

**UNIVERSITE BLIDA 1**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département des Biotechnologies**

**MEMOIRE DE MAGISTER**

Spécialité : Agro-ressources

EXTRACTION ET CARACTÉRISATION DES COMPOSÉS  
SECONDAIRES DE DEUX PLANTES : ARMOISE BLANCHE  
(*Artemisia herba-alba* Asso.) ET ROMARIN (*Rosmarinus officinalis* L.)  
DE LA RÉGION DE DJELFA. EFFETS THÉRAPEUTIQUES  
ET BIOPESTICIDES.

Par

**Samah LAKEHAL**

Devant le jury composé de :

|                |                                     |               |
|----------------|-------------------------------------|---------------|
| S.A. SNOUSSI   | Professeur, U. Blida1               | Président     |
| A. TOUATI      | Professeur, E.N.S., Kouba           | Examineur     |
| T. HADJ SADOK  | Maître de conférences A, U. Blida 1 | Examineur     |
| F.Z. BENREBIHA | Professeur, U. Blida 1              | Promotrice    |
| C. CHAOUIA     | Maître de conférences A, U. Blida 1 | Co-Promotrice |

Blida, Juin 2016

## RESUME

Les plantes aromatiques et médicinales constituent une source importante de molécules bioactives notamment dans leurs extraits volatils. Dans ce cadre et afin d'isoler de nouvelles molécules dotées de propriétés biologiques puissantes nous nous sommes intéressés à l'extraction des huiles essentielles de deux espèces de plantes : l'armoise blanche (*Artemisia herba-alba* Asso.) et le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.), récoltées dans la région de Djelfa le mois d'Avril 2012. Le rendement moyen en huiles essentielles obtenues par hydrodistillation (type Clevenger) est de l'ordre de  $0.8 \pm 0.05\%$  (ml/100g) et  $1.20 \pm 0.01\%$  (ml/100g), respectivement. La composition chimique des huiles essentielles étudiées a été identifiée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM), dont les composés majoritaires sont : le camphre (39,5%), le chrysanthénone (10,38%) et le 1,8-cinéole (8,6%) pour l'huile essentielle de l'armoise blanche. Bien que, l'huile essentielle du romarin a été caractérisée comme ayant un important contenu de camphre (39,7%) suivi par le 1,8-cinéole (18,26%), l' $\alpha$ -pinène (13,19%) et le camphène (9,51%). L'activité antimicrobienne a été étudiée vis-à-vis de six souches microbiennes : *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* qui se sont révélées sensibles aux huiles essentielles étudiées à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* qui s'est montrée résistante. La concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles a été déterminée selon la méthode de dilution en gélose. Une bonne activité biopesticide des huiles essentielles testées s'est évaluée vis-à-vis de deux champignons à savoir : *Aspergillus niger* et *Fusarium oxysporum*. L'activité antioxydante a été mesurée en utilisant trois tests : le test de piégeage du radical diphénylpicrylhydrazyl (DPPH), le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène et la détermination du pouvoir réducteur (FRAP). Les résultats montrent que les huiles essentielles testées ont une activité antioxydante modérée, relativement faible comparées aux antioxydants standards.

**Mots clés :** *Artemisia herba-alba* Asso., *Rosmarinus officinalis* L., hydrodistillation, huile essentielle, activité antimicrobienne, activité biopesticide, activité antioxydante.

## ABSTRACT

Aromatic and medicinal plants are an important source of bioactive molecules, especially in volatile extracts. In this context and in order to isolate new compounds with potent biological properties we were interested in the extraction of essential oils of two species: wormwood (*Artemisia herba-alba* Asso.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), harvested in the Djelfa region the month of April 2012. The yield of essential oils obtained by hydrodistillation (type Cleavenger) is about  $0.8 \pm 0.05$  (ml/100g) and  $1.20 \pm 0.01$  (ml/100g), respectively. The chemical composition of essential oils studied was identified by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC / MS), The majority compounds are: camphor (39, 5 %), chrysanthenone (10, 38 %) and 1, 8-cineole (8,6 %)for the essential oil of wormwood. However, the rosemary essential oil was characterized as having an important camphor content (39, 7%) followed by 1, 8-cineole (18,26%), the  $\alpha$ -pinene (13,19%) and camphene (9,51%).The antimicrobial activity was studied towards six microbial strains: *Klebsiella Pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, they are revealed sensitive to essential oils studied except for *Pseudomonas aeruginosa* has proved resistant. The minimal Inhibitory Concentration (MIC) was determined using agar dilution method. A good biopesticide activity of essential oils tested was evaluated towards two fungi: *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum*. The antioxidant activity was measured using three tests: the trapping test diphenylpicrylhydrazyl radical (DPPH), bleaching test of  $\beta$ -carotene and determination of the reducing power (FRAP). The results show that essential oils tested have moderate antioxidant activity, relatively low compared with antioxidants standards.

**Keywords:** *Artemisia herba-alba* Asso., *Rosmarinus officinalis* L., hydrodistillation, essential oil, antimicrobial activity, biopesticide activity, antioxidant activity.

## الملخص

تعتبر النباتات العطرية و الطيبة مصدرا هاما للمركبات الحيوية خاصة تلك التي تكمن في مستخلصاتها الطيارة. على هذا الاساس و من اجل عزل مركبات جديدة ذات خصائص بيولوجية فعالة وقع اهتمامنا على استخراج الزيوت الأساسية لنوعين من النباتات: الشيح (*Artemisia herba alba* Asso.) وإكليل الجبل (*Rosmarinus officinalis* L.). تم الحصول عليهما من منطقة الجلفة ، شهرأبريل 2012. متوسط العائد من الزيوت الأساسية المتحصل عليها بتقنية التقطير البخار ( نوع Clevenger ) حوالي  $0.8 \pm 0.05$  (ml/100g) و  $1.20 \pm 0.01$ (ml/100g) على التوالي. تم التعرف على التركيب الكيميائي للزيوت الأساسية بواسطة جهاز CG/MS، حيث العناصر الغالبة في زيت نبتة الشيح camphre (39,5%) ، chrysanthénone ، (10,38%) و 1,8- cinéole (8,6%). بينما الزيت الاساسي لنبتة اكليل الجبل فهو يحتوي على كمية هامة من: camphre (39,7%) متبوع بـ 1,8-cinéol (18,29%) ،  $\alpha$ -pinène (13, 19%) و camphène (9,51%). تمت دراسة النشاط المضاد للميكروبات على ستة كائنات مجهرية وهي : *Klebsiella pneumoniae* ، *Bacillus subtilis*، *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa* ، *Staphylococcus aureus* و *Candida albicans* ، حيث تبينت كلها حساسة للزيوت الأساسية المدروسة باستثناء *Pseudomonas aeruginosa* التي أثبتت قدرتها على المقاومة . تم تحديد الحد الأدنى للتركيز المثبط ( MIC ) من الزيوت الأساسية وفقا لطريقة التخفيف في الوسط آغار. أظهرت الزيوت الاساسية المختبرة نشاطا جيدا كمبيدات حيوية على الفطريات : *Aspergillus niger* و *Fusarium oxysporum*. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة عن طريق ثلاثة اختبارات : اختبار محاصرة الراديكال (DPPH) diphénylpicrylhydrazyl اختبار تبييض  $\beta$  الكاروتين و القوة الارجاعية (FRAP). وأظهرت النتائج ان الزيوت الأساسية لها نشاط مضاد للأكسدة متوسط، نسبيا ضعيف مقارنة بمضادات الاكسدة المرجعية.

**الكلمات المفتاحية:** الشيح (*Artemisia herba-alba* Asso.)، إكليل الجبل (*Rosmarinus officinalis* L.)، التقطير البخار، زيت اساسي، تأثير مضاد للميكروبات، تأثير المبيدات الحيوية ، تأثير مضاد الأكسدة.

## REMERCIEMENTS

Avant tout je remercie Dieu « ALLAH » le tout puissant de m'avoir accordé la force, le courage et la patience pour terminer ce travail. Je tiens à faire part de ma reconnaissance particulière et de mon respect profond aux membres composant le jury :

Ma promotrice Madame BENREBIHA F.Z. Professeur à U. Blida 1 pour tout son aide, ses orientations et ses conseils judicieux qui m'en éclairé.

Ma Co-promotrice Madame CHAOUIA C. Maître de conférences A à U. Blida 1 pour l'effort fourni, les conseils prodigués, sa patience et sa persévérance dans le suivi.

Monsieur SNOUSSI S.A. Professeur à U. Blida 1 qui m'a fait l'honneur d'assurer la présidence du jury.

Monsieur TOUATI A. Professeur à l'E.N.S.K d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Monsieur HADJ SADOK T. Maître de conférences A à U. Blida 1 qui a bien voulu examiner ce modeste travail.

J'exprime mes vives gratitude à la directrice de la filiale antibiotical SAIDAL de Medéa, à Madame BAKHTI et à Mr CHERIF T., ainsi qu'à tout le personnel du laboratoire de toxicologie et de physico-chimie.

Je tiens à remercier Monsieur AIT YAHIYA A. et Madame HAMZA K. du laboratoire de chimie de l'E.N.S - Kouba.

Mes vifs remerciements sont adressés à Messieurs : RAS DJBEL, SOBHI et BOUKOURCHI du laboratoire de microbiologie de l'hôpital spécialisé militaire de Bouchaoui. Ainsi qu'à tout le personnel du laboratoire de la police scientifique à Ben Aknoun en particulier monsieur BEN AYADA T.

Mes remerciements sont adressés, à tous nos enseignants, qui nous ont donné les bases de la science.

Ma gratitude est exprimée en particulier envers Mr LAKEHAL et Mr MELIANI.

## **DEDICACE**

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mes chers **parents** qui sont très fières de moi aujourd'hui. Que ce travail soit le témoignage de ma gratitude pour l'amour et la sollicitude que vous avez su me prodiguer depuis toujours.*

*A mon petit frère **Abd erraouf**.*

*A mes sœurs **Mouna** et **Manar**.*

*A mes **grands-parents**.*

*A toutes les familles : **LAKEHAL** et **CHABANE**.*

*A mes collègues : **Imene, Hadjer, Nadjia, Fathia, Nabaouia, Razika, Aicha, Zahra, Assia** et **Asma**.*

*A mes adorables amies : **Asma** et **Nadjet selma***

*A mes meilleurs ami(e)s : **Nassima, Sihem, Sarah, Hamza, Zaki, Samih, Red, Idris, Mokhtar, Mouhamed, Raouf** et **Ahmed**.*

*Je dédie ce modeste travail...*

**Samah**

## TABLE DES MATIERES

**RESUME**

**REMERCIEMENTS**

**TABLES DES MATIERES**

**LISTES DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX**

**INTRODUCTION**

**CHAPITRE 1 : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**

|   |    |
|---|----|
| <b>1.1. ARMOISE BLANCHE (<i>Artemisia herba-alba</i> Asso.)</b> | 15 |
| 1.1.1. Etymologie   | 15 |
| 1.1.2. Systématique   | 15 |
| 1.1.3. Synonymes botaniques                                     | 15 |
| 1.1.4. Noms vernaculaires                                       | 16 |
| 1.1.5. Description botanique de la plante                       | 16 |
| 1.1.6. Répartition géographique et écologie                     | 17 |
| 1.1.7. Propriétés et utilisation                                | 17 |
| <b>1.2. ROMARIN (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)</b>          | 19 |
| 1.2.1. Etymologie   | 19 |
| 1.2.2. Systématique   | 19 |
| 1.2.3. Synonymes botaniques                                     | 19 |
| 1.2.4. Noms vernaculaires                                       | 20 |
| 1.2.5. Description botanique de la plante                       | 20 |
| 1.2.6. Répartition géographique et écologie                     | 21 |
| 1.2.7. Propriétés et utilisation                                | 21 |
| <b>1.3. LES HUILES ESSENTIELLES</b>                             | 24 |
| 1.3.1. Répartition et Localisation                              | 24 |
| 1.3.2. Fonctions dans la plante                                 | 25 |
| 1.3.3. Extraction   | 27 |

|   |    |
|---|----|
| 1.3.4. Caractéristiques physico-chimiques.                          | 32 |
| 1.3.5. Conservation.  | 33 |
| 1.3.6. Biosynthèse et composition chimique des huiles essentielles. | 33 |
| 1.3.7. Toxicité   | 37 |
| 1.3.8. Notion de chémotype.   | 37 |
| 1.3.9. Domaines d'application des huiles essentielles.              | 38 |
| <b>1.4. Stress oxydant.</b>   | 41 |
| 1.4.1. Les espèces oxygénées réactives.                             | 41 |
| 1.4.2. Les antioxydants.  | 42 |
| <b>CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES.</b>                           | 45 |
| <b>2.1. ETUDE DE LA REGION.</b>                                     | 45 |
| 2.1.1. Localisation géographique.                                   | 45 |
| 2.1.2. Sol  | 46 |
| 2.1.3. Précipitations.  | 46 |
| 2.1.4. Temperature  | 47 |
| <b>2.2. MATERIEL UTILISE.</b>                                       | 47 |
| 2.2.1. Matériel biologique  | 47 |
| 2.2.2. Matériel non-biologique                                      | 49 |
| <b>2.3. METHODES D'ETUDE.</b>                                       | 49 |
| 2.3.1. Taux d'humidité  | 49 |
| 2.3.2. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation     | 50 |
| 2.3.3. Rendement en huiles essentielles.                            | 51 |
| 2.3.4. Contrôle physico-chimique.                                   | 51 |
| 2.3.5. Identification des huiles essentielles par CG/MS.            | 53 |
| 2.3.6. Activité antimicrobienne et biopesticide.                    | 54 |
| 2.3.7. Activité antioxydante.                                       | 56 |
| 2.3.8. Analyses statistiques  | 62 |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION</b>                     | <b>63</b> |
| 3.1. Taux d'humidité de la matière végétale                     | 63        |
| 3.2. Rendement en huiles essentielles                           | 65        |
| 3.3. Caractéristiques organoleptiques                           | 71        |
| 3.4. Caractéristiques physico- chimique des huiles essentielles | 72        |
| 3.5. Identification des huiles essentielles par CG/MS           | 73        |
| 3.6. Etude de l'activité antimicrobienne et biopesticide        | 84        |
| 3.7. Etude de l'activité antioxydante                           | 98        |

## **CONCLUSION**

## **APPENDICE**

- A. Liste des figures**
- B. Matériel non biologique**
- C. Liste des graphiques**
- D. Etude statistique**
- E. Liste des abréviations**
- F. Liste des symboles**
- G. Glossaire**

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1: Aspect général, feuilles et inflorescences d'*Artemisia herba alba* Asso.

Figure 1.2: Aspect général, feuilles et inflorescences de *Rosmarinus officinalis* L.

Figure 1.3: Interactions des plantes avec leur environnement.

Figure 1.4: Dispositif expérimental de l'hydrodistillation type Clevenger.

Figure 1.5: Biosynthèse des terpénoïdes et phénylpropanoïdes.

Figure 1.6: Structure de quelques composés chimiques majoritaires.

Figure 1.7: Mécanisme réactionnel de système enzymatique.

Figure 2.1: Localisation géographique de la zone d'étude (wilaya de Djelfa).

Figure 2.2: Vue générale des touffes à Djelfa.

Figure 2.3: Montage de l'hydrodistillation type Clevenger.

Figure 2.4: Réaction de réduction d'un radical DPPH en présence d'un antioxydant.

Figure 3.1: Taux d'humidité des feuilles séchées d'armoise blanche.

Figure 3.2: Taux d'humidité des feuilles séchées du romarin.

Figure 3.3: Rendements en Huiles essentielles.

Figure 3.4: Huile essentielle d'armoise blanche.

Figure 3.5: Huile essentielle du romarin.

Figure 3.6: Chromatogramme de l'huile essentielle d'armoise blanche.

Figure 3.7: Chromatogramme de l'huile essentielle du romarin.

Figure 3.8: Variation de pourcentage d'inhibition pour les huiles essentielles.

Figure 3.9: Variation de pourcentage d'inhibition pour les standards

Figure 3.10: Détermination graphique d'EC<sub>50</sub> des huiles essentielles.

Figure 3.11: Valeurs d'EC<sub>50</sub> pour les antioxydants synthétiques, les huiles essentielles.

Figure 3.12: Cinétique de réduction du radical libre DPPH obtenue pour la concentration EC<sub>50</sub> des huiles essentielles.

Figure 3.13: Détermination graphique de TEC des huiles essentielles.

Figure 3.14: Les valeurs de TEC<sub>50</sub>.

Figure 3.15: Cinétique de blanchiment du β-carotène en présence des huiles essentielles et des antioxydants standards.

Figure 3.16 : Activité antioxydante relative (AAR%) des huiles essentielles et des antioxydants standards après 48h.

Figure 3.17 : Pouvoir réducteur de l'huile essentielle d'armoise blanche.

Figure 3.18 : Pouvoir réducteur de l'huile essentielle du romarin.

Figure 3.19 : Pouvoir réducteur des antioxydants de référence (BHT, BHA, Vit C).

Tableau 1.1 : Les principales espèces oxygénées réactives.

Tableau 2.1: Répartition des précipitations moyennes mensuelles et annuelles.

Tableau 2.2 : Températures moyennes mensuelles et annuelles.

Tableau 2.3: Micro-organismes testés.

Tableau 3.1: Rendement en huiles essentielles de l'Armoise blanche.

Tableau 3.2 : Rendement en huiles essentielles du romarin.

Tableau 3.3 : Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de l'armoise blanche.

Tableau 3.4: Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle du romarin.

Tableau 3.5: Propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle d'armoise blanche.

Tableau 3.6: Propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du romarin.

Tableau 3.7: Identification des principaux composants chimiques de l'huile essentielle d'armoise blanche analysés par CPG/MS.

Tableau 3.8: Teneur en composés majoritaires (%) des huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* Asso. de différentes origines géographiques.

Tableau 3.9: Identification des principaux composants chimiques de l'huile essentielle du romarin par CPG/MS.

Tableau 3.10: Teneur en composés majoritaires (%) des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. de différentes origines géographiques.

Tableau 3.11: Résultats de l'activité antibactérienne.

Tableau 3.12: Activité antibactérienne des huiles essentielles de l'armoise blanche et de romarin.

Tableau 3.13: Résultat de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle de l'armoise blanche.

Tableau 3.14: Résultat de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle de romarin.

Tableau 3.15 : Résultats de l'activité antifongique des huiles essentielles.

Tableau 3.16: Quelques travaux antérieurs sur l'efficacité antioxydante de l'armoise blanche et de romarin.

Tableau 3.17 : Paramètres de calcul de l'activité antioxydante.

Tableau 3.8: Teneur en composés majoritaires (%) des huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* Asso. de différentes origines géographiques.

Tableau 3.9: Identification des principaux composants chimiques de l'huile essentielle du romarin par CPG/MS.

Tableau 3.10: Teneur en composés majoritaires (%) des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. de différentes origines géographiques.

Tableau 3.11: Résultats de l'activité antibactérienne.

Tableau 3.12: Activité antibactérienne des huiles essentielles de l'armoise blanche et de romarin.

Tableau 3.13: Résultat de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle de l'armoise blanche.

Tableau 3.14: Résultat de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle de romarin.

Tableau 3.15 : Résultats de l'activité antifongique des huiles essentielles.

Tableau 3.16: Quelques travaux antérieurs sur l'efficacité antioxydante de l'armoise blanche et de romarin.

Tableau 3.17 : Paramètres de calcul de l'activité antioxydante.

## INTRODUCTION

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires [1].

Actuellement, plusieurs questions se sont soulevées concernant d'une part, l'efficacité et la sécurité des produits chimiques utilisés en médecine ou dans l'industrie alimentaire. En effet, en raison des effets secondaires des antioxydants synthétiques tels que l'hydroxytoluène butylé (BHT), qui peuvent être responsables des dommages du foie et de la carcinogenèse et de la résistance que les micro-organismes pathogènes établissent contre les antibiotiques [2-4]. Le développement de nouvelles voies de recherche pour aboutir à des alternatives apparaît donc indispensable. Par ailleurs, les substances naturelles douées d'activité antimicrobienne et antioxydante présentent un intérêt socio-économique très important dans le domaine de la recherche bio-pharmacologique. Plusieurs laboratoires à travers le monde se sont orientés vers la recherche des substances bioactives et leur valorisation [1, 5].

Et d'autre part, les enjeux d'avenir de l'agriculture qui s'efforcent de répondre aux exigences du développement durable. En effet, la lutte chimique quasi généralisée exerce une pression sur l'environnement et présente ses limites d'applications avec l'apparition de résistance des bio-agresseurs, de la pollution et des effets nocifs fortement soupçonnés sur la santé humaine [6, 7].

C'est pourquoi, aujourd'hui il y a nécessité de développer des méthodes de substitution aux pesticides de synthèse dans la protection des cultures et des récoltes. Parmi ces méthodes, les biopesticides qui constituent un outil de choix dans les programmes de gestion de la résistance des ravageurs aux pesticides [6, 7].

Les substances d'origine naturelle et plus particulièrement les huiles essentielles détiennent actuellement une place importante dans les systèmes de lutte, leur rôle dans la recherche phytopharmaceutique dans certains pays du monde n'est plus à démontrer [8].

L'Algérie, par sa position géographique, jouit de plusieurs facteurs de pédogenèse (littoral, steppe, montagnes et le désert) et de grandes variations climatiques (humide, sub-humide, semi-aride et aride) auxquels s'ajoutent les ressources hydriques [9], offre une végétation riche et diverse. Un grand nombre de plantes aromatiques y pousse spontanément. L'intérêt porté à ces plantes n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années [10].

Ce travail a pour objet l'investigation de ces plantes qui représentent une source potentielle pour la découverte de nouvelles molécules naturelles bioactives [11]. La valorisation de ces ressources naturelles végétales passe essentiellement par l'extraction de leurs huiles essentielles [1]. Ces dernières, sont d'intérêt croissant pour les industries pharmaceutiques, cosmétiques, agroalimentaires et la recherche scientifique en raison de leurs activités antioxydante, antibactérienne et antifongique [12].

Dans ce contexte et afin de valoriser notre richesse floristique algérienne, nous nous sommes intéressés à l'étude de deux espèces : l'aromise blanche (*Artemisia herba-alba* Asso.) de la famille des Astereaceae et le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) de la famille des Lamiaceae., poussant à l'état spontané dans les monts de la région de Djelfa. En se servant de données ethno-pharmacologiques, le choix de ces deux espèces végétales s'est basé sur leurs applications importantes dans nos traditions locales, par une grande tranche de population comme moyen incontournable de médication et comme épices pour l'usage culinaire.

Cette étude est organisée en trois chapitres :

Le premier chapitre est un aperçu bibliographique sur les deux plantes étudiées à savoir : *Artemisia herba alba* Asso et *Rosmarinus officinalis* L. et des généralités sur les huiles essentielles.

Le matériel et les méthodes utilisées à savoir : les techniques d'extraction, la caractérisation des huiles essentielles et aussi les protocoles utilisés au cours des tests biologiques concernant les activités antimicrobienne, biopesticide et antioxydante, sont présentés dans le second chapitre.

Le troisième chapitre aborde les résultats et la discussion.

Le manuscrit est achevé par une conclusion générale sur l'ensemble des résultats obtenus ainsi que des perspectives ont été dégagées.

## CHAPITRE 1

### RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

#### 1.1. Armoise blanche : *Artemisia herba alba* Asso.

##### 1.1.1. Etymologie :

*Artemisia* est le nom de genre des armoises. Il provient de celui de la déesse vierge grecque d'*Artémis*, déesse de la lune qui avait pour rôle de protéger les femmes malades par ses propriétés régulatrices du cycle menstruel, *herba-alba* signifie herbe blanche, se réfère à la couleur blanchâtre des feuilles [13 -15].

##### 1.1.2. Systématique :

D'après QUEZEL et SANTANA [16], *Artemisia herba alba* Asso appartient :

|                      |                                   |
|----------------------|-----------------------------------|
| Règne :              | Plantae                           |
| Sous règne :         | Tracheobionta                     |
| Embranchement :      | Spermaphyta                       |
| Sous embranchement : | Angiospermes                      |
| Classe :             | Eudicots                          |
| Sous classe :        | Astéridées                        |
| Ordre :              | Asterales                         |
| Famille :            | Asteracées                        |
| Genre :              | <i>Artemisia</i>                  |
| Espèce :             | <i>Artemisia herba alba</i> Asso. |

##### 1.1.3. Synonymes botaniques [17, 18] :

- *Artemisia inculta* Del.
- *Artemisia sieberii* Basser.
- *Artemisia aragonensis* Lam.
- *Seriphidium herba* Asso (Soják fide).

#### 1.1.4. Noms vernaculaires [17-20]:

- Arabe: Chih.
- Anglais: White or desert wormwood, sagebrush.
- Français: Armoise blanche, thym des steppes, absinthe blanche.

#### 1.1.5. Description botanique de la plante :

Les caractéristiques botaniques de la plante correspondent à celles décrites par QUEZEL et SANTANA [16], HOUMANI et *al.* [21], LUCIENNE [22], BEZZA et *al.* [23], KADRI et *al.* [24] & BADR et *al.* [25] : *Artemisia herba alba* Asso (Figure 1.1) est une plante herbacée vivace présentant un port buissonnant ramifié de 20 à 40 cm de haut. Les tiges tomenteuses sont dressées et ligneuses à la base, elles portent des feuilles sessiles, argentées, pubescentes, divisées en languettes fines, laineuses recouvert de fines poils qui reflètent la lumière du soleil, donnant ainsi un aspect grisâtre à la plante. L'inflorescence est un capitule très petit, ovoïde et sessile de 1,5 à 3 mm de diamètre, portant 2 à 5 fleurs jaunâtres hermaphrodites. Les feuilles sont caractérisées par une forte odeur aromatique. Les fruits sont des akènes [26].

La croissance végétative de l'*Artemisia herba alba* Asso. à lieu à l'automne avec des feuilles de grande taille. A la fin de l'hiver et au printemps les feuilles sont plus petites et riches en huiles essentielles [24, 27]. La floraison commence de Septembre à Décembre et se développe essentiellement en fin d'été [24,28].

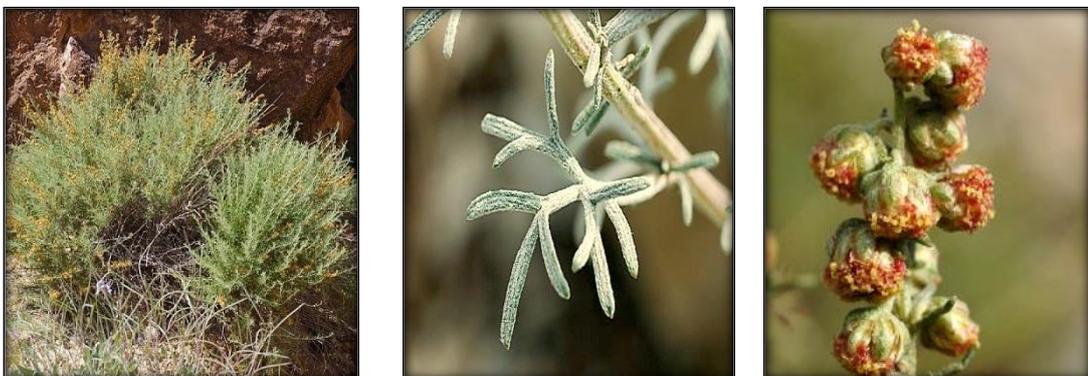


Figure 1.1: Aspect général, feuilles et inflorescences d'*Artemisia herba alba* Asso. [23, 28].

### 1.1.6. Répartition géographique et écologie :

L'armoise blanche (*Artemisia herba-alba* Asso) est une espèce steppique de la famille des Astéraceae [29]. Elle présente une vaste répartition géographique, depuis les îles Canaries et le sud-est de l'Espagne jusqu'aux steppes d'Asie centrale (Iran, Turkménistan et Ouzbékistan), à travers l'Afrique du nord (Tunisie, Maroc et l'Algérie), le Moyen-Orient (Égypte, désert de Sinaï et Palestine occupée) et le nord-ouest Himalaya [30-32].

En Afrique du Nord, l'Armoise blanche est très répandue sur les hauts plateaux, les pâturages rocaillieux et les terreaux des plateaux des basses montagnes [21,33].

*Artemisia herba alba* Asso. résiste à la sécheresse. Elle est présente sous les bioclimats arides et semi arides à variante chaude, tempéré et fraîche, généralement, dans les étages du Thermo-méditerranéen et Mésoméditerranéen [16, 34].

Cette espèce supporte le gypse et des niveaux de salinité modérément élevés. Elle est abondante dans des sols, à texture fine, assez bien drainés. Dans le sud, elle pousse sur des sols bruns steppiques de texture moyenne et en extrême sud sur des sols sableux [35].

En Algérie, elle couvre environ 4 millions d'hectares et se développe dans les steppes argileuses et les sols tassés relativement peu perméables. Elle se trouve sur les dayas, les dépressions et les zones plus ou moins humides. Elle constitue un moyen de lutte naturel contre l'érosion et la désertification [29].

### 1.1.7. Propriétés et utilisation :

L'armoise blanche est une des plantes les plus largement utilisées dans la médecine traditionnelle algérienne [16, 36].

Elle a été utilisée, tout d'abord, comme aromatisant dans le thé et le café, puis elle est devenue une panacée dans la médecine traditionnelle arabo-musulmane [23, 37]. Traditionnellement, l'armoise blanche est utilisée pour son activité antihelminthique [23]. Elle présente aussi un caractère vermifuge très prisé pour le bétail et pour les nomades du désert [19, 28, 38].

*Artemisia herba alba* Asso. a été connue pour ses vertus thérapeutiques en tant qu'agent antibactérien, analgésique, antispasmodique, antihémorragique et emménagogue [39, 40]. KADRI et al. [24], MIGHRI et al. [31] & TAHRAOUI et al. [41] ont signalé son utilisation en tant que remède pour les rhumes, la toux et la bronchite.

L'armoise blanche a été utilisée aussi pour le traitement de troubles gastriques, la gastrite, la diarrhée et les douleurs abdominales [21, 36, 42], l'inflammation du tractus gastro-intestinal, les convulsions [43, 44], les maladies infectieuses, les maladies de la peau, la gale et la syphilis [45]. Elle est aussi employée pour la guérison des blessures externes, les inflammations et la polyarthrite rhumatoïde [46].

Des études ethno-pharmacologiques ont montré l'intérêt de l'armoise blanche contre le diabète grâce à son activité hypo-glycémiante et anti-hyperglycémiante [47- 49], ainsi que contre l'hyper – tension artérielle et les névralgies [31, 41, 50]. Elle est efficace aussi contre les maladies cardiovasculaires [50, 51].

En outre, cette espèce est utilisée en décoction contre la fièvre et dans le traitement des troubles menstruels et nerveux, les maladies de la peau, la gale et la syphilis [27, 40, 41, 52]. Elle est considérée comme un nouveau chémotype préventif contre la progression du cancer [53].

Les extraits aqueux d'armoise blanche ont montré des activités antileishmaniose, antispasmodique [54-56], Analgésique, hémostatique [28, 56], antioxydante et anti-inflammatoire [20]. Aussi, la tisane préparée à partir de l'*Artemisia herba alba* Asso a été utilisé comme agent antibactérien dans la médecine populaire algérien [56].

L'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* Asso a été connue par ses vertus thérapeutique, désinfectante, vermifuge et antispasmodique [21]. Beaucoup de chercheurs ont montré diverses activités biologiques et / ou pharmacologiques de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* Asso. comme agent antimicrobien, antifongique, antioxydant, [24, 31] et antidiabétique [57]. Elle présente également des activités antileishmaniose et antimutagène [58, 59].

## 1.2. Romarin : (*Rosmarinus officinalis* L.)

### 1.2.1. Etymologie :

Le nom latin *Rosmarinus* est habituellement interprété, comme dérivé "ros" de la rosée et "marinus" d'appartenir à la mer [60, 61]. Cette nomination de la plante est due au fait qu'elle se rencontre de plus en plus près de la mer. Cette interprétation est un produit d'étymologie traditionnelle, mais la plus récente étude étymologique est inclinée à une origine grecque " rhos " arbuste et " myrinos " aromatique [62, 63]. Il a également été appelé « antos » par les anciens Grecs, qui est « la fleur » ou « libanotis » en raison de son odeur d'encens [64].

Le nom d'espèce *officinalis* indique que la plante a été utilisée à des fins médicinales [65].

### 1.2.2. Systématique :

D'après QUEZEL et SANTANA [16], le *Rosmarinus officinalis* L. appartient :

|                      |                                  |
|----------------------|----------------------------------|
| Règne :              | Plantae                          |
| Sous règne :         | Tracheobionta                    |
| Embranchement :      | Spermatophyta                    |
| Sous embranchement : | Magnoliophyta                    |
| Classe :             | Magnoliopsida                    |
| Sous classe :        | Asteridae                        |
| Ordre :              | Lamiales                         |
| Famille :            | Lamiaceae                        |
| Genre :              | <i>Rosmarinus</i> L.             |
| Espèce :             | <i>Rosmarinus officinalis</i> L. |

### 1.2.3. Synonymes botaniques [66, 67, 68] :

- *Rosmarinus latifolius* Miller.
- *Rosmarinus angustifolius* Miller.
- *Salvia rosmarinus* Schleiden.
- *Rosmarinus laxiflorus* Noë.

#### 1.2.4. Noms vernaculaires [65, 68]:

- Arabe: Iklil el gabal, Klil, Iklil.
- Anglais: Rosemary, moorwort.
- Français: Romarin, Encensier, Herbe-aux-couronnes, rose marine.

#### 1.2.5. Description botanique de la plante :

Le romarin (Figure 1.2), est un arbrisseau vivace, touffu, toujours vert de 1 m à 1.5 m [69], pouvant atteindre jusqu'à 2 m de hauteur dans les régions pluvieuses où les conditions écologiques sont favorables [70].

Il est facilement reconnaissable en toute saison par ses feuilles (Figure 1.2) persistantes, sessiles, opposées, linéaires, coriaces et enroulées sur les bords [65, 71-73]. Elles sont étroites, pointues, épaisses, luisantes, chagrinées et verdâtres sur la face supérieure. La face inférieure tomenteuses et blanchâtres, présente une nervure médiane saillante, avec 1,0-2,5 cm de long et 4 mm de largeur par 1-3 mm d'épaisseur [61, 64, 72-75].

Les fleurs bilabiées, sont groupées en inflorescences spiciformes (Figure 1.2), leur couleur est d'un bleu pâle ou blanchâtre maculées de taches violettes. Les fleurs blanches sont rares (ex : *Rosmarinus officinalis* albiflorus). Le calice en cloche est bilabié [61, 65, 71, 73]. Les feuilles et les fleurs ont une odeur caractéristique forte en raison de l'huile essentielle accumulée dans trichomes glandulaires [64, 76, 77]. Comme pour la plupart des Lamiacées, les fruits sont des akènes simples de couleur brune [75, 78]. La floraison peut avoir lieu toute l'année surtout après les grandes pluies de Septembre à Février [70].



Figure 1.2: Aspect général, feuilles et inflorescences de *Rosmarinus officinalis* L. [79, 80].

### **1.2.6. Répartition géographique et écologie :**

*Rosmarinus officinalis* L. est une plante médicinale endogène à l'Europe du sud et à la région du littoral à travers les zones d'Asie mineure, principalement dans les zones entourant la mer Méditerranée [81-85]. Elle se trouve en particulier sur les collines rocheuses et sèches [86].

Il est répandu dans les pays européens, en France, en Espagne et au Portugal. On le retrouve également au Maghreb (Maroc, Algérie, Tunisie et Libye) où il est abondant. Il devient rare et ne se manifeste que dans quelques stations isolées en Egypte, en Palestine occupée et au Liban [87]. Cependant, cette plante aromatique peut également être trouvée dans d'autres pays tels que l'Argentine, le Brésil et l'Uruguay [70, 88, 89].

Le romarin est cultivé dans plusieurs pays pour ses huiles essentielles. Il est principalement cultivé en Italie, Espagne, Grèce, Turquie, Egypte, France, Portugal, l'Inde, l'Afrique du Nord, Afrique du Sud, l'Asie centrale, l'Asie du Sud, en Australie et aux Etats-Unis [69, 70, 88- 92].

C'est une espèce indigène poussant spontanément dans toute l'Algérie [16], il se présente dans les zones littorales pas trop loin de la mer, les lieux secs et même au Sahara [87].

Le romarin résiste à la sécheresse et il est très exigeant en lumière et en chaleur. Il s'acclimate particulièrement dans les zones arides supérieures, du subhumide chaud à frais (le thermo-méditerranéen et le méso-méditerranéen). Il est indifférent aux qualités chimiques du sol. Cependant, il présente une certaine préférence pour les sols carbonatés et bien drainés [93-95].

### **1.2.7. Propriétés et utilisation :**

Le romarin est une plante aromatique intéressante par son contenu en composés bioactifs [96 -98].

Depuis l'antiquité, le romarin est employé pour améliorer et stimuler la mémoire et prévenir la maladie d'Alzheimer. Encore aujourd'hui, les étudiants en font brûler dans leurs chambres en période d'examens [99 -103].

Il est fréquemment utilisé en raison de son goût amer et astringent dans la cuisine méditerranéenne traditionnelle comme condiment [101, 103, 104].

Le romarin a été cité, depuis le 8<sup>ème</sup> siècle dans la médecine traditionnelle arabo-musulmane par IBN EL BEITHAR pour ses propriétés diurétiques et emménagogues [78, 95]. Les herboristes l'utilisent, traditionnellement, comme sudorifique, diurétique, tonique, astringent, stimulant, digestif, expectorant [105-108], cholagogue [92], anti-nociceptive, analgésique, cholérétique, antispasmodique, arthritiques, antirhumatismal, anti-thrombotique et antidépresseur [109-116].

Il est également reconnu pour leurs propriétés antimicrobiennes, antioxydantes et anti-inflammatoires [117-124].

Le romarin est utilisé aussi pour la prévention et le traitement du diabète, l'hypertension, le cancer, les maladies cardiovasculaires, l'anémie et l'insomnie [125-130].

*Rosmarinus officinalis* L. a été décrit comme étant une plante qui traite les obstructions du foie et de la rate. Ses parties aériennes sont aussi utilisées pour soulager la colique rénale, les affections des voies urinaires, les dysménorrhées, les douleurs et les spasmes musculaires [69, 70, 95, 111, 131, 132].

Il est recommandé comme relaxant, contre les migraines, les maux de tête, l'épilepsie, la sinusite et contre les maladies neurodégénératives. Ainsi, pour accélérer le processus de cicatrisation des plaies [69, 112, 133-135].

SASIKUMAR [101], BIESKI et al. [129], HAMZAA et al. [130], ÇAKILCIOGLU et TÜRKÖGLU [136] & UGULU et al. [137] soulignent que le romarin est utilisé pour traiter et prévenir les problèmes respiratoires comme l'asthme, la bronchite, la grippe et la toux en tant qu'antiseptiques pulmonaires.

C'est un, stomachique, carminative, utilisé pour traiter les ulcères et les diarrhées [131, 138, 139]. Il est utile pour stimuler l'appétit et la sécrétion des sucs gastriques [70].

BERNARDES et al. [140], BUBONJA-SONJE et al. [141] & JORDÁN et al. [142] ont décrit plusieurs activités biologiques de leurs extraits, directement liés par leur concentration en composés phénoliques, notamment dans l'industrie alimentaire [143]. Ces dernières sont connus pour leur haute activité antimicrobienne, utiles pour le contrôle des infections bactériennes des aliments et antioxydante puissante contre les radicaux libres, permettant de ralentir efficacement la peroxydation des lipides [131, 144, 145].

Les huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. ont fait l'objet de plusieurs études, montrant des propriétés antimicrobienne, antioxydante, anti-inflammatoire, anti-tumorale [146, 160], analgésique [70], anti-nociceptive [109], Anti-ulcère [161] et anti dépresseur [115, 116].

Elles aident aussi à réduire les inflammations qui contribuent aux maladies cardiaques et du foie [130, 162].

TSAI et al. [163], SLAMENOVÁ et al. [164] & FERNÁNDEZ et al. [165] ont décrit ces produits naturels en tant que protecteurs efficaces contre le cancer, les dommages oxydatifs, le diabète (activité hypoglycémiant), ainsi que contre l'hypertension. Elles sont également connues pour calmer la toux et soigner les bronchites en tant que antiseptique pulmonaire [92, 138].

Les huiles essentielles confèrent au romarin ses propriétés digestives à savoir : cholagogues, cholérétiques, antispasmodiques, carminatives et stomachiques. Des propriétés toniques, stimulantes, astringentes, sudorifique et antidiarrhéique ont été également mises en évidence [73, 92, 138].

Il a été prouvé par SANDERS et al. [166] & RAUTER [132] l'action des huiles essentielles de romarin dans la stimulation du système nerveux résultant sous contrôle l'amélioration de la mémorisation et de capacités de concentration.

Elles sont utilisées en usage externe (massage sédatif) contre l'arthrite, les contusions, les douleurs (musculaires, rhumatismales et traumatiques), les sciatiques et dans la revitalisation des membres paralysés, en augmentant la circulation sanguine des membres, ainsi que contre l'eczéma et la goutte [90, 138, 167].

### 1.3. Huiles essentielles :

Le terme « huile essentielle » a été inventé au 16<sup>ème</sup> siècle par le médecin suisse HOHENHEIM pour désigner le composé actif d'un remède naturel [168].

Plusieurs définitions de L'huile essentielle existent mais celle retenue par l'Association Française de Normalisation AFNOR [169], la norme ISO [170] et adoptée par la PHARMACOPÉE EUROPÉENNE [171], est la suivante :  
*« Les huiles essentielles sont des produits odorantes et volatils généralement de composition complexe obtenus 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 sans chauffage. Une huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition »* [172-176].

Cette définition est cependant restrictive car elle exclut aussi bien les produits extraits à l'aide de solvants que ceux obtenus par tout autre procédé. Nous retenons alors que les huiles essentielles sont des mélanges de complexes aromatiques de plantes, extraits par distillation à la vapeur d'eau ou aux solvants [8, 176, 177].

Les plantes qui synthétisent les huiles essentielles sont connues sous le nom de « plantes aromatiques » [178].

#### 1.3.1. Répartition et localisation :

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs [71].

Les familles botaniques les plus courantes produisant les huiles essentielles sont: Abiétacées (pins, sapins, cèdres), Apiacées (anis, fenouil), Astéracées (absinthe, armoise blanche, camomille), Cupressacées (genévrier), Lamiacées (romarin, lavande, thym, origan), Lauracées (cannelle, laurier), Myrtacées (eucalyptus, giroflier, myrte), Poacées (citronnelle), Rutacées (citron, mandarine, pamplemousse) [179-186].

Les huiles essentielles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices spécifiques. Ce sont des structures histologiques spécialisées servant à leur synthèse et à leur stockage. Ces cellules sont le plus souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante recouvertes d'une cuticule [71, 186-189].

Les cellules sécrétrices sont rarement à l'état isolé, mais le plus souvent regroupées dans des poches sécrétrices (*Myrtacées, Rutacées*), dans des canaux sécréteurs (*Apiacées, Astéracées*) ou dans des poils sécréteurs (*Lamiacées*) [182, 190-194].

Sur le site de stockage, les gouttelettes d'huile essentielle sont entourées de membranes spéciales constituées d'esters d'acides gras hydroxylés hautement polymérisés, associés à des groupements peroxydes. En raison de leur caractère lipophile et donc de leur perméabilité extrêmement réduite vis-à-vis des gaz, ces membranes limitent fortement l'évaporation des huiles essentielles ainsi que leur oxydation à l'air [189].

Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une même espèce et dans un même organe [187-188].

Les huiles essentielles sont issues de la sécrétion naturelle élaborée dans divers organes végétaux: les sommités fleuries (menthe, lavande), les feuilles (eucalyptus, laurier) et moins habituellement dans les rhizomes (gingembre), les fruits (anis), les écorces (agrumes, cannelle) et les graines (muscades) [195-199].

### **1.3.2 Fonction dans la plante :**

La fonction biologique des huiles essentielles demeure le plus souvent obscure [71]. Il est toutefois vraisemblable qu'ils ont une fonction écologique (Figure 1.3) lors des interactions végétales, comme agent allélopathique, afin de réduire la compétition des autres espèces de plantes par l'inhibition de la germination des graines. En effet, le 1,8-cinéole et le camphre, libérés dans l'atmosphère sont absorbés par le sol sec, inhibant la germination des graines des espèces spontanées [176, 200- 203].

Elles interviennent aussi lors des interactions végétal- animal, comme agent de protection contre les prédateurs : insectes, champignons et bactéries par leurs propriétés antiseptiques, insecticides, fongicides et bactéricides [54, 174, 204-206]. Elles sont aussi efficaces contre les herbivores par le gout et les effets défavorables sur le système nerveux [202, 203].

Par leurs odeurs caractéristiques, les huiles essentielles interviennent également dans l'attraction des pollinisateurs (insectes et oiseaux) qui participent dans la dispersion du pollen ce qui favorise la pollinisation [54, 204, 207].

Les huiles essentielles protègent aussi, la plante contre le stress photo-oxdatif [208]. Les constituants des huiles essentielles sont considérés comme des modérateurs des réactions d'oxydation intramoléculaire, protégeant la plante contre les facteurs atmosphériques [209].

