

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

UNIVERSITE SAAD DAHLEB -BLIDA-1
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE



MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de **Master**

En : **Physico-chimie des milieux dispersés et des formulations**

Intitulé

***Elaboration d'une huile composée. Effet microbiologique,
anti-inflammatoire et antalgique.***

Préparé par

Abbou Fatima El Zahra

Soutenu publiquement le 08/12 /2015 devant le jury composé de :

Mr. Y. Bal	Professeur	USDB 1	Président
Mr. Laarbi Bouamrane	MAA	USDB1	Examineur
Mr. A. Ait Yahia	MAA	USDB 1	Directeur de Mémoire

Remerciement

En préambule à ce mémoire, je remercie ALLAH, le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Mes premiers remerciements vont à Mr AIT YAHYA, Maître assistante à l'université Blida 01, qui a dirigé ce travail. Son ouverture intellectuelle, sa disponibilité et sa passion qui m'ont permis de progresser et d'apprendre beaucoup en la côtoyant. J'espère que ce travail sera à la hauteur de ses espérances.

Je tiens tellement à remercier Mme HAMZA, pour tous les encouragements, les précieux conseils, la confiance, la patience que vous m'avez accordée ; et l'atmosphère favorable que vous avez créée autour de moi.

Mes sincères remerciements s'adressent à Mr. Y. BAL, professeur à l'université Blida 01, d'avoir accepté de présider le jury.

J'adresse mes vifs remerciements à Mr. B. BOUAMRAN, Maître assistante à l'université Blida 01, qui a bien accepté d'examiner ce travail et de participer au jury.

Je tiens aussi à remercier Mr. A. BOULAHOUACHE, Maître assistante à l'université Blida 01 et chef de département de chimie, pour ses précieux conseils durant ces années de formation.

J'aimerais bien remercier l'ensemble de l'équipe du laboratoire de chimie de la faculté des sciences USD Blida 01 pour leur accueil bienveillant et leur conseils avisés, et cela malgré leur emploi du temps chargé.

Je réserve une pensée spéciale à tous les enseignants du Chimie analytique qui ont su nous donner une formation appréciable durant mon cursus, et à la promotion PFE 2014/2015 pour la sagesse dont elle a fait preuve. Ce geste sera gravé à jamais dans notre mémoire

*Un grand merci au personnel de laboratoire de pharmacotoxicologie Mme.k,
AZINE. (Directrice de laboratoire) du centre de recherche et de développement
SAIDAL El Mohammedia pour leur présence constante ; travailler avec eux fut un
grand plaisir pour moi.*

*Je sais que j'oublie des gens. Mais un fait est certain. Bien que je demeure le
principal artisan de ce manuscrit, je ne peux pas ignorer que sa réalisation n'aurait
jamais été possible sans la contribution de nombreuses personnes. Je les remercie tous
et je souhaite que la lecture qui s'offre à leur curiosité leur procure la satisfaction
qu'ils espéraient.*

Dédicace

J'ai le grand plaisir de dédier le fruit de mes études à mes très chers parents, la lumière de ma vie, le symbole de tendresse et de sécurité, l'école de mon enfance pour vos mains qui tant travaillées, pour votre cœur qui m'atant donné, pour votre sourire qui m'atant réchauffé, pour vos yeux qui furent par fois mouillés, pour vous qui m'avez tant aimé. Que Dieu vous garde toujours en bonne santé.

À mes chères sœurs : Hind, Khadidja.

Et à mes chères frères : Ahmed, Nadjib, yahia.

Et je n'oublie jamais mes chères amies Soumia, Meriem et sa famille pour leur présence, son aide et son encouragement,

J'ai pu surmonter tous les obstacles.

Ma chère sœur Razika et sa famille

À mon fiancé qui M'a Encouragé et Que J'ai Rencontré Dans Ma Vie Et Être À Mes Côtés Dans Les Moments Les Plus Difficiles.

À mes oncles, tantes, cousins et cousines :

Vous avez, de près ou de loin, contribué à ma formation.

Affectueuse reconnaissance.

À mes ami(e)s d'enfance, mes camarades d'auditoires et ceux de la faculté des sciences de l'Université de Saad DAHLAB.

En reconnaissance de tous les sacrifices consentis par chacun de vous pour me permettre d'atteindre cette étape de ma vie. Avec tout mon respect

Fatima el Zahra

Sommaire

Remerciements	
Dédicaces	
Résumé	
Abstract	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale	01
Chapitre I : Les huiles essentielles	
I.1 Définition	02
I.2 Caractères physiques des huiles essentielles	03
I.3 Composition chimique	03
I.3.1. Terpènes	04
I.3.2. Composés aromatiques	04
I.3.3. Composés d'origine diverses	05
I.4 Notion de chémotype	06
I.5 Facteurs de variabilité	06
I.5.1 Influence du cycle végétatif	06
I.5.2 Influence des facteurs extrinsèques	06
I.5.3 Influence du procédé d'obtention	07
I.6 Conservation des huiles essentielles	07
I.7 Activités biologiques et utilisations	08
I.8 Propriétés thérapeutiques des huiles essentielles	09
I.8.1 Propriétés antiseptique	09
I.8.2 Propriétés anti-inflammatoire	09
I.8.3 Propriétés cicatrisante	09
I.8.4 Propriétés spasmolytique et sédatives	10

Sommaire

Chapitre II : La microencapsulation

II. Historique	11
II.1 Définition	11
II.2 Classification des microparticules.....	11
II.3 Techniques d'encapsulation	12
II.3.1 Les cyclodextrines.....	12
II.3.1.1 Définition	12
II.3.1.2 Structures des cyclodextrines.....	13
II.3.1.3 Caractéristiques physico-chimiques de l' α -, β - et γ - cyclodextrines.....	13
II.4 Complexes d'inclusion.....	14
II.4.1 Principe de formation du complexe d'inclusion.....	14
II.4.2 Les domaines d'applications des cyclodextrines.....	15
II.4.2.1 Domaine cosmétique.....	15
II.4.2.2 Domaine pharmaceutique.....	15
II.4.2.3 Domaine des huiles essentielles.....	16
II.5. Les Tensio-actifs	16
II.5.1. Définition.....	16
II.5.2. Classification chimique.....	17
II.5.2.1. Tensioactifs non ioniques.....	17
II.5.2.2. Tensioactifs anioniques.....	17
II.5.2.3. Tensioactifs cationiques.....	17
II.5.2.4. Tensioactifs amphotères.....	17
II.5.3. Propriétés.....	17
II.5.4. Exemple d'application des tensioactifs dans les huiles essentielle.....	18

Partie expérimentale

Chapitre III : Matériels Et Méthodes

III.A Lieux d'expérimentation.....	20
III.1 Matériel et produits.....	20
III.1.1 Réactifs chimiques et appareillage.....	20
III.2 Préparation de l'huile composée.....	21

Sommaire

III.2.1 Encapsulation de l'huile composée.....	22
III.2.1.1 Tensioactifs.....	22
III.2.1.1.1 Préparation des solutions de tensioactif.....	22
III.2.1.1.2 Traitement du mélange de composés volatile par les tensio-actifs.....	22
III.2.1.2 Cyclodextrine.....	23
III.2.1.2.1 Préparation des solutions de CD.....	23
III.2.1.2.2 Mode opératoire.....	23
III.2.2 Analyse de l'huile par chromatographie en phase gazeuse.....	24
III.3 Pouvoir antioxydant de l'huile composée et de ses constituants.....	25
III.3.1 La méthode de piégeage du radical DPPH.....	25
III.3.2 La méthode FRAP.....	29
III.3.3 La méthode de la β -carotène.....	30
III.4 Étude du pouvoir antimicrobien.....	30
III.4.1 Protocole expérimental.....	32
III.4.1.1 L'aromatogramme.....	32
III.4.1.4 Préparation des disques.....	33
III.4.1.5 Ensemencement.....	33
III.4.1.6 Dépôt des disques.....	33
III.4.1.7 Incubation.....	33
III.4.1.8 Lecture.....	33
III.5 Test d'activité anti-inflammatoire.....	34
III.5.1 Mode opératoire.....	34
III.5.2 Expression des résultats.....	34
III.6 Test d'activité antalgique.....	36
III.6.1 Mode opératoire.....	36
III.6.2 Expression des résultats.....	36

Chapitre IV: préparation et traitement de l'huile composée

IV Introduction.....	37
IV.1 Composition de l'huile composée.....	37
IV.2 Analyse de l'huile composée et son encapsulation.....	42

Sommaire

V. Résultats des activités biologiques.....	47
V.1 Activité antioxydante.....	47
V.1.1 Méthode de piégeage du radical DPPH.....	47
V.1.1.1 Principe.....	47
V.1.2 La méthode FRAP (Ferricreducingantioxidant power).....	57
V.1.2.1 Principe.....	57
V.1.3 Méthode de la β -carotène.....	59
V.1.3.1 Principe.....	59
V.2 Résultats de l'Activité antimicrobienne.....	59
V.2.1 Activité antibactérienne.....	61
V.2.2 Activité antifongique.....	62
V.3 Résultats de l'activité anti-inflammatoire in vivo.....	63
V.4 Résultats de l'activité antalgique.....	66
Conclusion générale.....	69
Références bibliographiques	
Annexes	

Résumé

Nous avons dans notre travail élaboré une huile composée, constituée de treize composés étalons, dont sept sont des carbures mono terpéniques (Limonène, α -pinène, β -pinène, P-cymène, Myrcène, Camphène, Ocimène), quatre des alcools mono terpéniques (Menthol, Linalol, Carvacrol, Thymol), une cétone monoterpéniques (Camphor) et un phénylpropène (Eugenyl acetate). Ceci nous a permis de contrôler la composition et la stabilité de notre huile au cours du temps de stockage.

Les chromatogrammes obtenus par GC de l'huile brute et de l'huile traité avec le SDS, montrent une variation de la composition chimique.

L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de piégeage du radical libre DPPH a montré que les produits phénoliques sont les plus actives. Mais leurs activités restent inférieures à ceux des antioxydants de références (BHT, BHA, vit C et guaiacol). L'activité du mélange par cette technique montre un effet synergique positif très important ($EC_{50} = 0.0019$ mg/ml).

Nous avons démontré que la bactérie *Escherichia coli* est extrêmement sensible à notre huile composée, avec une zone d'inhibition de 45 mm. De même, la levure *candida albicans* avec une zone d'inhibition de 52 mm.

Le test de Levy, appliqué à notre huile a montré un taux de réduction d'œdèmes de 81,80%. Cette dernière présente donc un effet anti-inflammatoire très important. Aussi, le pouvoir analgésique est assez appréciable par rapport au produit de référence puisque, l'huile induit un pourcentage de protection égale à 54,5%.

Abstract

We have in our work developed a compound oil, established by thirteen compound standards, among which seven are carbides mono terpenic (Limonene, α -pinene, β -pinene, P-cymene, Myrcene, Camphene, Ocimene), four of the mono terpenic alcohols (Menthol, Linalool, Carvacrol, Thymol), a mono terpenic ketone (Camphor) and a phenylpropene (Eugenyl acetate). This allowed us to control the composition and the stability of our oil in time of storage.

Chromatograms obtained by GC from the raw oil and from the oil treated with the SDS, show a variation of the chemical composition before and after. The evaluation of the antioxidizing activity by the method of trapping of the free radical DPPH showed that the phenolic products are the most active. But their activities remain lower than those of the reference antioxidants (BHT, BHA, vit C and guaiacol). The activity of the mixture by this technique shows a very important positive synergic effect ($EC_{50} = 0.0019$ mg / ml).

We demonstrated that the bacterium *Escherichia coli* are extremely sensitive to our compound oil, with a zone of 45 mm inhibition. Also, the yeast *albicans Candida* with a zone of 52 mm inhibition. The test of Levy, applied to our oil showed a rate of reduction of 81, 80 % oedemas. The latter thus presents a very important anti-inflammatory effect. Also, the analgesic power is rather considerable with regard to the leading product because, the oil leads a percentage of protection equal to 54, 5 %.

Liste des abréviations

Abs : Absorbance.

ATCC: American Type Collective Cultures.

Antioxydant : molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques (WOLFGANG, 2008).

Anti-radicalaire : substance qui intervient ou empêche certains phénomènes de vieillissement (POUSSET, 2004).

Anti-inflammatoire : ce dit d'un produit ayant la propriété de diminuer l'inflammation.

Analgésique : les analgésiques sont des médicaments utilisés en médecine, ayant pour but d'éliminer la douleur (GIRRE, 2006).

BHT : Butyle Hydroxyle Toluène.

BHA : Butyle Hydroxyle Anisol.

°C: degree celcus.

C: Concentration.

CTAB : bromure de cétyltriméthyl ammonium.

CMC: Concentration Micellaire critique.

CRD : Centre de recherche et de développement.

CD : Cyclodextrine.

Carraghénine : mucopolysaccharide sulfaté extrait d'une algue marine.

Crampe : contraction involontaire, douloureuse et transitoire d'un muscle ou d'un groupe musculaire.

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

Diclofenac : un médicament à effet anti-inflammatoire.

Fe³⁺ : Ion ferrique.

Fe²⁺ : Ion ferreux.

Fe(III)- TPTZ : Complexe tripyridyltriazine ferrique.

FeCl₃: Chlorure ferrique.

Liste des abréviations

FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power.

Gram + : Bactérie Gram-positive.

Gram - : Bactérie Gram-négative.

GC : Chromatographie.

HE : Huile Essentielle.

HC : Huile composée.

H : heure.

I% : Taux d'inhibition.

IC₅₀ : Concentration Inhibitrice de 50 %.

ISO : Organisation Internationale de normalisation.

Kg : kilogramme.

K₃Fe (CN) ₆ : Ferricyanure de potassium.

m : masse.

M : masse molaire.

min : minute.

mg : milligramme.

ml : millilitre.

Mm : millimètre.

Nm : nanomètre.

PH : Potentiel d'hydrogène.

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate.

TCA : L'acide Trichloroacétique.

TA : tensio-actif.

T : Température.

Tr pm : Tour par minute.

UV : ultra-violet.

Liste des abréviations

V : Volume.

ul : microlitre.

α : alpha.

β : beta.

δ : gamma.

% : pourcentage.

Liste des figures

Figure	Titre	Page
Partie bibliographique		
I-1	Structure d'un isoprène	3
I-2	Exemple de structures des composés aromatique rencontrées dans les HE	5
I-3	Exemple de quelques composées diverses rencontrée dans les HE	5
II-4	Structure des cyclodextrines	14
II-5	Exemple de formation du complexe d'inclusion	15
II-6	Schéma simplifié d'un tensioactif	17
II-7	Structure d'une micelle en solution aqueuse	18
partie expérimentale		
II-8	Mélange de composés volatils	22
II-9	schématisation de la méthode d'encapsulation de notre huile composée avec les TAs.	23
II-10	schématisation de la méthode d'encapsulation de notre huile composée avec les CDs.	27
II-11	Organigramme de la méthode FRAP	28
II-12	Illustration de la méthode d'Aromatogramme sur boîte pétrie	31
II-13	Illustration des différentes étapes de l'activité anti-inflammatoire	34
III-14	Les différentes étapes (A, B, C) de l'activité antalgique	35
IV-15	Chromatogramme de notre huile brute en (a) et l'huile traitée avec le SDS en (b) réalisé sur un appareil Hewlett Packard Agilent6890N	43
IV-16	Histogramme de la variation de l'abondance des composés dans l'huile brute et l'huile traité avec le SDS	45
V-I7	Réaction de réduction du DPPH en présence d'un antioxydant AH	48
V-18	variation de l'activité de piégeages du radical libre DPPH en fonction de la variation de la concentration des antioxydants de référence.	51
V-19	variation de l'activité de piégeages du radical libre DPPH en fonction de la variation de la concentration des différents composants de l'huile préparés.	52
V-20	structure chimique du thymol, carvacrol, p-cymene, menthol et limonène.	55
V-21	mécanisme d'action des antioxydants phénolique	5
V-22	structure chimique du guaiacol et l'eugénol acétate.	55

V-23	formes limites montrant la stabilité du radical phénoxy par le groupement méthoxy adjacents	56
V-24	structure chimique de l'ocimene, myrcene, linalol, β -pinène, et α – pinène	56
V-25	Histogrammes comparatifs de l'absorbance des composants de notre huile lors du test FRAP	58
V-26	Aromatogrammes des bactéries testées avec notre mélange de composés volatiles.	60
V-27	La moyenne des poids des pattes gauches et droites pour les trois lots.	64
V-28	Le pourcentage d'œdème et de réduction d'œdème pour les lots : témoin ; hessaie l et référence.	65
V-29	La moyenne des crampes chez les souris Témoin, Référence, Essai pendant 10 mn.	67

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Partie bibliographique		
II-1	Description de quelques terpènes	4
II-2	Procédés chimique, physico-chimique et physico mécanique des techniques d'encapsulation	12
II-3	Caractéristiques physico-chimiques des CDs (α , β -et γ)	14
Partie expérimentale		
III-4	réactifs chimiques et appareillages utilisés au cours de notre expérimentation.	20
III-5	masse de chaque composé pour la préparation de l'huile composée.	21
III-6	masses de tensioactifs utilisés pour la préparation des solutions de concentration une fois la CMC ou deux fois la CMC.	22
III-7	Masse des différentes cyclodextrines utilisées.	23
III-8	concentration de la solution mère, différentes concentrations et volumes des solutions testées de chaque échantillon.	24
III-9	Références, allures et pathologies des souches utilisées	
IV-10	Les éléments de l'huile composée, leurs familles, nom selon U.P.A.C., formules brutes et leurs formules chimiques ainsi que leurs températures de fusion et d'ébullition.	29
IV-11	Plantes dont les composants de notre huile sont majoritaires.	39
IV-12	Quelques propriétés biologiques des éléments de notre huile composée.	41
IV-13	Temps de rétention des composés de notre huile selon les conditions d'Adams.	44
IV-14	Variation de l'abondance des composés dans l'huile brute (%A) et l'huile traitée avec le SDS (%B).	45
V-15	Abondance à 517nm des solutions des composants de notre huile ainsi que l'huile lors du test de l'activité de piégeage du radical libre DPPH.	48
V-16	Abondance à 517nm des solutions des antioxydants de référence lors de l'activité de piégeages de radicale DPPH	50
V-17	Valeur de la concentration effective qui donne 50% de radicale DPPH des échantillons étudiés	53
V-18	masse des différents composants dans l'huile brute à la concentration d'EC50	57
V-19	Absorbances des constituants de notre huile lors du test de l'activité par la méthode FRAP à 700nm	58
V-20	Diamètres des zones d'inhibition des souches microbienne.	59
V-21	Résultats de l'activité anti-inflammatoire.	64
V-22	Activité antalgique, exprimée par le nombre de contractions en dix min	66

Introduction générale

Les huiles essentielles, ont toujours trouvé leur place en aromathérapie, en pharmacie, en parfumerie, en cosmétique et dans la conservation des aliments. Leur utilisation est liée à leurs larges spectres d'activités biologiques reconnues. Ce sont des mélanges naturels de composés volatiles très complexes. Elles sont constituées de composés terpéniques et de composés aromatiques dérivés du phénylpropane, qui ne sont pas stables et difficiles à conserver au cours du temps. Il serait alors intéressant d'encapsuler ces huiles ou une partie d'elles pour les préserver et/ou augmenter leur efficacité. Seulement, le développement d'un procédé d'encapsulation nécessite une composition fixe de cette huile. La composition de l'huile essentielle dépend de plusieurs paramètres (cycle végétatif, la température, L'humidité relative, la durée totale d'insolation et le régime des vents, procédé d'obtention...). C'est dans ce cadre que nous nous sommes intéressés à formuler une huile composée dont la reproduction donne une composition fixe.

Ce travail sera réparti en trois parties. La première partie sera consacrée à la recherche bibliographique. Elle sera subdivisée en deux chapitres, nous apporterons dans le premier des généralités sur les huiles essentielles. Dans le deuxième, nous donnerons un aperçu sur l'encapsulation.

La deuxième partie sera réservée au matériel et méthodes où nous donnerons une description des méthodes suivies, et des appareils et produits utilisés.

Dans la troisième partie nous exposerons l'ensemble des résultats obtenus, ainsi que les discussions et les interprétations proposées. Cette partie sera subdivisée en deux chapitres. Le premier comportera la formulation et l'encapsulation de l'huile composée. Dans le deuxième, nous discuterons les résultats de l'activité antioxydante de l'huile et de ces composants. Ainsi que l'activité antimicrobienne, anti-inflammatoire et anti-antalgique de notre huile.

À la fin, on terminera par une conclusion générale.

Partie bibliographique

I. Les huiles essentielles

I.1. Définition

la définition des huiles essentielles, selon la pharmacopée européenne [1], qui est très proche de celle de la norme ISO [2] est : « l'huile essentielle est un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition ».

Depuis sa 9^{ème} édition, la pharmacopée européenne n'utilise plus que le terme « huiles essentielles » pour désigner ces substances appelées aussi dans le langage courant par « essences naturelles », ou encore extraits aromatique de plantes. Le terme « huile » se rapportant au caractère visqueux et hydrophobe de ces substances, et le terme « essentielle » se comprenant comme étant la caractéristique principale de la plante.

Il existe différents types d'huiles essentielles :

- **Huile essentielle déterpénée** : C'est une huile essentielle partiellement ou totalement privée des hydrocarbures monoterpéniques
- **Huile essentielle déterpénée et désesquiterpénée** : C'est une huile essentielle partiellement ou totalement privée des hydrocarbures mono- et sesquiterpéniques
- **Huile essentielle rectifiée** : C'est une huile essentielle qui a subi une distillation fractionnée, dans le but de supprimer des composants toxiques ou intéressants.
- **Huile essentielle privée d'un composé « X »** : C'est une huile essentielle qui a subi une séparation partielle ou totale d'un composant « X », par un moyen physique (par exemple, la cristallisation ou la distillation). Ainsi, l'huile essentielle de menthe (*Mentha arvensis*) riche en menthol peut être partiellement démentholée, après un refroidissement entraînant la cristallisation, puis la filtration du menthol lévogyre. Ce dernier a de nombreuses applications. Des méthodes par extraction existent mais, dans ce cas, on parlera d'«extraits» et non d'huiles essentielles [3].

I.2. Caractères physiques des huiles essentielles :

Les huiles essentielles représentent un mélange de composés très varié et très complexe. Mais qui possèdent en commun un certain nombre de propriétés physiques [4]. Elles sont généralement liquides à la température ordinaire.

- Elles sont généralement incolores, âcres, inflammables et très odorantes.
- Elles sont dextrogyres ou lévogyres et rarement inactives sur la lumière polarisée.
- Elles sont volatiles et entraînaibles à la vapeur d'eau.
- Leur point d'ébullition varie de 160°C à 240°C et leur densité de 0,759 à 1,096.
- Elles sont insolubles dans l'eau.
- Elles sont solubles dans la plupart des solvants organiques tels que l'alcool et l'éther.

- Elles sont sensibles à l'oxydation et donc de conservation limitée.

I.3. Composition chimique

Ce sont des mélanges complexes et variables de constituants appartenant de façon quasi exclusive, à deux groupes : le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquent d'autre part [5].

I.3.1. Terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures résultant de la combinaison de plusieurs unités d'isoprène (C_5H_8) (Figure 1), et ont pour formule de base des multiples de celle-ci, c'est-à-dire $(C_5H_8)_n$.

Les terpénoïdes peuvent être considérés comme des terpènes modifiés avec des groupes méthyles ajoutés ou enlevés, ou des atomes d'oxygène ajoutés. Tout comme les terpènes, les terpénoïdes peuvent être classés selon leur nombre (n) d'unités isoprène. (La figure I-1) donne la formule chimique de l'isoprène. (Le tableau I-1) donne une description de quelque terpène qu'on trouve dans l'huile essentielle.

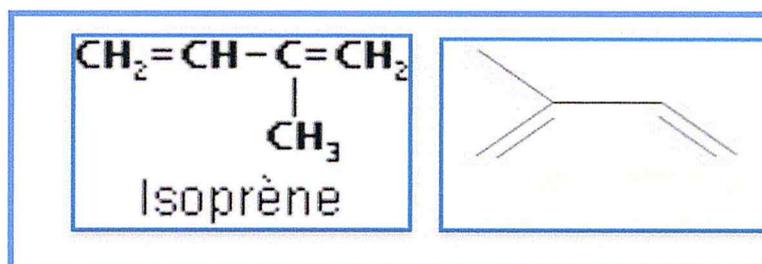
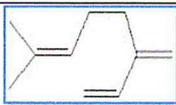
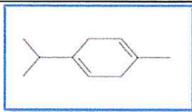
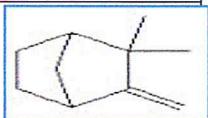
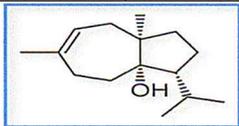
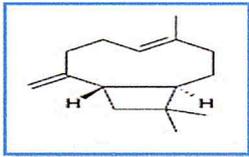
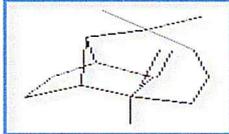


Figure I-1: structure d'un isoprène

Tableau I-1 : description de quelques terpènes.

nombre d'unités isoprène.	Description	Exemple
n = 2 monoterpènes	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.	Acyclique  Myrcène
		Monocyclique  γ-terpinène
		Bicyclique  Camphène
n = 3 sesquiterpènes	hydrocarbures en C ₁₅	 carotol  b-caryophyllène  Longifolène

I.3.2. Composés aromatique

Ce sont généralement des dérivés du phényl-propane (C6 - C3). Ils sont beaucoup moins fréquents que les précédents. Ce sont très souvent des allyles et Propényl phénol, parfois des aldéhydes [5]. La figure I- 2 donne quelque exemple de composés qu'on trouve dans l'huile essentielle.

