

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA

Faculté des Sciences Agro-Vétérinaires

Département des Sciences Agronomiques

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : AGRO-RESSOURCES

EXTRACTION, CARACTERISATION ET EFFET ANTIMICROBIEN DE
L'HUILE ESSENTIELLE D'*Artemisia absinthium*

Par

SIHEM BENMIMOUNE

Devant le jury composé de :

S.A. SNOUSSI	Professeur, USD. Blida	Président
F.Z. BENREBIHA	Professeur, USD. Blida	Promotrice
S.A. AIT YAHIA	Maître assistant A, USD. Blida	Co-promoteur
Z. DJAZOULI	Maître de conférences A, USD. Blida	Examineur
T. HADJ SADDOK	Maître de conférences B, USD. Blida	Examineur

Blida, Juin 2012

RESUME

Notre étude est basée sur une caractérisation chimique et phytochimique de l'*Artemisia absinthium* L et sur des tests *in vitro* pour mettre en évidence des activités biologiques de l'huile essentielle et l'extrait naturel.

Une comparaison qualitative et quantitative de l'huile essentielle extraite par deux procédés d'extraction a été réalisée par l'analyse de CG/SM et par le calcul de rendement. La méthode de l'hydrodistillation a fournit une composition chimique et une teneur en huile meilleures à celle de l'entraînement à la vapeur d'eau. Ces huiles sont composées majoritairement de thuyone suivi de chamazulène et de ρ -cymène.

L'activité antimicrobienne de l'huile d'absinthe a été testée *in vitro* selon deux méthodes (diffusion sur gélose et microdilution) sur quatre champignons phytopathogènes (*Aspergillus sp*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum* et *Helminthosporium sp*). L'étude de l'effet antifongique a montré que cette huile a un effet inhibiteur vis-à-vis les microorganismes testés en particulier la souche *Botrytis cinerea*. Par ailleurs, cette activité dépend de la nature de l'huile et du germe lui-même.

L'activité antioxydante *in vitro* a été étudiée avec la méthode au DPPH. Le test d'activité montre que l'huile et l'extrait d'*Artemisia absinthium* présentent un très faible pouvoir antioxydant comparativement aux antioxydants pris comme référence. L'extrait est doté d'un pouvoir antiradicalaire potentiellement élevé pas rapport à son huile.

Les dosages quantitatifs des composés phénoliques par la méthode de Folin-Ciocalteu ont révélé que l'absinthe est pauvre en polyphénols totaux et en tanins.

Mots clés : absinthe, huile essentielle, procédés d'extraction, extrait, rendement, étude chimique, activités biologiques, *in vitro*, étude phytochimique.

ABSTRACT

Our study is based on chemical and phytochemical characterization of *Artemisia absinthium* L and *in vitro* tests to demonstrate the biological activities of essential oil and natural extract.

A qualitative and quantitative comparison of the essential oil extracted by two extraction procedures was performed by analysis of CG/SM and the yield calculation. The method of hydrodistillation has a chemical composition and provides an oil content than the best training water vapor. These oils are composed mainly of thujone followed chamazulene and ρ -cymene.

The antimicrobial activity of wormwood oil was tested *in vitro* by two methods (agar diffusion and microdilution) on four plant pathogenic fungi (*Aspergillus sp*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum* and *Helminthosporium sp*). The study of the antifungal effect showed that this oil has an inhibitory effect counterpart the microorganisms tested in particular the strain *Botrytis cinerea*. Otherwise, this activity depends on the nature of the oil and the germ itself.

The antioxidant activity *in vitro* was studied with the DPPH method. The activity test shows that the oil and extract of *Artemisia absinthium* have a very low antioxidant capacity compared to the antioxidants used as a reference. The extract has a potentially high antiradical power not from its oil.

The quantitative determinations of phenolic compounds by the Folin-Ciocalteu revealed that absinthe is low in total polyphenols and tannins.

Key words: *Artemisia absinthium*, essential oil, extraction processes, extract, yield, chemical study, biological activities, *in vitro*, phytochemical study.

ملخص

تستند دراستنا في الخصائص المواد الكيميائية و الكيميائية النباتية من *Artemisia absinthium* و على فحوص مخبرية إين فيترو للتدليل على الأنشطة البيولوجية من الزيت الأساسي و المستخلص الطبيعي.

تم إجراء مقارنة نوعية و كمية من الزيت العطري المستخرج من قبل عمليتين استخراج كان بالتحليل CG/MS و حساب العائد.

تزود طريقة hydrodistillation بتركيب كيميائي و محتوى الزيت أفضل من *entraînement à la vapeur* و تتكون هذه الزيوت بشكل رئيسي من *thuyone* يتبع *chamazulène* و *p-cymène*.

تم اختبار نشاط مضادات الميكروبات من زيت الأفسنتين في التجارب المخبرية من قبل تقنيتين (*microdilution et diffusion sur gélose*) على أربعة فطريات الممرضة للنباتات *culmorum, Botrytis cinerea, Aspergillus sp*) و *Fusarium, Helminthosporium sp*.

أظهرت دراسة تأثير مضاد للفطريات أن هذا الزيت له تأثير مثبط ضد الميكروبات في اختبار السلالة على وجه الخصوص *Botrytis cinerea*. و علاوة على ذلك، فإن هذا النشاط يعتمد على طبيعة الزيت و الجرثومية نفسها.

تمت دراسة نشاط مضادات الأكسدة في التجارب المخبرية باستخدام طريقة DPPH. اختبار النشاط يدل على أن الزيت و المستخلص الطبيعي للأفسنتين لديها قدرة مضادة للأكسدة منخفضة جدًا بالمقارنة مع المواد المضادة للأكسدة استخدامها كمرجع المستخلص لديه طاقة عالية بالمقارنة مع زيتته.

كشفت التحديدات الكمية من المركبات الفينولية عن طريقة Folin-Ciocalteu أن الأفسنتين منخفضة في إجمالي البوليفينول و التانينات.

الكلمات المفتاحية: الأفسنتين، زيت الأساسية، عمليات الاستخلاص، المستخلص الطبيعي، إنتاج، دراسة كيميائية، النشاطات البيولوجية، إين فيترو، دراسة كيميائية نباتية.

REMERCIEMENTS

Je remercie avant tout **Allah** le tout puissant de m'avoir donné la volonté et la force de mener à bien ce modeste travail.

Je remercie chaleureusement, ma promotrice Mme BENREBIHA F/Z de m'avoir dirigé, orienté et aidé par ses précieux conseils tout le long de ce travail, de sa rigueur scientifique et de ses qualités humaines.

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude à mon co-promoteur en l'occurrence Mr AIT YAHIA pour son aide et ces orientations pour lesquelles ils m'ont été d'une grande utilité.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur SNOUSSI pour avoir accepté de présider le jury. Sans oublier les examinateurs en l'occurrence le Docteur DJAZOULI et HADJ SADDOK qui m'ont fait l'honneur d'étudier et d'apprécier ma modeste contribution.

Je remercie également mes Professeur ACHOUCH et BENMOUSSA pour leur gentillesse et leur aide.

Je remercie également le Professeur SABAOU de l'Ecole Normale Supérieure de KOUBA - ALGER de m'avoir bien voulu m'autoriser à utiliser les souches agricoles existantes au sein de son auguste laboratoire. Je tiens à remercier également le Docteur BOUTOUMI de l'université de BLIDA pour ces précieux conseils.

Mes remerciements vont aussi à Mme AIT YAHIA et Mr TAREK de l'Ecole Normale Supérieure de KOUBA – ALGER pour les commentaires et les suggestions qu'ils m'ont servis à la confection de ce mémoire.

Mes sincères remerciements vont en particulier :

- A mes très chers parents pour le soutien et les encouragements qu'ils m'ont témoignés durant tout mon cycle universitaire et en particulier à mon père pour ses orientations et ses précieux conseils. A ma sœur unique pour son aide matérielle et sa disponibilité, sans oublier mes deux frères pour leurs aides et encouragements ainsi qu'à mes belles sœurs.

- A MERABTINE A. de m'avoir soutenu, encouragé tout le long de ce travail, de sa patience et de sa disponibilité.
- A ma très chère copine Arissan pour ces encouragements et son soutien.
- A tout le personnel du laboratoire de physiologie végétale et de l'amélioration du département d'agronomie et du laboratoire de cosmétologie du département de chimie de l'USDB.
- A mademoiselle Khalida, ingénieur en agronomie pour m'avoir aidé à localiser et à extraire la plante à Cherchell.
- Aux anciens diplômés de Magister Khadidja, Karima et Amina du département d'agronomie pour leur aide.
- Aux diplômés d'ingénieur en agronomie : Abdelbaki, Samir, Malika, Amina, Yacine, Sarah, Safia, Amina et Hanane
- Aux diplômés de Master en chimie : Nassima, Djilali et Malika.
- A tous mes collègues de PG « agro ressources » pour leur aide en particulier Hadjira, Mohamed et Billel.
- Aux étudiants de Magister en agronomie: Samah, Fatiha, Asma et Salema.
- A mes collègues de travail de l'ITAFV : Nassima, Salima, Amina et Chouaib.
- A Mr Kamel, responsable de la bibliothèque et à Mr RIAD responsable du centre de calcul du département d'Agronomie USDB

DEDICACES

A mes très chers parents

A ma sœur, mes frères et à Abdelatif

A mes belles sœurs

A ma grand-mère lui souhaitant longue vie

A la mémoire de mon grand père

A tous ceux qui me sont chers

...Sihem

TABLE DES MATIERES

RESUME

ABSTRACT

ملخص

REMERCIEMENTS

DEDICACES

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

GLOSSAIRE

INTRODUCTION.....	9
CHAPITRE 1 : PRESENTATION DE LA PLANTE.....	13
1.1. Généralités.....	13
1.2. Historique.....	13
1.3. Origine et distribution géographique.....	13
1.4. Etude botanique et biologique de l'absinthe.....	14
1.4.1. Classification classique.....	14
1.4.2. Noms communs.....	14
1.5. Biologie de la plante.....	15
1.6. Exigences écologiques.....	17
1.6.1 Climatiques.....	17
1.6.2 Edaphiques.....	17
1.7. Composition chimique de l'absinthe.....	18
1.7.1. Substances amères.....	18
1.7.2. Huiles essentielles.....	18
1.7.3. Autres constituants.....	18
1.7.3.1. Flavonoïdes.....	18
1.7.3.2. Coumarines.....	18

1.7.3.3. Acides phénols.....	19
1.8. Utilisations de l'absinthe.....	19
1.8.1. Propriétés thérapeutiques.....	19
1.8.2. Usage culinaire.....	20
1.8.3. Usage agronomique.....	20

**CHAPITRE 2 : LES HUILES ESSENTIELLES, LES POLYPHENOLS ET LES
ACTIVITES BIOLOGIQUES.....21**

2.1. Huile essentielle.....	21
2.1.1. Définition.....	21
2.1.2. Intérêts.....	21
2.1.3. Synthèse et localisation.....	21
2.1.4. Propriétés physiques.....	22
2.1.5. Composition chimique des huiles essentielles.....	22
2.1.5.1. Terpènes.....	22
2.1.5.1.1. Monoterpènes.....	23
2.1.5.1.2. Sesquiterpènes.....	23
2.1.5.2. Composés aromatiques.....	23
2.1.5.3. Composés d'origine diverses.....	23
2.1.6. Effets biologiques de l'huile essentielle.....	23
2.1.7. Composition chimique de l'huile essentielle de l'absinthe.....	26
2.1.8. Techniques d'extraction.....	26
2.1.8.1. Distillation.....	27
2.1.8.2. Expression à froid.....	27
2.1.8.3. Extraction au CO ₂ supercritique.....	28
2.1.9. Conservation.....	28
2.1.10. Facteurs intervenant dans la qualité et la quantité des huiles essentielles.....	28
2.1.10.1. Cycle végétatif.....	28

2.1.10.2. Facteurs extrinsèques.....	28
2.1.10.3. Influence du procédé d'obtention.....	29
2.1.11. Domaines d'utilisation des huiles essentielles.....	29
2.1.11.1. En thérapeutique.....	29
2.1.11.2. En industrie agro-alimentaire.....	29
2.1.11.3. En cosmétique.....	30
2.1.12. Toxicité des huiles essentielles.....	30
2.2. Composés phénoliques.....	30
2.2.1. Définition.....	30
2.2.2. Effets biologiques des polyphénols.....	31
2.2.3. Technique d'extraction.....	32
2.2.4. Catégories des polyphénols.....	32
2.2.4.1. Formes les plus simples.....	32
2.2.4.1.1. Acides phénoliques.....	32
2.2.4.1.2. Coumarines.....	32
2.2.4.1.3. Flavonoïdes.....	33
2.2.4.2. Forme condensée (tanin).....	33
2.3. Activités biologiques.....	33
2.3.1. Activité antimicrobienne.....	34
2.3.1.1. Technique de micro-atmosphère.....	34
2.3.1.2. Technique par contact direct.....	34
2.3.1.2.1. Aromatogramme.....	34
2.3.1.2.2. Méthode du puits ou cylindre.....	35
2.3.2. Activité antioxydante.....	35
2.3.2.1. Radicaux libres.....	35
2.3.2.2. Antioxydants.....	36
2.3.2.2.1. Définition.....	36
2.3.2.2.2. Principaux antioxydants.....	36
2.3.2.2.2.1. Antioxydants naturels.....	36

2.3.2.2.2. Antioxydants de synthèse.....	38
2.3.2.3. Mécanismes d'action des antioxydants.....	38
CHAPITRE 3 : MATERIELS ET METHODES.....	39
3.1. Lieux d'expérimentation.....	39
3.2. Dispositif expérimental.....	39
3.3. Matériel végétal.....	40
3.3.1. Cueillette et identification de la plante.....	40
3.3.2. Conservation.....	40
3.4. Caractéristiques climatiques de la région d'étude.....	41
3.4.1. Température de la région de Cherchell.....	41
3.4.2. Pluviométrie de la région de Cherchell.....	41
3.5. Huile essentielle.....	42
3.5.1. Protocole expérimental.....	42
3.5.1.1. Hydrodistillation.....	42
3.5.1.2. Entraînement à la vapeur.....	42
3.5.1.3. Récupération de l'huile essentielle de l'absinthe.....	43
3.5.2. Rendement.....	45
3.5.3. Analyse qualitative et semi-quantitative des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM).....	45
3.6. Extrait naturel.....	46
3.6.1. Méthode de macération.....	46
3.6.2. Procédure expérimentale.....	46
3.7. Tests des effets biologiques.....	47
3.7.1. Tests d'activité antimicrobienne.....	47
3.7.1.1. Micro-organismes étudiés.....	47
3.7.1.2. Procédure microbiologique.....	50
3.7.1.2.1. Zone d'inhibition (Z.I).....	50
3.7.1.2.1.1. Principe.....	50

3.7.1.2.1.2. Procédure expérimentale.....	50
3.7.1.2.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	52
3.7.2. Test d'activité antioxydante.....	53
3.7.2.1. Principe.....	53
3.7.2.2. Préparation de solutions.....	54
3.7.2.3. Procédure expérimentale.....	55
3.7.2.4. Expression des résultats.....	55
3.8. Etude phytochimique.....	56
3.8.1. Dosage des phénols totaux.....	56
3.8.1.1. Principe.....	56
3.8.1.2. Procédure expérimentale.....	56
3.8.2. Dosage des tanins.....	58
3.9. Analyse statistique des résultats.....	58
CHAPITRE 4 : RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	59
4.1. Rendement et composition chimique de l'huile essentielle de l'absinthe.....	59
4.1.1. Rendement en huile essentielle.....	59
4.1.2. Composition chimique de l'huile essentielle de l'absinthe par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	61
4.1.2.1. Hydrodistillation.....	61
4.1.2.2. Entraînement à la vapeur d'eau.....	65
4.2. Propriétés de l'extrait.....	73
4.3. Effets biologiques.....	74
4.3.1. Pouvoir antimicrobien.....	74
4.3.1.1. Etude de l'effet antifongique par la méthode de diffusion sur gélose.....	74
4.3.1.2. Etude de l'effet antifongique par la méthode de microdilution.....	78
4.3.2. Pouvoir antioxydant.....	83