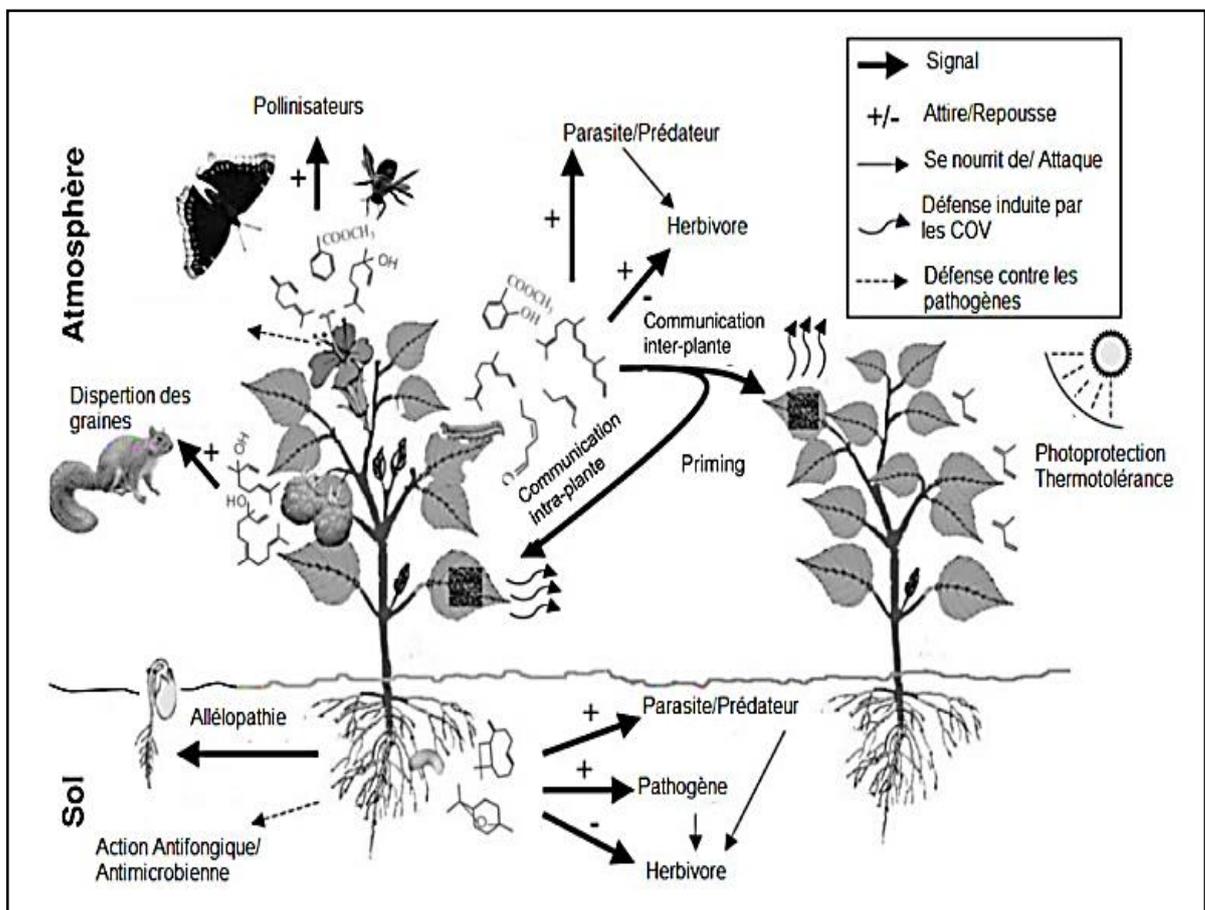


Figure 1.3: Interactions des plantes avec leur environnement [205].

Certains auteurs considèrent que l'huile essentielle est une source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques. D'autre part, elle conserve l'humidité nécessaire à la vie des plantes exposées à des climats désertiques [210].

BRUNETON [71] & BALDWIN [211] signalent que l'huile essentielle peut constituer des supports à une « communication » plante - plante ou plante-environnement. La variété structurale de ses composés autorise le transfert de « messages biologiques » sélectifs.

### **1.3.3. Extraction :**

L'extraction des huiles essentielles est une opération capitale qui doit permettre d'obtenir des produits volatils, particulièrement fragiles, sans altérer la qualité [212]. Le choix de la méthode d'extraction des huiles essentielles dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, rameaux), le rendement et les caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire aux températures élevées.

Les principales méthodes d'extraction des huiles essentielles peuvent être résumées en :

#### **❖ Extraction par hydrodistillation :**

C'est la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée, elle demeure la technique la plus employée pour extraire les huiles essentielles [213]. Elle consiste à immerger le matériel végétal directement dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à l'ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant (Figure1.4). L'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité [213-215].

FERHAT *et al.* [213], CASSEL *et al.* [216], ZHANG *et al.* [217] & MONCADA *et al.* [218] soulignent que les avantages de cette technique sont importants. Ils enregistrent des rendements élevés avec des extraits de haute pureté et ils notent également que l'inconvénient principal est l'intensité de l'énergie et la température élevée affectant la qualité des huiles essentielles extraites.

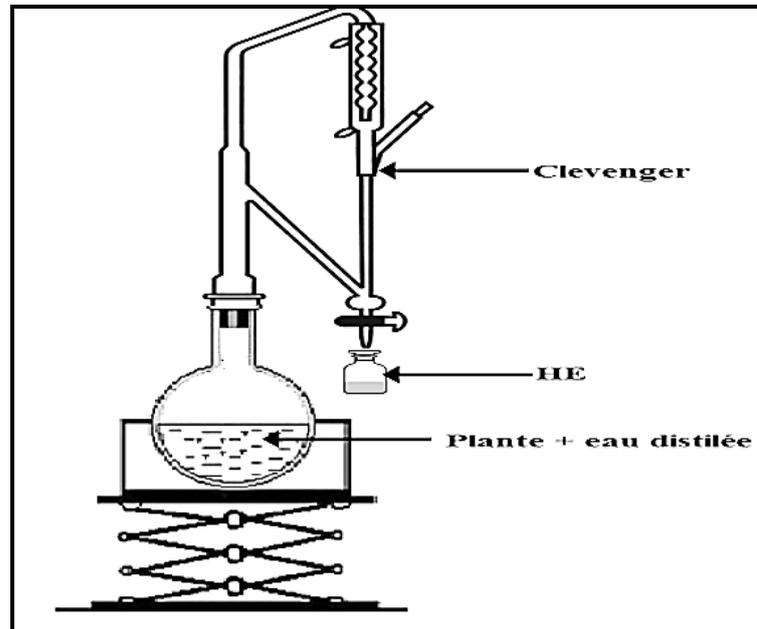


Figure 1.4 : Dispositif expérimental de l'hydrodistillation (type Clevenger) [71].

BOUKHATEM et *al.* [219] confirment que le chauffage prolongé et puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques. L'eau, l'acidité et la température peuvent induire l'hydrolyse des esters mais aussi des réarrangements, des isomérisations et/ou des oxydations.

❖ **Distillation par entraînement à la vapeur d'eau :**

Les parties de plantes utilisées sont déposées sur une grille perforée au-dessus de la base de l'alambic, sans que le matériel végétal ne soit au contact avec l'eau [8, 213].

La vapeur d'eau qui s'est volatilisée et entraînée l'huile essentielle, se condense ensuite dans le serpentin du réfrigérant. L'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité [212].

Pendant l'entraînement à la vapeur d'eau, la matière végétale est exposée à une température élevée et à l'action chimique de l'eau, dans ces conditions, la fragilité thermique des constituants de l'huile ou l'hydrolyse de certains d'entre eux conduisent à la formation d'artéfacts [213].

### ❖ **Hydrodiffusion :**

Cette technique consiste à pulser de la vapeur d'eau à travers la masse végétale, du haut vers le bas. Ainsi le flux de vapeur traversant la biomasse végétale est descendant contrairement aux techniques classiques de distillation dont le flux de vapeur est ascendant [71, 212].

L'avantage de cette technique est traduit par l'amélioration qualitative et quantitative de l'huile récoltée, l'économie du temps et d'énergie [71, 212].

Ces procédés présentent des inconvénients dus principalement à l'action de la vapeur d'eau ou de l'eau à l'ébullition. En effet, certains organes végétaux, en particulier les fleurs, sont trop fragiles et ne supportent pas les traitements par entraînement à la vapeur d'eau et par hydro-distillation.

### ❖ **Extraction par enfleurage :**

L'industrie des parfums a utilisé l'enfleurage pour les organes fragiles comme les fleurs. Ce procédé permet d'obtenir des essences dites absolues. Il consiste à extraire les principes aromatiques des plantes par des corps gras qui se saturent d'essence. Le corps gras est épuisé par l'alcool absolu et ce solvant est évaporé sous vide [214, 220].

### ❖ **Expression à froid :**

Elle constitue le plus simple des procédés, mais ne s'applique qu'aux agrumes dont l'écorce des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences. Elle consiste à exercer sur les fruits une pression pour extraire les huiles essentielles présentes dans leur écorce [71, 212, 220, 221].

L'essence obtenue est ensuite entraînée par un courant d'eau froide. Une émulsion constituée d'eau et d'essence se forme, l'essence est alors isolée par décantation [212, 213].

Cette technique uniquement mécanique limite l'oxydation car elle conserve les antioxydants naturels contenus dans la fraction non volatile de l'essence, le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence car il n'a subi aucune modification chimique [212, 213].

Cependant l'utilisation de grande quantité d'eau dans ce procédé peut altérer la qualité des huiles essentielles par dissolution des composés oxygénés, par hydrolyse et par transport de microorganismes [212, 213].

#### ❖ **Extraction par solvants :**

Ce procédé d'extraction ne permet pas d'obtenir des huiles essentielles, mais des concrètes. Il s'agit d'extraits de plantes obtenus au moyen de solvants non aqueux. Les solvants généralement utilisés sont des hydrocarbures aliphatiques : hexane, éther de pétrole, cyclohexane, propane et butane liquide [71].

Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également des composés non volatils tels que les cires, les pigments, les acides gras et bien d'autres composés [222].

Purifié par l'alcool absolu, le produit obtenu est appelé "absolu" et sa composition se rapproche de celle d'une huile essentielle [223, 224].

BRUNETON [71] signale que l'inconvénient majeur de l'extraction par les solvants est leur manque de sélectivité. En effet, de nombreuses substances lipophiles peuvent se retrouver dans les concrètes et impose une purification ultérieure. Un autre inconvénient réside dans la toxicité des solvants (problème des résidus dans le produit final).

Les inconvénients des techniques précédentes ont attiré l'attention de plusieurs laboratoires de recherche et ont permis la mise au point des nouvelles techniques d'extraction des huiles essentielles qui sont beaucoup plus écologiques, en utilisant des solvants moins toxiques et en petites quantités [213].

Pour raccourcir le temps de traitement, limiter l'altération des constituants de l'huile essentielle et économiser l'énergie, il est possible de travailler en surpression modéré [68].

Parmi ces techniques innovantes, figurent : l'extraction assistée par micro-ondes ou ultrasons, l'extraction par les fluides supercritiques [213, 225].

### ❖ **Extraction par micro-ondes :**

C'est une technique récente développée dans le but d'extraire des produits naturels comparables aux huiles essentielles et aux extraits aromatiques.

Dans ce procédé, la plante est chauffée sélectivement par un rayonnement micro-ondes dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle. Les molécules volatiles sont entraînées dans le mélange azéotrope formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée [221, 71, 226].

L'évaporation de l'eau contenue dans les cellules, crée à l'intérieur de ces dernières une pression qui brise les parois végétales et libère ainsi le contenu en huile [224]. Un système de refroidissement à l'extérieur permet la condensation de distillat composé d'eau et d'huile essentielle facilement séparable par simple décantation [71, 226].

Cette technique présente des avantages notamment : la rapidité, économie de temps et d'énergie. Le procédé utilisé donne un produit qui, le plus souvent, est de qualité supérieure à celle de produit d'hydrodistillation traditionnelle (dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées), extrait dépourvu de solvant résiduel [227-231].

### ❖ **Extraction assistée par ultra-sons :**

Les ultrasons sont des ondes vibrationnelles mécaniques de fréquence allant de 16 KHz à 1 GHz pouvant se propager dans les solides, les liquides et les gaz. Dans un milieu liquide la propagation des ondes va générer des cycles successifs de compression (haute Pression) et de raréfaction (basse pression) [232].

Cette différence de pression va générer des mouvements moléculaires au sein du milieu. Lors d'un cycle de raréfaction la distance entre molécules est augmentée et au-dessus d'une certaine distance, dépendant de chaque milieu, des bulles de cavitations vont se former. Ces bulles vont croître pendant les phases de raréfaction et diminuer pendant les phases de compression. La répétition de ces cycles va conduire à l'implosion des bulles de cavitation, libérant ainsi une grande quantité de matière [233].

### ❖ **Extraction au CO<sub>2</sub> supercritique :**

C'est un procédé d'extraction, par fluide supercritique, utilise le CO<sub>2</sub> sous très haute pression et à basse température pour extraire les huiles essentielles.

Il s'agit d'une énergie efficace, processus respectueux de l'environnement (méthode verte). Les organes de la plante sont placés dans une cuve en acier inoxydable et le CO<sub>2</sub> est injecté dans le réservoir. Sous haute pression, il se transforme en CO<sub>2</sub> liquide et agit comme un solvant pour extraire l'huile essentielle de la plante. Lorsque la pression est diminuée, CO<sub>2</sub> retourne à l'état gazeux ne laissant que l'huile volatile et aucun autre résidu n'est accumulé [213].

Cette technique est aujourd'hui considérée comme la plus prometteuse car elle fournit des extraits volatils de très haute qualité, de composition très proche de celle des arômes végétaux naturels [71, 234].

Les extractions au CO<sub>2</sub> supercritique, à des températures plus basses, sont plus douces sur les échantillons de plantes par rapport à distillation à la vapeur (absence de réarrangements et d'hydrolyse). En outre, elle produit des rendements plus élevés. De nombreuses molécules qui ne peuvent pas être extraites par distillation à la vapeur sont obtenues avec extraction du CO<sub>2</sub> [71].

Le CO<sub>2</sub> est relativement non toxique, non- inflammable, disponible en haute pureté, de faible coût et peut être facilement retiré de l'extrait. Le principal inconvénient de CO<sub>2</sub> est son manque de polarité pour l'extraction des analytes polaires [178, 231].

#### **1.3.4. Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles :**

Les propriétés physiques des huiles essentielles se résument en leurs indices, pouvoir rotatoire, viscosité, densité, solubilité dans l'alcool, point d'ébullition et congélation. Généralement incolores ou jaune pâle, les essences sont liquides à température ambiante. la nature huileuse la rend liposolubles ainsi elles sont peu solubles dans l'eau mais le sont dans les solvants organiques apolaires, les huiles grasses et dans les alcools [71, 235, 236].

Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau (à l'exception des huiles essentielles de saffran (*Sassafras albidum*), de girofle (*Eugenia caryophyllata*) ou de cannelle (*Cinnamomum zeylanicum*) constituent des exceptions [71, 235, 236].

Les huiles essentielles sont extrêmement volatiles et sensibles à l'oxydation. En raison de la structure de leurs molécules (présence de doubles liaisons et des groupes fonctionnels tels que un groupe hydroxyle, aldéhyde, ester). Elles sont facilement oxydées par la lumière, la chaleur et l'air [237, 238].

Elles ont tendance à se polymériser en donnant lieu à la formation de produits résineux ce qui induit à la perte de ses propriétés. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée [215].

#### **1.3.5. Conservation :**

La conservation des huiles essentielles exige certaines précautions indispensables si l'on veut éviter leur oxydation et leur dépolymérisation. Aussi convient-il d'utiliser des flacons de verre colorés ou opaques, munis de bouchons bien adaptés pour les préserver de l'air et de la lumière, principaux agents de la dégradation [180, 231].

Bien stockées, les huiles essentielles se conservent environ trois ans. Seules les essences d'agrumes, d'une conservation plus fragile, se renouvellent tous les ans [212].

#### **1.3.6. Biosynthèse et composition chimique des huiles essentielles :**

Les huiles essentielles sont des mélanges très complexes de composés volatils, beaucoup contiennent environ 20 à 60 composés, même si certains peuvent contenir plus de 100 différents composants [239-241].

Ces composés peuvent être classés en deux catégories principales: le groupe des terpénoïdes et le groupe des phénylpropanoïdes [242-244].

➤ **Terpénoïdes :**

Les composés terpéniques constituent une famille de composés largement répandue dans le règne végétal et les principaux constituants des huiles essentielles. Ils sont synthétisés (figure 1.5) à partir d'un précurseur unique appelé l'isopentenyl pyrophosphate (IPP = C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>) [176].

Cette unité isoprénique à 5 atomes de carbone peut être synthétisée dans le cytoplasme via la voie du mévalonate et conduit à la formation de la plupart des sesquiterpènes ou dans les plastides via la voie non mévalonique (la voie de déoxy xylulose phosphate) produisant principalement des monoterpènes et diterpènes [176, 245-247].

La voie du mévalonate (Figure 1.5) consiste en la condensation de trois molécules d'acetyl CoA pour former l'acetoacetyl CoA qui se transforme après une chaîne des réactions enzymatiques et consommatrices d'énergie en mévalonate 5-diphosphate, puis une réaction de décarboxylation permet de transformer ce dernier en IPP [175,176, 247].

Alors que pour la voie non mévalonique (Figure 1.5), la condensation tête à tête de glyceraldehyde3-phosphate avec le pyruvate conduit à la formation de 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DOXP) qui subit par la suite une chaîne des réactions enzymatiques, aboutissent à la formation du 1-hydroxy-2-methyl-2(E) butenyl-4PP (HMBPP), qui sous l'action de HMBPP réductase se transforme en IPP [175, 176, 245, 247].

Après la synthèse de l'unité isoprénique, des réactions de condensation tête à queue d'un nombre variable d'unités isopréniques aboutissent à formation des différentes classes terpéniques : des monoterpènes C<sub>10</sub> (issus de la condensation de 2unités isopréniques), des sesquiterpènes C<sub>15</sub> (3 unités isopréniques), des diterpènes C<sub>20</sub> (4 unités isopréniques) et des triterpènes C<sub>30</sub> (6 unités isopréniques) [176, 247].

Pour chaque classe de terpène, des différentes réactions chimiques, cyclisation fonctionnalisation, réarrangement, permettent de former diverses structures terpéniques à partir d'un précurseur unique [71].

### ➤ Phénylpropanoïdes :

Ces composés aromatiques dérivés du phénylpropane ( $C_6 - C_3$ ) sont beaucoup moins fréquents que les terpénoïdes [248].

Beaucoup des Phénylpropanoïdes trouvés dans les huiles essentielles sont des phénols (allylphénols et propénylphénols) ou des éthers de phénols, parfois des aldéhydes [71, 176, 179]. Ils sont constitués d'une chaîne de trois carbones liée à un noyau aromatique à six carbones ( $C_6 - C_3$ ) où la  $C_6$  étant un cycle benzénique [148].

Les phénylpropanoïdes sont synthétisés (Figure 1.5) par la voie de l'acide shikimique, leurs principaux précurseurs étant l'acide cinnamique provenant de l'acide aminé aromatique phénylalanine [176].

L'acide shikimique est synthétisé à partir du phosphoénolpyruvate. L'élimination de l'un des alcools cycliques de l'acide shikimique et la réaction avec du pyruvate de phosphoénol donne l'acide chorismique. Ce composé forme le squelette de l'acide phénylpropionique. L'amination et la réduction de la fonction cétone de l'acide chorismique produit l'acide aminé phénylalanine. En outre, l'aromatisation de l'acide shikimique donne des dérivés de l'acide benzoïque, présents dans plusieurs huiles essentielles [176, 241].

Généralement, L'huile essentielle de romarin contient principalement des monoterpènes et dérivés monoterpènes (95 - 98 %), le reste (2 - 5 %) étant des sesquiterpènes, les plus importants sont (Figure 1.6) : le camphre, le 1,8- cinéole suivi par le bornéole, le verbénone, l' $\alpha$  -pinène et le camphène [76, 104, 249, 250, 251].

En effet, l'huile essentielle d'armoise blanche a été en grande partie rapportée être composée de monoterpénoïdes, principalement oxygénés, tels que (Figure 1.6) : le 1,8-cinéole, le chrysanthénone,  $\alpha/\beta$ -thujone et de camphre en tant que composants majoritaires [28].

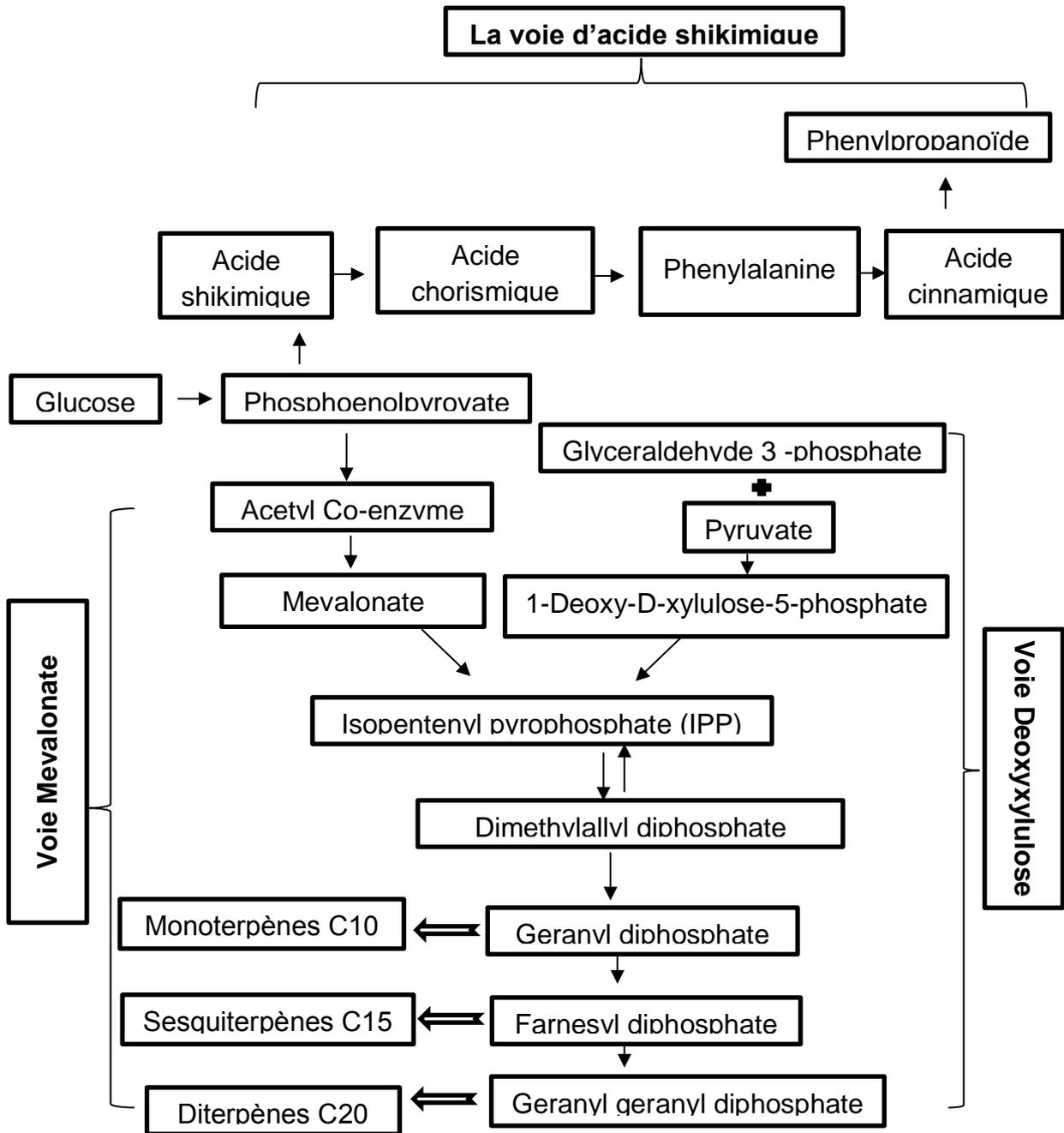


Figure 1.5 : Biosynthèse des terpenoïdes et phenylpropanoïdes [176].

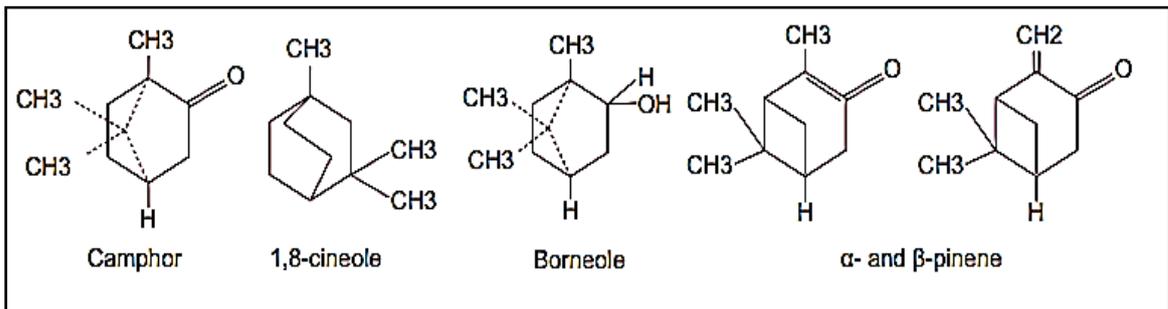


Figure 1.6 : Structure de quelques composés chimiques majoritaires [252].

### 1.3.7. Toxicité :

En dépit de leurs effets bénéfiques, les huiles essentielles sont loin d'être non-toxiques. La majorité des huiles essentielles, causent des effets toxiques [204]. La toxicité des huiles essentielles est très variable en fonction de leur composition il est très intéressant de connaître que :

- Les huiles essentielles à cétones sont neurotoxiques.
- Les huiles essentielles à terpènes sont irritantes et néphrotoxiques.
- Les huiles essentielles à phénols ont une action caustique sur la peau et sont hépatotoxiques.

Les huiles essentielles doivent toujours être utilisées diluées. Il est important de respecter la posologie et la durée de la prise [212].

Les huiles essentielles sont des métabolites secondaires qui ont une toxicité par voie orale faible ou très faible. La majorité de celles qui sont couramment utilisées ont une DL<sub>50</sub> comprise entre 2 et 5 g/kg (anis, l'eucalyptus et girofle) ou, ce qui est le plus fréquent, supérieures à 5 g/kg (camomille lavande).

Les mêmes observations peuvent être faites pour les constituants des huiles essentielles. En effet, rares ceux sont qui ont une DL<sub>50</sub> < 2 g/kg (camphre : 1,47 g/kg et thujone : 0,2 g/kg). Ces données, testées chez l'animal, ne fournissent que des indications relatives. Les observations cliniques chez l'homme montrent que des intoxications aiguës sont possibles, même lorsque la DL<sub>50</sub> est élevée [71].

### 1.3.8. Notion de chémotype :

C'est une classification chimique, biologique et botanique qui désigne la molécule majoritairement présente dans une huile essentielle [1]. Ce qui permet de distinguer une huile essentielle extraite d'une même espèce botanique mais de composition biochimique différente [253].

Basé sur les principaux composés des huiles essentielles de romarin, trois différents chémotypes ont été détectés. : Le chémotype eucalyptol, le chémotype camphre - bornéol et le chémotype  $\alpha$  -pinène - verbenone [138, 183, 265, 254].

Alors que la composition chimique de l'huile essentielle de l'armoise blanche, selon TISSERAND et YOUNG [255] a permis l'identification de sept chemotypes, d'un point de vue chimique : Cis-Chrysanthenyl acétate,  $\beta$ -Thujone,  $\alpha$ -thujone, camphore, verbenone,  $\alpha$ -thujone/ camphore,  $\alpha$ -thujone /  $\beta$ -Thujone .

### **1.3.9. Domaines d'application des huiles essentielles :**

Actuellement, près de 3000 huiles essentielles sont décrites, parmi lesquelles environ 300 présentent une importance commerciale dans l'industrie pharmaceutique et thérapeutique (préparation de matière première), l'industrie cosmétique (savons, parfums, dentifrices, eaux de toilettes) ainsi que l'industrie agro-alimentaire (boissons alcoolisées, desserts, bonbons) [95, 256], en raison d'une part, de leurs activités antioxydantes, antibactériennes et antifongiques [12,257] et d'autre part, de ce que la plupart des huiles essentielles sont classées dans la liste des substances GRAS, qui les rendent utiles en tant que conservateurs naturels dans les industries agroalimentaires [258-261].

Ces activités spécifiques sont liées aux différents composants qu'elles contiennent. Leur composition chimique est d'une grande complexité, ce qui les rend inimitables car chaque huile essentielle regroupe en réalité plusieurs substances aromatiques très élaborées et très différentes [220].

- **En industrie pharmaceutique et thérapeutique :**

L'usage des huiles essentielles en médecine ne fut jamais abandonné malgré la découverte de processus de synthèse organique et la naissance de l'industrie pharmaceutique. Leurs applications dans ce domaine sont vastes. Elles requièrent de bonnes connaissances de ces substances et du fonctionnement du corps humain [262]. Elles sont considérées comme un véritable réservoir de molécules de base qui sont irremplaçables [263].

En phytothérapie, les huiles essentielles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne et fongique. Elles présentent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre [264].

Elles sont connues pour leur activité antimicrobienne et certaines sont classées comme des substances qui pourraient être employées pour empêcher la croissance des microorganismes pathogènes et contaminants [259, 261].

MIGHRI et *al.* [31] ont prouvé que quatre chemotypes des huiles essentielles d'armoise blanche ont une activité antibactérienne contre *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Salmonella ser.*

De même, IMELOUANE et *al.* [45] ont trouvé que l'huile essentielle d'armoise blanche a une activité antibactérienne vis à vis les souches *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Bien que, Le romarin est considéré comme l'un des épices avec une forte activité antimicrobienne. Leur huile essentielle contenant le camphre, identifié comme l'un des principaux composants chimiques responsables pour exercer une activité antimicrobienne [265].

Il a été signalé que les huiles essentielles de citron, de géranium, de romarin, d'orange et de clou de girofle ont une importante activité inhibitrice sur quatre bactéries Gram négatif (*Escherichia coli*, *klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*) et vis-à-vis deux bactéries Gram positif (*Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*) [266].

- **En industrie cosmétique :**

Les huiles essentielles ont été répandues, pendant des siècles, comme un des ingrédients en produits de beauté, en raison de leurs activités biologiques intéressantes.

L'huile essentielle de romarin est largement appliquée dans l'industrie cosmétique pour produire diverses eaux de Cologne, essences de bain, lotions capillaires et shampoings et comme une composante du désinfectant [267, 268].

- **En industrie agro-alimentaire :**

En plus de la saveur contribué aux aliments, beaucoup de plantes aromatiques et leurs huiles essentielles montrent une activité antimicrobienne et pourraient empêcher la croissance des microorganismes pathogènes, en améliorant de ce fait la sécurité alimentaire [269, 270].

Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Quelques travaux ont rapporté que certaines huiles essentielles sont plus efficaces que les antioxydants synthétiques [128].

Des études de l'équipe constituant le Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA), ont montré que l'incorporation des huiles essentielles directement dans les aliments (viandes hachées, légumes hachés, purées de fruit et yaourts) où l'application par vaporisation en surface de l'aliment (pièce de viande, charcuterie, poulet, fruits et légumes entiers) contribuent à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydation [271].

Le romarin a été récolté depuis longtemps pour une utilisation dans les denrées alimentaires [133]. Egalement, ses huiles essentielles, et ses extraits solubles dans l'eau ont été utilisés pour la conservation et l'assaisonnement des denrées alimentaires [172]. Les activités antioxydantes et antibactériennes des composants de base de l'huile essentielle de romarin (1,8-cinéole,  $\alpha$ -pinène et de camphre) ont été démontrées [268].

TSAI *et al.* [163] & SLAMENOVÁ *et al.* [164] ont décrit ces produits naturels en tant que protecteurs efficaces contre le cancer, les dommages oxydatifs et des agents pathogènes d'origine alimentaire.

- **En industrie des pesticides :**

Dans la recherche d'alternatives aux pesticides de synthèse, les huiles essentielles de plantes aromatiques ont été largement étudiés et certains d'entre eux sont commercialisés comme biopesticides [273].

Contrairement aux pesticides de synthèse, généralement basée sur un seul ingrédient, les huiles essentielles ont un mélange complexe de composants qui les rendent aptes à éviter la résistance de site cible, puisque leurs composants peuvent interagir en synergie ou additive [274].

Les substances d'origine naturelle et plus particulièrement les huiles essentielles détiennent actuellement une place importante dans les systèmes de lutte, leur rôle dans la recherche phytopharmaceutique dans certains pays du monde n'est plus à démontrer [8].

Les propriétés antimicrobiennes, insecticides, acridicides et larvicides de l'huile essentielle de l'armoise blanche et du romarin sont bien documentés [63, 275].

En effet, il a été signalé que l'huile essentielle de romarin inhibe la croissance de *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus flavus* [276].

De même, Il a été montré que les huiles essentielles extraites de la plante aromatique *Artemisia herba-alba* Asso. expriment un effet insecticide sur des ravageurs des denrées stockés, *Ephestia kuehniella* [277].

Un insecticide / acaricide contenant de l'huile de romarin en tant qu'ingrédient actif a été récemment introduit pour une utilisation sur les cultures horticoles sous le nom EcoTrol™ [8].

#### **1.4. Stress oxydant :**

##### **1.4.1. Les espèces oxygénées réactives:**

L'appellation espèces oxygénées réactives (EOR) inclut les radicaux libres de l'oxygène (Tableau 1.1) mais aussi certains dérivés réactifs non radicalaires dont la toxicité est plus importante tels que le peroxyde d'hydrogène et le peroxydinitrite [278, 279].

Les radicaux libres sont des espèces chimiques, atomiques ou moléculaires, contenant un ou plusieurs électron(s) libre(s) non apparié(s) sur leurs couches externes. Du fait de leur caractère très électrophile, les espèces radicalaires vont tenter de rapprocher leurs électrons célibataires en agressant toute molécule susceptible de se faire arracher un électron [280].

L'espèce agressée devient à son tour radicalaire initiant de cette façon un processus de réaction en chaîne qui se caractérise par trois étapes ; (i) initiation, (ii) propagation et (iii) terminaison provoquant enfin une perturbation de la cellule vivante [281].

Tableau 1.1 : Les principales espèces oxygénées réactives [278].

| Nom                             | Symbol         |
|---------------------------------|----------------|
| <b>Espèces radicalaires</b>     |                |
| Anion superoxyde                | $O_2^{\cdot-}$ |
| Radical hydroxyle               | $OH^{\cdot}$   |
| Monoxyde d'azote                | $NO^{\cdot}$   |
| <b>Espèces non radicalaires</b> |                |
| Peroxyde d'hydrogène            | $H_2O_2$       |
| Acide hypochlorique             | $HOCl$         |
| Oxygène singulier               | $^1O_2$        |
| Peroxynitrite                   | $ONOO^-$       |

#### 1.4.2. Les Antioxydants :

Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats [282].

La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques

##### ❖ Systèmes enzymatiques :

Il s'agit principalement de trois enzymes ; (i) la superoxyde dismutase (SOD), (ii) la catalase (CAT) et (iii) la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du  $O_2^{\cdot-}$  et du  $H_2O_2$ , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire [280].

Le mécanisme réactionnel invoqué dans cette détoxification enzymatique peut être résumé dans le schéma suivant :

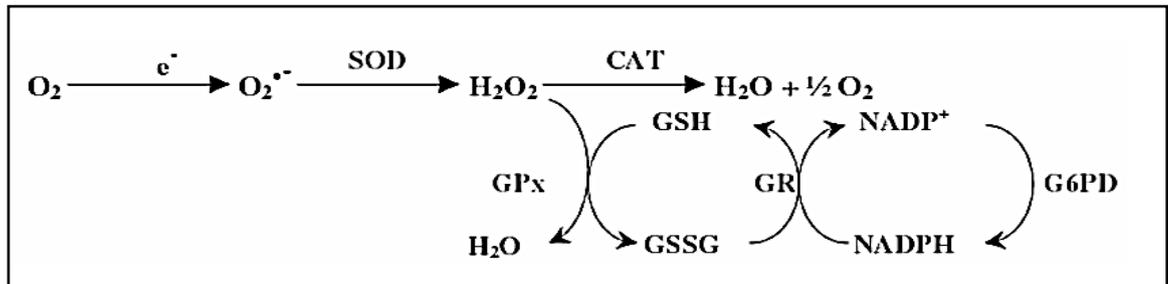


Figure 1.7: Mécanisme réactionnel de système enzymatique.

- La superoxyde dismutase (SOD) accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène [283].
- La catalase agit en synergie avec la SOD, son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire [284].
- La glutathion peroxydase (GPx) joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène
- La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur [284].

#### ❖ **Systemes non enzymatiques :**

Ce groupe de systèmes anti-oxydants renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, la mélatonine, l'acide lipoïque. De tous ces composés endogènes synthétisés par les cellules, le plus important est sans doute le glutathion réduit (thiol majeur au niveau intracellulaire) [285].

La bilirubine est, quant à elle, capable de piéger les radicaux peroxydes et l'oxygène singulier, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires [286].

Les protéines chélatrices de métaux de transitions comme l'haptoglobine, la ferritine, l'albumine et la céruloplasmine agissent en diminuant la disponibilité d'agents pro-oxydants, comme les ions  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  ou  $Cu^{2+}/Cu^+$  permettant par ce biais de prévenir la production des radicaux libres par la réaction de Fenton [287].

Les oligoéléments Le cuivre, le zinc, le manganèse, le sélénium et le fer sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes anti oxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium [288].

D'autres substances exogènes apportées par l'alimentation, telles que les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes agissent en piégeant les radicaux et en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules stables [281, 289].

La vitamine piègeuse devient à son tour un radical qui sera détruit ou régénéré par un autre système. A titre d'exemple, la vitamine E est régénérée par la vitamine C, elle-même régénérée par les ascorbates réductases [289].

Des composés comme les alcaloïdes, les polyphénols et huiles essentielles apportés également par l'alimentation, jouent un rôle similaire de piègeurs de radicaux libres [281].

#### ❖ Les antioxydants synthétiques :

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT) gallate propylée (PG) et le tétrabutylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels [290]. Cependant, l'utilisation d'antioxydants de synthèse est remise en question du fait d'effets négatifs sur la santé du consommateur (effets tératogènes, mutagènes et cancérigènes) [291].

## CHAPITRE 2

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.1. Etude de la région :

##### 2.1.1. Localisation géographique :

L'étude a été menée dans la région de Djelfa. Du point de vue géographique, elle est comprise entre 33° et 35° de latitude Nord et entre 2° et 5° de longitude Est. Elle est caractérisée par une altitude variant de 150 m à 1613 m.

Elle se situe en pleine zone de steppe, à 300 km au sud d'Alger (dernière ville avant l'Atlas saharien et le désert), limitée au Nord par la wilaya de Médéa et de Tissemsilt, à l'Ouest par la wilaya de Laghouat et de Tiaret, à l'Est par la wilaya de M'sila et de Biskra et au Sud par Ouargla et Ghardaïa (Figure 2.1).

Elle couvre près de 18.175 km<sup>2</sup> représentant 1.36% de la superficie totale du pays [292].

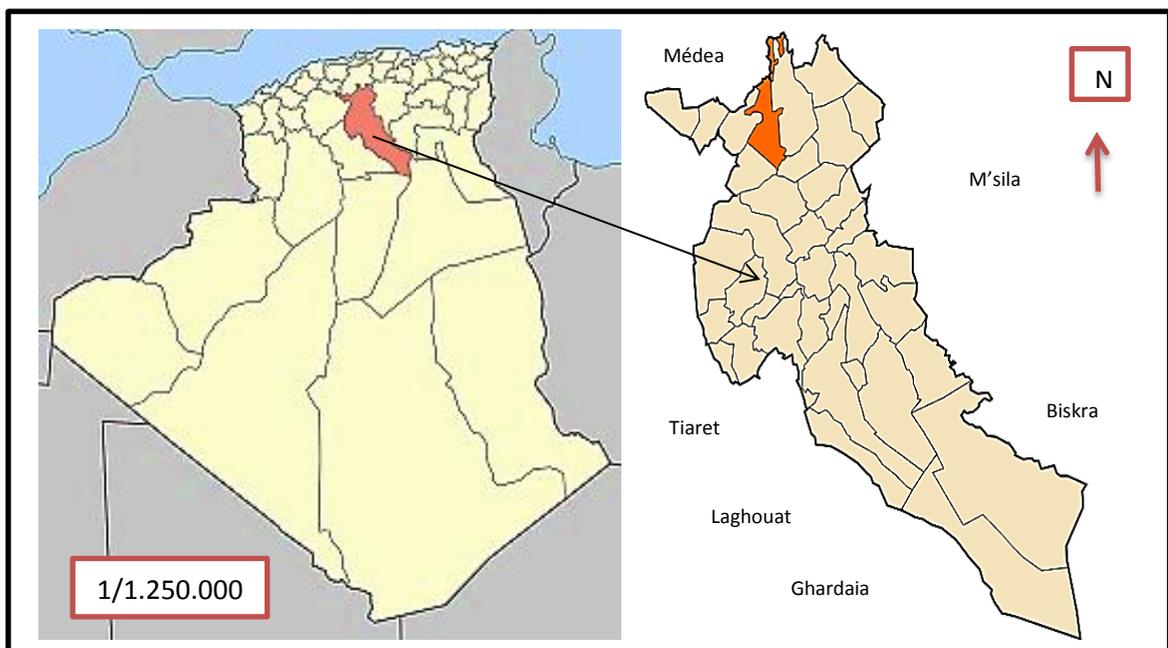


Figure 2.1 : Localisation géographique de la zone d'étude (wilaya de Djelfa) [292].

### 2.1.2. Sol :

La répartition des sols steppiques correspond à une mosaïque compliquée où se mêlent sols anciens, récents, dégradés et évolués. Ces sols sont en général peu profonds, pauvres en éléments nutritifs et en matières organiques, avec prédominance des sols minces de couleur grise à cause de la rareté de l'humus. Certains sols, situés en général au niveau des dépressions, sont en revanche relativement profonds et riches en éléments nutritifs et en matières organiques [293].

### 2.1.3. Précipitations :

Les données fournies (Tableau 2.1) par l'Office National de Météorologie (O.N.M.) [294] de Djelfa ont montré que le climat est semi-aride, fortement marqué par la continentalité, l'insuffisance des précipitations et leur irrégularité.

En effet, les précipitations annuelles moyennes oscillent entre 200 et 400 mm. Les pluies tombent le plus souvent sous forme d'averses orageuses et torrentielles, quelquefois mêlées à la grêle. Le nombre de jours de pluie varie entre 37 et 80 par an [293].

Tableau 2.1: Répartition des précipitations moyennes mensuelles  
(Djelfa : décennie 2003- 2013) [294].

| Mois            | Jan  | Fév  | Mar  | Avr  | Mai  | Jui  | Juit | Aou  | Sep  | Oct  | Nov  | Déc  |
|-----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Djelfa (mm)     | 26.7 | 23.5 | 12.5 | 32.8 | 30.7 | 15.6 | 13.2 | 04.7 | 15.0 | 11.0 | 20.1 | 49.0 |
| Nombre de jours | 12   | 10   | 09   | 08   | 07   | 00   | 05   | 04   | 02   | 04   | 10   | 10   |

Les valeurs de la moyenne mensuelle des précipitations pour la décennie (2003- 2013), ont montré que les précipitations les plus importantes sont enregistrées au cours de la période allant de Novembre à Mai dont le mois le plus pluvieux est Décembre avec une moyenne de 49 mm. Alors que la période sèche apparaît à partir du mois de Juin avec un minimum en Aout de 4.7 mm.

### 2.1.4. Temperature :

Les températures maximales des mois les plus froids sont comprises entre 1.8°C et 1.9°C, tandis que les températures maximales du mois le plus chaud dépassent 37°C. Le nombre de jours de gelée peut atteindre 40. L'amplitude thermique annuelle est généralement supérieure à 20°C [293].

Tableau 2.2 : Températures moyennes mensuelles (°C)

(Djelfa : décennie 2003- 2013) [294].

| Mois | Jan  | Fév  | Mar  | Avr  | Mai  | Jui  | Juit | Aou  | Sep  | Oct  | Nov  | Déc  |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Max  | 0.17 | 00.1 | 04.8 | 06.4 | 09.5 | 13.9 | 19.1 | 16.8 | 15.0 | 13.6 | 04.0 | 0.05 |
| Min  | 0.97 | 09.3 | 14.5 | 19.5 | 22.0 | 29.0 | 33.8 | 32.3 | 27.8 | 26.1 | 12.6 | 09.6 |
| Moy  | 0.51 | 04.1 | 09.4 | 13.0 | 15.5 | 21.8 | 26.7 | 24.7 | 21.4 | 19.7 | 08.0 | 04.6 |

## 2.2. Matériel utilisé :

### 2.2.1. Matériel biologique :

#### ❖ Matériel végétal :

L'étude a été réalisée sur des feuilles d'armoise blanche *Artemisia herba alba* Asso. et du romarin *Rosmarinus officinalis* L. (Figure 2.2).

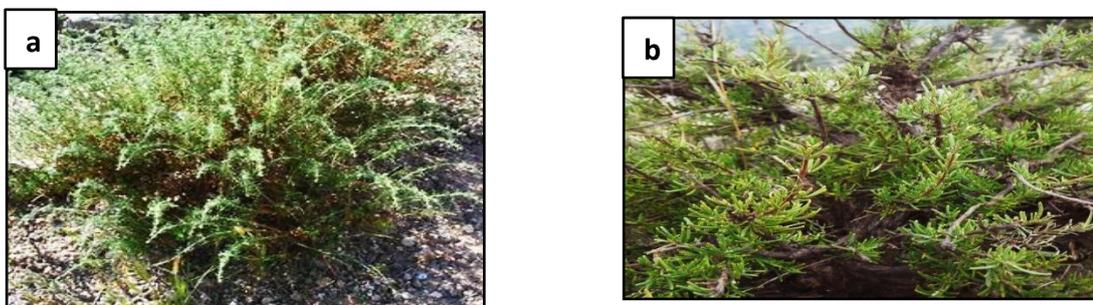


Figure 2.2 : Vue générale des touffes à Djelfa.

a: *Artemisia herba alba* Asso.

b: *Rosmarinus officinalis* L.

L'identification des plantes s'est faite par DJAB ALLAH Fatima, botaniste à INRF (Institut National de Réserve Forestière) à Djelfa et par l'équipe botanique de l'Institut National d'Agronomie El-Harach-Alger, en se référant à QUEZEL et SANTA [16].

La récolte s'est effectuée au mois d'Avril 2012 dans la région de Djelfa (Djebel Gâigâ altitude de 1200 m). Les échantillons ont été séchés dans un endroit sec, à température ambiante pendant une semaine pour éviter le développement des microorganismes et à l'abri de la lumière afin de garder l'aspect biochimique des molécules.

Après la détermination du taux d'humidité, les feuilles de chaque plante ont été broyées, à l'aide d'un broyeur (type Medicaalex). Une poudre verdâtre est obtenue et conservée soigneusement dans des bocaux bruns et hermétiquement fermés où ils sont placés dans un endroit sec.

#### ❖ Micro- organismes

L'activité antimicrobienne et biopesticide des huiles essentielles étudiées a été réalisée, au niveau de l'hôpital spécialisé militaire à Bouchaoui, sur huit microorganismes référencées (Tableau 2.3).

Tableau 2.3: Micro-organismes testés.

|                               |            |
|-------------------------------|------------|
| Bactéries gram négatif        |            |
| <i>Escherichia coli</i>       | ATCC 10536 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 27853 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>  | ATCC 27888 |
| Bactéries gram positif        |            |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | ATCC 65388 |
| <i>Bacillus subtilis</i>      | ATCC 66333 |
| Levure                        |            |
| <i>Candida albicans</i>       | ATCC 10235 |
| Champignons                   |            |
| <i>Aspergillus niger</i>      | ATCC 10619 |
| <i>Fusarium oxysporum</i>     | ATCC 10328 |

### ❖ Matériel non biologique :

La verrerie, l'appareillage et les réactifs utilisés sont mentionnés dans l'Appendice A.