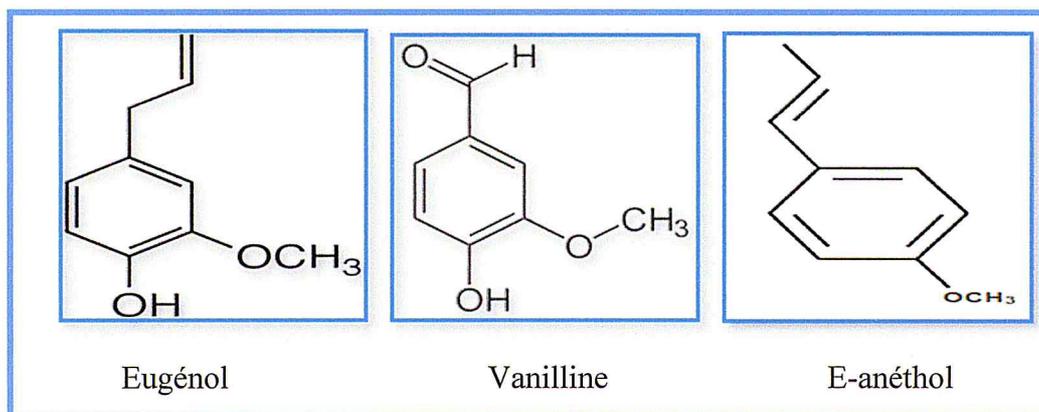


Figure I-2 : Exemple de structures des composés aromatique rencontrées dans les HE.

I.3.3. Composés d'origine diverses

Ce sont les produits qui résultent de la transformation de molécules non volatiles. Ces composés contribuent souvent aux arômes de fruits. Au cour de la préparation des huiles essentielles, certains composés aliphatiques, de faible masse moléculaire, sont entrainés lors de l'hydrodistillation (carbures, acides, alcools, aldéhydes, esters...) [5]. La figure I-3 donne quelques exemples de composés qu'on trouve dans l'huile essentielle.

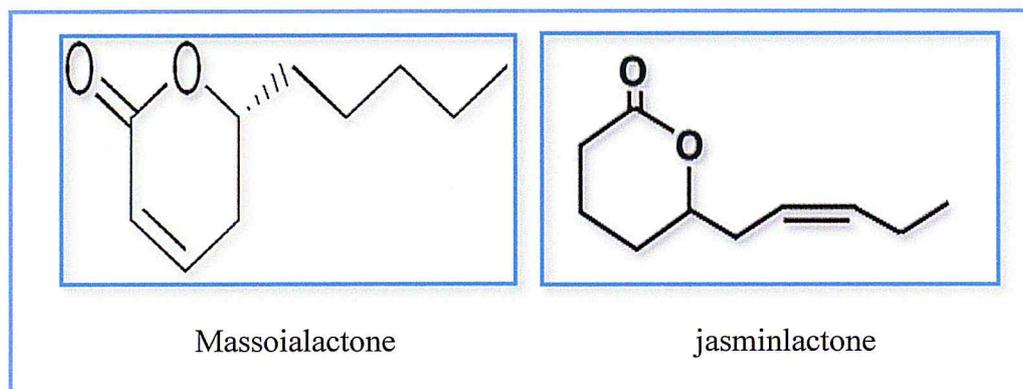


Figure I-3: Exemple de quelque composées diverses rencontré dans les HE.

I.4. Notion de chémotype

Un chémotype, ou encore race chimique, désigne une entité chimique distincte au sein d'une même espèce. Certaines espèces de plantes, de champignons ou de micro-organismes, présentent des variations chimiques de leur métabolite secondaires en fonction des influences de leurs écosystèmes (altitude, humidité, ensoleillement) [6]. Il est important de noter que des huiles essentielles à chémotypes différents, présenteront non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables. L'un des exemples les plus démonstratifs est celui du thym (*Thymus vulgaris* L.) de la Méditerranée occidentale. On compte pour cette espèce, morphologiquement homogène et caryologiquement stable, sept chimiotypes différents : six dans les garrigues de sud de la France (à thymol, à carvacrol, à géraniol, à linalol, à α -terpinéol, à trans-4-thuyanol et cis-8-myrcénol) et un, en Espagne, à cinéole. Un exemple, est celui du «bois d'Inde», *Pimenta racemosa* (Miller) J. Moore var, *racemosa* de Guadeloupe ; Il existe en trois chimiotypes: un type «girofle» riche (56%) en eugénol et chavicol, un type «citron» à géraniol et néral (40+ 30%) majoritaire et un type « anisé» dont l'huile essentielle renferme 48% de méthyleugénol et 32% d'estragole [7].

I.5. Facteurs de variabilité

Plusieurs facteurs influents sur la composition chimique des huiles essentielles on cite [8].

I.5.1. Influence du cycle végétatif

Pour une espèce donnée, la proportion des différents constituants d'une huile essentielle peut varier tout au long du développement. Ainsi, chez la menthe poivrée (*Mentha x piperita*), la diminution de la teneur en (-)-menthone observée au cours du cycle végétatif correspond à une réduction en(-)-menthol et en (+)- néomenthol : la teneur en (-)-menthol (libre et estérifié) augmente, celle en(+)-néomenthol n'augmente pas_ au contraire_ du fait de sa conversion en un dérivé hydrosoluble, le glucoside de (+)-néomenthyle. Des variations, parfois très importantes, sont couramment observées dans d'autres espèces : fenouil, carotte, coriandre (chez cette dernière la teneur en linalol est 50% plus élevée chez le fruit mûr que chez le fruit vert), etc.

I.5.2. Influence des facteurs extrinsèques

Il s'agit là de l'incidence des facteurs de l'environnement et des pratiques culturales. La température, L'humidité relative, la durée totale d'insolation et le régime des vents exercent une influence directe, surtout chez les espèces qui possèdent des structures histologiques de stockage superficielles (ex : poils sécréteurs des Lamiaceae). Lorsque la localisation est plus profonde la qualité est beaucoup plus constante. Chez la menthe poivrée, les jours longs et les nuits tempérées conduisent à des rendements en huile essentielle plus élevés et à une augmentation de la teneur en mentho furanne. Alors que, les nuits froides favorisent la formation de menthol.

I.5.3. Influence du procédé d'obtention

La labilité des constituants des huiles essentielles explique que la composition du produit obtenu par hydrodistillation soit, le plus souvent, différente de celle du mélange initialement présent dans les organes sécréteurs du végétal. Au cours de l'hydrodistillation l'eau, l'acidité et la température peuvent induire l'hydrolyse des esters mais Il est intéressant de remarquer que ce glucoside transporté au niveau du rhizome est hydrolysé et réoxydé en (-)-menthone. Cette cétone est oxydée en une lactone ce qui permet l'ouverture du cycle et l'initiation d'un processus du type β -oxydation. L'utilisation de lactone ^3H marquée montre que le carbone est réutilisé (formation d'acides gras et de phytostérols marqués). L'existence de ce catabolisme et de ce turn-over modifie radicalement la conception classique du monoterpène qui s'accumule, produit final d'un processus passif.

Un phénomène de même nature est connu chez la sauge (*Salvia officinalis*) : la diminution de la teneur en(+)-camphre qui est observé lorsque les feuilles ont atteint leur taille maximale correspond à la formation d'une lactone et à la solubilisation de celle-ci par glycoylation. Dégradation de l'hydrate de sabinène au cours de l'hydrodistillation illustre cette instabilité. Ce composé et son dérivé acétylé sont constituants largement dominants de l'essence obtenue par extraction au pentane après broyage, sous azote liquide, des sommités fleuries de la marjolaine (*Origanum majorana* L.). L'hydrodistillation des mêmes rameaux fournit un produit qui renferme, entre autres, une forte proportion de terpin-1-én-4-ol, accompagné de γ - et d' α -terpinènes : parallèlement, la teneur en acétate de cis-hydrate de sabinène devient négligeable. L'expérience conduite avec le cis-hydrate de sabinène et son acétate (synthétiques) montre que le simple reflux dans l'eau les décompose : en 30 minutes, il ne reste que 10% de l'acétate et 85% de l'alcool alors qu'apparaissent terpin-1-én-4-ol (majoritaire), γ - et α -terpinènes, p-cymène, limonène, terpinolène et α -terpinéol. On comprend mieux ainsi les variations importantes de composition que fait ressortir l'analyse de la bibliographie sur cette huile essentielle (pratiquement de 0 à 40% pour l'hydrate de sabinène et/ou le terpin-1-én-4-ol).

Parmi les facteurs qui influent sur la composition, l'incidence de l'état de la matière première : chez certaines Lamiacée, un stockage de 24 heures suffit pour induire des changements sensibles de composition _ lesquels peuvent d'ailleurs être souhaités. Il faut enfin signaler que la cinétique de distillation n'est pas la même pour tous les constituants d'une huile essentielle (carbures, alcools, cétones, etc.) : la composition du distillat varie en fonction du temps. On voit donc l'importance qu'il y a, pour assurer la qualité du produit et sa constante, à étudier, définir et contrôler l'ensemble des paramètres, de la culture à l'élaboration du produit final.

I.6. Conservation des huiles essentielles

L'instabilité des molécules constitutives des huiles essentielles rend leurs conservations difficiles, cette dégradation, peut être mesurée par :

- Mesure organoleptique : couleur, odeur,... [9].

- les indices (peroxyde, réfraction,...) ;
- la détermination des caractères physiques (viscosité, miscibilité à l'alcool, pouvoir rotatoire,...) ; et/ou par l'analyse chromatographique.

La présence des fonctions chimiques réactives, tels les terpènes peuvent facilement s'oxyder quand l'huile essentielle n'est pas bien stockée. Ces dégradations pouvant modifier les propriétés et/ou mettre en cause l'innocuité de l'huile essentielle, il convient de les éviter en conservant les huiles essentielles :

- À l'abri de l'humidité, en utilisant des flacons propres et secs ;
- À l'abri de la lumière, en aluminium vernissé, en acier inoxydable ou en verre teinté anti-actinique ;
- À l'abri de l'air, en remplissant entièrement le flacon et le fermés de façon étanche (l'espace libre étant rempli d'azote ou d'un autre gaz inerte) ;
- À l'abri de la chaleur, à froid, de préférence à + 4 °C [9,10].

I.7. Activités biologiques et utilisations

L'activité biologique d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et à leurs effets synergiques [11]. Les esters ont un effet relaxant et calmant sur le corps, les aldéhydes sont des composés organiques possèdent des propriétés calmantes et sédatives, les cétones aident à stimuler la régénération des cellules et à favoriser la formation de tissus, les terpènes qui peuvent inhiber l'accumulation des toxines dans le corps humain et ont des propriétés stimulantes, antibactériennes et sédatives, les oxydes ont une action légèrement stimulante, les acides et les alcools qui ont des propriétés antimicrobiennes, de plus les molécules de sesquiterpénoles possèdent des propriétés anti-inflammatoires et peuvent aider au bon fonctionnement du système immunitaire et les phénols qui sont parmi les composés les plus bénéfiques de tous les groupes aromatiques contiennent des niveaux élevés de molécules oxygénantes et possèdent de puissantes propriétés anti-oxydantes. [12].

Plusieurs travaux ont mis en évidence les différentes activités biologiques des plantes aromatiques et médicinales, en particulier leurs pouvoirs antifongiques [13, 14, 15] antibactériens [16, 17], antioxydants [18] et insecticides. [19, 20, 21].

Les composés possédant la plus grande efficacité antibactérienne et le plus large spectre sont des phénols : le thymol, le carvacrol et l'eugénol. Le carvacrol est le plus actif de tous : reconnu pour être non toxique, il est utilisé comme agent de conservation et comme arôme alimentaire dans les boissons, friandises et autres préparations. Le thymol est l'ingrédient actif des rince-bouches. L'eugénol est utilisé dans les produits cosmétiques, alimentaires et dentaires. Ces trois composés ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactérie. [22, 23].

Les alcools monoterpéniques viennent immédiatement après les phénols, en matière d'activités antibactériennes, les plus connus sont : le géraniol, le linalol, le thujanol, le myrcénol, le terpinéol, le menthol et le pipéritol.

Les aldéhydes monoterpéniques sont également quelque peu bactéricides, les plus couramment utilisés sont le néral, le géraniol, le citronellal et le cuminal [24]. Les

industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques sont très intéressées par les propriétés de ces composés d'autant plus qu'il s'agit d'aromatisants naturels. Beaucoup de chercheurs à travers le monde étudient leur potentiel en tant qu'agent de conservation [24].

I.8. Propriétés thérapeutiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont recommandées en usages antiseptiques, cicatrisants, digestifs, anti-inflammatoires et sédatifs. Elles sont utilisées par voie orale, par inhalation, ou en massages (mélangés à une huile végétale douce). [25].

Notons tout d'abord qu'il arrive à certains de confondre l'activité d'une huile essentielle avec celle de la plante dont elle est issue. L'huile essentielle de romarin est antibactérienne alors que l'infusé de la même espèce soit traditionnellement utilisée pour le traitement symptomatique de troubles digestifs divers, sur la base de propriétés antispasmodiques et cholérétiques peut être liées à la présence de composés phénoliques. Remarquons ensuite que si l'on étudie les effets biologiques et/ou pharmacologiques d'un monoterpène, d'un sesquiterpène ou d'un alkylbenzène pur, il est difficile de parler de pharmacologie, de pharmacocinétique ou de métabolisme d'une huile essentielle, c'est-à-dire d'un mélange. En troisième lieu, il convient de souligner que l'éventail des propriétés attribuées (et parfois expérimentalement démontrées) aux plantes à huiles essentielles et aux huiles essentielles elles-mêmes est trop larges pour permettre des généralisations simplificatrices, mais forcément réductionnistes.

I.8.1. Propriété antiseptique

Ce pouvoir antiseptique s'exerce à l'encontre des bactéries pathogènes variées, y compris des souches habituellement antibiorésistantes dont elles altèrent les structures et la fonctionnalité membranaires. Certaines huiles essentielles sont également actives sur des champignons responsables des mycoses et sur des levures (*Candida*). Sarriette, cannelle, thym, girofle, lavande, eucalyptus sont au nombre des huiles essentielles les plus antiseptiques. Des composés comme le linalol, le citral, le géraniol ou le thymol sont respectivement 5, 5, 2, 7, 1 et 20 fois plus antiseptiques que le phénol.

I.8.2. Propriété anti-inflammatoire

Les aldéhydes sont doués de propriétés actives contre les états inflammatoires. Ainsi, les huiles essentielles qui en sont riches, sont très utilisées par voie interne ou locale, dans les inflammations articulaires. [26].

I.8.3. Propriété cicatrisante

Les huiles essentielles employées contre les affections de la peau ont des propriétés cicatrisantes. Cette action est due à l'intensification de l'appel sanguin au niveau des tissus et à la stimulation de l'action régénérante des leucocytes. [26].

I.8.4. Propriétés spasmolytiques et sédatives

De très nombreuses plantes à huiles essentielles (menthe, verveine, etc.) sont réputées efficaces pour diminuer ou supprimer les spasmes gastro-intestinaux. Il est fréquent qu'elles stimulent la sécrétion gastrique d'où les qualificatifs de « digestives » et de « stomachiques » qui leur sont décernés. Avec toutes les conséquences qui peuvent découler de cette « eupepsie » : amélioration de certaines insomnies de troubles psychosomatiques divers, diminution de la « nervosité », etc.

In vitro, un grand nombre d'huiles essentielles (angélique, basilic, camomille, girofle, mélisse, menthe, thym) exercent une activité spasmolytique marquée sur l'iléon de cobaye isolé et, dans une moindre mesure, sur la trachée du même animal. D'après des travaux réalisés sur l'huile essentielle de menthe, il est possible que ce type d'activité soit lié à une inhibition de l'entrée du calcium dans les cellules.

II. Historique :

La première application industrielle de microparticules date des années 1950 quand Green et Schleicher ont encapsulé des particules de pigments dans des polymères naturels (protéine/gélatine et polysaccharide/gomme arabique) par coacervation complexe. Cette stratégie, utilisée pour la production de papier "carbone", permet la duplication d'un texte ou d'une figure sous l'effet d'une faible pression en encapsulant des colorants. [27].

Dans les années 1960, l'encapsulation de cristaux liquides par la gélatine et la gomme d'acacia pour la production de matériaux pour écrans thermosensibles a été décrite par Ferguson [28]. Cette méthode d'encapsulation a permis le développement des écrans à cristaux liquides utilisés pour les structures aérospatiales.

Au cours des dernières années, la microencapsulation s'est considérablement développée à l'échelle industrielle. Les microparticules ont des applications très variées, elles sont utilisées pour la production de textiles parfumés [29] et de produits cosmétiques, [30,31] pour la protection des récoltes agricoles [32,33], dans l'agroalimentaire pour donner de nouvelles propriétés aux aliments (encapsulation d'arômes, colorants, épices) [34], mais aussi dans les produits phytosanitaires [35, 36] et dans le domaine de la médecine et de la pharmacie. [37, 41].

II.1. Définition

La microencapsulation est une technique de protection de matières sensibles (à l'état solide, liquide ou gazeux) appelées aussi matières actives à l'aide d'une matière enrobante par formation de particules de taille micrométrique [34]. Ce procédé permet de créer une barrière de protection pour les molécules encapsulées et de contrôler leur relargage dans un milieu donné. Le contenu d'une capsule individualisée est protégé de l'environnement par la matière enrobante et peut-être libéré sous l'action de la température, d'enzymes, du changement de pH du milieu, de l'action mécanique ou simplement par la diffusion à travers la matière enrobante poreuse.

Les principales motivations pour l'encapsulation d'un matériau sont

- L'augmentation de la stabilité des ingrédients sensibles (protection de la matière encapsulée contre l'oxydation ou des effets de milieu ambiant tel que la chaleur, l'humidité ou le pH).
- La conversion des liquides en poudres fluides.
- Le masquage d'odeur, du goût ou d'activité des matériaux encapsulés.
- La diminution de la vitesse d'évaporation de la matière active volatile.
- La formulation des principes actifs utilisés en très petites quantités.
- La libération contrôlée ou ciblée de composants actifs.

II.2. Classification des microparticules

Le type de particules obtenues par microencapsulation dépend des propriétés physico-chimiques de la matière active et de la matière enrobante, de leur composition et de la

technique utilisée. Les microparticules peuvent se présenter sous différentes structures dont les deux plus simple est la structure réservoir (microcapsule) et la structure matricielle (microsphère). [42].

- La microcapsule est une particule réservoir constituée d'un cœur de matière active liquide ou solide entourée d'une enveloppe solide continue du matériau enrobant.
- La microsphère est constituée d'un réseau macromoléculaire continu, formant une matrice dans laquelle la matière active est finement dispersée, à l'état de fines particules solides ou encore de gouttelettes liquides. Ces deux types de morphologie de microparticules ainsi que quelques variantes plus complexes.

II.3. Techniques d'encapsulation

Les procédés de microencapsulation sont variés ; il existe plusieurs classifications de ces techniques [42]. Elles peuvent être classées selon l'utilisation ou non de solvants organiques, selon le coût énergétique des techniques ou encore selon leur application dans un domaine ou un autre. La classification la plus courante des techniques d'encapsulation est indiquée dans le (tableau II- 2).

Tableau II-2: procédés chimique, physico-chimique et physico-mécaniques des techniques d'encapsulation.

Procédés chimiques	Procédés physico-chimiques	Procédés physico-mécaniques
Polymérisation interfaciale	coacervation (simple ou complexe)	Atomisation
polymérisation en milieu dispersé	évaporation-extraction de solvant	Gélification ou congélation de gouttes
Polymérisation radicalaire ou anionique	Gélification thermique	enrobage en lit fluidisé extrusion procédé basé sur la technologie des fluides supercritiques

Il existe d'autres méthodes d'encapsulation qui ont une grande importance dans le domaine cosmétique, pharmaceutique et alimentaire qui utilisent les cyclodextrines et les tensio-actifs.

II.3.1. Les cyclodextrines

II.3.1.1. Définition

Les cyclodextrines (CD) sont des molécules-cage d'origine naturelle utilisées pour le piégeage et l'encapsulation des composés odorants pour augmenter leur stabilité, leur durée de vie où masquer leurs effets indésirables. Ces composés sont employés dans plusieurs domaines et plus particulièrement dans l'agroalimentaire et le cosmétique. Ces applications reposent sur

la capacité des CD à former des complexes d'inclusion avec la plupart des substances organiques présentes dans les huiles essentielles (adéquante entre la taille de sa cavité et des molécules à piéger). [43].

La microencapsulation par les cyclodextrines est une méthode qui suit le principe d'encapsulation par coacervation simple.

II.3.1.2. Structure des cyclodextrines

Les cyclodextrines forment une famille de macromolécules composées de 6 à 12 unités de D-glucose liées par liaison entre le carbone en position 4 d'une unité et le carbone en position 1 d'une autre unité comme c'est présenté sur le schéma de la figure II-4.

Elles sont formées par dégradation enzymatique de l'amidon. Les unités de D-glucose forment un macrocycle. On peut le représenter sous la forme d'un cylindre creux.

Les groupements hydroxyle (hydrophile) sont situés vers l'extérieur et les hydrogènes (hydrophobe) sont orientés vers l'intérieur de la cavité donnant ainsi à la cyclodextrine la propriété d'être soluble dans l'eau et de pouvoir contenir des molécules hydrophobes. [43].

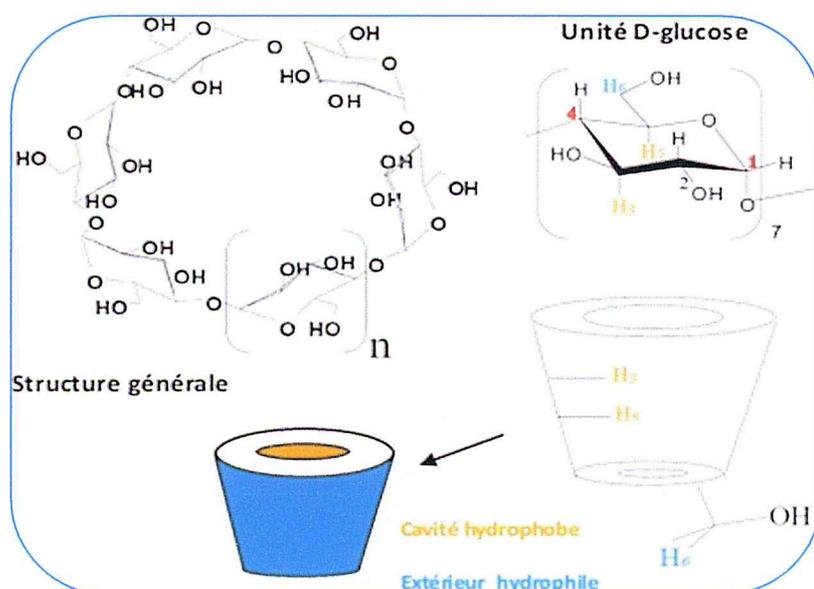


Figure II-4: Structure des cyclodextrines.

II.3.1.3. Caractéristiques physico-chimiques de l' α -, β - et γ - cyclodextrines

Rappelons que ces macrocycles se présentent sous la forme d'un cône tronqué dont la surface externe est hydrophile et la surface interne hydrophobe. La nomenclature des cyclodextrines distingue une face primaire (la plus étroite) où l'on trouve les fonctions alcools primaires en position 6, et une face secondaire (la plus large) où l'on trouve les fonctions alcools secondaires en position 2 et 3.

Dans le tableau suivant sont répertoriées les principales caractéristiques de ces composés. [44].

Tableau II-3: Caractéristiques physico-chimiques des CDs (α , β -et γ).

	α -cyclodextrine	β -cyclodextrine	γ -cyclodextrine
Nombre d'unités glycosidique	6	7	8
Masse molaire (g/mol)	972	1135	1297
Solubilité dans l'eau (g/L)	145	18.5	232
Diamètre de la cavité (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Hauteur du cône(Å)	7.9±0.1	7.9±0.1	7.9±0.1
Diamètre extérieur(Å)	14.6±0.4	15.4±0.4	17.5±0.4
Volume de la cavité(Å³)	174	262	427
Molécules formant des complexes d'inclusions avec la cyclodextrine	Petites molécules hydrocarbures linéaires	Cycles benzéniques adamantanes...	Polycycles aromatique

La solubilité des cyclodextrines dans l'eau est relativement élevée, exceptée pour la β -CD. Dans ce cas, une fonction hydroxyle portée par le C2 d'une unité glucopyranose peut former une liaison hydrogène avec la fonction hydroxyle portée par le C3 de l'unité voisine. Dans une β -CD, ces liaisons H forment une ceinture à la périphérie de la face secondaire, ce qui lui confère une certaine rigidité. Ceci explique aussi la moins bonne solubilité de cette cyclodextrine dans l'eau par rapport aux autres. En effet, dans l' α - et la γ -cyclodextrine, les liaisons hydrogènes ne se font pas toutes sur la face secondaire. Il reste donc des fonctions hydroxyles libres pour interagir avec les molécules d'eau. Par conséquent, ces deux cyclodextrines sont moins rigides mais plus solubles dans l'eau. [45].

II.4. Complexes d'inclusion

II.4.1. Principe de formation du complexe d'inclusion

Le principe d'inclusion d'un invité dans la cavité moléculaire de la cyclodextrine est basé sur le gain énergétique réalisé par le système hôte invité lors du processus. En effet, en solution aqueuse, la cavité légèrement apolaire de la cyclodextrine est occupée par des molécules d'eau qui engendrent des interactions énergétiques défavorables du type polaire/apolaire. [46].

Ces molécules d'eau pourront donc être facilement substituées par une "molécule invitée" appropriée, moins polaire que l'eau. [47].

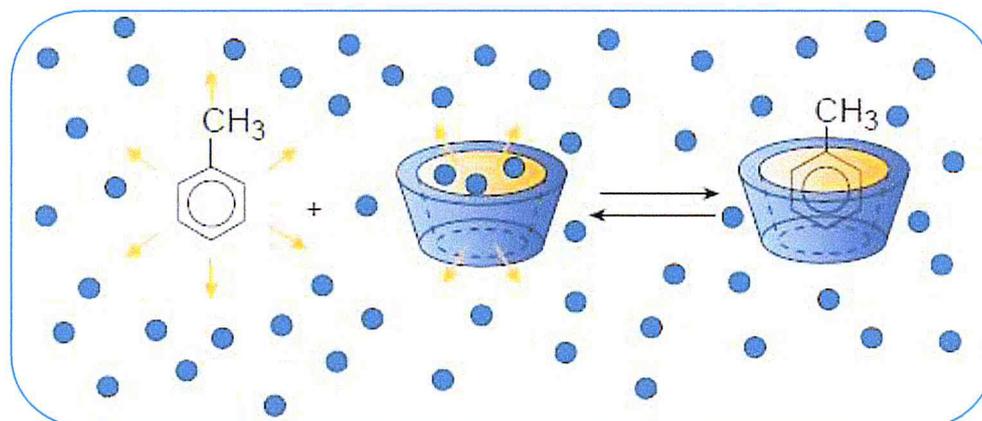


Figure II-5: Exemple de formation du complexe d'inclusion. [48].