4.3.2.1. Activité de piégeage du radical DPPH par les échantillons étudiés.....	83
4.3.2.2. Activité de piégeage du radical DPPH par les étalons d'antioxydants.....	85
4.3.2.3. Détermination de EC ₅₀	88
4.4. Analyse phytochimique.....	90
4.4.1. Teneur des phénols totaux.....	90
4.4.2. Teneur des tanins.....	91
CONCLUSION.....	95
APPENDICES.....	97
REFERENCES.....	108

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1: Schéma d' <i>Artemisia absinthium</i> L [45].....	17
Figure 1.2: Une touffe d'absinthe [original].....	17
Figure 1.3 : Feuilles d'absinthe [original].....	18
Figure 1.4 : Habitat d' <i>Artemisia absinthium</i> L [original].....	18
Figure 2.1 : Effets biologiques des polyphénols [99].....	32
Figure 3.1 : Absinthe [original].....	41
Figure 3.2: Endroit de séchage de la plante [original].....	41
Figure 3.3 : Feuilles sèches d'absinthe [original]	41
Figure 3.4: Le montage de l'hydrodistillation [original].....	43
Figure 3.5 : Le montage de l'entraînement à la vapeur d'eau [original].....	44
Figure 3.6 : Différentes étapes de récupération des huiles essentielles de l'absinthe [original].....	45
Figure 3.7: Préparation de l'extrait brut à partir de la matière végétale sèche.....	48
Figure 3.8 : Les souches phytopathogènes testés [original].....	49
Figure 3.9 : Principe de la méthode de diffusion sur gélose.....	51
Figure 3.10 : Différentes étapes de la zone d'inhibition [original].....	53
Figure 3.11 : Différentes étapes de la CMI [original].....	54
Figure 3.12 : Forme libre et réduite du radical DPPH [184 ; 185].....	55
Figure 3.13 : Différentes étapes du test au DPPH [original].....	56
Figure 3.14 : Protocole de mise en œuvre du test de dosage des phénols totaux....	58
Figure 4.1 : Effet des procédés d'extraction sur le rendement en huile essentielle...61	61

Figure 4.2 : Huile essentielle d'absinthe.....	60
Figure 4.3: Profil chromatographique de la composition chimique de l'huile essentielle de l'absinthe extraite par l'hydrodistillation.....	62
Figure 4.4: Histogramme des différents constituants de l'huile essentielle d' <i>Artemisia absinthium</i> L extraite par l'hydrodistillation (HD) et l'entraînement à la vapeur d'eau (EV).....	66
Figure 4.5 : Histogramme des constituants majoritaires de l'huile essentielle d' <i>Artemisia absinthium</i> L extraite par l'hydrodistillation.....	67
Figure 4.6: Profil chromatographique de la composition chimique de l'huile essentielle de l'absinthe extraite par l'entraînement à la vapeur d'eau.....	68
Figure 4.7 : Histogramme des constituants majoritaires de l'huile essentielle de l'absinthe extraite par l'entraînement à la vapeur d'eau.....	69
Figure 4.8 : Histogramme représentant les différentes familles chimiques de composés de l'huile essentielle d'absinthe extraite par l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur d'eau.....	70
Figure 4.9 : Extrait d'absinthe.....	75
Figure 4.10 : Histogramme représentant l'activité antifongique de l'huile essentielle étudiée vis-à-vis de différentes souches.....	77
Figure 4.11 : Représentation des zones d'inhibition des souches testées.....	79
Figure 4.12 : Représentation de l'aspect des champignons testés à différentes concentrations de l'huile essentielle de l'absinthe.....	82
Figure 4.13 : Activité antioxydante de l'huile et d'extrait d'absinthe.....	86
Figure 4.14 : Evolution de l'activité antioxydante en fonction de la concentration des échantillons testés.....	86
Figure 4.15 : Activité antioxydante des différents standards.....	88

Figure 4.16 : Evolution de l'activité antioxydante en fonction de la concentration des étalons d'antioxydants.....	88
Figure 4.17 : Histogramme représentant l'activité antioxydante des antioxydants standards.....	90
Figure 4.18: Histogramme représentant les valeurs de EC ₅₀ des échantillons testés et les antioxydants de référence.....	91
Figure 4.19 : Courbe d'étalonnage des phénols totaux.....	93
Figure 4.20 : Courbe d'étalonnage des tanins.....	94
Figure 4.21: Teneur en phénols totaux et en tanins (mg d'équivalent étalon/g d'extrait).....	95
Tableau 2.1 : Bioactivités et structure de quelques composés aromatiques constituant les huiles essentielles [75 -77].....	25
Tableau 3.1 : Valeurs des températures de la région de Cherchell [155].....	42
Tableau 3.2 : Les valeurs des précipitations de la région de Cherchell [155].....	42
Tableau 3.3 : Caractéristiques des souches microbiennes testées.....	50
Tableau 4.1 : Test de NEWMAN et KEULS du facteur procédés d'extraction sur le rendement en huile essentielle.....	59
Tableau 4.2 : Composition chimique de l'huile essentielle de l'absinthe extraite par l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur d'eau.....	63
Tableau 4.3 : Comparaison entre les teneurs (%) des différentes familles chimiques de composé de l'huile essentielle d'absinthe extraite par deux procédés d'extraction.....	67
Tableau 4.4: Comparaison entre les teneurs (%) des composés majoritaires de l'huile essentielle d'absinthe de l'Algérie avec ceux des autres pays.....	70

Tableau 4.5: Comparaison entre les teneurs (%) des différentes familles chimiques de composés de l'huile essentielle d'absinthe de l'Algérie avec ceux des autres pays.....	72
Tableau 4.6 : Test de NEWMAN et KEULS du facteur souche phytopathogène sur le diamètre des zones d'inhibitions ZI (mm).....	74
Tableau 4.7 : Activité antifongique de l'huile essentielle d' <i>Artemisia absinthium</i> à différentes concentrations.....	78
Tableau 4.8 : Variation du taux de piégeage du radical DPPH en fonction des différentes concentrations de l'huile essentielle et de l'extrait d'absinthe.....	83
Tableau 4.9 : Variation du taux de piégeage du DPPH en fonction des différentes concentrations des étalons d'antioxydants.....	85
Tableau 4.10 : Test de NEWMAN et KEULS du facteur antioxydants de référence sur l'activité antioxydante.....	86
Tableau 4.11 : EC ₅₀ des échantillons naturels et des standards.....	88
Tableau 4.12 : Teneur en phénols totaux.....	92
Tableau 4.13 : Teneur en tanins.....	93

GLOSSAIRE

Akène : fruit sec, indéhiscant, à graine unique dont le péricarpe. Le nom peut aussi s'écrire achaine.

Amer, (ère) : stimule la sécrétion de salive et des sucs digestifs, augmentant ainsi l'appétit.

Anthelminthique : se dit d'une substance qui s'oppose au développement des helminthes ou qui les tue.

Anti-agrégant : substance chimique s'opposant à l'agrégation des plaquettes sanguines.

Anti-angiogénique : empêche l'angiogénèse, c'est-à-dire la fabrication des vaisseaux sanguins qui irriguent les tumeurs cancéreuses. Ainsi, les tumeurs ne sont plus alimentées en sang et elles disparaissent progressivement.

Antibactérien : prévenant ou combattant les bactéries, l'infection bactérienne.

Antifongique : détruit les champignons.

Anti-inflammatoire : qui fait dégonfler, et diminuer l'irritation. La plupart des anti-inflammatoires sont aussi des antidouleurs.

Antimicrobien : détruit les microorganismes.

Antioxydant : ralentissant ou s'opposant à l'oxydation.

Antiparasitaire : substance capable de lutter contre des parasites externes ou internes.

Antiseptique : produit utilisé pour lutter contre la prolifération germes de la peau et des muqueuses.

Anti-tumoreux : produit qui permet de lutter contre les tumeurs.

Antivirale : substance qui agit contre les virus.

Apéritive : stimule l'appétit

Aromathérapie : l'utilisation à des fins thérapeutiques des essences et des huiles essentielles dont les molécules aromatiques se diffuse via le sang.

Bactéricide : tue les bactéries.

Bactériostatiques : antibiotique stoppant la multiplication des bactéries.

Cancer : prolifération anormale des cellules d'un tissu.

Carminatif : facilite l'évacuation des gaz intestinaux.

Chémotypes : désigne une entité chimique distincte au sein d'une même espèce (ensemble d'individus interféconds)

Chimiotype : molécules biologiquement actives majoritairement présentes dans les huiles essentielles.

Cholérétique : augmente la sécrétion de la bile.

Détoxifier : éliminer les substances toxiques.

Diurétique : favorise l'élimination de l'urine.

Dyspepsie : digestion difficile et douloureuse, accompagné de ballonnements.

Essence : composé naturel, volatil, odorant, extrait de diverses parties de plantes, ou de sécrétions animales.

Eupeptique : facilite la digestion

Fébrifuge : lutte contre la fièvre.

Fée verte : vin de la grande absinthe.

Fongicide : propre à détruire les champignons parasites.

Fongistatique : substance qui stoppe la croissance des champignons pathogènes.

Gastralgie : ensemble de symptômes provoquant des douleurs gastriques

Hépatique : relatif au foie.

Herbicide : produit servant à désherber.

Huile essentielle : liquide obtenu par distillation de substances aromatiques de certaines plantes

Inflorescence : ensemble des fleurs regroupées sur le même axe.

Insecticide : tue les insectes.

Insectifuge : produit utilisé pour éloigner les insectes

Nématicide : substance ayant la propriété de détruire les nématodes.

Schizonticide : tout produit ayant la capacité d'éliminer des parasites dans l'organisme.

Sporocides : ayant un pouvoir de destruction des spores.

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

Terpène : hydrocarbures de formule générale $(C_5H_8)_n$; molécule souvent présente dans la composition des huiles essentielles naturelles de plantes.

Tonique : fortifie ou stimule l'activité de l'organisme.

Vasodilatateur : augmente le calibre des vaisseaux sanguins.

Vermifuge : élimine les vers intestinaux.

Vivace : plante dont la longévité est de plusieurs années.

INTRODUCTION

L'utilisation des plantes aromatiques par l'Homme est une pratique antique [1]. De nos jours la majorité des habitants du globe terrestre utilisent de très nombreuses plantes, compte tenu de leurs propriétés aromatiques, comme source d'assaisonnement ou comme remède en médecine traditionnelle. Cependant, cette utilisation ne se base sur aucun critère scientifique, elle tient compte simplement des observations au cours des siècles.

Actuellement, plusieurs questions se sont soulevées concernant la sécurité et l'efficacité des produits chimiques synthétiques utilisés en médecine, en industrie alimentaire et en agriculture. En effet, l'usage abusif et inapproprié des agents antimicrobiens chimiques dans l'agriculture a entraîné l'émergence de germes phytopathogènes multirésistants, engendrant un problème épineux pour la santé humaine ainsi que pour l'environnement. D'un autre côté, de nombreuses maladies dégénératives sont liées à des phénomènes d'oxydation, causés par les radicaux libres (oxygène singulet, radical superoxyde, anion peroxyde, radical hydroxyl). Ces « espèces oxygénées réactives » produites par la respiration cellulaire, peuvent endommager l'ADN qui pourrait conduire à une mutation. Par ailleurs, la peroxydation des lipides produit au cours des processus de fabrication et de stockage des aliments sous l'action des radicaux libres de l'oxygène (ROS) ont conduit à des modifications de goût, d'odeur et de couleur et par conséquent à la perte de la qualité et de la sécurité des aliments. Les antioxydants de synthèse généralement utilisés en industrie alimentaire en vue de retarder l'oxydation des lipides, se sont avérés responsables d'effets indésirables. En effet les antioxydants de synthèses sont suspectés d'avoir des effets négatif sur la santé du consommateur.

Pour remédier à cette situation, les travaux scientifiques se sont de nouveaux orientés vers le patrimoine naturel et traditionnel, en particulier les plantes médicinales, ces dernières possèdent des propriétés biologiques avérées très intéressantes, qui trouvent leurs applications dans divers domaines, à savoir en médecine, en cosmétologie et en l'agriculture.

Les métabolites secondaires des plantes sont réputés depuis fort long temps pour leurs propriétés phytothérapeutiques et depuis quelques années l'Homme s'intéresse également à leurs autres activités biologiques. Ces métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches *in vivo* et *in vitro* notamment la vulgarisation de nouveaux constituants naturels.

L'Afrique est l'un des continents dotés d'une biodiversité la plus riche dans le monde, avec une multitude de plantes utilisées comme herbes, aliments naturels et pour des buts thérapeutiques. Ayant une position géographique privilégiée, l'Algérie constitue un cadre naturel tout à fait original offrant une gamme complète de bioclimats méditerranéens et sahariens favorisant une flore riche et variée avec un endémisme très remarqué. Cette richesse et cette originalité font que l'étude de la flore d'Algérie présente un intérêt scientifique fondamental dans le domaine de la valorisation des substances naturelles.

Le genre *Artemisia* est parmi les genres les plus importants de la famille des composées (Astéracées). Il a été enregistré onze espèces d'*Artemisia* en Algérie [2]. *Artemisia absinthium* L communément appelé « Chedjret Meriem ». Cette espèce a été utilisée depuis l'antiquité dans la médecine populaire [3 ; 4]. Traditionnellement celle-ci est utilisée comme des toniques stomachiques, des antipyrétiques, des antimicrobiens, dans le traitement des plaies, des insecticides et d'autres.

De nombreuses études sur la caractérisation chimique et les activités biologiques ont été menées sur cette espèce. Des travaux sur le chémotype chimique de l'huile d'absinthe provenant de la Turquie [5] a révélé la présence de 101 composants. Parmi lesquels il existe respectivement quatre composés majoritaires à savoir le chamazulène, le nuciferol butanoate, le nuciferol propionate et l'oxyde de caryophyllène.

LOPES et *al.* [6] a réalisé une investigation sur l'absinthe récolté au Canada. 110 composés chimiques ont été identifiés dans cette huile dont l'acétate de sabinyl est le principal composé accompagné par le myrcène et le thuyone.

Deux chémotypes différents ont été répertoriés en Iran [7] et [8]. La composition chimique de l'huile de la plante récoltée du Nord-Ouest [7] a identifié 28 composants chimiques. Le β -pinène, le thuyone et le sabinène sont les principaux composés. En

revanche, l'huile de l'absinthe collectée au Nord-Est du même pays a donné les composés majoritaires suivants : le camphor, le p-cymène et le isodène [8].

Au Maroc [9], deux composés ont été relevés, le thuyone et l'acétate de sabinyl. En Turquie [10], l'huile essentielle est composée majoritairement par le sabinène.

L'effet antimicrobien des huiles essentielles de l'*Artemisia absinthium* provenant de la Croatie a été constaté et décrit par différents auteurs [11-14]. Selon ces auteurs, le taux élevé de thuyone est la principale cause de l'activité antimicrobienne de l'huile. Les mêmes observations ont été rapportées, par la suite, par [15-18]. Juteau et al [18] a montré que l'effet antimicrobien des huiles essentielles de l'absinthe peut varier d'une région à l'autre.

KORDALI et al. [5 ; 19] a mené une étude afin de montrer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de l'absinthe provenant de la Turquie. KORDALI et al. [5] a constaté que l'absinthe a un pouvoir anti-fongique vis-à-vis de toutes les espèces fongiques testées.

Par ailleurs, les auteurs ont mis l'accent sur la corrélation proportionnelle entre la présence des monoterpènes oxygénés et le pouvoir antifongique. En effet, ceux-ci ont été identifiés avec des faibles taux dans l'huile essentielle d'absinthe influençant, ainsi, l'activité antifongique de cette espèce. Etant donné que l'huile essentielle de l'absinthe consiste en un mélange complexe de plusieurs composants, on ne peut pas attribuer l'activité antifongique à un ou plusieurs composés.