## 2.3. Méthodes d'étude :

### 2.3.1. Taux d'humidité :

Le taux d'humidité consiste à une perte de poids par dessiccation [295]. La détermination de taux d'humidité a été effectuée selon la méthode décrite par BOUKSSAIM [296] et AOAC [297] : Pour cela, des capsules contenant une masse de  $5 \text{ g} \pm 0,01\text{g}$  de feuilles séchées des différents échantillons ont été mises dans une étuve de type Binder à  $105 \pm 5^\circ\text{C}$  pendant 24 heures. A la sortie de l'étuve, les capsules sont refroidies dans un dessiccateur. La pesée est réalisée chaque 3 heures jusqu'à l'obtention d'un poids constant. La moyenne des pertes en poids est calculée et le taux d'humidité est déterminé par la formule suivante:

$$H = \frac{(P_i - P)}{P_i} \times 100$$

H : Taux d'humidité (%).

$P_i$  : Masse de l'échantillon avant séchage en étuve (g).

P : Masse de l'échantillon après séchage en étuve (g).

### 2.3.2. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation :

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée au niveau du Laboratoire de recherche sur les Produits Bioactifs et Valorisation de la Biomasse, Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger.

L'obtention des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger (Figure 2.3) [298]. La méthode appliquée est celle décrite dans la PHARMACOPÉE EUROPÉENNE [299]. Une masse de 100 g de matériel végétal sec est immergée dans 500 ml de l'eau distillée dans un ballon de 2 litres, avec ajout de quelques grains de pierre ponce. Le mélange est ensuite porté à ébullition. La durée d'extraction est de l'ordre de trois heures en moyenne, après la récupération de la première goutte de distillat.

L'huile essentielle obtenue, moins dense que l'eau, est récupérée dans un petit flacon opaque et conservée à 4 °C à l'obscurité en présence de sulfate de magnésium (MgSO<sub>4</sub>) anhydre, pour éliminer les traces d'eau.



Figure 2.3 : Montage de l'hydrodistillation (type Clevenger).

### 2.3.3. Rendement en huiles essentielles :

Le rendement en huiles essentielles, est exprimé par le volume de l'huile essentielle obtenue en millilitre par rapport à 100 g de la matière sèche. Il est donné par l'équation suivante [300] :

$$Rdt(\%) = \left[ \frac{V_{HE}}{m_s} \times 100 \right]$$

Rdt (%) : rendement en huile essentielle.

$V_{HE}$  : volume d'huile essentielle recueilli (ml).

$m_s$  : masse végétale sèche (g).

### 2.3.4. Contrôle physico-chimique :

Selon les recommandations de l'AFSSAPS., les Pharmacopées Européenne et Française et la norme ISO, les contrôles physico-chimiques des huiles essentielles sont nécessaires pour évaluer leur qualité à savoir : La densité relative, l'indice de réfraction, le pouvoir rotatoire et l'indice d'acide.

#### ❖ Mesure de la densité relative :

La densité relative d'une substance est le rapport entre la masse d'un certain volume de cette substance à  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  et la masse d'un volume égal d'eau à la même température [179].

Selon la norme de la PHARMACOPÉE EUROPÉENNE [299], le pycnomètre est rempli avec de l'eau distillée, puis sa masse est mesurée à l'aide d'une balance hydrostatique. Une pesée du même volume d'huile essentielle est effectuée. La densité relative est calculée selon la formule suivante :

$$d_{HE} = m_1/m_2$$

$d_{HE}$  : Densité de l'huile essentielle.

$m_1$  : Masse en gramme d'un volume d'huile essentielle.

$m_2$  : Masse en gramme du même volume d'eau distillée.

#### ❖ Mesure de l'indice de réfraction :

L'indice de réfraction d'un milieu est le rapport de la vitesse de la lumière dans le vide et de la vitesse de la lumière dans ce milieu. Il détermine les propriétés optiques d'une substance et se mesure à l'aide d'un réfractomètre [301].

Selon la norme de la PHARMACOPÉE EUROPÉENNE [299], l'indice de réfraction consiste à étalonner le réfractomètre avec de l'eau distillée. Ensuite, mettre quelques gouttes d'huile essentielle dans l'appareil. Le réfractomètre est réglé jusqu'à ce qu'il se stabilise et donne des lectures au minimum à la troisième décimale près.

### ❖ Mesure du pouvoir rotatoire :

Lorsqu'une solution aqueuse est traversée par un faisceau de lumière polarisé, le plan de polarisation de la lumière s'oriente vers un angle. La valeur de cet angle, ajustée à la concentration de la solution et à l'épaisseur de la couche liquide traversée, définit le pouvoir rotatoire spécifique ou l'activité optique de la substance.

La solution aqueuse, est positive lorsque le plan de polarisation de la lumière tourne vers la droite (dextrogyre), et négative (lévogyre) lorsqu'il tourne vers la gauche [181].

Selon la norme de la PHARMACOPEE EUROPEENNE [291], on détermine le zéro du polarimètre avec le tube fermé vide et on remplit ensuite le tube avec l'huile essentielle. Le calcul du pouvoir rotatoire s'effectue selon la formule suivante :

$$[\alpha]^{D_{20}} = \alpha / l \times P_{20}$$

$[\alpha]^{D_{20}}$  : Pouvoir rotatoire de l'huile essentielle.

$\alpha$  : Angle de rotation en degré lu à  $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$ .

$l$  : Longueur en décimètre du tube polarimétrique.

$P_{20}$  : Densité relative de l'huile essentielle.

### ❖ Mesure de l'indice d'acide :

L'indice d'acide ( $I_A$ ) est la masse en mg d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire pour neutraliser les acides gras libres contenus dans un gramme de substance [179].

Selon la norme de la PHARMACOPÉE EUROPÉENNE [291], on met dans un bécher 1 gramme d'huile essentielle, auquel est ajouté 5 ml d'un mélange à volume égal d'éthanol et d'éther avec quelques gouttes de phénolphtaléine. Le mélange est neutralisé par l'hydroxyde de potassium 0.1 M contenu dans la burette.

La neutralisation est terminée lorsque la couleur rose persiste pendant 15 secondes au moins. L'indice d'acide est calculé selon la formule suivante :

$$I_A = 5,61 \times n/m$$

$I_A$  : Indice d'acide.

$n$  : Volume de KOH 0.1 M consommé au cour de titrage.

$m$  : Masse en gramme de l'huile essentielle

### 2.3.5. Identification des huiles essentielles par CG/MS :

La CPG/MS, permet de fournir un chromatogramme accompagné d'un ensemble de spectres de masse (MS) correspondants à chaque pic chromatographique, ce qui permet l'identification précise de la majorité des constituants séparés par la chromatographie phase gazeuse (CPG) [298].

#### ✓ Conditions opératoires :

La chromatographie phase gazeuse est un appareil de type Perkin Elmer GCMS modèle Clarus 500, équipé d'une colonne capillaire PE, Elite série 5% phenyl dimethyl polysiloxanne, de longueur : 30 m et de diamètre interne de 0,25 mm, l'épaisseur du film de la phase stationnaire : 0,25 µm. couplé à un spectromètre de masse (MS) avec un détecteur Scan à impact d'électron.

Les conditions analytiques sont les suivantes :

Le gaz vecteur qui constitue la phase mobile est l'hélium réglé à un débit de 1 ml/mn. Programmation de la température : La température de l'injecteur est de 250°C, et l'injection se fait en mode Split avec un volume de 1 µl des huiles essentielles diluées dans du méthanol (1% v/v).

La température initiale de la colonne est maintenue à 80°C en isotherme pendant 3 mn, puis la température augmente graduellement à raison de 4°C/mn jusqu'à 150°C pendant 3 mn. Pour le spectromètre de masse la température de détection est de 250°C.

La fragmentation est effectuée par impact électronique sous un champ de 70 eV, en mode : Balayage 80-600  $\mu\text{m}$ . Analyseur : quadripôle L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse. Le temps d'analyse est de 40 mn.

La combinaison de ces deux techniques d'analyse CPG/MS permet de séparer les composants de l'échantillon et d'identifier chaque composant en comparant leurs temps de rétentions relatifs et leurs spectres de masse avec les bases de données standards (ADAMS 2007).

### **2.3.6. Activité antimicrobienne et biopesticide:**

L'activité antimicrobienne et biopesticide a été réalisé au niveau de l'hôpital spécialisé militaire de Bouchaoui.

Les méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne et biopesticide des huiles essentielles sont : la méthode de diffusion dans l'agar et la méthode de contact direct par dilution en milieu gélosé.

- **Méthode de diffusion dans l'agar ou Aromatogramme :**

Cette méthode consiste en la réalisation d'un aromatogramme dans le but de déterminer la sensibilité des différentes souches microbiennes vis-à-vis des huiles essentielles [302].

L'aromatogramme est une méthode inspirée de l'antibiogramme qui permet déterminer l'activité inhibitrice de croissance des huiles essentielles [264].

Le principe de l'aromatogramme repose sur la compétition entre la croissance d'une souche microbienne et la diffusion d'une huile essentielle dans un milieu gélosé à partir d'un support en papier pré-imprégné [303]. Il consiste en la détermination des diamètres des zones d'inhibition [235].

La méthode utilisée dans cette étude pour évaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, est celle décrite par IMELOUANE et *al.* [45].

Une suspension microbienne de densité équivalente au standard 0,5 de Mac Farland ( $10^6$  UFC/ml) est préparée dans une solution saline (0,9% NaCl). Les boîtes de Pétri contenant le milieu de culture gélosé (Mueller Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour la levure et PDA pour les champignons) sont ensemencées en strie avec 100 $\mu$ l de l'inoculum. A la surface de chaque boîte, un disque de papier filtre (Wattman n°4) stérile de 6 mm de diamètre imbibé avec 15  $\mu$ l des huiles essentielles pures est déposé. Les boîtes sont laissées une heure à température ambiante pour permettre la diffusion de l'huile essentielle, puis elles sont incubées à  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 24 heures pour les bactéries, 48 h pour la levure et 5 jours pour les champignons à  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . Après incubation, le diamètre d'inhibition est mesuré en millimètres, disque inclus.

❖ **Méthode de contact direct par dilution en milieu gélosé :**

La méthode de dilution en gélose permet d'évaluer la concentration minimale inhibitrice (CMI) des agents antimicrobiens. La CMI est définie comme étant la plus faible concentration d'huile essentielle inhibant toute croissance visible à l'œil nu après incubation [304-306].

La méthode utilisée est celle proposée par GHAZGHAZ et AOUADHI [307].

Du fait de la non miscibilité des huiles essentielles à l'eau et donc au milieu de culture, la mise en émulsion a été réalisée grâce à une solution d'agar à 0,2 % afin de favoriser le contact germe/composé.

Des boîtes de Pétri contenant différentes concentrations d'huile essentielle allant de 0,003% jusqu'à 2,5 % (v/v) ont été inoculées avec la souche testée.

La culture bactérienne utilisée a été diluée dans une solution saline (0,9 % NaCl) pour l'obtention d'une densité d'inoculum de  $10^6$  UFC (Unités Formant Colonie) / ml. 100  $\mu$ l de chaque culture diluée ont été ensemencé sur la surface de la gélose solidifiée.

Les boites non inoculées contenant de l'huile essentielle ont servi comme contrôle négatif. Les boites d'essai et de contrôle ont ensuite été incubées pendant 24 h à  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ . Pour chaque traitement, l'absence de colonies a été considérée comme un effet inhibiteur.

### **2.3.7. Activité antioxydante :**

L'activité antioxydante des huiles essentielles d'armoise blanche et du romarin a été effectuée au niveau du laboratoire de recherche sur les Produits Bioactifs et Valorisation de la Biomasse à l'école normale supérieure de Kouba, (Alger).

Afin d'évaluer l'activité antioxydante des huiles essentielles testées, trois méthodes basées sur trois principes différents sont réalisées car les résultats d'une seule méthode ne peuvent pas identifier tous les mécanismes possibles caractérisant un antioxydant [308].

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à des antioxydants de référence à savoir : l'acide ascorbique (vitamine C), le BHT (butyl-hydroxy-toluène) et le BHA (butyl-hydroxy- anisole) [309, 310].

Un contrôle négatif est effectué dans les mêmes conditions pour chaque méthode.

#### **❖ Méthode de piégeage du radical libre DPPH :**

Le test de piégeage du DPPH est l'un des méthodes les plus utilisées pour déterminer l'activité antiradicalaire des extraits de plantes [311].

Cette méthode est basée sur la réduction du radical libre DPPH• (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle) qui possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Figure 2.4).

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 foncée, caractérisée par une absorbance dans une solution d'éthanol centrée à environ 517 nm [312-314].

Quand une solution de DPPH (DPPH•) est mélangée avec une substance antioxydante qui peut céder un atome d'hydrogène, cela donne lieu à la forme réduite DPPH-H (DPPH), avec perte de cette couleur violette en une adoption d'une couleur jaune pâle (Figure 2.4) [315, 316].

Le virage vers cette coloration et l'intensité de cette coloration dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance anti-radicalaire [317].

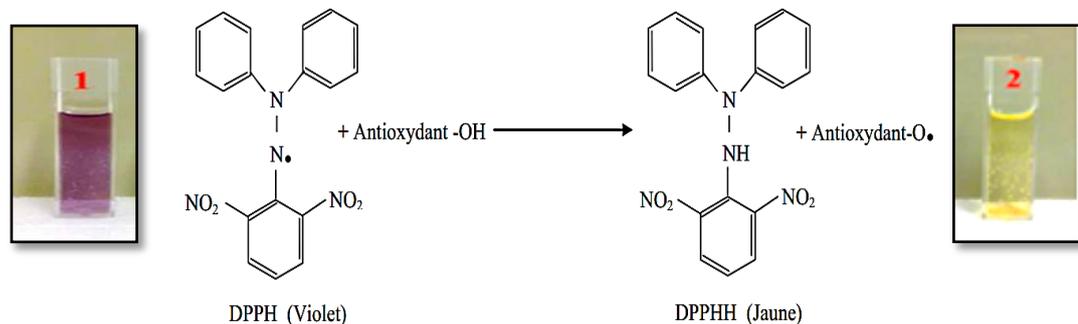


Figure 2.4 : Réaction de réduction d'un radical DPPH en présence d'un antioxydant [309,318].

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles d'armoise blanche et du romarin est celle proposée par SUBRAMANION et *al.* [319] et SHARMA et *al.* [320] avec quelques modifications:

La solution de DPPH (2,2-diphényl-di-picrylhydrazyl) est obtenue en dissolvant 4 mg de la poudre dans 100 ml de l'éthanol (EtOH). Les échantillons des huiles essentielles ont été préparés par dissolution dans l'éthanol absolu (EtOH) à raison de 80mg/ml. Ces solutions, dites solutions mères, ont subi ensuite des dilutions pour arriver à des concentrations allant de 0.04 à 32 mg/ml.

Le test s'effectue en mélangeant 1 ml de la solution précédente de DPPH (0.04%) avec 1ml de l'huile à tester à différentes concentrations.

Les antioxydants de référence ou le contrôle positif (BHT, BHA et Vit C) ont été aussi préparé selon la même méthode à raison de 0,2 mg/ml. Le contrôle négatif est constitué de 1 ml de la solution DPPH et 1 ml de l'éthanol absolu (EtOH).

Après une période d'incubation de 30 minutes, à une température du laboratoire ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) et à l'abri de la lumière et de l' $\text{O}_2$  atmosphérique, la mesure de l'absorbance a été effectuée à 517 nm [321, 322].

Les valeurs obtenues sont transformées ensuite en pourcentages d'inhibition en utilisant la formule suivante [323, 324]:

$$I\% = 100 \times \left[ \frac{A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{blanc}}} \right]$$

$I\%$  : Activité antioxydante.

$A_{\text{blanc}}$  : Absorbance du contrôle négatif.

$A_{\text{échantillon}}$  : Absorbance du composé à tester.

Le graphique de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'huile essentielle permet de déterminer la  $\text{EC}_{50}$  (autrement appelée  $\text{IC}_{50}$ ), exprimée en mg de substrat/ml de DPPH.

C'est la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du DPPH• initial de 50% [325-327]. Il peut être aussi défini comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (couleur) [326]

L'activité antioxydante de l'huile essentielle est déduite graphiquement par la régression linéaire [326, 329]. Cette valeur est comparée à celle trouvée par les antioxydants standards (BHT, BHA, vitamine C).

En effet, pour mieux caractériser le pouvoir antiradicalaire, des paramètres cinétiques sont mesurés, tels que le  $\text{TEC}_{50}$ , la constante de vitesse de la réaction ou le coefficient directeur de la courbe cinétique [325, 330, 331].

#### **Détermination du temps d'équilibre :**

La cinétique des réactions des huiles essentielles testées avec le DPPH• a été examinée à l' $\text{EC}_{50}$ . Le paramètre  $\text{TEC}_{50}$  est défini comme le temps atteint à l'équilibre avec une concentration d'antioxydant égale à l' $\text{EC}_{50}$ . Ce temps est calculé graphiquement [326, 332].

L'estimation de  $TCE_{50}$  permet d'introduire la classification suivante [310, 325, 333] :

- $TEC_{50} < 5$  min (réaction rapide).
- $TEC_{50}$  entre 5-30 min (réaction intermédiaire).
- $TEC_{50} > 30$  min (réaction lente).

• **Détermination de l'efficacité antiradicalaire EAR :**

L'indice de l'efficacité antiradicalaire relie la concentration du DPPH• et le temps  $TEC_{50}$  dans l'essai avec la concentration effective  $EC_{50}$  de l'échantillon qui résulte dans un paramètre constant pour chaque solution. Il est déterminé par la formule suivante [328, 334] :

$$EAR = \frac{1}{EC_{50} \times TEC_{50}}$$

EAR : Efficacité antiradicalaire.

$EC_{50}$  : Concentration Effective médiane.

$TEC_{50}$  : Temps atteint à l'équilibre.

L'activité antiradicalaire des solutions testées a été estimée, en se basant sur la classification proposée par POPOVICI et *al.* [310] et SANCHEZ MORENO et *al.* [335] comme suit :

- Faible pour  $EAR < 1.10^{-3}$ .
- Intermédiaire entre  $1.10^{-3}$  -  $5.10^{-3}$ .
- Elevée entre  $5.10^{-3}$ - $10.10^{-3}$ .
- Très élevée pour  $EAR > 10.10^{-3}$ .

❖ **Méthode de blanchissement de  $\beta$ -carotène :**

Cette technique de spectrophotométrie dans l'ultraviolet consiste à mesurer l'inhibition des composés organiques volatils et les hydro-péroxydes conjugués diène résultant de l'oxydation de l'acide linoléique, ou à mesurer la décoloration de  $\beta$ -carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique à 470 nm [19, 311, 336, 337].

Selon LAGUERRE et *al.* [311], l'oxydation de l'acide linoléique est catalysée par la chaleur ( $50 \pm 5^\circ\text{C}$ ) de manière non spécifique. La dispersion de l'acide linoléique et du  $\beta$ -carotène dans la phase aqueuse est assurée par du Tween 40. L'addition d'antioxydants purs ou sous forme d'extraits végétaux induit un retard de la cinétique de décoloration du  $\beta$ -carotène. Si la couleur jaune persiste, cela indique la présence de substances antioxydantes [291, 311].

L'activité antioxydante des échantillons testés a été évaluée selon la méthode décrite par TEPE et *al.* [336], ATHAMENA et *al.* [337] & M'HIR et *al.* [338]: 2 mg de  $\beta$ - carotène ont été dissous dans 1 ml de chloroforme. La solution obtenue a été introduite dans un ballon contenant 2 mg d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40.

Après évaporation du chloroforme par le rotavapeur sous vide à  $40 \pm 2^\circ\text{C}$ , 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène ont été ajoutés avec agitation vigoureuse à l'aide d'un vortex.

De cette nouvelle solution 2.5 ml sont transférés dans des tubes à essai, et 350 $\mu$ l de chaque échantillon (huiles essentielles étudiées, BHA, BHT et Vit C) à raison de 2g/l sont ajoutés.

Le contrôle négatif contient tous les réactifs à l'exception de l'échantillon à tester qui est remplacé par un volume égale de l'éthanol (350  $\mu$ l). L'incubation des tubes se fait à l'obscurité pendant 48 heures, dans un bain-Marie à  $50 \pm 5^\circ\text{C}$ .

La cinétique de décoloration de l'émulsion a été suivi à des intervalles de temps réguliers pendant 48 heures ( $t_0$ , 1, 2, 3, 4, 5, 24 et 48 h ), à une longueur d'onde de 470 nm. L'activité antioxydante relative des échantillons étudiés (AAR) est calculée selon la formule donnée par HIMED et BARKAT [339] :

$$AAR = \left( \frac{Abs_{\text{échantillon}}}{Abs_{BHT}} \right) \times 100$$

AAR : Activité anti-oxydante relative.

Abs <sub>échantillon</sub> : Absorbance de l'échantillon après 48 heures.

Abs <sub>BHT</sub> : Absorbance du BHT après 48 heures.

### ❖ Méthode FRAP (Ferric reducing antioxidant power) :

La méthode de réduction du fer ferrique est un essai simple, rapide et reproductible [329]. Elle est universelle, peut être appliquée aussi bien chez les plantes que les plasmas et dans les extraits organiques et aqueux [329, 340]. Le test sur le pouvoir réducteur est la capacité d'une molécule à réduire un oxydant en lui cédant un électron [341].

Cette méthode conçue par OYAIZU [342] est basée sur la réduction du fer ferrique  $\text{Fe}^{3+}$  présent dans le complexe ferrocyanure de potassium  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  en fer ferreux  $\text{Fe}^{2+}$  en présence des réducteurs dans les extraits des plantes [329, 343, 344]. Le  $\text{Fe}^{3+}$  participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton [344]. Par conséquent,  $\text{Fe}^{2+}$  peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700 nm [329, 345]. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des échantillons testés [344].

Le pouvoir réducteur du fer ( $\text{Fe}^{3+}$ ) dans les échantillons à testés a été déterminé selon la méthode décrite par BOUGANDOURA et BENDIMERAD [329], BOURKHIS et *al.* [291] et DOUKANI & *al.* [344]:

Dans un tube à essai contenant 1 ml de solution d'échantillon sont ajoutés 2,5 ml de tampon phosphate (0,2M, pH 6,6) puis 2,5 ml de ferrocyanure de potassium [ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ] (10g/l). L'ensemble est chauffé à  $50 \pm 2$  °C au bain Marie pendant 20 minutes. Un volume de 2,5 ml d'acide trichloracétique (100 g/l) est ensuite ajouté et le mélange est centrifugé à 3000 tours/min pendant 10 minutes. Enfin, 2,5 ml du surnageant ont été mélangés avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de chlorure ferrique [ $\text{FeCl}_3$ ] (1 g / l).

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc préalablement préparé, en remplaçant l'échantillon par l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre). Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard (BHT, BHA, vitamine C) dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des échantillons testés.

### **2.3.9. Analyses statistiques :**

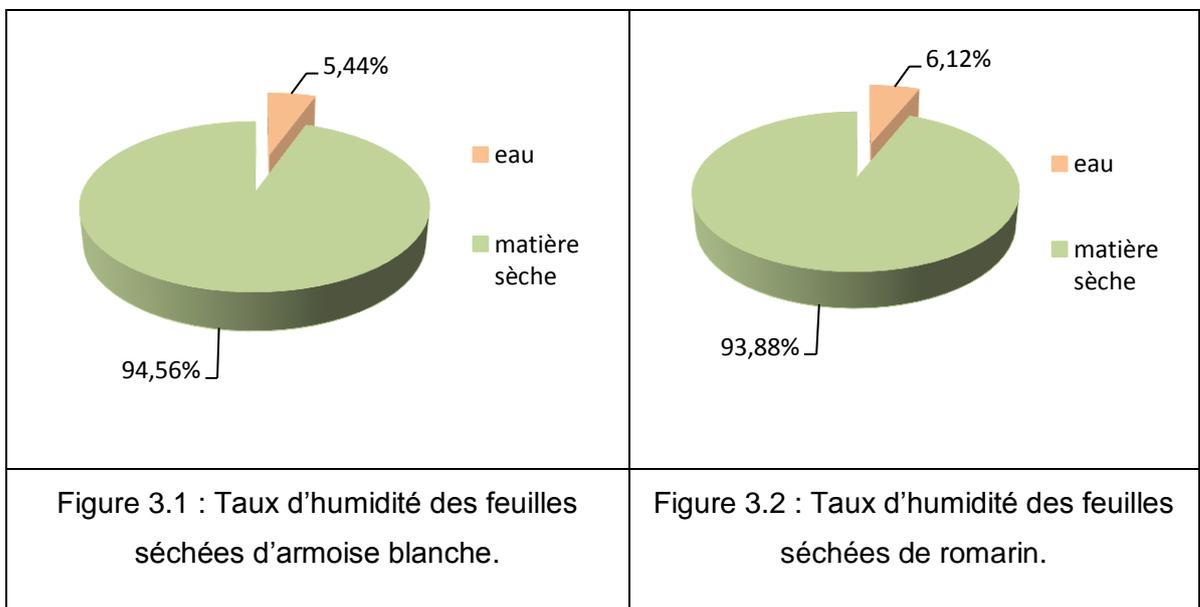
Toutes les mesures expérimentales ont été répétées trois fois et sont exprimées en tant que moyenne  $\pm$  SD (écart-type de trois mesures) en utilisant le logiciel Excel 2013. La détermination graphique des EC<sub>50</sub> des différents standards et des huiles essentielles est effectuée par le logiciel (Origin 8).

## CHAPITRE 3

### RESULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1. Taux d'humidité de la matière végétale :

La détermination de taux d'humidité des feuilles séchées à l'ombre durant une semaine de l'armoise blanche et du romarin a révélé un taux respectivement de  $5,44 \pm 0,17 \%$  et de  $6,12 \pm 0,11 \%$ . Ce qui signifie que  $94,56 \pm 0,17\%$  et  $93,88 \pm 0,11\%$ , respectivement, représentent le taux des matières sèches de nos échantillons ayant servi réellement à l'extraction des huiles essentielles (Figures 3.1 et 3.2).



Selon la norme ISO 662 [346], ces taux sont nettement inférieurs à 12%, cela montre que la matière végétale analysée a été séchée et conservée dans de bonnes conditions, ce qui rend, par conséquent, les résultats de nos analyses phytochimiques plus fiables.

Plusieurs recherches bibliographiques ont montré qu'un bon séchage de plantes aromatiques est fondamental pour l'extraction des huiles essentielles [83], en raison de son influence significative sur le rendement et la composition des huiles essentielles [347-350].

KHORSHIDI et *al.* [83] & SINGH [351] ont prouvé que le séchage réduit l'humidité à un niveau qui empêche leur détérioration, permettant ainsi un stockage dans un état stable pour une utilisation ultérieure.

Or, une plante si elle n'est pas séchée dans de bonnes conditions, risque de se dégrader et perdre la totalité de ses huiles essentielles [352].

Selon les travaux de DABIRÉ et *al.* [353], le temps de séchage influence énormément le rendement en huiles essentielles. En effet, au bout de 7 jours de séchage à l'ombre le rendement est optimum [83, 354, 355] et au-delà du 14<sup>ème</sup> jour le rendement en huile essentielle est très faible et devient insignifiant [353].

Dans ce sens BENJILALI et *al.* [356] ont trouvé que la teneur en huiles essentielles des feuilles de romarin séchées à l'ombre pendant une semaine est quatre fois plus importante que celle d'une plante fraîche.

L'augmentation de la teneur en huiles essentielles avec le séchage s'expliquerait par une activité physiologique (réactions enzymatiques) importante. La biosynthèse des huiles essentielles continue et s'accélère après la récolte du matériel végétal en réponse au stress hydrique [300].

Toutefois, lors du séchage, une plante aromatique pourrait perdre une partie de son huile essentielle par volatilisation. Ces pertes sont d'autant plus importantes que la durée de séchage est longue [300, 356].

MIGHRI et *al.* [357] ont signalé que la teneur en huiles essentielles de l'armoise blanche a diminué le long de la période de séchage de 2,5% à 1,8%.

Le procédé de séchage a également eu un effet significatif sur la proportion des différents composants des huiles essentielles [83].

Le terme «perte au séchage» est une signification similaire à la teneur en humidité. Néanmoins, puisque les produits à base de plantes sont un mélange complexe de substances chimiques, de nombreuses autres substances volatiles en dehors de l'eau peuvent être présents dans le produit séché. Ainsi, la perte lors de séchage comprend les pertes d'eau et d'autres composés volatils dans les échantillons [358].

### **3.2. Rendement en huiles essentielles :**

Les rendements moyens en huiles essentielles d'armoise blanche et de romarin sont exprimés en ml par rapport à 100 g de matière végétale sèche (Figure 3.3).

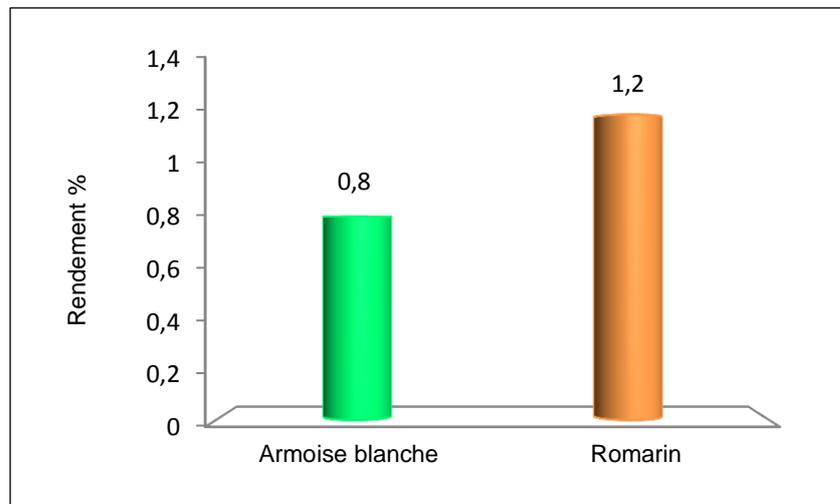


Figure 3.3 : Rendements en huiles essentielles.

Le rendement moyen en huiles essentielles d'*Artemisia herba -alba* Asso, obtenu par hydrodistillation (type Cleavenger), est de l'ordre de  $0.8 \pm 0.05$  % (v/p). En comparaison, avec les résultats de l'étude faite par notre équipe du laboratoire de biotechnologie des productions végétales, ce rendement est supérieur à celui de la région de M'sila ( $0.7 \pm 0.12$  % v/p).

Cependant, le rendement moyen en huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. est de l'ordre de  $1.2 \pm 0.01$  % (v/p).

Il est légèrement inférieur au rendement obtenu dans une étude antérieure faite par notre équipe du laboratoire de biotechnologie des productions végétales, dans la région de M'sila ( $1.4 \pm 0.13$  % v/p).

Les rendements en huiles essentielles enregistrés dans la présente étude étaient dans les plages décrites dans la littérature [0.16–4.9% (v/p) pour l'armoise blanche et 0.1–3% (v/p) pour le romarin, (Tableau 3.1 et Tableau 3.2)]

Les variabilités de rendement en huiles essentielles est attribuée à plusieurs facteurs à savoir : l'origine (Tableau 3.1 et 3.2), les conditions pédoclimatiques et édaphiques de la zone de croissance [34,144, 359].

En effet, Des études antérieures menées par JORDÁN et *al.* [360] et JORDÁN et *al.* [361] ont décrit l'effet de la zone bioclimatique sur le rendement en huiles essentielles. Les faibles indices de thermicité dans une zone de croissance accordée favorisent la production de l'huile essentielle.

En Tunisie, des populations d'*Artemisia herba-alba* Asso. provenant de deux étages climatiques (semi- aride et aride) ont donné un rendement en huiles essentielles qui varient entre 1.2 % v/p et 4.9 % v/p [362].

De même, six populations de *Rosmarinus officinalis* L. (var. *typicus* et var. *trogodytorum*) provenant de trois étages climatiques (sub-humide, semi- aride et aride) ont donné un rendement en huiles essentielles qui varient entre 1.17% (v/p) et 2.7% (v/p) [254].

Aussi, le rendement est tributaire de 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 superficielles [222].

Les fluctuations et variations constatées dans le rendement peuvent être attribuées non seulement à l'origine de la plante mais également à la plante elle-même (le stade phénologique, la période de la récolte et la partie utilisée) [34, 183, 254].

En effet, pour le rendement en huiles essentielles extraites des feuilles récoltées à différents stades phénologiques. ÖZCAN et CHALCHAT [152], WANNES et *al.* [199], ZAOUALI et *al.* [254] & HAMROUNI-SELLAMI et *al.* [363] ont affirmé que le romarin fourni le rendement le plus élevé en huiles essentielles au stade de la floraison, tandis que SINGH et GULERIA, [364] ont constaté que la phase de maturation produit le plus en huiles essentielles. De même pour l'armoise blanche, MIGHRI et *al.* [365] ont affirmé que cette dernière fourni le rendement le plus élevé en huiles essentielles au stade de la floraison.

Tableau 3.1: Rendement en huiles essentielles de l'Armoise blanche.

| <b>Pays</b>      | <b>Région</b>                    | <b>Méthodes d'extraction</b>       | <b>Période de récolte</b> | <b>Organe</b>           | <b>Rendement v/p</b> | <b>Références</b> |
|------------------|----------------------------------|------------------------------------|---------------------------|-------------------------|----------------------|-------------------|
| Algérie (M'sila) | Bnifouda                         | Hydrodistillation (Type Clevenger) | Novembre 2008             | Partie aérienne         | 0.79                 | [18]              |
|                  | Bougaa                           |                                    | Juillet 2008              |                         | 0.94                 |                   |
|                  | Boussaada                        |                                    | Octobre 2008              |                         | 0.72                 |                   |
|                  | Boutaleb                         |                                    | Novembre 2008             |                         | 0.16                 |                   |
| Algérie          | Biskra                           | Entrainement à la vapeur           | Octobre 2009              | Sommités fleuries       | 0.95                 | [23]              |
| Tunisie          | Gafsa (les montagnes de Ayaycha) | Hydrodistillation (Type Clevenger) | Janvier 2009              | Feuilles et fleurs      | 1.45                 | [30]              |
|                  | Zone semi-aride                  | Hydrodistillation                  | -                         | Partie aérienne         | 1.2                  | [362]             |
|                  | Zone aride                       |                                    |                           |                         | 4.9                  |                   |
|                  | 18 Provenances Sud tunisien      | Hydrodistillation                  | -                         | Partie aérienne         | 0.68-1.93            | [27]              |
| Jordanie         | -                                | Hydrodistillation                  | -                         | Feuilles, fleurs, tiges | 1.3                  | [366]             |
| Maroc            | Guerçif                          | Hydrodistillation (Type Clevenger) | Septembre 2008            | Partie aérienne         | 0.56                 | [34]              |
|                  |                                  |                                    | Mars 2008                 |                         | 0.86                 |                   |
|                  |                                  |                                    | Juin 2008                 |                         | 1.23                 |                   |
|                  | Ouarzazate                       | Hydrodistillation (Type Clevenger) | -                         | partie aérienne         | 1.2                  | [275]             |

Tableau 3.2 : Rendement en huiles essentielles du romarin.

| <b>Pays</b> | <b>Région</b>                 | <b>Méthodes d'extraction</b>       | <b>Période de récolte</b> | <b>Organe</b>         | <b>Rendement (%) v/p</b> | <b>Références</b> |
|-------------|-------------------------------|------------------------------------|---------------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------|
| Algérie     | Kherrata                      | Hydrodistillation (Type Clevenger) | Octobre 2012              | partie aérienne       | 0.35                     | [367]             |
|             | Bibans                        |                                    |                           |                       | 0.30                     |                   |
|             | Boutaleb                      |                                    |                           |                       | 0.20                     |                   |
|             | Agmeroual                     |                                    |                           |                       | 0.10                     |                   |
|             | N'gaous                       |                                    |                           |                       | 0.25                     |                   |
|             | Bossaada                      |                                    |                           |                       | 0.15                     |                   |
| Maroc       | El Ayat                       | Hydrodistillation (Type Clevenger) | -                         | partie aérienne       | 0.5                      | [368, 369]        |
|             | Debdou                        |                                    |                           |                       | 2.9                      |                   |
|             | Rchida                        | Hydrodistillation (Type Clevenger) | Mars 2010                 | partie aérienne       | 1.29                     | [95]              |
|             | Berkine                       |                                    |                           |                       | 1.87                     |                   |
|             | Aknoul                        |                                    |                           |                       | 2.21                     |                   |
|             | Tafersoust région montagnaise | Hydrodistillation (Type Clevenger) | Mars 2009                 | Feuilles              | 0.54                     | [85]              |
|             | Meknès-Tafilalet              | Hydrodistillation (Type Clevenger) | Aout 2009                 | feuilles et bourgeons | 2.68                     | [370]             |

|                        |                         |                                       |                          |                    |                            |       |
|------------------------|-------------------------|---------------------------------------|--------------------------|--------------------|----------------------------|-------|
| Tunisie                | Sidi Bouzid             | hydrodistillation                     | Mars 2008                | Partie<br>aérienne | 1.25                       | [371] |
|                        | Zaghouan                |                                       |                          |                    | 1.27                       |       |
|                        | Bizerte                 |                                       |                          |                    | 1.35                       |       |
|                        | Sub-humide              | Hydrodistillation<br>(Type Clevenger) | -                        | Partie<br>aérienne | Varie entre<br>1.17 et 2.7 | [254] |
|                        | Semi-aride              |                                       |                          |                    |                            |       |
|                        | Aride                   |                                       |                          |                    |                            |       |
| Turquie                | Konya                   | -                                     | -                        | -                  | 1.9                        | [152] |
| Iran                   | Kerman<br>province      | Hydrodistillation<br>(Type Clevenger) | Mai 2008                 | Les feuilles       | 3.2                        | [75]  |
| Espagne<br>(Murcie)    | Thermo-<br>medetéranéen | Hydrodistillation<br>(Type Clevenger) | Eté                      | partie<br>aérienne | 1.9                        | [360] |
|                        |                         |                                       | Printemps                |                    | 1.3                        |       |
|                        | Super-<br>mediteranéen  |                                       | Eté                      |                    | 3.0                        |       |
|                        |                         |                                       | Printemps                |                    | 1.8                        |       |
|                        | Thermo-<br>medetéranéen | Hydrodistillation<br>(Type Clevenger) | Entre Juillet et<br>Aout | partie<br>aérienne | 1.74                       | [361] |
|                        | Meso-<br>medetéranéen   |                                       |                          |                    | 2.44                       |       |
| Super-<br>mediteranéen | 2.58                    |                                       |                          |                    |                            |       |

Dans la région de Guerçif (Maroc), GHANMI et al. [34] ont montré que le rendement en huiles essentielles de l'espèce d'*Artemisia herba-alba* varie en fonction de la période de récolte.

Selon JORDÁN et al. [360] et JORDÁN et al. [361] le meilleur rendement en huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. est trouvé en été, coïncide avec la haute température et la plus photopériode. Ces mêmes auteurs révèlent que l'été est le meilleur moment pour exploiter les huiles de romarin.

L'extraction que nous avons effectuée a été faite au mois d'Avril caractérisé par une photopériode optimale propice à la biosynthèse des huiles essentielles.

La méthode d'extraction utilisée [372, 373], la méthode et la durée de séchage [222] et les pratiques culturelles (le désherbage et les amendements) [222, 374, 375] peuvent aussi influencer le rendement en huiles essentielles.

En effet, OKOH et al. [412] ont étudié l'effet des différents procédés d'extraction sur le rendement de l'huile essentielle de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) par hydro-distillation et par micro-ondes sans solvant (SFME). Les rendements totaux des fractions volatiles obtenues par hydro-distillation et SFME étaient 0,31 % et 0,39 %, respectivement.

Pour les pratiques culturelles, les amendements contribuent à l'augmentation de la masse végétale et donc celui du rendement en huiles essentielles. C'est ce qui en ressort d'une étude brésilienne sur l'impact de l'engrais organique sur *Rosmarinus officinalis* L. mesurée par le rendement et la qualité de l'huile. Les traitements en utilisant des engrais organiques à base d'extraits d'algues ont provoqué une augmentation significative de rendement en huiles essentielles et de la surface foliaire, indépendamment de la méthode d'application [376].

Aussi, un effet positif sur l'augmentation du rendement pourra être fait soit en privilégiant une culture intercalaire ou encore l'apport de la paille [222].

MOUMNI et al. [377] et DUTTA et al. [378] ont attribué la différence en rendement à un déterminisme génétique au niveau de la plante.

En effet, des armoises blanches domestiquées dans les mêmes conditions climatiques, édaphiques et hydriques, leurs rendements en huile essentielle varient d'une manière notable d'une accession à une autre.

### **3.3. Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles :**

A l'issue des distillations, les différentes caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles de l'armoise blanche et de romarin sont regroupées respectivement dans les tableaux (3.3 et 3.4) et les figures (3.4 et 3.5).

Tableau 3.3 : Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de l'armoise blanche analysée.

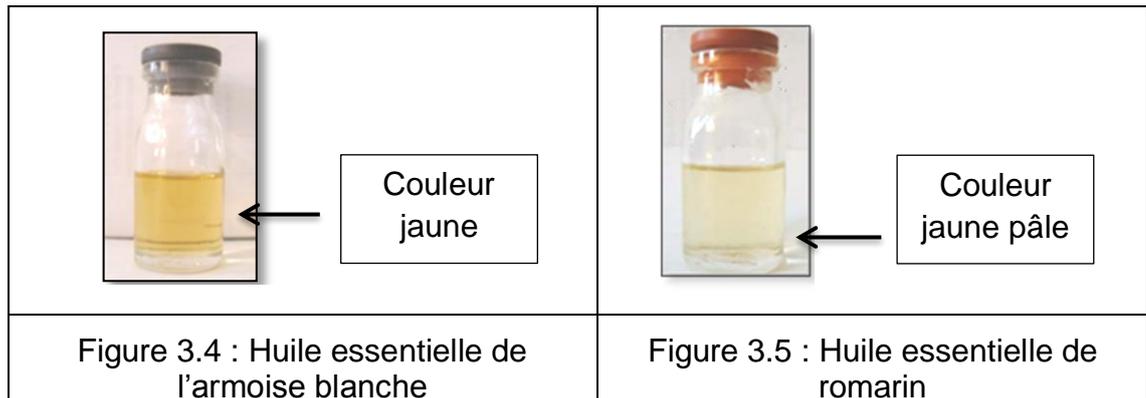
| Caractéristiques | Huile essentielle analysée                      | IMELOUANE et <i>al.</i> [45]                                |
|------------------|---|---|
| Aspect           | Liquide fluide                                  | liquide   |
| Couleur          | Jaune foncé                                     | jaune.  |
| Odeur            | Caractéristique, fraîche, pénétrante, camphrée. | pénétrante, agréable herbacée caractéristique de la plante. |

Tableau 3.4 : Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de romarin analysée.

| Caractéristiques | Huile essentielle analysée                      | Pharmacopée Européenne [302] | HILAN et <i>al.</i> [379] | AFNOR [172]  |
|------------------|---|------------------------------|---------------------------|--|
| Aspect           | Liquide limpide.                                | Liquide limpide              | liquide limpide           | Liquide mobile   |
| Couleur          | Jaune pâle                                      | Incolore à jaune pâle        | jaune pâle                | incolore à jaune pâle                                  |
| Odeur            | Caractéristique, Fraîche, pénétrante, Camphrée. | Odeur caractéristique        | très marquée              | Caractéristique, Fraîche, +/- camphrée selon l'origine |

Les paramètres organoleptiques de l'huile essentielle de romarin obtenue sont en accord avec ceux répertoriés dans les normes PHARMACOPÉE EUROPÉENNE [302], AFNOR, [172] et les travaux donnés par HILAN et *al.* [379].

Quant à l'huile essentielle d'Armoise blanche obtenue sont en accord avec ceux donnés par les travaux d'IMELOUANE et *al.* [45].



### **3.4. Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles :**

Les spécificités physico-chimiques des huiles essentielles d'armoise blanche et de romarin sont consignées dans les tableaux (3.5 et 3.6).

Tableau 3.5 : Propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle de l'Armoise blanche.

| Caractéristiques     | Huile essentielle analysée | SHAKHNOZA et <i>al.</i> [380] |
|----------------------|----------------------------|-------------------------------|
| Pouvoir rotatoire    | +3°                        | -12.2° à + 3.88°              |
| Indice de réfraction | 1.4651                     | 1.4653 - 1.4676               |
| Densité relative     | 0.9272                     | 0.9257-0.9288                 |
| Indice d'acide       | 0.9                        | 2.72                          |

Tableau 3.6 : Propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle de romarin.

| Caractéristiques     | Huile essentielle analysée | Pharmacopée Européenne [302] | Les valeurs d'ONIPPAM [381] | AFNOR [172]   |
|----------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|---------------|
| Pouvoir rotatoire    | +5°                        | -5° à + 8°                   | -3° à + 25°                 | -             |
| Indice de réfraction | 1.473                      | 1.464 - 1.473                | 1.466 - 1.475               | 1.3356-1.3500 |
| Densité relative     | 0.913                      | 0.895 - 0.920                | 0.894 - 0.920               | 0.9050-0.9210 |
| Indice d'acide       | 0.9                        | Au max 1                     | Au max 1                    | 0.5-2         |

Malgré les différentes variations, nous remarquons que les paramètres physico-chimiques des huiles essentielles sont en accord avec ceux mentionnés par les normes : PHARMACOPÉE EUROPÉENNE [302], O.N.I.P.P.A.M. [381], AFNOR [172] et les travaux de SHAKHNOZA et *al.* [380]. Ces fluctuations sont attribuées à la complexité de la notion de chémotype [222].

Pour les constantes chimiques, l'indice d'acide renseigne sur le taux d'acides libres. En effet, un indice d'acide élevé (supérieure à deux) trouve une explication dans la dégradation de l'huile essentielle (hydrolyse des esters) durant la conservation. Inversement, un indice d'acide inférieur à deux est une preuve de bonne conservation de l'essence (faible quantité d'acides libres) [222, 382].

Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé [222, 382].

Le faible indice de réfraction de l'huile essentielles indique sa faible réfraction de la lumière ce qui pourrait favoriser son utilisation dans les produits cosmétiques [222, 382].

La détermination des propriétés physico-chimiques est une étape nécessaire mais demeure non suffisante pour caractériser l'huile essentielle. Il sera donc primordial de déterminer le profil chromatographique de l'essence aromatique.

### **3.5. Identification des huiles essentielles par CPG/MS :**

#### **3.5.1. L'huile essentielle d'armoise blanche :**

Les résultats relatifs à la composition chimique de l'huile essentielle d'armoise blanche sont regroupés dans le tableau 3.7 en fonction des temps de rétention par ordre croissant. Les profils chromatographiques sont illustrés par la figure 1 (Appendice B).