La complexation n'est pas permanente, l'association et la dissociation du complexe formé entre la cyclodextrine et l'invité sont alors gouvernées par l'équilibre thermodynamique [49]. Suivant, dans le cas d'une complexation entre une molécule de cyclodextrine et une molécule invitée. [50].

II.4.2. Les domaines d'applications des cyclodextrines

II.4.2.1. Domaine cosmétique

Les CDs ont été largement utilisés récemment dans l'encapsulation moléculaire des agents cosmétiques actifs. Elles apparaissent aujourd'hui dans de nombreuses formulations de produits cosmétiques, y compris les crèmes, lotions, shampooings, dentifrices, et parfums [50]. Les principaux objectifs et avantages de l'utilisation de CDs dans la formulation des produits cosmétiques peuvent être résumés comme suit [51] :

- Amélioration de la stabilité physique et chimique des molécules hôtes.
- Augmentation ou diminution de l'absorption cutanée de plusieurs composés.
- Augmentation ou diminution des irritations de la peau.
- Réduction ou élimination des odeurs corporelles indésirables.
- Matériaux à libération prolongée pour parfums cosmétiques.
- Création ou augmentation de la stabilisation des émulsions et les suspensions.
- Inhibition de la formation de mousse avec des agents tensioactifs.
- Masquage ou réduction du goût et des odeurs indésirables.
- Prévention des interactions entre les composés dans une formulation.
- Réduction de l'hygroscopicité.

II.4.2.2. Domaine Pharmaceutique :

Les cyclodextrines sont des molécules intéressantes pour la formulation de médicaments [52]. Les principales applications de ces excipients résident dans leur capacité à solubiliser des substances actives peu solubles [53] en milieu aqueux et à améliorer potentiellement la biodisponibilité de molécules hydrophobes [54]. Elles permettent parfois d'augmenter la

stabilité, de diminuer la perception du mauvais goût, voire les effets indésirables de certains principes actifs [55]. De nombreux complexes à base de cyclodextrine ont été étudiés en solution ou à l'état solide [55] pour être délivrés par différentes voies d'administration [56].

II.4.2.3. Domaine des huiles essentielles

Dans le but d'augmenter la solubilité et la dissolution de composants insolubles dans l'eau en utilisant les cyclodextrines, des études récentes [57], on put caractériser le complexe d'inclusion du Carvacrol avec l'hydroxypropyl-beta-cyclodextrine (HPBCD) et comparer l'activité antimicrobienne et antioxydante du carvacrol sous sa forme complexée à celle libre dans l'huile essentielle correspondante. Le complexe Carvacrol -HPBCD présente une activité antimicrobienne plus élevée que le carvacrol libre pour les deux bactéries, *Escherichia coli* et *Salmonella enterica*. Ainsi, la HPBCD augmente la solubilité dans l'eau du carvacrol sous sa forme complexée, par conséquent le contact entre le carvacrol et la bactérie augmente. Toutefois, l'activité antioxydante relevée été plus basse pour le complexe d'inclusion. Ceci, indique que la HPBCD rend le carvacrol moins accessible pour réagir avec le radical libre.

L'étude de la stabilité du complexe indique que ce dernier ne subit pas de dégradation, et que les microparticules ont été stables. Donc le complexe carvacrol-HPBCD peut avoir une importante application dans l'industrie alimentaire comme un système antimicrobien. [58,59].

II.5. Les Tensio-actifs

II.5.1. Définition

Les tensioactifs ou agents de surface sont des molécules d'origine naturelle ou synthétique possédant d'une part une chaîne à caractère lipophile (ou queue hydrophobe) et d'autre part un groupement à caractère hydrophile (aussi appelé tête polaire) comme illustré sur la figure II-6. Ces composés sont dits amphiphiles [60].

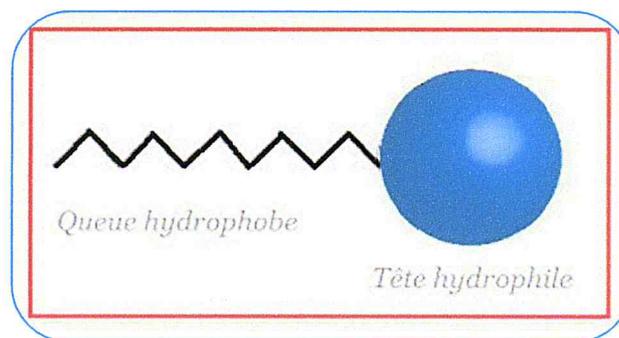


Figure II-6 : Schéma simplifié d'un tensioactif.

Les tensioactifs sont des composés qui diminuent la tension superficielle d'un liquide, la tension interfaciale entre deux liquides ou celle entre un liquide et un solide.

II.5.2. Classification chimique

On distingue quatre types de tensioactifs suivant la nature de la partie hydrophile : non ioniques, anioniques, cationiques et amphotères [61].

II.5.2.1. Tensioactifs non ioniques

Les tensioactifs non ioniques ne comportent aucune charge nette. Ils ne donnent aucun ion en solution aqueuse. Leur caractère hydrophile provient de la présence, dans leur molécule, de groupements polaires de type éther, alcool, carbonyle ou amine.

II.5.2.2. Tensioactifs anioniques

Les tensioactifs anioniques possèdent un ou plusieurs groupes fonctionnels s'ionisant en phase aqueuse pour donner des ions chargés négativement.

II.5.2.3. Tensioactifs cationiques

Les tensioactifs cationiques possèdent un ou plusieurs groupements s'ionisant en solution aqueuse pour donner des ions tensioactifs chargés positivement. Les plus répandus sont les dérivés des amines quaternaires aliphatiques.

II.5.2.4. Tensioactifs amphotères

Les tensioactifs amphotères contiennent à la fois des groupements acides et basiques. En conséquence, suivant le pH du milieu où ils se trouvent, ils libèrent un ion positif ou un ion négatif.

II.5.3. Propriétés

Dans la phase aqueuse, les tensioactifs forment des agrégats, tels que des micelles, où les queues hydrophobes forment le cœur de l'agrégat et les têtes hydrophiles sont en contact avec le liquide environnant. Des micelles sphériques (figure II-7) ou cylindriques ou des bicouches peuvent être formées.

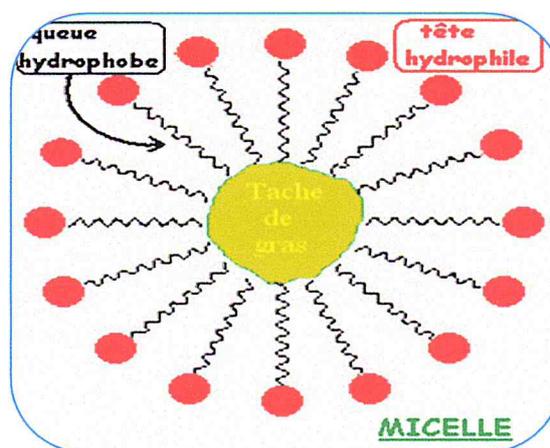


Figure II- 7: Structure d'une micelle en solution aqueuse.

La forme des agrégats dépend de la structure chimique des tensioactifs qui est elle-même fonction de l'équilibre existant entre la partie hydrophobe et la partie hydrophile. Cet équilibre peut être décrit par la balance hydrophile-lipophile (HLB) du tensioactif. Il existe différentes façons d'exprimer la valeur HLB. L'une d'entre elles classe les tensioactifs dans des valeurs allant de 0 à 40. Plus la valeur est élevée, plus la solubilité dans l'eau est grande. Il existe des tables de HLB pour différents groupes classiques. Si la HLB est inférieure à 6, le tensioactif aura un caractère hydrophobe et donnera préférentiellement des émulsions inverses (eau dans huile, E/H) ; si la HLB est supérieure à 10, le tensioactif aura un caractère hydrophile et donnera préférentiellement des émulsions directes (huile dans eau, H/E).

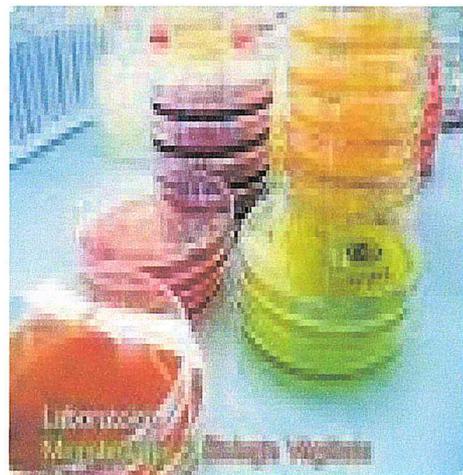
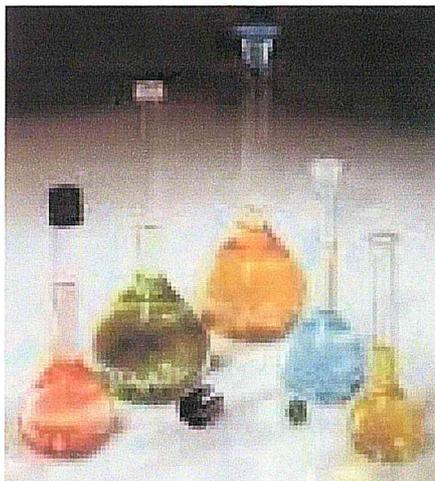
Les tensioactifs peuvent également augmenter la solubilité de certaines matières organiques pratiquement insolubles dans l'eau. Ce phénomène, appelé solubilisation, est dû à l'incorporation de ces matières organiques dans les micelles des tensioactifs tel qu'illustré sur la figure n°2. La formation de ces micelles n'intervient qu'à partir d'une certaine concentration en tensioactifs, elle est appelée concentration micellaire critique ou CMC. [62].

II.5.4. Exemple d'application des tensioactifs dans les huiles essentielle

- L'encapsulation de l'huile essentielle de citronnelle systématique, par coacervation de la gélatine et la gomme arabique. A permis la conservation des œuvres d'art d'une bibliothèque contre les fongiques. Car généralement les produits efficaces sont néfastes par les supports et /ou l'environnement immédiat de l'œuvre ou du livre à protéger. [63].
- La réalisation d'une microémulsion limpide et stable à partir de matières lipophiles liquides d'origine végétale notamment d'huiles essentielles utilise un agent solubilisant écologiquement optimiser constitué d'un mélange entre une huile végétale éthoxylée et au moins un tensioactif supplémentaire comprenant un tensioactif anionique dérivé d'une autre huile végétale et/ou un Co-tensioactif non ionique. Cette microémulsion permet de garder les propriétés actives d'origine des huiles essentielles en ajoutant des propriétés spécifiques propres provenant de l'agent solubilisant ou du mélange de celui-ci avec les matières lipophiles végétales. Applications: toutes les applications des huiles essentielles et celles conférées par l'ajout des tensioactifs spécifiques. [64].

Partie Experimentale

Matériel et Méthodes



III.A Lieux d'expérimentation

Notre travail expérimental a été réalisé au niveau des structures scientifiques suivantes :

- laboratoire physico-chimique de l'université de Saad Dahlab Blida pour la préparation de mélange de composés volatils.
- laboratoire de recherche sur les produits bioactifs et valorisation de la biomasse pour l'évaluation de l'activité antioxydants.
- laboratoire d'hygiène et de contrôle alimentaire de la wilaya de Blida. Pour l'étude de l'activité antimicrobienne.
- laboratoire pharmaco-toxicologique du centre de recherche et développement C.R.D groupe SAIDAL (El-Mohammadia, Alger) pour l'étude des activités: anti-inflammatoire et antalgique.

III.1 Matériel et produits

III.1.1 Réactifs chimiques et appareillage

L'ensemble des réactifs chimiques utilisés au cours de notre expérimentation sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau III-4 : réactifs chimiques et appareillages utilisés au cours de notre expérimentation.

	Réactifs chimiques :	Appareillages :
Préparation de l'huile composée	Carvacrol, thymol, linalol, limonène, ocimène, myrcene, α -pinène, β -pinène, eugenyl acétate, p-cymene, menthol, camphene, camphor	Balance analytique, Béchers, pipettes, micropipette, Tubes à essais,
Encapsulation de l'huile composée par les Tensioactifs	SDS, CTAB, Na_2SO_4 , Heptane, eau distillé	Tubes à essais, portoirs, pipettes pasteur, micropipettes, micro seringues, vortex, centrifugeuse.
L'encapsulation de l'huile composée par les Cyclodextrine	α -cyclodextrine, β -cyclodextrine, γ -cyclodextrine, 2HP cyclodextrine, heptane, eau distillé, Na_2SO_4	Tubes à essais, portoirs, pipettes pasteur, micropipettes, micro seringues, vortex, centrifugeuse.

l'activité antioxydante	La méthode du DPPH :	Éthanol, le DPPH, eau distillé La b-carotène, tween 40, chloroforme, acide linoléique, éthanol KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , TCA, FeCl ₃ , K ₃ Fe(CN) ₆	spectrophotomètre UV-Visible, vortex, agitateur magnétique centrifugeuse,
	La méthode de b-carotène :		
	La méthode FRAP :		
Activité antimicrobienne		Milieu de culture : Miller Hinton et sabouraud, Tween 80.	Autoclave, étuve, bec benzen, boîtes pétri, disques vierge.
Activité anti-inflammatoire		Carraghénine à 1%, eau physiologique, Déclofénac	Seringue, Balance analytique, Balance pour animaux
Activité antalgique		Acide acétique à 1%, eau physiologique	Seringue

III.2 Préparation de l'huile composée

Pour la préparation de notre huile composée, nous avons mélangé 13 composés avec des quantités équimolaires à raison de $4 \cdot 10^{-2}$ mol/l dans 250 ml d'heptane. La masse prise pour chaque composé est donné dans le tableau III-5

Tableau III-5 : masse de chaque composé pour la préparation de l'huile composée.

composés	M g /mol	m en g
camphor	152.23	1.62
carvacrol	150.22	1.52
Thymol	150.23	1.52
limonene	136.24	1.46
menthol	156.27	1.59
β -pinène	136.23	1.38
α -pinène	136.23	1.39
Myrcène	136.23	1.12
Ocimène	136.23	1.51
Linalol	154.25	1.60
p-cymene	134.22	1.35
camphène	136.23	1.34
eugenyl acetate	206.24	2.11



Figure III-8 : mélange de composés volatils.

III.2.1 Encapsulation de l'huile composée

L'encapsulation de notre huile composée est réalisée par deux méthodes, en utilisant soit les tensioactifs, soit les cyclodextrines.

III.2.1.1 Tensioactifs

III.2.1.1.1 Préparation des solutions de tensioactif

Dans notre étude on a travaillé avec deux types de tensioactif le SDS et le CTAB. La concentration des solutions des tensioactifs utilisée est égale à la CMC de chaque TA ou deux fois la CMC. Les peser réaliser pour préparer ces solutions est représentés dans le tableau suivant :

Tableau III-6 : masses de tensioactif utilisés pour la préparation des solutions de concentration une fois la CMC ou deux fois la CMC.

	SDS (mg)	CTAB (mg)
1 CMC	115.3	16.7647
2 CMC	230.6	33.5294

III.2.1.1.2 Traitement du mélange de composés volatile par les tensio-actifs

À 5ml de l'huile composée on ajoute 10ml de la solution de TA, ce mélange est mis sous agitation pendant 5 min sur le vortex. Une décantation de 24h suivie d'une centrifugation nous permet de récupérer la phase supérieure. Cette phase sera séchée avec du MgSO₄ puis conservé à froid et à l'abri de la lumière pour une analyse par GC. L'organigramme suivant résume toutes ces étapes:

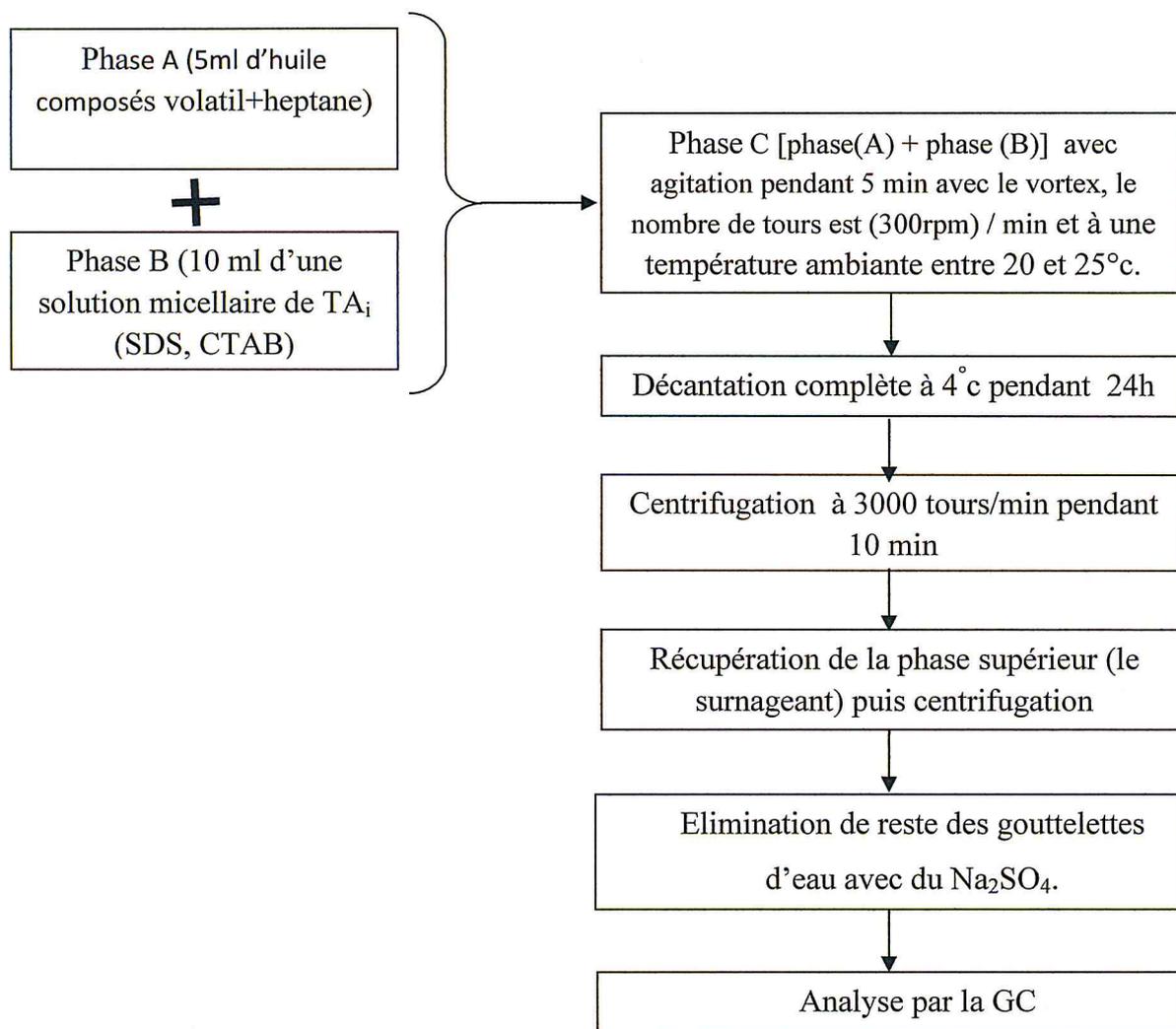


Figure III-9 : schématisation de la méthode d'encapsulation de notre huile composée avec les TAs.

III.2.1.2 Cyclodextrine

III.2.1.2.1 Préparation des solutions de CD

Dans notre étude on a travaillé avec 3 dérivés de CD : le α -CD, β -CD, 2H(P)- β -CD. Dans le but de préparer des mélanges équimolaires entre la solution de CD et celle de chaque Composant de l'huile composé, nous avons utilisé l'eau comme solvant pour ces solutions.

Tableau III-7 : masses des différentes cyclodextrines utilisées.

	α -CD (g)	β -CD (g)	2H(P)- β -CD (g)
1-1 CD mg/1ml	0,25	0,297	0,31

III.2.1.2.2 Mode opératoire

À 5ml d'une solution de 5 μ l de l'huile composée dans l'heptane, on ajoute 18ml de la solution de cyclodextrine, ce mélange est mis sous agitation pendant 5 min sur le vortex. Une

décantation de 24h suivie d'une centrifugation nous permet de récupérer la phase supérieure. Cette phase sera séchée avec du $MgSO_4$ puis conservé à froid et à l'abri de la lumière pour une analyse par GC. L'organigramme suivant résume toutes ces étapes:

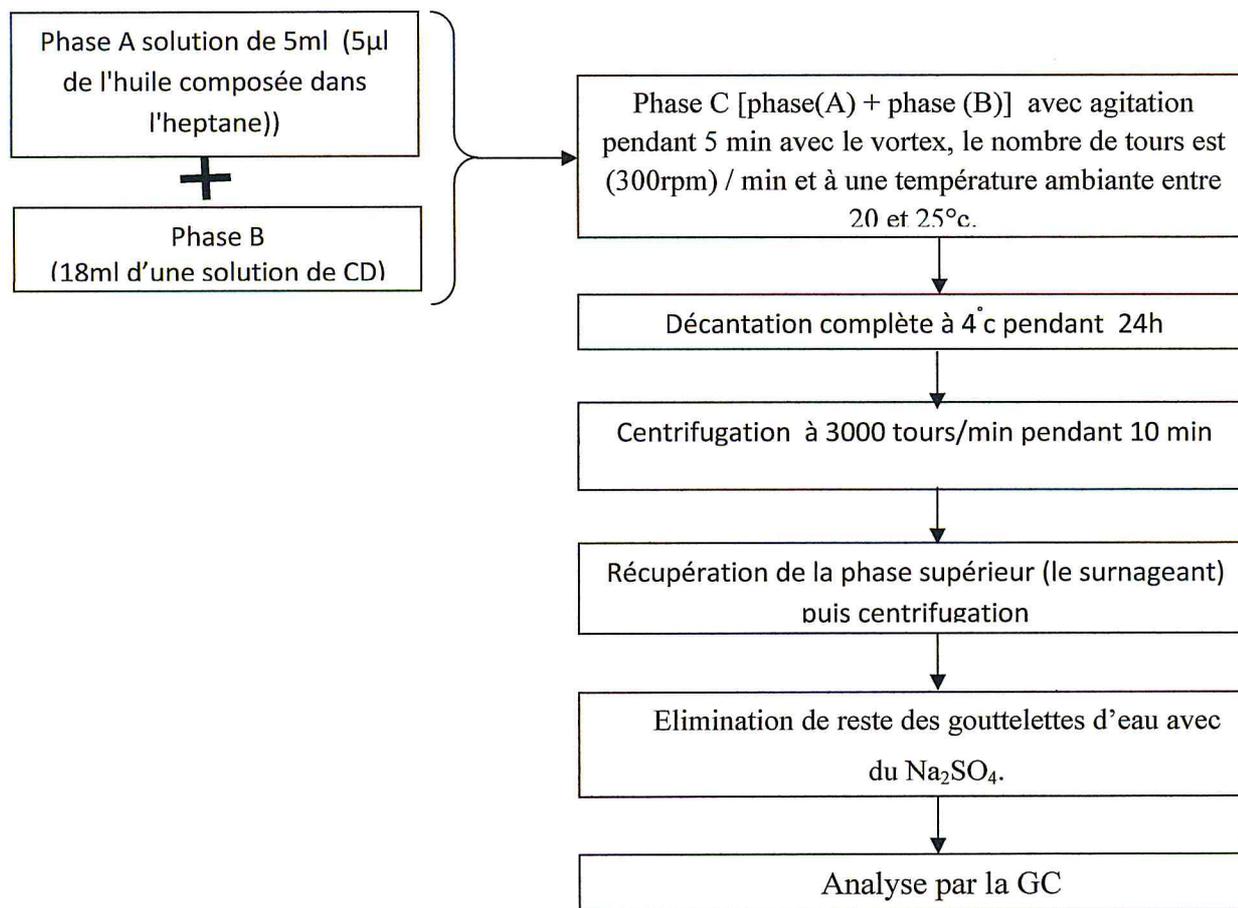


Figure III-10 : schématisation de la méthode d'encapsulation de notre huile composée avec les CDs.

III.2.2 Analyse de l'huile par chromatographie en phase gazeuse

Cette analyse a été faite au laboratoire de chromatographie au niveau du laboratoire d'analyses et d'instrumentation de la faculté des sciences et de technologie de l'USDB-1 selon les conditions opératoires suivantes :

CPG : Hewlett Packard Agilent6890N

Les conditions de chromatographie sont les suivantes :

- Injection de 0,2 µl en mode Splitless pendant 30 sec.
- Température de l'injection : 250°C.
- Colonne capillaire apolaire SE30 (25m × 0,25 mm × 0,25 µm).
- Programmation de température : 55°C pendant 2 min ; 8°C/min jusqu'à 250°C pendant 30min.
- Débit du gaz vecteur : azote (5ml / min) avec une pression de 25MP.
- La surface minimale 1000.

III.3 Pouvoir antioxydant de l'huile composée et de ses constituants

Le pouvoir antioxydant de notre huile composé et de chaque composé de cette huile a été testé par trois méthodes : la méthode de piégeage du radical libre 2, 2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), la méthode de blanchiment de la β -carotène et la méthode de réduction de fer ferrique (FRAP).

III.3.1 La méthode de piégeage du radical DPPH

La mesure de l'activité anti radicalaire a été testée selon la méthode de BLOIS [65]. Le radical libre DPPH (2, 2- diphenyl-1-picrylhydrazyl) sont solubilisés dans l'éthanol absolu à une concentration de 4 mg de DPPH dans 100 ml d'éthanol. Les solutions de nos échantillons sont préparées à des concentrations qui nous permettront d'évaluer l'EC50. Ces intervalles de concentrations ont été déterminés grâce à des tests préliminaires effectués sur chaque échantillon. En parallèle, des solutions des antioxydants de synthèse : vitamine C, hydroxytoluène butylé (BHT) et hydroxyanisole butyle (BHA) ont été préparées avec des concentrations de 0,2mg/ml. Les concentrations ainsi que les volumes de chaque échantillon sont donné dans le tableau III-8.