Par la suite, KORDALI et al. [19] a rapporté que la concentration de l'huile essentielle de l'absinthe n'a aucune influence sur l'activité antimicrobienne. Cependant, l'huile essentielle de cette espèce d'*Artemisia* a un effet inhibiteur vis-à-vis d'un nombre limité de bactéries.

L'activité antioxydante de l'absinthe a été étudiée par divers auteurs. KORDALI et al. [5] a mené une étude afin de montrer l'activité antioxydante de l'huile essentielle de l'absinthe provenant de la Turquie. Il a été constaté qu'il est difficile de déterminer les composants responsables de l'activité antioxydante. Les huiles essentielles riches en composants phénoliques ont montré une forte activité antioxydante [20 ; 21]. Le thuyone peut être le responsable de l'effet antioxydant car l'absence de ce composé

dans quelques espèces d'*Artemisia* est fortement liée au faible taux d'activité antioxydante.

En 2005 [22], l'extrait de l'*Artemisia absinthium* provenant de la Serbie a été obtenu séquentiellement en utilisant cinq solvants pour différents polarités. L'activité antioxydante a été déterminée en mesurant la capacité de piéger le radical DPPH. Les taux importants des composants phénoliques totaux et flavonoïdes indique que ces composants ont un rôle important dans l'activité antioxydante.

Au Canada [6], l'activité antioxydante de l'espèce étudiée a été déterminé par deux méthodes : β -Carotène et au DPPH, ils ont déduit une faible présence d'activité antioxydante en comparant avec l'antioxydant de synthèse (BHT) et l'antioxydant naturelle (huile d'origan).

BAYKAN EREL et al. [10], Pour mettre en évidence l'activité antioxydante de cette espèce, l'activité testée a été montrée par la mise en place de trois méthodes à savoir : la méthode au DPPH, la méthode de la capacité antioxydante en équivalent Trolox (TEAC) et la méthode de la capacité antioxydante totale (TAC), cette activité est élevée chez l'espèce étudiée en adoptant la méthode au DPPH , l'activité de l'huile est importante à celle de l'extrait méthanolique.

L'activité insecticide de l'absinthe a été déterminée par DERWICH et al.,[9]. Elle est donc démontrée que l'effet insecticide de l'huile essentielle de l'absinthe est dûe essentiellement à l'abondance de thuyone, l'acétate de sabinyl et aussi à tous les constituants chimiques contenus dans huile.

Cependant, à notre connaissance, aucune étude détaillée n'a été réalisée auparavant sur l'absinthe poussant spontanément au Nord d'Algérie. Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés au suivi de l'influence de procédé d'extraction sur le rendement et la composition chimique des huiles essentielles de l'absinthe de la région de Cherchell (Algérie). Nous nous sommes contentés de déterminer le pouvoir antimicrobien et antioxydant *in vitro* pour l'huile et l'extrait d'absinthe et de caractériser l'extrait en évaluant le dosage des phénols totaux et des tanins. Cette étude s'intègre dans le contexte global de la mise en valeur de la biodiversité des plantes aromatiques et médicinales algériennes en général et des espèces du genre *Artemisia* en particulier pour leurs propriétés médicinales.

CHAPITRE 1

PRESENTATION DE LA PLANTE

1.1. Généralités

Les Astéracées constituent l'une des plus vastes familles du règne végétal [23], c'est la deuxième après les orchidées [24]. Cette famille comprend plus de 20.000 espèces végétales [25]. Le métabolisme terpénique est généralement intense chez cette famille qui élabore une grande variété de structures : mono, sesqui, di et tri-terpénique [23].

La famille des composées comprend de nombreuses plantes aromatiques et médicinales. Parmi les genres importants : *Artemisia*, *santoline*, *centaurée* et *chrysanthème*. *Artemisia* est le genre le plus important de la famille des Astéraceae avec 300 espèces [26 ; 27]. On l'utilise dans une grande partie des pharmacopées locales en raison de leurs diverses propriétés médicinales [28].

1.2. Historique

L'absinthe est l'une des plus anciennes plantes médicinales connues. Depuis le temps les plus reculés, on l'utilisait dans la thérapeutique [29].

Selon GILLY [30], « bsinthium » signifie : douceur et avec le préfixe « a » privatif « absinthium » signifie : sans douceur. C'est la très renommée boisson alcoolisée et appelée aussi "La Fée verte".

L'huile volatile de l'absinthe a été utilisée pour faire des boissons à l'absinthe. Cependant, l'huile est toxique et la plupart des pays ont interdit sa fabrication depuis le début du 20ème siècle [31 ; 32]. La plante fut déclarée toxique à cause de la présence des thuyones. Ce n'est qu'en 1999 qu'il est à nouveau permis de cultiver, de distiller et de consommer la plante [30].

1.3. Origine et distribution géographique

L'absinthe, plante herbacée très aromatique, est originaire du sud de la Sibérie et du Cachemire. L'espèce est cultivée dans les pays Balkans, en Angleterre, en France, Afrique du nord et elle est également présente dans l'est de l'Amérique du nord au

Canada et en Turquie [33 ; 34 in 35 ; 32 ; 36 ; 37]. Son aire de répartition est eurasiatique, assez cosmopolite, elle est décrite comme fréquente dans la région méditerranéenne. Elle est présente au Maghreb, particulièrement au Maroc et en Algérie, où elle est connue sous le nom de “Chedjret Meriem” [38].

1.4. Etude botanique et biologique de l’absinthe

1.4.1. Classification classique

L’absinthe appartient aux [39] :

Régne : *Plantae*

Sous-régne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Arteridae*

Ordre : *Astérales*

Famille : *Astéracées (eae)*

Genre : *Artemisia*

Espèce : *Artemisia absinthium* L

1.4.2. Noms communs

- En Algérie (nom vernaculaire)

Diverses appellations lui sont attribuées. En Kabyle : Thamemmayth [40] .En Arabe : Chiha Coracani, Chaibet el Adjouz, Degnatech Cheik, Chiba, Chedjret Meriem [38 ;41].

- Dans d’autres pays

Artemisia absinthium L. possède plusieurs autres appellations à travers l’Europe telle que :

Nom Français : Absinthe [30].

Nom Anglais: Wormwood [29].

Nom Allemand: Wermut [29].

Nom Espagnol : encens [30].

Nom Italien : assenzo [30].

- Synonymes

Armoise Absinthe, Alvine, Herbe aux vers, Herbe sainte, grande Absinthe [42], Aluine, Armoise amère [41] et Absinthe Suisse [43].

1.5. Biologie de la plante

C'est une plante vivace (figures 1.1 et 1.2) pouvant atteindre 1m de haut, son odeur est très forte, sa saveur est fortement amère et aromatique [41].

Les tiges sont souterraines, ligneuses, dressées et rameuses. Les fragments de tige sont rigides, gris argentés, à l'extérieur sont anguleux et possèdent une moelle interne [43].

L'absinthe possède des grosses touffes de feuilles recouvertes d'un fin duvet gris pâle (figure 1.2), avec des folioles profondément découpées (figure 1.3) dont les feuilles alternes bi-a tripennatiséquées portent une pubescence dense sur les deux faces. Elles sont vertes et grisâtres à la face supérieure. Tandis qu'à la face inférieure, elles sont blanchâtres, couvertes de poils fins et soyeux [41 ; 43 ; 44 ; 38].

Les inflorescences sont des petits capitules floraux jaunes, globuleux et disposés en grappes composées ramifiées [43]. La floraison a lieu durant la période allant de juillet à septembre [41].

Les fruits de l'absinthe sont des akènes ovoïdes comprimés [42], très petits, lisses et sans aigrettes [43].



Figure 1.1: Schéma d'*Artemisia absinthium* L [45].



Figure 1.2: Une touffe d'absinthe [original].



Figure 1.3 : Feuilles d'absinthe [original]

1.6. Exigences écologiques

1.6.1 Climatiques

La plantation de l'absinthe exige des endroits bien ensoleillés. Elle peut pousser dans les régions à faible pluviosité et sa culture est possible également dans des zones arides et sèches [46].

1.6.2 Edaphiques

L'absinthe n'est pas exigeante en sol, elle pousse dans les plaines, montagnes, pentes, régions secs et arides, terrains rocheux et le bord des routes,. Elle réussit sur des sols acides et sols argileux calcaires (figure 1.4). Cette plante est disséminée également dans les régions incultes. Elle est même indiquée pour mettre en valeur les terrains pauvres et inaptes aux autres cultures [46 ; 30 ; 38 ; 29].



Figure 1.4 : Habitat d'*Artemisia absinthium* L [original]

1.7. Composition chimique de l'absinthe

Selon WICHTL et ANTON [43], et HEINRICH *et al.* [47], parmi les constituants chimiques de l'absinthe : les substances amères (0,15-0,4 %) et les huiles essentielles (0,2-1,5%).

1.7.1. Substances amères

Les principes amers contenus dans la plante ne constituent pas un groupe homogène. Toutes ces substances, qui peuvent être très différentes, sont liées entre elles par l'amertume de leur goût [48].

Le taux de principes amers dans une feuille fraîche de l'absinthe augmente au cours de l'année jusqu'à être multiplié par six à la floraison [30]. Le genre est riche en différentes lactones sesquiterpéniques [49]. Parmi ces substances, on distingue :

- Les lactones sesquiterpéniques dimères
- Les lactones sesquiterpéniques monomères

1.7.2. Huiles essentielles

Selon GILLY [30], l'huile essentielle de l'absinthe possède une saveur amère et brûlante, sa densité varie entre 0,925 et 0,950. Cette huile contient beaucoup de composants mono et sesquiterpènes qui ont été identifiés dans cette huile [43].

1.7.3. Autres constituants

1.7.3.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments présents uniquement dans la vacuole des plantes, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles [33].

1.7.3.2. Coumarines

Les coumarines sont des phytoalexines dont le taux de production augmente dans les tissus végétaux suite à une infection par un pathogène ou à une exposition aux différents stress [50].

1.7.3.3. Acides phénols

Le terme acide phénol désigne les dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique [51]. On trouve également chez l'absinthe du québrachitol, des acides succiniques, des résines, des acides maliques, des tanins et des lignanes de type sésamine [38 ; 43].

1.8. Utilisations de l'absinthe

1.8.1. Propriétés thérapeutiques

L'absinthe est un excellent tonique amer, elle est légèrement diurétique, emménagogue et vermifuge. C'est l'un des meilleurs toniques stomachiques contre la dyspepsie, la gastralgie et les insuffisances hépatiques [29 ; 52].

Les substances amères présentes dans cette espèce lui confèrent des propriétés thérapeutiques. De ce fait, elle est apéritive, eupeptique, cholérétique et carminative [38].

La présence des flavonoïdes pourrait expliquer le fait que la plante est fébrifuge [53 ; 38].

Néanmoins, l'intérêt thérapeutique des acides phénols est limité par la propriété antiseptique urinaire [33].

La plante possède également une action antitoxique en cas d'intoxication au plomb [41]. D'autres utilisations sont décrites comme remède populaire, l'absinthe jouit d'une grande réputation comme tonique, contre l'anémie et l'arthrite [29], et, par voie externe, contre le retard de cicatrisation [43].

D'autres activités biologiques ont été démontrées in vitro, à savoir : anthelminthique et schizonticide [43]. Par ailleurs, plusieurs travaux ont été menés pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne de l'*Artemisia absinthium* L [18 ; 6].

Les principes amers de grande absinthe sont des azulénogènes qui peuvent fournir le carbure anti-inflammatoire, c'est leur transformation en azulènes qui leur confère des qualités anti-inflammatoires [54 ; 38].

1.8.2. Usage culinaire

L'absinthe est en fait très peu utilisée en tant qu'épice. En raison de sa saveur amère très prononcée, elle ne doit être utilisée qu'avec parcimonie (quelques fragments de feuilles). Or sa consommation est prohibée dans de nombreux pays en raison de ses fortes teneurs en thuyone neurotoxique, entraînant des troubles nerveux, des hallucinations et des convulsions [35].

1.8.3. Usage agronomique

L'absinthe est un insecticide ou insectifuge [55]. D'après les travaux effectués par BOUKSIL et KHELLILI [56], CHABAB [57] et HAMDANI et AMEUR [58], l'huile essentielle de cette plante a une activité insecticide certaine dans le contrôle de *Callosobruchus maculatus* (ravageur de niébé) et contre *Tribolium costaneum herbst* (ravageur de blé dur) et la *Sitophilus oryzae* (ravageur des grains de céréales) respectivement.

CHAPITRE 2

LES HUILES ESSENTIELLES, LES POLYPHENOLS ET LES ACTIVITES BIOLOGIQUES

2.1. Huile essentielle

2.1.1. Définition :

La norme AFNOR définit une huile essentielle comme un produit obtenu à partir d'une matière végétale de composition assez complexe [59 ; 33].

2.1.2. Intérêts

Selon MILPIED [60], les huiles essentielles ont certainement un rôle dans la plante : il s'agit d'une sécrétion qui induit une augmentation de la production de certains composants pour inhiber la germination en hiver, protéger la plante contre les parasites, les insectes, les herbivores et favoriser la fécondation en attirant certains insectes.

Les huiles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers qui ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie [61].

2.1.3. Synthèse et localisation

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs, elles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : fleurs, feuilles, fruits, graines, racine,...etc [33]. Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans les cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule [35].

Selon BRUNETON [33], les essences sont stockées dans des :

- ❖ cellules à huile essentielle des Lauracées ou des Zingibéracées ;
- ❖ poils sécréteurs des Lamiacées ;
- ❖ poches sécrétrices des Myrtacées ou des Rutacées ;
- ❖ canaux sécréteurs des Apiacées ou des Astéracées.

2.1.4. Propriétés physiques

Malgré leurs différences de constitution, les huiles essentielles possèdent un certain nombre de propriétés physiques communes. Elles sont liquides à température ambiante, très odorantes, volatiles, ces essences ne sont que très rarement colorées. Leur densité est le plus souvent inférieure à celle de l'eau. Elles possèdent également un indice de réfraction souvent élevé [33 ; 62].

Le pouvoir rotatoire est l'une des propriétés principales des huiles essentielles. Il permet à certaines substances de dévier le plan de la lumière. Chaque espèce végétale produit une huile essentielle dont les composés ont des pouvoirs rotatoires définis. Il permet la mesure quantitative de l'activité optique de l'huile essentielle [63 ; 64 ; 65].

Les huiles essentielles sont aussi de nature hydrophobe, totalement solubles dans l'alcool, l'éther, le chloroforme et dans la plupart des solvants organiques, mais insolubles dans l'eau [62]. Ces substances ne contiennent aucun corps gras contrairement à une huile végétale [66].

Elles sont très facilement altérables et sensibles à l'oxydation. Le caractère odorant des huiles essentielles est lié à la volatilité de leurs molécules [67].

2.1.5. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et variables de constituants qui appartiennent à deux groupes : les terpènes et les composés aromatiques [33 ; 68].

2.1.5.1. Terpènes

Ce sont des hydrocarbures de nature terpénique dont la formule générale est $(C_5 H_8)_n$ généralement cyclique. Les terpènes sont des substances volatiles à masse moléculaire peu élevée. Les plus fréquents sont les monoterpènes ($C_{10} H_{16}$), les sesquiterpènes ($C_{15} H_{24}$) sont moins répandus [69].

2.1.5.1.1. Monoterpènes

Les monoterpènes sont des constituants odorants des essences végétales. Ils peuvent être acycliques (myrcène, ocimène), monocycliques (α - et γ -terpinène, ρ -cymène) ou bicycliques (pinènes, camphène, sabinène) [69].

2.1.5.1.2. Sesquiterpènes

Ces composés sont souvent représentés en faibles quantités dans les huiles essentielles. Ils donnent un goût amer aux plantes aromatiques. On trouvera quelques exemples des sesquiterpènes : carbures mono ou polycycliques (β - bisabolène, β – caryophyllène) [69].