Tableau 3.7 : Identification des principaux composants chimiques de l'huile essentielle d'armoise blanche analysés par CPG/MS.

| Numéros de structures        | IK   | TR    | Nom du composant      | Pourcentage% |
|------------------------------|------|-------|-----------------------|--------------|
| 1                            | 934  | 12,78 | $\alpha$ -pinene      | 1,16         |
| 2                            | 950  | 13,01 | Camphene              | 6,00         |
| 3                            | 974  | 13,32 | Sabinene              | 0,90         |
| 4                            | 990  | 13,54 | 1-octen-3-ol          | 0,27         |
| 5                            | 1017 | 15,99 | $\alpha$ -terpipene   | 0,26         |
| 6                            | 1025 | 16,12 | para-Cymene           | 0,48         |
| 7                            | 1033 | 16,30 | 1,8-cineole           | 8,60         |
| 8                            | 1058 | 16,70 | $\gamma$ -Terpinene   | 0,30         |
| 9                            | 1074 | 17,03 | $\alpha$ -thujone     | 7,03         |
| 10                           | 1091 | 17,28 | $\alpha$ -Terpinolene | 0,26         |
| 11                           | 1107 | 17,59 | Filifolone            | 1,04         |
| 12                           | 1119 | 17,86 | $\beta$ -Thujone      | 1,74         |
| 13                           | 1124 | 18,96 | Chrysanthenone        | 10,38        |
| 14                           | 1153 | 19,60 | Camphre               | 39,50        |
| 15                           | 1156 | 19,67 | Sabina ketone         | 1,07         |
| 16                           | 1162 | 21,83 | Pinocarvone           | 1,79         |
| 17                           | 1169 | 22,65 | Borneol               | 3,35         |
| 18                           | 1178 | 22,65 | Terpinene-4-ol        | 1,07         |
| 19                           | 1206 | 22,76 | Verbenone             | 0,23         |
| 20                           | 1229 | 23,26 | Cis-carveol           | 0,25         |
| 21                           | 1237 | 25,44 | E-ocimenone           | 0,34         |
| 22                           | 1244 | 25,58 | Carvone               | 0,15         |
| 23                           | 1275 | 26,28 | Bornyl acetate        | 2,52         |
| 24                           | 1287 | 27,18 | Carvacrol             | 0,70         |
| 25                           | 1298 | 27,81 | $\gamma$ -Elemene     | 0,12         |
| 26                           | 1313 | 28,14 | Bicycloelemene        | 0,17         |
| 27                           | 1393 | 30,02 | Germacrene D          | 1,07         |
| 28                           | 1418 | 30,61 | Germacrene B          | 0,55         |
| 29                           | 1444 | 31,19 | Bicyclogermacrène     | 0,33         |
| 30                           | 1457 | 31,51 | Delta-cadinene        | 0,22         |
| 31                           | 1465 | 38,22 | Spathulenol           | 1,31         |
| Les monoterpènes oxygénés    |      |       |                       | 77,78 %      |
| monoterpènes hydrocarbures   |      |       |                       | 11,29 %      |
| sesquiterpènes hydrocarbures |      |       |                       | 3,77 %       |
| Total                        |      |       |                       | 92,84 %      |

Les résultats de l'analyse de la composition chimique, par chromatographie gazeuse -Spectrométrie de masse (CPG/MS), de l'huile essentielle d'armoise blanche ont permis d'identifier 31 composés qui représentent un total de 92,84 %.

Les monoterpènes oxygénés (77,78%) sont les composants prédominants dont le camphre (39,5%), Chrysanthenone (10,38%), eucalyptol (8,60%),  $\alpha$ -thujone (7,03%), le Bornéol (3,35%) et Bornyl acetate (2,52%), suivis par les monoterpènes hydrocarbures (11, 29%) représentés par le camphène (6,0%) et les sesquiterpènes hydrocarbures (3,77%).

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par ZOUARI et *al.* [30], NEFFATI et *al.* [59], BELHATTAB et *al.* [18] & MIGHRI et *al.* [31] qui ont rapporté que l'huile essentielle d'armoise blanche est composée de monoterpènes, principalement de monoterpènes oxygénés, tels que le camphre, le 1,8- cinéole , chrysanthenone , chrysanthenol et  $\alpha / \beta$  – thujone comme principaux composants et de sesquiterpènes hydrocarbures.

L'huile essentielle des parties aérienne d'*Artemisia herba alba* a été largement étudiée. Une grande variabilité chimique a été rapportée dans différents pays, et même dans des localités différentes du même pays (Tableau 3.8) [383, 384].

Les différentes compositions observées ont été caractérisées soit par la dominance d'un seul composé majeur présent à des teneurs élevées ( $\alpha$ -thujone,  $\beta$ -thujone, 1,8-cinéole, camphre, chrysanthenone, pinocarvone,  $\alpha$ -copaène, limonene ou acétate de trans-sabinyle), soit par une co-dominance de deux ou plus de ces composés présents à des teneurs assez importantes [30, 31, 59, 362].

En se basant sur ces données de profils chimiques des huiles essentielles, TISSERAND et YOUNG [255] classent l'armoise blanche en sept chémotypes: Cis-Chrysanthenyle acétate,  $\beta$ -Thujone,  $\alpha$  –thujone, camphore, verbenol,  $\alpha$  – thujone/ camphore,  $\alpha$  –thujone /  $\beta$ -Thujone.

Tableau 3.8 : Teneur en composés majoritaires (%) des huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* Asso. de différentes origines géographiques.

| Pays                         | Région      | Camphre     | 1,8 cinéole | $\alpha$ -thujone | $\beta$ -Thujone | Verbenol    | Acétate de cis-chrysanthényle | Chrysanthenone | Davanone    | Références |
|------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------------|------------------|-------------|-------------------------------|----------------|-------------|------------|
| Algérie                      | Méchrea     | 22.2        | -           | -                 | <b>41.2</b>      | -           | -                             | -              | -           | [385]      |
|                              | Nord sahara | <b>49.3</b> | 13.4        | -                 | -                | -           | -                             | 3.2            | -           | [386]      |
|                              | M'sila      | <b>33.1</b> | 8.6         | 3.6               | 6.9              | -           | 0.5                           | 12.2           | -           | [18]       |
|                              |             | <b>19.4</b> | -           | -                 | 15               | -           | -                             | 15.8           | -           | [387]      |
|                              | Djelfa      | 5.6         | 5.8         | -                 | -                | -           | -                             | -              | <b>36.1</b> | [388]      |
|                              |             | <b>39.1</b> | 12.3        | 6.8               | 4.7              | -           | -                             | 7.0            | -           | [21]       |
|                              | Biskra      | 1.17        | 2.36        | 7.8               | 1.53             | -           | <b>25.1</b>                   | 4.98           | -           | [23]       |
|                              | Bejjai      | <b>29.6</b> | -           | 20.3              | -                | 19          | -                             | -              | -           | [389]      |
| Saida                        | <b>29.8</b> | 6.5         | 1.4         | 1.08              | -                | -           | 8.2                           | 0.7            | [390]       |            |
| Marroc                       | Ouarzazate  | 26.6        | -           | 9.2               | 5.6              | -           | -                             | <b>28.1</b>    | 1.13        | [275]      |
|                              | Taforalt    | <b>43.0</b> | 7.08        | -                 | 1.74             | -           | -                             | 0.4            | -           | [45]       |
|                              | Machraa     | <b>31.9</b> |             |                   |                  | -           | -                             | 25.8           | -           | [384]      |
|                              | Er-Rachidia | 5.12        | 2.27        |                   | 6.14             | <b>21.8</b> |                               |                |             | [43]       |
|                              | -           | <b>28.9</b> |             | 25.9              | 16.0             |             |                               |                |             | [391]      |
|                              | Oujda       | 8.41        | -           | 21.1              | <b>46.7</b>      | -           | -                             | -              | -           | [392]      |
| Tunis                        | Bir elhfy   | 10.8        | 8.91        | <b>24.8</b>       | 8.32             | -           | 3.29                          | 4.73           | -           | [24]       |
|                              | Gafsa       | 1.42        | 3           | 8.73              | 2.57             | -           | <b>10.6</b>                   | 4.94           | -           | [30]       |
| <b>Iran (Nazlo)</b>          |             | 34.9        | 7.42        | 4.12              | <b>35.6</b>      | -           | -                             | -              | -           | [393]      |
| <b>Ouest d'Azerbaïjan</b>    |             | 34.9        | 7.42        | -                 | <b>35.6</b>      | -           | -                             | -              | -           | [394]      |
| <b>Jordanie (Buseirah)</b>   |             | -           | -           | <b>16.2</b>       | 8.5              | -           | -                             | -              | -           | [366]      |
| <b>Espagne (Valentina)</b>   |             | -           | 10.2        | -                 | -                | -           | 5.6                           | 6.7            | <b>18.1</b> | [395]      |
| <b>Iraq (Karbala desert)</b> |             | <b>37.3</b> | -           | -                 | -                | -           | -                             | 16.6           | -           | [396]      |

L'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba* Asso. de la région de Djelfa fait partie de chemotype à camphre (37,5 %). Ce dernier a été signalé dans différentes régions d'Algérie : Bou Saada, Batna, Sidi Aissa, Djelfa et Kenchela (19 –48%) [397], M'sila [387] Benifouda de M'sila [18], Bejaia [389], Djelfa [21], Saida [390] et au nord du Sahara Algérien [386].

Au Maroc, IMELOUANE et *al.* [45] dans la région de Taforalt et PAOLINI et *al.* [384] dans la région de Machraa, ont révélé la présence du Camphre comme composé majoritaire de l'huile essentielle d'armoise blanche

De même, HOUBAIRI et *al.* [391] ont trouvé que l'huile d'*Artemisia herba-alba* du Maroc contient un taux de camphre plus faible de 28.96%.

D'après, ABAAS et *al.* [396], le composé majoritaire de l'huile essentielle d'armoise blanche d'Iraq est le camphre avec 37.3%.

Toutefois, certains composés chimiques minoritaires dans la présente étude ont été décrits par d'autres chercheurs comme composés majoritaires des huiles essentielles d'armoise blanche.

En effet, l' $\alpha$ -thujone qui est peu présent dans notre huiles essentielle avec un taux de 7,03 %. Il est le composé majoritaire de l'huile essentielle de Tunisie (Bir Elhfay ) [24] et de Jordanie [366].

De même, BOUKRICH et *al.* [362] ont montré que l' $\alpha$ -thujone est le principal composé de l'armoise blanche des zones semi-aride et aride de la Tunisie.

Des études antérieures ont montré que l'acétate de cis-chrysanthényle est le principal composé de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* Asso. de l'Algérie (Biskra) et de la Tunisie (Gafsa) [23, 30].

Selon AKROUT et *al.* [398] & MIGHRI et *al.* [31], l'huile essentielle d'armoise blanche provenant de la région de Beni-Khedache (Sud de Tunisie) et de la région de Kirchaou (sud-est tunisien) est caractérisée par la dominance de  $\beta$ -thujone.

Cependant, MIGHRI et al. [31], MIGHRI et al. [357], MIGHRI et al. [365], MIGHRI et al. [399] & MIGHRI et al. [400] ont indiqué la présence de  $\beta$ -Thujone dans l'huile essentielle d'armoise blanche.

Des études faites par BOUCHIKHI et al. [385], BOUTKHIL et al. [392], & AGHAEI et al. [394] montrent que le  $\beta$ -thujone caractérise l'huile essentielle d'armoise blanche qui se trouve spontanément à Méchria (l'ouest d'Algérie), Oujda (Maroc) et l'Ouest d'Azerbaïdjan.

SALIDO et al. [383] & SALIDO et al. [395] ont identifié le davanone comme constituant major dans l'huile essentielle de certains chemotypes d'Espagne. De même, DAHMANI-HAMZAOUI et BAALIOUAMER [388] ont identifié le davanone dans l'huile essentielle d'armoise blanche de Djelfa.

TILAOUI et al. [43] ont montré que l'huile d'armoise blanche de l'Imilchil à Er-Rachidia (Maroc) contient le verbénol comme composé majoritaire.

D'autre part ZAIM et al. [275] ont montré que l'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba* Asso. de Sud du Maroc (Ouarzazate) contient de chrysanthène comme composé majoritaire.

L'eucalyptol est identifié comme le constituant majoritaire dans l'huile essentielle d'armoise blanche provenant du sud de l'Espagne (41 % au maximum) [383] et de l'Égypte [28].

Il est l'un des principaux composés dans les huiles essentielles provenant d'Algérie [18,21, 386]. Cependant, il n'est pas présent dans celle provenant d'Algérie (M'Sila) [387].

### **3.5.2. L'huile essentielle de romarin :**

Les résultats de l'identification par chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse (CG/MS) des principaux composants chimiques de l'huile essentielle de romarin, en fonction des temps de rétention par ordre croissant, présentés par le chromatogramme de la figure 2 (Appendice A) , ont permis d'identifier 21 composés qui représentent un total de 94,5 % (Tableau 3.9).

Tableau 3.9 : Identification des principaux composants chimiques de l'huile essentielle de romarin analysés par CPG/MS.

| Numéros de structures        | IK   | TR    | Nom du composant       | Pourcentage % |
|------------------------------|------|-------|------------------------|---------------|
| 1                            | 926  | 12,64 | tricyclène             | 0,21          |
| 2                            | 931  | 13,1  | $\alpha$ -pinène       | 13,19         |
| 3                            | 947  | 13,73 | camphène               | 9,51          |
| 4                            | 972  | 14,88 | $\beta$ -pinène        | 1,09          |
| 5                            | 992  | 15,1  | myrcène                | 0,10          |
| 6                            | 1005 | 15,9  | $\alpha$ -phéllandrène | 0,20          |
| 7                            | 1018 | 16,4  | $\alpha$ -terpinène    | 0,22          |
| 8                            | 1026 | 16,7  | para-cymène            | 1,58          |
| 9                            | 1031 | 16,9  | limonène               | 1,24          |
| 10                           | 1030 | 17,12 | 1,8 cinéol             | 18,26         |
| 11                           | 1057 | 18,17 | $\gamma$ -terpinène    | 0,10          |
| 12                           | 1088 | 18,95 | terpinolène            | 0,17          |
| 13                           | 1102 | 20,1  | chrysanthénone         | 3,83          |
| 14                           | 1144 | 21,84 | camphre                | 39,70         |
| 15                           | 1166 | 22,60 | borneéol               | 3,29          |
| 16                           | 1184 | 23,05 | terpinène-4-ol         | 0,81          |
| 17                           | 1196 | 23,54 | $\alpha$ -terpinéol    | 0,14          |
| 18                           | 1287 | 27,18 | bornyl acétate         | 0,06          |
| 19                           | 1423 | 32,24 | $\beta$ -caryophyllène | 0,55          |
| 20                           | 1581 | 38,15 | Caryophyllène oxyde    | 0,15          |
| 21                           | 1668 | 40,29 | $\alpha$ -bisabolol    | 0,20          |
| Les monoterpènes oxygénés    |      |       |                        | 66,2%         |
| monoterpènes hydrocarbures   |      |       |                        | 27,4%         |
| sesquiterpènes hydrocarbures |      |       |                        | 0,7%          |
| sesquiterpènes oxygénés      |      |       |                        | 0,2%          |
| Total %                      |      |       |                        | 94,5%         |

Les monoterpènes oxygénés (66,2%) sont les composants prédominants dont le camphre (39,7%), eucalyptol (18,26%), Chrysanthénone (3,83%), le Bornéol (3,29%) sont les principaux composés, suivis par les monoterpènes hydrocarbures (27,4%) représentés par l' $\alpha$ -pinène (13,19 %) et le camphène (9,51%), les sesquiterpènes hydrocarbures (0,7%) et sesquiterpènes oxygénés (0,2%)

Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par Wang et *al.* [154], Szumny et *al.* [104], Hosni et *al.* [268] et ALEKSANDAR et *al.* [401] qui ont rapporté que l'huile essentielle de romarin contient principalement des monoterpènes, principalement de monoterpènes oxygénés, suivi par les monoterpènes hydrocarbures et les sesquiterpènes.

ZAOUALI et *al.* [153] & JORDÁN et *al.* [360] ont étudié les changements dans la composition de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. var . *typicus* Batt à différents stades phénologiques. L'analyse de l'huile essentielle a montré des concentrations plus élevées de monoterpènes oxygénés et les hydrocarbures monoterpéniques pendant le stade végétatif et le stade de la floraison. Cependant, les plus grandes quantités de diterpènes et sesquiterpènes oxygénés ont été détectés dans les plantes récoltées au stade de maturation de fruits.

FERNÁNDEZ et *al.* [402] ont montré que les principaux composés volatiles de l'huile essentielle du romarin sont le camphre et le 1,8-cinéole, le bornéol, le verbenone, l' $\alpha$ -pinène et le camphène.

NAPOLI et *al.* [63], classe le romarin en trois chemotypes, selon le composé majoritaire de leurs huiles essentielles : *cineoliferum* (teneur élevée en 1,8-cinéole); *camphoriferum* (camphre > 20%); et *verbenoniferum* (verbénone > 15%).

*Rosmarinus officinalis* L. de la région de Djelfa est classé dans le chémotype *cineoliferum* car son huile essentielle est caractérisée par la présence de Camphre comme principal constituant (39,7 %).

En se basant sur la classification de SALIDO et *al.* [383] trois chemotypes de *Rosmarinus officinalis* ont été identifiés de la région Est d'Algérie [367] :

- Le premier chémotype est le 1,8 cinéol qui caractérise les régions : Kherrata (35.52%) et Bibbans (42.16%).
- Le deuxième chémotype est le camphre qui caractérise la région de Boussâada (42.73%), Agmeroual (38.84%) et N'gaous (16.88%).
- Le troisième chémotype est l' $\alpha$ -pinène (25.2%) qui caractérise la région de Boutaleb (Biskra).

BOUSBIA et al. [267], GIORDANI et al. [403] & BEKKARA et al. [404] ont signalé que le romarin des régions d'Alger, Annaba et Tlemcen (Honaine) est classé dans le chémotype  $\alpha$ -pinene avec des taux de l'ordre de 44,11%, 19,7% et respectivement.

ZOUBIRI et BAALIOUAMER, [405] & KABOUCHE et al. [406] ont signalé que le 1,8 cinéol est le composé majoritaire de l'huile essentielle de romarin provenant de la région de Sétif et de Constantine.

Lors d'une étude sur l'huile essentielle du romarin de la région d'Oued Souf (Biskra), TOUAFÉK et al. [407] ont également identifié le 1,8-cinéole comme composant principal avec un taux de 29,5% suivi de 2-éthyl-4,5-diméthylphénol (12,0%), du camphre (11,5%) et de bornéol (9,4%).

Plusieurs études sur la composition chimique des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. de différentes origines géographiques ont été réalisées (Tableau 3.10).

- Le chémotype Camphre a été signalé en Espagne [361], en Tunisie [153], en France [408]
- Le chémotype 1,8-cinéole a été signalé en Espagne [361], en Italie [63], au Maroc [408], en Tunisie [153] et en Turquie [183].
- Le chémotype  $\alpha$ -pinene a été signalé : en Roumanie [410], en Iran [411] et en Chine [154].

ÖZCAN et al. [152] ont étudié la composition de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* de la Turquie, ils ont signalé qu'elle est caractérisée par une teneur élevée de p-cymène (44.02 %).

Le principal composé identifié dans l'huile essentielle de romarin provenant de Portugal est le myrcène [409].

BOZIN et al. [249] ont signalé que les composants de l'huile de *R. officinalis* étaient le limonène (21.7%), camphre (21.6%) and  $\alpha$ -pinene (13.5%).

Tableau 3.10 : Teneur en composés majoritaires (%) des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. de différentes origines géographiques.

| Pays                        | Région    | Camphre     | 1,8 cinéole | $\alpha$ -pinene | $\beta$ -pinene | pp-cymene | Limonene | Myrcene     | Verbenone   | Références |
|-----------------------------|-----------|-------------|-------------|------------------|-----------------|-----------|----------|-------------|-------------|------------|
| Algérie                     | Kherrata  | 14.4        | <b>35.5</b> | 11.3             | 4.02            | 1.97      | -        | 1.06        | -           | [367]      |
|                             | Bibans    | 9.13        | <b>42.1</b> | 13.8             | 2.82            | 2.88      | -        | 1.50        | -           |            |
|                             | Boutaleb  | 24.0        | 8.83        | <b>25.2</b>      | 1.61            | 2.29      | 4.57     | 0.78        | -           |            |
|                             | Agmeroual | <b>38.8</b> | 5.43        | 16.9             | 0.91            | 1.88      | 4.45     | 0.68        | 13.6        |            |
|                             | N'gaous   | <b>16.8</b> | 12.3        | 13.6             | 0.91            | 2.21      | 3.82     | 1.11        | 3.92        |            |
|                             | Boussàada | <b>42.7</b> | 6.64        | 15.1             | 1.37            | 1.68      | 3.16     | 0.4         | -           |            |
|                             | Alger     | 7.8         | -           | <b>44.1</b>      | 2.6             | 1.3       | 5.5      | 1.9         | 6.4         | [267]      |
|                             | Annaba    | 12.6        | 7.9         | <b>19.7</b>      | 1.6             | 2.8       | 5.1      | -           | 1.5         | [403]      |
|                             | Tlemcen   | 15.3        | 5.0         | <b>23.1</b>      | 12.2            | 1.9       | 3.2      | 4.5         | -           | [404]      |
|                             | Sétif     | 11.8        | <b>13.5</b> | 12.6             | 2.2             | -         | 1.2      | 1.2         | 8.3         | [405]      |
| <b>Marroc</b>               |           | 12.6        | <b>49.1</b> | 6.2              | 6.2             | 1.5       | -        | -           | -           | [408]      |
| <b>Tunisie</b>              |           | 11.7        | <b>37.9</b> | 8.7              | 2.2             | 0.8       | 1.2      | 0.6         | -           | [153]      |
|                             |           | <b>28</b>   | 22.7        | 13.3             | 0.6             | 1.6       | 0.2      | 0.7         | -           |            |
| <b>Portogal</b>             |           | 12.8        | 10.6        | 14.1             | 4               | -         | 0.2      | <b>23.7</b> | 1.4         | [409]      |
| <b>Romanie</b>              |           | 3.8         | 6           | <b>61.2</b>      | 2.8             | 1.6       | 2.9      | 2.7         | -           | [410]      |
| <b>Iran</b>                 |           | 2.7         | 13.7        | <b>48.7</b>      | 2               | 0.5       | -        | 4.5         | 2.1         | [411]      |
| <b>Chine</b>                |           | 14.3        | -           | <b>19.4</b>      | 6.7             | 1.7       | 0.3      | -           | -           | [154]      |
| <b>Espagne (Murcia)</b>     |           | 18.5        | <b>22.1</b> | 15.6             | 1.1             | 2.9       | 2.9      | 1.6         | 5.4         | [361]      |
|                             |           | 15          | 19.1        | <b>19.2</b>      | 1.1             | 2.5       | 3.9      | 3.7         | 5           |            |
|                             |           | <b>20.2</b> | 19.7        | 14.6             | 1.2             | 2.3       | 3.3      | 2.7         | 4.8         |            |
|                             |           | 17.7        | <b>21.1</b> | 16.2             | 1.6             | 2.3       | 3.4      | 3.3         | 5.1         |            |
|                             |           | <b>24</b>   | 18.9        | 14.1             | 2.2             | 1.5       | 3.1      | 3.4         | 4           |            |
| <b>Sud d'Afrique (Cape)</b> |           | 16.6        | 11.9        | 11.5             | 1.1             | -         | -        | 1.3         | <b>17.4</b> | [412]      |
| <b>Italie Sicily</b>        |           | 19.2        | <b>24.5</b> | 21               | 5.5             | 1.3       | 3.6      | -           | 1.2         | [63]       |
| <b>Turquie</b>              |           | 5.8         | <b>61.4</b> | 10.2             | 1.1             | 2.3       | 2.4      | 1.5         | -           | [183]      |

En analysant la composition chimique de l'huile essentielle de romarin d'Iran GACHKAR et al. [268] ont constaté qu'elle est dominée par le piperitone (23.7%),  $\alpha$ -pinene (14.9%), linalool (14.9%) et le 1, 8-cineole (7.43%).

ZAOUALI et al. [153], CELIKTAS et al. [183], JORDÁN et al. [360], SINGH & GULERIA [364] & TIGRINE-KORDJANI et al. [412], ont attribué les variations dans la composition chimique des huiles essentielles à de nombreux facteurs, y compris le lieu d'origine géographique des plantes, le stade phénologique des plantes, la période de la récolte et la partie de la plante utilisée.

En effet, ZAOUALI et al. [153] & JORDÁN et al. [360] ont étudié les changements dans la composition des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. var. *typicus* Batt. à différents stades phénologiques.

L'analyse des huiles essentielles provenant de la distillation des feuilles et des tiges entières ont montré des concentrations plus élevées de monoterpènes oxygénés et les hydrocarbures monoterpéniques pendant le stade végétatif et le stade de maturation de fruits. Cependant, les plus grandes quantités de diterpènes et sesquiterpènes oxygénés ont été détectés dans les plantes récoltées au stade de la floraison.

L'étude de GHANMI et al. [34] sur l'influence de la date de récolte (Avril, Juin, Septembre) sur la composition chimique des huiles essentielles de l'armoise blanche de la région de Guerçif (Maroc oriental) montrent une grande différence entre la collecte du mois de septembre par rapport à celles des mois d'avril et de juin.

En effet, les collectes d'avril et juin sont caractérisées par la présence de chrysanthénone comme principal constituant (respectivement 47,71 et 48,45 %) suivi du camphre (respectivement 21,59 et 24,85 %) et de l' $\alpha$ -thujone (respectivement 4,06 et 4,40 %).

Ils sont accompagnés d'autres constituants dont les teneurs sont relativement importantes : l' $\alpha$ -pinène (4,31, 2,16 %), le  $\beta$ -germacrène (3,15, 0,77 %), et le  $\beta$ -elemène (2,86, 1,78 %).

Par contre, les échantillons récoltés au mois de septembre se distinguent par la présence du camphre comme composé majoritaire suivi de l' $\alpha$ -terpin-7-al avec des taux respectifs de 45 et 22 %.

La collecte de ce mois se caractérise aussi par des pourcentages faibles en  $\alpha$ -thujone et en chrysanthénone (respectivement 0,25 et 0,28 %) et l'absence de  $\beta$ -thujone par rapport aux autres collectes

Les fluctuations et les variations constatées dans composition chimique peuvent être attribuées non seulement à l'origine et la plante mais également aux procédés appliqué pour l'analyse et l'identification des composés de l'huile essentielle, notamment la colonne et les conditions programmées [413, 414]. L'indice de rétention d'un composé A dépend de la phase stationnaire et de la température [34].

OKOH et *al.* [415], ont étudié l'effet des différents procédés d'extraction sur la composition chimique. de l'huile essentielle de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) par hydro-distillation (HD) et par micro-ondes sans solvant (SFME). L'huile essentielle obtenue par HD contient plus d'hydrocarbures monoterpènes (32,95 %) que l'huile essentielle obtenue par SFME (25,77 %), tandis que des taux plus élevés de monoterpènes oxygénés (28,6%) sont présents dans l'huile extraite par SFME en comparaison avec HD (26,98 %).

### **3.6. Etude de l'Activité antimicrobienne et biopesticide:**

#### **3.6.1. Activité antibactérienne :**

Les résultats de l'étude de l'activité antimicrobienne in vitro des huiles essentielles d'*Artemisia herba-alba* Asso. et de *Rosmarinus officinalis* L., évaluée par la méthode de diffusion sur gélose (Tableau 3.11) sont exprimé en adoptant l'estimation de MOREIRA et *al.* [416] & DJEDDI et *al.* [417]:

- Souche extrêmement sensible : Diamètre plus de 20 mm.
- Souche très sensible : Diamètre compris entre 15 et 19 mm.
- Souche sensible : Diamètre compris entre 9 et 14 mm.
- Souche non sensible : Diamètre moins de 8 mm.

Tableau 3.11 : Résultats de l'activité antibactérienne.

| Diamètres des ZI (mm) $\pm$ SD                                 |                    |             |               |                    |               |
|--|--------------------|-------------|---------------|--------------------|---------------|
| Plantes étudiées   | Bactéries Gram (-) |             |               | Bactéries Gram (+) |               |
|  | <i>K.p.</i>        | <i>P.a.</i> | <i>E.c.</i>   | <i>B.s.</i>        | <i>S.a.</i>   |
| <i>Armoise blanche</i><br>( <i>Artemisia herba-alba</i> Asso.) | 15 $\pm$ 0.54      | 06 $\pm$ 00 | 19 $\pm$ 0.55 | 21 $\pm$ 0.43      | 33 $\pm$ 0.43 |
| Romarin<br>( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.)                 | 13 $\pm$ 0.51      | 06 $\pm$ 00 | 17 $\pm$ 0.25 | 22 $\pm$ 0.54      | 28 $\pm$ 0.46 |

Les huiles essentielles d'armoise blanche et de romarin ont une activité antimicrobienne vis-à-vis des souches testées, dans laquelle certaines souches semblent se distinguer par une sensibilité élevée par rapport aux autres, sauf pour *Pseudomonas aeruginosa* qui s'est montrée résistante. Ainsi, les souches à Gram positif présentent souvent plus de sensibilité vis-à-vis des huiles essentielles testées que les souches à Gram négatif.

En effet, pour les bactéries à Gram positif, *S. aureus* est la souche la plus sensible avec la zone de plus forte inhibition (33  $\pm$  0.22 – 28  $\pm$  0,11 mm), suivie par *B. subtilis* (22  $\pm$  0.15 - 21  $\pm$  0.17 mm).

Selon l'estimation donnée par MOREIRA et al. [416] & DJEDDI et al. [417], ces deux espèces bactériennes sont considérées comme extrêmement sensibles envers les huiles essentielles testées.

Cependant, une activité modeste a été observée contre les bactéries à Gram négatif sur *Klebsiella pneumoniae* (15  $\pm$  0,2 – 13  $\pm$  0.3 mm) et *Escherichia coli* à gram négatif (19  $\pm$  0.57 -17  $\pm$  0.25 mm). Ces deux espèces bactériennes, selon l'estimation donnée par MOREIRA et al. [416] et DJEDDI et al. [417] sont considérées comme sensibles à très sensibles envers les huiles essentielles testées.

L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* reste un cas particulier avec une résistance plus forte aux huiles essentielles testées.

Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par LOGRADA et *al.* [367]; KAZEMI et *al.* [418], ZOUARI et *al.* [30], IMELOUANE et *al.* [45], MOUCHEM et *al.* [419], AL-SHUNEIGAT et *al.* [420], SBAYOU et *al.* [421] qui ont montré que les huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. et d'*Artemisia herba alba* Asso. présentent une activité antibactérienne contre les souches Gram positif et Gram négatif (Tableau 3. 12).

Tableau 3.12 : Activité antibactérienne des huiles essentielles de l'armoise blanche et de romarin

| Huile essentielle | Zone d'inhibition (mm) |             |                    |            | Références |
|-------------------|------------------------|-------------|--------------------|------------|------------|
|                   | Bactéries Gram (-)     |             | Bactéries Gram (+) |            |            |
|                   | K.p.                   | E.c.        | B.s.               | S.a.       |            |
| Armoise blanche   | 16 ± 0,1               | 17,23± 0,25 | -                  | 28,17±0,28 | [45]       |
|                   | 11,0 ± 0,3             | 18,0 ± 1,0  | -                  | -          | [420]      |
|                   | 8,7 ± 0,6              | 11,3 ± 0,6  | 23± 1,0            | -          | [30]       |
|                   | -                      | 16 ± 0      | -                  | 13 ± 0     | [421]      |
| Romarin           | -                      | 14,3 ± 0,7  | 23 ± 0,9           | 22,0 ± 1,0 | [128]      |
|                   | 11,6± 0                | 13,5± 0     | -                  | 14,0± 0    | [422]      |
|                   | 9,0± 0                 | 9,0± 0      | -                  | 10,0± 0    | [423]      |
|                   | 12± 0                  | -           | 12,0± 0            | 18,0± 0    | [424]      |
|                   | 15± 0                  | -           | 20± 0              | 30± 0      | [418]      |

Plusieurs travaux réalisés par DERWICH et *al.* [85], NEDOROSTOVA et KLOUCEK [425] & OKOH et *al.* [415], ont confirmé la grande sensibilité des bactéries Gram positif par rapport aux Gram négatif. Ceci est dû principalement à la différence de la structure de la paroi cellulaire. En effet, la paroi des bactéries Gram (-) est surtout composée en lipopolysaccharides (LPS) et de protéines. Les lipopolysaccharides (LPS), grâce à ses charges négatives de surface, empêchent la diffusion des molécules hydrophobes, alors que les protéines excluent le passage des molécules hydrophiles de poids moléculaire élevé [426, 427].

Néanmoins, ils permettront la diffusion libre des molécules avec une masse moléculaire en-dessous de 600 Da, comme le carvacrol qui peut traverser cette barrière [428, 429].

Tandis que les bactéries Gram (+) sont moins protégées contre les agents antibactériens. Leur paroi est riche en peptidoglycane (polymère complexe de sucres et d'acides aminés donnant à la bactérie sa forme et sa rigidité que ce soit chez les bactéries Gram positif ou négatif), n'entrave que la diffusion des molécules supérieures à plus de 50 000 Da [430].

De plus, les extrémités lipophiles des acides lipotéichoïques de la membrane cellulaire des bactéries à Gram positif peuvent faciliter la pénétration des composés hydrophobes [415, 431].

Par rapport à la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* contre, les résultats obtenus sur l'huile essentielle d'armoise blanche sont en accord avec ceux trouvés par IMELOUANE et al. [45] & ZOUARI & al. [30].

Tandis que, AL-SHUNEIGAT et al. [420] ont trouvé que l'huile testée a un effet sur cette souche avec une zone d'inhibition égale à  $09 \pm 2$  mm.

De même, nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par d'autres auteurs OUIBRAHIM et al. [412], CHAHBOUN et al. [424], KAZEMI et al. [418] & GACHKAR et al. [259], par rapport à la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* contre l'huile essentielle du romarin.

Par ailleurs, ces résultats sont très loin à ceux indiqués par CELIKTAS et al. [183] &

HUSSAIN et al. [128] qui ont montré que l'huile essentielle du romarin exerce une activité sur la souche *Pseudomonas aeruginosa* (ZI=  $17,0 \pm 1,0$  mm).

Cette résistance est due à l'imperméabilité de la paroi de cette bactérie [417, 428]. En effet, cette bactérie du fait qu'elle appartient aux bactéries Gram (-), elle possède une résistance intrinsèque aux agents biocides, en relation avec la nature de sa membrane externe. Cette dernière est composée de lipopolysaccharides qui forment une barrière imperméable aux composés hydrophobes [432, 433].

*Pseudomonas aeruginosa* a la capacité de de former un biofilm (une organisation complexe composée de différentes strates dans lesquelles les bactéries se retrouvent en conditions physiologiques spécifiques à leur situation [434].

De plus, ces micro-organismes sont mobiles, il est probablement possible à ces bactéries d'être déplacées profondément dans l'agar nutritif de gélose et par conséquent d'échapper ainsi à l'action des métabolites contenus dans les huiles essentielles.

En présence d'agents perméabilisants de la membrane externe, des substances inactives contre *Pseudomonas aeruginosa* deviennent actives [435]. En effet, l'inhibition de la croissance des bactéries Gram (-) a été rapportée, particulièrement en combinaison avec les facteurs qui peuvent influencer l'intégrité de la cellule et/ou la perméabilité de la membrane telle que les pH acides et les fortes concentrations en NaCl [436].

- **Concentration minimale inhibitrice :**

La méthode de contact direct par dilution en milieu gélosé a permis de déterminer la concentration minimale inhibitrice CMI (Tableaux 3.13 et 3.14).

Les résultats, montrent que la bactérie *Staphylococcus aureus* s'est montré la plus sensible, elle a été inhibée à partir d'une concentration minimale de 0.1 mg/ml pour l'huile essentielle de l'armoise blanche et de 0.15 mg/ml pour l'huile essentielle de romarin.

Les concentrations 0.84 mg/ml et de 0.05 mg/ ml de l'huile essentielle d'armoise blanche ont été suffisantes pour arrêter la croissance d' *Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae*, respectivement.

Tandis que pour l'huile essentielle de romarin, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* ont été inhibées à partir d'une concentration minimale de 0.62 mg/ml.

Tableau 3.13: Résultat de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle de l'armoise blanche.

| <i>Artemisia herba alba</i> Asso. |             |                    |             |                    |
|-----------------------------------|-------------|--------------------|-------------|--------------------|
| [C] (%)                           | [C] (mg/ml) | Bactéries Gram (-) |             | Bactéries Gram (+) |
|                                   |             | <i>K.p.</i>        | <i>E.c.</i> | <i>S.a.</i>        |
| 2.5                               | 13.45       | -                  | -           | -                  |
| 1.25                              | 6.72        | -                  | -           | -                  |
| 0.6                               | 3.36        | -                  | -           | -                  |
| 0.3                               | 1.68        | -                  | -           | -                  |
| 0.15                              | 0.84        | -                  | -           | -                  |
| 0.07                              | 0.42        | -                  | +           | -                  |
| 0.03                              | 0.21        | -                  | +           | -                  |
| 0.015                             | 0.10        | -                  | +           | -                  |
| 0.007                             | 0.05        | -                  | +           | +                  |
| 0.003                             | 0.02        | +                  | +           | +                  |

Tableau 3.14 : Résultat de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle de romarin.

| <i>Rosmarinus officinalis</i> L. |             |                    |             |                    |
|----------------------------------|-------------|--------------------|-------------|--------------------|
| [C] (%)                          | [C] (mg/ml) | Bactéries Gram (-) |             | Bactéries Gram (+) |
|                                  |             | <i>K.p.</i>        | <i>E.c.</i> | <i>S.a.</i>        |
| 2.5                              | 19.85       | -                  | -           | -                  |
| 1.25                             | 9.92        | -                  | -           | -                  |
| 0.6                              | 4.96        | -                  | -           | -                  |
| 0.3                              | 2.48        | -                  | -           | -                  |
| 0.15                             | 1.24        | -                  | -           | -                  |
| 0.07                             | 0.62        | -                  | -           | -                  |
| 0.03                             | 0.31        | +                  | +           | -                  |
| 0.015                            | 0.15        | +                  | +           | -                  |
| 0.007                            | 0.07        | +                  | +           | +                  |
| 0.003                            | 0.03        | +                  | +           | +                  |

ALIGIANNIS et *al.* [437] ont proposé une classification de l'huile essentielle basée sur des résultats des CMI, comme suit:

- forte inhibition : CMI inférieure à 0.5 mg/ml;
- inhibition modérée : CMI varie de 0.6 à 1.5 mg/ml;
- faible inhibition : CMI supérieure à 1.6 mg/ml.

Selon cette classification, nous constatons une très forte inhibition des huiles essentielles d'armoise blanche et de romarin contre *S. aureus* et une inhibition modérée contre les souches *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*.

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux d' IMELOUANE et *al.* [45] qui ont déterminé la CMI des huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* Asso. du maroc (Chemotype à comphre) sur quatre souches microbiennes, notamment *Staphylococcus aureus* (0.16 mg /ml), *Klebsiella pneumoniae* (0.04 mg /ml) et *Escherichia coli* (0.66 mg/ml).

Nous avons également comparé nos résultats à ceux de de HUSSAIN et *al.* [41] & OKOH et *al.* [415], qui ont déterminé la CMI des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. du maroc (Chemotype à 1, 8 Cinéole) et de sud d'Afrique (Chemotype à Verbenone), sur quatre souches microbiennes, notamment *Staphylococcus aureus* (0.30 - 3.75 mg /ml), *Klebsiella pneumoniae* (0.94 mg /ml) et *Escherichia coli* (1.52- 7.5 mg/ml) où ils ont enregistré une faible activité par rapport à nos souches .

CUSHNIE et LAMB [3], LAHLOU et *al.* [8] & HAMMER et *al.* [182] ont attribué les fluctuations dans les résultats de la détermination de l'activité antimicrobienne à plusieurs paramètres notamment le type des micro-organismes ciblés, la méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne, la nature de milieux de culture, les conditions de culture (temps d'incubation, la température, l'oxygène), la concentration, le type de l'extrait et particulièrement la nature et la structure des molécules bioactives.

Selon OUSSALAH et *al.* [188], l'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, aldéhydes).

Ainsi les composés chimiques les plus efficaces et qui possèdent un large spectre d'action antimicrobienne sont dans l'ordre NOWAK & *al.* [438]: les phénols (thymol, carvacrol et eugénol), les aldéhydes (géraniol, citral et néral), les cétones (carvone, pulégone et camphre) et les alcools ( $\alpha$ -terpinéol, terpinen-4-ol, menthol, géraniol, linalol) [183, 188, 428, 439].

Du fait de la variabilité quantitative et qualitative des composants des huiles essentielles, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire. Etant donné que chaque composé possède son propre mode d'action [168, 440, 441].

La plupart des mécanismes d'action sont attribués à l'interaction des composants des huiles essentielles avec la membrane cellulaire [442].

En effet, Le mode d'action des huiles essentielles dépend des caractéristiques de ses composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Leur accumulation entre les phospholipides entraîne une perte de l'intégrité de la membrane cellulaire bactérienne, en augmente sa perméabilité, ce qui induit la perte des constituants intracellulaires [443-446].

Les huiles essentielles peuvent aussi provoquer une perturbation chémo-osmotique en affectant le gradient ionique de part et d'autre de la membrane cytoplasmique ce qui diminue la stabilité de la membrane ainsi que le transport membranaire [440, 447].

Dans une étude qui a été réalisée par FREEMAN et CAREL [448], l'huile essentielle de thé a provoqué des fuites d'ions potassium ( $K^+$ ) au niveau des membranes cellulaires d'*E. coli* et *S. aureus*. Cette fuite de  $K^+$  est la toute première preuve de l'existence de lésions irréversibles au niveau de la membrane de la bactérie.

Un autre mécanisme d'action proposé implique le groupement hydroxyle des phénols, comme le carvacrol, qui agirait comme un transporteur transmembranaire des cations et des protons monovalents, cet effet perturbe le gradient ionique et le fonctionnement membranaire des cellules microbiennes [429].

Mais certaines bactéries sont capables de contrebalancer cet effet par l'utilisation de la pompe ionique, dans ce cas la croissance ralentit grâce à l'épuisement de l'énergie de la pompe [447].

D'autres auteurs pensaient que l'activité inhibitrice de ces composés serait due à leur affinité avec les groupements SH impliqués dans la division cellulaire [449].

MAHMOUD et *al.* [450] & CALSAMIGLIA et *al.* [451] ont suggéré que l'effet antimicrobien qu'exercent les huiles essentielles pourrait être expliqué par la destruction de certains systèmes enzymatiques incluant ceux qui participent dans la production d'énergie cellulaire et la production des composés structuraux.

En outre, les huiles essentielles peuvent interagir avec les membranes mitochondriales et à générer des radicaux libres qui oxydent les macromolécules, ce qui conduit à la mort par nécrose [452].

GUESMI et BOUDABOUS [450] & CALSAMIGLIA et *al.* [453] quant à eux, ont avancé l'hypothèse d'inactivation et destruction du matériel génétique.

### **3..6.2. Activité antifongique :**

Les résultats relatifs à l'activité antifongique des huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* Asso. et de *Rosmarinus officinalis* L. sont consignés dans le Tableau 3.15.

Tableau 3.15 : Résultats de l'activité antifongique des huiles essentielles.

| Les plantes étudiées                                    | Diamètres des ZI (mm)± SD |                 |                     |
|---|---------------------------|-----------------|---------------------|
|   | <i>C. Albicans</i>        | <i>A. niger</i> | <i>F. oxysporum</i> |
| Armoise blanche<br>d' <i>Artemisia herba alba</i> Asso. | 36±0,43                   | 31±0,49         | 29± 0.54            |
| Romarin<br><i>Rosmarinus officinalis</i> L.             | 35±0,48                   | 29±0,52         | 27±0,55             |

En se basant sur l'estimation donnée par MUTAI et *al.* [454], les huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* Asso. et de *Rosmarinus officinalis* L. se sont avérées très actives contre toutes les espèces fongiques testées à savoir : la levure *Candida albicans*, ainsi que les deux champignons *Aspergillus niger* et *Fusarium oxysporum*, avec des zones d'inhibition comprises entre  $27 \pm 0,17$  et  $36 \pm 0,2$  mm.

L'estimation donnée par MOREIRA et al. [416] et DJEDDI et al. [417], nous a permis de considérer *Candida albicans*, *Aspergillus niger* et *Fusarium oxysporum* comme des souches extrêmement sensibles aux huiles essentielles étudiées.

.Les champignons montrent généralement une sensibilité supérieure par rapport aux bactéries [455].

Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par ZOUARI et al. [30] qui ont montré que l'huile essentielle d'armoise blanche exerce une forte activité inhibitrice de la croissance de nombreux champignons à savoir *Fusarium solani* (ZI= 27.7± 2.5), *Fusarium sp* (ZI= 27.0 ± 1.6) et *Aspergillus oxysporum* (ZI= 51.0 ± 5.0)

MIGHRI et al. [31] ont constaté que l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* Asso. a un fort effet inhibiteur sur la croissance de certaines souches de levure de *Candida* (*C. albicans* ZI=19.0-1.0, *C. glabrata* ZI=18.7-0.6, *C. tropicalis* ZI= 22.3-0.6 et *C. saké* ZI=17.5-1.0). Ce qui est en accord avec les travaux de REGNAULT- ROGER [244] qui a montré que les huiles essentielles extraites de 10 plantes provenant de plusieurs sites d'Algérie ; y compris l'armoise blanche, ont été analysées pour leur activité potentielle contre *Candida albicans*.

Les études de KOLAI et al. [456] ont trouvé que l'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba* Asso. s'est avérée un agent antifongique efficace contre le *Fusarium Oxysporum*.

En outre, une plus forte activité antifongique des huiles essentielles d'*Artemisia judaica* et *Artemisia herba-alba* a été démontré sur l'inhibition de la croissance d'*Aspergillus niger* [457].

PITAROKILI et al. [458] notent que l'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba* agit de façon active sur *Fusarium oxysporum*.

Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par SANTOYO et al. [459] & CELIKTAS et al. [183]. qui ont montré que l'huile essentielle de romarin présente une activité antifongique importante.

KAZEMI et al. [418] ont signalé l'effet antifongique de l'huile essentielle du romarin sur la levure *Candida albicans* (ZI= 16 mm), *Fusarium oxysporum* (ZI= 16 mm) et *Aspergillus niger* (ZI= 15 mm).

LIMA et al. [460] ont rapporté l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. contre *Candida albicans* ATCC 76615 qui s'est montrée sensible.

LA TORRE et al. [461] ont démontré que les huiles essentielles de romarin ont inhibé la croissance du mycélium et la germination de conidies de *F. oxysporum* f. sp. lycopersici et réduire sa gravité.