Dans des tubes secs, on introduit différents volumes de chaque échantillon à tester et on complète à 1ml avec de l'éthanol, on ajoute 1ml de la solution de DPPH, après agitation à l'aide d'un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité, à température ambiante (25°C) pendant 30 min. Le test est répété 3 fois. La lecture est effectuée par la mesure d'absorbance à 517nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible, en utilisant des cuves en quartz. L'activité est mesurée par la relation suivante :

$$\% \text{ activité} = (\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{test}}) / \text{Abs}_{\text{control}} * 100$$

Soit :

Abs_{control} : Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm de la solution éthanol + DPPH.

Abs_{test} : Absorbance à 517 nm de chaque échantillon

Tableau III-8: concentration de la solution mère, différentes concentrations et volumes des solutions testées de chaque échantillon.

composés	SM (mg /ml)	V (ul)	C (mg /ml)
Linalol	500mg/ml	0	0
		20	5
		50	12,5
		100	25
		150	37,5
		200	50
		300	75
		400	100
		500	125
Ociméne	500mg/ml	0	0
		5	1,25
		10	2,5
		20	5
		30	7,5
		40	10
		50	12,5
		75	18,75
		150	37,5
Carvacrol	10mg/ml	0	0
		20	0,1
		40	0,2
		60	0,3
		80	0,4
		100	0,5
		120	0,6
		150	0,75
		200	1
400	2		
α-pinène	500mg/ml	0	0
		20	5
		50	12,5
		100	25
		150	37,5
		200	50
		250	62,5
		300	75
		400	100
		500	125
		600	150
P-cymene	500mg/ml	0	0
		20	5
		50	12,5
		100	25

		150	37,5
		200	50
		300	75
		400	100
		500	125
		600	150
Thymol	10mg/ml	0	0
		20	0,1
		40	0,2
		60	0,3
		80	0,4
		100	0,5
		120	0,6
		150	0,75
		200	1
		500	2,5
β-pinène	500mg/ml	0	0
		20	5
		40	10
		80	20
		100	25
		150	37,5
		200	50
		300	75
		400	100
		500	125
Menthol	500mg/ml	0	0
		100	25
		150	37,5
		200	50
		300	75
		400	100
		500	125
		700	175
Eugenyl acétate	100 mg/ml	0	0
		20	1
		40	2
		60	3
		100	5
		200	10
		300	15
		500	25
Huile brute	Huile brute	0	0
		10	0,00039
		30	0,00117
		50	0,00195

		100	0,0039		
		200	0,0078		
		400	0,0156		
		500	0,0195		
Vit C	0,2 mg/ml	0	0		
		5	0,0005		
		10	0,001		
		40	0,004		
		50	0,005		
		60	0,006		
		80	0,008		
		100	0,01		
		200	0,02		
		300	0,03		
		400	0,04		
		BHA	0,2 mg/ml	0	0
				5	0,0005
20	0,002				
40	0,004				
60	0,006				
80	0,008				
100	0,01				
200	0,02				
300	0,03				
400	0,04				
BHT	0,2 mg/ml	0	0		
		5	0,0005		
		20	0,002		
		40	0,004		
		60	0,006		
		80	0,008		
		100	0,01		
		200	0,02		
		300	0,03		
		400	0,04		
guaiacol	10 mg/ml	2	0,01		
		4	0,02		
		5	0,025		
		8	0,04		
		10	0,05		
		20	0,1		
		40	0,2		
		60	0,3		
		100	0,5		
		120	0,6		
		150	0,75		
		200	1		

III.3.2 La méthode FRAP

Ce test a été déterminé suivant la méthode préconisée par Oyaizu [66]. Dans des tubes à essai contenant 100 μ l de solutions à différentes concentrations diluées dans l'éthanol sont mélangés avec 1,25 ml de solution tampon phosphate (0,2M ; PH=6,6) et 1,25 ml d'héxacyano ferrate de potassium [$K_3Fe(CN)_6$] à 1%. Les mélanges sont chauffés à 50C° au bain- marie pendant 30min .Un volume de 1,25ml de TCA (10%) est ensuite ajouté. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. Enfin 1,25 ml du surnageant de chaque solution a été mélangé avec 1ml d'eau distillée et 0,2 ml de $FeCl_3$ (0,1%). L'absorbance de chacune de ces solutions est mesurée à 700nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Un blanc sans échantillon est préparé dans les mêmes conditions, l'échantillon est mesuré à 700nm, le BHT et BHA est utilisé pour le contrôle positif. Le protocole de la méthode FRAP est schématisé dans la figure III-11.

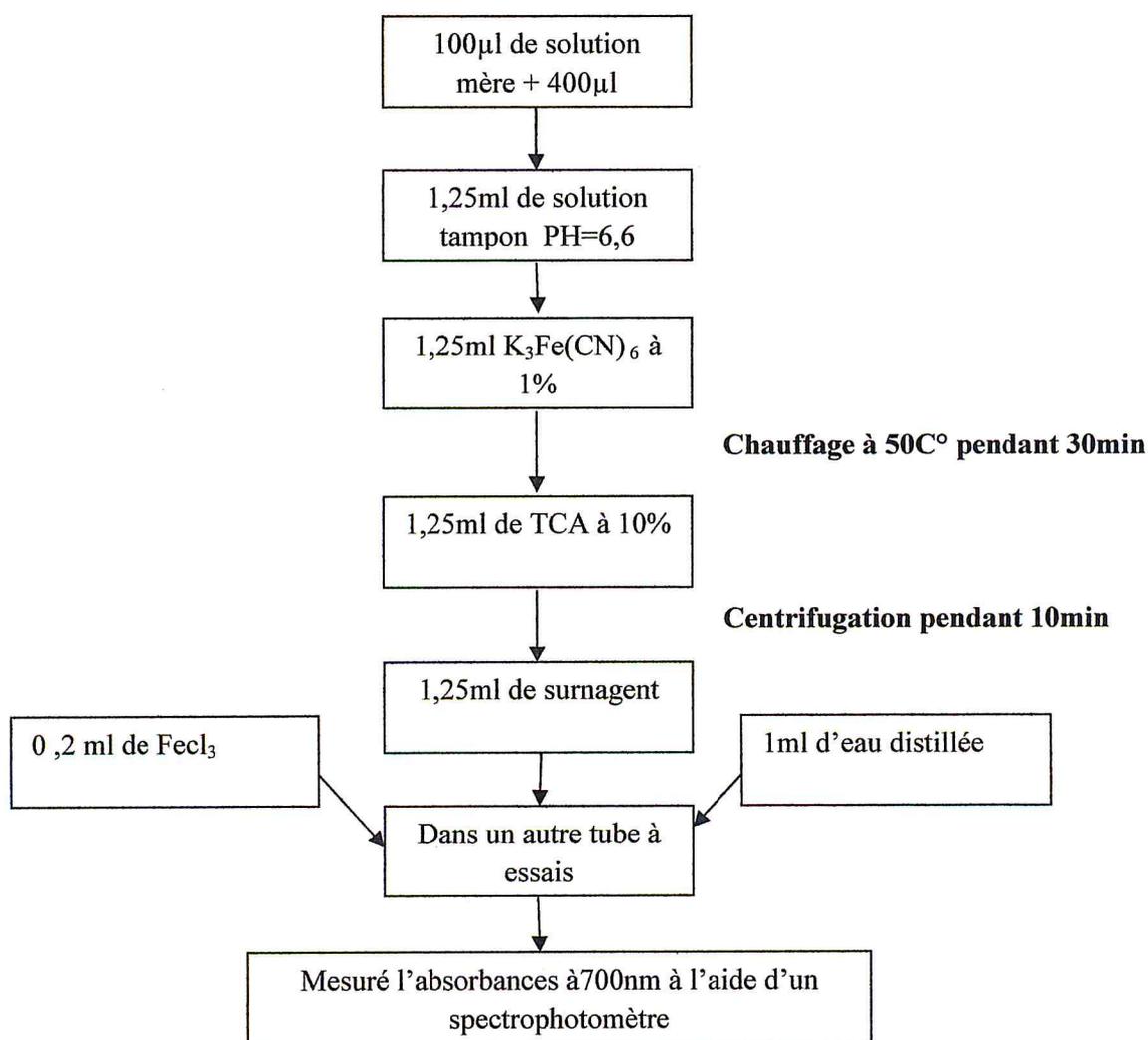


Figure III-11: Organigramme de la méthode FRAP.

III.3.3 La méthode de la β -carotène

La méthode décrite par Tepe et ses collaborateurs [67] ont été employées. Une émulsion de β -carotène/acide linoléique a été préparée par solubilisation de 2 mg de β -carotène dans 1ml de chloroforme, ensuite 25 μ l de l'acide linoléique et 200 mg de tween 40 sont additionnés. Le chloroforme est complètement évaporé au rota vapeur et 100 ml d'eau sont ajoutés, l'émulsion résultante est vigoureusement agitée.

À 2,4 ml du mélange précédent, 100 mg de chaque composant pur de notre huile, trois répétitions ont été effectuées pour chaque solution. Les mélanges ont été incubés en obscurité et chauffé à 50C° au bain-marie pendant 2h. Des contrôles ont été aussi préparés avec la même procédure, en remplaçant les solutions de nitrones par des solutions des antioxydants de référence BHT, BHA (contrôle positif) et l'autre sans antioxydant (contrôle négatif) où l'échantillon est remplacé par 350 μ l d'éthanol. La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant est suivie à 490nm à des intervalles de temps réguliers pendant 2heures. L'activité antioxydante relative des extraits (AAR) est calculée après 2 heures selon l'équation suivante :

$$\text{AAR}\% = [\text{Abs}(\text{échantillon}) / \text{Abs}(\text{BHT})] \times 100$$

Où :

AAR : activité antioxydant relative ;

Abs 2h (échantillon): absorbance de l'échantillon après 2 heures ;

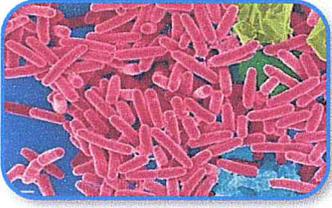
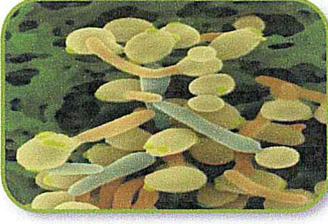
Abs 2h (BHT): absorbance du BHT après 2 heures.

III.4 Étude du pouvoir antimicrobien

Dans le but d'évaluer le pouvoir antimicrobien de mélange de composés nous avons testé ces derniers sur six micro-organismes. (2 bactéries Gram⁻, 2 bactéries Gram⁺, une levure et un champignon).

Les souches utilisées proviennent de l'institut pasteur, ils sont choisis pour leur fréquence élevée à contaminer les denrées alimentaires et pour leur pathogénicité. Le tableau III-9 illustre : les noms, références, allures sous le microscope électronique et les principales pathologies causées par ces micro-organismes utilisés.

Tableau III-9 : Références, allures et pathologies des souches utilisées [68].

Souches	Noms :	Référence :	Allures :	Pathologies :
Bactéries Gram -	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25422		Pathogène : Gastro-entérites, infections urinaires, méningites, ou Sepsis.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853		Pathogène : Flore de transit sur la peau et les muqueuses et cause des surinfections de plaies ou brûlures.
Bactérie Gram +	<i>Bacillus ceureus</i>	ATCC 10876		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538		Pathogènes : intoxications alimentaires, d'infections localisées suppurées
Levures	<i>Candida albicans</i>	ATCC 24433		Pathogènes : Infections fongiques essentiellement au niveau des muqueuses digestives et gynécologiques.
Champignons	<i>Aspergillus flavus</i>	ATCC 2035		Responsables de nombreuses dégradations alimentaires.

L'analyse microbiologique a pour principe de mettre à chaque fois une souche microbienne en contact avec l'huile essentielle à différentes concentrations et ceux dans un milieu de culture solide (préalablementensemencé) approprié pour chaque micro-organisme.

Dans notre étude nous avons mis en évidence le pouvoir antimicrobien de nos échantillons par la méthode de l'aromatogramme (ou diffusion sur milieu gélosé).

III.4.1 Protocole expérimental

III.4.1.1 L'aromatogramme

L'aromatogramme est une méthode inspirée de l'antibiogramme. Elle permet de déterminer l'activité des huiles essentielles à inhiber la croissance des germes cibles. Cette méthode repose sur le pouvoir de diffusion des huiles essentielles sur un milieu solide à l'intérieur d'une boîte de Pétri, qui va nous permettre de mettre en évidence l'effet antibactérien de l'huile essentielle sur les bactéries, ainsi que la détermination de la résistance ou la sensibilité de ces bactéries vis-à-vis de cette huile essentielle, par la mesure du diamètre d'inhibition autour du disque de cellulose imprégné de nos huiles essentielles [69]. La méthode expérimentale suivie est expliquée dans ce qui suit et résumé dans la figure III-12.

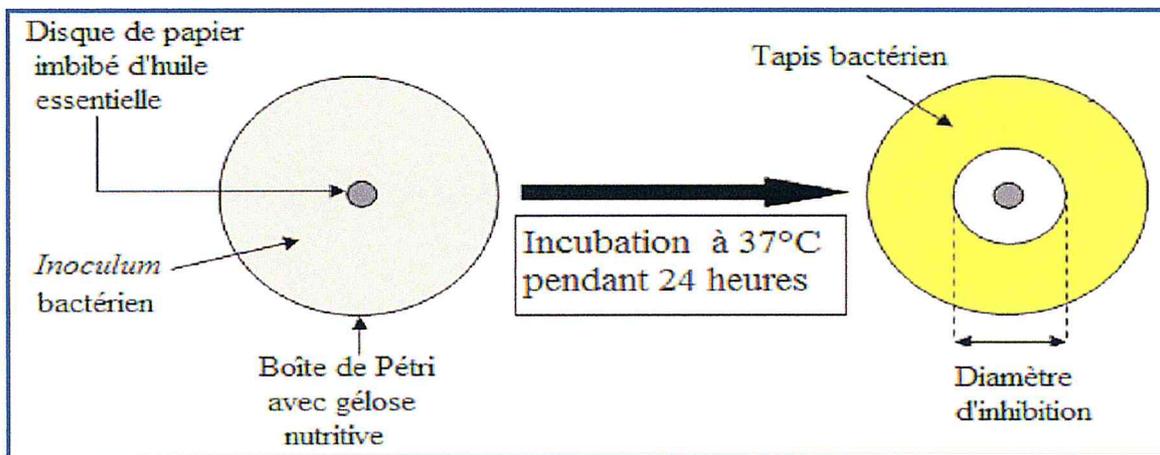


Figure III-12 : illustration de la méthode d'Aromatogramme sur boîte Pétri.

III.4.1.2 Préparation du milieu de gélose

On fait fondre les milieux Muller Hinton et Sabouraud dans un bain-marie à 95°C, après on les verse aseptiquement dans des boîtes de pétri à raison de $\frac{3}{4}$ du volume total de la boîte, on laisse refroidir et solidifier sur la paillasse.

III.4.1.3 Préparation de l'inoculum

À partir d'une culture jeune des bactéries, champignons et levures, on réalise des suspensions troubles selon le Protocol suivant :

- casser l'extrémité d'une pipette pasteur et la faire passer rapidement à la flamme ;
- ouvrir la boîte pétrie contient le germe, et prélever aseptiquement 03 à 04 colonies isolées et identiques ;
- déboucher le tube contenant 10mL d'eau physiologique stérile et faire déposer les colonies prélevées ;
- passer l'ouverture du tube contenant la suspension de germe à la flamme avant de la renferme.

- agiter au vortex.
- on réalise une première lecture de la concentration de la suspension à l'aide d'un densimètre qui doit être égale à 05 CFU/ml ;
- si la valeur trouvée durant la première lecture est supérieure à 05 CFU/mL, on l'ajuste tout en ajoutant de l'eau physiologique, si elle est inférieure à la valeur maximale, dans ce cas, on doit ajouter des colonies et on fait une deuxième lecture.
- recommencer toutes ces opérations avec tous les autres germes testés.

III.4.1.4 Préparation des disques

Les disques sont fabriqués à partir du papier Wattman N° 3, avec un diamètre de 9mm par l'emporte-pièce. Ensuite, ces disques sont mis dans un tube à essai, stérilisés à l'autoclave, puis stockés à une température ambiante (le tube à essai est hermétiquement fermé).

III.4.1.5 Ensemencement

Après solidification du milieu de culture, la suspension bactérienne à tester est étalés sur la surface du milieu de culture sous forme de strie serré dans des boîtes pétri contenant de 20 ml de Muller Hinton (pour les boîtes destiner à tester les bactéries) et 20 ml de Sabouraud (pour les boîtes destiner à tester les champignons et les levures).

III.4.1.6 Dépôt des disques

Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, des disques de papier Wattman (03disques/boite) sont déposés sur le milieu de culture précédemment inoculé avec le microorganisme choisi, puis les imbibés par 45µL de mélange de composés volatils. Les boites sont maintenues à 4°C pendant 4h pour que l'huile essentielle puisse diffuser.

III.4.1.7 Incubation

Les boites ont été incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 h pour les boites qui sont ensemencé de bactéries et 48 heures pour ceux ensemencé par les champignons et les levures.

III.4.1.8 Lecture

La lecture s'effectue après l'incubation par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition (le diamètre du disque inclus), la lecture se fait à l'aide d'un pied à coulisse. Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition [70].

Non sensible(-) ou résistante : diamètre < 8 mm

Peu sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.

Sensible (++) ou intermédiaire : diamètre compris entre 15 à 19 mm

Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

III.5 Test d'activité anti-inflammatoire

Le test consiste à évaluer l'effet anti-inflammatoire de notre mélange à une concentration de 1000 mg/kg, sur l'œdème des pattes postérieures provoquées par l'injection d'une solution de la Carraghénine à 1 % chez les souris.

La préparation de la solution de la Carraghénine (1%) a été faite par une dilution de 1mg de la Carraghénine dans 100 ml d'eau physiologique. Les souris albinos sont réparties en 3 lots de 6 souris dont le poids corporel est compris entre 18g et 23g.

III.5.1 Mode opératoire

Au temps T0: Administrer aux trois lots des suspensions suivante:

Lot témoin : chaque souris reçoit 0,5 ml d'eau physiologique.

Lot essai 1 : chaque souris reçoit 0,5 ml du mélange à la dose 1000mg/kg

Lot de référence : chaque souris reçoit 0,5 ml du produit de référence (Clofenal) (Déclofénac de sodium à 2 mg/kg).

Au temps T0+30min : La solution de la Carraghénine à 1% est injectée sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche sous un volume de 0,025ml à tous les souris mis en expérience (figure III-13).

Au temps T0+4h : Après avoir sacrifié les souris ayant été soumises à une forte concentration d'éther diéthylique, couper les pattes postérieures à hauteur de l'articulation et les pesés sur une balance analytique.

III.5.2 Expression des résultats [71]

- Calculer la moyenne arithmétique des poids de la patte gauche et la patte droite pour chaque lot.

- Calculer le pourcentage d'augmentation des poids de la patte (% d'œdème) et (% de réduction d'œdème) par les formules suivantes :

$$\% \text{ d'œdème} = \frac{\text{moyenne des poids de la patte gauche} - \text{moyenne des poids de la patte droite}}{\text{moyenne des poids de la patte droite}}$$

$$\% \text{ de réduction de l'œdème} = \frac{\% \text{ de l'œdème témoin} - \% \text{ de l'œdème essai}}{\% \text{ de l'œdème témoin}}$$

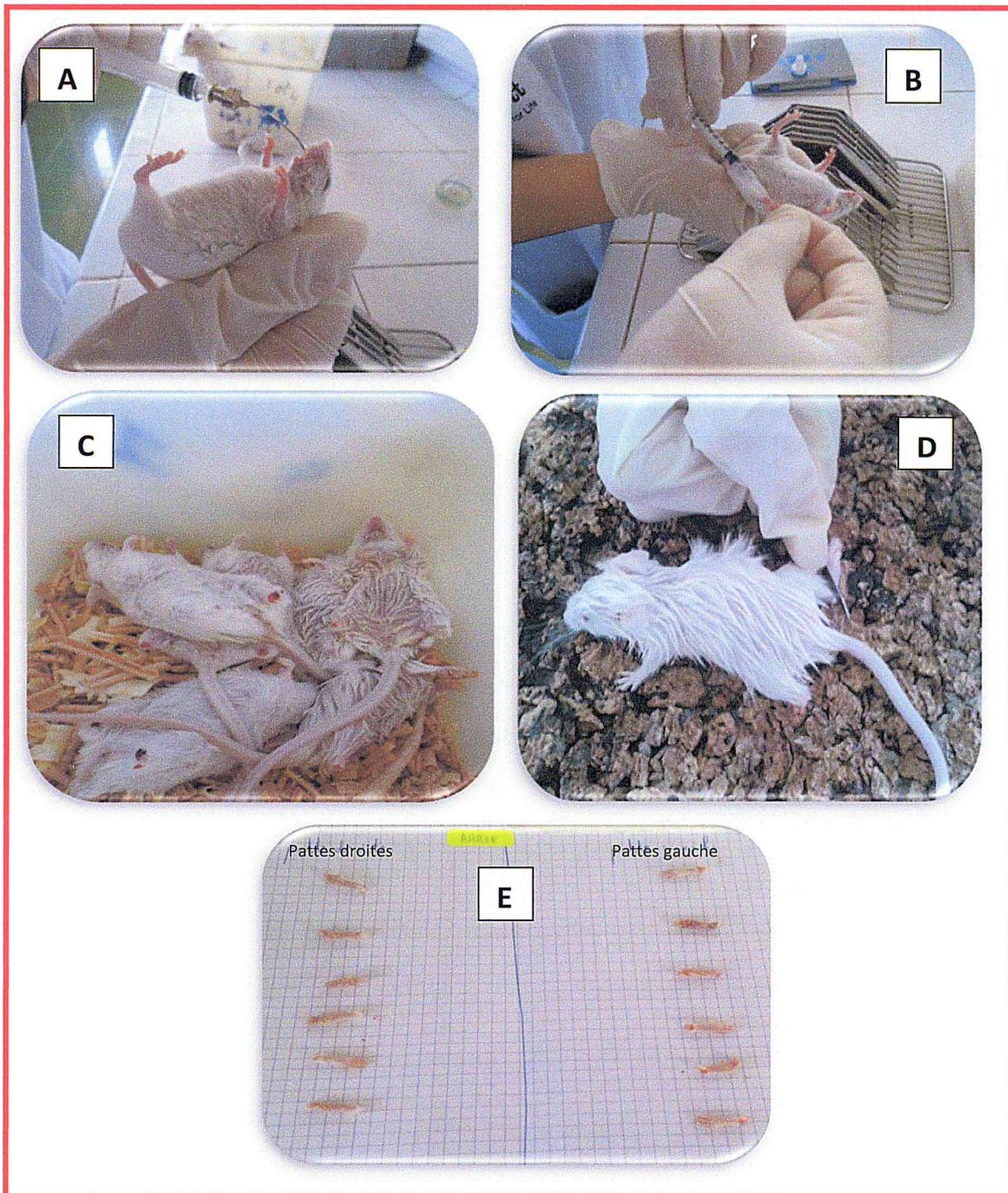


Figure III-13 : Illustration des différentes étapes de l'activité anti-inflammatoire citée précédemment
(A) : administration des solutions préparées par voie orale, (B) : injection de la carraghénine à 1% sous l'aponévrose des pattes gauches, (C) : Sacrifier les souris avec l'étherdiéthylique, (D) : Couper les pattes postérieures à la hauteur de l'articulation, (E) : Peser les pattes droites et gauches.

III.6 Test d'activité antalgique

Le principe de cette activité est de réduire par des substances antalgiques la douleur provoquée chez les souris par l'injection d'une substance irritante capable d'entraîner des mouvements de torsion. Nous avons utilisé le test de la torsion (**Writhing test**) pour l'évaluation de l'activité antalgique périphérique de notre mélange [72].

Le test consiste à évaluer l'effet antalgique de notre mélange à une concentration de 1000 mg/kg, par l'injection d'une solution d'acide acétique par voie intra-péritonéale

La préparation de la solution d'acide acétique (1%) a été faite par une dilution de 1mg de l'acide acétique dans 100 ml d'eau distillée. Les souris albinos sont réparties en 3 lots de 6 souris dont le poids corporel est compris entre 18g et 23g.

III.6.1 Mode opératoire

Lot témoin : chaque souris reçoit par voie intra-péritonéale de l'eau physiologique à raison de 0.5ml

Lot de référence: chaque souris reçoit par la même voie une solution d'un médicament antalgique : Spasfon® (phloroglucinol.hydraté ; ampoule injectable 40mg/4ml ; Laboratoire LAFON, France) ;

Lot essai 1 : chaque souris reçoit par voie orale 0,5ml du produit à tester à la dose active bibliographique (mélange).

Trente minutes (30 mn) après les différents traitements, une injection de 0.2 ml d'une solution d'acide acétique (1%) a été faite par voie intra-péritonéale dans chaque souris. Le syndrome douloureux se caractérise par des mouvements d'étirement des pattes postérieures et de torsion de la musculature dorso-abdominale.

Après injection de la solution d'acide acétique et un temps de latence de 5 minutes, nous avons compté, pour chaque souris, le nombre torsions pendant 10 minutes.

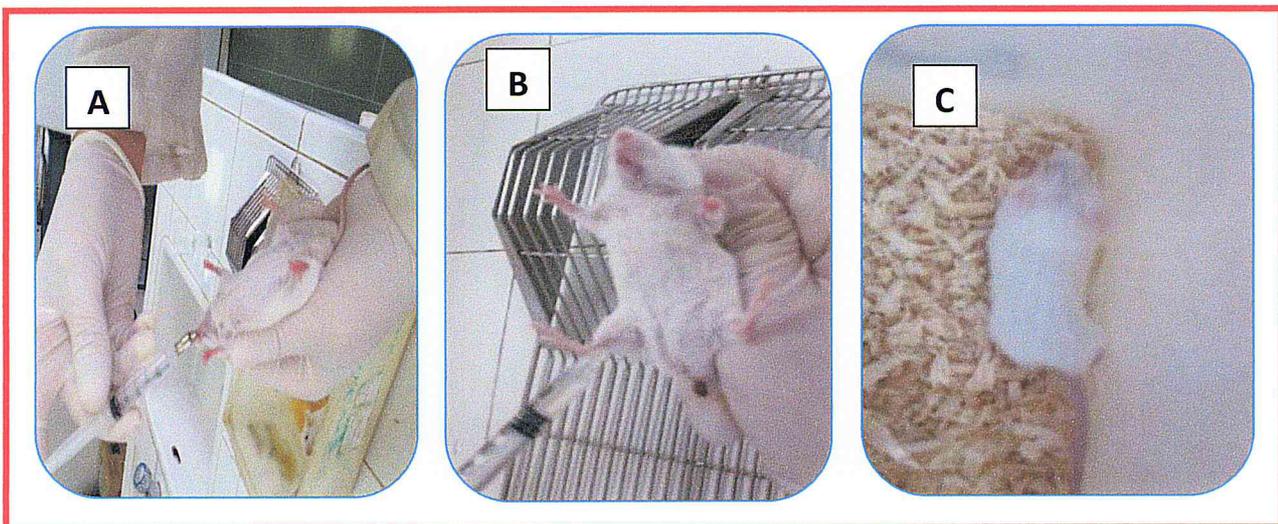


Figure III-14: Les différentes étapes (A, B, C) de l'activité antalgique. (A) : Administration du produit à tester; (B) : Injection de l'acide acétique, (C) : Le comptage des crampes.