2.1.5.2. Composés aromatiques

Les composés de cette série sont beaucoup moins fréquents que les monoterpènes et les sesquiterpènes. Les composés aromatiques dérivés du phenylpropane [C_6-C_3] sont très souvent des allyles et propénylphénols [33]

2.1.5.3. Composés d'origine diverses

En plus des hydrocarbures terpéniques et les composés aromatiques, se trouvent également un grand nombre de composés oxygénés (alcools, cétones, acides, aldéhydes, esters) qui entrent dans la composition des huiles essentielles [70 ; 67].

2.1.6. Effets biologiques de l'huile essentielle

L'activité biologique de l'huile est liée à sa composition chimique, en particulier de la nature et de leurs composés majeurs [71]. Les composés chimiques à plus grande efficacité et dev plus large spectre sont des phénols (thymol, carvacrol et eugénol) suivit des alcools (géraniol, linalol), des aldéhydes (geranial, citronellal) et enfin des cétones (thuyone, puligone) [72].

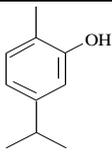
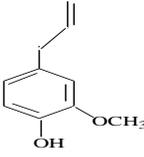
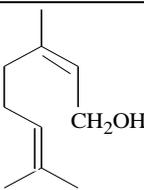
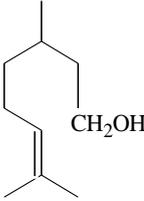
Les neufs huiles essentielles manifestant les propriétés inhibitrices les plus importantes sont les huiles essentielles de l'angélique, du laurier, de la cannelle, du clou de girofle, du thym, de l'amande amère, de l'origan, du piment et du géranium. Elles inhibent plus de 200 genres de bactéries testées [73].

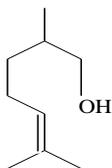
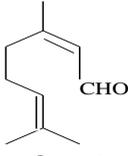
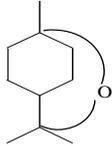
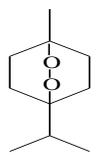
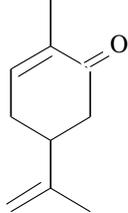
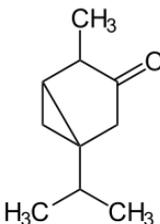
Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des moisissures et de levures [71].

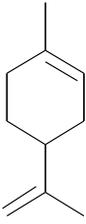
Certaines huiles essentielles présentent des activités anti-tumorales et sont utilisées dans le traitement préventif de certains types de cancers [74].

Les grandes familles biochimiques que l'on trouve dans les huiles essentielles, et leurs propriétés thérapeutiques, sont résumées dans le tableau 2.1 :

Tableau 2.1 : Bioactivités et structure de quelques composés aromatiques constituant les huiles essentielles [75 -77].

Composés aromatiques	Formules développées	Teneur dans quelques plantes	Propriétés
Phénols	 Carvacrol  Eugénol	Thym (<i>Thymus vulgaris</i>) : 33% Origan (<i>Origanum vulgare</i>):76% Girofle (<i>Syzigium romaticum</i>): 82% Poivre (<i>Piper dioica</i>) : 54%	Antiseptiques Bactéricides Fongicides Antivirales Antiparasitaires
Alcools terpéniques	 Géraniol  Citronellol	Palmarosa (<i>Cymbopogon martinii</i>) : 75-95% Citronnelle (<i>Cymbopogon nardus</i>) :10-20%	Anti-inflammatoires Antiseptiques Bactéricides Fongicides Antivirales

<p>Aldéhydes terpéniques</p>	 <p>Citronellal</p>  <p>Citral</p>	<p>Citronnelle (<i>Cymbopogon winteriana</i>) :35-45%</p> <p>Eucalyptus (<i>Eucalyptus citriodora</i>) :90%</p> <p>Lemongrass (<i>Cymbopogon citrus</i>) :70%</p> <p>Mélisse citronnée (<i>Melissa officinalis</i>) : 50%</p>	<p>Antifongiques Sporocides Insecticides</p>
<p>Ether-oxydes peroxydes</p>	 <p>Cinéole</p>  <p>Ascaridole</p>	<p>Eucalyptus (<i>Eucalyptus globulus</i>) :56%</p> <p>Epazote (<i>Chenopodium ambosiodes</i>) :61%</p>	<p>Antibactériens Antifongiques Insecticides</p>
<p>Cétones</p>	 <p>Carvone</p>  <p>Thuyone</p>	<p>Carvi (<i>Carum carvi</i>): 50%</p> <p>Absinthe(<i>Artemisia absinthium</i>): 40-70%</p>	<p>Anti- inflammatoire Antivirales Antifongiques Insecticide carminatif</p>

<p>Hydrocarbures aliphatiques, sesquiterpène</p>	 Limonène	<p>Carvi (<i>Carum carvi</i>) 45%</p>	<p>Fongistatiques Bactériostatiques Insecticides Nematicides Herbicides</p>
--	---	---------------------------------------	---

2.1.7. Composition chimique de l'huile essentielle de l'absinthe

La composition chimique de l'huile d'absinthe est dominée par une cétone biterpénique bicyclique, qui est la thuyone. Elle possède deux formes stéréoisométriques naturelles, l' α et la β thuyone [78].

On note la présence de polyènes, de flavonoïdes et de lactones sesquiterpéniques [79]. D'après GILLY [30], les compositions de l'huile et de sa couleur varient suivant l'origine géographique et la date de récolte de la plante, par exemple phellandrène, cadinène, azulène (pour les huiles bleues).

Plusieurs chimiotypes ont été détectés dans l'huile essentielle d'absinthe dont on cite trois exemples [80] :

- Chimiotype à cis-époxyocimène et α thuyone (plante d'Italie).
- Chimiotype à acétate de chrysanthényle et acétate de sabinyle (plante de France).
- Chimiotype mixte (plantes d'Italie, de Sibérie et de la Roumanie)

2.1.8. Techniques d'extraction

D'après ROUX et *al.* [81], l'extraction des huiles essentielles est une opération capitale qui doit permettre d'obtenir des produits volatils, particulièrement fragiles, sans altérer la qualité.

D'après [33], il existe divers procédés pour extraire les principes volatils, parmi eux :

- Distillation
- Expression à froid
- Extraction au CO₂ supercritique

2.1.8.1. Distillation

Les huiles essentielles sont extraites principalement selon deux méthodes de distillation : hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur.

L'hydrodistillation (water distillation) est la méthode la plus simple et la plus ancienne. C'est un procédé qui consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition [33]. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un serpentin réfrigéré. On obtient suite à cette opération, des huiles essentielles qui se séparent de l'eau par simple différence de densité. En effet, la plupart des huiles flottent à la surface où on les recueille à partir de récipients [82].

La deuxième méthode est la distillation par entraînement à la vapeur d'eau (steam distillation), dans laquelle, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau, mais il se dispose dans un alambic traversé par un courant de vapeur d'eau. Sous l'effet de la chaleur, l'eau se transforme en vapeur, traverse alors la cuve remplie de plantes aromatiques [81]. La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant [83].

2.1.8.2. Expression à froid

L'expression à froid ne s'applique qu'aux agrumes, il s'agit d'une technique mécanique qui consiste à déchirer les péricarpes riches en cellules sécrétrices. L'huile est entraînée par l'eau, le mélange est centrifugé et l'on recueille directement une huile essentielle extrêmement naturelle et pure [84].

Ce procédé 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 [81].

2.1.8.3. Extraction au CO₂ supercritique :

La matière végétale est chargée dans l'extracteur où est ensuite introduit le CO₂ supercritique sous pression et réfrigéré. Le mélange est ensuite recueilli dans un vase d'expansion où la pression est considérablement réduite. Le CO₂ s'évapore et ne reste que l'huile essentielle [25].

2.1.9. Conservation

La conservation des huiles essentielles exige certaines précautions indispensables si l'on veut éviter leur oxydation et leur dépolymérisation [62]. Elles ne devraient pas être conditionnées dans des flacons transparents. Elles sont en effet sensibles aux facteurs externes et doivent par conséquent être conservées dans des récipients protecteurs [35], comme des flacons de verre colorés ou opaques, bien hermétiques, pour les préserver de l'air, de la lumière, et de la température, qui sont les principaux agents de la dégradation [62].

2.1.10. Facteurs intervenant dans la qualité et la quantité des huiles essentielles

Parmi les principaux facteurs susceptibles d'influencer la composition des huiles essentielles :

2.1.10.1. Cycle végétatif

Pour une espèce donnée, la proportion des différents constituants d'une huile essentielle peut varier tout au long du développement de la plante. Des variations, parfois très importantes, sont couramment observées chez: fenouil et carotte [33].

2.1.10.2. Facteurs extrinsèques

D'après BRUNETON [33], et TEUSCHER et *al.* [35], il s'agit de l'influence des facteurs de l'environnement et des pratiques culturales. La température, l'humidité relative, la durée totale d'ensoleillement, le régime des vents, l'indice de pluviométrie et les facteurs édaphiques et de stress, représentent les principaux facteurs liés à l'environnement. Les conditions de culture des plantes aromatiques influencent également les profils qualitatifs et quantitatifs telles que les dates du semis et de la récolte, les traitements phytosanitaires, l'emploi d'engrais, les conditions atmosphériques lors de la récolte, les modes de conditionnement, la durée et les

conditions de stockage. Ces facteurs constituent des paramètres importants pouvant être à l'origine de modifications notoires de la composition chimique d'une espèce donnée. C'est la raison pour laquelle la culture des plantes aromatiques se fait selon des normes bien définies, qui précisent par exemple pour les huiles essentielles la proportion relative des principaux constituants.

Ces facteurs ont une influence directe notamment chez les espèces qui possèdent des structures histologiques de stockages superficielles (ex: poils sécréteurs des Lamiaceae). Lorsque la localisation est plus profonde, la qualité est plus constante [33].

2.1.10.3. Influence du procédé d'obtention

La labilité des constituants des huiles essentielles explique que la composition du produit obtenu par hydrodistillation soit, le plus souvent, différente de celle du mélange initialement présent dans les organes sécréteurs du végétal. Au cours de l'hydrodistillation, l'eau, l'acidité et la température peuvent induire l'hydrolyse des esters mais aussi des réarrangements, des isomérisations, des racémisations et des oxydations, etc [33].

2.1.11. Domaines d'utilisation des huiles essentielles

Etant donné la diversité de la composition des huiles essentielles, on trouve néanmoins leur utilisation dans plusieurs domaines en thérapeutique, cosmétiques, industrie agroalimentaires et autres [85].

2.1.11.1. En thérapeutique

Les huiles essentielles ont de nombreuses propriétés, antiseptiques, antimicrobiennes, cicatrisantes, relaxantes, carminatifs et autres [86 ; 87]. Elles peuvent être aussi utilisées pour éliminer les toxines [88].

2.1.11.2. En industrie agro-alimentaire

L'huile essentielle des plantes aromatiques (organ, thym, sauge, romarin, clou de girofle...) est utilisée dans les préparations alimentaires comme arôme de boissons, de chewing-gums, de glaces et de pâtisseries [89 ; 90 ; 35].

2.1.11.3. En cosmétique

Certaines huiles essentielles s'inscrivent parfaitement dans un programme cosmétique au naturel. Le plus couramment utilisée en cosmétique est l'huile essentielle de patchouli. Les huiles extraites de la bourrache et de l'onagre permettent d'améliorer l'hydratation de la peau [91].

2.1.12. Toxicité des huiles essentielles

La toxicité des huiles essentielles est très variable en fonction de leur composition, il est donc très important de la connaître [81].

- Les huiles essentielles à cétones sont neurotoxiques et ne doivent être administrées ni aux femmes enceintes, ni aux enfants, ni aux sujets épileptiques.
- Les huiles essentielles à terpènes sont irritantes.
- Les huiles essentielles à phénols (eugénol) ont une action caustique sur la peau et sont hépatotoxiques, elles doivent toujours être utilisées diluées [81].

Du fait de la forte concentration, de l'efficacité et de la grande activité des huiles essentielles, de nombreuses précautions doivent être prises avant tout emploi concernant la dose ainsi que le mode d'application interne ou externe [92].

2.2. Composés phénoliques

2.2.1. Définition

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des produits synthétisés par les végétaux et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire [93]. Ils constituent un ensemble de molécules très largement répandues dans le règne végétal [94], en formant une immense famille de plus de 8000 composés naturels [95].

Les polyphénols forment le groupe de composés phytochimiques le plus important des plantes [96]. On les rencontre au niveau des racines, des feuilles, des fruits et des écorces [97]. Comme c'est le cas pour la plupart des substances naturelles qualifiées de métabolites secondaires, la répartition qualitative et quantitative des polyphénols est inégale selon les espèces, les organes, les tissus et les stades physiologiques [98].

Tous les phénols, à de très rares exceptions (exemple : la lignine), interviennent dans différents processus : photosynthèse, respiration, croissance, résistance à l'attaque des insectes, des micro-organismes et aux maladies infectieuses [97].

2.2.2. Effets biologiques des polyphénols

Les composés polyphénoliques sont d'ailleurs de plus en plus utilisés en thérapeutique (figure 2.1) [99]. Ils pourraient permettre de prévenir de nombreuses pathologies comme le cancer [100], les maladies dégénératives et cardio-vasculaires [101].

Un encouragement à la consommation d'aliments d'origine végétale riches en polyphénols constitue désormais une des principales recommandations en santé publique. Parmi les antioxydants végétaux, les polyphénols sont capables de réduire les radicaux libres oxydants par transfert d'hydrogène [102 ; 103 ; 93]. D'autres études ont montré que ces composés phénoliques sont aussi des bons inhibiteurs d'enzymes responsables de la production des radicaux libres [104 ; 105 ; 106].

Selon BIONDI et *al.* [107], les constituants phénoliques sont les principaux responsables de l'activité antimicrobienne. La présence de tanins et de saponosides dans les extraits de plante pourrait justifier les propriétés antimicrobiennes observées car ces substances ont des activités antibactériennes connues [108 ; 109].

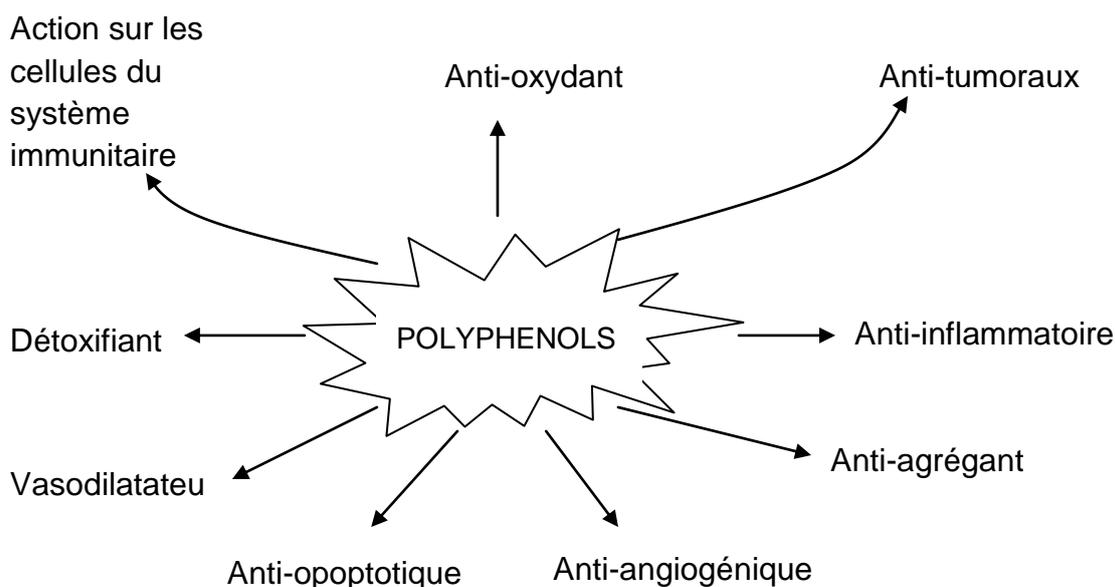


Figure 2.1 : Effets biologiques des polyphénols [99].

