure 14 :** Evolution d'activité antioxydante en fonction de différentes concentrations de vitamine C. p 42
- **Figure 15 :** Evolution du taux de protéines totales en fonction des concentrations Des H.Es d'Armoise et l'Eucalyptus, (*Paecilomyces*). P43
- **Figure 16 :** Evolution du taux de protéines totales en fonction des concentrations Des H.Es d'Armoise et l'Eucalyptus, (*Rhizopus*). P44
- **Figure 17 :** Evolution du taux de lipides totales en fonction des concentrations

Des H.Es d'Armoise et l'Eucalyptus, (*Rhizopus*). P46

- **Figure 18** : Evolution du taux de lipides totales en fonction des concentrations
Des H.Es d'Armoise et l'Eucalyptus, (*Penicillomyces*). P46

Liste des tableaux

- **Tableau 1**: Liste des principaux radicaux libres. P16
- **Tableau 2** : rôle des antioxydants contre les maladies. P18
- **Tableau 3** : caractères physique et chimique des deux H.Es d'*Artemisia herba alba* et *Eucalyptus globulus*. P33
- **Tableau 4** : zone d'inhibition de H.Es d'*Artemisia heba alba*, (*Rizopus sp.*). p38
- **Tableau 5**: zone d'inhibition de H.Es d'*Eucalyptus globulus*, (*Rizopus sp.*). P38
- **Tableau 7** : zone d'inhibition de H.Es d'*Eucalyptus globulus* (*Paecilomyces sp.*). p38
- **Tableau 8** : zone d'inhibition de H.Es d'*Artemisia heba alba*, (*Paecillomyces sp.*). p39
- **Tableau 9** : zone d'inhibition de H.Es, d'*Artemisia heba alba* (*Penicillium sp I.*) p39
- **Tableau 10** : zone d'inhibition de H.Es d'*Eucalyptus globulus*, (*Penicillium sp I.*) p39
- **Tableau 11** : zone d'inhibition de H.Es, d'*Artemisia heba alba* (*Penicillium sp II.*) P39
- **Tableau 12** : zone d'inhibition de H.Es d'*Eucalyptus globulus*, (*Penicillium spII.*). p39
- **Tableau 13** : le pourcentage d'inhibition antioxydante de l'H.E d'*Artemisia h.a.* p40
- **Tableau 14** : le pourcentage d'inhibition antioxydante de l'H.E d'*Eucalyptus g.* p40
- **Tableau 15** : le pourcentage d'inhibition antioxydante de vitamine C. p40
- **Tableau 16** : Valeurs des IC50 des H.E.s d'*Artemisia h.a* et d'*Eucalyptus g.* p42

Liste des abréviations

- **HEs** : huiles essentielles.
- **AFSSAPS** : Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
- **AFNOR** : L'Association française de normalisation est l'organisme
- **CPG** : chromatographie phase gazeuse.
- **CPG/SM** : chromatographie gazeuse couplée à la spectroscopie de masse.
- **CPG/O**: Chromatographie en phase gazeuse couplée à l'olfactométrie.
- **DIF** : détecteur d'ionisation en flam.
- **RHE** : rendement des huiles essentielles.
- **P20** : la densité à 20° C.
- **BBC** : bleu de coomassie.
- **DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.
- **BSA** : l'Albumine Sérum bovine.
- **DL50** : Dose Létale 50

Table de matière

Partie I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Introduction.....	1
------------------------	---

Chapitre I: *Artemisia herba alba* et *Eucalyptus globulus*

I.1.1. <i>Artemisia herba alba</i>	2
I.1.1.1. Nomenclature et taxonomie.....	2
I.1.1.2. Description de plante d' <i>Artemisia herba alba</i>	3
I.1.1.3. Répartition géographique d' <i>Artemisia herba alba</i>	3
I.1.2. <i>Eucalyptus globulus</i>	3
I.2.2.1. Nomenclature et taxonomie.....	3
I.2.2.2. Description d' <i>Eucalyptus globulus</i>	4
I.2.2.3. Répartition géographique d' <i>Eucalyptus globulus</i>	5