III.6.2 Expression des résultats

- Calculer les moyennes arithmétiques des crampes pour chaque lot.
- Calculer le pourcentage de réduction de crampes (pourcentage de protection) chez les souris traitées par rapport aux témoins.

$$\% \text{ de protection} = \frac{\text{moyenne de crampes de témoin} - \text{moyenne de crampes de l'essai}}{\text{moyenne de crampes de témoin}}$$

IV. Introduction :

L'objectif principal de ce travail est l'extraction des composants majoritaires des huiles essentielles par encapsulation. Cela en vue d'étudier l'activité biologique des deux parties (majoritaire (extraite) et minoritaire (restante)). Cet objectif a été basé sur les résultats des travaux antérieurs, où il a été prouvé que des produits minoritaires sont responsables de l'activité de l'huile.

Il est décrit dans la littérature que la composition de l'huile essentielle dépend de plusieurs paramètres (cycle végétatif, la température, L'humidité relative, la durée totale d'insolation et le régime des vents, procédé d'obtention...). Et surtout des conditions de stockage. Il est donc difficile d'avoir une huile avec une composition constante le long de cette étude. Nous avons alors pensé à formuler une "huile composé" dont la composition reste constante au cours du temps et qui assurera une meilleure reproductibilité des résultats.

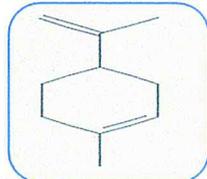
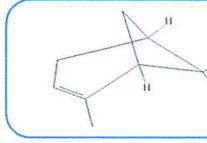
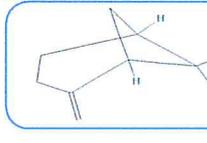
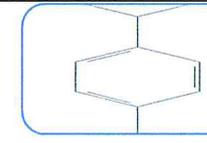
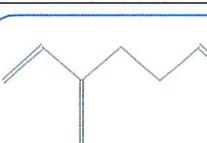
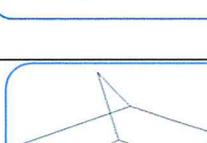
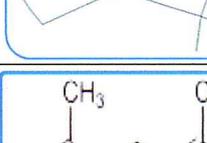
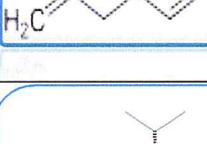
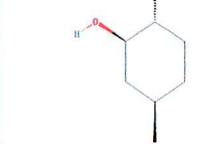
Le travail de ce mémoire vise à étudier l'activité antioxydante de cette huile et de chacun de ses composants en plus de l'activité antibactérienne, anti-inflammatoire et antalgique du mélange.

IV.1. Composition de l'huile composée

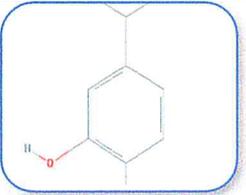
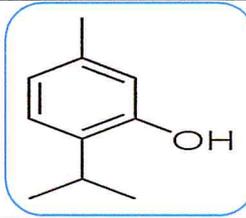
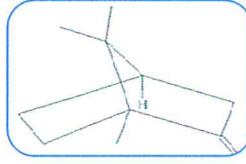
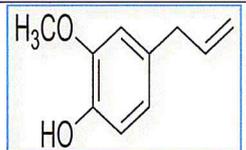
Les composés choisis pour la préparation de notre huile sont pour la plupart des monoterpènes, cette classe de composés très abondante dans les huiles essentielles a été choisie pour leurs volatilités et leur sensibilité à l'oxydation. Il sera très intéressant par la suite de voir leur degré d'encapsulation. Le tableau suivant donne les formules brutes et chimiques de ces éléments.

Partie expérimentale Chapitre IV : Préparation et traitement de l'huile composée

Tableau IV-10 : les éléments de l'huile composée, leurs familles, nom selon U.P.A.C., formules brutes et leurs formules chimiques ainsi que leurs températures de fusion et d'ébullition.

Les Composés		Propriété physico-chimique			
	Nom UICPA	T°C de fusion	T°C d'ébullition	Formule chimique	
carbures monoterpéniques	Limonène C ₁₀ H ₁₆ [73]	1-méthyl-4-prop-1-èn-2-yl-cyclohexène	276,65 °C	229 °C	
	α-pinène C ₁₀ H ₁₆ [74]	triméthyl-2, 6,6-bicyclo[3.1.1]hept-2-ène	49 à 51 °C	233 °C	
	β-pinène C ₁₀ H ₁₆ [75]	6,6-diméthyl-2-méthylènebicyclo[3.1.1]heptane	-75 °C	176 °C	
	P-cymène C ₁₀ H ₁₄ [76]	1-méthyl-4-(1-méthyléthyl) benzène	- 62,5 °C	156 °C	
	Myrcène C ₁₀ H ₁₆ [77]	7-méthyl-3-méthylidèneocta-1,6-diène	- 61,5 °C	166 °C	
	Camphène C ₁₀ H ₁₆ [78]	2,2-diméthyl-3-méthylène-bicyclo[2,2,1]heptane	- 67,9 °C	177 °C	
	Ocimène C ₁₀ H ₁₆ [79]	3,7-diméthyl-1, 3,7-octariene	50 °C	176°-178°C	
alcool monoterpéniques	Menthol C ₁₀ H ₂₀ O [80]	(1R,2S,5R)-5-méthyl-2-(propan-2-yl)cyclohexanol	< -80 °C	167 °C	
	Linalol C ₁₀ H ₁₈ O [81]	3,7-diméthyl-1,6-dièn-3-ol	51 °C	159 °C	

Partie expérimentale Chapitre IV : Préparation et traitement de l'huile composée

	Carvacrol C ₁₀ H ₁₄ O [82]	2-méthyl-5-(propan-2-yl) phénol. (2-methyl-5-(1-methylethyl)-phenol)	36 à 38 °C	212 °C	
	Thymol C ₁₀ H ₁₄ O [83]	5-méthyl-2-(propan-2-yl)-phénol	<20 °C	198 à 200 °C	
cétones mono terpéniques	Camphor C ₁₀ H ₁₆ O [84]	1, 7,7-triméthylbicyclo [2, 2,1] heptan-2- one	180 °C	204 °C	
phénylpr opènes	Eugenyl acetatae C ₁₂ H ₁₄ O ₃ [85]	4-allyl-2-méthoxyphénol	-9 °	253 °C	

Ces composés représentent les composés majoritaires de plusieurs huiles comme c'est indiqué dans le tableau suivant:

Tableau IV-11 : plantes dont les composants de notre huile sont majoritaires. [86, 87, 88].

Les composés		
Limonène	Pamplemousse - <i>citrus paradisi</i>	90 à 97%
	Mandarine Verte - <i>citrus reticulata</i>	65 à 80
	Orange Douce - <i>citrus sinensis</i>	89 à 97%
	Citron - <i>citrus limon</i>	56 à 78%
	Bergamote - <i>citrus aurantium ssp bergamia</i>	34 à 52%
α-pinène	Myrte Verte - <i>myrtus communis</i>	45 à 68%
	Térébenthine - <i>pinus pinaster</i>	70 à 90%
	Romarin à Verbénone - <i>rosmarinus officinalis</i>	15 à 40%
	Myrte Rouge - <i>myrtus communis</i>	19 à 28%
	Ciste Ladanifère - <i>cistus ladaniferu</i>	16 à 50%
	Camomille Sauvage - <i>ormenis mixta va</i>	9 à 20%

Partie expérimentale Chapitre IV : Préparation et traitement de l'huile composée

β-pinène	Mandarine Verte - <i>citrus reticulata</i>	65 à 80
	Citron - <i>citrus limon</i>	56 à 78%
	<i>citrus aurantium ssp bergamia</i>	34 à 52%
	Sapin de Sibérie - <i>abies sibirica</i>	7 à 10%
	Lentisque Pistachier - <i>pistacia lentiscus</i>	7 à 16%
P-cymène	Ajowan - <i>trachyspermum ammi</i>	10 à 30%
	Thym à Thymol - <i>thymus zygis</i>	8 à 28%
	Origan Compact - <i>origanum compactum</i>	6 à 20%
	Lentisque Pistachier - <i>pistacia lentiscus</i>	7 à 16%
	Sarriette des Montagnes - <i>satureja montana</i>	5 à 25%
Myrcène	Pamplemousse - <i>citrus paradisi</i>	90 à 97%
	Mandarine Verte - <i>citrus reticulata</i>	65 à 80%
	Orange Douce - <i>citrus sinensis</i>	89 à 97%
	Lentisque Pistachier - <i>pistacia lentiscus</i>	7 à 16%
	Encens - <i>boswellia carterii</i>	2 à 16%
Camphène	Epinette Noire - <i>picea mariana</i>	10 à 25%
	Romarin à Camphre - <i>rosmarinus officinalis</i>	6 à 13%
	Thym à Feuilles de Sarriette - <i>thymus satureioides</i>	6 à 12%.
Menthol	Menthe Poivrée - <i>menta piperita</i>	30-55%
	Menthe des Champs - <i>mentha arvensis</i>	50-75%
Linalol	Thym à Linalol - <i>thymus zygis</i>	30 à 50%
	Lavande Fine - <i>lavandula angustifoli</i>	25 à 36%
	Bergamote - <i>citrus aurantium ssp bergamia</i>	34 à 52%
	Lavandin - <i>lavandula Burnatii</i>	25 à 39%
	Lavande Aspic - <i>lavandula latifolia</i>	25 à 50%
Carvacrol	Origan Compact - <i>origanum compactum</i> -	21 à 53%
	Sarriette des Montagnes - <i>satureja montana</i> -	25 à 50%
	Thym à Feuilles de Sarriette - <i>thymus satureioides</i> -	2 à 11%
	<i>thymus herba-barona</i>	54.0%
Thymol	Thym à Thymol - <i>thymus zygis</i>	37 à 55%
	<i>Thymus ciliatus</i>	44,2%
	<i>Thymus algeriensis</i>	29,2%

Partie expérimentale Chapitre IV : Préparation et traitement de l'huile composée

	Thymus herba-barona	(30.2%)
	Origan Compact - <i>origanum compactum</i>	8 à 28%
Camphor	Sauge à Feuilles de Lavande - <i>salvia lavandulifolia</i>	11 à 36%
	Lavandin - <i>lavandula Burnatii</i>	25 à 39%
	Lavande Aspic - <i>lavandula latifolia</i>	25 à 50%
	Romarin à Camphor - <i>rosmarinus officinali</i>	14 à 24%
Eugenyl acétate	<i>Eugenia caryophyllata</i>	70–90 %
	<i>Cinnamomum cassia</i> (L.)	70–90 %
	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	70–90 %
	<i>Dianthus caryophyllus</i> L.	30 %
	<i>Ocimum basilicum</i> L.	30–80 %
	<i>Ocimum gratissimum</i> L.	50–90 %
	<i>Ocimum sanctum</i> L.	70 %

Ces composés sont connus pour leurs activités biologiques très intéressantes. Ils sont bactéricides, antivirale, antifongiques, antioxydants, anti-inflammatoires, antidépresseurs, anti-œdémateuse, antiseptique atmosphérique, hypocholestérolémiante, ulcéroprotectrice, insecticide, immunomodulante, anti diabétique, anticancéreuse, expectorante...Etc. Le tableau IV-13 donne l'activité de chacun des composants de notre huile.

Tableau IV-12: quelques propriétés biologiques des éléments de notre huile composée.

Composés	Carvacrol	thymol	limonène	α /pinène	β /pinène	Paracymène	Myrcène	Camphène	linalol	Menthol	Camphre	Ocimene	Eugenyl acetate
Activités													
Bactéricide	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
antivirale	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
antifongique	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
anti/élastase	+	+	/	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
antioxydants	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Anti-inflammatoires	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
antidépresseur	+	/	+	/	/	/	/	/	+	/	/	/	/
Anti-œdémateuse	/	/	+	+	+	+	+	/	/	/	/	/	/
antiseptique atmosphérique	/	/	+	+	+	+	+	+	/	/	/	/	/
hypocholestérolémiante	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Ulcéroprotectrice	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

Activité insecticide	/	/	/	+	/	/	/	/	+	/	+	/	/
immunomodulante	+	+	/	+	/	/	/	/	+	/	/	/	/
anti diabétique	/	/	/	/	/	/	+	/	/	/	/	/	/
anticancéreuse	/	/	+	/	/	/	/	/	/	+	/	/	/
expectorante.	+	+	+	+	+	+	+	/	/	/	/	/	/

/: Non décrit par la littérature

IV.2 Analyse de l'huile composée et son encapsulation

L'encapsulation de notre huile composée est réalisée par deux méthodes, en utilisant soit les tensioactifs, soit les cyclodextrines. Deux types de tensioactif sont utilisés : le SDS et le CTAB. Pour les cyclodextrines, nous avons travaillé avec 3 dérivés de CD : le α -CD, β -CD, 2H(P)- β -CD. Le même protocole d'encapsulation est suivi pour les deux méthodes.

Par manque de moyen, on a réalisé que deux chromatogrammes, celui qui correspond au mélange brut et celui du mélange traité avec le tensioactif SDS. Ces chromatogrammes obtenus avec les conditions chromatographiques antérieures, sont donnés dans la figure IV-15.

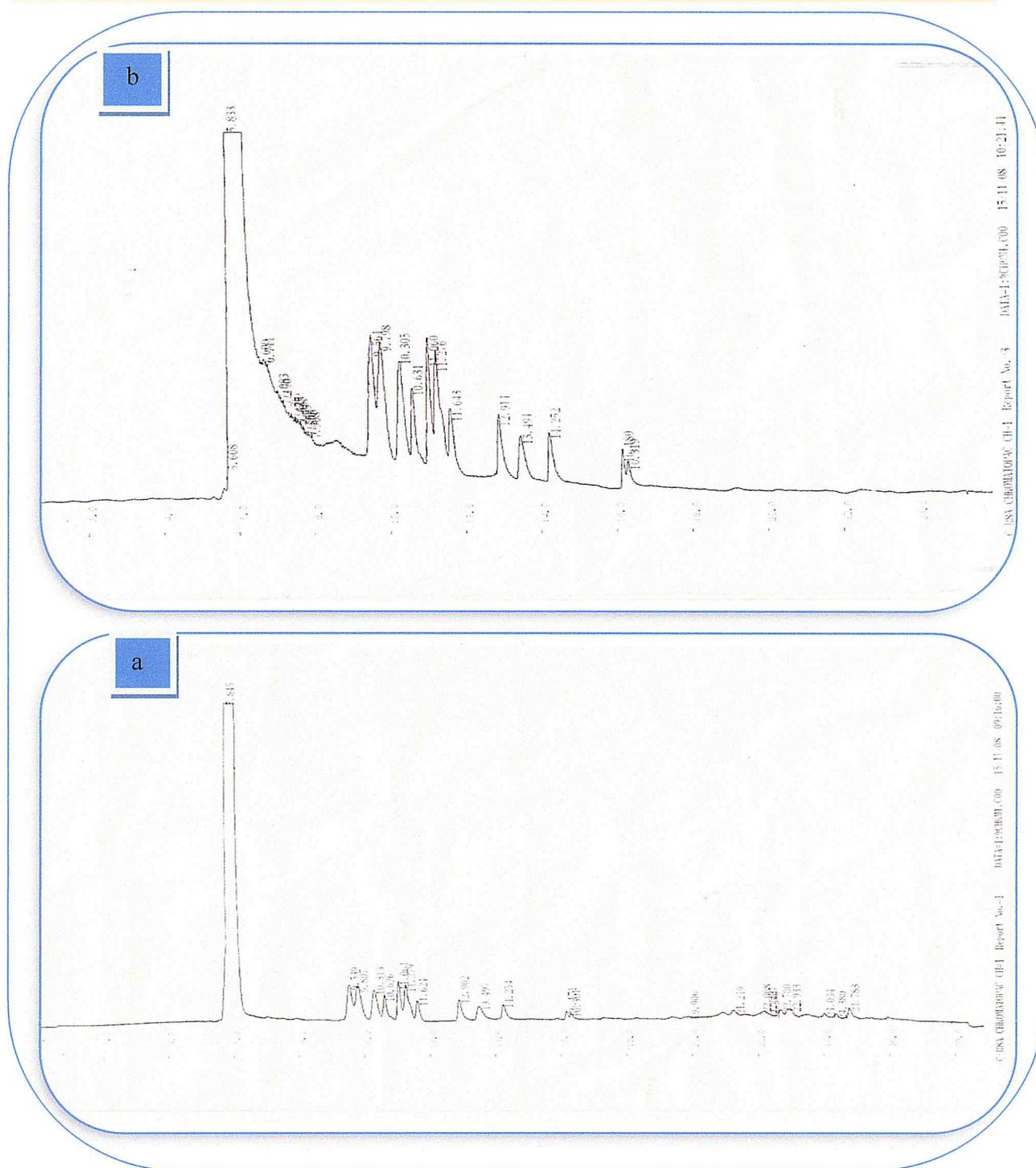
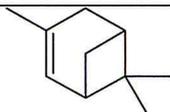
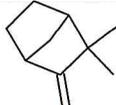
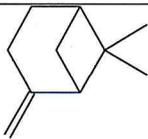
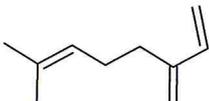
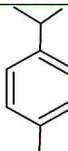
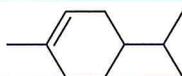
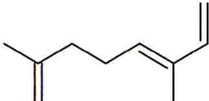
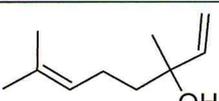
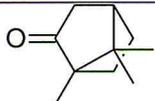
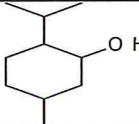
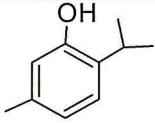
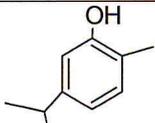
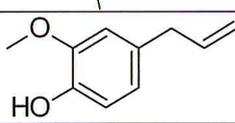


Figure IV-15: Chromatogramme de notre huile brute en (a) et l'huile traitée avec le SDS en (b) réalisé sur un appareil Hewlett Packard Agilent6890N.

Une bonne séparation par chromatographie donne un pic pour chaque composé. Les pics doivent être bien séparés et avoir une forme symétrique ou gaussienne. Le chromatogramme de l'huile brute présente onze pics. Cela montre que quelques-uns des composés sont mal séparés. Il n'est donc pas possible de faire une étude quantitative. On donne dans le tableau x les temps de rétention de nos composés donnés dans la littérature.

Partie expérimentale Chapitre IV : Préparation et traitement de l'huile composée

Tableau IV-13 : temps de rétention des composés de notre huile selon les conditions d'Adams.

composés	Structure chimique	Temps de rétention (min)
α -pinène		5.86
Camphène		6.26
β -pinène		7.04
Myrcène		7.43
p-cymène		8.53
Limonène		8.69
Ocimène		9.42
Linalol		11.32
Camphor		13.28
Menthol		14.39
Thymol		19.71
Carvacrol		20.14
Eugenyl acetatae		29.70

Partie expérimentale Chapitre IV : Préparation et traitement de l'huile composée

On remarque selon ce tableau que les temps de rétention varient selon la structure chimique des composés, on a l'élution des hydrocarbures saturés suivis des hydrocarbures insaturés et à la fin on obtient les composés hydroxylés. Ces derniers sont plus lourds et présente des températures d'ébullitions plus importantes dues principalement à la formation des liaisons d'hydrogène. Les temps de rétention ainsi que l'abondance des composés séparés de notre huile brute et de l'huile traitée avec le SDS sont donné dans le tableau IV-14 et représenté sur la figure IV-15.

Tableau IV-14 : Variation de l'abondance des composés dans l'huile brute (%A) et l'huile traitée avec le SDS (%B).

Tr (min)	% A	% B	(% A - % B)
6,711	0,000	1,702	-1,702
9,359	13,729	13,344	0,385
9,807	15,805	15,547	0,258
10,313	12,470	12,310	0,160
10,626	7,501	6,138	1,363
11,064	10,597	9,972	0,625
11,279	13,878	14,695	-0,817
11,624	5,498	6,267	-0,769
12,902	6,408	5,769	0,639
13,497	6,071	5,205	0,866
14,254	4,380	4,874	-0,494
16,18	0,000	2,105	-2,105
16,319	0,000	2,072	-2,072
22,933	3,663	0,000	3,663

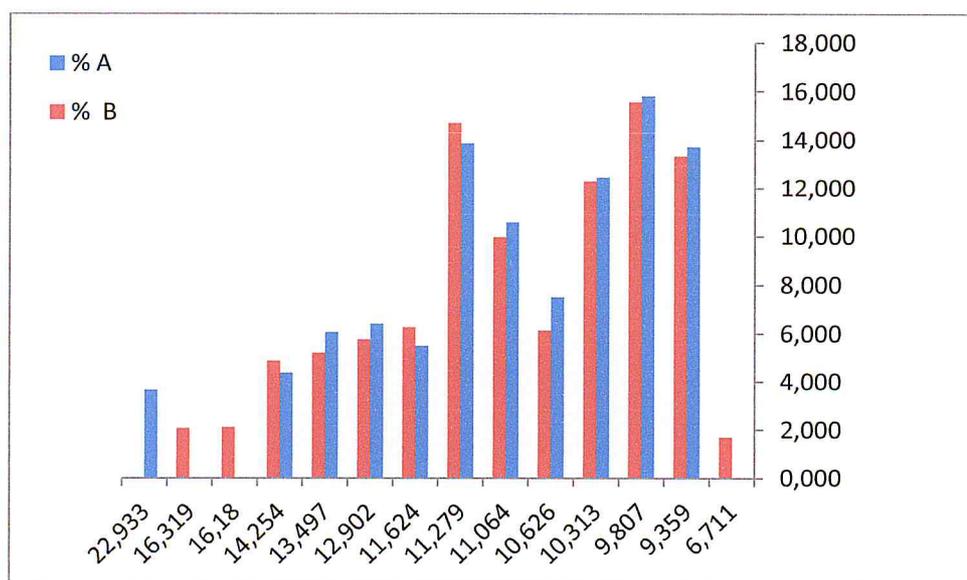
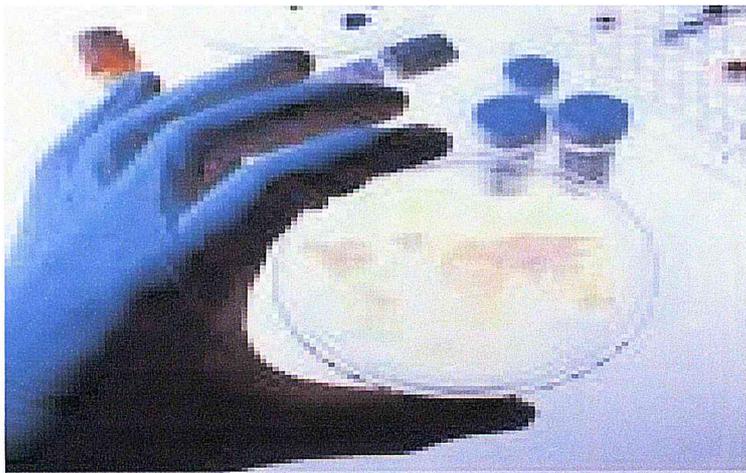


Figure IV-16: histogramme de la variation de l'abondance des composés dans l'huile brute et l'huile traité avec le SDS.

Ces résultats montrent que le traitement de l'huile composée avec le SDS donne de nouveaux composés qui sortent à 6,711, 16,18 et 16,319 min. Ces composés peuvent être le résultat de la dégradation de quelques composés par l'effet de l'eau lors du traitement ou par l'effet de la présence du tensioactif. D'autres analyses chromatographiques (GC-MS) peuvent nous renseigner de la composition chimique de ces derniers. D'autre part, on remarque la disparition du composé qui sort à 22,933min. Aussi, l'histogramme montre la diminution de l'abondance de quelques composés ($T_r = 10,626$; $11,064$; $12,902$ et $13,497$ min) et l'augmentation d'autres ($T_r=11,624$ et $11,279$ min). Ces variations de la composition chimique nous laissent espérer l'obtention d'une meilleure séparation par la complexation avec les cyclodextrines. En effet, le passage de la complexation d'un ensemble de molécules à la complexation moléculaire devra donner un meilleur rendement et surtout une meilleure sélectivité. Toutefois, on attend toujours les résultats de cette partie.

Résultats et discussions



V. Résultats des activités biologiques

Dans ce chapitre on donnera les résultats de l'activité biologique de notre mélange. Nous avons évalué l'activité antioxydante par la méthode de DPPH, l'activité antibactérienne par la méthode d'aromatogramme. L'activité anti-inflammatoire par la méthode de Levy et l'activité antalgique par le test de la torsion (**Writhing test**).

V.1 Activité antioxydante

La mise en évidence du pouvoir antioxydant de nos échantillons est réalisée par trois tests chimiques [89], chacun de ces tests correspond à un des trois mécanismes de réaction qui sont :

- Mécanisme de réaction HAT « transfert d'atome d'hydrogène » réalisé par la méthode de β carotène.
- Mécanisme de réaction SET « simple transfert d'électron » réalisé par la méthode de FRAP « ferricréducing antioxydant ».
- Mécanisme de réaction HAT et SET à la fois réalisé par la méthode de DPPH « 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazole ».