2.2.3. Technique d'extraction

D'après RICHARD [110], et ROBERT [111], il s'agit d'extractions par les solvants, qui ne permettent pas forcément d'obtenir des huiles essentielles, mais plutôt des concrètes. Ceux-ci, sont des produits cireux très colorés et très aromatiques. Les solvants, utilisés dans l'extraction, peuvent être : hexane ou éther de pétrole ou méthanol. Ils ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau. Les extraits issus de l'extraction par solvants ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras et des résines.

L'extraction à l'aide de solvants organiques pose un problème par son coût élevé. De plus, ce type d'extraction ne respecte pas les exigences de la réglementation liée à la protection de l'environnement de par sa toxicité.

2.2.4. Catégories des polyphénols :

Les composés phénoliques sont divisés en plusieurs catégories : les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins qui sont des produits de la polymérisation des flavonoïdes, les acides phénoliques, les coumarines, les lignanes et d'autres classes existent en nombre considérable [95]. On distingue deux formes de polyphénols :

2.2.4.1. Formes les plus simples

Ces molécules phénoliques simples sont présentées sous forme soluble dans la vacuole [112]. Elles sont caractérisées par leurs bas poids moléculaires. On distingue : les acides phénoliques, les coumarines et les flavonoïdes.

2.2.4.1.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales. Leur toxicité est faible et sont considérés non toxiques [113].

2.2.4.1.2. Coumarines

Les coumarines sont des phytoalexines dont le taux de production de celles-ci augmente dans les tissus végétaux suite à une infection par un pathogène, ou à une exposition aux différents stress [50].

2.2.4.1.3. Flavonoïdes

Le terme flavonoïde provenant du latin «*Flavus*», signifiant "Jaune" [33 ; 114 ; 115]. Les flavonoïdes sont largement rencontrés dans le règne végétal, en abondance dans les familles suivantes : Polygonacées, Apiacées, Rutacées, Astéracées et Légumineuses [116]. Ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles [117].

Les flavonoïdes sont omniprésents dans les organes aériens jeunes où ils sont localisés dans les tissus superficiels [118 ; 119]. On les trouve principalement dans les agrumes : citrons, orange, pamplemousses et dans une moindre mesure : abricots, cerises, raisins, papayes, tomates et sarrasin. On en trouve également en quantité importante dans de nombreuses plantes médicinales et très spécifiquement dans les herbes aromatiques comme le thym, le persil, le romarin et le céleri [120 ; 119].

Les flavonoïdes sont largement abondants dans les légumes feuilles (salade, choux, épinards...etc), ainsi que dans les téguments externes des fruits [119]. Ils se trouvent dissous dans le suc vacuolaire ou localisés dans les chloroplastes et les membranes des végétaux [33 ; 121].

2.2.4.2. Forme condensée (tanin)

Les tanins sont des composés phénoliques polaires d'origine végétale, qui existent dans presque chaque partie de la plante : écorce, feuilles, fruits et racines, leurs poids moléculaires s'étend de 500 à 3000 g [122 ; 123].

Ils sont utilisés dans l'industrie de cuir. La quantité importante de tanin identifiée chez les plantes parasitées correspond à une réaction de défense. Les tanins ont une propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible. Cette propriété est liée à leur aptitude à se combiner à des macromolécules (protéines, polysaccharides) [124 ; 125].

2.3. Activités biologiques

La diversité moléculaire que contiennent les antibiotiques naturels, leur confère des rôles et des propriétés biologiques très variés.

De nombreuses huiles essentielles présentent un pouvoir antioxydant, effet anti-inflammatoire et activité antimicrobienne [126 -129]. Parmi les activités biologiques :

2.3.1. Activité antimicrobienne

Dés la naissance, l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes. Pour résister à ces micro-organismes de nombreux moyens sont mis en jeu. Parmi ces moyens on distingue les substances antibiotiques extraites des plantes [130 ; 131].

Actuellement, les principales techniques d'évaluation du pouvoir antimicrobien se divisent en deux catégories :

2.3.1.1. Technique de micro-atmosphère

Cette méthode consiste à déposer un disque de papier filtre imprégné par l'échantillon à tester au centre du couvercle d'une boîte de pétri, sans que l'échantillon entre en contact avec la géloseensemencée par les micro-organismes. La boîte est hermétiquement fermée.

Il se produit une évaporation des substances volatiles dans l'enceinte de la boîte et les cellules sensibles de l'inoculum sont inhibées. La lecture du test porte donc sur la croissance ou non du l'inoculum.

Cependant cette méthode ne quantifie pas l'activité antimicrobienne réelle des substances testées, elle montre seulement l'activité des constituants volatils à la température d'incubation [132].

2.3.1.2. Technique par contact direct

Elle consiste à mettre l'agent antimicrobien dans un milieuensemencé par des micro-organismes, puis d'observer la croissance de ces derniers. Le contact peut avoir lieu en milieu gélosé ou liquide.

2.3.1.2.1. Aromatogramme

Cette méthode a l'avantage de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces microbiennes. Elle consiste à utiliser des disques de papier imprégnés avec différents produits à tester. Les disques sont ensuite déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de la souche à étudier.

Après incubation, les souches se développent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'agent antimicrobien suffisante pour inhiber leur croissance. On observe ainsi autour des disques une zone circulaire indemne de colonies, appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'agent antimicrobien. Plus il est petit, plus la souche est résistante [133].

2.3.1.2.2. Méthode du puits ou cylindre

Cette méthode assure une diffusion radiale de l'huile essentielle à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire et facilement mesurable [134]. Elle consistait à découper un trou circulaire vertical dans la gélose et à y verser une solution de produit à tester de concentration connue. Substance à tester diffusant radialement crée une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablementensemencée avec la suspension microbienne [135].

2.3.2. Activité antioxydante

L'oxygène est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant de la matière organique [136]. Dans les circonstances quotidiennes normales, des radicaux libres sont produits en permanence et en faible quantité et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents [137].

Dans ces circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/pro-oxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé "stress oxydant" [138 ; 137].

2.3.2.1. Radicaux libres

Un radical libre est une molécule ou un atome portant un électron non apparié dit célibataire [95 ; 139 ; 140]. Cette propriété rend cet élément très réactif [95 ; 140]. Il revient immédiatement à l'état stable, en cherchant une autre molécule avec laquelle il peut se combiner [137].

Il est en relation avec l'apparition de nombreuses pathologies chroniques associées aux vieillissements tels que l'alzheimer, le cancer, les maladies cardiovasculaires, les maladies inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire [141]. Il est important de signaler que tous les radicaux libres ne sont pas forcément des oxydants [142].

Cependant, l'opération bénéfique des radicaux libres dépend d'un équilibre délicat qui peut être détruit par de nombreux facteurs, notamment les polluants présents dans l'air que nous respirons et l'eau et les aliments que nous consommons. Les rayons ultraviolets du soleil, d'autres radiations, la fumée de tabac, l'exercice excessif et le stress sont également des facteurs qui augmentent considérablement la présence des radicaux libres dans notre système [137].

2.3.2.2. Antioxydants

2.3.2.2.1. Définition

Les antioxydants sont des substances capables de retarder ou d'empêcher l'oxydation, se sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs [143 ; 139].

La raison pour la quelle les antioxydants sont importants vient du fait que l'oxygène est un élément potentiellement toxique puisqu'il peu être transformé en formes plus réactives telles que le superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène singulet et les radicaux hydroxyles, collectivement connu sous le nom d'oxygène actif [143]. Les antioxydants permettent, également de faire en sorte que les produits alimentaires conservent leur goût et leur couleur et demeurent longtemps comestibles.

2.3.2.2.2. Principaux antioxydants

Il existe deux grandes familles d'antioxydants, ceux d'origine naturelle et ceux de synthèse.

2.3.2.2.2.1. Antioxydants naturels

Ce sont des molécules d'origine naturelle. Elles incluent les caroténoïdes, l'albumine, l'acide urique, les œstrogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide ascorbique, les composés phénoliques, la vitamine E et le sélénium...etc. Elles peuvent stabiliser

les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres [144 ; 145].

❖ La vitamine E ou tocophérol

La vitamine E (VE) est un antioxydant important qui protège les cellules contre les dommages associés aux radicaux libres et par conséquent, prolonge la vie cellulaire tout en ralentissant le processus de vieillissement [146]. La vitamine est rencontrée surtout dans les huiles végétales, les noix [139].

❖ La vitamine C ou l'acide ascorbique

La vitamine C est un micronutriment qui n'est pas synthétisé par l'organisme humain et doit être apporté dans les aliments. Elle est largement répandue dans les fruits [147 ; 149], cette vitamine hydrosoluble est capable de réagir directement avec les radicaux libres [147]. Des études réalisées sur la base de la vitamine C ont démontré qu'elle empêche les dégâts oxydatifs sur les protéines [148 ; 149].

❖ Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont impliqués dans la prévention de nombreux types de cancer, cancer de la prostate, cancer du poumon [149].

❖ L'acide alpha-lipoïque

Il fut identifié comme vitamine. Il a depuis été reclassé comme antioxydant et peut piéger les radicaux libres aux niveaux intracellulaires et extracellulaires. Du fait qu'il est aussi bien liposoluble qu'hydrosoluble, il peut accéder à toutes les parties de nos cellules [151].

❖ Les phénols

Les acides phénoliques, comme l'acide rosmarinique, sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires et peuvent avoir des propriétés antivirales [142].

2.3.2.2.2. Antioxydants de synthèse

Les antioxydants de synthèse habituellement utilisés sont les composés phénoliques, tels que le Butyl Hydroxy Anisole (BHA), Butyl Hydroxy Toluène (BHT), Gallate Propylée (PG) et le Ter-Butyl-Hydroxy-quinone (TBHQ), ils sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels [152].

2.3.2.3. Mécanismes d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers :

- Le captage de l'oxygène singulet [150 ; 142].
- Désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, et fournisse des hydrogènes aux radicaux libres présents à savoir composés phénoliques naturels ou de synthèse [142 ; 153].
- La chélation des ions métalliques réduise l'effet pro-oxydant des ions telles que les flavonoïdes, l'acide ascorbique ...etc [142 ; 154].

CHAPITRE 3

MATERIEL ET METHODES

3.1. Lieux d'expérimentation

Notre étude a été réalisée dans les laboratoires suivants :

- L'extraction des huiles essentielles de la plante étudiée a été effectuée au niveau du laboratoire de cosmétologie, département de chimie, université Saad Dahleb de Blida (USDB).
- L'étude de l'activité antifongique a été réalisée au sein du laboratoire de physiologie végétale, département d'agronomie d'USDB.
- L'étude de l'activité antioxydante et la caractérisation de l'extrait a été faite au niveau du laboratoire de recherche sur les produits bioactifs et la valorisation de la biomasse de l'ENS à Kouba.
- L'analyse chromatographie (CG-SM) a été réalisée à Mobidal de Bab Ezzouar.

3.2. Dispositif expérimental

Le plan expérimental adopté au cours de notre étude est un bloc aléatoire complet sans contrôle d'hétérogénéité à randomisation totale.

Notre protocole expérimental s'est présenté sous forme de trois expériences. La première a été consacrée à l'étude de l'effet des procédés d'extraction sur le rendement en huile essentielle. Cette expérience est réalisée avec cinq répétitions soit 10 mesures au total. La deuxième expérimentation a été consacrée à l'étude de l'effet des souches phytopathogènes sur le diamètre des zones d'inhibition. Cet essai a porté sur un total de 16 boîtes de pétri dont trois répétitions ont été effectuées et un témoin pour chaque pathogène. La dernière expérience a été employée à l'étude de l'effet des antioxydants de référence sur l'activité antioxydante. Ce test a porté sur 63 tubes à essai au total dont trois répétitions ont été effectuées et un témoin pour chaque traitement.

3.3. Matériel végétal

3.3.1. Cueillette et identification de la plante

La plante que nous avons utilisée lors de notre expérimentation est : l'absinthe (*Artemisia absinthium* L). La collecte des rameaux a été effectuée durant le mois de Janvier 2011 en période végétative (figure 3.1). Le lieu de la collecte est situé à environ 90km à l'ouest d'Alger (Cherchell, wilaya de Tipaza, Algérie). La plante a été identifiée au département de botanique, ENSA-El Harrach- Alger.



Figure 3.1 : Absinthe [original]

3.3.2. Conservation

Les plantes, fraîchement récoltées, ont été nettoyées et séchées pendant deux mois à l'ombre dans un endroit sec et aéré (figure 3.2). Le matériel végétal utilisé était composé de feuilles sèches (figure 3.3). Celles-ci ont été ensuite pesées, broyées grossièrement et récupérées dans des sacs en papier.



Figure 3.2: Endroit de séchage de la plante

[original]



Figure 3.3 : Feuilles sèches d'absinthe

[original]

3.4. Caractéristiques climatiques de la région d'étude

3.4.1. Température de la région de Cherchell

La température est un facteur écologique capital agissant sur la répartition des espèces. Pour la région de Cherchell, les valeurs de la température enregistrées en 2010 - 2011 sont présentées dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1 : Valeurs des températures de la région de Cherchell [155].

Paramètres (°C)	Sep	Oct	Nov	Déc	Jan	Fév	Mar	Avr	Mai	Juin	Juil	Aoû
T _{moy}	20.5	18.5	12	15	11	11.5	14	18.5	21	23.5	28	26
T _{min}	8	3	2	3	0	3	4	9	11	13	17	15
T _{max}	33	34	22	27	22	20	24	28	31	34	39	37

Les moyennes thermiques mensuelles de l'année 2010 - 2011 de la région de Cherchell montrent qu'au moment de la cueillette, la température avoisinait 11°C (Mois de Janvier). On y observe également que les deux extrémités des températures correspondent aux mois de Février et de Juillet avec 11.5 °C et 28 °C respectivement.

3.4.2. Pluviométrie de la région de Cherchell

Pour la région de Cherchell, les valeurs des précipitations notées en 2010 - 2011 sont réparties dans le tableau 3.2.

Tableau 3.2 : les valeurs des précipitations de la région de Cherchell [155].

Paramètre	Sep	Oct	Nov	Déc	Jan	Fév	Mar	Avr	Mai	Juin	Juil	Aoû
P (mm)	19.5	116.5	99	59.5	108	108.6	36.4	95.6	93.5	18	0	0

La plus importante quantité pluviométrique enregistrée durant l'année 2010-2011 est celle du mois d'Octobre 2010 (116.5 mm), suivie par 108.6 mm pour le mois de Février 2011 et 108 mm pendant le mois de Janvier 2011. Le total pluviométrique a atteint 754,6 mm, on peut dire que l'année 2011 a été peu pluvieuse.

3.5. Huile essentielle

3.5.1. Protocole expérimental

L'extraction des huiles essentielles (HE) de l'absinthe a été effectuée par deux méthodes d'extraction : l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur d'eau. On procède à la pesée des échantillons à traiter puis on les introduit dans des ballons. Au cours de chaque essai, 100g de matière végétale a été traitée. La durée d'extraction est de l'ordre de trois heures après la première goutte de distillat.

3.5.1.1. Hydrodistillation

L'hydrodistillation consiste à porter à l'ébullition, un mélange de feuilles d'absinthe et d'eau distillée, l'ensemble est introduit dans un ballon de deux litres. Avant le raccordement du montage, on introduit dans le ballon quelques grains de pierre ponce (figure 3.4).

Sous l'action de la chaleur, les cellules végétales éclatent et libèrent des composés organiques odorants et volatils. La vapeur d'eau formée, chargée de produits volatils, se condense au contact de réfrigérant. Le condensat est recueilli dans un erlenmeyer.