SANTOYO et al. [459], montrent que l'huile essentielle de romarin présente une activité contre les levures (*Candida albicans*) et les moisissures (*Aspergillus niger*).

SUPPAKUL et al. [462] ont suggéré que l'activité antifongique des huiles essentielles, peut se faire selon deux mécanismes différents : certaines constituants provoquent la fuite des électrolytes et l'épuisement des acides aminés et des sucres, d'autres peuvent être insérés dans les lipides membranaires, par conséquent il y'a perte des fonctions membranaires.

En outre, l'activité antifongique des huiles essentielles pourrait également être liée à l'interférence des composants de l'huile essentielle dans des réactions enzymatiques de la synthèse de la paroi cellulaire, qui affecte la croissance fongique [444]. Ces suggestions ont été déjà rapportées par MOUCHEM et al. [419].

Certains agents antifongiques inhibent la croissance des cellules en interrompant la biosynthèse d'ergostérol, qui résulte d'une liaison des antifongiques à l'ergostérol sur la membrane cellulaire [460]. Ce procédé affecte l'intégrité et de la fonction de certaines protéines liées à la membrane et conduit à des troubles osmotiques (crée un canal dans les membranes fongiques par lequel s'échappent des ions, principalement K<sup>+</sup> et H<sup>+</sup>), des perturbations de la croissance et la prolifération cellulaire [463].

L'action antifongique des huiles essentielles vis-à-vis *C. albicans* est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure [455].

Les travaux de TEPE et *al.* [364] montrent que la présence de l' $\alpha$ -pinène, le  $\beta$ -pinène et le limonène inhibent l'activité respiratoire chez la mitochondrie de la levure.

Une étude faite par BARRAL et *al.* [465] a permis de déterminer grâce à la microscopie électronique, que lorsqu'*Aspergillus niger* est exposé à l'huile essentielle du thym, celle-ci provoque des dommages irréversibles sur la membrane cellulaire ainsi que sur les organites du champignon.

La propriété antifongique de l'huile essentielle de romarin contre *Fusarium verticillioides* se fait par la perte de l'intégrité de la membrane (la rupture apparente de la paroi cellulaire et la fuite du contenu cytoplasmique, les hyphes semblaient aplati et froissé) et donc le blocage de la croissance cellulaire [444,463].

Les variations observées dans les activités antifongiques entre les différents travaux sont liées à plusieurs paramètres dont : la nature du milieu de germination, le genre et l'état de l'espèce fongique (utilisée juste après son isolement ou après plusieurs repiquages), l'âge de la culture, En effet Plus cette dernière est âgée, plus elle devient sensible à l'action de l'huile essentielle. Mais ces variations dépendent aussi de la nature de l'huile essentielle et son contenu en composés volatils ; la concentration et la quantité de l'huile essentielle ; la concentration de l'inoculum concernant les spores (Une augmentation de la densité des spores, supérieur à  $10^6$  UFC, exige des concentrations élevées d'huile essentielle pour les éliminer) [466].

La forte activité antimicrobienne de l'huile essentielle contre les micro-organismes sensibles peuvent être attribués à la présence d'une forte concentration de monoterpènes [467].

DEBA et *al.* [468] & OKOH et *al.* [415] ont révélé que l'huile de romarin obtenue par extraction aux micro-ondes a été plus active contre les micro-organismes que l'huile obtenue par hydro-distillation. Cela peut être dû en partie au fait que l'huile extraite par micro-ondes contient des élevés en composés oxygénés et ces classes de composés ont été révélés posséder de fortes activités antibactériennes et antifongiques.

À l'inverse, *Artemisia campestris* qui est composée essentiellement de monoterpènes hydrocarbonés, a révélé une activité antimicrobienne faible contre les germes pathogènes [398].

Les monoterpènes oxygénés des huiles essentielles semblent présenter un degré variable de cytotoxicité. Comme substances lipophiles classiques, ils passent à travers la paroi cellulaire et la membrane cytoplasmique et perturbent leur structure. Chez les bactéries, les dommages de la membrane sont liés à la perte d'ions et la réduction du potentiel de la membrane, l'effondrement de la pompe à protons et l'épuisement de l'ATP [469].

L'activité antimicrobienne du romarin est attribuée à la présence de camphre, 1-8 cinéole, camphre le bornéol, camphène,  $\alpha$ -pinène et  $\beta$ -pinène, connus pour leurs propriétés antimicrobiennes [468, 415, 459].

WEERAKKODY et *al.* [470] ont indiqué que le romarin a une forte activité antimicrobienne. Ils ont signalé que le camphre identifié comme principal composant chimique de ses huiles essentielles est responsable pour exercer une activité antimicrobienne.

Tandis que, la présence d'une teneur importante de monoterpènes oxygénés (thujones, camphre et 1,8-cinéole) dans l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* Asso peut être responsable de son activité antimicrobienne prononcée. En outre, d'autres composants mineurs tels que le bornéol a été également démontré qu'il avait un potentiel pouvoir antimicrobien [31].

Le camphre composé majoritaire de l'huile essentielle de l'armoise blanche a été révélé pour inhiber la croissance des bactéries et champignons [31, 471].

Il a été suggéré que de tels composés hydrophobes sont capables de perturber la membrane plasmique et la membrane externe des bactéries gram (-), ce qui provoque des changements dans la perméabilité de la membrane et la mort cellulaire [79, 472].

Par ailleurs, les huiles essentielles sont des mélanges très complexes de composés majoritaires et minoritaires ce qui rend difficile l'explication de leurs propriétés antimicrobiennes. Il n'y a pas de composant majeur seul responsable de cette propriété [359, 468, 473].

Les interactions entre ces composants peuvent conduire à des effets antagonistes, additifs ou synergiques. Certaines études ont démontré que les huiles essentielles entières ont généralement une activité antimicrobienne plus élevée que les mélanges de leurs principales composantes, ce qui suggère que les composants mineurs sont essentiels à l'activité synergique, bien que des effets antagonistes et additifs ont également été observés [403, 474, 475].

En effet, l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* peut être attribuée à l'interaction complexe entre ses différents constituants. La plupart des travaux trouvés dans la littérature scientifique ont mis en évidence l'effet des principales composantes qui définissent le chemotype de romarin sur son activité antimicrobienne [213, 360, 476]. En conséquence, certains composants terpéniques mineurs jouent un rôle important dans l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle du romarin [360,477].

En outre, ROTA et *al.* [477] ont décrit un effet de synergie entre les composants terpéniques et des composés phénoliques qui définissent l'huile essentielle de chemotype de romarin.

L'efficacité de ces composants mineurs, selon DEBA et *al.* [468] & JORDÁN et *al.* [360], peut être liée au fait qu'ils sont capables de détruire l'intégrité cellulaire et inhiber ainsi les processus de respiration et de transport d'ions.

JORDÁN et *al.* [360] & HOSNI et *al.* [268] ont indiqué que la combinaison de 1,8-cinéol et  $\alpha$ -pinène améliore l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de romarin vers *S. typhimurium*.

En outre, les mêmes auteurs ont également signalé que l'huile de romarin riche en 1,8-cinéole avait réduit l'activité antibactérienne contre *S. aureus*. La présence d'autres composants à savoir  $\alpha$ -terpinène-7-al associé à plus grande proportion de p-cymène peut être efficace contre *S. aureus*. Cela est également observé pour *E. coli* et la levure *C. albicans*.

### **3.7. Etude de l'activité antioxydante:**

Trois méthodes basées sur trois principes différents sont réalisées pour évaluer l'activité antioxydante des huiles essentielles d'armoise blanche et du romarin. Chacune de ces méthodes correspond à un des trois mécanismes de réaction suivants [478] :

- Mécanisme de réaction HAT « Transfert d'Atome d'Hydrogène » et SET « Simple Transfert d'Electron » à la fois réalisé par la méthode de piégeage du radical DPPH « 2,2-diphényle-1picrylhydrazyle ».
- Mécanisme de réaction HAT réalisé par la méthode de blanchiment de  $\beta$ -carotène.
- Mécanisme de réaction SET réalisé par la méthode de FRAP « Ferric Reducing Antioxydant Power ».

#### ➤ **Méthode de piégeage du radical libre DPPH :**

L'activité antioxydante des huiles essentielles et des antioxydants standards (Vitamine C, BHT, BHA) par le piégeage du radical libre DPPH a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH•) à la couleur jaune (DPPH-H), mesurable à 517nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances antiradicalaires [329, 323, 334, 479 - 481]

#### ❖ **Pourcentage d'inhibition :**

Les résultats obtenus montrent que l'évolution de l'activité antiradicalaire est dose-dépendante.

En effet, le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration que ce soit des standards (BHT, BHA et vit C) ou des huiles essentielles des deux plantes étudiées jusqu'à arriver à un plateau qui correspond à l'épuisement presque total du DPPH• présent dans le milieu réactionnel.

Le taux d'inhibition du radical libre pour l'huile essentielle de romarin est inférieur à celui de l'armoise blanche pour toutes les concentrations utilisées.

En effet, pour une concentration de 32 mg/ml, l'huile essentielle d'armoise blanche a révélé un pourcentage d'inhibition de 83,53% tandis que celle de romarin est inhibée avec 82.60 % de DPPH.

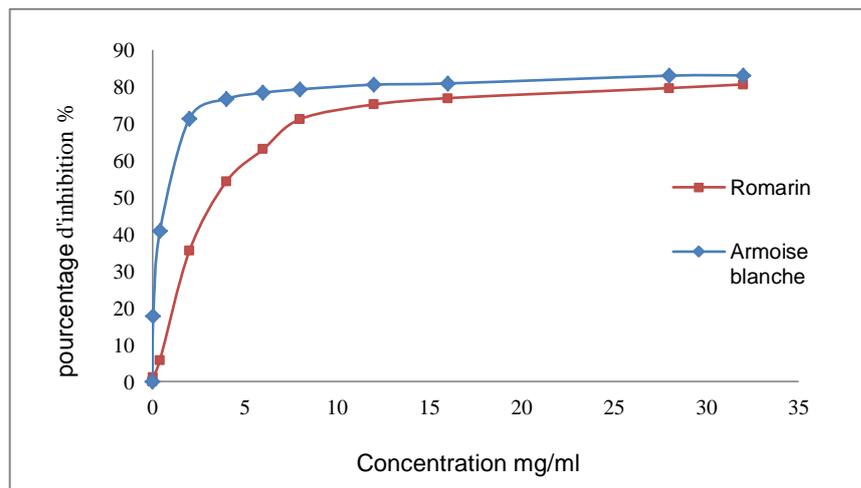


Figure 3.8: Variation de pourcentage d'inhibition pour les huiles essentielles.

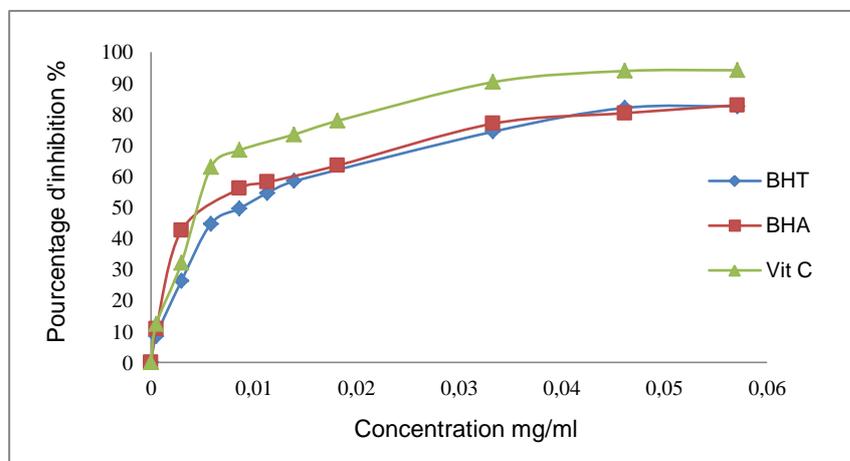


Figure 3.9: Variation de pourcentage d'inhibition pour les standards.

L'effet anti-radicalaire des huiles essentielles sur le DPPH• est dû à leur pouvoir donneur d'un atome d'hydrogène [482]. L'atome H transférée sur le radical libre DPPH• permet alors sa transformation en une molécule stable DPPH, ceci provoque une diminution de la concentration du radical libre et également l'absorbance au cours du temps de réaction jusqu'à l'épuisement de la capacité d'antioxydant donneur d'hydrogène [483,332].

PEKKARINEN et *al.* [484] & KOLEVA et *al.* [485] ont rapporté que la polarité du substrat n'affecte pas l'activité de balayage du DPPH•, car la méthode de piégeage du radical libre DPPH• est indépendante de la polarité du substrat [486].

Afin de s'affranchir de l'influence de la concentration, la réactivité est estimée par la concentration effective  $EC_{50}$  de l'antioxydant [310].

#### ❖ Détermination de la valeur $EC_{50}$

L'indice  $EC_{50}$  correspond à une réduction de 50% de l'activité du DPPH• dans le milieu réactionnel. il est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé. D'autant elle est plus élevée que son  $EC_{50}$  est petite [24, 310].

Les valeurs  $EC_{50}$  des huiles essentielles des deux plantes étudiées (*Rosmarinus officinalis* L. & *Artemisia herba alba* Asso.) et des antioxydants standards sont déterminées graphiquement à partir des régressions linéaires (Figure 3.10).

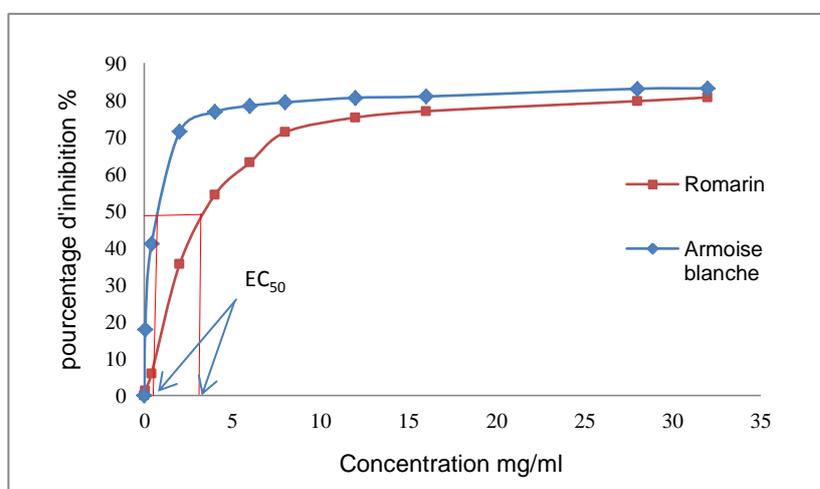


Figure 3.10 : Détermination graphique d' $EC_{50}$  des huiles essentielles.

Les valeurs  $EC_{50}$  déterminées en mg/ml des deux huiles essentielles (*Rosmarinus officinalis* L. et *Artemisia herba alba* Asso) et des antioxydants standards sont représentées dans la figure 3.11.

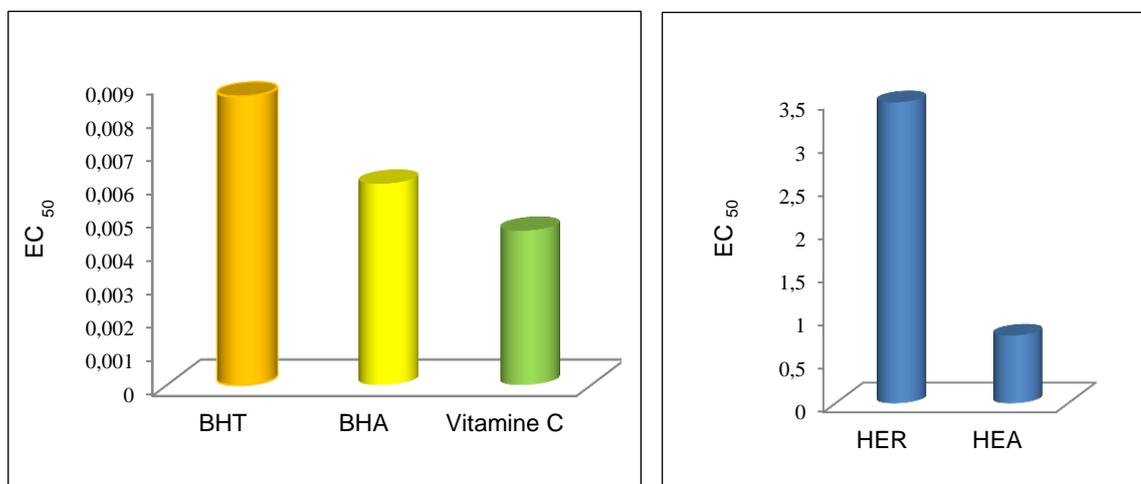


Figure 3.11 : Valeurs d' $EC_{50}$  pour les antioxydants synthétiques et les huiles essentielles.

Selon les résultats enregistrés, les huiles essentielles testées sont dotées d'un pouvoir antioxydant modéré relativement faible par rapport aux antioxydants standards utilisés (Vitamine C, BHT, BHA).

HUSSAIN, [185] a attribué l'activité antioxydante des huiles essentielles à la présence des groupes d'hydroxyle dans la structure chimique de leurs composés.

L'huile essentielle de l'armoise blanche peut ramener le radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH $\cdot$ ) au diphenylpicrylhydrazine (DPPH,H) stable avec un  $EC_{50}$  de  $0.7838 \pm 0.08$  mg/ml montrant une activité antioxydante et une capacité à piéger le radical libre DPPH plus élevée que celles de l'huile essentielle de romarin avec un  $EC_{50}$  de  $3.4838 \pm 0.42$  mg/ml.

L'activité antioxydante d'une huile essentielle est principalement attribuée à ses composés majoritaires, bien que l'effet synergique ou antagoniste d'un composé mineur doive être pris en considération [168, 487]. La présence de carvacrol même à faible concentration (0.7%) peut expliquer l'activité de piégeage du radical DPPH de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* Asso.[332].

Il semble que l'antioxydant le plus efficace est la vitamine C (Acide ascorbique) avec un  $EC_{50}$  de  $0.0046 \pm 0.0003$  mg/ml. BOUGANDOURA et BENDIMERAD [329] ont démontré que les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique et tocophérol (Vitamine E) réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène.

Le test au DPPH• n'est pas quantitatif, il permet de comparer différents extraits entre eux selon leur capacité à piéger le DPPH• et ainsi, d'apprécier les variations qualitatives des composés phénoliques [310].

Les tests au DPPH• fournis dans la littérature sont basés sur le même principe que celui décrit par BRAND-WILLIAMS et *al.* [333], mais les protocoles analytiques diffèrent dans plusieurs paramètres [310, 334].

Toutefois il est important de noter que l'utilisation de différents protocoles de mesure et de différents indices d'évaluation de l'activité antioxydante réduit la fiabilité d'une comparaison des valeurs [310].

Cependant, l'efficacité antioxydante des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. et d'*Artemisia herba alba* Asso a été signalé dans de nombreux travaux antérieurs (Tableau 3.16).

TEPE et *al.* [336], SHARIFIRAR et *al.* [326] et AKROUT et *al.* [398] ont attribué cette différence dans les valeurs d'  $EC_{50}$  à plusieurs facteurs:

- La composition chimique de l'huile essentielle,
- Le protocole expérimental utilisé comprenait:
  - ✓ Le rapport entre la quantité de l'huile essentielle et la quantité de la solution DPPH utilisée dans le mélange,
  - ✓ La concentration de la solution DPPH
  - ✓ Le temps d'incubation,
  - ✓ La façon d'exprimer l'unité  $EC_{50}$ .

Ce qui ne rend pas fiable la comparaison directe des valeurs  $EC_{50}$  rapportés dans divers travaux. En effet, même pour les antioxydants de synthèse utilisés, tels que l'acide ascorbique et le BHT, les valeurs  $EC_{50}$  rapportées sont différents selon le protocole expérimental utilisé.

Tableau 3.16: Quelques travaux antérieurs sur l'efficacité antioxydante de l'armoise blanche et de romarin.

| Paramètres                        | V échantillon | V DPPH                     | $\lambda$ (nm) | T (min) | Equation  | solvant         | EC <sub>50</sub>        | Auteurs |
|-----------------------------------|---------------|----------------------------|----------------|---------|---|-----------------|-------------------------|---------|
| <i>Artemisia herba alba</i> Asso. | 500 $\mu$ l   | 125 $\mu$ l<br>0.02%(w :v) | 517            | 60      | $I\%$<br>$= 100 \times [A \text{ blanc} - A \text{ échantillon} / A \text{ blanc}]$ | Ethanol<br>99%  | 242<br>$\mu$ g/ml       | [24]    |
|                                   | 500 $\mu$ l   | 125 $\mu$ l<br>0.2mM       | 517            | 60      | $I\%$<br>$= 100 \times [A \text{ blanc} - A \text{ échantillon} / A \text{ blanc}]$ | Methanol<br>99% | 0.14<br>mg/ml           | [30]    |
| <i>Rosmarinus officinalis</i> L.  | 50 $\mu$ l    | 1ml<br>0.1mM               | 517            | 30      | $I\%$<br>$= 100 \times [A \text{ blanc} - A \text{ échantillon} / A \text{ blanc}]$ | Ethanol<br>99%  | 29.56%                  | [409]   |
|                                   | 1ml           | 1ml<br>0.135mM             | 517            | 30      | $I\%$<br>$= 100 \times [A \text{ blanc} - A \text{ échantillon} / A \text{ blanc}]$ | Methanol<br>99% | 0.34<br>mg/ml<br>(SFME) | [150]   |
|                                   | 1ml           | 1ml<br>0.135mM             | 517            | 30      | $I\%$<br>$= 100 \times [A \text{ blanc} - A \text{ échantillon} / A \text{ blanc}]$ | Methanol<br>99% | 0.46<br>mg/ml<br>(HD)   | [150]   |

### ❖ Cinétique de la réaction.

Le suivi de la cinétique de la réaction de réduction du DPPH en solution dans le temps nous renseigne sur l'efficacité et la puissance de l'agent antioxydant [531].

La cinétique de réduction du radical libre DPPH obtenue pour la concentration  $EC_{50}$  des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. et d'*Artemisia herba alba* Asso (Figure 3.12).

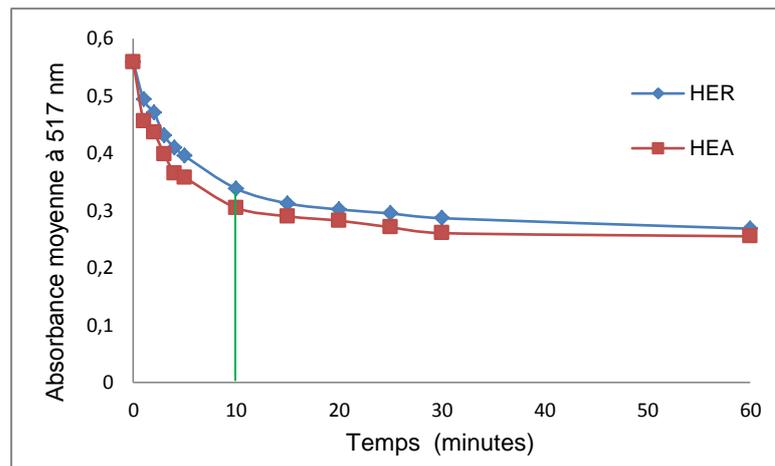


Figure 3.12 : Cinétique de réduction du radical libre DPPH obtenue pour la concentration  $EC_{50}$  des huiles essentielles.

Pour les deux échantillons examinés, la réaction est biphasée, avec une baisse rapide dans l'absorbance dans les premières minutes, suivies d'une étape plus lente, jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint, nous distinguons alors deux zones :

- Zone à forte cinétique de piégeage du radical observée au bout des dix premières minutes pour l'huile essentielle de l'armoise blanche et au bout de 15 minutes pour l'huile essentielle de romarin.
- Zone à faible cinétique de piégeage du radical DPPH ou zone de tendance vers l'équilibre constatée.

Pour l'acide ascorbique, la réaction est rapide et instantanée. Le changement de couleur, qui exprime le passage du DPPH de forme radical (DPPH•) à la forme réduite stable non radical (DPPH-H) se fait dans un laps de temps extrêmement court où l'état d'équilibre est atteint à 2 min et la réduction est presque complète. Alors pour les huiles essentielles des deux plantes étudiées, la réaction est lente et nécessite un temps prolongé pour atteindre l'état d'équilibre (10 min à 15 min respectivement).

D'après HUANG *et al.* [488] et POPOVICI *et al.* [310] le piégeage des radicaux libres par des antioxydants est tributaire de deux types de mécanismes:

- Cinétique rapide : la libération de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle des composés phénoliques de l'huile essentielle.
- Cinétique lente : la libération d'un électron.

Notons que la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle de carvacrol présent dans l'huile essentielle de l'armoise blanche. En présence d'un radical libre (DPPH•), l'atome H est transféré sur ce dernier alors transformé en une molécule stable DPPH, ceci provoque une diminution de la concentration du radical libre et également l'absorbance au cours du temps de réaction jusqu'à l'épuisement de la capacité d'antioxydant donneur d'hydrogène [383,332].

#### ❖ Détermination de $TEC_{50}$ .

Nous avons choisi l'état d'équilibre comme période de mesure où il s'avère que la réaction ne progresse pas au-delà. Le temps à l'état d'équilibre dépend de la réactivité des antioxydants.

Le paramètre  $TEC_{50}$  est défini comme le temps atteint à l'équilibre avec une concentration d'antioxydant égale à  $EC_{50}$ . Ce temps est déterminé graphiquement (Figures 3.13, 3.14).

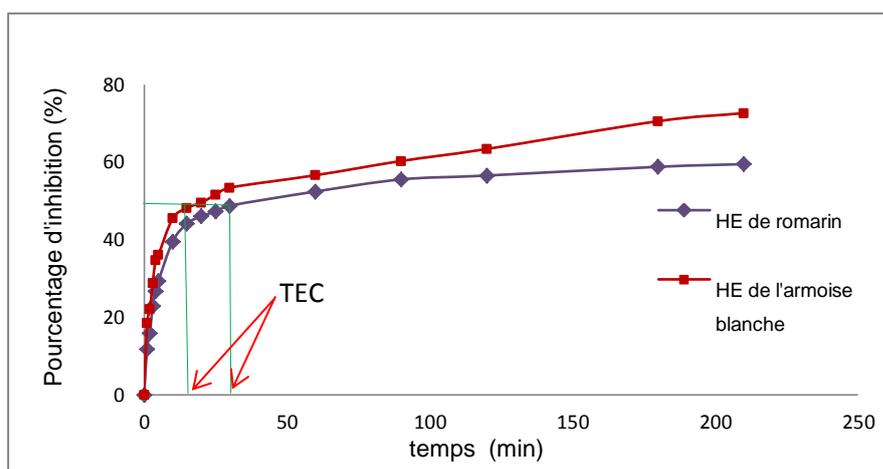


Figure 3.13 : Détermination graphique de TEC des huiles essentielles.

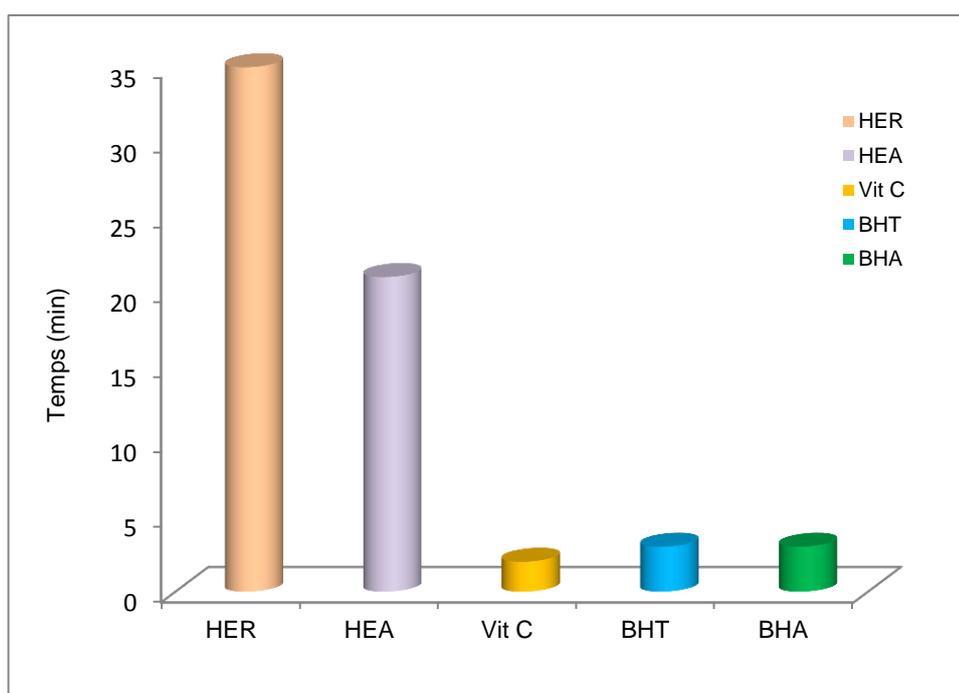


Figure 3.14: Les valeurs de TEC<sub>50</sub>

Les résultats obtenus (Figure 3.11) et l'estimation de la TEC<sub>50</sub> donnée par BRAND-WILLIAMS et *al.* [332], SCHERER et GODOY [323] & POPOVICI et *al.* [308] montrent que les antioxydants synthétiques (vitamine C, BHT, BHA) réagissent d'une façon plus rapide avec DPPH•.

Ils ont besoin seulement de  $2 \pm 1$  min,  $3 \pm 1$  min et  $3 \pm 1$  min pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Alors que les huiles essentielles de l'armoise blanche et le romarin réagissent d'une façon intermédiaire à lente avec un TEC<sub>50</sub> de  $21 \pm 1$  mn et  $35 \pm 1$  mn respectivement.

Pour caractériser l'efficacité de ces antioxydants, on calcule l'EA (paramètre d'efficacité anti-radicalaire).

❖ **Paramètre d'efficacité antiradicalaire :**

Un nouveau paramètre a été défini, l'efficacité antioxydante, qui combine les deux paramètres ( $IC_{50}$  et  $TEC_{50}$ ) afin de caractériser facilement le comportement d'une substance en tant qu'antioxydant.

Les paramètres de calcul de l'activité antioxydante sont résumés dans le tableau 3.17.

Tableau 3.17 : Paramètres de calcul de l'activité antioxydante.

|       | $EC_{50}$ (mg/ml) | $TEC_{50}$ (min) | AE (ml/mg*min) |
|-------|-------------------|------------------|----------------|
| HEA   | 0.7838± 0.08      | 21±1mn           | 0.06075±0.001  |
| HER   | 3.4838±0.42       | 35±1mn           | 0.0082±0.0005  |
| BHT   | 0.0086±0.0005     | 3±1mn            | 348.83± 5.87   |
| BHA   | 0.006±0.0001      | 3±1mn            | 500.00± 8.54   |
| Vit C | 0.0046±0.0003     | 2±1mn            | 108.69± 1.69   |

L'activité anti-radicalaire suivant la classification proposée par SANCHEZ MORENO *et al.* [335] et POPOVICI *et al.* [310] est élevée pour l'huile essentielle de romarin et très élevée pour l'huile essentielle de l'armoise blanche et les antioxydants synthétiques testés

En comparant les résultats obtenus, on classe l'activité antioxydante suivant l'ordre :

|  |
|--|
| Acide ascorbique >BHA> BHT> HE de l'Armoise blanche > HE de Romarin. |
|--|

De nombreuses recherches ont montré une corrélation positive entre les activités antiradicalaires et les composés phénoliques [489-493].

L'activité antioxydante attribuée aux polyphénols s'expliquent en partie par leur capacité à capturer des radicaux libres [489].

LOPEZ - LUTZ et *al.* [494], MIGHRI et *al.* [31], RIAHI et *al.* [495], KADRI et *al.* [24] & ABOU EL-HAMD et *al.* [28] ont signalé que l'activité antioxydante faible des huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* Asso peut être liée à la domination de composés non- phénolique.

Des résultats similaires ont été trouvés avec des huiles essentielles d'autres espèces d'*Artemisia* comme *A. absinthium* , *A. biennis* , *A. Cana* , *A. dracunculus* , *A. frigida* , *A.* et *A. ludoviciana longifolia* , qui sont dominées par des composants non – phénoliques [31, 494].

L'activité antioxydante faible de l'huile essentielle de romarin *Rosmarinus officinalis* L. comparativement à d'autres huiles connus par leur activité antioxydante importante telles que les huiles essentielles d'Aragon, le thym et de girofle, est due à l'absence des composés phénoliques tels que le thymol, le carvacrol et l'eugénol [486, 496, 497, 398].

Selon RUBERTO et BARATTA [498], OKOH et *al.* [150], ERDOGAN-ORHAN et *al.* [499], GHEDADBA et *al.* [500] & KADRI et *al.* [24], les monoterpènes oxygénés et le mélange de monoterpènes et des sesquiterpènes hydrocarbures sont principalement responsables de potentiel antioxydant des huiles essentielles par leur capacité d'agir comme donneurs d'atomes d'hydrogènes ou d'électrons, d'où la transformation réductive de DPPH• en DPPH-H, et par conséquent la formation de la coloration jaune.

La capacité de balayage de radical libre DPPH par l'huile essentielle de romarin et d'armoise blanche peut être attribuée à la présence de certaines composants qui ont une activité anti-oxydante, notamment le 1,8-cinéole, l' $\alpha$  -pinène, le  $\beta$  -pinène, le camphre et l' $\alpha/\beta$  - thujone [249, 268, 501, 24, 360].

Dans des études antérieures, GACHKAR et *al.* [259] et RUBERTO et BARATTA [498] ont démontré que les huiles avec une prédominance monoterpénique ont montré une activité assez modeste.

Les principaux composants contenus dans les huiles essentielles d'armoise blanche et de romarin (1,8-cinéole, le camphre, la verbénone, le bornéol, le  $\alpha$ -pinène, le camphène) sont connus pour présenter une faible activité anti-oxydante [496, 398, 498].

Cette constatation est en contradiction avec les travaux de TEPE et *al.* [336], où ils ont démontré une grande activité antioxydante des huiles essentielles contenant des monoterpènes et / ou des sesquiterpènes oxygénés. Ainsi une corrélation existe entre l'activité antioxydante des essences et la teneur de monoterpènes oxygénés [502, 503].

BOZIN et *al.* [249] et KADRI et *al.* [24] ont signalé que la forte activité de l'huile essentielle de l'armoise blanche est essentiellement accordée à la présence de teneurs élevées de monoterpènes oxygénés et des mélanges de monoterpènes et / ou des sesquiterpènes hydrocarbonés.

Les monoterpènes oxygénés, probablement monoterpènes cétones (camphre) peuvent avoir la plus grande contribution à la capacité antioxydante des huiles essentielles de romarin [504].

ZAOUALI et *al.* [153] et EL- MASSRY et *al.* [505] ont attribué la forte activité de balayage observée chez deux variétés de *Rosmarinus officinalis* L. (*typicus* & *trogodytorum*) et une espèce d'armoise *Artemisia judaica* en partie à la teneur élevée en camphre enregistrée dans leurs huiles essentielles qui est selon BOURKHISS et *al.* [291] et BARKAT et LAIB [332] doté d'un pouvoir antioxydant considérable.

### **1. Méthode de Blanchiment du $\beta$ -carotène :**

Les activités inhibitrices de peroxydation des lipides par les huiles essentielles ont été évaluées par l'essai du blanchiment du  $\beta$ -carotène, fondé sur la perte de la couleur jaune de  $\beta$ -carotène, due à sa réaction aux radicaux qui sont constitués par oxydation d'acide linoléique dans une émulsion [24, 500]. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchiment du  $\beta$ -carotène [486, 482, 506, 507]. Plus l'efficacité d'un antioxydant est grande, plus la décoloration du  $\beta$ -carotène sera lente [469, 508]

Cette méthode est employée couramment parce que le  $\beta$ -carotène montre une activité biologique forte et est un composé physiologique important [24]. De ce fait, il est employé dans l'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles des feuilles de Romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) et d'Armoise blanche (*Artemisia herba alba* Asso.).

Les résultats de l'étude de la cinétique de blanchiment du  $\beta$ -carotène en absence et en présence des huiles essentielles de Romarin (*Rosmarinus officinalis* L.), d'Armoise blanche (*Artemisia herba alba* Asso) et des antioxydants synthétiques (BHA, BHT et vit C) montrent que les courbes ont la même allure, ce qui implique la même interprétation (Figure 3.15):

- au temps ( $t_0$ ) : la densité optique des huiles essentielles, les standards et le contrôle négatif, étant presque la même et présentant un seuil d'absorbance d'environ (0.75). Nous pouvons l'expliquer par le fait qu'à ce moment-là il n'y a aucun radical libre qui a été formé dans le milieu réactionnel, par conséquent le  $\beta$ -carotène reste hautement insaturé, la couleur jaune confère alors une absorbance maximale, ce temps peut être nommé « temps de repos ».
- au temps ( $t : 2 \text{ h}$ ): l'absorbance commence à diminuer progressivement pour les deux huiles essentielles étudiées, les standards et le contrôle (-), ce qui indique sans doute le début de la formation des radicaux libres dans le milieu réactionnel généré par l'acide linoléique, on nomme ce temps « temps de génération »
- Au-delà de 2h ( $2\text{h} < t \leq 48\text{h}$ ) : l'étude de cinétique de blanchiment du  $\beta$ -carotène montre que celui-ci diminue graduellement avec le temps, pour atteindre un état stationnaire au bout de 48 heures, étant donné que le nombre des radicaux libres devient important. Après ce temps-là, il reste constant, ce qui montre que toutes les doubles liaisons présentes dans le  $\beta$ -carotène sont dégradées, ce qui s'achève à l'épuisement irréversible de la coloration jaune par la transformation en une couleur blanche, c'est donc le blanchiment total du  $\beta$ -carotène, ce temps est dit « temps d'épuisement ».

Par ailleurs, on remarque que la courbe (Figure 3.15) qui correspond au contrôle (-) diminue d'une façon rapide, car il n'y a aucun antioxydant qui puisse inhiber ou diminuer l'oxydation du  $\beta$ -carotène, ce qui facilite l'action des radicaux libres et que les huiles essentielles semblent inhiber d'une manière efficace ( $AAR_{HER}= 82.23\%$  et  $AAR_{HEA}= 80.32\%$ ) l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du  $\beta$ -carotène par rapport au contrôle négatif et le BHT (Figures 3.15 et 3.16),.

La Vitamine C (un composé polaire) est avérée un antioxydant modeste (79.21%), ce résultat est probablement dû à la haute spécificité de l'essai du blanchissement du  $\beta$ - carotène pour les composés lipophiles [259].

Ce phénomène pourrait s'expliquer par le paradoxe des phénomènes polaires comme il est décrit par FRANKEL *et al.* [509] et KOLEVA *et al.* [485] Etant donné que le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène est similaire à un système d'émulsion de lipides dans l'eau.

FRANKEL et MEYER [510] et BOUZID *et al.* [511] ont supposé que les antioxydants apolaires (Les huiles essentielles étudiées) exercent des propriétés antioxydantes plus importantes car ils sont concentrés au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi de prévenir la formation de radicaux lipidiques et l'oxydation du  $\beta$ -carotène. Alors que les antioxydants polaires (vitamine C) restent dilués dans la phase aqueuse et sont ainsi moins efficaces dans la protection des lipides.

Un extrait qui retarde ou inhibe le blanchissement du  $\beta$ -carotène peut être décrit comme un antioxydant primaire [511, 512].

Un antioxydant primaire est défini comme étant un composé chimique qui retarde ou empêche l'étape d'initiation et interrompt l'étape de propagation de la réaction d'oxydation des lipides [513, 514].

L'antioxydant cède un radical hydrogène, qui peut être un transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, par un transfert de protons, pour donner un intermédiaire radical stabilisé de par ses structures mésomères conjuguées, arrêtant de ce fait la réaction en chaîne de propagation pendant le processus d'oxydation des lipides [335]. De ce fait, les huiles essentielles de romarin et d'armoise blanche sont considérées comme antioxydants primaires.

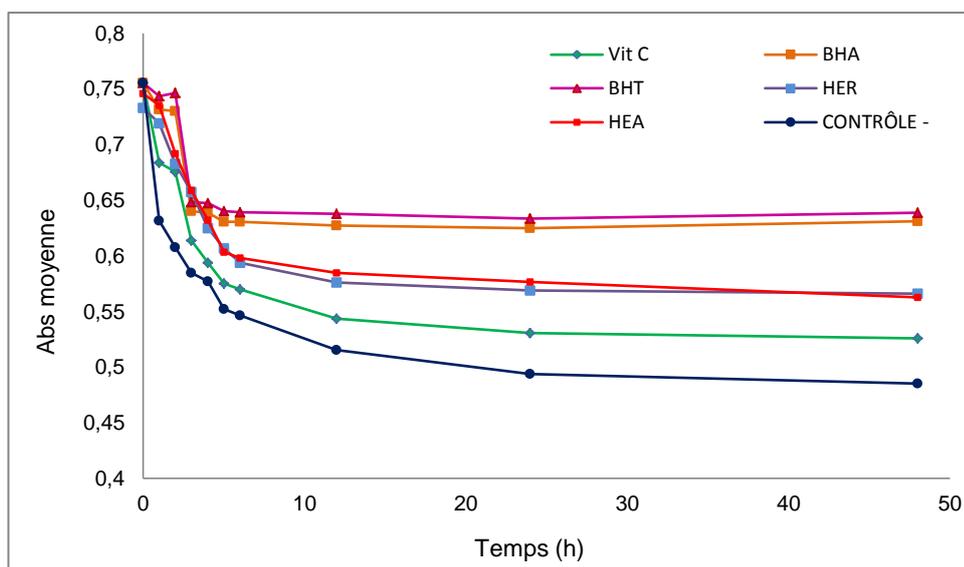


Figure 3.15 : Cinétique de blanchiment du  $\beta$ -carotène en présence des huiles essentielles et des antioxydants standards.

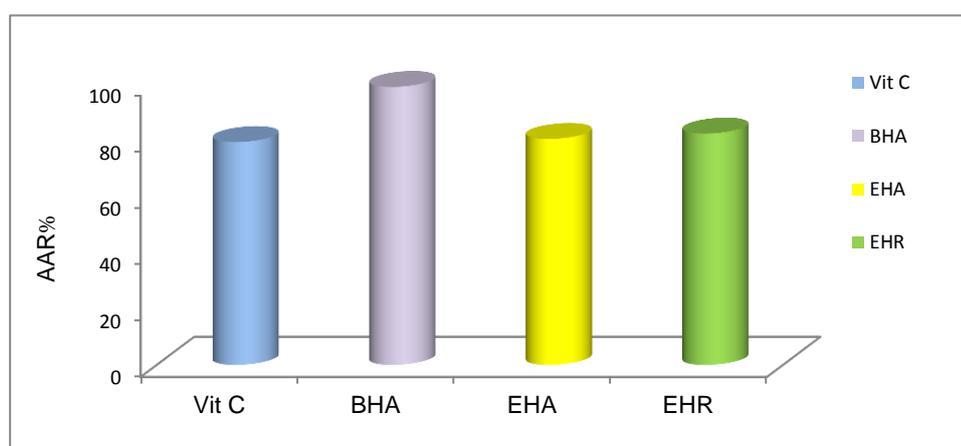


Figure 3.16 : Activité antioxydante relative (AAR%) des huiles essentielles et des antioxydants standards après 48h.

Nous pouvons déduire que la méthode de blanchissement du  $\beta$ -carotène serait particulièrement utile pour des investigations des antioxydants lipophiles et serait appropriée pour étudier l'activité antioxydante des huiles essentielles.

En revanche, si des composés polaires (acide ascorbique) sont examinés seulement par cette méthode, ils seraient considérés en tant qu'antioxydants faibles.

La plupart des activités antioxydantes non enzymatiques telles que le piégeage du radical libre et l'inhibition de la peroxydation est mis en place par la réaction rédox [515].

#### ❖ Méthode FRAP (Ferric reducing antioxidant power) :

La présence des antioxydants dans les huiles essentielles de romarin et d'armoise blanche a été évaluée par le test FRAP dont la puissance de réduction est l'un des mécanismes antioxydants [344, 334, 516].

L'activité antioxydante est développée par la mesure de la capacité des antioxydants à réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) présent dans le complexe  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). En effet, le  $\text{Fe}^{3+}$  participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. Par conséquent,  $\text{Fe}^{2+}$  peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700nm [489, 334, 344, 329].

Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés et par conséquent l'activité antioxydante [344]. En d'autre terme, le système  $\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  confère à la méthode la sensibilité pour la détermination « semiquantitative » des concentrations des polyphénols, qui participent à la réaction rédox [329, 517]. Les résultats de l'activité antioxydante dosée par le test de FRAP des huiles essentielles et des antioxydants de synthèse (BHT, BHA, Vit C) sont représentés dans les figures 3.17, 3.18 et 3.19 :

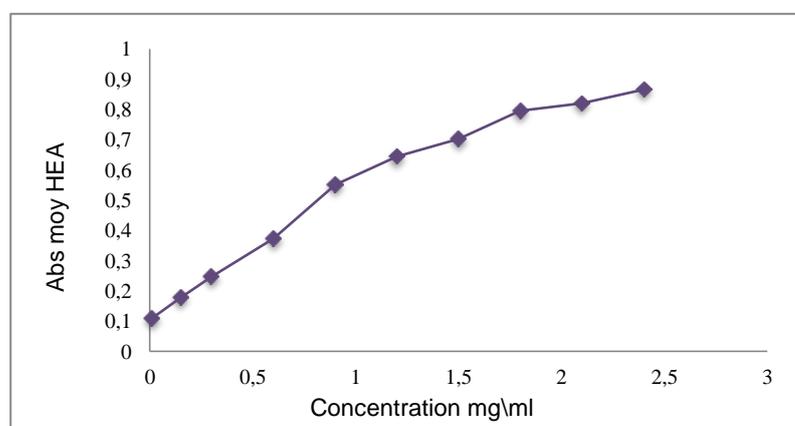


Figure 3.17 : Pouvoir réducteur de l'huile essentielle de l'armoise blanche

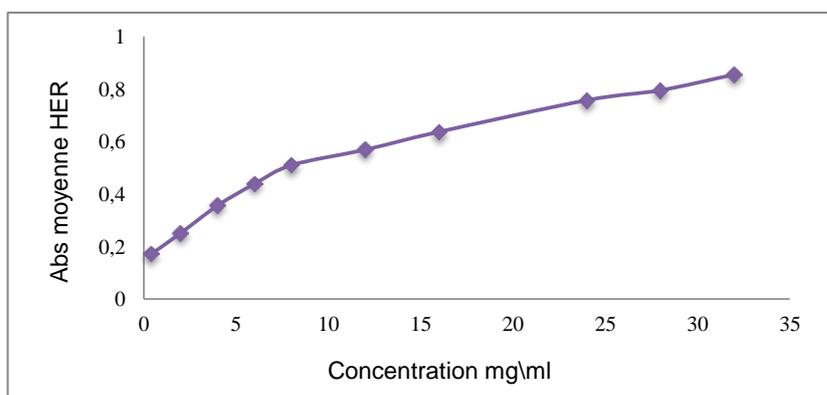


Figure 3.18 : Pouvoir réducteur de l'huile essentielle de romarin.