V.1.1 Méthode de piégeage du radical DPPH

V.1.1.1 Principe

Le principe de cette méthode, tel qu'il est décrit par BOIS et coll. En 1958 [90], est basé sur la mesure du piégeage du radical libre DPPH (Diphénylpicrylhydrazyl) en solution dans l'éthanol ou le méthanol. Ce dernier possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Figure V-15). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères et le DPPH reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. Cette délocalisation donne également lieu à la couleur violette foncé, caractérisé par une absorbance en solution d'éthanol centré à environ 517 nm.

L'addition d'un antioxydant qui peut céder un atome d'hydrogène ou un électron libre conduit à la formation de la forme réduite DPPH-H (2) avec une décoloration de la solution. Cette décoloration est directement proportionnelle à la capacité antioxydante du produit ajouté. Elle peut être suivie par spectrophotométrie en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm. Cette méthode fournit donc un moyen pratique de mesurer l'activité antioxydante de nos échantillons.

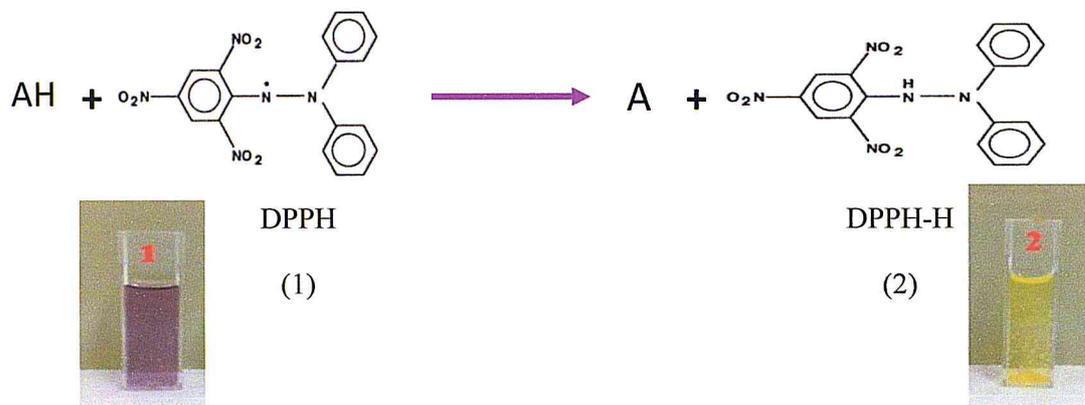


Figure V-17 : Réaction de réduction du DPPH en présence d'un antioxydant AH.

Les résultats de l'activité de piégeage du radical libre DPPH par des composants de notre huile ainsi que l'huile sont donnés dans le tableau V-15 et illustrés sur la figure V-19.

Tableau V-15 : Absorbance à 517 nm des solutions des composants de notre huile ainsi que l'huile lors du test de l'activité de piégeage du radical libre DPPH.

Composés de l'huile	Concentration en mg/ml	Abs à 517 nm	Activité (%)
Linalol	0	0,5259	0
	5	0,5140	2,2628
	12,5	0,4820	8,3476
	25	0,4683	10,9527
	37,5	0,4385	16,6191
	50	0,4084	22,3427
	75	0,3525	32,9720
	100	0,2774	47,2523
	125	0,2249	57,2352
Ocimène	0	0,5259	0,0000
	1,25	0,5179	1,5212
	2,5	0,4181	20,4982
	5	0,3458	34,2461
	7,5	0,1846	64,8983
	10	0,1045	80,1293
	12,5	0,0896	82,9625
	18,75	0,0649	87,6593
	25	0,0714	86,4233
Carvacrol	0	0,5259	0
	0,1	0,4055	22,8940
	0,2	0,3271	37,8018
	0,3	0,3271	42,3844
	0,4	0,2343	55,4478
	0,5	0,1995	62,0650
	0,6	0,1897	63,9285

	0,75	0,1567	70,2034
	1	0,1108	78,9313
	2	0,1086	79,3496
α -pinène	0	0,5259	0
	5	0,4938	6,1038
	12,5	0,4654	11,5040
	25	0,4300	18,2354
	37,5	0,3944	25,0047
	50	0,3893	25,9681
	62,5	0,3752	28,6556
	75	0,3591	31,7170
	100	0,3575	32,0212
	125	0,3326	36,7560
	150	0,3186	39,4181
	p-cymène	0	0,5259
5		0,4966	5,5714
12,5		0,4462	15,1549
25		0,3813	27,4957
37,5		0,3499	33,4664
50		0,3134	40,4069
75		0,288	45,2367
100		0,226	57,0260
125		0,1955	62,8256
150		0,1826	65,2785
Thymol	0	0,5259	0
	0,1	0,4533	13,8049
	0,2	0,3487	33,6946
	0,3	0,3139	40,3118
	0,4	0,2774	47,2523
	0,5	0,2399	54,3829
	0,6	0,2214	57,9007
	0,75	0,2063	60,7720
	1	0,1713	67,4272
	2,5	0,0866	83,5329
β -pinène	0	0,5259	0
	5	0,4472	14,9648
	10	0,3653	30,5381
	20	0,2988	43,1831
	25	0,2684	48,9636
	37,5	0,2156	59,0036
	50	0,1758	66,5715
	75	0,1434	72,7324
	100	0,141	73,1888
	125	0,1134	78,4369
Eugenyl acétate	0	0,5259	0,0000
	1	0,3561	32,2875
	2	0,2815	46,4727
	3	0,2295	56,3605
	5	0,2088	60,2966

	10	0,1342	74,4818
	15	0,1177	77,6193
	25	0,0497	90,5495
Huile brute	0	0,4712	11,6086
	0,00039	0,4178	22,9414
	0,00117	0,3734	32,3641
	0,00195	0,2809	51,9949
	0,0039	0,1889	71,5195
	0,0078	0,0967	91,0865
	0,0156	0,0549	99,9575
	0,0195	0,0403	103,0560

Afin de situer l'activité antioxydante de nos composés et celle de notre huile, nous avons fait une étude comparative entre leur activité et celle de quatre antioxydants de référence à savoir : le guaiacol, la vitamine C, le BHA et BHT. La variation de cette activité en fonction de leurs concentrations est donnée dans le tableau V-16 et représentée dans la figure.

Tableau V-16 : Absorbance à 517 nm des solutions des antioxydants de références lors du test de l'activité de piégeage du radical libre DPPH.

Composé de référence	Concentration en mg/ml	Abs à 517 nm	Activité (%)
Guaiacol	0,01	0,4229	19,5855
	0,02	0,3300	37,2504
	0,025	0,2734	48,0129
	0,04	0,1331	74,6910
	0,05	0,1121	78,6842
	0,1	0,0927	82,3731
	0,2	0,0936	82,2019
	0,3	0,0641	87,8114
	0,4	0,0587	88,8382
	0,5	0,0531	89,9030
	0,6	0,0641	87,8114
	0,75	0,0517	90,1692
	1	0,0628	88,0586
Vit C	0	0,5259	0
	0,0005	0,439	16,3972
	0,001	0,344	33,8277
	0,004	0,034	93,0278
	0,005	0,03	94,1053
	0,006	0,029	94,5490
	0,008	0,029	94,5490
	0,01	0,029	94,5490
	0,02	0,029	94,5490
	0,03	0,029	94,5490
	0,04	0,029	94,5490
BHA	0	0,5259	0
	0,0005	0,518	1,5021
	0,002	0,44	16,3339
	0,004	0,356	32,3065

	0,006	0,282	46,3776
	0,008	0,219	58,3571
	0,01	0,175	66,7237
	0,02	0,136	74,1395
	0,03	0,083	84,2175
	0,04	0,077	85,3584
BHT	0	0,0000	0
	0,0005	2,5003	7,7771
	0,002	10,0010	12,4675
	0,004	20,0020	35,2221
	0,006	30,0030	43,9056
	0,008	40,0040	50,2440
	0,01	50,0050	57,4697
	0,02	100,0100	70,2731
	0,03	150,0150	77,1185
	0,04	200,0200	81,1751

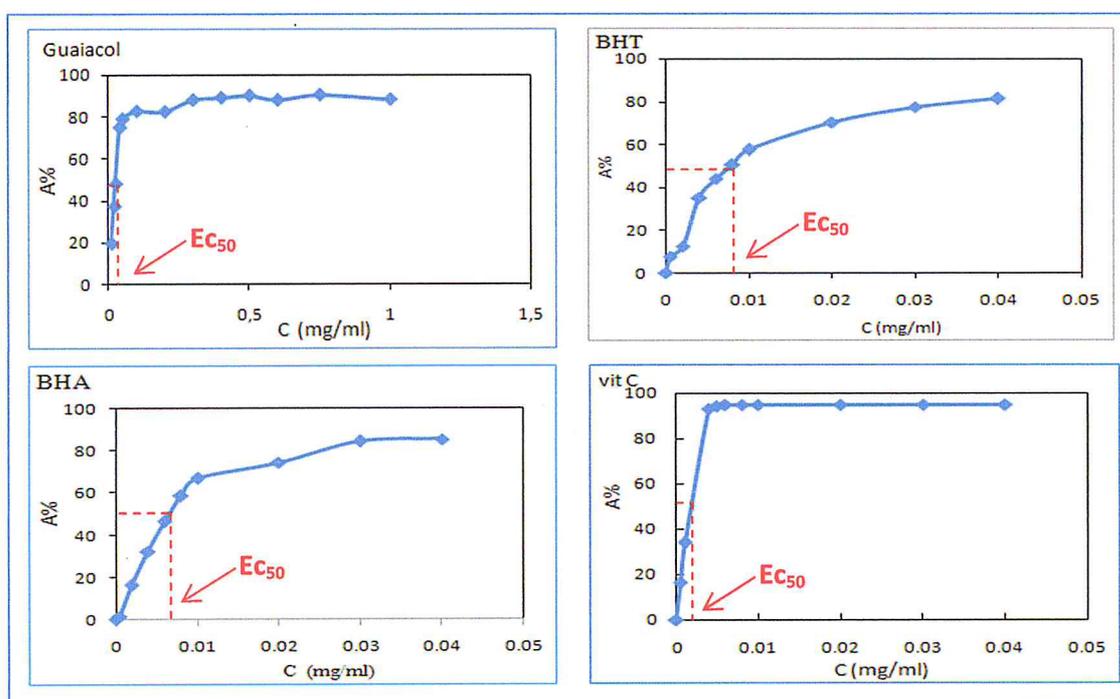


Figure V-18: variation de l'activité de piégeages du radical libre DPPH en fonction de la variation de la concentration des antioxydants de référence.

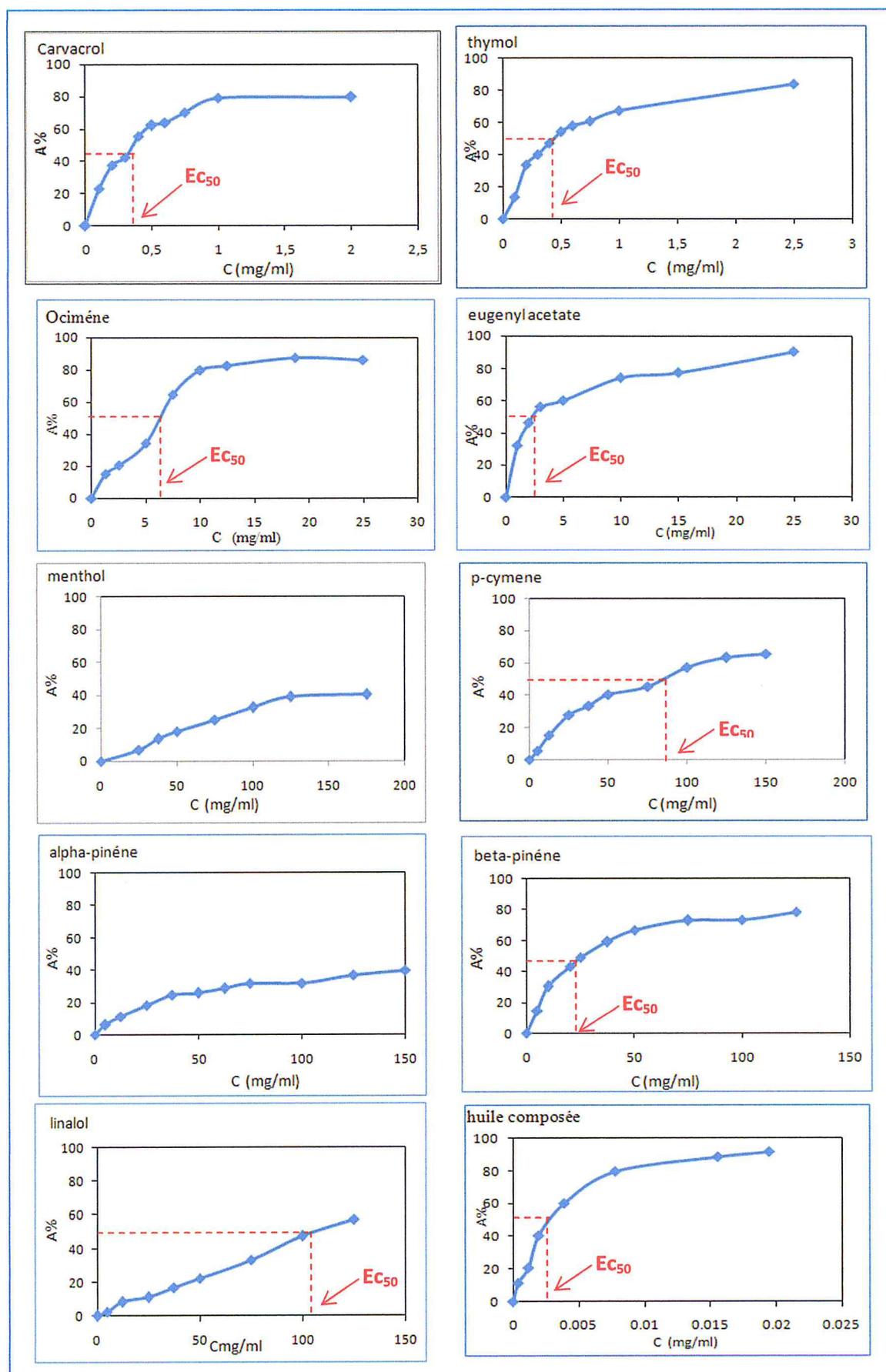
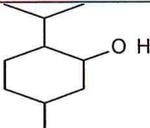
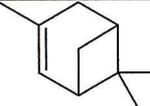
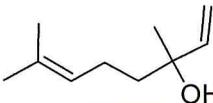
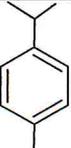
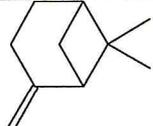
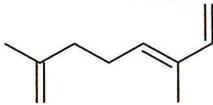
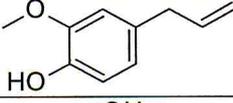
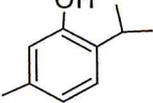


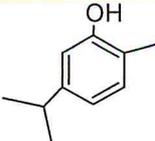
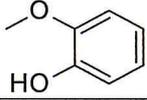
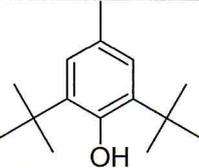
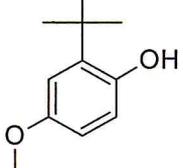
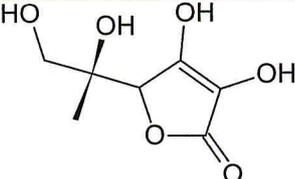
Figure V-19 : variation de l'activité de piégeages du radical libre DPPH en fonction de la variation de la concentration des différents composants de l'huile préparés.

On remarque que l'activité du piégeage du radical libre DPPH varie selon la structure des composés testés. Cela se traduit par la variation de l'intervalle des concentrations qui donne une activité. On peut regrouper ces intervalles en trois groupes, le premier manifeste une activité à des concentrations qui varie entre 0 et 200 mg/ml et c'est le cas du menthol, α -pinène, β -pinène, p-Cymène et linalol. Le deuxième groupe contient l'ocimène et l'eugenyl acétate qui présentent le pouvoir antioxydant dans l'intervalle de 0 à 30mg/ml. Le troisième groupe contient le carvacrol et le thymol qui sont active dans l'intervalle de 0 à 3 mg/ml. Les antioxydants de référence présente une activité à des concentrations allant de 0 à 1 mg/ml. Alors que le limonène et le camphor ne présente aucune activité même à des concentrations supérieure à 200mg/ml. Le Myrcene donne une suspension dans l'éthanol, donc son activité antioxydante ne peut être testée par cette méthode.

Pour faire une étude comparative de l'activité de tous les composés, nous avons déterminé la valeur de la concentration effective qui donne 50% de l'activité de piégeage du radical DPPH (CE_{50}) de chaque échantillon. Ces dernières sont regroupées dans le tableau 5.

Tableau V-17: Valeurs de la concentration effective qui donne 50% de l'activité de piégeage du radical DPPH (EC_{50}) des échantillons étudiés.

Echantillon	Structure chimique	EC_{50} (mg/mL)
Menthol		Sup à 180
α -pinène		Sup à 160
Linalol		106,65
p-cymène		85,48
β -pinène		25
Ocimène		6,33
Eugenyl acétate		2,28
thymol		0,435

Carvacrol		0,3552
mélange	/	0,0019
guaïacol		0.02
BHT		0,008
BHA		0,006
Vit C		0.0016

La capacité antioxydante d'un composé est autant plus élevée que son E_{C50} est petite. L'analyse du tableau V-17 montre que les antioxydants de référence présentent les plus faibles valeurs d' E_{C50} . Cela signifie que leur pouvoir antioxydant est plus important que les composants de notre huile.

Les composés les plus actives parmi les composants de notre huile sont le carvacrol et le thymol. Cette activité peut être attribuée à la fonction phénolique. En effet, si on compare l'activité de ces deux composés au limonène et menthol et p-cymène (figure V-18) on remarquera que ce dernier présente la même structure que le thymol et le carvacrol mais sans la fonction phénol et cela a augmenté son E_{C50} à 85,48 mg/ml. D'autre part, si on analyse la structure du menthol. On remarque qu'il présente la même structure que le thymol mais sans le cycle benzénique et cela a augmenté son E_{C50} à plus de 180 mg/ml.

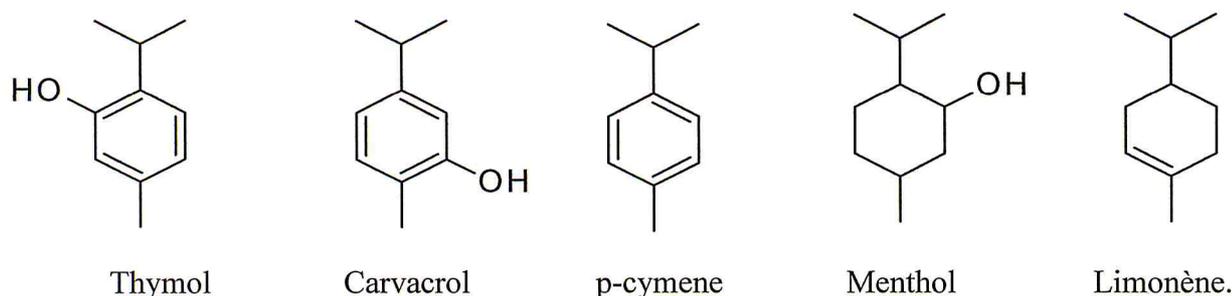


Figure V-20: structure chimique du thymol, carvacrol, p-cymene, menthol et limonène.

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés en bibliographie où il est décrit que les composés phénoliques ont de très bonnes propriétés antioxydantes. En raison de leur capacité à piéger les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène. Les radicaux intermédiaires phénoxy ($\text{PO}\cdot$) sont relativement stables en raison de la résonance et donc une nouvelle réaction en chaîne n'est pas facile à initier (figure V-21) [91].

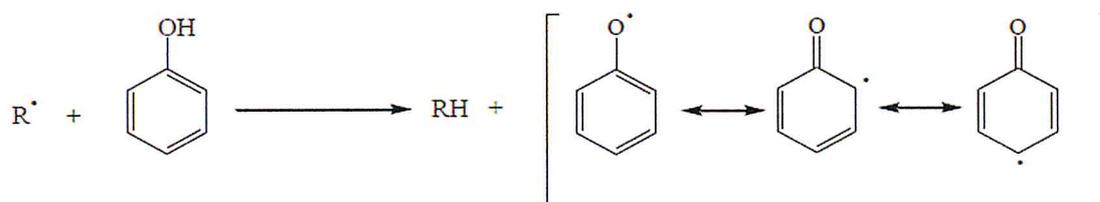


Figure V-21 : mécanisme d'action des antioxydants phénolique

Par ailleurs, ils peuvent agir avec d'autres radicaux libres selon la réaction:



Le troisième composé le plus actif parmi les composants de notre huile est l'eugénol acétate. Il présente la même structure chimique que le gaïacol avec un groupement prop-2-enyl en para (figure V-22) et c'est ce qui a peut-être fait augmenter son EC_{50} de 0,02 à 2,28 mg/ml.

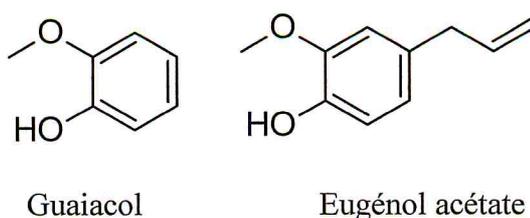


Figure V-22: structure chimique du guaiacol et l'eugénol acétate.

D'autre part, la présence du groupement méthoxy en position méta de la fonction hydroxy du phénol augmente largement son activité. Cela peut être expliqué par la stabilité du radical libre par résonance comme le montrent les formes limites suivantes:

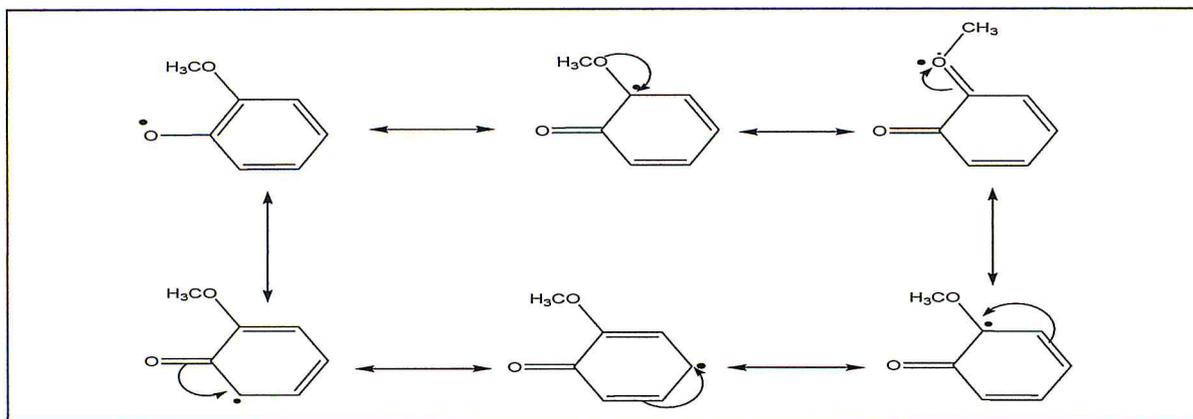


Figure V-23 : formes limites montrant la stabilité du radical phénoxy par le groupement méthoxy adjacents.

Le myrcène et l'ocimène sont des isomères de position, ces deux composé donnent la même activité à des petites concentrations (15% d'activité à 5mg/ml). Seulement à des grandes concentrations le myrcène devient insoluble et l'analyse devient impossible par spectrophotométrie UV-Visible. L'activité antioxydante du l'ocimène est du au à la présence des hydrogène mobile qui seront par la suite stabilisé par résonnance. L'importance de la résonance se traduit par la diminution de l'activité de linalol qui présente la même structure que l'ocimène avec un hydroxyle à la place de la double liaison conjuguait. L'hydrogène de la fonction hydroxyle est en principe plus mobile seulement ce dernier ne sera pas stabilisé par résonance et donne une activité inferieure. Aussi le passage de la forme aliphatique de l'ocimène à la forme cyclique n'améliore pas cette activité puisque on obtient des E_{C50} supérieure avec le α et β -pinène

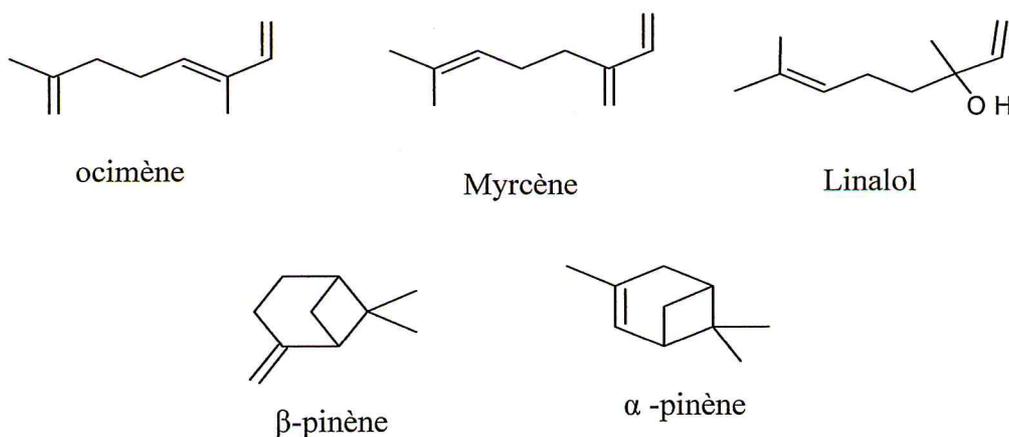


Figure V-24: structure chimique de l'ocimène, myrcène, linalol, β -pinène, et α -pinène

La valeur d' E_{C50} de l'huile montre l'effet synergique positif et important du mélange. En effet cette valeur est inférieure à celle du carvacrol, le composé le plus actif dans le mélange. Alors que sa concentration dans le mélange est de l'ordre de trace. Le tableau suivant donne les concentrations des différents composants dans le mélange à la concentration d' E_{C50} de l'huile.