Chapitre II: LES HUILES ESSENTIELLES

I.2. Historique.....	6
I.3. Définition.....	6
I.4. Localisation des huiles essentielles dans la plante.....	7
I.5. Rôle physiologique.....	8
I.6. Caractères physique.....	8
I.7. Composition chimique.....	9
I.7.1. Les terpènes.....	9
I.7.2. Classification des terpènes.....	9
I.7.3. Les phénols.....	10
I.7.3.1. Les flavonoïdes.....	10
I.7.3.2. Les tanins.....	10
I.8. Facteurs de variabilité de chimotype.....	11
I.8.1. Chimotype.....	11
I.8.2. Les facteurs intrinsèques.....	11
I.8.2.1. Le cycle végétatif.....	11
I.8.2.2. L'organe producteur.....	11
I.8.3. Les facteurs extrinsèques.....	11
I.8.3.1. facteur de l'environnement.....	11
I.8.3.2. Les transformations du matériel végétal.....	12
I.9. Procédés d'extraction des huiles essentielles.....	12
I.9.1. Distillation à l'eau ou "hydrodistillation".....	12
I.9.2. Entraînement à la vapeur d'eau.....	13
I.9.3. Distillation sèche.....	13
I.9.4. Expression à froid.....	13
I.9.5. Extraction par micro-ondes.....	14
I.10. Méthodes d'identification chimique des huiles essentielles.....	14

I.10.1. La chromatographie en phase gazeuse (CPG/DIF).....	15
I.10.2. La chromatographie gazeuse couplée à la spectroscopie de masse CPG/SM.....	15
I.10.3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à l'olfactométrie (CPG/O).....	16

Chapitre III. LES CHAMPIGNONS

II.1. Définition.....	17
II.2. Modes de vie.....	17
II.3. Classification des champignons.....	17
II.4. Identification morphologique.....	18
II.4.1. Critères d'identification macroscopique.....	18
II.4.2. Critères d'identification microscopique.....	19
II.5. Modes de reproduction.....	19
II.5.1. La reproduction sexuée.....	19
II.5.2. La reproduction végétative.....	19

Chapitre VI: LES ACTIVITES BIOLOGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES

III.1. L'activité antioxydante.....	20
III.1.1. Stress oxydant.....	20
III.1.2. Les radicaux libres.....	20
III.1.3. Les sources de production des radicaux libres.....	21
III.1.4. Les antioxydants.....	21
III.1.4.1. Les antioxydants endogènes.....	22
III.1.4.2. Les antioxydants exogènes.....	22
III.1.5. Mode d'action.....	23
III.1.6. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante.....	23
III.2. Activité antibactérienne.....	23
III.3. Activité antifongique.....	24
III.4. Activité antivirale.....	24
III.5. toxicité des huiles essentielles.....	25

Partie II : ETUDE EXPERIMENTAL

Chapitre I : Matériels et méthode

I.3. Zone de récolte.....	26
I.2. Extraction des huiles essentielles.....	26
I.3. Détermination de rendement d'extraction.....	27
I.4. Etude physique et chimique des HEs.....	27
I.4.1. La densité.....	28
I.4.2. Indice de réfraction.....	28
I.4.3. Miscibilité à l'éthanol.....	28
I.4.4. Le facteur pH.....	28
I.4.5. L'analyse chromatographique.....	28
I.3. L'activité antifongique.....	30
I.3.1. Culture des champignons dans l'infusoire.....	30
I.3.2. Purification des échantillons.....	30
I.3.3. Identification des souches de champignon.....	30

I.3.3.1. Etude des caractères macroscopique des champignons	31
I.3.3.3. Etude des caractères microscopiques	31
I.3.4. La méthode appliquée pour tester l'activité antifongique	31
I.4. Evaluation d'activité antioxydante de deux plantes	32
I.4.1. Méthode appliquée (DPPH)	32
I.4.2. Détermination du pourcentage d'inhibition	32
I.5. Dosage des Protéines totales	33
I.6. Dosage des lipides	33