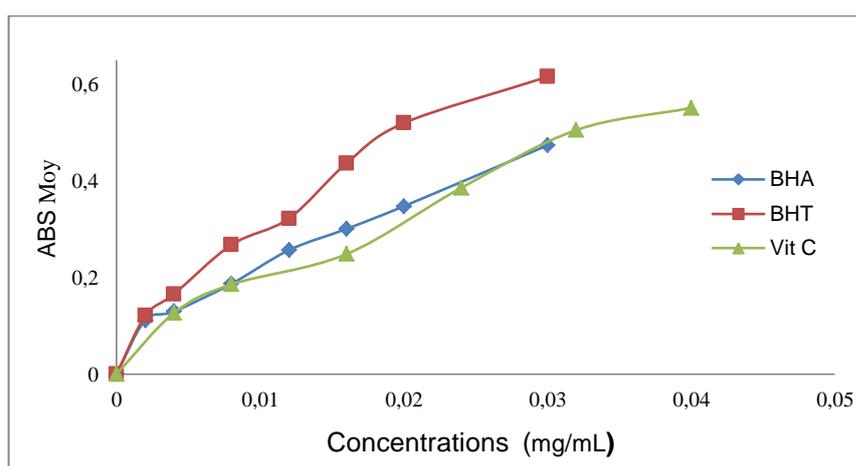


Figure 3.19 : Pouvoir réducteur des antioxydants de référence.

Le pouvoir réducteur des huiles essentielles des plantes étudiées est dose dépendante (concentration dépendante). A la concentration de 0,5 mg/ml, le pouvoir réducteur de l'huile essentielle de l'*Artemisia herba alba* Asso est largement supérieur ( $DO=0,3304$ ) par rapport à l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. ( $DO=0,1262$ ), mais nettement inférieur à celui de l'acide ascorbique qui présente une densité optique de 0,7484 à la concentration 0,04 mg/ml seulement.

En générale, le potentiel réducteur des extraits végétaux est dû à la présence de molécules capables de donner des électrons qui peuvent réagir avec les radicaux libres et les convertir en produits stables, terminant de ce fait les réaction en chaines parmi lesquelles les polyphénols [518].

En outre, une forte corrélation entre la teneur totale en composés phénoliques et l'activité antioxydante déterminée par le test FRAP [519].

Le pouvoir réducteur des deux espèces étudiées est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques (la présence de carvacrol même à faible concentration dans l'huile essentielle de l'armoise blanche) qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants [329, 520].

Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle [329, 497].

Beaucoup de travaux ont indiqué qu'il y a une corrélation directe entre les activités antioxydantes et la puissance de réduction de quelques composants de plantes [522].

Les composés phénoliques et terpéniques contenus dans les huiles essentielles sont associés avec leur activité antioxydante, principalement en raison de leurs propriétés redox exercées par différents mécanismes : piégeage du radical libre, des donneurs d'hydrogène ou d'électrons, chélation des métaux de transition [559, 575].

Les propriétés redox, principales raison de l'activité antioxydante des huiles essentielles, jouent un rôle important dans la neutralisation des radicaux libres ou en décomposition des peroxydes [512].

Les résultats basés sur les trois méthodes de mesure de la capacité antioxydante montrent que les huiles essentielles testées possèdent des propriétés de piégeage de radicaux libres, Notons que l'huile essentielle de l'armoise est plus efficace que celle de romarin. Ce qui est confirmé par AOUADI et *al.* [523]. Nous pouvons expliquer ce résultat par la présence de carvacrol même à faible concentration dans l'huile essentielle de l'armoise blanche.

Il semble qu'il y avait une très forte corrélation positive entre l'activité antioxydante des huiles et leur contenu du carvacrol. Ces résultats sont cohérents avec l'étroite relation entre la teneur en carvacrol et le potentiel antioxydant élevé rapporté par de nombreux auteurs [486, 524, 525].

KARADAG et al. [526], TABART et al. [527], GHIABA et al. [528] & GACHKAR et al. [259] ont attribué la variation de l'activité antioxydante des huiles essentielles à la méthode d'évaluation.

En effet la complexité chimique des huiles essentielles, souvent un mélange de composés avec des groupes fonctionnels différents ; la polarité et le comportement de produits chimiques peuvent mener aux résultats dispersés, selon la méthode utilisée [409, 529].

PUKALSKAS et al. [530] & KADRI et al. [531] soulignent que L'activité antioxydante dépend de la nature hydrosoluble ou liposoluble de l'antioxydant. Ce qui explique le fait que les huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. et d'*Artemisia herba alba* Assso ont une activité antioxydante modérée dans le test de piégeage de radical libre DPPH et le test FRAP, en comparaison avec le test de blanchissement de  $\beta$ -carotène, où elles ont montré des activités antioxydantes importantes.

Aussi, les différences enregistrées de l'activité antioxydante peuvent être en rapport avec la méthode utilisée pour extraire les composés antioxydants. En effet, l'huile essentielle de romarin extraite par micro-ondes a montré une activité supérieure à celle obtenue par hydrodistillation classique. Cela est probablement dû à des proportions plus élevées de composés oxygénés dans l'huile extraite par micro-ondes [150].

Selon DERWICH et al. [85] & BARRA et al. [465], l'activité antioxydante peut aussi varier en fonction de la composition chimique des huiles essentielles.

Selon WANG et al. [154], Il est très difficile d'attribuer les activités biologiques (Activité antioxydante) d'une huile essentielle total à un ou quelques composés actifs, car une huile essentielle contient toujours un mélange de différents composés chimiques. En Outre les composés majeurs et même mineurs peuvent apporter une contribution significative à l'activité de l'huile [472, 495, 30].

Parallèlement d'autres travaux, ont montré que ce n'est pas uniquement les composés majoritaires des huiles essentielles qui sont responsables de cette activité antioxydante, mais il peut y avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace vis à-vis des radicaux libres [532, 533].

La comparaison in vitro de l'activité antioxydante d'huile essentielle du romarin avec celles de ses principaux composants (1,8-cinéole,  $\alpha$  - pinène et  $\beta$ -pinène) au moyen de l'essai au DPPH et l'essai de blanchissement du  $\beta$ -carotène, a montré que l'huile essentielle était plus active que ses composants dans les deux modèles d'essai [154].

L'activité antioxydante des antioxydants naturels peut être due à divers mécanismes, tels que l'inhibition de la peroxydation lipidique en un stade précoce par l'activité scavenger des radicaux peroxydes et de l'interruption d'une chaîne de réactions radicalaires par le don d'atomes d'hydrogène ou d'électrons, le piégeage des radicaux libres et la capacité de réduction, qui convertissent les radicaux libres à des produits finaux plus stables [184].

## CONCLUSION

L'Algérie, de part sa position géographique, présente une large gamme d'étages bioclimatiques, induisant une biodiversité immense de plantes aromatiques et médicinales qui demandent d'être exploitées, afin de déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles pourront répondre aux différents problèmes de la santé et d'être une alternative des pesticides synthétiques.

Dans ce cadre, deux plantes ont fait l'objet de notre étude phytochimique et des activités biologiques : l'armoise blanche (*Artemisia herba-alba* Asso.) et le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.), dont les feuilles ont été récoltées dans la région de Djelfa (zone semi\_aride), le mois d'Avril 2013. Le rendement moyen en huiles essentielles exprimé en millilitre par rapport à 100 g de la matière sèche est de l'ordre de  $0,80 \pm 0,15\%$  et de  $1,20 \pm 0,12\%$ , respectivement, ce dernier peut être rentable à l'échelle industrielle.

La composition chimique des huiles essentielles étudiées a été identifiée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM), dont les composés majoritaires sont : le camphre (39,5%), le chrysanthénone (10,38%) et le 1,8-cinéole (8,6%) pour l'huile essentielle de l'armoise blanche. Bien que, l'huile essentielle du romarin a été caractérisée comme ayant un important contenu de camphre (39,7%) suivi par le 1,8-cinéole (18,26%), l' $\alpha$ -pinène (13,19%) et le camphène (9,51%).

Quant au contrôle physico-chimique des différents paramètres à savoir : l'indice de réfraction, l'indice d'acide, la densité relative et le pouvoir rotatoire a montré que les huiles essentielles des deux espèces étudiées répondent aux normes internationales.

L'activité antimicrobienne vis-à-vis des souches testées : *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, et *Candida albicans* révèle une sensibilité marquée aux huiles essentielles à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* qui s'est montrée plus résistante.

Une bonne activité biopesticide des huiles essentielles testées s'est évaluée vis-à-vis de deux champignons à savoir : *Aspergillus niger* et *Fusarium oxysporum*.

L'activité antioxydante a été évaluée par trois tests : le test de piègeage du radical diphénylpicrylhydrazyl (DPPH), le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène et la détermination du pouvoir réducteur (FRAP). Les résultats montrent que les huiles essentielles testées ont activité antioxydante modérée comparées aux antioxydants standards : butylhydroxytoluène (BHT), butylhydroxyanisole (BHA) et vitamine C.

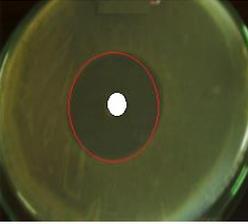
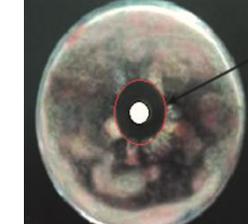
Parallèlement aux travaux, ce n'est pas uniquement les composés majoritaires des huiles essentielles qui sont responsables de ces activités biologiques, mais il peut y avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace.

En effet, il ressort du présent travail que *l'Artemisia herba-alba* Asso. et *Rosmarinus officinalis* L. de la région de Djelfa sont des plantes très intéressantes et riches en composés secondaires. Les résultats obtenus sont remarquables, car ils ouvrent dans le futur des perspectives, en orientant les recherches scientifiques vers la réalisation des études approfondies et complémentaires des activités biologiques des plantes étudiées.

A cet effet, on propose de réaliser des tests en synergie avec des antibiotiques de synthèse ou d'autres huiles essentielles afin d'inhiber l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* qui semblait résistante à l'action des huiles essentielles, d'ouvrir des pistes pour l'isolement et la caractérisation des principes actifs responsables de ses activités, la mise en évidence de leur mécanisme d'action in vivo et de montrer aussi leur importance et la possibilité de leur exploitation dans certains domaines : pharmaceutique, cosmétique, insecticide et alimentaire.

## APPENDICE A

### LISTE DES FIGURES

|   |   |  |   |
|---|---|--|---|
|  |  |  |  |
| <i>K. pneumoniae</i>  | <i>P. aeruginosa.</i>   | E. coli.   | <i>B.subtilis.</i>  |
|  |  |  |  |
| <i>S. aureus.</i>   | <i>C.albicans.</i>  | F.oxysporum.   | <i>A. niger</i>   |

**Figure A.1 :** Résultats de l'effet antimicrobien de l'huile essentielle de l'armoise blanche et du Romarin.



**Figure A.2 :** Virage de la couleur en présence de DPPH.

**APPENDICE B**  
**MATERIEL NON BIOLOGIQUE**

| <b>VERRERIES</b> | <b>APPAREILS</b>                   | <b>Réactifs</b>                 |
|------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| Bocaux.          | Broyeur.                           | Mg So <sub>4</sub> .            |
| Capsules.        | Balance analytique.                | NaCl.                           |
| Ballon.          | Etuve.                             | NaOH (0.1 M).                   |
| Flacons.         | Dessiccateur.                      | Ethanol.                        |
| Entonnoir.       | Clevenger.                         | Ether.                          |
| Flacons teintés. | Chauffe ballon.                    | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . |
| Béchers.         | Réfractomètre.                     | DMSO.                           |
| Burette.         | Pycnomètre.                        | DPPH.                           |
| Tubes à essai.   | Balance hydrostatique.             | BHA.                            |
| Boîtes de pétri. | Polarimètre.                       | BHT.                            |
| Seringue.        | CPG/MS.                            | Vitamine C.                     |
|                  | Spectrophotomètre<br>(UV-visible). | β-carotène.                     |
|                  | Rotavapeur sous vide.              | Chloroforme.                    |
|                  | Bain-Marie.                        | Acide linoléique.               |
|                  | Centrifugeuse.                     | Tween 40.                       |
|                  | Vortex.                            | Méthanol.                       |
|                  |                                    | Tampon phosphate 0.2M, PH=6.6). |
|                  |                                    | Acide trichloracétique.         |

## APPENDICE C

### LISTE DES GRAPHIQUE

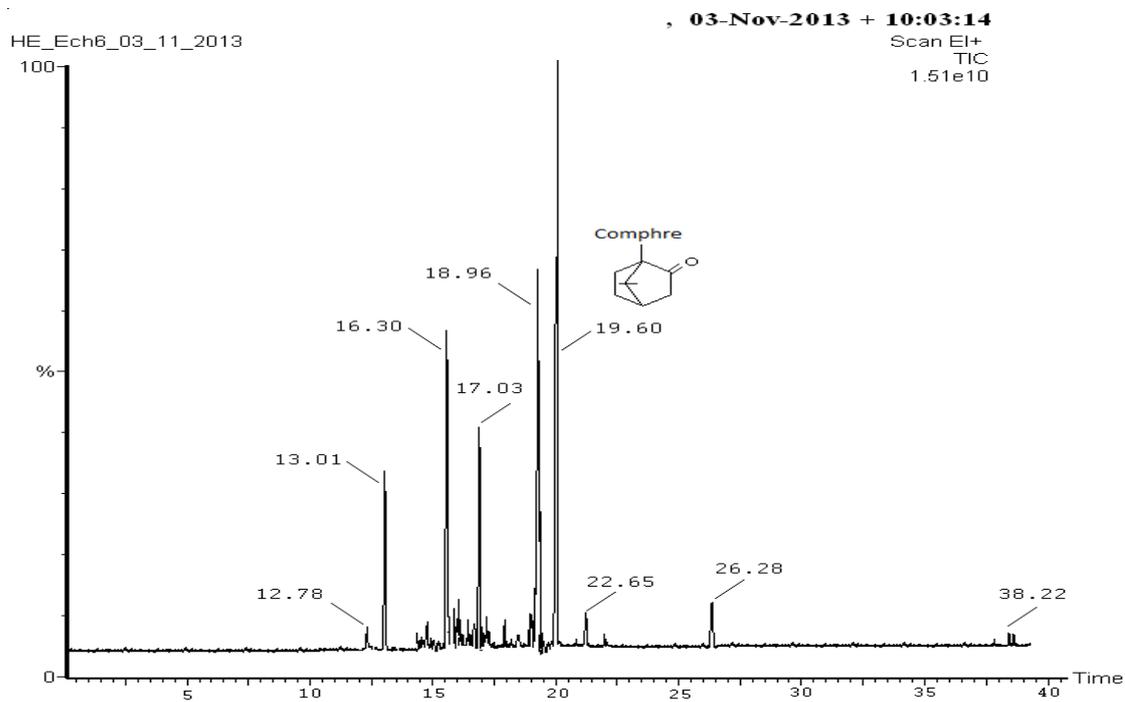


Figure 3.7 : Chromatogramme de l'huile essentielle d'armoise blanche.

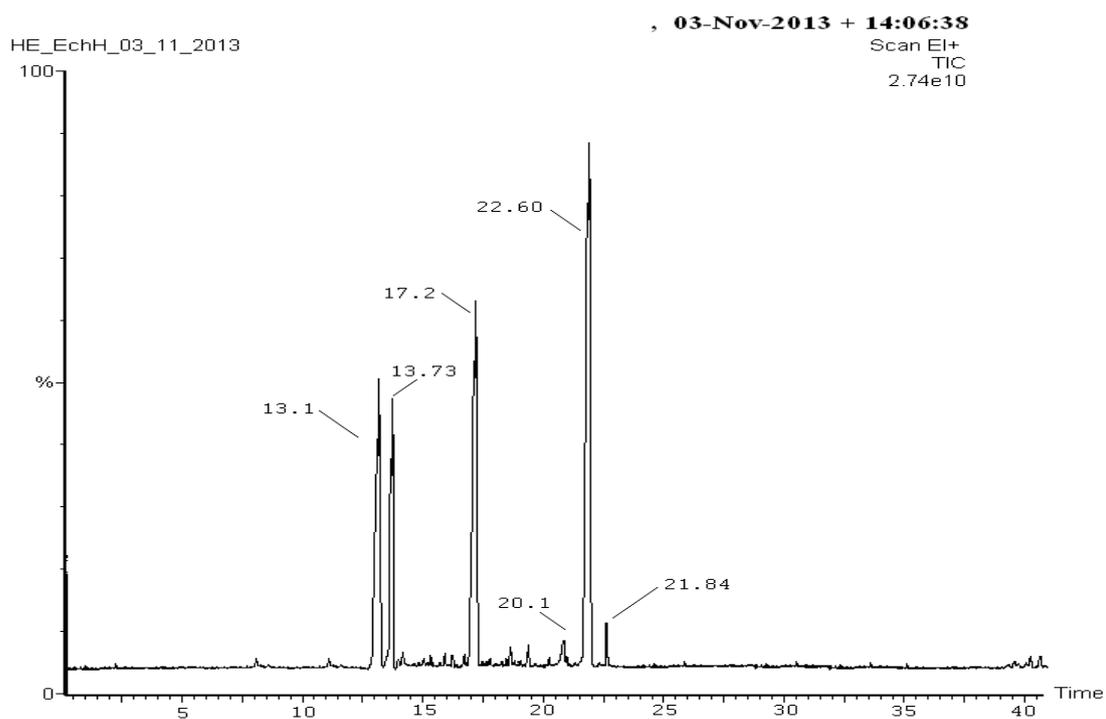


Figure 3.8 : Chromatogramme de l'huile essentielle du romarin.

**APPENDICE D**  
**ETUDES STATISTIQUES**

**Calcul de la moyenne :**

$$\bar{X} = 1/n \sum_1^n x_i$$

$n$  : Nombre de répétitions.

$x_i$  : Valeurs observées.

**Calcul de l'écart type :**

$$S = \sqrt{1/n - 1 \sum_i^n (x_i - \bar{X})^2}$$

## APPENDICE E

### LISTE DES ABREVIATIONS

HE : Huile essentielle.

HEA : Huile essentielle d'armoise blanche.

ZI : Zone d'Inhibition.

*E.c.* : *Escherichia coli*.

*P.a.* : *Pseudomonas aeruginosa*.

*K.p.* : *Klebsiella pneumonia*.

*S.a.* : *Staphylococcus aureus*.

*B.s.* : *Bacillus subtilis*.

*C.a.* : *Candida albicans*.

*A.f.* : *Aspergillus flavus*.

*F.o.* : *Fusarium oxysporum*.

ATCC : American Type Culture Collection.

PDA: Potato Dextrose Agar

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

ISO : Organisation Internationale de Normalisation.

AFNOR : Association Française de Normalisation.

AFSSPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé.

CPG/SM : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse.

ATP : adénosine-5'-triphosphate.

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.

BHT : Butylhydroxytoluène.

BHA : Butylhydroxyanisole.

Vit C : Vitamine C.

FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power.

EC<sub>50</sub> : Concentration requise pour diminuer la concentration du DPPH de 50%.

APR : Pouvoir antiradicalaire.

TEC<sub>50</sub> : Temps nécessaire pour atteindre l'équilibre à EC<sub>50</sub>.

AER : Activité antiradicalaire.

AAR : Activité antioxydante relative.

Abs : Absorbance.

Max : Moyenne des températures maximales.

Min : Moyenne des températures minimales.

Moy :  $(M+m)/2$ .

## APPENDICE F

### LISTE DES SYMBOLES

v/v : volume par volume.

p/v : poids par volume.

°C : degré Celsius.

h : heure.

t : temps.

t<sub>0</sub> : temps initial.

g : gramme.

% : pourcentage.

ml : millilitre.

µl : microlitre.

M : Molaire.

m : mètre.

mm : millimètre.

µm : micromètre.

min : minute.

ev : électro volt.

CFU : Unité Formant des Colonies.

nm : nano mètre.

mg : milligramme.

< : Inférieur.

> : Supérieur.

+ : Positif.

- : Négatif.

TR : Temps de rétention.

IK : Indice de Kovats.

$\alpha$  : Alpha.

$\beta$  : Béta.

$\gamma$  : Gama.

$\pm$  : Plus au moins.

## APPENDICE G

### GLOSSAIRE

**Pubescente** : Se dit des plantes garnies de poils très fins et courts.

**Capitule** : Il s'agit de fleurs sans pédoncules regroupées sur un réceptacle, entourées de bractées.

**Akène** : Un fruit sec indéhiscent, à graine unique.

**Antidiabétique** : Protège contre le diabète.

**Antiseptique** : Détruit les microbes et empêche leur développement.

**Vermifuge** : Se dit d'un remède qui a la propriété d'expulser les vers intestinaux.

**Antispasmodique** : Fait baisser la tension et soulage les spasmes musculaires.

**polyarthrite rhumatoïde** : Une maladie dégénérative inflammatoire chronique, caractérisée par une atteinte articulaire souvent bilatérale et symétrique.

**Analgésique** : Supprime la douleur.

**Antibactérien** : Inhibe et détruit les bactéries.

**Hémostatique** : Qui a la propriété d'arrêter les hémorragies.

**Arthrite** : Désigne l'inflammation **d'une articulation**.

**Antimutagène** : S'oppose aux substances susceptibles d'introduire des mutations.

**Digestif** : Remède concourant à la digestion.

**Tonique** : purifie, rafraîchit et « tonifie » la peau.

**Diurétique** : Stimule la production d'urines.

**Sudorifique** : qui provoque la sueur (provoque la transpiration).

**Carminatif** : Facilite l'évacuation des gaz intestinaux.

**Stomachique** : Soulage des maux d'estomac ou facilite la digestion.

**Caustique** : Il signifie qui est brûlant, corrosif en parlant des substances qui ont la propriété de brûler ou de désorganiser, par leur action chimique, les matières animales.

**Hypertension** : une pathologie cardiovasculaire définie par une pression artérielle trop élevée.

**Labyrinthite** : (otite interne) est une affection d'équilibre suite à une infection ou inflammation de l'oreille interne

**Antivirale** : qui perturbe le cycle de réplication d'un ou de plusieurs virus, permettant ainsi de ralentir mais rarement d'arrêter une infection virale.

**Anti-inflammatoire** : qui combat les inflammations.

**Néuralgie** : définit la présence de douleurs sur le trajet d'un nerf.

**Cholérétique** : , c'est-à-dire la production de bile par le foie.

**Hépatoprotecteur** : qui protège le foie.

**Anti-tumorigène** : s'oppose aux cellules susceptibles de dégénérer en tumeurs

**Antiparasitaire** : qui détruit les parasites.

**Antiproliférative** : empêche la prolifération d'un phénomène.

**Cholagogue** : facilite l'évacuation de la bile vers l'intestin

**Insecticide** : qui a la propriété de tuer les insectes, leurs larves et/ou leurs œufs.

**Biopesticide** : pesticide biologique, lutte contre les organismes considérés comme nuisibles.

**Cytotoxique** : qui a la propriété d'altérer des cellules, éventuellement jusqu'à les détruire.

**Hépatotoxique** : nocif pour le foie.

**Neurotoxique** : Qui agit habituellement en perturbant ou en paralysant l'influx nerveux.

**Antifongique** : Actif contre les champignons et les levures.

**Antimicrobien** : Inhibe et détruit les microbes.

**Antioxydant** : Permet aux aliments de résister à l'oxydation et à une détérioration graduelle.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Amarti F., El Ajjouri M., Ghanmi M., Satrani B., Aafi A., Farah A., Khia A., Guedira A., Rahouti M. & Chaouch A., "Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc", *Phytothérapie*, V.9, n° 3, (2011), 149-157.
2. Djeridane A., Yousfi M., Brunel J.M. & Stocker P., "Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants", *Food Chem. Toxicol.*, V. 48, (2010), 2599–2606.
3. Cushnie T.P.T. & Lamb A.J., "Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids", *Int. J. Antimicrob. Agents*, V.38, (2011), 99-107.
4. Yakhlef G., Laroui S., Hambaba L., Aberkane M.C. & Ayachi A., "Évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle", *Phytothérapie*, (2011), V.9, 209-218.
5. Aouni M., Pelen F. & Soulimani R., "Étude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles et domaines d'application", *Phytothérapie*, V. 11, (2013), 225-236.
6. Koul O., Walia S. & Dhaliwal G. S., "Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints", *Biopestic. Int.*, V. 4, n°1, (2008), 63–84.
7. Deravel J, Krier F. & Jacques P., "Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique)", *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, (2014), V.18, n°2, 220-232.
8. Lahlou M., "Methods to Study the Phytochemistry and Bioactivity of Essential Oils", *phytotherapy Research*, V.18, (2004), 435-448.
9. Belouad A., "Plantes médicinales d'Algérie". Office des Publications Universitaires, (Alger, 2001), 5-10.
10. LAIB I., "Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis*: application aux moisissures des légumes secs", *Revue Nature & Technologie*, n° 07, (Juin 2012), 44-52.

11. Teuscher E., Anton R. & Lobstein A., "Plantes aromatiques épicées, aromates, condiments et huiles essentielles", Lavoisier, Edition TEC and DOC, V. 6, (2005), 266-272.
12. Dung N.T., Kim J.M. & Kang S.C., "Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb). Merr and Perry buds", Food and Chemical Toxicology, V. 46, (2008), 3632-3639.
13. Jeanneney J.N., "Concordance des temps: dialogues radiophoniques", Nouveau Monde Editions, (2005), 960 p.
14. Singh R.J., "Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement: Medicinal Plants, Genetic Resources Chromosome" Engineering & Crop Improvement, CRC Press, V. 6, (2011), 1098 p.
15. Bencheqroun H.K., Ghanmi M., Satrani B., Aafi A. & Chaouch A., "Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Artemisia mesatlantica*, plante endémique du Maroc", Buletin de la société royale des sciences de liège, V. 81, (Décembre 2012), 4-21.
16. Quezel P. & Santana S., " Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertique Méridionales", Editions Centre National de la Recherche Scientifique, V. II, Paris, (1963), 977p.
17. Duke J.A., "Duke's handbook of medicinal plants of bible", CRC press, (2007), 552 p.
18. Belhattab R., Loubna A., José G., Barroso L.G., Pedro A. & Figueiredo C., "Essential oil from *Artemisia herba-alba* Asso grown wild in Algeria: Variability assessment and comparison with an updated literature survey", Arabian Journal of Chemistry, V.7, n° 2, (April 2014), 243-251.
19. Seddiek S.A., Ali M.M., Hanem F., Khater & Mohamed M., " El-Shorbagy Anthelmintic activity of the white wormwood, *Artemisia herba-alba* against *Heterakis gallinarum* infecting turkey poults", Journal of Medicinal Plants Research, V. 5, n°16 , (August 2011), 3946-3957.
20. Lupidi G., Bramucci M., Quassinti L. & Enzo F., Luca A., Hala K. & Hala G.M., " Antiproliferative activities of *Artemisia herba-alba* ethanolic extract in human colon cancer cell line (HCT116) ", Alternative Medicine Studies, V.1, n°1. (2011), 55-59.

21. Houmani M., Houmani Z. & Melpomeni S., " Intérêt de *Artemisia herba alba* Asso dans l'alimentation du bétail des steppes algériennes", *Acta Botanica Gallica*, V. 151, n°2, (2004), 165-172.
22. Lucienne D., " Les Plantes Médicinales de l'Algérie", Edition Berti, (2008), 240 p.
23. Bezza L., Mannarino A., Fattarsi K., Mikail C., Abou L., Hadji-Minaglou F. & Kaloustian J., " Chemical composition of the essential oil of *Artemisia herba-alba* issued from the district of Biskra (Algeria) " V. 8, n°5, (2010), 277-281.
24. Kadri A., Ben Chobba I., Zarai Z., Békir A., Néji G., Damak M. & Gdoura R., " Chemical constituents and antioxidant activity of the essential oil from aerial parts of *Artemisia herba-alba* grown in Tunisian semi-arid region, *African Journal of Biotechnology*" V.10, n°15, (April 2011), 2923-2929.
25. Badr A., Hanaa H., El-Shazly N.S. & Helail W. E-G., " Genetic diversity of *Artemisia* populations in central and north Saudi Arabia based on morphological variation and RAPD polymorphism", *Plant Syst Evol*, (2012) V. 298, 871-886.
26. Ghrabi Z.S., "*Artemisia herba alba* Asso in *A Guide to Medicinal Plants in North Africa* : Centre for Mediterranean Cooperation, International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, Union internationale pour la conservation de la nature et de ses ressources IUCN", (2005), 256 p.
27. Haouari M. & Ferchichi A., "Study of genetic polymorphism of *Artemisia herba-alba* from Tunisia using ISSR markers *African Journal of Biotechnology*", V. 7, n°1, (January 2008), 44-50.
28. Abou El Hamd M., El-Sayed M.A., Hegazy M. E., Helaly Soleiman E., ABEER E.M. & NAGLAA M.S., " Chemical Constituents and Biological Activities of *Artemisia herba-alba* Asso", *records of naturel products*, V.4, n°1, (2010), 1-25.
29. Ayad N., Benchaben H. & Maatoug M., " Dynamique des peuplements d'*Artemisia herba-alba* Asso dans la steppe du Sud oranais (Algérie occidentale)", *Sécheresse*, V.18, n° 3, (2007), 193-198.
30. Zouari S., Zouari N., Fakhfakh N., Bougatef A., M. A. Ayadi & Mohamed Neffati " Chemical composition and biological activities of a new essential

- oil chemotype of Tunisian *Artemisia herba alba* Asso”, Journal of Medicinal Plants Research, V. 4, n° 10, (May 2010), 871-880.
31. Mighri H., Hajlaoui H., Akrouf A., Najjaa H. & Neffati M., “Antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia herba-alba* essential oil cultivated in Tunisian arid zone”, Chimie, n°13, (2010), 380-386.
  32. Messaoudene D., Belguendouz H., Ahmedi M-L., Ben abdekader T., Otmani F., Terahi M., Youinou P. & Touil-boukoffal C., “ Ex vivo effects of flavonoïds extracted from *Artemisia herba alba* on cytokines and nitricoxide production in Algerian patients with Adamantiades - Behçet’s disease”, Journal of inflammation, (2011), V.8, 35p.
  33. Aafi A., Taleb M-S. & Fechtal M., “Espèces remarquables de la Flore du Maroc”, CNRF, (2002), 146p.
  34. Ghanmi M., Satrani B., Aafi A., Isamili M.R., Houti H., El Monfalouti H., Bencheqroun K.H., Aberchane M., Harki L., Boukir A., Chaouch A. & Charrouf Z., “ Effet de la date de récolte sur le rendement, la composition chimique et la bioactivité des huiles essentielles de l’armoise blanche (*Artemisia herba-alba*) de la région de Guerçif (Maroc oriental)”, Phytothérapie, V.8, (2010), 295-301.
  35. Nabli M.A., “Essai de synthèse sur la végétation et la phyto-écologie tunisiennes”, tomel, Edition MAB (Faculté des sciences de Tunis), (1989), 186-188.
  36. Khennouf S., Iratni N., Baghiani A., Harzallah D. & Arrar L., “Antioxidant and antibacterial activities of extracts from *Artemisia herba alba*Asso. leaves and some phenolic compounds”, Journal of Medicinal Plants Research,V. 4, n°13, (July 2010), 273-280.
  37. Abu-Irmailehand B. & Afifi F., “Herbal medicine in Jordan with special emphasis on commonly used herbes”, J. Ethnopharmacol, (2003), 89-193.
  38. Mobarak M.G., Seddiek S.H.A., Soliman A.S. & Mobarak A.A., “The effect of *Artemisia* on chickens fed ration contaminated with aflatoxin-B1”, Mansura Vet. Med. J., (2008), V.10, 1-13.
  39. Sharaf S. A., Shibli R.A., Kasrawi M.A. & Baghdadi S.H., “ Slow-growth preservation of wild shih (*Artemisia herba-alba* Asso.) microshoots from

- Jordan”, Journal of Food, Agriculture & Environment, V.10, n°2, (2012), 1359-1364.
40. Al-Qura'n S., “Taxonomical and pharmacological survey of therapeutic plants in Jordan”, J. Nat. Prod., V.1, (2008), 10-26.
  41. Tahraoui A., El-Hilaly J., Israili Z.H. & Lyoussi B., “Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province)”, J. of Ethnopharmacol, V. 110, n°1, (2007), 105-107.
  42. Awad N.E., Seida A.A., El-Khayat Z., Shaffie N. & Abd El-Aziz A.M., “hypoglycemic Activity of *Artemisia herba-alba* (Asso) used in Egyptian Traditional Medicine as Hypoglycemic Remedy”, Journal of Applied Pharmaceutical Science, V. 2, n°3, (2012), 30-39.
  43. Tilaoui M., Ait Mouse H., Jaafari A., Aboufatima R., Chait A. & Zyad A-M., “Chemical composition and antiproliferative activity of essential oil from aerial parts of a medicinal herb *Artemisia herba-alba*”, Revista Brasileira de Farmacognosia, Brazilian Journal of Pharmacognosy, V.21, n°4, (2011), 781-785.
  44. Baba Aissa F., “Encyclopedie des plantes utiles”, Edition Librairie moderne, Rouiba, (2000), 368p.
  45. Imelouane B., El Bachiri A., Ankit M., Khedid K., Wathélet J.P. & Amhamdi H., “Essential oil Composition and antimicrobial Activity of *Artemisia Herba-Alba* Asso Grown in Morocco”, Banat's Journal of Biotechnology, V. I, n°2, (November 2010), 48 -55.
  46. Abdul Latief A. G., Khloud A. J. & Ibrahim M. R., “Genetic and chemical variations among wild populations of a medicinal plant (*Artemisia herba-alba* Asso.) collected from different regions in Jordan”, Journal of Food, Agriculture & Environmen, V. 10, n°3 & 4, (2012), 26-31.
  47. Stefkov G., Miova B., Dinevska-Kjovkarovska S., Stanoeva J.P., Stefova M., Petrusevska G. & Kulevanova S., “Chemical characterization of *Centaureum erythrea* L. and its effects on carbohydrate and lipid metabolism in experimental diabetes”, J. Ethnopharmacol, V. 152, (2014), 71-77.
  48. Hamza N., Berke B., Cheze C., Le Garrec R., Lassalle R., Agli A.N., Robinson P., Gin H. & Moore N., “ Treatment of high fat diet induced type 2

- diabetes in C57BL/6J mice by two medicinal plants used in traditional treatment of diabetes in the east of Algeria”, J. Ethnopharmacol., V.133, (2011), 931-933.
49. Hamza N., Berke B., Cheze C., Marais S., Lorrain S., Abdouelfath A., Lassalle R., Carles D., Gin H. & Moore N., “Effect of *Centaureum erythraea* Rafn, *Artemisia herba-alba* Asso and *Trigonella foenum-graecum* L. on liver fat accumulation in C57BL/6J mice with high-fat diet-induced type 2 diabetes”, Journal of Ethnopharmacology, V. 171, (Aout 2015), 4-11.
  50. Ali Zeggwagh N., Jean Baptiste M. & Eddouks M., “Acute hypotensive and diuretic activities of *Artemisia herba alba* aqueous extract in normal rats, Asian Pacific”, Journal of Tropical Biomedicine, V. 4, Supplement 2, (juillet 2014), S644-S648.
  51. Moufid A. & Eddouks M., “*Artemisia herba alba*: a popular plant with potential medicinal properties, Pak J Biol Sci. ” V.15, (2012), 1152-1159.
  52. Alzweiri A. M., Sarhan A.A., Mansi K., Hudaib M. & Abujjai T., “Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Jordan, the Northern Badia region”, J. Ethnopharmacol., V.137, (2011), 27–35.
  53. Khlifi D., Sghaier R.M., Amouri S., Laouini D., Hamdi M. & Bouajila J., “Composition and anti-oxidant, anti-cancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba-alba*, *Ruta chalpensis* L. and *Peganum harmala* L. Food and Chemical Toxicology”, V. 55, (May 2013), 202-208.
  54. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., et al. “ Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) after treatment with UVC radiation, 8-MOP plus UVA and MMS”, Mut. Res., V. 606, n°1–2, (2006), 27-38.
  55. Hatimi S., Boudouma M., Bichichi M., Chaib N. & Idrissi N.G., “*In vitro* evaluation of antileishmania activity of *Artemisia herba-alba* Asso”, Bull. Soc. Pathol. Exot., V. 94, (2001), 29-31.
  56. Laid M., Hegazy F. & Ahmed A.A., “Sesquiterpene lactones from Algerian *Artemisia herba alba* ”, Phytochemistry lett., V. 1, (2008), 85-88.
  57. Iriadam M.D., Musa G.M., Hatice H. & Sun Baba F., “Effects of two Turkish medicinal plants *Artemisia herba-alba* and *Teucrium polium* on blood

- glucose levels and other biochemical parameters in rabbits”, *J. Cell. Mol. Biol.*, V. 5, (2006), 19-24.
58. Essid R., Rahali F-Z., Msaada K., Sghair I., Hammami M., Bouratbine A., Aoun K. & Limam F., “ Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medicinal plants in Northern Tunisia”, *Industrial Crops and Products*, V. 77, (Décembre 2015), 795-802.
  59. Neffati A., Skandrani I., Ben Sghaier M., Bouhlel I., Kilani S., Ghedira K., Neffati M., Chraief I., Hammami M. & Chekir-Ghedira L. “Chemical Composition, Mutagenic and Antimutagenic Activities of Essential Oils from (Tunisian) *Artemisia campestris* and *Artemisia herba-alba*”, *J. Essenl. Oil Res.*, V. 20, n°5, (2008), 471-477.
  60. Aggarwal B. B. & Ajaikumar B. K., “Molecular targets and therapeutic uses of spices”, *Modern Uses for Ancient Medicine*, Ed. word scientific, (2009), 430p.
  61. Begum A., Sandhya S., Shaffath A. S., Vinod K. R., Reddy S. & Banji D., “An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae)”. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, V. 12, n°1, (2013), 61-73.
  62. Heinrich M., Kufer J., Leonti M. & Pardo-de-Santayana M., “Ethnobotany and ethnopharmacology–interdisciplinary links with the historical sciences”, *J. Ethnopharm.*, V. 107, (2007), 157-160.
  63. Napoli E.M., Curcuruto G. & Giuseppe R., “Screening of the essential oil composition of wild Sicilian rosemary”, *Biochemical Systematics and Ecology*, V. 38, (2010), 659-670.
  64. Ribeiro-Santos R., Carvalho-Costa D., Cavaleiro C., Costa H.S., Albuquerque T.G., Conceição Castilho M., Ramos F., Melo N.R. & Sanches-Silva A., “A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)”, *Trends in Food Science & Technology*, V. 45, n°2, (October 2015), 355-368.
  65. Rameau J-C., Dominique M. & Dumé G., “Flore forestière française région méditerranéenne”, *foret privée française*, (2008), 2426p.
  66. Rudolf H., Konstantin K., Horst R. & Georg S., “Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis: Drogen P-Z Folgeband 2”, *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis Series*, 5<sup>ème</sup> Edition, Springer-Verlag, (2013), 1195 p.

67. Ong H.C., “Rempah-ratus, khasiat makanan & ubatan”, Utusan Publications, 2008, 255 p.
68. Quattrocchi U., “CRC World Dictionary of Medicinal and Poisonous Plants: Common Names, Scientific Names, Eponyms, Synonyms, and Etymology” V.5, CRC Press, (mai 2012), 3960 p.
69. Heidari-Valaa H., Ebrahimi Hariry R., Sadeghi M. & Akhondia M.M., Ghaffari Novind M. & Mahnaz Heidari “Evaluation of an Aqueous-Ethanollic Extract from *Rosmarinus officinalis* (Rosemary) for its Activity on the Hormonal and Cellular Function of Testes in Adult Male Rat”, Iranian Journal of Pharmaceutical Research, , V. 12, n°2, (2013), 445-451.
70. Kesatebrhan H.A. & Tesfahun K.T., “chemical and antimicrobial investigations on essential oil of *rosmarinus officinalis* leaves grown in ethiopia and comparison with other countries”. J. app. Pharm., V. 6, n°2, (2014), 132-142.
71. Bruneton J., “Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales”, Tec & Doc, Paris, 4<sup>ème</sup> Edition, (2009), 1292 p.
72. Damerdji A. & Iadjmi I. “Contribution à l’étude bio-écologique de la faune de *Rosmarinus officinalis* L. (romarin) (labiées) dans la région de Tlemcen (N.O. Algérien)”, rev. Ivoir. Sci. Technol., V. 23, (2014), 224 – 243.
73. Goetz P. & Kamel G., “Phytothérapie anti-infectieuse Collection Phytothérapie pratique”, Springer Science & Business Media, (2012), 340 p.
74. Polese J.M., “La culture des plantes aromatiques”, Ed. Artemis, (2006), 93 p.
75. Moghtader M., Salari H., & Farahmand A., “Evaluation of the antifungal effects of rosemary oil and comparison with synthetic borneol and fungicide on the growth of *Aspergillus flavus*”, Journal of Ecology and the Natural Environment, V. 3, n°6, (2011), 210-214.
76. Díaz-Maroto M.C., Pérez-Coello M.S., Sánchez-Palomo E. & González-Viñas M.A., “Impact of drying and storage time on sensory characteristics of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)”, Journal of Sensory Studies, V.22, (2007), 34-48.

77. Marin M., Koko V., Duletić-Laušević A., Marin P.D., Rančić D. & Dajic-Stevanovic Z., "Glandular trichomes on the leaves of *Rosmarinus officinalis*: morphology, stereology and histochemistry", *South African Journal of Botany*, V.72, (2006), 378–382.
78. Khiari D. & Boussaid M., "Diversité phytotypique de quelques populations de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) en Tunisie", *Tropicultura*, V.18,n°4, (2000), 203 -207.
79. Humberto M.B., Silva Filho E.C., Edeltrudes D.O. L., Coutinho H.D.M., Morais-Braga M.F.B., Tavares C. C.A., Tintino S.R., Rego J.V., De Abreu A.P.L., Lustosa M.d. C.G., Oliveira R.W.G., Citó A.M.G.L. & Lopes J.A. D., "Chemical composition and possible use as adjuvant of the antibiotic therapy of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L.", *Industrial Crops and Products*, V. 59, (August 2014), 290-294.
80. Babar A., Al-Wabel N.A., Saiba S., Aftab A., Khan S.A. & Anwar F., "Essential oils used in aromatherapy: A systemic review, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, V. 5, n° 8, (August 2015), 601- 611.
81. Miguel M.G., Guerrero C., Rodrigues H. & Brito J., "Essential oils of *Rosmarinus officinalis* L., effect of harvesting dates, growing media and fertilizers", *Proc. of the 3rd Int. Conf. on Energy, Environment, Ecosystems and Sustainable Development*, Agios Nikolaos, Greece, (2007).
82. Iserin P., "Encyclopédie des plantes médicinales", Tome 2, Ed. Larousse, Londres, (2001), 143-226.
83. Khorshidi J., Mohammadi R., Fakhr Tabatabaei M. & Nourbakhsh H., "Influence of Drying Methods, Extraction Time, and Organ Type on Essential Oil Content of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)", *Nature and Science*, V.7, n°11, (2009), 42-44.
84. Bicchi C., Binello A. & Rubliolo P., "Determination of phenolic diterpene antioxidants in rosemary (*Rosmarinus officinalis*) with different methods of extraction and analysis, phytochemical analysis" *P.C.A.*, (2000), V.11, 236.

85. Derwich E., Benziane Z., Chabir R. & Taouil R., "In vitro antibacterial activity and GC/MS analysis of the essential oil Extract of leaves of *Rosmarinus officinalis* L. grown in morocco, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, V. 3, n° 3, (2011), 8995.
86. Sanchetti G. & Goyal P.K., "Prevention of radiation induced hematological alterations by medicinal plant *Rosmarinus officinalis* L.,in mice", Afr. J. Trad. Cam.,V.4, n° 2, (2007), 165 - 172.
87. Helal Y., "Etude e biomasse du romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) dans le massif des beni-imploul-Aurès-Algérie", Forest Science, n° 3, (2010), 25-42.
88. Porte A., Godoy R.L.O., LopesD, Koketsu M., Gonçalves S. L. & Torquillo H.S., "Essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) from Rio de Janeiro, Brazil", Journal of Essential Oil Research, V.12, (2000), 577-580.
89. Dellacassa E., Lorenzo D., Moyna P., Frizzo C.D., Serafini L. A. & Dugo P., "*Rosmarinus officinalis*L. (Labiatae) essential oils from the South of Brazil and Uruguay", Journal of Essential Oil Research, V.11, (1999), 27-30.
90. Gruenwald J., Brendler T., Jaenicke C. & Mehta M. : "PDR for Herbal Medicines", Medical Economics Company, (2000), 645-646.
91. Atti-Santos A.C., Rossato M., Pauletti G.F., Duarte Rota L., Ciro Rech J., Pansera M.R., Agostini F., Atti Serafini L. & Moyna P ., "Physico-chemical Evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oils", Brazilian Archives of Biology and Technology, V. 48, n°6, (2005), 1035–1039.
92. Verma R.S., Laiqur R., Sunita M., Rajesh K., Amit C. & Anand S., "Changes in essential oil content and composition of leaf and leaf powder of *Rosmarinus officinalis* cv. CIM-Hariyali during storage", Maejo Int. J. Sci. Technol, V. 5, n°2, (2011), 181-190.
93. Benabid A., "Flore et écosystèmes du Maroc. Evaluation et préservation de la biodiversité", Edition Ibis press, Paris, France, (2000), 159-161.
94. Ghanmi M., Satrani B., Aberchane M., et al., "Plantes Aromatiques et Médicinales du Maroc : Les milles et une vertus. Collection Maroc Nature", Edition du Centre de Recherche Forestière, V. 7, (2011), 128p.