Tableau V-18: masse des différents composants dans l'huile brute à la concentration d' E_{C50} .

composés	Masse des composés (mg/ml)
camphor	0,00015777
carvacrol	0,00014803
Thymol	0,00014803
limonène	0,00014218
menthol	0,00015484
β -pinène	0,00013439
α -pinène	0,00013537
Myrcene	0,00010907
ocimene	0,00014705
linalol	0,00015582
p-cymene	0,00013147
camphene	0,0001305
Eugenyl acétate	0,00020548

V.1.2 La méthode FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

V.1.2.1 Principe

C'est une méthode universel, le principe de cette méthode crier par « Oyaizu, 1986 » est basé sur la réduction du fer ferrique Fe^{3+} présent dans le complexe ferrocyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ en fer ferreux Fe^{2+} . La réaction est révélée par le virage de la couleur jaune du fer ferrique en couleur bleu vert du fer ferreux. Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant l'absorbance à 700nm et en surveillant l'augmentation de l'intensité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel. Une augmentation de l'absorbance du milieu réactionnel à 700 nm correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des antioxydants testés. Les résultats du test FRAP sur nos composés sont donnés dans le (tableau V-19).

Tableau V-19 : Absorbances des constituants de notre huile lors du test de l'activité par la méthode FRAP à 700nm.

Composés/ Blanc	Abs1	Abs2	Abs moy
Blanc	0,0791	0,0813	0,0802
camphor	0,1369	0,1374	0,1371
menthol	0,1508	0,1560	0,1534
Linalol	0,1985	0,2010	0,19975
myrcène	0,3416	0,1906	0,2661
p-cymene	0,2679	0,2740	0,27095
Beta-pinène	0,4158	0,4866	0,4512
limonène	0,7368	0,6889	0,71285
Eugenyl acétate	1,1859	1,3249	1,2554
Alpha-pinène	1,3576	1,3896	1,3736
Ocimène	1,4962	1,5158	1,506
Carvacrol	1,7236	1,8185	1,77105
guaiacol	1,8374	1,9065	1,87195
thymol	1,8844	1,9017	1,89305

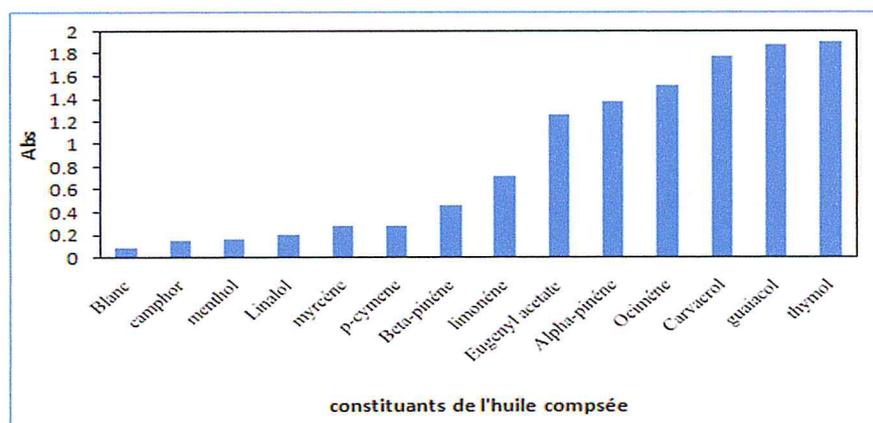


Figure V-25: Histogrammes comparatifs de l'absorbance des composants de notre huile lors du test FRAP

Les résultats du test FRAP montre que tous ces composés présentent un effet réducteur du fer ferrique en fer ferreux. Cela se traduit par la différence de l'absorbance du blanc et les autres composants. D'autre part, on remarque que l'activité par cette méthode ne suit pas le même classement que celui de la méthode DPPH. Cela peut être interpréter par la différence du mécanisme d'action. On remarque aussi, comme pour la méthode DPPH, Les composés phénoliques présentent l'activité la plus importante.

V.1.3 Méthode de la β -carotène

V.1.3.1 Principe

Cette méthode se base sur la décoloration de la β -carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique. La dispersion de l'acide linoléique et du β -carotène dans la phase aqueuse est assurée par du Tween 40. L'addition d'antioxydant induit un retard de la cinétique de la décoloration du β -carotène. Cette méthode est sensible, rapide et simple s'agissant d'une mesure spectrophotométrique dans le visible. La couleur jaune si elle persiste, indiquent la présence de substances antioxydants [92]. Cette méthode a été appliquée sur tout les composants de notre huile, seulement l'apparition d'une turbidité après l'agitation des solutions n'a pas permis la lecture des résultats. Donc cette méthode n'est applicable a nos produits aux concentrations utilisés.

V.2 Résultats de l'Activité antimicrobienne

Nous avons étudié in vitro le pouvoir antibactérien de notre mélange à la dose de 45 μ l, par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé. Le pouvoir antimicrobien de nos échantillons est obtenu par la mesure des diamètres des zones d'inhibition (mm).

Les diamètres de la zone d'inhibition observée après 24h d'incubation à 37°C pour les bactéries et 48h pour la levure sont illustrés par la figure V-22, et résumés dans le tableau suivant.

Tableau V-20 : Diamètres des zones d'inhibition des souches microbienne.

Souches	Espèces bactériennes utilisées	Diamètre d'inhibition (mm)
Bactéries	<i>Escherichia coli</i>	45 mm
	<i>Staphylococcus aureus</i>	12 mm
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9 mm
	<i>Bacillus ceureus</i>	9 mm
champignons	<i>Aspergillus flavus</i>	9 mm
levures	<i>Candida albicans</i>	52 mm

Après l'incubation, nous remarquons l'apparition des zones d'inhibition avec des diamètres différents qui entourent les disques imprégnés du mélange de composés volatiles, cela s'explique par le fait que les souches bactériennes, sont plus au moins sensibles vis-à vis de notre échantillon.

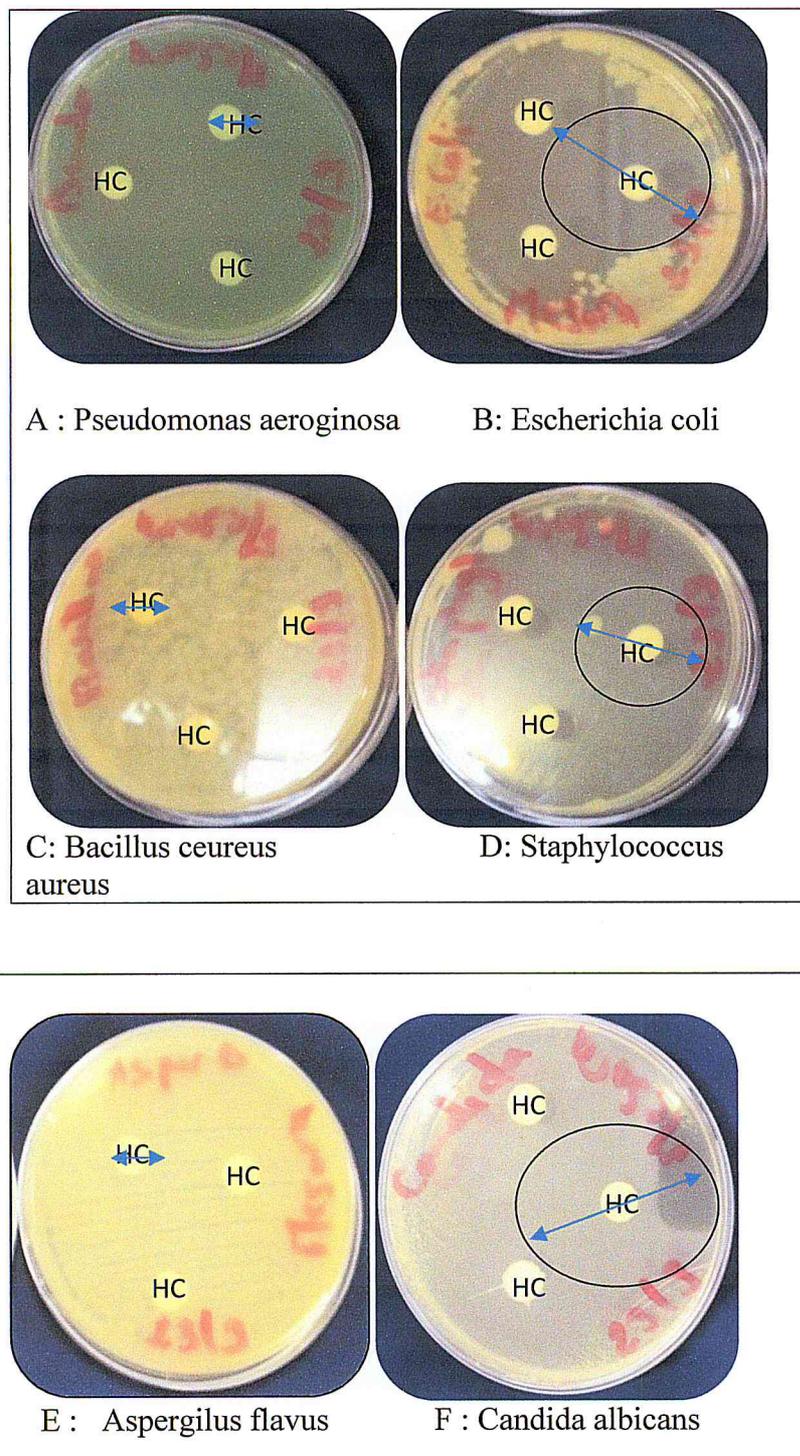


Figure V-26 : Aromatogrammes des bactéries testées avec notre mélange de composés volatiles.

V.2.1 Activité antibactérienne

D'après le tableau 6 et la figure, nous remarquons que :

- La bactérie *Escherichia coli* est extrêmement sensible au mélange de composés volatiles, avec une zone d'inhibition de 45mm.
- La bactérie *Staphylococcus aureus* est moins sensible, elle présente une zone d'inhibition de 12 mm.
- *Pseudomonas aeruginosa* a manifesté une résistance élevée vis-à-vis de notre mélange, marqué par une absence totale de la zone d'inhibition.
- La bactérie *Bacillus cereus* est très résistante par rapport à notre mélange.

L'activité biologique d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques et à leurs effets synergiques.

En effet, la force et le spectre d'activité antimicrobienne varient selon le type d'huile essentielle et le Gram des bactéries. Cependant, les bactéries à Gram positif sont généralement les plus sensibles. La résistance générale plus élevée chez les bactéries à Gram négatif est attribuée à la présence d'une membrane externe imperméable aux composés lipophiles.

L'absence de cette barrière chez les bactéries à Gram positif permet le contact direct des constituants hydrophobes des extraits avec la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire bactérienne.

Ainsi :

Plusieurs auteurs (Cox et al, [93], Panizzi et al, [94], ont travaillé sur l'activité antimicrobienne des composés majoritaires des HE. Qu'ils ont classés dans l'ordre décroissant suivant :

Phénols>alcools>aldéhydes>cétones>éthers>hydrocarbures.

(Bourkhiss et al,) [95] ont mis en évidence l'effet inhibiteur de l' α -pinène.

D'autres études ont reporté l'effet antibactérien de ces terpènes sur les bactéries Gram - tel que *E. coli* [96]. Ils ont montré l'influence de la composition des huiles essentielles en monoterpènes et sesquiterpènes sur leurs activités. Ainsi, l'effet de l' α -pinène varie selon l'abondance de cette famille de composés. Cela a été attribué à la synergie entre les composés [97].

Généralement le β -pinène exerce un effet antibactérien considérable, spécialement contre *Staphylococcus aureus* et autre Gram⁺. Takikawa et al, [98] ont montré que, le β -pinène possède une efficacité contre les souches pathogènes d'*E. Coli*, mais cette activité est inférieure à celle contre les souches non pathogènes.

Dans une étude sur l'activité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles de deux thymus marocains [99] :

- *Thymus ciliatus* : composés principalement par le thymol (44,2%) et β -E-ocimène (25,8%) et α -terpinène (12,3%).
- *Thymus algeriensis* : composée de comphor (27,7%) et le α -pinène (20,5%).

Les deux huiles essentielles se sont montrées actives contre les bactéries testés (*S. aureus* et *E. coli*). Mais c'est l'huile essentielle de *T. ciliatus* qui a manifesté le plus grand pouvoir antimicrobien grâce à sa richesse en thymol.

Selon Remmalt et al [100], l'huile essentielle de l'origan *vulgaris* riche en carvacrol (49,1%) et l'huile essentielle de *thymusvulgaris* riche en thymol (67,3%) représentent approximativement le même spectre d'activité antibactérienne contre *E.coli*, et *S.aureus*. De même, Benabid et al [101], en étudiant l'huile essentielle de l'origan *vulgaris* composée principalement de thymol (32,4%) et de carvacrol (16,7%), on relevé une grande activité inhibitrice (zone d'inhibition >10mm et <20mm) contre *E.coli* et *pseudomonas aereuginosa*.

Plusieurs auteurs : Pellecuer et al. [102], Gergis et al. [103], Satrani et al. [104] ont montré que les huiles essentielles riches en dérivés phénoliques (carvacrol et thymol) possèdent une forte activité antimicrobienne.

Dorman et al. [105] ont démontré que le thymol est le composé qui possède le plus large spectre d'activité antibactérienne. Des études réalisées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), ont également montré que ce constituant possède une forte activité antifongique et antibactérienne contre de nombreuses espèces y, compris *Aspergillus sp.*, *S. aureus* et *E. coli*.

Lambert et al. [106] et Juven et al. [107] ont expliqué ce phénomène par le fait que le thymol se lie aux protéines membranaires et fait augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire bactérienne. D'autres travaux ont suggéré aussi que ce composé volatil est responsable de l'inactivation d'enzymes, y compris ceux impliqués dans la production d'énergie et la synthèse des constituants de structure.

V.2.2 Activité antifongique

Notre huile composée a été testé sur une levure à savoir, *Candida albicans* et sur un champignon *Aspergillus flavus* afin d'évaluer son pouvoir antifongique.

Les résultats illustrés sur la figure V-26 montrent que les organismes testés "*Aspergillus flavus*" poussent sur toute la surface de la gélose, ce qui indique que notre mélange n'a pas d'activité antifongique sur ce germe. Tant disque, la levure *candida albicans est* extrêmement sensible vis-à-vis de notre mélange qui a donné une zone d'inhibition de 52mm. Cette activité antifongique de notre huile peut être expliquée par sa richesse en composés phénols terpéniques, comme le thymol et le carvacrol. Ces dernier agissent comme des antiseptiques et antimicrobiens. (Arras et al. De Billerbeck et al. [108]. On trouvé le même résultat concernant *Condida albicans*.

Ainsi, les phénols terpéniques des huiles essentielles provoquent, contre les champignons, plusieurs dégâts tels que des perturbations morphologiques des hyphes

mycéliens, la rupture de la membrane plasmique et l'altération de la structure des mitochondries (Arras et al. [108] ; De Billerbeck et al. [108]).

Sauf que, l'étude réalisée par l'Organisation Mondiale de la Santé OMS, [109], à montrer que le thymol possède une forte activité antifongique contre : *Aspergillus* sp. Cette différence entre les résultats, concernant l'activité antifongique, ne peut être liée qu'à la composition chimique, aux groupements fonctionnels des composés majoritaires et minoritaires et à leurs effets de synergie ;

En fin, on peut dire que les composés phénoliques présentent le plus large spectre d'activité antibactérienne. Ils entraînent notamment des lésions irréversibles sur les membranes et sont utiles dans les infections bactériennes, virales et parasitaires, quelle que soit leur localisation. Le thymol et l'eugénol sont responsables des activités fongicides et bactéricides des huiles essentielles qui en contiennent. La molécule de thymol exerce un effet inhibiteur et létal sur différentes souches et, parmi elles, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, sur lesquelles elle provoque des fuites d'ions potassium. Par contre, elle est moyennement active sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Les alcools avec 10 atomes de carbone (ou monoterpénols) viennent immédiatement après les phénols, en terme d'activité, avec les géraniols, linalol, thujanol, myrcénol, terpinéol, menthol et pipéritol pour les plus connus. Les aldéhydes sont également quelque peu bactéricides. Les plus couramment utilisés sont le néral et le géraniol (des citrals), le citronnellal et le cuminal.

Les groupes moléculaires avec les plus puissantes actions antibactériennes sont également des antifongiques efficaces mais ils doivent être utilisés sur de plus longues périodes. Des études fondamentales ont également montré que les alcools et les lactones sesquiterpéniques avaient une activité antifongique [109].

V.3 Résultats de l'activité anti-inflammatoire in vivo

Après l'administration de l'eau physiologique, le produit de référence (Clofénal), et notre huile composée à des souris chez les quelles, nous avons provoqué une inflammation, par l'injection de la carraghénine à 1%, dans la surface plantaire des pattes postérieure.

Nous avons mesuré les poids des pattes postérieures en (g) chez les trois lots.

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau V-21 et illustrés par la figure V-27 et V-28.

Tableau V-21 : Résultats de l'activité anti-inflammatoire.

Témoin (Eau physiologique)		La référence (Clofénal)		Mélange (produit à tester)	
Poids pattes gauches (g)	Poids pattes droites (g)	Poids pattes gauches (g)	Poids pattes droites (g)	Poids pattes gauches (g)	Poids pattes droites (g)
0,158	0,144	0,173	0,130	0,156	0,146
0,193	0,155	0,164	0,150	0,170	0,139
0,220	0,162	0,149	0,131	0,137	0,126
0,190	0,146	0,169	0,158	0,158	0,160
0,247	0,162	0,163	0,138	0,130	0,138
0,207	0,158	0,147	0,121	0,129	0,123
La moyenne =0,203	La moyenne =0,154	La moyenne =0,160	La moyenne =0,138	La moyenne =0,146	La moyenne =0,138
% d'œdème= 31,82%		% d'œdème=15,94%		% d'œdème=5,79%	
		% de réduction de l'œdème =50%		% de réduction de l'œdème =81,80%	

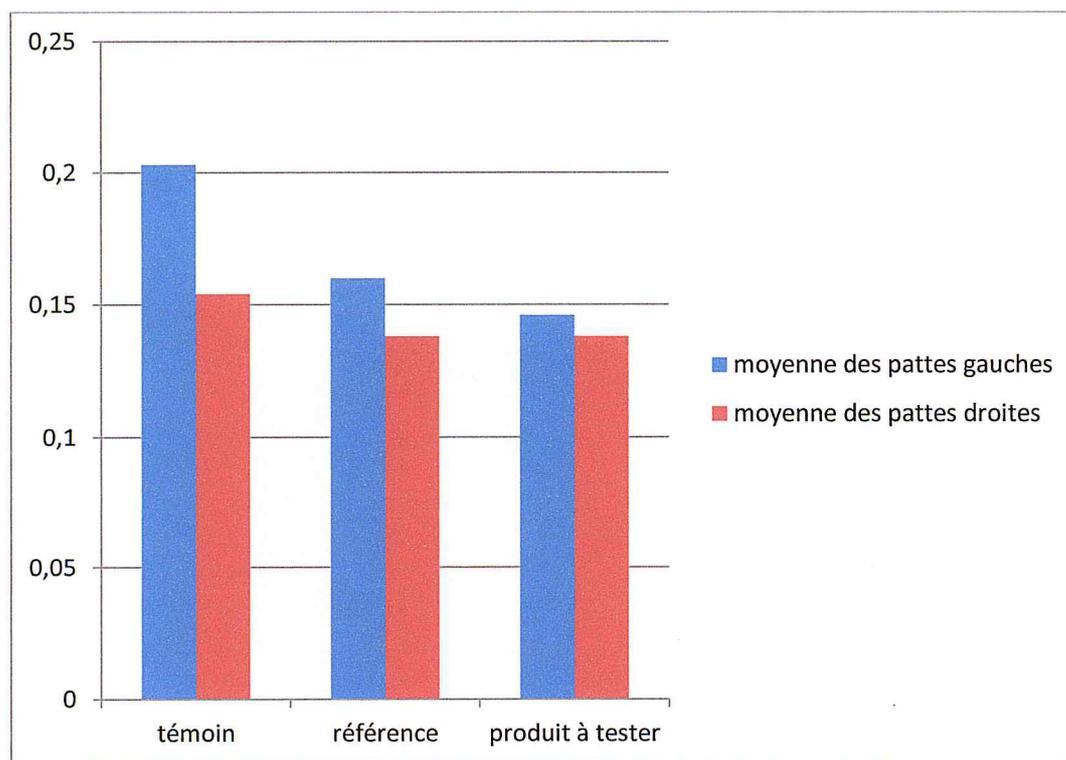


Figure V-27 : La moyenne des poids des pattes gauches et droites pour les trois lots.

Le pourcentage d'œdème et de réduction d'œdème pour les trois lots sont reportés dans la figure V-28.

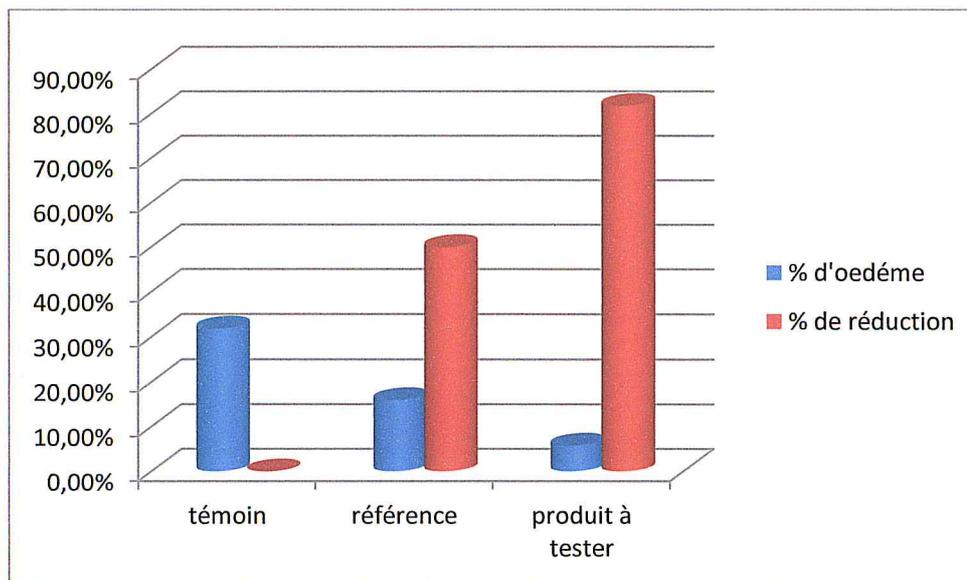


Figure V-28 : Le pourcentage d'œdème et de réduction d'œdème pour les lots : témoin ; essai1 et référence.

Après 30min de l'expérimentation, l'administration par la voie orale de la carraghénine, entraîne une augmentation significative du volume des pattes gauches par rapport aux pattes droites, que se soit pour le groupe des souris témoins, du groupe standard ou celle du groupe traités par notre huile. Ceci prouve que la carraghénine induit une réaction inflammatoire engendrant un œdème.

Nous avons constatés la formation d'œdème (figure 34) chez les trois lots comme suit :

- Lot témoins : formation d'œdème à 31,82%
- Lot traité par le produit de référence (Clofénal®) : formation d'œdème à 15,94%
- Lot traité par l'huile composée : formation d'œdème à 5,79%,

Dans les quatre heures qui ont suivi le traitement, nous avons remarqué que 0,5ml de notre mélange induit un taux de réduction d'œdèmes de 81,80%. Ce taux est fortement supérieur à celui obtenue par le Clofénal®. En effet, ce dernier a provoqué une réduction d'œdèmes de 50% (figure V-28).

Au regard de ces résultats, il est claire que notre huile composée possède des effets anti-inflammatoires attribués à son contenu en composés volatiles, en particulier les monoterpènes par exemple, α -pinène, β -pinène, le carvacrol, le limonène ainsi de suite.

Ceci est en parfaite accord avec les résultats de De Bonjardim ; Guimarães et al. [110]. Ils ont montrés que les monoterpènes, composés majoritaires des huiles essentielles, contiennent des propriétés thérapeutiques, antalgique et anti-inflammatoire.

Aussi, les études menées par Bonjardim et al. [110]; on démontré que le p-cymene est capable de produire des effets antalgique et anti-inflammatoire chez les souris.

V.4 Résultats de l'activité antalgique

L'activité antalgique, de notre huile composée, a été évaluée par le dénombrement des crampes ou des contractions abdominales induites chez les souris par injection intrapéritonéale de l'acide acétique. Les résultats obtenus de cette étude sont indiqués dans le Tableau V-22.

Tableau V-22: Activité antalgique, exprimée par le nombre de contractions en dix minutes.

Nombre de souris	Témoin	Référence	Essai
S1	42	1	16
S2	21	1	20
S3	10	0	13
S4	39	2	1
S5	25	1	1
S6	19	1	20
Moyenne de crampes	26	1	11,83
% de protection		96,15	54,5

D'après les résultats du tableau ci-dessus, il apparait que le lot de souris traitées avec le médicament (témoin positif) présente le nombre de contractions le plus faible (1 spasmes par 10 minutes). En revanche, le lot traité avec l'eau physiologique (témoin négatif) présente le nombre de contractions le plus élevée (26 spasmes par 10 minutes). Concernant notre échantillon, le nombre de contractions est égal à 12 spasmes. La moyenne des crampes chez les trois lots sont reportés dans la figure V-29.

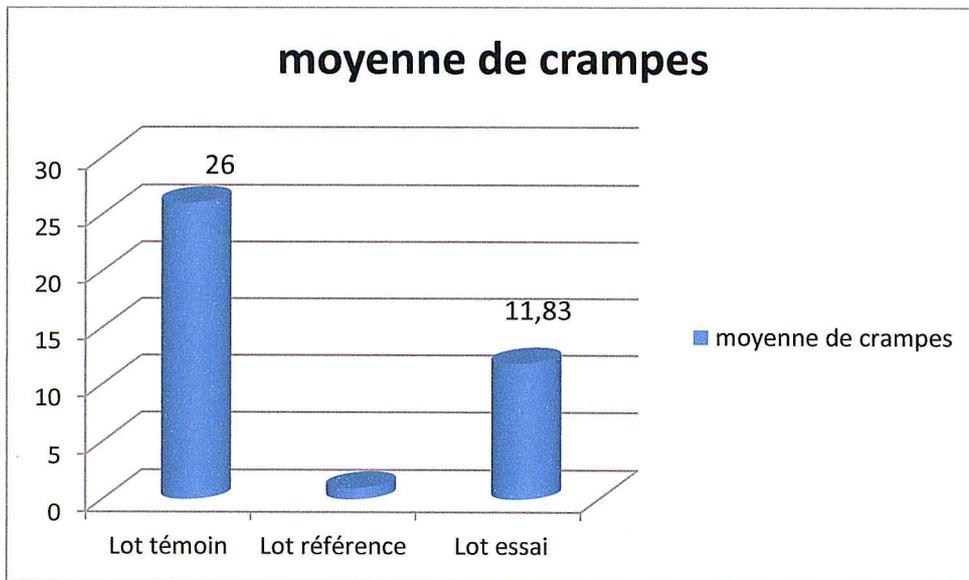


Figure V-29: La moyenne des crampes chez les souris Témoin, Référence, Essai pendant 10 mn.