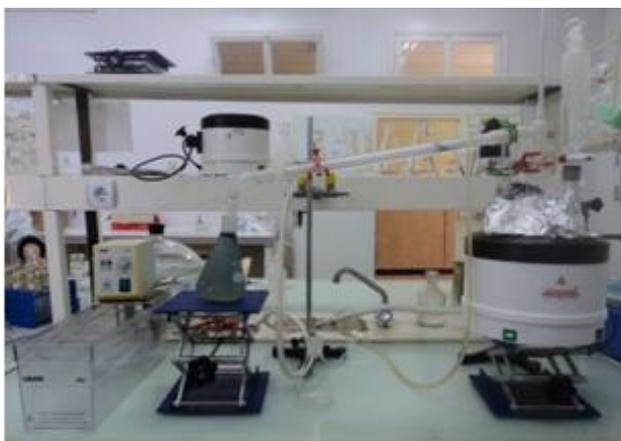


Figure 3.4: Le montage de l'hydrodistillation [original]

3.5.1.2. Entraînement à la vapeur

Les feuilles d'*Artemisia absinthium* L ne sont pas en contact avec l'eau distillée, mais elles se disposent dans un ballon traversé par un courant de vapeur d'eau (figure 3.5).

Au moment du chauffage, la vapeur d'eau produite dans le ballon est reconduite par une colonne en verre et traverse le matériel végétal, elle produit l'explosion des poches contenant les substances odorantes de la plante (HE). Le mélange eau-HE est récupéré dans un erlenmeyer.

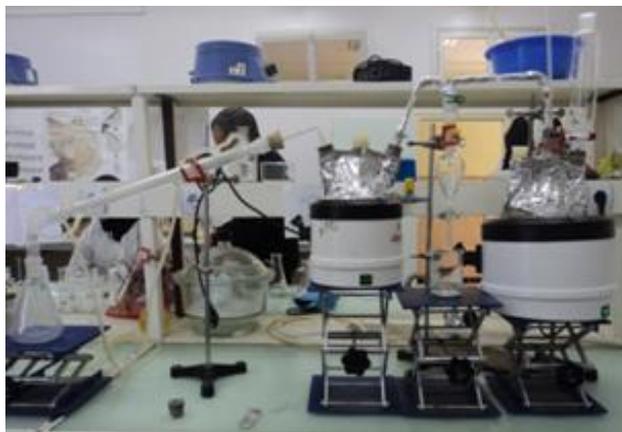


Figure 3.5 : Le montage de l'entraînement à la vapeur d'eau [original]

3.5.1.3. Récupération de l'huile essentielle de l'absinthe

Après l'extraction, le distillat obtenu présente deux phases :

- Une phase organique sous forme de gouttes d'huile surnageantes d'odeur caractéristique (assez forte).
- Une phase aqueuse parfumée représentant l'hydrolat, ce dernier a été soumis à une extraction liquide-liquide avec un solvant organique, l'évaporation de celui-ci par l'évaporateur rotatif, donne une deuxième phase huileuse qu'on regroupe avec la première pour obtenir un meilleur rendement en HE.

La procédure expérimentale suivie est décrite comme suit :

1. Ajouter le chlorure de sodium (NaCl) pour faciliter la récupération des gouttelettes d'HE ;
2. Transférer le distillat obtenu dans l'ampoule à décanter ;
3. Récupérer l'HE avec un solvant organique «l'éther diéthylique» (figure 3.6a) ;
4. Agiter, dégazifier et laisser décanter (figure 3.6b) ;

5. Laisser décanter, le temps d'obtenir deux phases, la phase supérieure qui est la phase organique (solvant + HE) et la phase inférieure constituée d'eau (figure 3.6c)
6. Répéter le processus d'extraction liquide-liquide trois fois pour récupérer le maximum d'HE extraite ;
7. Récupérer toutes les phases organiques et les regroupées dans un seule bécher, la phase obtenue est séchée avec du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) et filtrer ensuite ;
8. Evaporer l'éther via l'évaporateur rotatif à 35°C pour obtenir l'HE pure (figure 3.6d) ;
9. Conserver l'HE à une température de 4°C , à l'obscurité dans un flacon en verre brun fermé hermétiquement en vue de son analyse.

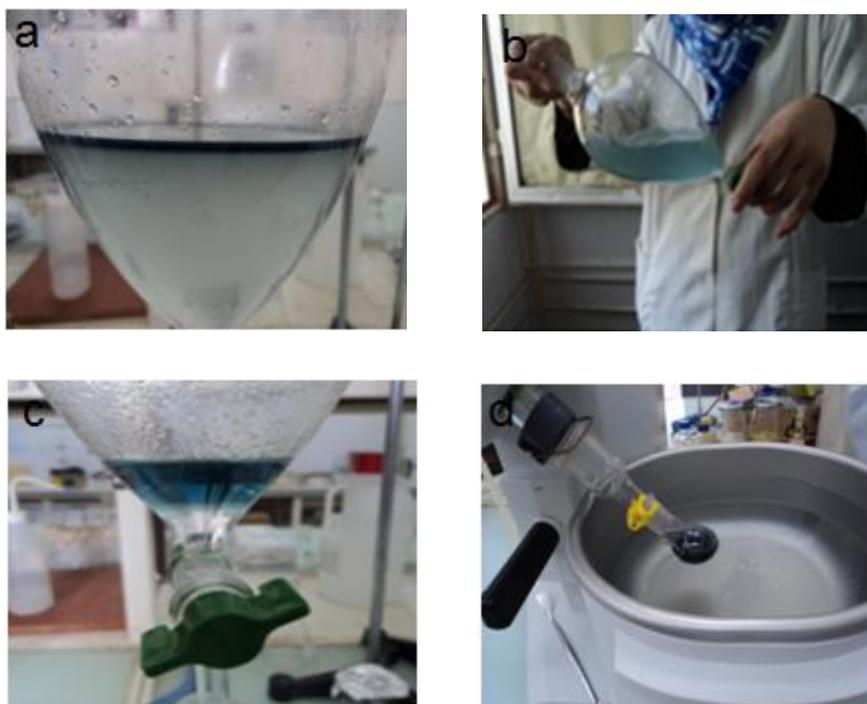


Figure 3.6 : Différentes étapes de récupération des huiles essentielles de l'absinthe : (a) : récupérer l'huile avec le solvant organique; (b) : agiter et dégazifier l'ampoule à décanter; (c) : laisser décanter ; (d) : évaporer le solvant avec l'évaporateur rotatif [original].

3.5.2. Rendement

On définit le rendement de l'HE par différentes méthodes. Dans cette étude nous avons choisi celui du rapport entre la masse de l'HE (M_{HE}) et la masse de la matière végétale sèche (M_{VS}). Le rendement de l'HE est exprimé en gramme par rapport à 100g de matière végétale sèche des feuilles de la plante, qui est donné par la relation suivante [156] :

$$Rdt_{HE}\% = \frac{M_{HE}}{M_{VS}} \times 100$$

Avec :

$Rdt_{HE}\%$: rendement en HE(%)

M_{HE} : masse de l'HE(g)

M_{VS} : masse de la matière végétale sèche (g)

3.5.3. Analyse qualitative et semi-quantitative des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)

Les HE extraites par les deux méthodes étudiées ont été soumises à des analyses qualitatives et semi-quantitatives par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM).

L'analyse des échantillons des HE a été effectuée au laboratoire d'analyse « Mobidal » situé à Bab Ezzouar, selon les conditions opératoires suivantes :

L'analyse chromatographique a été effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse de type HP série Agilent 6890 N piloté par ChemStation «NIST98» et couplée avec un spectromètre de masse de type HP série Agilent 5973.

La fragmentation est effectuée par impact électronique à 70 eV. La colonne utilisée est capillaire HP-5MS (30m x 0.25 mm) avec une épaisseur du film de la phase 0.25 μm .

Le mode d'injection utilisé est le Splitless avec un débit de 0.2 μl par 30 secondes et une température de 250°C. La température de la colonne est programmée de 60 à

250°C à raison de 3°C /min. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est de 1ml/min.

3.6. Extrait naturel

3.6.1. Méthode de macération

La méthode d'extraction utilisée pour les composés phénoliques est celle de BIALLO et *al.* [157]. Elle est effectuée par épuisement successive du matériel végétal, en utilisant un solvant organique. L'objectif de l'étape de l'extraction est de libérer les substances phénoliques présentes dans les feuilles en poudre.

3.6.2. Procédure expérimentale

Les échantillons déjà séchés à l'abri de la lumière et à température ambiante sont finement broyés en poudre, ensuite, la matière végétale est mise à macérer pendant 48 heures à température ambiante dans le méthanol à raison de 1g /5 ml. Après filtration, on obtient de la concrète. Le solvant organique est éliminé par une évaporation rotative sous vide. L'extrait brut obtenu est immédiatement congelé et récupéré dans des flacons en verre hermétiquement fermés et conservés jusqu'à leur utilisation.

L'organigramme de la figure 3.7 illustre le procédé d'extraction par solvant volatile afin d'obtenir un extrait brut à partir des poudres des feuilles de l'absinthe.

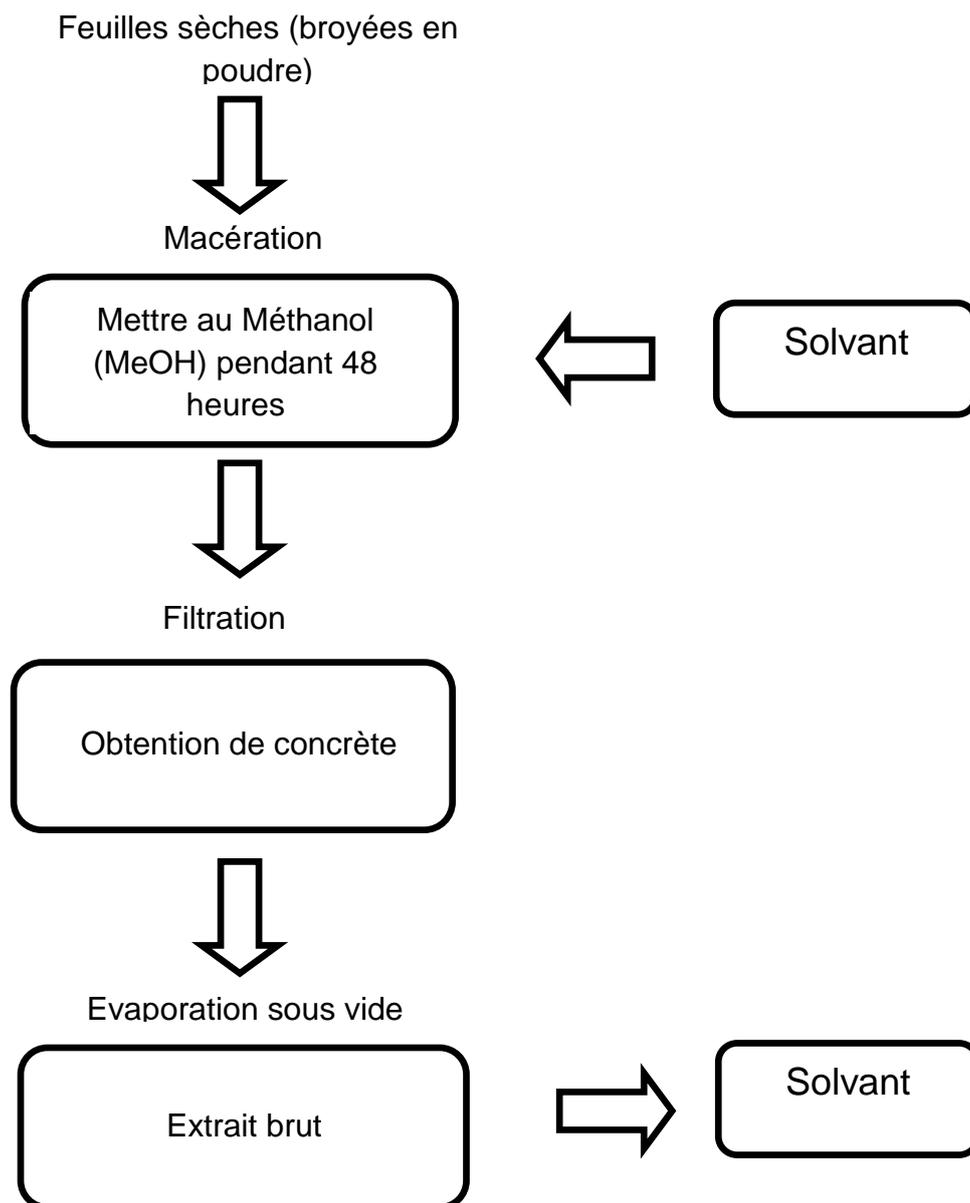


Figure 3.7: Préparation de l'extrait brut à partir de la matière végétale sèche.

3.7. Tests des effets biologiques

3.7.1. Tests d'activité antimicrobienne

3.7.1.1. Micro-organismes étudiés

Dans le but d'évaluer le pouvoir antimicrobien de l'HE d'*Artemisia absinthium* L, nous avons testé quatre champignons phytopathogènes (*Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *Helminthosporium sp* et *Aspergillus sp*). Ces micro-organismes (figure 3.8) ont été étudiés pour leurs fréquences élevées à contaminer les plantes cultivées et pour leur pathogénicité, Ce test antimicrobien a été effectué avec une seule souche de l'ATCC (American type culture collection).

Les souches phytopathogènes testées *Botrytis cinerea* et *Fusarium culmorum* ont été fournies par le laboratoire de recherche microbiologie de l'E.N.S de Kouba à savoir :

Fusarium culmorum: F 3288 code F.C;

Botrytis cinerea : identifiée au laboratoire de recherche microbiologie.

Les deux autres souches phytopathogènes ont été fournies par le laboratoire de mycologie du département d'Agronomie de l'Université de Blida. Le tableau 3.3 illustre les principales plantes hôtes et les symptômes causés par les champignons phytopathogènes

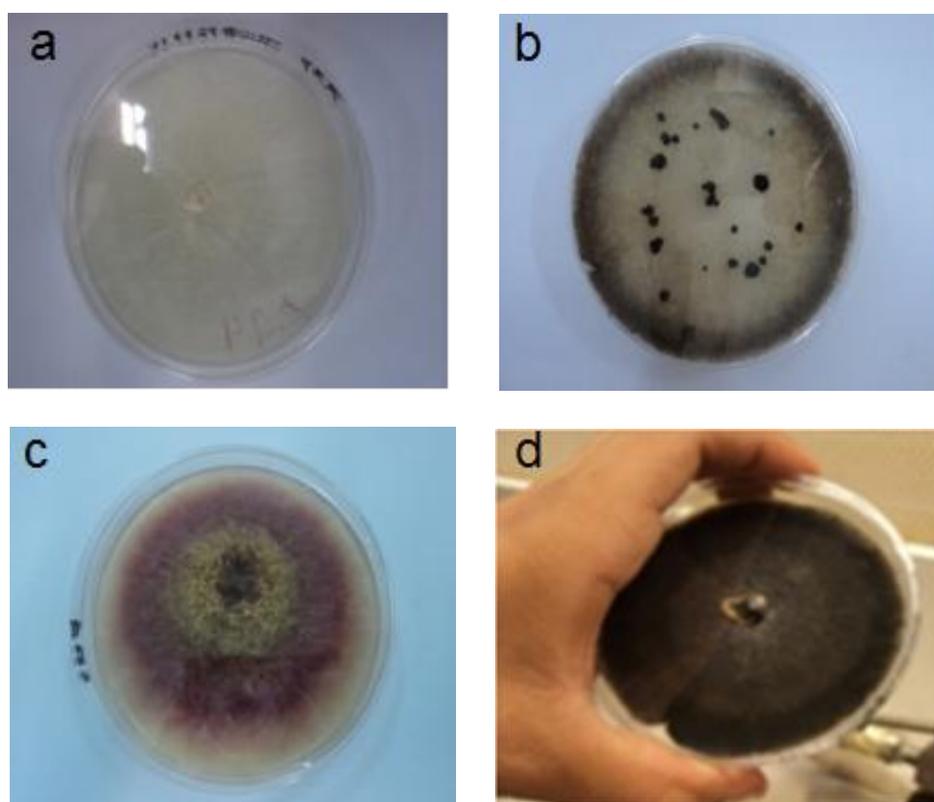


Figure 3.8 : Les souches phytopathogènes testés :(a) : *Aspergillus sp* ;(b) :*Botrytis cinerea* ;(c) :*Fusarium culmorum* ;(d) :*Helminthosporium sp* [original].