95. Khia A., Ghanmi M., Satrani B., Aafi A., Aberchane M., Quaboul B., Chaouch A., Amusant N. & Charrouf Z., "Effet de la provenance sur la qualité chimique et microbiologique des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. du Maroc", *Phytothérapie*, (2014),V.12, 341-347.
96. Arranz E. , Mes J., Wichers H.J., Jaime L., Mendiola J.A., Reglero G. & Santoyo S., "Anti-inflammatory activity of the basolateral fraction of Caco-2 cells exposed to a rosemary supercritical extract", *Journal of Functional Foods*, V. 13, (March 2015), 384-390.
97. Teixeira B., Marques A., Ramos C., Neng N.R., Nogueira J.M.F., Saraiva J.A., et *al.*, "Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils", *Industrial Crops and Products*, V. 43, (2013), 587–595.
98. Babovic N., Djilas S., Jadranin M., Vajs V., Ivanovic J., Petrovic S., et *al.*, "Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs and their antioxidant capacity Innovative", *Food Science & Emerging Technologies*, V.11,n°1, (2010), 98–107.
99. Yi W. & Wetzstein H.Y., "Biochemical, biological, and histological evaluation of some culinary and medicinal herbs grown under greenhouse and field conditions", *J. Sci. Food Agr.*, V.90, (2010), 1063-1070.
100. Stefanovits-Bányai E., Tulok M.H., Hegedus A., Renner C. & Varga I.S., "Antioxidant effect of various rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) clones", *Acta Biologica Szegediensis*,V. 47, (2003), 111–113.
101. Sasikumar B., "Handbook of herbs and spices: Rosemary", Ed. K.V. Peter, (2012), 452–468.
102. Ahmad H.H., hamza A.H., hassan A.Z. & sayed A.H., "promising therapeutic role of *Rosmarinus officinalis* successive methanolic fraction against colorectal cancer", *international journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, V. 5, n°4, (2013),164-170.
103. Peter K.V., "Handbook of herbs and spices: Introduction to herbs and spices, medicinal uses and sustainable production", K.V. Ed. Peter, (2012), 1–15.
104. Szumny A., Figiel A., Gutiérrez-Ortíz A. & Carbonell-Barrachina Á.A. "Composition of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) as affected

- by drying method”, Journal of Food Engineering, V. 97, n°2, (2010), pp. 253–260.
105. Tavassoli S. & Emam Djomeh Z., “Total Phenols, Antioxidant Potential and Antimicrobial Activity of Methanol Extract of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)”, Global Veterinaria, V. 7, n° 4,(2011),337-341.
  106. Najafian S., Rowshan V. & Tarakemeh A.,“Comparing essential oil composition and essential oil yield of *Rosmarinus officinalis* and *lavandula angustifolia* before and full flowering stages”, International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology, V.3,n°1,(Jan- Mar 2012), 212-218.
  107. Kiran S. & Bhanu P., “Toxicity and biochemical efficacy of chemically characterized *Rosmarinus officinalis* L. essential oil against *Sitophilus oryzae* and *Oryzaephilus surinamensis*”, Industrial Crops and Products, V. 74, (November 2015), 817–823.
  108. Vahid R., Farzaneh F., Sharareh N., “The essential oil of *Dodonaea viscosa* leaves is allelopathic to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)”, Industrial Crops and Products, V. 56, (May 2014), 241–245.
  109. Takaki I., Bersani-Amado L.E., Vendruscolo A., Sartoretto S.M., Diniz S.P., Bersani-Amado C.A. & Cuman R.K.N., “Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oils in experimental animal models”. J. Med. Food,V.11, (2008),741–746.
  110. Martínez A.L., González-Trujano M.E., Chávez M. & Pellicer F., “Antinociceptive effectiveness of triterpenes from rosemary in visceral nociception”, Journal of Ethnopharmacology, V.142, n°1, (2012), 28-34.
  111. Gonzalez–Trujano M.E., Pena E.L., Martinez A.L.,Moreno J., Guevara-Ferer P. & DécigaCampos M., “Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L, using three different experimental models in rodents”, J. Ethnopharmacol., V.111,(2007),476-82.
  112. Karakurum Göskel B., Coskun O., Ucler S., Karatas M., Ozge A. & Ozkan S., “Use of complementary and alternative medicine by a sample of Turkish primary headache patients”, Revista de Agricultura, V.26, n°1, (2014), 1–7.
  113. Naemura A., Ura M., Yamshita T., Arai R. & Yamamoto J., “Long-term intake of rosemary and common thyme herbs inhibits experimental

- thrombosis without prolongation of bleeding time”, *Thrombosis Res*, V.122, (2008), 517–522.
114. Sasaki K., El Omri A., Kondo S., Han J. & Isoda H., “*Rosmarinus officinalis* polyphenols produce anti-depressant like effect through monoaminergic and cholinergic functions modulation”, *Behavioural Brain Research*, V. 238, (February 2013), 86-94.
  115. Machado D.G., Bettio L.E.B., Cunha M.P., Capra J.C., Dalmarco J.B., Pizzolatti M.G., et al., “Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: involvement of the monoaminergic system”, *Progress in Neuro-Psycho Pharmacology & Biological Psychiatry*, V. 33, n° 4, (2009), 642–650.
  116. Machado D.G., Cunha M.P., Neis V.B., Balen G.O., Colla A., Bettio L.E.B., et al., “Antidepressant-like effects of fractions, essential oil, carnosol and betulinic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L.”, *Food Chemistry*, V.136, n° 2, (2013), 999–1005.
  117. Posadas S.J., Caz V., Largo C., De la Gándara B., Matallanas B., Reglero G. & De Miguel E., “Protective effect of supercritical rosemary extract *Rosmarinus officinalis*, on antioxidants of major organs of aged rats”. *Exp. Geront.*, V. 44, (2009), 383–389.
  118. Botsoglou N.A., Taitzoglou I.A., Botsoglou E., Zervos I., Kokoli A., Christakia E. & Nikolaidisc E., “Effect of long-term dietary administration of oregano and rosemary on the antioxidant status of rat serum, liver, kidney and heart after carbon tetrachloride-induced oxidative stress”, *J. Sci. Food Agric*, V. 89, (2009), 1397–1406.
  119. Pérez-Fons L., Garzón M.T. & Micol V., “Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) polyphenols on membrane phospholipid order”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V.58, (2010), 161–171.
  120. Hernández-Hernández E., Ponce-Alquicira E., Jaramillo-Flores M.E. & Guerrero Legarreta I., “Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus*

- officinalis*L.) and oregano (*Origanum vulgare*L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters”, *Meat Sci*, V. 81, (2009), 410–417.
121. Askun T., Tumen G., Satil F. & Ates M., “In vitro activity of methanol extracts of plants used as spices against *Mycobacterium tuberculosis* and other bacteria”, *Food Chem.*, V.116, (2009),289–294.
  122. Rozman T. & Jersek B.,“Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*”, *Acta agricultura Slovenica*, V. 93, (2009), 51–58.
  123. Juhás Š., Bukovská A., Čikoš S., Czikková S., Fabian D. & Koppel J., “Anti-inflammatory effects of *Rosmarinus officinalis* essential oil in mice”, *Acta Vet. Brno*, V.78, (2009), 121–127.
  124. Benincá J.P., Dalmarco J.B., Pizzolatti M.G. & Fröde T.S., “Analysis of the anti-inflammatory properties of *Rosmarinus officinalis* L. in mice”, *Food Chem.*, V.124, (2011), 468–475.
  125. Tai J., Cheung S., Wu M. & Hasman D.H., “Antiproliferation effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on human ovarian cancer cells in vitro”, *Phytomedicine*, V. 19, (2012), 436-443.
  126. Afonso M.S., de O Silva A.M., Carvalho E.B., Rivelli D.P., Barros S.B., Rogero M.M., et al., “Phenolic compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) attenuate oxidative stress and reduce blood cholesterol concentrations in diet-induced hypercholesterolemic rats”, *Nutrition & Metabolism*, V.10, n°1, (2013), 19 p.
  127. Bakirel, T., Bakirel, U., Keles, O.U., Ulgen, S.G. & Yardibi, H., “In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan- diabetic rabbits. *J. Ethnopharmacol.*, V.116, (2008),64-73.
  128. Hussain A.I., Anwar F., Chatha S.A.S., Jabbar A., Mahboob S. & Nigam P.S., “*Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities”, *Braz. J. Microbiol.*, V. 41, (2010), 1070–1078.
  129. Bieski I.G., Rios Santos F., de Oliveira R.M., Espinosa M.M., Macedo M., et al., “Ethnopharmacology of medicinal plants of the pantanal region (mato grosso, Brazil)”, V. 2012, (2012), 36 p.

130. Hamzaa R. G., El Shahat A. N. & Mekawey H.M.S., "Modulating Efficiency of  $\gamma$ -Irradiated Rosemary in Improving the Hepatic Antioxidant Status of Ethanol Administrated Rats", *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, V. 1, n°8, (2012), 1-6 p.
131. Saber A., S. & Hawazen A.L., "Protective Effect of Rosemary (*Rosmarinus Officinalis*) Leaves Extract on Carbon Tetrachloride -Induced Nephrotoxicity in Albino Rats". *Life Science Journal*, V. 9, n° 1, (2012), 779-785 p.
132. Rauter A.P., "Natural products in the new millennium : prospects and Industrial application", Edition Dordrecht ; Boston ; London : Kluwer Academic Publishers, (2002), 47 p.
133. El Omri A., Han J.P., Kawada K., Abdrabbah M.B. & Isoda H., "*Rosmarinus officinalis* polyphenols activate cholinergic activitie sin PC12 cells through phosphorylation of ERK1/2", *J. Ethnopharmacol.*, v.131, (2010), 451–458.
134. Soyol D., Jindal A., Singh I. & Goyal P.K., "Modulation of radiation-induced biochemical alterations in mice by rosemary ( *Rosemarinus officinalis*) extract", *Phytomedicine*, V. 14, (2007), 701 -705.
135. Sienkiewicz M., Lysakowska M., Pastuszka M., Bienias W. & Kowalczyk E., "The Potential of Use Basil and Rosemary Essential Oils as Effective Antibacterial Agents", *Molecules*, V. 18, (2013), 9334-9351.
136. Çakilcioglu U. & Türkoglu I., "Plants used to lower blood sugar in Elazig Central District, In: I. International Medicinal and Aromatic Plants Conference on Culinary Herbs". *Acta Horticulturae*, V.826, (2007), 97-104.
137. Ugulu I., Baslar S., Yorek N. & Dogan Y., "The investigation and quantitative ethnobotanical evaluation of medicinal plants used around Izmir province", *Turkey J. Med. Plants. Res.*, V.3, (2009) , 345-367.
138. Pintore G., Usai M., Bradesi P., Juliano C., Boatto G. & Tomi F., "Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica", *Flav. Frag. J.*, V. 17, (2002), 15–19.
139. Amaral G.P., Carvalho N.R., Barcelos R.P., Dobrachinski F., Portella R.D.L., Silva M.H., et al., "Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. in gastric ulcer prevention induced by ethanol in rats", *An International Journal Published for the British Industrial*

- Biological Research Association Food and Chemical Toxicology, V.55, (2013), 48–55.
140. Bernardes W.A., Lucarini R., Tozatti M.G., Souza M.G, Silva M., M.L.A., da Silva Filho A.A., Martins C.H.G., Crotti A.E.M., Pauletti P.M., Groppo M. & Cunha W.R., “Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* against oral pathogens: relevance of carnosic acid and carnosol”, Chem. Biodivers., (2010), 7 p.
  141. Bubonja-Sonje M., Giacometti J. & Abram M., “Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols”. Food Chem., V.127, (2011), 1821–1827.
  142. Jordán M.J., Lax V., Rota M.C., Lorán S. & Sotomayor J.A., “Relevance of carnosic acid, carnosol and rosmarinic acid concentrations in the in vitro antioxidant and antimicrobial activities of *Rosmarinus officinalis* (L.) methanolic extracts”. J. Agric. Food Chem., V. 60, n° 38, (2012), 9603–9608.
  143. Romano C.S., Abadi K., Repetto V., Vojnov A.A. & Moreno S., “Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives”, Food Chem., V.115 (2009), 456–461.
  144. Jamshidi R., Afzali Z., & Afzali D., “Chemical Composition of Hydrodistillation Essential Oil of Rosemary in Different Origins in Iran and Comparison with Other Countries”, American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., V.5, n°1, (2009), 78-81.
  145. Silva Ribeiro D., Felix Siqueira G., Eudes da Silva V. & Guimarães A. G., “Evaluation rosemary essential oil in the control of multidrug-resistant *Escherichia coli* in Coalho cheese”. Vol. 4, n°.1, (February 2013), 1-9.
  146. Van Vuuren S.F., Suliman S. & Viljoen A.M., “The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials”, Lett. Appl. Microbiol., V.48, (2009), 440–446.
  147. Issabeagloo E., Kermanizadeh P., Taghizadieh M. & Forughi R., “Antimicrobial effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oils against *Staphylococcus* spp”, Afr. J. Microbiol. Res., V.6, (2012), 5039–5042.

148. Ntzimani A.G., Giatrakou V.I. & Savvaidis I.N., "Combined natural antimicrobial treatments (EDTA, lysozyme, rosemary and oregano oil) on semi cooked coated chicken meat stored in vacuum packages at 4 °C: Microbiological and sensory evaluation Innovative", *Food Sci. Emerg. Technol.*, V.11, (2010), 187–196.
149. Khosravi A.R., Shokri H., Farahnejat Z., Chalangari R. & Katalin M., "Antimycotic efficacy of Iranian medicinal plants towards dermatophytes obtained from patients with dermatophytosis", *Chin. J. Nat. Med.*, V.11 (2013), 43–48.
150. Okoh O., Sadimenko A. P. & Afolayan A. J., "Antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained by hydro-distillation and solvent free microwave extraction", *African Journal of Biotechnology*, V. 10, n°20, (May 2011), 4207-4211.
151. Hussain A.I., Anwar B.F., Nigam P.S., Sarker S.D., Moore J.E. & Rao J.R., "Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth", *LWT Food Sci. Technol.*, V.44, (2011), 1199–1206.
152. Özcan M.M. & Chalchat J., "Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey". *Internat. J. Food Sci. Nutr.*, V. 59, (2008), 691–698.
153. Zaouali Y., Bouzaine T. & Boussaid M., "Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities", *Food and Chemical Toxicology*, V.48, (2010), 3144–3152.
154. Wang W., Wu N., Zu Y. & Fu Y., "Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components". *Food Chemistry*, V.108, (2008), 1019–1022.
155. Noqueira de Melo G.A., Grespan R., Fonseca T.O., Silva E.L., Romero A.L., Bersani-Amado C.A. & Cuman R.K., "*Rosmarinus officinalis* L. essential oil inhibits in vivo and in vitro leukocyte migration". *J. Med. Food*, V.14, n°9, (2011), 944-946.
156. Ehrnhöfer –Ressler M.M., Fricke K., Pignitter M., Walker J.M., Walker J., Rychlik M., et al., "Identification of 1,8-cineole, borneol, camphor, and

thujone as anti-inflammatory compounds in a *Salvia officinalis* L. infusion using human gingival fibroblasts”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V.61, (2013), 3451–3459.

157. Mengoni E.S., Vichera G., Rigano L.A., Rodriguez-Puebla M.L., Galliano S.R., Cafferata E.E., Pivetta O.H., Moreno S. & Vojnov A.A., “Suppression of COX-2, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  expression and leukocyte infiltration in inflamed skin by bioactive compounds from *Rosmarinus officinalis* L.”, *Fitoterapia*, V.82, n°3, (2011), 414–421.
158. Degner S. C., Papoutsis A. J., & Romagnolo D. F., “Health benefits of traditional culinary and medicinal Mediterranean plants. In R. Ross Watson (Ed.), *Complementary and alternative therapies and the aging population*”, New York: E-Publishing Inc, (2009), 541-562.
159. Peng C.H., Su J.D., Chyau C.C., Sung T.Y., Ho S. S., Peng C.C., et al., “Supercritical fluid extracts of rosemary leaves exhibit potent anti-inflammation and anti-tumor effects”, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, V.71, n°9, (2007), 2223–2232.
160. Bai N., He K., Roller M., Lai C.S., Shao X., Pan M.H. & Ho C.T., “Flavonoids and phenolic compounds from *Rosmarinus officinalis*”, *J. Agric. Food Chem.*, V.58, n°9, 5363–5367.
161. Dias P.C., Foglio M.A., Possenti A. & Carvalho J.E., “Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extracts of *Rosmarinus officinalis* L”, *J. Ethnopharmacol.*, V.69, 57-62.
162. Alnahdi H.S., “Effect of *Rosmarinus officinalis* extract on some Cardiac Enzymes of Streptozotocin-induced Diabetic Rats”, *J of Health Sci* V.2, (2012), 33-37.
163. Tsai C.W., Lin C.Y. & Wang Y.J., “Carnosic acid induces the NAD(P)H: quinone oxidoreductase expression in rat clone cells through the p38/nuclear factor erythroid-2 related factor pathway”, *J. Nutr.*, V.141, n°12, (2010), 2119–2125.
164. Slamenová D., Horváthová E., Kovacikova Z., Kozics K. & Hunakova L., “Administration of rosemary essential oil enhances resistance of rat hepatocytes against DNA-damaging oxidative agents”, *Food Chem.*, V.129, (2010), 64–70.

165. Fernández L.F., Palomino O.M. & Frutos G., “Effectiveness of *Rosmarinus officinalis* essential oil as antihypotensive agent in primary hypotensive patients and its influence on health-related quality of life”, *Journal of Ethnopharmacology*, V. 151, n° 1, (January 2014), 509–516.
166. Sanders C., Diego M., Fernandez M., Field T., Hernandez-Reif M. & Roca A., “EEG asymmetry responses to lavender and rosemary aromas in adults and infants”. *Int. J. Neurosci.*, V. 112, (2002), 1305-1032.
167. Heinrich, M., Kufer J., Leonti M. & Pardo-Santayana M., “Ethnobotany and Ethnopharmacology interdisciplinary links with the historical sciences”, *J. Ethnopharmacol.*, V. 26, (2006), 565-73.
168. Burt S., “Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review”. *Int. J. Food Microbiol.*, V.94, (2004), 223-253 p.
169. AFNOR (Association Française de Normalisation), “Recueil de normes : les huiles essentielles”. Tome 1. Echantillonnage et méthodes d’analyse. AFNOR, Paris, (2000), 440 p.
170. NORME ISO 9235 , “Matières premières d’origine naturelle- vocabulaire”, (2013).
171. PHARMACOPÉE EUROPEENNE, “Huile essentielle Aetherolea” (2008), 2098.01.
172. NICOLAS J. F., “Progrès en Dermato-Allergologie- Lyon”, John Libby Eurotext, (2013), 391p.
173. GAZENGEL J.M. & ORECCHIONI A.M., “ le préparateur en pharmacie – Guide théorique et pratique” 2 Ed. , Lavoisier, (2013),1761 p.
174. VIGAN M., “les huiles essentielles « leur retour et leur toxicité » in : progrès en dermato-allergologie”, bordeaux, John Libbey Eurotext, (2009), 391 p.
175. Baser K.H.C. & Demirci F., “Chemistry of essential oils. In: Flavours and fragrances—chemistry, bioprocessing and sustainability”. Springer, Berlin, (2007) 43–86.
176. Zuzarte M. & Lígia S., “Essential Oils Chemistry In: Damião Pergentino de Sousa : Bioactive Essential Oils and Cancer”, Springer, (octobre 2015), 292 p.

177. Prabuseeninivasan S., Jajakumar M. & ignacimuthu S., "In vitro antibacterial activity of some plant essential oils", *Bio Med Central Complementart and Alternative Medicine*, (2006), V. 6, N° 39.
178. Pourmortazavi S.M. & Hajimirsadeghi S.S., "Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis". *Journal of Chromatography*, (2007), V.1163, 2–24.
179. Kaloustian J. & Hadji-Minaglou F., "la connaissance des huiles essentielles : qualitologie et aromathérapie : entre science et tradition, une application médicale raisonnée", Springer Science & Business Media, (2013), 226 p.
180. Bardeau F., "Les huiles essentielles", Fernand Lanore, (2009), 315 p.
181. Teixeira da Silva J.A., "Mining the essential oils of the Anthemideae", *African Journal of Biotechnology*, Vol.3, (2004), 706-720.
182. Hammer K.A., Carson C.F., Dunstan J.A., Hale J., Lehmann H., Robinson C.J., Prescott S.L., & Riley T.V., "Antimicrobial and anti-inflammatory activity of five *Taxandria fragrans* oils in vitro". *Microbiology and immunology*, V. 52, (2008). 522-530.
183. Celiktas O. Y., Kocabas E. E. H., Bedir E. , Sukan F. V., Ozek T., & Baser K.H.C., "Antimicrobial activities of methanolextracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations", *Food Chemistry*, V.100, (2007), 553-559.
184. Hussain A.I., Anwar F., Sherazi S.T.H., Przybylski R., "Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations", *Food Chem.*, V.108, (2008), 986-995.
185. Anwar F., Ali M., Hussain A.I., & Shahid M., "Antioxidant and antimicrobial activities of essential oils and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Pakistan", *Flavour Fragr. J.*, V.24, (2009), 170-176.
186. Maffei M.E., "Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles", *South African Journal of Botany*, V.76, (2010), 612-63.
187. Karray-Bouraoui N., Rabhi M., Neffati M., Baldan B., Ranieri A., Marzouk B. et al., "Salt effect on yield and composition of shoot essential oil and trichome morphology and density on leaves of *Mentha pulegium*" *Industrial Crops and Products*, V.30, (2009), 338–343.

188. Oussalah M., Caillet S., Saicier L., Lacroix M., "Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a pseudomonas putida strain isolated from meat ", *eat Science*, V. 73, (2006), 236-244.
189. Anton R. & Lobstein A., "Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles ", Tec & Doc, Paris, (2005), 522 p.
190. Ahmadi L., Mirza M., & Shahmir F., "The volatile constituents of Artemisia marschaliana Sprengel and its secretory elements". *Flavour Fragr J.*, (2002). V.17, 141-143.
191. Bezić N., Šamanić I., Dunkić V., Besendorfer V., & Puizina J., "Essential Oil Composition and Internal Transcribed Spacer (ITS) Sequence Variability of Four South-Croatian Satureja Species (Lamiaceae)". *Molecules*, V.14, (2009), 925-938.
192. Ciccarelli D., Garbari F., & Pagni A.M., "The flower of Myrtus communis(Myrtaceae): Secretory structures, unicellular papillae, and their ecological role", *Flora*, V.203, (2008), 85-93.
193. Liolios C.C., Graikou K., Skaltsa E., & Chinou I., "Dittany of Crete: A botanical and ethnopharmacological", *Journal of Ethnopharmacology*, V.131, (2010), 229-241.
194. Morone-Fortunato I., Montemurro C., Ruta C., Perrini R., Sabetta W., Blanco A., Lorusso E., & Avato P., "Essential oils, genetic relationships and in vitro establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from wild Mediterranean germplasm", *Industrial Crops and Products*, V.32, (2010), 639-649.
195. Cava R., Nowak E., Taboada A. & Marin-Iniesta F., "Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk", *J. Food Prot.*, V.70, (2007) , 2757–2763.
196. Dvaranauskaite A., Venskutonis P., Raynaud C., Talou T., Viskelis P. & Sasnauskas A., "Variations in the essential oil composition in buds of six black currant (*Ribesnigrum* L.) cultivars at various development phases", *Food Chemistry*, V.114, n°2, (2009), 671–679 p.
197. Hill L.E., Gomes C. & Taylor T.M., "LWT – food science and technology characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans -cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove

- bud extracts) for antimicrobial delivery applications”, *LWT – Food Science and Technology*, V.51, (2013), 86-93.
198. Lv., Huang H., L Yu., Whent M., Niu Y., Shi H., et al., “Phenolic composition and nutraceutical properties of organic and conventional cinnamon and peppermint”, *Food Chemistry*, V.132, n°3, (2012), 1442-1450.
  199. Wannas W. A., Mhamdi B., Sriti J., Ben Jemia M., Ouchikh O., Hamdaoui G., et al., “Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower”, *An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association Food and Chemical Toxicology*, V.48, n°5, (2010), 1362-1370.
  200. Thompson J D., Chalchat J C., Michet A. & Linhart Y B., “EHLERS B- Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes”, *Journal of chemical ecology*, V.29, n°4, (2003).
  201. Ormeno E., Fernandez C. & Mévy J P., “Plant coexistence alters terpene emission and content of Mediterranean species”, *Phytochemistry*, V.68, (2007), 840-852.
  202. Porter N., “Essential oils and their production”, *Crop & Food Research*, n° 39, (2001).
  203. Guignard J. L. & Dupont F., “Botanique systématique moléculaire”, Ed. Masson. 13<sup>ème</sup> Edition.
  204. Carson C F. & Hammer K A., “Chemistry and Bioactivity of Essential Oils. In Thormar H. *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*”, United Kingdom, John Wiley & Sons Ltd, (2011), 204-238.
  205. Dudareva N., Krzyzanowska J., Oleszek W. & Pistelli L., “Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives”, *Critical Rev. Plant Sci.*, (2006), V.25, n° 5, 417-440.
  206. Unsicker S.B., Kunert G. & Gershenzon J., “Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores *Curr Opin*”, *Plant Biol.*, V.12, n°4, (2009), 479-485.

207. Cseke L.J., Kaufman P.B. & Kirakosyan A., "The Biology of Essential Oils in the Pollination of Flowers", *Natural product communications*, V.2, n°12, (2007), 1317-1336.
208. Pichersky E., Gershenzon J., "The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense", *Curr Opin Plant Biol.*, V.5, (2002), 237-243.
209. Yan X. & Chen S., "Regulation of plant glucosinolate metabolism", *Planta*, V.226, (2007), 1343-1352.
210. Bekhechi C., Boti J.B., Bekkara Abdelouahid D.E., Casanova J. & Toni F., "Isothymol in ajowan essential oil, *Nat Prod Commun*", V.5, n°7, (2010), 1107-1110.
211. Baldwin I.T., "Volatile Signaling in Plant-Plant Interactions: 'Talking Trees' in the Genomics Era", *Science*, V.311, (2006), 812-815.
212. Roux D., Chaumont J.P., Cieur C., Millet J., Morel J.M. & Tallec D., "Conseil en aromathérapie", *Pro-Officina*, 2<sup>ème</sup> Edition, (2008), 13-31.
213. Ferhat M A., Meklati B Y. & Chemat F., "Citrus d'Algérie : les huiles essentielles et leurs procédés d'extractions", Ed, Office des publications universitaires, Alger, (2010), 157 p.
214. Boukhobza F. & Goetz P., "Phytothérapie en odontology", Editions CdP Initiatives Santé, (février 2014), 226 p.
215. Baser K.H.C., Buchbauer G., "Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications", CRC Press NW, (2010).
216. Cassel E., Vargas R.M.F., Martinez N., Lorenzo D., Dellacassa E., "Steam distillation modeling for essential oil extraction process", *Ind. Crops Prod.*, V.29, (2009), 171-176.
217. Zhang X., Gao H., Zhang L., Liu D., Ye X., "Extraction of essential oil from discarded tobacco leaves by solvent extraction and steam distillation, and identification of its chemical composition", *Ind. Crops Prod.*, V.39, (2012), 162-169 p.
218. Moncada J., Tamayo J. A. & Cardona C A., "Techno-economic and environmental assessment of essential oil extraction from Oregano (*Origanum vulgare*) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in Colombia", *Journal of Cleaner Production*, (September 2015).

219. Boukhatem M. N., Hamaidi M .S., Saidi F. & Hakim Y., "Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie)", *Revue Nature et Technologie*, n° 03, (2010), 37-45.
220. Aboughe Angone S., Aworet Samseny C. & Eyele Mve M., "Quelques propriétés des huiles essentielles des plantes médicinales du Gabon", *Phytothérapie*, V.13, (2015), 283-287.
221. Marrouf A. & Tremblin G., "Abrégé de biochimie appliqué", Ed EDP science", (2009), 485 p.
222. Robert G., "Les Sens du Parfum.Osman", Eroylles Multimedia Paris, (2000), 224 p.
223. Proust B., "Petite Géométrie des Parfums", Éditions du Seuil Paris, (2006), 126 p.
224. Duraffourd C. & Lapraz J C., "Traité de phytothérapie clinique, médecine et endobiogenie", Edition masson, (2002), 7-139 p.
225. Hemwimon S., Pavasant P. & Shotiprux A., "Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda Citrifolia*", *Separation and Purification Technology*, (2007), 44-50.
226. Hattab M E., CulioliG., Piovetti L., Chitour S E. & Valls R., "Comparison of various extraction methods for identification and determination of volatile metabolites from the brown alga *Dictyopteris membranacea*", *Journal of Chromatography*, V.1143, (2007), 1–7.
227. Chiasson H., Bélanger A., Bostanian N., "Acaricidal properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) essential oils obtained by three methods of extraction", *J. Econ. Entomol*, (2001), 167-171.
228. Kaufmann B. & Christen P., "Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction", *Phytochem. Anal*, V.13, (2002), 105-113.
229. Olivero-Verbel J., González-Cervera T., Güette-Fernandez J., Jaramillo-Colorado B. & Stashenko E., "Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants", *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, V.20, n°4, (2010), 568-574.

230. Lucchesi M.E., Chemat F. & Smadja J., "Solvent free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs. Comparison with conventional hydro-distillation", *J Chromatogr A*, V.1043, (2004), 323-327.
231. Preema Devi M., Chakrabarty S., Ghosh S K. & Bhowmick N., "Essential Oil: Its Economic Aspect, Extraction, Importance, Uses, Hazards and Quality in : Amit Baran Sharangi, Suchand Datta; Value Addition of Horticultural Crops", *Recent Trends and Future Directions Springer*, (février 2015), 342 p.
232. Wang L. & Weller C.L., "Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants". *Trends in Food Science & Technology*, -V.17, n°6, (2006), 300-312.
233. Petrier C., Gondrexon N. & Boldo P., "Ultrasons et sonochimie. Techniques de l'ingénieur ", V. AF6310, (2008), 1-14.
234. Wenqiang G., Shufen L., Ruixiang Y., Shaokun T. & Can Q., "Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods". *Food Chem* .V.1001, (2007), 1558-1564.
235. Gupta V., Mittal P., Bansal P., Khokra S.L. & Kaushik D., "Pharmacological Potential of *Matricaria recutita*", *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, V. 2, (2010) 12-16.
236. Martín A., Varona S., Navarrete A. & Cocero M.J., "Encapsulation and CoPrecipitation Processes with Supercritical Fluids: Applications with Essential Oils", *The Open Chemical Engineering Journal*, V. 4, (2010), 31-41.
237. Skold M., Karlberg A.T., Matura M. & Borje A., "The fragrance chemical  $\beta$ -caryophyllene—air oxidation and skin sensitization", *Food and Chemical Toxicology*, V.44, (2006), 538–545.
238. Skold M., Hagvall L. & Karlberg A.T., "Autoxidation of linalyl acetate, the main compound of lavender oil, creates potent contact allergens", *Contact Dermatitis*, V.58, (2008), 9-14.
239. Miguel, M.G., "Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils". *Molecules*, V.15, (2010), 9252-9287.

240. Thormar, H., "Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents", John Wiley & Sons Chichester, (2011).
241. Sell, C.S. (2006). "The Chemistry of Fragrance. From Perfumer to Consumer", 2<sup>ème</sup> edition, The Royal Society of Chemistry. Cambridge. 329 p.
242. Andrade E.H.A., Alves C.N., Guimarães E.F., Carreira, L.M.M. & Maia, J.G.S., "Variability in essential oil composition of *Piper dilatatum* L.C. Rich". Biochem. Syst. Ecol., V.39, (2011), 669-675.
243. De Sousa D.P. Júnior G.A.S. Andrade L.N. & Batista J.S., "Spasmolytic Activity of Chiral Monoterpene Esters", Rec. Nat. Prod., V.5, (2011), 117-122.
244. Regnault- Roger C., Philogène Bernard J.R. & Vincent C. "biopesticides d'origine végétale", 2<sup>ème</sup> Ed., Lavoisier, (2008), 576 p.
245. Eisenreich W., Rohdich F. & Bacher A., "Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids", TRENDS in Plant Science, V. 6, n°2, (200), 78-84.
246. Bouwmeester H.J. (2006) "Engineering the essence of plants", Nat. Biotech. V. 24, 1359–1361.
247. Dubey V.S., Bhalla R. & Luthra R. "An overview of the non -mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants". J. Biosci. V.28, n°5, (2003), 637–646.
248. Brigitte-Milpied H., "Progrès en dermato-allergologie: Bordeaux 2009", John Libbey Eurotext, (2009), 391 p.
249. Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I. & Jovin E. "Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae essential oils", Journal of Agricultural and Food Chemistry, V.55, (2007), 7879–7885.
250. Calin-Sanchez A., Antoni S., Figiel A., Klaudiusz J., Maciej A., Angel A & Carbonell-Barrachin, "Effects of vacuum level and microwave power on rosemary volatile composition during vacuum–microwave drying", Journal of Food Engineering, V.103, (2011), 219–227.
251. Apostolides N. A. , El Beyrouthy M., Dhifi W. ,Najm S., Cazier F., Najem W., Labaki M. & AbouKaïs A., "Chemical Composition of Aerial Parts of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil Growing Wild in Lebanon", Journal of Essential Oil Bearing Plants, V. 16, n° 2, (2013), 274-282.

252. Koul O., Suresh W. & Dhaliwal G.S., "Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints", *Biopestic. Int.* V.4, n°1, (2008), 63–84.
253. Silvant C., "L'Aromathérapie : La nature au service de l'humanité", (2015), 208 p.
254. Zaouali Y., Bouzaine T. & Boussaid M., "Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities", *Food Chem. Toxicol.*, V.48, (2010), 3144–3152.
255. Tisserand R. & Young R., "Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals", 2ème Edition, (2013), 784.
256. Djilani A. & Dicko A., The therapeutic benefits of essential oils. In: Bouayed, J. Bohn T., *Nutrition, Well-being and Health*. Tech. Croatia, (2012), 155–178.
257. Alitonou G.A., Tchobo F.P., Sessou P., et al., "Chemical composition, antiradical and anti-inflammatory activities of four annonaceae from Benin", *IJPCBS*, V. 3, (2013), 914–23.
258. Eyele Mve Mba C., Menut C., Lamaty G., et al. "Aromatic plants of tropical central Africa. Part XIX. Volatile components from leaves of two lamiaceae from Cameroon: *leucas deflexa* hook and *Solenostemon monostachyus* (P. Beauv)" *Briq. Flav. Fragr. J.*, V.9, (1994), 315 p.
259. Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., et al., "Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils". *Food Chem.*, V. 102, (2007), 898–904.
260. Obame LC, Bongui JB, Andzi BT, et al. "Antifungal and antibacterial activities of *Aucoumea klaineana* Pierre Essential Oil From Gabon", *VRI Phytomed*, V. 2, (2014), 17–21.
261. Rasooli I., Fakoor M.H., Yadegarinia D., et al. "Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils". *Int J. Food Microbiol.*, V.122, (2008) 135–9
262. Soto-Mendivil E.A., Moreno-Rodriguez J.F., Estarron-Espinosa M., Garcia-Fajardo J.A. & Obledo-Vazquez E.N., "Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* against *Alternaria citri*-E-Gnosis", V.4, n°16, (2006).
263. Ouraini D., Agoumi A., Alaoui M.I., Alaoui K., Cherrah Y., Alaoui M.A. & Belabbas M.A., "Activité antifongique de l'acide oléique et des huiles

- essentielles de *Thymus saturejoides* L. et de *Mentha pulegium* L., comparé aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques”, *Phytothérapie*, V.1, (2007), 6-14.
264. De Billerbeck G., “Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques”. Springer, *Phytothérapie*, V.5, (2007), 249–253.
265. Mahmoodi A., Roomiani L., Soltani M., Basti A. A., Kamali A. & Taheri S., “Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils and Extracts from *Rosmarinus officinalis*, *Zataria multiflora*, *Anethum graveolens* and *Eucalyptus globulus*”, *Global Veterinaria*, V. 9, n°1, (2012), 73-79.
266. Prabuseenivasan S., Jayakumar M. & Ignacimuthu S., “*In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils”, *BMC Complement Altern. Med.*, V.6, n°39, (2006), 1-8.
267. Bousbia N., Vian M.A., Ferhat M.A., Petitcolas E., Meklati B.Y. & Chemat F., “Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity”, *Food Chem.*, V. 14, (2009), 355-362.
268. Hosni K., Hassen I., Chaâbane H., Jemli M., Dallali S. & Sebei H., “Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (*Thymus capitatus* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity”, *Ind. Crop Prod.*, V. 47, (2013), 291-299.
269. Piyo A., Udomsilp J., Khang-Khun P. & Thobunluepop P., “Antifungal activity of essential oils from basil (*Ocimum basilicum* Linn.) and sweet fennel (*Ocimum gratissimum* Linn.): Alternative strategies to control pathogenic fungi in organic rice”, *As. J. Food Ag-Ind. Special Issue*, (2009), S2-S9.
270. Hadizadeh I., Peivastegan B. & Hamzehzarghani H., “Antifungal activity of essential oils from some medicinal plants of Iran against *Alternaria alternata*”, *American Journal of Applied Sciences* V.6, n°5, (2009), 857-861.
271. Caillet S. & Lacroix M., “Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. INRS-Institut Armand-Frappier, (RESALA), (2007), 1-8.

272. Castano P., Hader I., Ciro G., Zapata J.E. & Jimenez S.L., "Bactericidal activity of ethanolic leaf extract and leaf essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. on some foodborne bacteria Vitae", J. Pharm. Chem. Faculty, V.17,n° 2, (2010), 149–154.
273. Cantrell C.L., Dayan F.E. & Duke S.O., "Natural products as sources for new pesticides", J. Nat. Prod.,V. 75, (2012), 1231–1242.
274. Isman M.B., Miresmailli S. & Machial C., "Commercial opportunities for pesticides based on plant essentials oils in agriculture, industry and consumer products" Phytochem. Rev., V.10, (2011), 197–204.
275. ZAIM A., Lahsen E. & Abdellah F., "Effets des huiles essentielles d'*Artemisia herba-alba* sur la survie des criquets adultes d'*Euchorthippus albolineatus* (Lucas, 1849)", Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, section Sciences de la Vie, V. 34, n°2, (2012), 127-133.
276. Pawar V.V. & Thaker V.S., "Evaluation of the anti- *Fusariumoxysporum* f. sp *cicer* and anti-*Alternaria porri* effects of some essential oils", *World J. Microb. Biot.*, V.23, (2007), 1099-1106.
277. Delimi A., Taibi F., Fissah A., Gherib S., Bouhkari M. & Cheffrou A., "Bio-activité des huiles essentielles de l'Armoise blanche *Artemessia herba alba* : effet sur la reproduction et la mortalité des adultes d'un ravageur des denrées stockées *Ephestia kuehniella*(Lepidoptera)", Afrique SCIENCE, V. 09, n°3, (2013), 82 – 90.
278. Bartosz G., "Generation of reactive oxygen species in biological systems", *Comments on Toxicology*,V. 9, (2003), 5-21.
279. Halliwell B. & Whiteman M., "Measuring reactive species and oxidative damage in vivoand in cell culture: how should you do it and what do the results mean?", *British journal of pharmacology*, V.142, (2004), 31-2.
280. Lehucher-Michel M.P., Lesgard, J.F., Delubac O. & Stocker P., "Durand, P., Prost, M. Stress oxydant et pathologies humaines", La Presse médicale, V. 30, (2001), 1076-1081.
281. Koechlin-Ramonatxo C., "Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires". *Nutrition clinique et métabolisme*, V. 20, (2006),165–177.

282. Berger M.M., "Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances", *Nutrition Clinique et Métabolisme*, V. 20, (2006), 48-53
283. Zelko I.N., Marian T.J. & Folz R.J., "Superoxide dismutase multigene family : a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression", *Free radical biology & medicine*, V. 33, (2002), 337-349.
284. Sorg O., "Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality", *Comptes Rendus Biologies*, V. 327, (2004), 649-662.
285. Favier A., "Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique", *L'actualité Chimique*, (2003), 108-115.
286. Neuzil J. & Stocker R., "Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin", *FEBS Letters*, V. 331, (1993), 281-284.
287. Martinez-Cayueta M., "Oxygen free radicals and human disease", *Biochimie*, V. 77, n°3, (1995), 147-61.
288. Garait B., "Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la Glisodin", Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université Joseph Fourier-Grenoble, (2006).
289. Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K. & Defraigne J.O., "Physiological action of antioxidant defences", *Nutrition Clinique et Métabolisme*, V. 16, (2002), 233-239.
290. Lisu W., Jui-Hung Y., Hsiao-Ling L. & Ming-Jiuan W., "Antioxydant effect of methanol extracts from *Lotus Plumule* and Blossom (*Nelumbo nucifera* Gertn)", *Journal of food and drug analysis*, V.11, n°1, (2003), 60-66.
291. Bourkhiss M., Hnach M.P., Costa J., Farah A. & Satrani B., "propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles des différentes parties de *tetraclinis articulata* (vahl) masters du maroc", *bulletin de la société royale des sciences de liège*, V. 79, (2010), 141-154.
292. Anonyme., DPTA., "Monographie de la Wilaya de Djelfa". Direction de la Pacification et de l'Aménagement du Territoire (DPTA), (2003), 6-22.
293. Nadia Brague-Bouragba., Ahmed Brague., Saliha Dellouli., François Lieutier., "Comparaison des peuplements de Coléoptères et d'Araignées

en zone reboisée et en zone steppique dans une région présaharienne d'Algérie", C. R. Biologies V.330, (2007), 923-939 p.

294. O.N.M., « Office National de la Météorologie », 2003-2013.
295. Lazouni H.A., Benmansour A., Taleb-bendiab S.A. & Chabane S.D., "Composition des constituants des huiles essentielles et valeurs nutritives du *Foeniculum vulgare* Mill", Journal of Sciences & Technologie, V.25, (2007), 7-12.
296. Boukssaim H., Ghanmi M., Satrani B., Aafi A., Aberchane M., Khia, A. Alaoui M. S. B., Chaouch A. & Farah A., "Caractérisation chimique et microbiologique des huiles essentielles des rameaux, des cônes et du bois de *Cupressus atlantica*, arbre forestier endémique du Maroc", Phytothérapie, V. 11, n° 5, (October 2013), 294-300.
297. Official Methods of Analysis (A.O.A.C), 17<sup>th</sup> Ed, Maryland, U.S.A., (2000), 360 pages.
298. Clevenger J.F., "Apparatus for the determination of volatile oil", J. Am. Pharm. Assoc., 17, (1928), 341-346.
299. PHARMACOPEE EUROPEENNE, 2005. 6ème Edition : Tome 1 et 2.
300. Bourkhiss M., Hnach M., Bourkhiss B., Ouhssine M., Chaouch A. & Satrani B., "Effet de séchage sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata (Vahl) Masters*", Agro-solutions, V.20, n°1, (2009), 45.
301. Seguin M. Tardif B., Deschenea J., "Physique XXI - Tome C - Ondes et physique moderne", De Boeck, (2010), 572p.
302. Wilkinson J.M., "Methods for testing the antimicrobial activity of extracts", Chapitre VIII, (2006), 157-165.
303. Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E. & Quentin R., "Bactériologie médicale. Techniques usuelles", Edition MASSON, (2007), 546 p.
304. Oussou K.R., Yolou S., Boti J.B., Guessennnd K.N., Kanko C., Ahibo C. & Casanovad J., "Etude chimique et activité anti-diarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée ivoirienne". European Journal of Scientific Research, V.24, n°1, (2008), 94-103.
305. Kaya T. & Koser H., "Direct Upstream Motility in *Escherichia Coli*", Biophysical Journal, V.102, n°7, (2012), 1514-1525.

306. Yang J., Nan .u, Yu-Jie F., Wei W., Meng L., Chun-Jian Z., Yuan-Gang Z. & Xiao-Lei L., “Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary”, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, V.32, (2011), 63–68.
307. Ghazghazi H., Aouadhi C. , Weslati M., Trakhna F., Sebei H., Maaroufi A. & Hasnaoui B., “Chemical Composition and *in vitro* Antimicrobial Activities of *Mentha pulegium* Leaves Extracts against Foodborne Pathogens”, *Journal of Food Safety*, V.33, n°3, (Aout 2013), 239–246.
308. Nikolić M., Glamočlija J., Ferreira I.C.F.R., Calhelha R. C., Fernandes Â., Marković T., Marković D., Giweli A. & Soković M., “Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and *Thymus vulgaris* L. essential oils”, *Industrial Crops and Products*, V. 52, (January 2014),183-190.
309. Molyneux P., “The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity Songklanakarín”, *J. Sci. Technol.*, V.26, n°2, (2004), 211-219.
310. Popovici C., Ilonka S. & Bartek T., “Evaluation de l’activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH”, *Revue de génie industriel*, V.4, (2009), 25-39.
311. Laguerre M., López-Giraldo L.J., Lecomte J., Pina M. & Villeneuve P., “Outils d’évaluation in vitro de la capacité antioxydante”, *Oilseeds & fats Crops and Lipids*, V. 14, n° 5, (Septembre-Octobre 2007), 278-292.
312. Szabo M.R., Iditoiu C., Chambre D. & Lupea A.X., “Improved DPPH determination of antioxidant activity spectrophotometric assay”, *Chem. Pap.*, V.61, n°3, (2007), 214-216.
313. Meléndez N.P., Nevárez-Moorillón V., Rodríguez-Herrera R., Espinoza J.C. & Aguilar C. N., “A microassay for quantification of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging”, *African Journal of Biochemistry Research*, V. 8, n°1, (January 2014), 14-18.
314. Asghar Z. & Masood Z., “Evaluation of antioxidant properties of silymarin and its potential to inhibit peroxy radicals in vitro”. *Pak. J. Pharm. Sci.*, V. 3, (2008), 249-254.

315. Martysiak-Żurowska D. & Wenta W., "A comparison of ABTS and DPPH methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk". *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, V. 1, n°11, (2012), 83-89.
316. Li W., Hosseinian F.S., Tsopmo A., Friel J.K. & Beta T., "Evaluation of antioxidant capacity and aroma quality of breast milk", *Nutrition*, V. 25, n°1, (2009), 105-114
317. Rolland Y., "Antioxydants naturels végétaux", *OCL*. V.11, n°6, (2004), 419-424.
318. Talbi H., Boumaza A., El-mostafa K., Talbi J. & Hilali A., "Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. ", *Environ. Sci.*, V. 6, n°4, (2015), 1111-1117.
319. Subramanion L.J., Zuraini Z. & Sasidharan S., "Phytochemicals screening, DPPH free radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activities of *Cassia fistula* seeds extract", *Journal of Medicinal Plants Research*, V. 5, n°10, (May 2011), 1941-1947.
320. Sharma R. K., Sharma N., Samant S. S., Nandi S. K. & Palni L. M. S., "Antioxidant Activities in Methanolic Extracts of *Olea Ferruginea* Royle Fruits" *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, V. 3, n° 2, (March 2013).
321. Sharma O.P. & Bhat T.K., "DPPH antioxidant assay revisited", *Food Chem.*, V.113, (2009), 1202–1205.
322. Santos C., Goreti B., Ilda C., Amílcar T., Fernanda M. & Ferreira, "Antioxidant activity assessment in fruit liquors and spirits: methods comparison", *Ciência Téc. Vitiv.* V.29, n°1, (2014), 28-34.
323. Kamkar A., Javan A.J., Asadi F. & Kamalinejad M., "The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil", *Food and Chemical Toxicology*, V.48, (2010), 1796-1800.
324. Meddour A., Yahia M., Benkiki N. & Ayachi A., "Etude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du *capparis spinosa* L. " *Lebanese Science Journal*, V.14, n°1, (2013).