Le pourcentage de protection des souris de trois lots sont reportés dans la figure

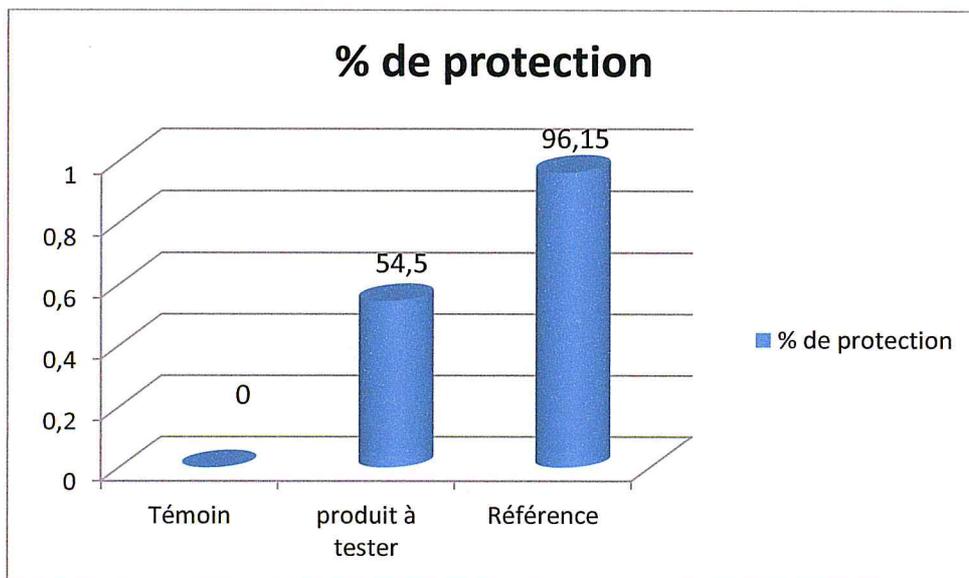


Figure V-30 : Le pourcentage de protection des souris de lot Témoin, produit à tester, Référence.

Nous observons que, 0,5 ml de l'huile composée induit un pourcentage de protection égale à 54,5%. Celui obtenu par le traitement à base du produit de référence Spasfon® et de 96,15%, pour le témoin on obtient 0% de protection, ce qui explique que notre mélange étudiée présente un pouvoir de protection contre les douleurs provoqué chimiquement.

A l'égard de ces résultats, nous pouvons stipuler que notre huile composée possède un pouvoir analgésique assez appréciable par rapport au produit de référence.

Toutefois, il nous reste à tester notre huile pour des doses plus faible en déterminant sa dose létale.

Conclusion générale

Le but de ce travail est la formulation d'une huile composée dont la composition est facile à reproduire. Cela dans le but d'avoir une huile avec une composition fixe tout au long de la recherche d'un procédé d'encapsulation des huiles essentielles.

Pour la formulation de cette huile, nous avons rassemblé treize composés dont sept sont des carbures monoterpéniques (Limonène, α -pinène, β -pinène, P-cymène, Myrcène, Camphène, Ocimène), quatre des alcools monoterpéniques (Menthol, Linalol, Carvacrol, Thymol), une cétone monoterpénique (Camphor) et un phénylpropènes (Eugenyl acétate).

Notre recherche a montré que ces composés représentent les composés majoritaires des huiles essentielles de plusieurs plantes usuelles. Ils présentent aussi, plusieurs activités biologiques intéressantes.

L'analyse préliminaire, de l'huile brute, par chromatographie gazeuse n'a pas permis la séparation de tous ses composés, il reste à déterminer les meilleures conditions pour cela.

La comparaison du chromatogramme de l'huile brute avec celui de l'huile traité avec le SDS, a montré une différence dans la composition chimique. Cela nous laisse espérer avoir de meilleurs résultats avec l'encapsulation par les cyclodextrines.

L'activité antioxydante par la méthode de piégeage du radical libre DPPH des différents composants de l'huile, varie selon la structure chimique de ces derniers. Les produits phénoliques sont les plus actives. Mais leur activité reste inférieure à celle des antioxydants de références (BHT, BHA, vit C et guaiacol). L'activité du mélange par cette technique montre un effet synergique positif très important.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a montré que la bactérie *Escherichia coli* est extrêmement sensible à notre huile composée, avec une zone d'inhibition de 45 mm. De même, la levure *candida albicans* est extrêmement sensible vis-à-vis de notre mélange qui a donné une zone d'inhibition de 52 mm.

Aussi, notre huile composée possède un effet anti-inflammatoire attribué à son contenu en composés volatiles, en particulier les monoterpènes. Nous avons remarqué un taux de réduction d'œdèmes de 81,80%. Qui est largement supérieur à celui obtenue par le Clofénal®. En effet, ce dernier a provoqué une réduction d'œdèmes de 50%. Et un pouvoir analgésique assez appréciable par rapport au produit de référence puisque, l'huile composée induit un pourcentage de protection égale à 54,5%.

Toutefois, il nous reste à tester notre huile pour des doses plus faibles en déterminant sa dose létale.

Référence bibliographique

- [1] : Pharmacopée européenne : Huiles essentielles - Aetherolea. 2098, (2008).
- [2] : Norme ISO 9235 :1997, Matières premières d'origine naturelle – Vocabulaire
- [3] : Roux D., J-P chaumont, Ccleur.J.Millet, J-M. Morl et D.Tillec. Conseil en aromathérapie .2^{ème} édition .Wolers Kluwer France. 14-15p.2008.
- [4] : Bérengère A.S., Goetz P et Paris M., 2007. Phytothérapie, la santé par les plantes. Ed : Sélection du Reader's Digest. Paris, pp : 8-25, 447p.
- [5] : Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2^{ème} édition Lavoisier, 278-292P.1993.
- [6] : Bruneton J. « Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales s»,4^{ème} édition Tec et doc. 1269p. Paris (2009).
- [7] : Shama HMIRI, Mohamed RAHOUTI, Zakaria HABIB, Badr SATRANI, Mohamed GHANMI et Mustapha EL AJJOURI « Evaluation du potentiel Antifongique des Huiles Essentielles de Mentha Pulegium et d'eucalyptus Camaldulensis dans la Lutte Biologique Contre les Champignons Responsables de la Détérioration des Pommes en Conservation Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège ». Vol. 80, p.824 – 836, (2011).
- [8]: Barnes J., Anderson L.A et Phillipson J.D., 2007. Herbal medicines. Ed: Pharmaceutical Press, 3^{ème} édition. London, pp: 4-5, 710p.
- [9] : Ghanmi M., Satrani B., Aberchane M., ismaili M., Aafi A., El abid A. (20). « Plantes aromatiques et médicinales du Maroc les milles et une vertu ». Centre de recherche forestière, 128 p, Rabat.
- [10] : Ciobanu A., Mallard I., Landy D., Bertaud E., Fourmentin S. « Développement de supports a base de cyclodextrines pour la liberation prolongee d'aromes », Réseau de Recherche en CycloDextrines, 15, 25, (2013).
- [11]: Dorman H.J.D. et al, Antimicrobial agents from plants: antimicrobial activity of plant volatil oil, Journal of applied Microbiology, 88: 308-316, (2000).
- [12]: Ghanmi M., Satrani B., Aberchane M., Ismail M., Aafi A., El Abid A. (20). « Plantes aromatiques et médicinales du Maroc : les milles et une vertu ». Centre de recherche forestière, 128 p, Rabat
- [13]: MOLEYER V. and NARASIMHAM P. «Antifugal activity of some essential oil components». Food Microbiology, 3,331-336, (1986).
- [14]: SOLIMAN K .M. and BADEAA R.I. «effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi». FOOD Chem Toxicol, 40, 1669-1675, (2002).

Référence bibliographique

- [15]: JAZET DONGMO P.M., TATSADJIUE L.N., TCHINDA SONWA E., KUATE J., AMVAM ZOLLO P.H., and MENUT C. « Essential oil of *Citrus aurantifolia* from Cameroon and their antifungal activity against *Phaeoramularia angolensis*». *African Journal of Agricultural Research*, 4(4), 354-358, (2009).
- [16]: BOURKHISS M., HANACH M., BOURKHISS B., OUHSSIN M., et CHOUCHE A. «composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc». *Afrique science*, 3 (2), 232-242, (2007).
- [17]: MAGINAM.D.A., DALMARCO E.M., WISNIEWSKI A., SIMIONATTO E.L., DALMARCO J.B., PIZZOLATTI M.G., and BRIGHENTE I.M.C. «chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species». *J. Nat. Med.* 63,345-350, (2009).
- [18]: BOUZOUITA N., KACHOURI F., BEN HALIMA M. et CHARBOUNI M.M. «composition chimique et activités antioxydants, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*», *J. Soc. Chim. Tunis.* 10,119-125, (2008).
- [19]: ERLER F., ULUG I., and YALCINKAYA B. «Repellent activity of essential oils against *Culex pipiens*». *Fitoterapia*, 77, 491-494, (2006).
- [20]: TANG G.W., YANG C.G., and XIE L.D. « Extraction of *Trigonella foenum-gracum* L. by supercritical fluid CO₂ and its contact toxicity to *Rhyzopertha dominica* (fabricius) (coleopteran: Bostrichidae) » *J. Pest. Sci.*, 80,151-157, (2007).
- [21]: CHENG S., HUANG C., CHEN Y., YU J., CHAN W., and CHANG S. «chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species», *Bioresour Technol*, 100, 452-456, (2009).
- [22]: Pauli, A. «Antimicrobial properties of essential oil constituent». *Int. J. Aromather.* 11,126-133, (2001).
- [23]: Fabian, D., Sabol, M., Damaraské, K., Bujněkova, D. «Essential oils – their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability». *Toxicol in vitro* 20, 1435-1445, (2006).
- [24]: Onawunmi G.O. et al. «antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* Stapf, *J. Ethnopharmacol.* 12(3): 279-86, (1984).
- [25] : ODOUL M. « La lettre de l'Institut français de Shiatsu : Les Huiles Essentielles ». Numéro hors série de l'Institut français de Shiatsu N° 02, P6-12, (2003).
- [26]: Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., « Biological effects of essential oils » A review. *Food and Chemical Toxicolog.* 446-475P, (2008).
- [27]: Dubey R., Shami T.C. and Bhasker Rao K.U. « Microencapsulation technology and application». *Defence Sci J.* 59, 82-95, (2009).

Référence bibliographique

- [28]: Ferguson J.L., Liquid crystals. *Scientific American*, 1964, 211, 77.
- [29]: Rodrigues S.N., Fernandes I., Martins I.M., Mata V.G., Barreiro F. et al. «Microencapsulation of limonene for textile application». *Ind Eng Chem Res.* 47, 4142-4147, (2008).
- [30]: El-Zawahry M.M., El-Shami S. and El-Mallah M.H. «Optimizing a wool dyeing process with reactive dye by liposome microencapsulation». *Dyes Pigments.* 74,684-691, (2007).
- [31]: Ge X., Wan Z., Song N., Fan A. and Wua R. «Efficient methods for the extraction and microencapsulation of red pigments from a hybrid rose». *J Food Eng.* 94, 122-128, (2009).
- [32]: Bingham G., Gunning R.V., Gorman K., Field L.M. and Moores G.D. «Temporal synergism by microencapsulation of piperonyl butoxide and α -cypermethrin overcomes insecticide resistance in crop pests». *Pest Manag Sci*, 2007, 63, 276-281, (2007).
- [33]: Stelinski L.L., McGhee P., Haas M., Ilichev A.L. and Gut L.G. «Sprayable microencapsulated sex pheromone formulations for mating disruption of four tortricid species: effects of application height, rate, frequency, and sticker adjuvant». *J Econom Entomol.* 100, 1360-1369, (2007).
- [34]: Augustin M.A. and Hemar Y., Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chem Soc Rev*, 2009, 38, 902-912.
- [35]: Nordstierna L., Abdalla A.A., Masuda M., Skarnemark G. and Nydén M., Molecular release from painted surfaces: Free and encapsulated biocides. *Prog Org Coat*, 2010, 69, 45-48.
- [36]: Scher H.B., Rodson M. and Lee K.S., Microencapsulation of pesticides by interfacial polymerization utilizing isocyanate or aminoplast chemistry. *Pestic Sci*, 1998, 54, 394-400.
- [37]: Benita S., Hoffman A. and Donbrow M., Microencapsulation of paracetamol using polyacrylate resins (Eudragit Retard), kinetics of drug release and evaluation of kinetic model. *J Pharm Pharmacol*, 1985, 37, 391.
- [38]: Huang Y.I., Cheng Y.H., Yu C.C., Tsai T.R. and Chama T.M., Microencapsulation of extract containing shikonin using gelatin-acacia coacervation method: A formaldehyde-free approach. *Colloid Surface*, 2007, 58, 290-297.
- [39]: Scalia S., Coppi G. and Iannuccelli V., Microencapsulation of a cyclodextrin complex of the UV filter; butyl methoxydibenzoylmethane: in vivo skin penetration studies. *J Pharmaceut Biomed*, 2010, 54, 345-350.

Référence bibliographique

- [40]: Sefton M.V. and Broughton R.L., Microencapsulation of erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1982, 717, 473.
- [41]: Sugamori M.E. and Sefton M.V., Microencapsulation of pancreatic islets in a water insoluble polyacrylate. *ASAIO Trans*, 1989, 35, 791.
- [42] : Richard J. and Benoit J.P., Microencapsulation. *Techniques d'Ingénieur*, 2000, J 2 210, 1-20.
- [43]: Duchene D; Bochot A. et Loftsson T. Cyclodextrins and their use in pharmacy and cosmetology. *STP pharma pratiques*. (2009). 19. 15-27
- [44] : E.M.Martin Del Valle, *Process Biochemistry*, 2004, 39, 1033.
- [45] : (a) R.Challa, A.Ahuja, J.Ali, R.K.Khar, *AAPS.Pharm.Sci.Tech*, 2005, 6,329; (b) K.Cal, Centkowska, *Eur.J.Pharm.Biopharm*, 2008, 68, 467.
- [46] : (a) S.Muñoz-Botella, B.del Castillo, M.A.Martyn, *Ars.Pharm*, 1995, 36, 187; (b) T.Loftsson, M.E.Brewster, *J. Pharm.Sci*, 1996, 85, 1017.
- [47] : R.Yang, J-B.Chen, X-Y.Dai, R.Huang, C-F.Xiao, Z-Y.Gao, B.Yang, L-J.Yang, S-J.Yan, H-B.Zhang, C.Qing,
- [48]: BilensoyI, *Cyclodextrins in Pharmaceuticals, Cosmetics, and Biomedecin*, John Wiley & Sons, 2011, p.25.
- [49]: G.Schmid, *Trends Biotechnol*, 1989, 7, 244.
- [50]: (a) U.Citernesi, M.Sciacchitano, *Cosmet. Toiletries*, 1995, 110, 53; (b) H.J.Buschmann, E.Schollmeyer, *Int.J. Cosmet. Sci*, 2002, 53, 185.
- [51]: (a) D.Duchêne, D.Wouessidjewe, *Dermal use of cyclodextrins and derivatives*. In: Duchêne, M., Ed., *New Trends in Cyclodextrins and Derivatives*. Editions de Santé, Paris, 1991, pp.449; (b) D.Duchêne, D.Wouessidjewe, M.C.Poelman, *Cyclodextrins in cosmetics*. In: *Novel Cosmetic Delivery Systems*, Marcel Dekker, New York, 1991, pp. 275
- [52]: T.Loftsson, M.E.Brewster, M.Masson, *Am.J.Drug.Deliv*, 2004, 2, 261.
- [53]: T.Yamakawa, S.Nishimura, *J.Control.Rel*, 2003, 86, 101.
- [54]: T.Loftsson, H.Fridriksdottir, T.K.Gudmundsdottir, *Int.J.Pharm*, 1996, 127, 293.
- [55]: T.Loftsson , D.Duchêne, *Intern.J.Pharmaceutics*, 2007, 329, 1.
- [56]: (a) M.E.Davis, M.E.Brewster, *Nature.Rev.Drug.Discovery*, 2004, 3, 1023; (b) G.Bettinetti, F.Melani, P.Mura, R.Monnanni, F.Giordano, *J.Pharm.Sci*, 1991, 80, 1162; (c) A.Ganza-Gonzalez, J.L.Vila-Jato, S.Anguiano-Igea, F.J.Otero-Espinar,

Référence bibliographique

J.Blanco-Mendez, Int.J.Pharmaceut, 1994, 106, 179; (d) M.E.Amato, F.Djedaini-Pilard, B.Perly, G.Scarlata, J.Chem.Soc.Perkin Trans, 1992, 2, 2065; (e) M.E.Amato, G.C.Pappalardo, B.Perly, Magn.Reson.Chem.

[57]: T.Loftsson, D.Hreinsdottir, M.Masson, Int.J.Pharm, 2005, 302, 18.

[58] : Arfa, A.B., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N. Chalier,P., (2006). Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. Letters in Applied Microbiologie, 43(2), 149-154.

[59]: Andrews, J.W., (2001). Determination of minimum inhibitory concentration. Journal Antimicrobial Chemotherapy, 48,5-16.

[60] : Ho Tan Taï L., 1999. Détergents et produits de soins corporels. Ed Dunod, 15-54.

[61]: Le Hir A., (2001), Pharmacie galéniques bonnes pratiques de fabrication des médicaments. 8^{ème} éd.

[62] : Ho Tan Taï L., 1999. Détergents et produits de soins corporels. Ed Dunod, 15 - 54.

[63]: F. Henry, I. Lopes, C. Bendjilali, S. Morteau Organisation Moleculaire Et Macromoleculaire, Laboratoire De Physico-Chimie Des Biopolymeres, Cnrs, Thiais, France Encapsulation D'huiles Essentielles Antifongiques Pour La Protection Des Œuvres D'art.

[64]: Leon Raul HERNANDEZ OCHOA octobre 2005 Substitution de solvant et matières actives de synthèse par un combine « solvant/actifs » d'origine végétale Thèse de l'Institut Nationale Polytechnique. Toulouse, France.

[65]: BOIS MS. (1958), Antioxidant determinations by the use of stable free radical, Nature **26**, 1199 – 1200.

[66]: OYAIZU M. (1986), Studies on products of browning reaction prepared from glucoseamine, Jpn J. Nutr., **44**, 307 – 314

[67]: Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H.A., Sokmen, A. 2006. Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chem.*, 95: 200-204.

[68]: Caccioni D.R.L. & Gizzard M., 1994. Inhibition of germination of fruit and postharvest pathogenic fungi by essential oil components. *J. Essent. Oil Res.*, **6**, 173-179.

[69]: Cimanga K. et al., 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J. Ethno pharmacology*, **79**, 213-220

Référence bibliographique

- [70]: Dorman H.J.D. & Deans S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antimicrobial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, **88**, 308-316.
- [71]: Siani, A.C., Garrido, I.S., Carvalho, E.S., Ramos, M.F.S., 1999. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *Journal of Ethno pharmacology* 66, 57–69.
- [72]: Ouédraogo N, Lompo M, Sawadogo RW, Tibiri A, Hay AE, Koudou J, Guissou IP., 2012. Étude des activités anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique des décoctés aqueux des feuilles et des racines de *Pterocarpuserinaceus* Poir.(Fabaceae). *Phytothérapie*, 10(5), pp: 286-292.
- [73]: Pellecuer J., Jacob M., Simeon de Buechberg M. & Allegrini J., 1980. Therapeutic value of the cultivated mountain savory (*Satureia Montana* L.). *Acta Hort.*, **96**, 35-39.
- [74]: de Carvalho PM Jr, Rodrigues RF, Sawaya AC, Marques MO, Shimizu MT. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordiaverbenacea* D.C.J *Ethnopharmacol* 2004;95(2-3):297-301.
- [75]: Liapi C, Anifantis G, Chinou I, Kourounakis AP, Theodosopoulos S, Galanopoulou P. Antinociceptive properties of 1,8-Cineole and β -pinene, from the essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* leaves, in rodents. *Planta Med* 2007;73(12):1247-54.
- [76]: Santana, M.F., Quintans-Júnior, L.J., Cavalcanti, S.C.H., Oliveira, M.G.B., Guimarães, A.G., Cunha, E.S., et al., 2011. p-cymene reduces orofacial nociceptive response in mice. *Revista Brasileira Farmacogen* 21, 1138-1143.
- [77]: Selvaraj, M., Pandurangan, A., Seshadri, K.S., Sinha, P.K., Krishnasamy, V., Lal, K.B., 2002. Comparison of mesoporous A1-MCM-41 molecular sieves in the production of myrcene for isopropylation of toluene. *Journal of Molecular Catalysis A Chemistry* 186, 173-186.
- [78]: A.E. Edris Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review *Phytother. Res.*, 21 (2007), pp. 308-323.
- [79]: Galeotti, N. et al. 2002, *Neuroscience Letters* Vol. 322, pages 145_148.
- [80]: OECD High Production Volume Chemicals Program, Screening Information Dataset for D-Menthol / CAS n° 15356-60-2, 50p. UNEP (2004)
- [81]: OECD High Production Volume Chemicals Program, Screening Information Dataset for Linalool / CAS n° 78-70-6, 25 p. UNEP (2005)
- [82]: N. Krimer, K.H.C. Baser, G. Tumen Carvacrol rich plants in Turkey *Chem. Nat Compd.*, 31 (1995), pp. 37-42 [SD-008]

Référence bibliographique

- [83] : Juliano et al., 2000 C. Juliano, A. Mattana, M. Usai Camposition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia.
- [84]: Andree Voilley et Patrick Etiévant, Flavour in food, CRC Press, Woodhead publishing limited, 2006, p.218-19, 223.
- [85] : Farco, J.A. and Grundmann, O. 2013, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry Vol. 13, No. 1, pages 124_131.
- [86]: ERLER F., ULUG I., and YALCINKAYA B., (2006), Repellent activity of five essential oils against *Culex pipiens*, *Fitoterapia*, 77, 491-494.
- [87]: OUSSALAH M., S. CAILLET and M. LACROIX. Mechanism of Action of Spanish oregano, Chinese cinnamon and savory essential oils on *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 69 (5), 1046-1055, 2006. BURT S., essential oils : a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94, 223-253, 2004.
- [88]: Bruneton J. « Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales ». Éditions Tec & Doc, Paris, éditions médicales internationales, Paris, (1999), pp: 483-560. Sallé E, « les huiles essentielles : Synthèse d'aromathérapie » Edition 2ème, Edition Frison-Roche, Paris, (2004), 220P :31-51
- [89] : BOUZOUITA N., KACHOURI F., BEN HALIMA M. et CHARBOUNI M.M. composition chimique et activités antioxydants, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*, *J. Soc. Chim. Tunis.*, 10, 119-125, (2008).
- [90]: BOIS MS. (1958), Antioxidant determinations by the use of stable free radical, *Nature* 26, 1199 – 1200.
- [91]: Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H.A., Sokmen, A. 2006. Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chem.*, 95: 200-204.
- [92]: OYAIZU M. (1986), Studies on products of browning reaction prepared from glucoseamine, *Jpn J. Nutr.*, 44, 307 – 314
- [93]: Cowan M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12, 564-582.
- [94]: Panizzi L., Flamini G., Gioni P.L. & Morelli I., 1993. Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean lamiaceae. *J. Ethnopharmacology*, 39, 169-170.

Référence bibliographique

- [95] : BOURKHISS M., HANACH M., BOURKHISS B., OUHSSIN M., et CHOUCHE A, composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc. *Afrique science*, 3 (2), 232-242, (2007).
- [96] : Martins AP, Salgueiro LR, Goncalves MJ, Proenca da Cunha A, Vila R, Canigual S. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Santiria trimera* bark. *Planta Med* 2003;69(1):77-9.
- [97]: Andrews RE, Parks LW, Spence KD. Some Effects of Douglas Fir Terpenes on Certain Microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 1980;40(2):301-4.
- [98] : Takikawa A, Abe K, Yamamoto M, Ishimaru S, Yasui M, Okubo Y, et al. Antimicrobial activity of nutmeg against *Escherichia coli* O157. *J Biosci Bioeng* 2002; 94(4):315-20.
- [99] : Amarti F. et al. 2008. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus capitatus* et de *Thymus bleicherianus* du Maroc. *Phytothérapie*, 6, 342-347.
- [100]: Remmal A. et al., 1993. Improved method for determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *J. Essent. Oil Res.*, 5(2), 179-184.
- [101] : Benabid A., 2000. *Flore et écosystèmes du Maroc. Évaluation et préservation de la biodiversité*. Paris : Édition Ibis Press, 159-161.
- [102] : Pellecuer J., Jacob M., Simeon de Buechberg M. & Allegrini J., 1980. Therapeutic value of the cultivated mountain savory (*Satureia Montana* L.). *Acta Hort.*, 96, 35-39.
- [103] : Gergis V., Spiliotis V. & Poulos C., 1990. Antimicrobial activity of essential oils from Greek *Sideritis* species. *Pharmazie*, 45, 70.
- [104] : Satrani B. et al., 2008. Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 146, 85-96.
- [105]: Dorman H.J.D. & Deans S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antimicrobial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, 88, 308-316.
- [106]: Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P. & Nychas G.J.E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl Bacteriol.*, 76, 626-631.
- [107]: Juven B.J., Kanner J., Schved F. & Weisslowicz H., 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.*, 76, 626-631.
- [108]: Arras G. & Usai M., 2001. Fungitoxic activity of 12 essential oils against four postharvest *Citrus* pathogens: chemical analysis of *Thymus capitatus* oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. *J. Food Prot.*, 64, 1025-1029.

Référence bibliographique

[109] : Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 1999. *Monographs on selected medicinal plants*. Geneva, Switzerland: OMS.

[110] : Bonjardim, L.R., Cunha, E.S., Guimarães, A.G., Santana, M.F., Oliveira, M.G.B., Serafini, M.R., et al., 2012. Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive properties of p-Cymene in Mice. *Zeitschrift Fur Naturforschung C* 67, 15–21.