Chapitre II : résultats et discussions

II.1. Le rendement	35
II.2. Caractère physique et chimique des HEs	35
II.3. La chromatographie des HEs	36
II.4. Teste de l'activité antifongique des deux H.Es	37
II.4.1. Identification des souches	37
II.4.2. Evaluation de L'activité antifongique	38
II.5. L'activité antioxydante des l'HEs	41
II.6. Le dosage de protéine	44
II.7. Le dosage des lipides	46

CONCLUSION GENERALE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNAXE

Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antioxydante et l'activité antifongique des huiles essentielles extraite de la partie aérienne d'*Artemisia herba alba* et *Eucalyptus globulus*, des plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle de l'Algérie. L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant les tests de DPPH. Dans un premier temps, les deux huiles essentielles sont obtenus par hydrodistillation, par un appareil de type Clavenger. Le rendement d'*Artemisia herba alba* et *Eucalyptus globulus* est 0.19% et 0.48% respectivement. L'analyse chromatographique montre une grande variabilité au niveau de la composition chimique. Par ailleurs, les deux extraits ont montré une très forte activité anti-radicalaire vis-à-vis du radical DPPH. De plus, l'effet antifongique des deux H.Es a été évalué par la méthode des puits, test de diffusion en milieu solide de cinq souches des champignons. Les résultats révèlent que les deux extraits ont exercé un effet antifongique considérable ; les souches testées sont classées comme sensible pour le *Rhizopus et Penicillomyces*, et peu sensible qui sont le *penicillium* I et II, et résistante dans le cas de l'*Alternaria*. Un test sur le taux de protéine total et de lipide des souches traitées par les H.Es révèle une très grande influence sur les protéines et ça confirme que les deux H.Es sont toxiques à des grandes doses. Et comme conclusion, les H.Es d'*Artemisia herba alba* et *Eucalyptus globulus* possèdent une excellente activité antioxydante et un effet antifongique considérable.

Mots clés: huile essentielle, *Artemisia herba alba*, *Eucalyptus globulus*, antioxydante, antifongique.

الملخص

كان الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المضاد للأكسدة والمضاد للفطريات الخاص بالزيوت الأساسية المستخلصة من الأجزاء الهوائية للشيح *Artemisia herba alba* والكاليتوس *Eucalyptus globulus* ، وهما من النباتات الطبية المستخدمة في الأدوية التقليدية في الجزائر. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة باستخدام اختبار DPPH. في البداية، تم استخلاص الزيوت الأساسية عن طريق التقطير بالبخار "hydrodistillation" ، باستعمال جهاز Clavenger. مردود نبتتي الشيح والكاليتوس كان 0.19% و 0.48% على التوالي. و أظهر التحليل الكروماتوغرافي ثراء التركيب الكيميائي للزيتين المستخلصين. علاوة على ذلك، أظهرت هذه الزيوت الأساسية قدرة كبيرة في مواجهة جذور DPPH. كما تم تقييم الأثر المضاد للفطريات الخاص بالمستخلصين عن طريق نشرها في علب بتري في وسط غذائي صلب و أجري التجربة على خمس سلالات من الفطريات. أظهرت النتائج أن كلا المستخلصين له تأثير ملحوظ مضاد للفطريات؛ وتم تصنيف السلالات المختبرة الى حساسة وهي *Penicelomyces* و *Rhizopus* ، و اقل حساسية *penicillium* I و II ، و حالة مقاومة هي *Alternaria* . وكشف الاختبار على معدل من البروتين والدهون للسلالات المعالجة بالزيوت الأساسية الأثر الكبير على البروتين وذلك يؤكد أن كلا الزيتين لديه مستوى من السمية في الجرعات العالية. و كاستخلاص لهذه الدراسة، الزيوت الأساسية لكل من *Artemisia herba alba*, *Eucalyptus globulus* ممتازة في ما يخص النشاط المضاد للأكسدة ولها تأثير مقبول مضاد للفطريات.

الكلمات المفاتيح: الزيوت الأساسية, مضادات الاكسدة, مضادات الفطريات, *Artemisia herba alba*, *Eucalyptus globulus*