325. Scherer R. & Godoy H. T., "Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl method", *Food Chemistry*, V.112, (2009), 654-658.
326. Sharififar F., Moshafi M.H., Mansouri S.H., Khodashenas M. & Khoshnoodi M., "In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss Food Control", V.18, (2007), 800–805.
327. Tirzitis G. & Bartosz G., "Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights", *ACTA ABP Biochimica Polonica*, V. 57, n° 1, (2010), 139–142.
328. Pérez-Jiménez, J. & Saura-Calixto F., "Antioxidant capacity of dietary polyphenols determined by ABTS assay: a kinetic expression of the results. International", *Journal of Food Science and Technology*, V. 43, (2008), 185-191.
329. Bougandoura N. & Bendimerad N., "Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq", *Revue « Nature & Technologie ». B- Sciences Agronomiques et Biologiques*, n°09, (2013), 14-19.
330. Nenadis N. & Tsimido M., "Observations on the estimation of scavenging activity of phenolic compounds using rapid 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH•) tests", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, V.79, n° 12, (2002), 1191-1195.
331. Villano D., Fernandez-Pachon M.S., Moya M.L., Troncoso A.M. & Garcia Parilla M.C., "Radical scavenging ability of phenolic compounds towards DPPH free radical", *Talanta*, V. 71, (2007), 230–235.
332. Barkat M. & Laib I., "Antioxidant activity of the essential oil from the flowers of *Lavandula stoechas*", *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, V.4, n°7, (2012), 96-101.
333. Brand-Williams W., Cuvelier M.E. & Berset C., "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, V.28, (1995), 25-30.
334. Marinova G. & Batchvarov V., "Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH", *Bulgarian*

- Journal of Agricultural Science, V.17, n°1, (2011), 11-24 Agricultural Academy.
335. Sanchez-Moreno C., Larrauri Jose A. & Saura-Calixto F.A., "Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols", Journal of the Science of Food and Agriculture, V.76, n°2, (1998), 270-276.
  336. Tepe B., Sokmen M., Akpulat H.A. & Sokmen A., "Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey", *Food Chem.*, V.95, (2006), 200-204.
  337. Athamena S., Chalghem I., A. Kassah-Laouar S., Laroui & Khebri S., "Activite anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L.", Lebanese Science Journal, V. 11, n°1, (2010), 69-81.
  338. M'hir S., Sifi S., Chammem N., Sifaoui I. , Mejri A., Moktar H. & Abderrabba M., "Antioxidant effect of essential oils of Thymus, Salvia and Rosemarinus on the stability to oxidation of refined oils", Annals of Biological Research, 2012, V.3, n°9, 2012, 4259-4263.
  339. Himed L. & Barkat M., "Élaboration d'une nouvelle margarine additionnée des huiles essentielles de Citrus limon ", Oilseeds & fats Crops and Lipids , OCL ,V.21, n°1, (2014), A102.
  340. Li H.B., Wong C-C., Cheng K-W. & Feng C., "Antioxidant properties in vitro and total Phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants", Lebensmittel- Wissenschaft and Technology, V. 41, n°3, (2008), 385–390.
  341. Jayaprakasha G. K. & Singh R.P., "Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro." Food Chemistiy, V.73, n°3, (2001), 285-290.
  342. Oyaizu M., "Studies on products of browning reaction : antioxydative activity of products of browning reaction", J Nutr. Japon, V.44, (1986), 307-315.
  343. Karagozler A., Erdag B. & Calmaz Emek Y., "Antioxydant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*", Food Chem , V.111, (2008), 400-407.
  344. Doukani K., Tabak S., Derriche A. & Hacini Z., "Etude physicochimique et phytochimique de quelques types de miels Algériens", Revue Ecologie-Environnement, V. 10, (2014), 37-49.

345. Chung Y.C., Chang C.T., Chao W.W., Lin C.F. & Chou S.T., "Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V. 50, (2002), 2454–2458.
346. Organisation Internationale de Normalisation (ISO 662), "Corps gras d'origines animale et végétale, Détermination de la teneur en eau et en matières volatiles", (1998), 7p.
347. Okoh O.O., Sadimenko A.P., Asekun O.T., et al. "The effects of drying on the chemical components of essential oils of *Calendula officinalis* L.", *African J. of Biotech.*, V. 7, n°10, (2008), 1500-1502.
348. Ahmadi K., Sefidkon F. & Osareh M.H., "Effect of drying methods on quantity and quality of essential oil three genotype of *Rosa damascene* Mill.", *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, V. 24, n°2, (2008), 162-176.
349. Ronicely R., Evandro M., Lauril R., Luiz B. & Jose M., "Effect of drying air temperature upon the essential oil content from Guaco". *International Conference of Agricultural Engineering, Brazil*, (2008), 1-4.
350. Diana L., Ronicely R., Evandro M., Evan V. & Antonio P., "Influence of drying air temperature on the essential oil content from *Melaleuca alternifolia* Cheel", *International Conference of Agricultural Engineering*, (2008), 1-4.
351. Singh B.P., "Germplasm introduction, exchange, collection and conservation of medicinal and aromatic plants-Their export potential", 2<sup>nd</sup> Edition, Aavishkar Publishers, Rajasthan, (2009), 1-26.
352. Aghfir M., Kouhila M., Jamali A. & Ait Mohamed L., "Séchage solaire convectif pour la conservation des feuilles de romarin (*Rosmarinus officinalis*)", J.I.T.H., Albi, France. ENSTIMAC, (2007), 5p.
353. Dabiré C.M., Eloi P., Roger H.Ch.N., Abdoul D.S., Jeanne M.R. & Mouhoussine N., "L'huile essentielle de *Grangea maderaspatana* (L.) poir. du Burkina Faso : rendement d'extraction et composition chimique", *J. Soc. Ouest-Afr. Chim.*, V. 28, (2009), 81-86.

354. Dabiré C., Roger H.C.N., André B., Mouhousine N. & Faustin S.S., "Effet du séchage de la matière végétale sur la composition chimique de l'huile essentielle et l'activité antioxydante d'extraits de *Ocimum basilicum* L.", Int. J. Biol. Chem. Sci., V. 5, n°3, (2011), 1082-1095.
355. Szumny A., Figiel A., Gutiérrez-Ortíz A. & Carbonell-Barrachina A.A., "Composition of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) as affected by drying method", Journal of Food Engineering, V. 97, n°2, (2010), 253-260.
356. Benjilali B. & Zrira S., "Plantes Aromatiques & médicinales. Atouts du secteur et exigences pour une valorisation durable ", Actes Edition, Rabat, (2005), 346 p.
357. Mighri H., Ahmed A , Casanova J. & Felix T., "Influence of Drying Time and Process on Artemisia herba-alba Asso Essential Oil Yield and Composition", Journal of essential oil-bearing plants JEOP, V.12, n°3, (2009), 358-364.
358. Souza C. R. F., Schiavetto I. A., Thomazini F. C. F. & Oliveira W. P. 2008. "Processing of *Rosmarinus officinalis* linne extract on spray and spotted bed dryers", *Brazilian journal of chemical engineering.*, V.25, n°1, (2008), 59-69.
359. Moghtader M. & Afzali D., "Study of the antibacterial properties of the essential oil of Rosemary". American- Eurasian J. Agric. Environ Sci., V. 5, n°3, (2009), 393-397.
360. Jordán M.J., Lax V., Rota M.C., Lorán S. & Sotomayor J. A., "Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and its polyphenolic extract", Industrial Crops and Products, V.48, (2013 a), 144– 152.
361. Jordán M.J., Lax V., Rota M.C., Lorán S. & Sotomayor J. A., "Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L." Food Control, V. 30, (2013b) 463-468.

362. Boukrich F., Zouari S., Neffati M., Abdelly C., Liu K., Casanova J. & Tomi F., "Chemical variability of *Artemisia herba-alba* Asso growing wild in Semi-arid and Arid Land (Tunisia)", *J. Essent. Oil Res.*, V. 22, (2010), 331-335.
363. Hamrouni-Sellami I., Maamouri E., Chahed T., Aidi Wannes W., Elyes Khouka M. & Marzouk B., "Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.)", *Ind. Crops Prod.* V. 30, (2009), 395–402.
364. Singh M. & Guleria N., "Influence of harvesting stage and inorganic and organic fertilizers on yield and oil composition of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in: a semi-arid tropical climate", *Industrial Crops and Products*, V. 42,(2013), 37-40.
365. Mighri H., Akrouf A., Casanova J., Tomi F. & Neffati M., "Impact of season and harvest frequency on biomass and essential oil yields of *Artemisia herba-alba* cultivated in southern Tunisian", *Exp. Agric.*, V. 4 & 5, (2009), 499-508.
366. Hudaiba M. & Aburjai T., "Composition of the essential oil from *Artemisia herba-alba* grown in Jordan", *J. Essential Oil Res.*, V. 18, n°3, (2006), 301-304.
367. Lograda T., Ramdani M., Chalard P. & Figueredo G., "Characteristics of essential oils of *Rosmarinus officinalis* from eastern Algeria", *Global Journal of Research on Medicinal Plants & Indigenous Medicine*, V.2, (2014), 794-807.
368. Fechtal M., Ismaili R. & Zine el Abidine A., "Effet de la transplantation sur la qualité et le rendement en huiles essentielles du romarin (*Rosmarinus officinalis* L.)", *Annales de la recherche forestière au Maroc*, V. 34, (2001), 94-102.
369. Fechtal M., Zine el Abidine A., Hachmi M., Sesbou A. & Karkouzi R., "Variabilité infraspecific du rendement et de la composition chimique des huiles essentielles du Romarin (*Rosmarinus officinalis* L.)", *Annales de la recherche forestière au Maroc*, V. 36 (2005), 98-106
370. Douiri L. F., Boughdad A., Moulay H. A. & Moumni M., "Biological Activity of *Rosmarinus Officinalis* Essential Oils against *Callosobruchus Maculatus*,

- (Coleoptera, Bruchinae)”, *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, V. 4, n°2, (2014), 5-14.
371. Ayadi S., Jerribi C. & Abderrebba M., “Extraction et étude des huiles essentielles de *Rosmarinus Officinalis* L. cueillie dans trois régions différentes de la tunisie”. *J Soc Alger Chim.*, V. 21, n°1, (2011), 25–33.
372. Van Vuuren S.F., Suliman S., Viljoen A.M., “The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials” *Lett. Appl. Microbiol.*, V. 48, (2009), 440–446.
373. Fellah M. R. & Abderraba M., “Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia officinalis* L. cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie”, *journal de la société algérienne de chimie*, V.16, n°2, (2006), 193-202.
374. Silano V. & Delbò M., “Assessment report on *Foeniculum vulgare* Miller ”, European Medicines Agency, London, (2008), 23 p.
375. Marzoukia H., Elaissib A., Khaldic A., Bouzidd S., Falconerie D., Marongiu B., Pirasa A. & Porcedda S., “Seasonal and geographical variation of *Laurus nobilis* L. essential oil from Tunisia”. *The Open Natural Products Journal*, V. 2, (2009), 86-91.
376. Tawfeeq A., Culham A., Davis F., Reeves M., “Does fertilizer type and method of application cause significant differences in essential oil yield and composition in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)?”, *Industrial Crops and Products*, V. 17, (2016), 88 p.
377. Mourni M., Elwatic L., Kassimi A. & Homrani B.A., “Insecticidal activity of the essential oil from seven accessions of *Artemisia herba-alba* asso domesticated in Errachidia (south-east of Morocco) against *Tribolium castaneum*”, *Int. Journal of Engineering Research and Applications*, V. 4, n°6, (2014), 33-36.
378. Dutta A., Batra J., Pandey-Rai S., Singh D., Kumar S. & Sen J., “Expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic pathway genes corresponds to accumulation of related alkaloids in *Catharanthus roseus* Planta”, V.83, (2005), 220–376

379. Hilan C., Sfeir R., Jawish D. & Aitour S., "Huiles essentielles de certaines plantes médicinales libanaises de la famille des Lamiaceae", *Libanaise Science Journal*, V.7, n°2, (2006), 13-22.
380. Shakhnoza S.A., Anna I.G. & Valentina I.V., "Lipids, Lipophilic Components and Essential Oils from Plant Sources", Springer Science & Business Media", (2011), 992.
381. Office National Interprofessionnel des Plantes à Parfum, Aromatiques et Médicinale, ONIPPAM, "Filière Plantes Aromatiques et à Parfum, Synthèse régionale : Alternatives Agricoles à l'arrachage de la vigne", (2008), 1-8.
382. Kanko C., Sawaliho B.E., Kone S., Koukoua G. & N'guessan Y.T., "Etude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus*", *Comptes rendus Chimie*, V. 7, (2004), 1039-1042.
383. Salido S., Valenzuela L.R., Altarejos J., Nogueras M., Sanchez A. & Cano E. "Composition and infraspecific variability of *Artemisia herba-alba* from southern Spain", *Biochem. Syst. Ecol.*, V. 32, (2004), 265-277.
384. Paolini J., El Ouariachi, E.M., Bouyanzer A., Hammouti B., Desjobert J.M., Costa J. & Muselli A., "Chemical variability of *Artemisia herba-alba* Asso essential oils from East Morocco", *Chemical Papers*, V. 64, (2010), 550-556.
385. Bouchikhi T., Z., Bendahou M. & Khelil M.A. "Lutte contre la bruche *acanthoscelides obtectus* et la mite *tineola bisselliella* par les huiles essentielles extraites de deux plantes aromatiques d'Algerie', *Lebanese Sci. J.*, V. 11, n°1, (2010), 55-68.
386. Dahmani-Hamzaoui N. & Baaliouamer A., "Chemical composition of Algerian *Artemisia herba-alba* essential oils isolated by microwave and hydrodistillation", *J. Essential Oil Res.*, V. 22, n°6, (2010), 514-517.
387. Dob T. & Ben Abdelkader T., "Chemical composition of the essential oil of *Artemisia herba-alba* asso grown in Algeria", *J. Essen. Oil Res.*, V.18, (2006), 685-690.
388. Dahmani-Hamzani N. & Baaliouamer A., "Chemical composition of the Algerian essential oil of *Artemisia herba-alba* native to Dejelfa", *Riv. Ital. EPPOS.*, V. 40, (2005).

389. Maiza-Benabdesselam F., Bekka F., Touati A., Ceyhan Gören A. & Benallaoua S., "Antibacterial activity of essential oils of two Algerian medicinal plants: *origanum glandulosum* desf. and *artemisia herba alba* asso", *Life Sciences Leaflets*, V. 16, 583-594.
390. Bouzidi N., Mederbal K. & Raho G. B., "Antioxidant Activity of Essential Oil of *Artemisia herba alba*", *J. Appl. Environ. Biol. Sci.*, V.6, n°5, (2016), 59-65.
391. Houbairi S., Elmiziani I., Lamiri A. & Essahli M., "Comparison of the Antioxidant Activity of Aromatic Medicinal Plants of Moroccan Origin", *European Journal of Medicinal Plants*, V.10, (2015), 1-10.
392. Boutkhil S., El Idrissi M., Amechrouq A., Lakhlifi T. & Chakir S. "Chemical composition of the essential oil of *Artemisia herba Alba* (Asso) populations", *Phys. & Chem. News*, V. 47, (2009), 133-137.
393. Sharifian I., Hashemi S.M., Aghaei M. & Alizadeh M., "Insecticidal activity of *Artemisia herba-alba* Asso against three stored product beetles", *Biharean Biologist*, V. 6, (2012), 90-93.
394. Aghaei M., Alizadeh M. & Sharifian I. "Chemical composition of essential oil of *Artemisia herba-alba* from West Azerbaijan, Iran", *E.J. Env. Agric. & Food Chem.*, V. 10, n°6, (2011), 2413-2416.
395. Salido S., Altarejos J., Nogueras M. & Sánchez A. "Chemical composition of the essential oil of *Artemisia herba-alba* Asso ssp. *valentina* (Lam.) Marcl", *J. Essential Oil Res.*, V. 13, n° 4, (2001), 221-224.
396. Abaas I.S., Hamzah J. M. & Ali H.M., "Analysis with evaluation of drying temperature on essential oil content of *Achillea frayrantissima* L. and *Artemisia herb-alba* L.", *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, V. 5, n°3, (2013), 913-914.
397. Vernin, G., Merad, O., Vernin, G.M.F., Zamkotsian, R.M., Pa'rká 'nyi, C., "GC-MS analysis of *Artemisia herba-alba*Asso essential oils from Algeria. In: Charalambous, G. (Ed.), *Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence*", Elsevier Science BV, Amsterdam, (1995), 147-205.
398. Akrouit A., AL Jani H., Amouri S. & Neffati M. "Screening of antiradical and antibacterial activities of essential oils of *Artemisia campestris* L., *Artemisia herba-alba* Asso, & *Thymus capitatus* Hoff. Et Link. Growing wild in the

- southern of Tunisia”, *Recent Research in Science and Technology*, V. 2, n°1, (2010), 29-39.
399. Mighri, H., Akrouf, A., Neffati, M., Tomi, F. & Casanova, J., “The essential oil from *Artemisia herba-alba* Asso cultivated in Arid Land (South Tunisia)”, *J. Essent. Oil Res.* 21, (2009c), 453–456.
400. Mighri, H., Akrouf, A., El-jeni, H., Zaidi, S., Tomi, F., Casanova, J. & Neffati, M., “Composition and intraspecific chemical variability of the essential oil from *Artemisia herba alba* growing wild in a Tunisian arid zone”, *Chem. Biodivers.*, V. 7, (2010), 2709–2717.
401. Aleksandar R., Isidora M., Nebojša P., Tatjana Č., Saša V. & Momir M., “Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective Potential”, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, V. 14, (2014), 1-9.
402. Fernández L.F., Palomino O.M., Frutos G., “Effectiveness of *Rosmarinus officinalis* essential oil as antihypotensive agent in primary hypotensive patients and its influence on health-related quality of life”, *Journal of Ethnopharmacology*, V. 151, n° 1, (January 2014), 509–516.
403. Giordani R., Hadeif Y., Kaloustian J., “Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants”, *Fitoterapia*, V.79, n°3, (2008), 199-203.
404. Bekkara A.F., Bousmaha L., Taleb B.S.A., BOTI J.B., CASANOV J., “Composition chimique de l’huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. poussant à l’état spontané et cultivé de la région de Tlemcen”, *Biologie et santé*, V. 7, n°1, (2007), 5-10.
405. Zoubiri S. & Baaliouamer A. , “Chemical composition and insecticidal properties of some aromatic herbs essential oils from Algeria”, *Food Chemistry*, V. 29,n° 1, (2011),179–182.
406. Kabouche Z., Boutaghane N., Laggoune S., Kabouche A., Aitkaki Z. & Benlabed K., “Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria”, *The international J. of Aromatherapy*, V. 15, (2005), 129-133.
407. Touafek O., Nacer A., Kabouche A., Kabouche Z., & Bruneau C., “Chemical composition of the essential oil of *Rosmarinus officinalis*

- cultivated in the Algerian Sahara”, *Chemistry of Natural Compounds*, V. 40, n°1, (2004), 28-29.
408. Matsuzaki Y., Toshiyuki T., Tatsuji N., Mari N. & Yasuaki K., “Antifungal activity of chemotype essential oils from rosemary against *Candida albicans*”, *Open Journal of Stomatology*, V. 3, (2013), 176-182.
409. Martins M.R., Tinoco M.T., Almeida A.S., & CRUZ-MORAIS J., “chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of three essential oils from portuguese flora”, *Journal of Pharmacognosy*, V 3, n° 1, (2012), 39-44.
410. Socaci Sonia A., Tofană M. & Socaciu C., “The Evaluation of Rosemary Essential Oil Variability Compared with that of Rosemary Leaves”, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, V. 16, n°2, (2010), 117–122.
411. Salehi P., Fakhari A. R., Ebrahimi S. N., Heydari R., “Rapid essential oil screening of *Rosmarinus officinalis* L. by hydrodistillation–headspace solvent microextraction”, *Flavour and Fragrance journal*, V. 22, n°4, (2007), 280–285.
412. Tigrine-Kordjani N., Chemat F., Meklati B.Y., Tuduri L., Giraudel J.L. & Montury M., “Relative characterization of rosemary samples according to their geographical origins using microwave-accelerated distillation, solid-phase microextraction and kohonen self-organizing maps”, *Anal. Bioanal. Chem.*, (2007), 389-631
413. Tantry, M. A., Akbar, S., Dar, J. A., Irtiza, S., Galal, A., Khuroo, M. A. & Ghazanfar, K., “Acylated flavonol glycoside from *Platanus orientalis*” *Fitoterapia*, V.83, (2012), 281-285.
414. Kutbay I. & Akfirat F.Ş., “Mapping of Biochemical Constituents in *Platanus acerifolia* Leaves By Analytical Techniques *Procedia*”, *Social and Behavioral Sciences*, V. 195 (2015), 1719 – 1727
415. Okoh O.O., Sadimenko A.P. & Sadimenko A.J.A. “Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods”, *Food Chem.*, V. 120, (2010), 308-312.

416. Moreira M. R., Ponce A. G., Del Valle C. E. & Roura S. I., "Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen", *LWT*, V.38, (2005), 565-570.
417. Djeddi S., Bouchenah N., Settar I. & Skaltsa HD., "Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algeria", *Chem. Natural Comp*, V. 43, n° 4, (2007), 487-490.
418. Kazemi M., Rostami H., & Ameri A., "The study of compositions and Antimicrobial Properties of Essential oil of *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* on Human Pathogens". *C.R.B.*, V. 5 , n°1, (2012), 1-12.
419. Mouchem F.Z., Hellal B., Ayad N. & Ayache A., "The antibacterial effect of the sagebrush essential oil (*Artemisia herba-alba* Asso.) of Western Algeria", *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, V. 7, n°5, (2015), 1305-1309.
420. Al-Shuneigat J., Al- Sarayreh S., Al-Qudah M., Al-Tarawneh I., Al-Saraireh Y. & Al-Qtaitat A., "GC-MS Analysis and Antibacterial Activity of the Essential Oil Isolated from Wild *Artemisia herba-alba* Grown in South Jordan", *Article no.BJMMR*, V. 5, n°3, (2015), 297-302.
421. Sbayou H., Ababou B., Boukachabine K., Angeles M., Zerouali K. & Amghar S., "Chemical Composition and Antibacterial Activity of *Artemisia herba-alba* and *Mentha pulegium* Essential Oils", *Journal of Life Sciences*, V. 8, n° 1, (2014), 35-41.
422. Ouibrahim A., Tlili-Ait-kaki Y., Bennadja S., Amrouni S., Djahoudi A.G., & Djebbar M. R., " Evaluation of antibacterial activity of *Laurus nobilis* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Ocimum basilicum* L. from Northeast of Algeria", *African Journal of Microbiology*, V. 7 n° 42, (2013), 4968-4973.
423. Tahri M., Bouchra I., Hassan A., Marie-Laure F. & Elbachiri A., "The Chemical compositions and the Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Essential Oil of *Rosemary* Leaves from Eastern Morocco", *J. Mater. Environ. Sci.* V.6, n°3, (2015), 666- 672.
424. Chahboun N., Esmail A., Rhaïem N., Abed H., Amiyare R., Barrahi M., Berrabeh M., Oudda H. & Ouhssine M., "Extraction and study of the essential oil *Rosmarinus Officinalis* Cuellie in the Region of Taza",

- Morocco, Scholars Research Library, Der Pharma Chemica, V.6,n°3, (2014), 367-372.
425. Nedorostova L. & Kloucek P., "Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria", *Food Control*, V. 20, (2009),157–60.
426. Basli A. & Chibane M., "Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie : *Origanum glandulosum* Desf", *Phytothérapie*, V. 10, (2012), 2–9.
427. Barchan A., Bakkali M., Arakrak A. & Laglaou A., "Effet antibactérien et anti-biofilm de trois espèces de *Mentha*: *Mentha spicata*, *Mentha pulegium* et *Mentha piperita*", *Phytothérapie*, (2015).
428. Dorman H.J.D., Deans S.G., "Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils", *Journal of Applied Microbiology*, V. 88, (2000), 308-316.
429. Ultee A., Bennik M.H.J., Moezelaar R., "The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*". *Applied and Environmental Microbiology*. V. 68, (2002), 1561–1568.
430. Hogan D. & Kolter R., "Why are bacteria refractory to antimicrobials", *Curr Op Microbiol*, V. 5, (2002), 272–4.
431. Karakaya S., El Sedef N., Karagozlu N., Sahin S. & Sumnu G., "Beste Bayramoglu Microwave-assisted hydrodistillation of essential oil from rosemary" , *J Food Sci Technol*, V. 51, n°6, (June 2014) 1056–1065.
432. Nikaido H., "Multidrug resistance in bacteria", *Annu. Rev. Biochem.*, V.78, (2009), 119–146.
433. Humberto M.B., Silva Filho E.C., Edeltrudes D.O. L., Coutinho H.D.M., Morais-Braga M.F.B., Tavares C. C.A., Tintino S.R., Rego J.V., De Abreu A.P.L., Lustosa M.d. C.G., Oliveira R.W.G., Citó A.M.G.L. & Lopes J.A. D., "Chemical composition and possible use as adjuvant of the antibiotic therapy of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L.", *Industrial Crops and Products*, V. 59, (August 2014), 290-294.
434. Abi-Ayad, S.-M. E.-A., Bensahla, T. A., Ali Mehidi, S., Dalouche, F. and Meliani, F. M., "Some aspects on the reproductive cycle of European conger eel, *Conger conger* (Linnaeus, 1758) (Osteichthyes,

- Anguilliformes, Congridae) captured from Western Algerian coasts: a histological description of spermatogenesis”, *Biodiversity Journal*, V. 2, n°3, (2011), 107-114.
435. Mann C.M., Cox S.D., Markham J.L., “The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil)”, *Lett. Appl. Microbiol.*, V. 30, (2000), 294-297.
436. Georgantelis D., Ambrosiadis I., Katikou P., Blekas G., & Georgakis S.A., “Effect of rosemary extract, chitosan and  $\alpha$ -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4°C”, *Meat Science*, V. 76, (2007), 172-181
437. Aligiannis N., Kalpoutzakis E., Mitaku S. & Chinou I. B. “Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two *Origanum* Species”, *J. Agric. Food Chem*, V. 49, (2001), 4168–4170.
438. Nowak A., Kalemba D., Krala L., Piotrowska M., Czyzowska A.. “The effects of thyme (*Thymus vulgaris*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils on *Brochothrix thermosphacta* and on the shelf life of beef packaged in high-oxygen modified atmosphere”. *Food Microbiology*, V.32, (2012), 212–216.
439. Vimal V. & Aarathi John S.B., “Superdisintegrants in Fast Disintegrating Drug Delivery Systems”, *International Journal of Pharmacy*, V.3, n°2, (2013), 380-385.
440. Souza E.L., Guerr N.B., Stamford T.L.M. & Lima E.O., “Spices: alternative sources of antimicrobial compounds to use in food conservation”. *Rev. Bras. Farm.*, V.87 ,n°1, (2006), 22-25
441. Bajpai V.K., & Kang S.C., “Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu”. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* V.87, (2010), 327-336.
442. Benchaar C., Calsamiglia S., Chaves A.V., Fraser G.R., Colombatto D., McAllister T.A., “Plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production”. *Animal Feed Science and Technology*. V.145, (2008), 209–228.
443. Pinto E., Pina-Vaz C., Salgueiro L., Goncalves M.J., Costa-de-Oliveira S., Cavaleiro C., Pinto G., Usai M., Bradesi P., Juliano C., Boatto G., Tomi F.,

- Chessa M., Cerri R. & Casanova J., "Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and corsical", *J. Flavor Fragrance*, V. 17, (2002), 15-19
444. Carmo E.S., Lima E.D.O., & De Souza E.L., "The potential of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species". *Brazilian Journal of Microbiology*. V.39, (2008), 362-367.
445. Bajpai V.K., Shukla S., & Kang S.C., "Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria* L". *Bioresource Technology* V.99, (2008), 8903-8908.
446. Yen T-B., & Chang S-T., "Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi". *Bioresource Technology*. V.99, (2008), 232-236.
447. Cox S.D., Mann C.M., Markam J.L., "Interaction between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*". *Journal of Applied Microbiology*. V.91, (2001), 492-497.
448. Freeman L., & Carel Y., "Aromathérapie". *Nutra News Science, Nutrition, Prévention et Santé* (2006).
449. Kurita N., Miyaji M., Kurane R., Takahara Y & Ichimura K. -Antifungal activity and molecular orbital energies of aldehyde compounds from oils of higher plants. *Agric. Bil. Chem.* 1979, 43 : 2365-2371.
450. Mahmoud B. S. M., Yamazaki K., Miyashita K., Il-Shik S., Dong-Suk C. & Suzuki T., "Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds". *Food Microbiology*. V.21, (2004), 657-666.
451. Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P.W., Castillejos L. & Ferret A., "Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation", *Journal of Dairy Science*, V.90, (2007), 2580-2595.
452. Tariku Y., Hymete A., Hailu A. & Rohloff J., "In vitro evaluation of antileishmanial activity and toxicity of essential oils of *Artemisia absinthium* and *Echinops kebericho*". *Chemistry Biodiversity*, V.8 2011, 614-623.

453. Guesmi A., Boudabous A., "Activité antimicrobienne de cinq huiles essentielles associées dans les produits de thalassothérapie". *Revue des Régions Arides*, numéro spécial, (2006), 224-230.
454. Mutai, C., C. Bii, C. Vagias, D. Abatis and V. Roussis, 2009. Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes. *J. Ethnopharmacol.*, 123: 143-148.
455. Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R., & Wyllie S.G., "The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil)", *Journal of Applied Microbiology*, V. 88, (2000), 170-175.
456. Kolai N., Saiah F. & Boudia A., "Effet inhibiteur *in vitro* de l'huile essentielle D'*Artemisia herba alba* sur deux souches de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*", *Algerian journal of arid environment*, V. 2, n°1, (2012), 71-76.
457. Janačković P., Novaković J., Soković M., Ljubodrag V., Abdulhmid A., Giweli Z. D. S. & Petar D. M., "Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Artemisia judaica*, *herba-alba* and *a. arborescens* from libya", *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, V. 67, n°2,(2015), 455-466.
458. Pitarokili D., Tzakou O., Loukis A., Harvala C., "Métabolites volatils à partir de *Salvia frucicosa* comme agents antifongiques dans soilborne agents pathogènes". *J. de l'agriculture et de chimie des aliments*, V. 51, n° 11, (2003), 3294-3301.
459. Santoyo S., Caveros S., Jaime L., Ibanez E., Senoran F. J. & Reglero G., "Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction", *J. Food Prot.*, V. 68, n°4, (2005), 790-795.
460. Lima I.O., Oliveira R.A.G., Lima E.O., Farias N.M.P. & Souza E.L., "Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Rev Bras Farmacogn*". V.16, n°2, (2006), 197-201.
461. La Torre A., Caradonia F., Matere A., & Battaglia V., "Using plant essential oils to control *Fusarium* wilt in tomato plants", *Eur J Plant Pathol*, (2015).
462. Suppakul P., Miltz J., Sonneveld K., & Bigger S. W., "Antimicrobial properties of Basil and its possible application in food packaging", *J.Agric. Food Chem.*, V.51, (2003), 3197-3207

463. Natalia da Silva Bomfim, Lydiana Polis Nakassugi, Jessica Faggion Pinheiro Oliveira, Cassia Yumie Kohiyama, Simone Aparecida Galerani Mossini, Renata Grespan, Samuel Botião Nerilo, Carlos Augusto Mallmann, Benicio Alves Abreu Filho, Miguel Machinski Jr. Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg Food Chemistry, Volume 166, 1 January 2015, Pages 330-336
464. Tepe B., Donmez E., Unlu M., Candan F., Daferera D., Vardar-Unlu G., Polissiod M. & Sokmen A., "Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl)", Food Chem., V.84, n°4, (2004), 519-525.
465. Barra A., Coroneo V., Dessi S., Cabras P. & Angioni A., "Chemical variability, antifungal and antioxidant activity of *Eucalyptus camaldulensis* essential oil from Sardinia", Nat. Prod. Commun., V. 5, (2010), 329-335.
466. Ouraini D., Agoumi A., Alaoui M.I., Alaoui K., Cherrah Y., Alaoui M.A. & Belabbas M.A., "Activité antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de *Thymus saturejoides* L. et de *Mentha pulegium* L., comparé aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques- Phytothérapie ", V.1, (2007), 6-14.
467. Sepahvand R., Delfan B., Ghanbarzadeh S., Rashidipour M., Veiskarami H. G., Ghasemian-Yadegari J., "Chemical composition, antioxidant activity and antibacterial effect of essential oil of the aerial parts of *Salvia sclareoides*" Asian Pac J Trop Med, V.7, n°1, (2014), S491-S496
468. Deba F., Xuan T.D., Yasuda M. & Tawata S., "Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn.", Var Radiata. Food Control, V.19 (2008), pp. 346–352.
469. Moon T., Wilkinson J. M., & Cavanagh H. M., "Antiparasitic activity of two *Lavandula* essential oils against *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Hexamita inflata*". Parasitol. Res. V. 99, (2006), 722-728.
470. Weerakkody N.S., Caffin N., Turner M. S., & Dykes G. A., "In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria", Food Control, V.21, (2010), 1408-1414.

471. Tabanca N., Kirimer N., Demirci B., Demirci F., Baser K.H.C., "Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Micromeria cristata* subsp. *phrygia* and the enantiomeric distribution of borneol", *J. Agric. Food Chem* 49 (2001) 4300-3.
472. Wang W ., Nan L ., Meng L ., Yuangang., & Thomas E., "Antibacterial Activity and Anticancer Activity of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil Compared to That of Its Main Components", *Molecules*, V.17, (2012), 2704-2713.
473. Faleiro M.L., Miguel M.G., Ladeiro F., Vanancio F., Tavarses R., Brito J.C., Figueiredo A.C., Barrosa J.G., & Pedro L.G., "Antimicrobial activity of essential oils isolated from *Portuguese endemic* species of *Thymus*", *Lett. Appl. Microbiol.*, V.36, (2003), 35-40.
474. Bassolé I.H.N., & Juliani H.R., "Essential oils in combination and their antimicrobial properties", *Molecules*, V. 17, (2012), 3989-4006.
475. Regnier T., Plooy W.D., Combrinck S. & Botha B., "Fungitoxicity of *Lippia scaberrima* essential oil and selected terpenoid components on two mango postharvest spoilage pathogens. *Postharvest Biology and Technology*", V.48, (2008), 254-258.
476. Ivanovic J., Mistic D., Zizovic I. & Ristic M., "In vitro control of multiplication of some food-associated bacteria by thyme, rosemary and sage isolates". *Food Control*.V. 25,n°1, (2012), 110-116.
477. Rota M.C., Herrera A., Martínez R.M., Sotomayor J.A. & Jordán M.J., "Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils", *Food Control*, V.19, (2008), 681-687.
478. Ronald L. P., Wu X. & Schaich K., "Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V. 53, n° 10, (2005).
479. Meléndez Norma P., Nevárez-Moorillón V., Raúl Rodríguez-Herrera J.C., Espinoza & Cristóbal N., Aguilar, "A microassay for quantification of 2,2-diphenyl-1-picrylhydracyl (DPPH) free radical scavenging", *African Journal of Biochemistry Research* V.8, n°1,(2014), 14-18.

480. Singh, R., Singh N., Saini B. S. & Rao H., "In vitro antioxidant activity of pet ether extract of black pepper". *Indian Journal of Pharmacology*, V. 40, n°4, (2008), 147-151.
481. Tabart, J., Kevers C., Pincenmail J., Defraigne J. O. & Dommes J., (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests, *Food Chemistry*, 113(4): 1226-1233.
482. Conforti F., Statti G., Uzunov D. & Menichini F., "Comparative chemical composition and antioxidant activities of wild and cultivated *Laurus nobilis* L. leaves and *Foeniculum vulgare* subsp. *Piperitum* (Ucria) coutinho seeds". *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, V.29 ,n°10, (2006), 2056-2064.
483. Villano D., Fernandez-Pachon M.S., Moya M.L., Troncoso A.M. & GarciaParilla M.C., "Radical scavenging ability of phenolic compounds towards DPPH free radical", *Talanta*, V.71, (2007), 230–235.
484. Pekkarinen S.S., Heinonen I.M. & Hopia A.I., "Flavonoids quercetin, myricetin, kaempferol and (+)-catechin as antioxidants in methyl linoleate", *J Sci Food Agric*, V. 79, (1999), 499-506.
485. Koleva I.I., van Beek T.A., Linssen J.P.H., de Groot A. & Evstatieva L.N., "Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods", *Phytochem. Analysis*. V. 13, (2001), 8–17.
486. Kulisic T., Radonic A., Katalinic V., Milos M., "Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil". *Food Chem*. V.85, (2004), 633–640.
487. Wu C.F., Jing-Yu Y., Fang W. & Xiao-Xiao W., "Resveratrol: botanical origin, pharmacological activity and applications", *Chinese Journal of Natural Medicines*, V. 11, n°1, (2013), 1-15.
488. Huang D., Ou B. & Prior R. L., "The chemistry behind antioxidant capacity assays", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V. 53, (2005), 1841-1856.
489. Ladoh Yemeda C.F., Dibong S.D., Nyegue M.A. & Djembissi Talla R.P., Lenta Ndjakou B., Mpondo, Mpondo E., Yinyang J., Wansi J.D., "Activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Phragmanthera capitata* (Loranthaceae) récoltée sur *Citrus sinensis*", *Journal of Applied Biosciences*. V.84, (2014), 7636– 7643.

490. Jasna M., Posavec S., Kazazic S., Stanzer D.& Stehlik-Tomas A., "Spirit drinks: a source of dietary polyphenols", *Croat. J. Food Sci. Technol.*, V. 4, n°2, (2012), 102-111.
491. Katsarou A., Rhizopoulou S., & P. Kefalas., "Antioxidant Potential of the Aerial Tissues of the Mistletoe *Loranthus europaeus* Jacq. Records of Natural Products", V.6, n°4, (2012), 394–397.
492. Bidié A., N'Guessan B.B., Yapo A.F., N'Guessan J.D & Djaman A.J., "Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne". *Sciences et Nature*, V. 8 , n°1, (2011), 1-11.
493. Santos-Sanchez N.F., Flores-Parra A., Valadez-Blanco R., Fernandez-Rojas B., Martinez-Vasquez J.B. & Salas-Coronado R., " Polyphenolic content, free radical scavenging activity and isolation of Tiliroside from *Heliocarpus terebinthinaceus* (*Tiliaceae*) Seeds", *Journal of Biological Sciences*, V. 14, n°5, (2014), 376-380.
494. Lopez-Lutz D., Alviano D.S., Alviano C.S. & Kolodziejczyk P.P., "Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils", *Phytochem.*, V .69, (2008), 1732-1738.
495. Riahi L., Chograni H., Elferchichi M., Zaouali Y., Zoghلامي N. & Mliki A., "Variations in Tunisian wormwood essential oil profiles and phenolic contents between leaves and flowers and their effects on antioxidant activities", *Ind. Crop. Prod.*, V .46, (2013), 290-296.
496. Politeo O., Jukié M. & Milos M., "Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils of Twelve Spice Plants", *Croatica Chemica*, V.79, n°4, (2006), 545-552.
497. Bounatirou S., Smiti S., Miguel M. G., Faleiro L., Rejeb M. N., Neffati M., "Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et link", *Food Chemistry*, V.105, (2007) 146-155.
498. Ruberto G., Baratta MT., "Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems". *Food Chem.* V. 69, (2000), 167-174.
499. Erdogan-Orhan I., Baki E., Senol S., Yilmaz G., "Sage-called plant species sold in Turkey and their antioxidant activities". *J Serb Chem Soc.* V. 75, (2010), 1491–1501.

500. Ghedadba N., Bousselsela H., Hambaba L., Benbia S., Mouloud Y., "Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L", *Phytothérapie*, V.12,(2014), 15-24.
501. Kadri A., Zarai Z., Chobba B., Bekir A., Gharsallah N., Damak M. & Gadoura R., "Chemical constituents and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil cultivated from south-western of Tunisia". *J. Med. Plants Res.* V.5, n°29, (2011), 6502-6508.
502. Miladi H., Ben Slama R., Mili D., Zouari S., Bakhrouf A. & Ammar E., "Chemical composition and cytotoxic and antioxidant activities of *Satureja montana* L. essential oil and its antibacterial potential against *Salmonella spp.* Strains". *Journal of Chemistry*, (2013), 9p.
503. Bourgou S., Ksouri R., Bellila A., Skandrani I., Falleh H. & Marzouk B., "Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots". *C. R. Biologies*, V.331,(2008), 48–55.
504. Rašković A., Milanović I., Pavlović N., Čebović T., Vukmirović S. & Mikov M., "Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential", *BMC Complementary and Alternative Medicine*, V.14, (2014),225- 234.
505. El-Massry K. F., El-Ghorab A. H. & Farouk A., "Antioxydant activity and volatile components of Egyptian *Artemisia judaica* L.", *Food Chemistry*, V. 79, (2002), 331–336.
506. Wang B., Zhang W., Duan X. & Li X., "In vitro antioxidative activities of extract and semi-purified fractions of the marine red alga, *Rhodomela confervoids*(*Rhodomelaceae*)", *Food Chem*, V.113, (2009) 1101-1105. Zhang D. Y., Yao X.H., Duan M.H., Wei F.Y., Wu G.H. & Li L., "Variation of essential oil content and antioxidant activity of *Lonicera* species in different sites of China", *Industrial Crops and Products*, V. 77, (December 2015), 772–779.
507. Hussain A., "Characterization and biological activities of essential oils of some species of *Lamiaceae*", *Thèse de Doctorat. Pakistan*, (2009), 257.
508. FRANKEL 1994
509. Frankel E.N., & Meyer A.S., "The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants".

Journal of the Science of Food and Agriculture, V. 80n°13, (2000), 1925–1941

510. Bouzid W., Yahia M., Abdeddaim M., Aberkane M.C., & Ayachi A., “evaluation de l’activite antioxydante et antimicrobienne des extraits de *l’aubepine monogyne*”, *Lebanese Science Journal*, V.12, n° 1, (2011)
511. Liyana-Pathirana C. M., & Shahidi F., “Antioxidant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions”. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, V.86, (2006), 477–485.
512. Miliauskas G., Venskutonis P.R., & van Beek T.A., “creening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts”, *Food Chem.* V.85, (2004), 231-237.
513. Multon J.L., “Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires”, Paris, Lavoisier, (2002), 207 – 231.
514. Zhu, Q.Y., Hackman R.M., Ensunsa J.L., Holt R.R. & Keen C.L., “Antioxidative activities of oolong tea”, *J. Agric. Food Chem.*, V.50, (2002), 6929-6934.
515. Khalil I., Moniruzzaman M., Boukraâ L., Benhanifia M., Islam A., Islam N., Sulaiman S.A. & Gan S.H., Physicochemical and antioxidant properties of Algerian honey. *Molecules.* V. 17, (2012), 11199-11215.
516. Amarowicz R., Pegg R., Rahimi-Moghaddam P., Barl B., Weil J., “Free-radical scavenging capacity antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies”. *Food Chem.* V.84, (2004), 551-562.
517. Ferreira, I.C.F.R., Baptista P., Vilas-Boas M., & Barros L., “Free radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity”. *Food Chem.* V.100, (2007), 1511-1516.
518. Gardner P.T., White T.A.C., McPhail D.B., Duthie G.G., “The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices”. *Food Chemistry* .V.68,(2000), 471-74.
519. Siddhuraju P., & Becker K., “The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts”, *Food Chemistry*, V.101, (2007), 10-19.

520. Jeong S.M., So-Young K., Dong-Ryul K., Seong-Chun J., Nam K.C., Ahn D.U. & Seung-Cheol L., "Effect of Heat Treatment on the Antioxidant Activity of Extracts from Citrus Peels", *J. Agric. Food Chem.*, V.52, (2004), 3389-3393
521. Yildirim A., Mavi A., Kara A.A., "Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* V.9, (2001), 4083-4089.
522. Aouadi D., Giuseppe L., Valentina V., Nasri S., Daniela M.R.B., Abidi S., Priolo A., Ben Salem H., "The antioxidant status and oxidative stability of muscle from lambs receiving oral administration of *Artemisia herba alba* and *Rosmarinus officinalis* essential oils", *Meat Science*, V.97, (2014), 237-243.
523. Kasrati A., Alaoui J.C., Fadli M., Bekkouche K., Hassani L., Wohlmuth H. et al. "Antioxidative activity and synergistic effect of *Thymus saturejoides* Coss. essential oils with cefixime against selected food-borne bacteria", *Industrial Crops and Products*, V. 61, (2014), 338-344.
524. Dandien, S.A., Lima, A.S., Mendes, M.D., Miguel, M.G., Faleiro, M.L., Sousa, M.J., Pedro, L.G., Barroso, J.G., Figueiredo, A.C., "Antioxidant activity of six Portuguese thyme species essential oils", *Flavour and Fragrance Journal*, V.25, n°3, (2010), 150-155.
525. Karadag A., Beraat O., Samim S., "Methods to Determine Antioxidant Capacities", *Food Anal. Methods*, V.2, (2009), 41-60.
526. Tabart J., Claire K., Joël P., Jean-Olivier D., Jacques D., "Evaluation of spectrophotometric methods for antioxidant compound measurement in relation to total antioxidant capacity in beverages", *Food Chemistry*, V. 120, n°2, (2010), 607-614.
527. Ghiaba Z., Boukouada M., Saidi M., Yousfi M., Ghiaba N., Kendour Z., "Comparison of antioxidant activity and phenolic content of three varieties of Algerian dates", *Algerian journal of arid environment*, V. 2, n°1, (2012), 42-48.
528. Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S., Radice M. & Bruni R., "Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin

as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods“, Food Chem., V.91, (2005), 621-632.

529. Pukalskas A., Venskutonis P.R., Salido S., et *al.*, “Isolation, identification and activity of natural antioxidants from horehound (*Marrubium vulgare* L.) cultivated in Lithuania”. Food Chem, V. 130, (2012), 695–701.
530. Kadri A., Zarai A., Békir A., et *al.*, “Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia”, Afr J Biotechnol, V. 10, (2011), 3908–14.
531. Barkat M. & Laib I., “Composition chimique et activité antioxydante de l’huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis*, Revue de génie industriel, V. 6, (2011), 46-54.
532. Lu F & Foo L.Y., “Antioxidant activity of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*)”, Food Chemistry, 75, 2001, p: 197-202