Tableau 3.3 : Caractéristiques des souches microbiennes testées [158-169].

Souches phytopathogènes	N°ATCC	Famille	Maladies	Gamme d'hôtes et symptomatologies
<i>Botrytis cinerea</i>	Identifiée	<i>Moniliaceae</i>	Pourriture grise. Pourriture noble «vigne».	- Champignon polyphage. -Attaque plus de 230 espèces de plantes. -Il affecte de nombreuses productions végétales en culture sous serre ou en plein champ d'un intérêt agronomique majeur comme la vigne, haricot ou la tomate...etc. -Ce champignon fait apparaître sur le feuillage un feutrage gris qui se développe rapidement sur la culture. Les tissus atteints meurent rapidement et de grosses tâches brunes/rouges apparaissent sur les fruits ou feuilles.
<i>Fusarium culmorum</i>	F 3288	<i>Nectriaceae</i>	Maladie du Fusariose Moisissures Produire des mycotoxines	-Les principales plantes hôtes sont les céréales, suivie de légumes et ainsi que arbres fruitiers. -Elle est responsable du nécrose du col de l'épi et dessèchement du sommet ou de la totalité de l'épi, ainsi que sa base se couvre d'amas de spores roses.
<i>Helminthosporium sp</i>	-----	<i>Dématiaceae</i>	Helminthosporiose	-Les principales plantes hôtes sont les céréales -Elle provoque des tâches brunes ovoïdes, entourées d'un halo chlorosé, ou à bords parallèles entre deux nervures avec en haut et en bas de la tâche un point de chlorose plus clair.
<i>Aspergillus sp</i>	-----	<i>Trichocomaceae</i>	Moisissures Produire des mycotoxines	-On les retrouve principalement dans les céréales, mais aussi dans de nombreux autres produits végétaux

----- souche non référenciée

3.7.1.2. Procédure microbiologique

Deux méthodes différentes sont employées pour l'évaluation de l'effet antimicrobien de l'HE des feuilles d'*Artemisia absinthium* L :

- la méthode de diffusion sur gélose, qui permet la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de la substance testée.
- la méthode de microdilution, qui a pour objectif la détermination des CMI (concentrations minimales inhibitrices) à partir d'une gamme de concentrations de produit dans le milieu de culture.

3.7.1.2.1. Zone d'inhibition (Z.I)

L'évaluation de l'activité microbienne des HE de l'espèce étudiée, a été réalisée selon la méthode de diffusion sur gélose (figure3.9) [170 ; 171]. Cette dernière a été utilisée auparavant par plusieurs chercheurs et récemment par [172-174].

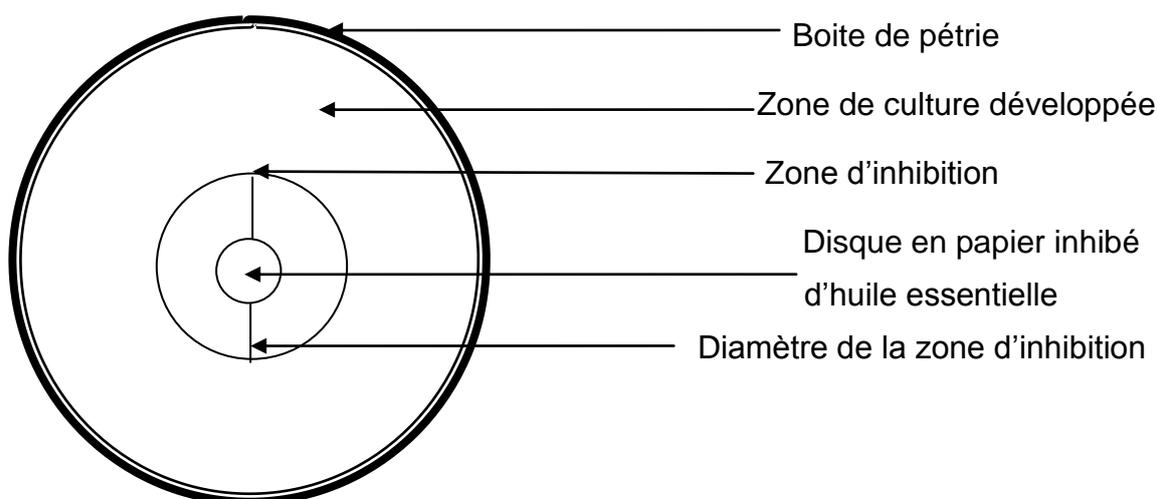


Figure 3.9 : Principe de la méthode de diffusion sur gélose.

3.7.1.2.1.1. Principe

Le principe consiste à estimer l'inhibition de la croissance des microorganismes développés sur des milieux de culture bien définis et soumis au contact à des disques imbibés d'huile essentielle, par la méthode de diffusion sur gélose [171].

3.7.1.2.1.2. Procédure expérimentale

- Les souches microbiennes à tester ont été cultivées sur milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar) (appendice B), pendant sept jours à 25°C à l'obscurité.

- La préparation de l'inoculum se fait à partir d'une culture de sept jours. On réalise des suspensions microbiennes en prélevant des colonies des germes testés qu'on dispose dans l'eau physiologique stérile puis on agite au vortex (Figure 3.10a) .
- L'ensemencement des germes testés s'effectue en prélevant certain volume de chaque suspension de champignons phytopathogènes testés, que l'on ensemence sur la surface du milieu de culture PDA déjà coulés dans les boîtes de pétri. On étale immédiatement la couche en faisant pivoter la boîte sur elle-même tout en assurant une uniformité de la surface, suivit par un dépôt des disques stériles en papier buvard absorbant de 9 mm de diamètre, imbibés d'une quantité bien définie (10µl) d'HE prélevée à l'aide d'une microseringue (figure 3.10b et 3.10c).
- Après 48 heures d'incubation à 25°C pour les germes testés, s'il y a apparition d'une zone d'inhibition, on mesure à l'aide d'une règle le diamètre de celle-ci en millimètre ou en centimètre [175].
- Le diamètre des zones d'inhibition permet d'estimer la résistance ou la sensibilité des différents germes testés à l'HE en adoptant la méthode de LECLERC [176] une souche est dite :
 - Sensible lorsque la zone d'inhibition est supérieure ou égale à 15 mm ;
 - Limite lorsque la zone d'inhibition est inférieure à 15 mm ;
 - Résistante lorsque la zone d'inhibition est inexistante [177].

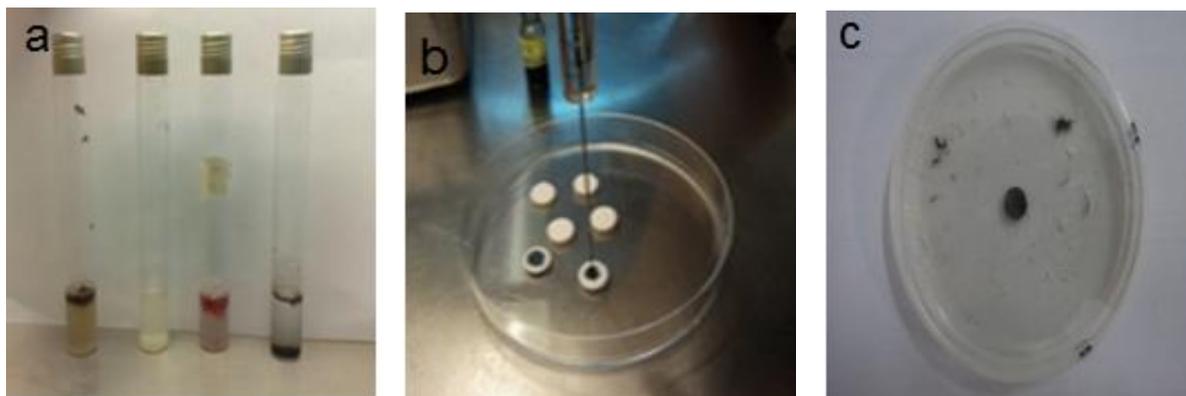


Figure 3.10 : Différentes étapes de la zone d'inhibition : (a) : suspensions microbiennes ;(b) : application de l'huile sur les disques ; (c) : dépôt du disque imbibé d'huile essentielle [original]

3.7.1.2.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'HE ont été déterminées selon la méthode rapportée par REMMAL et *al.* [178], et SATRANI et *al.* [179]. Du fait de la non miscibilité de l'HE à l'eau et donc aux milieux de culture, une mise en émulsion a été réalisée grâce à une solution d'agar à 0,2 % afin de favoriser le contact germe/composé. Des dilutions sont préparées au $1/10^e$, $1/25^e$, $1/50^e$, $1/100^e$, $1/200^e$, $1/500^e$ et $1/1000^e$ dans cette solution d'agar (figure 3.11a et 3.11b).

Dans des tubes à essais contenant chacun 13,5 ml de milieu solide PDA, stérilisés à l'autoclave (20minutes à 121°C) et refroidis à 45°C . On ajoute aseptiquement 1,5 ml de chacune des dilutions de façon à obtenir les concentrations finales de $1/100$, $1/250$, $1/500$, $1/1.000$, $1/2.000$, $1/5.000$ et $1/10.000$ (v/v) (figure 3.11c). Puis on agite convenablement les tubes avant de les verser dans des boîtes de Pétri (figure 3.11d). Des témoins contenant le milieu de culture et la solution d'agar à 0,2 % seule, sont également préparés.

L'ensemencement se fait par stries à l'aide d'une anse de platine calibrée afin de prélever le même volume d'inoculum. Ce dernier se présente sous forme d'une suspension dans l'eau physiologique stérile de spores et de mycélium provenant d'une culture de sept jours dans le PDA. L'incubation se fait à l'obscurité pendant sept jours à 25°C . Chaque essai est répété trois fois afin de minimiser l'erreur expérimentale.

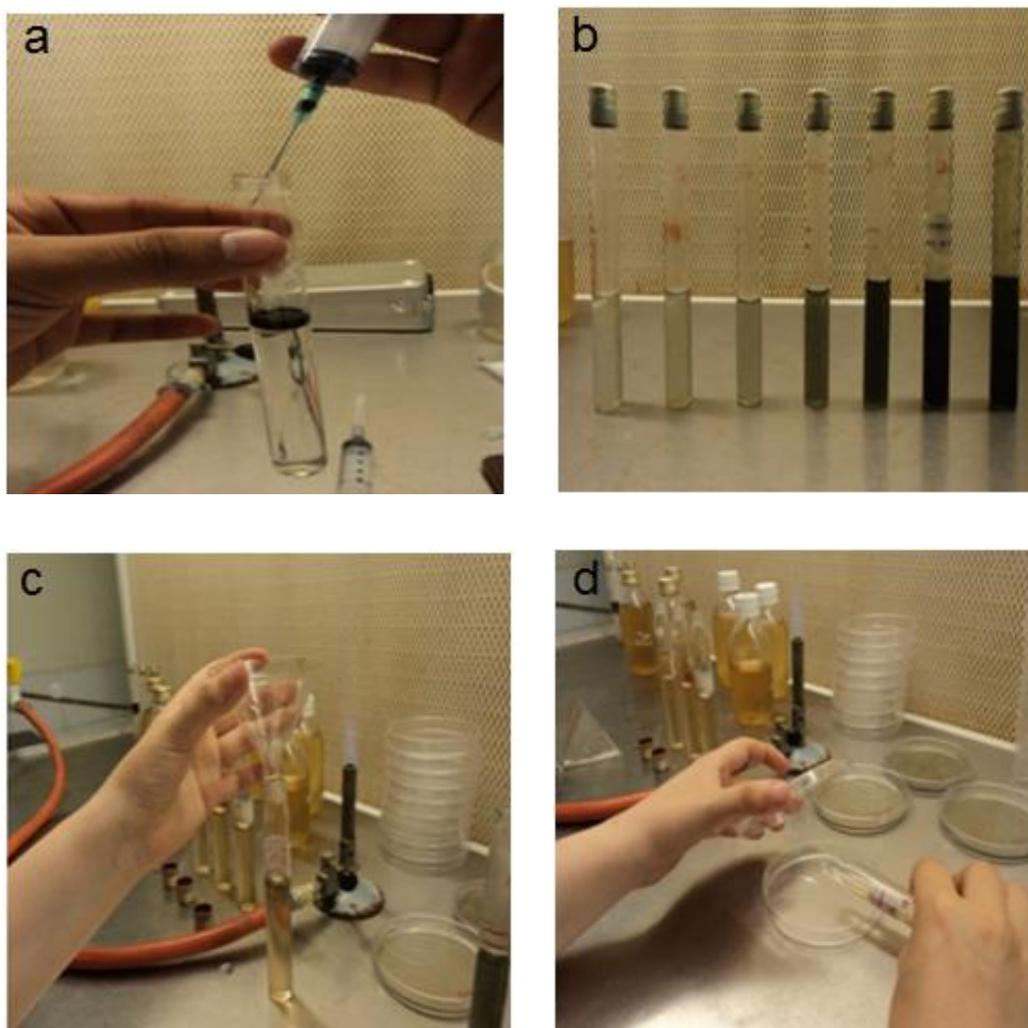


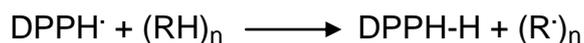
Figure 3.11 : Différentes étapes de la CMI : (a+b) : préparation des dilutions ; (c) : obtention des concentrations finales ; (d) : agitation et versement dans les boîtes de pétri [original].

3.7.2. Test d'activité antioxydante

Pour évaluer l'activité antioxydante de nos échantillons (HE et extrait), nous avons adopté la méthode au DPPH (2,2-diphényl-1-picryl hydrazyl) qui a été proposée par LEITAO et *al.* [180], CHEN et *al.* [181] et LOO et *al.* 2008 [182] avec quelques modifications.

3.7.2.1. Principe

Le DPPH (figure 3.12) est un radical libre stable possédant une coloration violette foncée, lorsqu'il est réduit par un capteur de radicaux libres, la coloration devient jaune pâle. On peut résumer cette réaction par l'équation suivante [183] :



où $(\text{RH})_n$ représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH $^\bullet$ (violet) pour le transformer en molécule DPPH-H (2,2-diphényl-1-picryl hydrazine) [184].

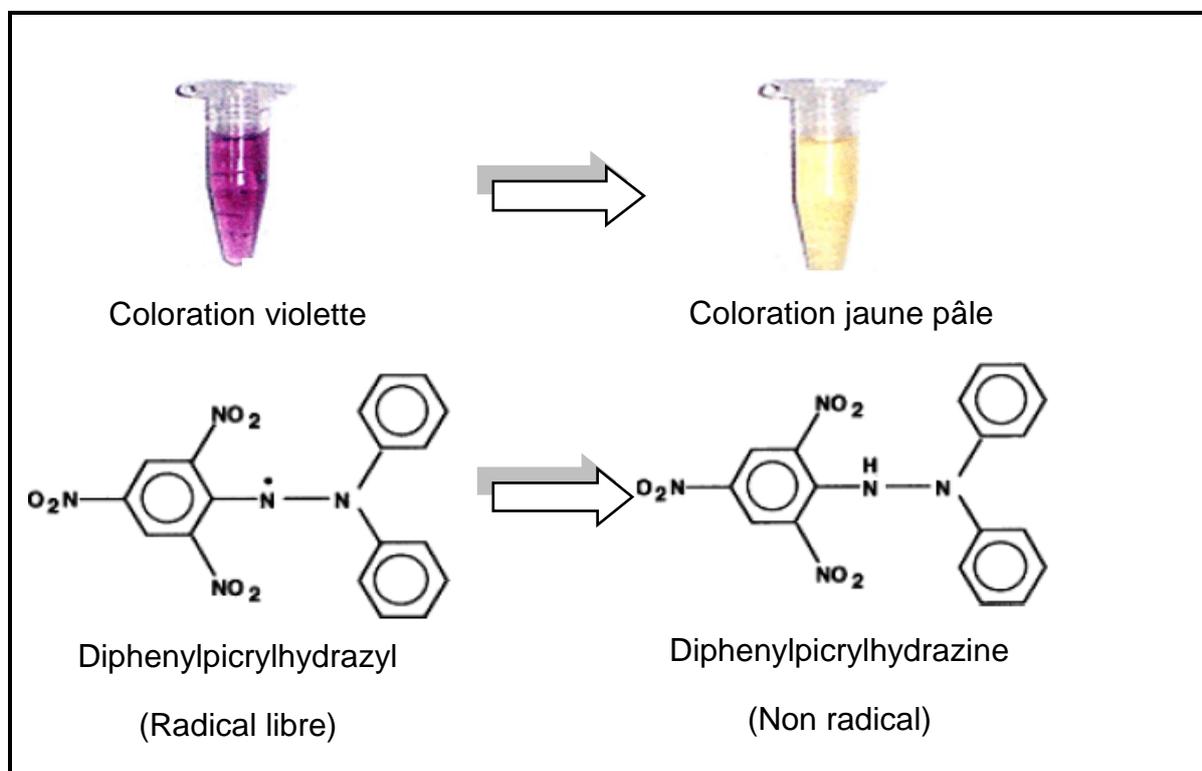


Figure 3.12 : Forme libre et réduite du radical DPPH [184 ; 185].

3.7.2.2. Préparation de solutions

Une solution de DPPH a été préparée par solubilisation de 4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol.

Pour le test, les substances testées (HE et l'extrait) et les témoins (BHA, BHT et VE) ont été préparés par dissolution dans le méthanol absolu à raison de 20 mg/ml pour l'HE, 2mg/ml pour l'extrait et 0.2mg/ml pour les témoins. Ces solutions dites solutions mères, subiront ensuite des dilutions pour avoir différentes concentrations de l'ordre de milligramme par millilitre.

3.7.2.3. Procédure expérimentale

Dans des tubes secs et stériles, on introduit 1 ml de méthanol (figure 3.13a) suivie par les différentes concentrations des solutions à tester ou des témoins au quelle on ajoute 1 ml de la solution DPPH.

Après agitation par un vortex (figure 3.13b), les tubes sont mis à l'obscurité à une température ambiante pendant 30 minutes. Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois.

La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV- Visible (figure 3.13c), en utilisant des cuves en quartz de volume de 2 ml. Pour chaque dilution, on prépare un blanc.

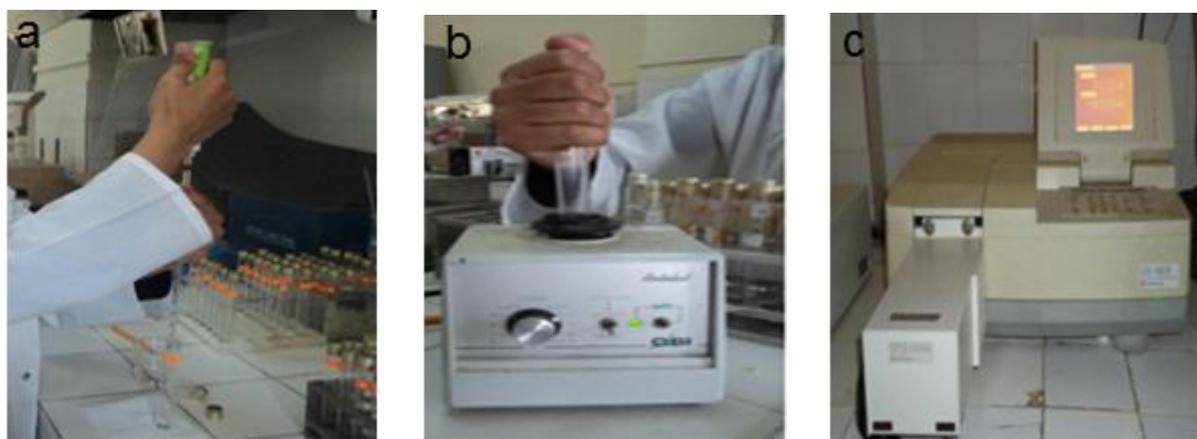


Figure 3.13 : Différentes étapes du test au DPPH ;(a) : introduction du méthanol ;
(b) : agitation par le vortex ;(c) : mesure par spectrophotomètre UV- Visible
[original].

3.7.2.4. Expression des résultats

La caractéristique principale d'un antioxydant est sa capacité à piéger les radicaux libres. Le pourcentage d'activité (I %) est donné par la formule suivante :

$$I (\%) = \left(\frac{Abs_{blanc} - Abs_{échan}}{Abs_{blanc}} \right) \times 100$$

Où :

$I (\%)$: Pourcentage d'activité antioxydante

Abs_{blanc} : Absorbance du témoin à 517nm.

$Abs_{échan}$: Absorbance de l'échantillon à 517nm.

Les résultats ont été exprimés par la moyenne de trois mesures \pm écart type. La valeur EC_{50} (concentration nécessaire pour l'inhibition de 50% des radicaux libres et appelée aussi la valeur IC_{50}) a été déterminée pour chaque échantillon, est défini comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (couleur). Les valeurs de EC_{50} des substrats sont comparées à celles trouvées pour les antioxydants de référence : BHA, BHT et VE [186].

3.8. Etude phytochimique

L'étude quantitative de l'extrait méthanolique préparé à partir des feuilles de l'*Artemisia absinthium* L a été effectuée spectrophotométriquement selon la méthode au réactif de Folin- Ciocalteu [187-192]. L'utilisation de cette méthode est largement répandue afin de caractériser la diversité des extraits végétaux.

3.8.1. Dosage des phénols totaux

3.8.1.1. Principe

Le réactif de Folin–Ciocalteu consiste en une solution jaune constituée par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$).

En milieu alcalin, le réactif de Folin-Ciocalteu, oxyde les composés polyphénoliques présents dans l'échantillon en ions phénolates et réduit partiellement ses hétéropolyacides, d'où la formation d'un complexe bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) [193 ; 194]. L'intensité d'absorption est proportionnelle à la quantité de phénols présents dans l'échantillon. L'absorbance de tous les extraits a été mesurée par un spectrophotomètre UV-visible à une longueur d'onde de l'ordre 760nm.

3.8.1.2. Procédure expérimentale

0.5 ml de l'échantillon (l'extrait végétal) a été introduits à l'aide d'une pipette dans des tubes à essai, suivis de l'addition de 7ml de l'eau distillée et de 0.5ml du réactif Folin- Ciocalteu. Après agitation pendant 3 minutes, 2ml de carbonates de sodium (Na_2CO_3) à 20% ont été ajoutés à l'ensemble, puis incubés à 100°C dans un bain marie pendant une minute et sont maintenus à l'obscurité à température ambiante.

L'absorbance a été déterminée à 760nm contre un blanc (même solution précédente à l'exception de l'extrait phénolique) sur un spectrophotomètre.

La quantification des phénols totaux de notre extrait a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = a x + b$), établie avec le standard étalon d'acide gallique à dix concentrations d'un interval allant de 0.5 à 5mg/ml et dans les mêmes conditions que l'échantillon. La teneur des polyphénols totaux a été exprimée en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait des feuilles en poudre (mg EAG/g).

L'estimation de la quantité en phénols totaux de notre extrait végétal (figure 3.14) est obtenue selon le protocole expérimental cité dans le schéma suivant :

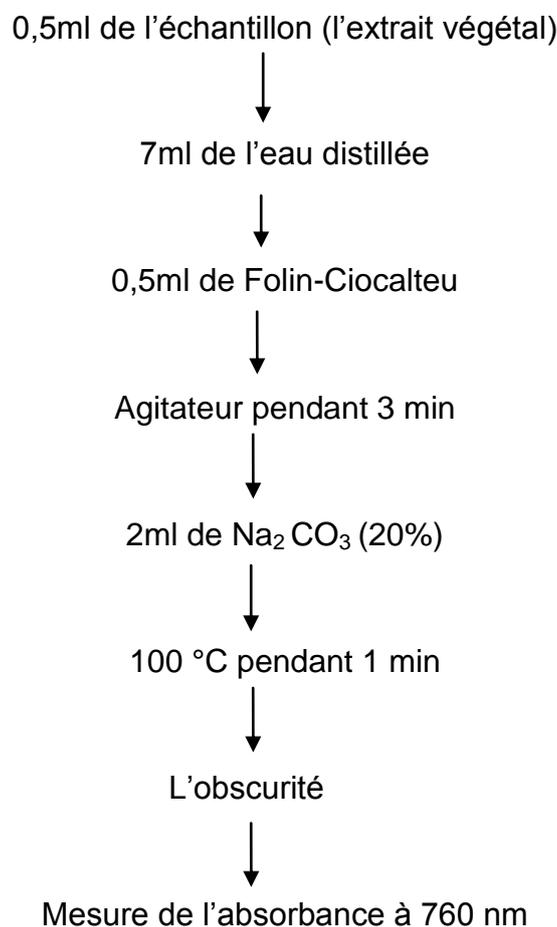


Figure 3.14 : Protocole de mise en œuvre du test de dosage des phénols totaux.

3.8.2. Dosage des tanins

Le principe et la procédure d'expérimentation du dosage des tanins est la même que celle suivie dans le dosage des phénols totaux. Pour cela, on utilise une courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide tannique dans la quantification des tanins et on mesure les différentes absorbances à une longueur d'onde de 685 nm.

3.9. Analyse statistique des résultats

Toutes les expériences ont été répétées trois fois, les résultats ont été présentés par la moyenne avec son écart type pour chaque cas.

Les résultats recueillis sur les rendements d'extraction et l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE et l'activité antioxydante des références ont fait l'objet d'analyses statistiques.

Les analyses statistiques des résultats sont traitées par le logiciel STAT-ITCF 1987-1988 vers.4 par une analyse de variance au seuil de 5%. Le test de NEWMAN et KEULS est utilisé pour la comparaison des moyennes.

Tous les histogrammes obtenus ont été réalisés en utilisant le logiciel Excel (Microsoft Office 2007) et les graphes obtenus ont été tracés en utilisant logiciel Origin 2000 vers.6.1.

CHAPITRE 4

RESULTATS ET DISCUSSIONS

4.1. Rendement et composition chimique de l'huile essentielle de l'absinthe

4.1.1. Rendement en huile essentielle

Les HE ont été extraites des matériaux végétaux secs. L'*Artemisia absinthium* provenant de Cherchell a fourni un rendement moyen en HE, exprimé en gramme pas rapport à 100 grammes de matière végétale sèche avec deux méthodes d'extraction : l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur d'eau.

Afin de déterminer l'effet des procédés d'extraction sur le rendement en HE, nous avons effectué l'analyse de la variance (appendice C).

A l'issu de cet essai, les résultats obtenus montrent que pour le facteur procédés d'extraction, l'analyse de la variance a révélé l'existence d'une action significative sur le rendement en HE.

D'après le test de NEWMAN et KEULS au seuil de 5%, nous constatons que la méthode de l'hydrodistillation présente la moyenne de rendement en HE la plus élevée avec 0.56 ± 0.05 %, suivie de celle de l'entraînement à la vapeur d'eau qui présente une moyenne de 0.45 ± 0.08 % . Le test de NEWMAN et KEULS a classé les traitements en deux groupes homogènes (tableau 4.1).

Les résultats du rendement en HE de l'absinthe en fonction de procédés d'extraction sont donnés par le tableau 4.1 et la figure 4.1

Tableau 4.1: Test de NEWMAN et KEULS du facteur procédés d'extraction sur le rendement en huile essentielle

Traitements	Moyenne \pm δ	Groupes homogènes
Hydrodistillation (HD)	0.56 ± 0.05	A
Entraînement à la vapeur d'eau (EV)	0.45 ± 0.08	B

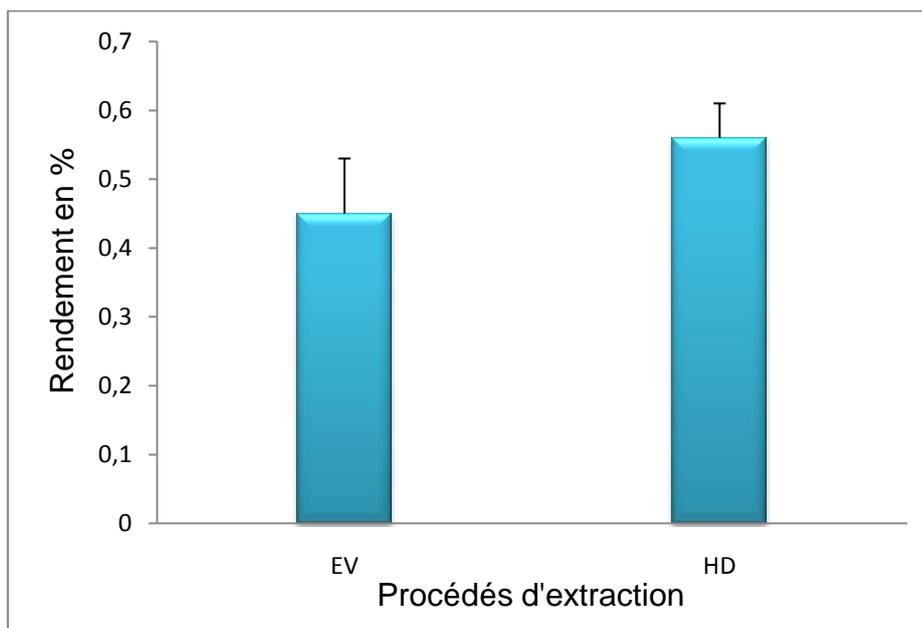


Figure 4.1 : Effet des procédés d'extraction sur le rendement en huile essentielle

Ces huiles sont d'une couleur bleu verdâtre et d'une odeur très forte et piquante (figure 4.2).



Figure 4.2 : Huile essentielle d'absinthe

Selon ORHAN et *al.* [195], la famille des Astéraceae contiennent des quantités appréciables d'HE.

Le rendement en HE de notre échantillon est similaire à celui estimé par WEISS et THIEME VERLAG [31], et SCHULZ et *al.* [196], il a été remarqué que les rendements varient respectivement de 0.25% à 0.5% et de 0.3% à 0.5% en HE.

La teneur en HE est très proche de celle obtenue par LOPES et *al.* [6] au Canada et par DERWICH et *al.* [9] au Maroc, elle a été évaluée respectivement à 0.5% et à 0.57%, alors qu'elle est moindre à celle de la Turquie [5 ; 19] avec 0.67%.

Nos résultats sont inférieurs à ceux obtenus par ORHAN et *al.* [195] et par REZAEINODEHI et KHANGHOLI [7]. Le premier auteur a estimé la teneur en HE de cette espèce cueillie en Algérie (Sétif) à environ 1.5%, le deuxième auteur a déterminé un rendement de 1.3% sur la plante provenant d'Iran. Ces résultats représentent presque le triple de ce qu'on a obtenu en teneur. Par ailleurs, les rendements obtenus aussi bien par ORHAN et *al.* [195], et REZAEINODEHI et KHANGHOLI [7] et par les nôtres, convergent sur un même intervalle de 0.2 à 1.7% [197 ; 198].

4.1.2. Composition chimique de l'huile essentielle de l'absinthe par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

L'identification de la composition chimique de l'HE d'*Artemisia absinthium* L par CG/SM est basée sur la comparaison des composés fournis par la banque de données utilisée par CG/SM et d'autres composés fournis par le logiciel NIST98.L.

On a identifié la composition chimique de l'HE des deux méthodes d'extractions citées précédemment.

4.1.2.1. Hydrodistillation

Le profil chromatographique de l'HE extraite par l'hydrodistillation (figure 4.3) et les résultats d'analyse par CG/SM sont présentés dans le tableau 4.2. Dix-sept constituants sont identifiés (appendice D₁) représentant un total de 98.15% de cette essence (figure 4.4).

Cette HE comprend comme composés majoritaires : la thuyone (60.82%) suivi de chamazulène (16.65%), le *p*-cymène (4.29%) et le 2-carène (4.25%) (Figure 4.5). Ces principaux constituants représentent 86.01% de la composition chimique totale. Cette huile est d'une couleur bleu.

D'autres composés sont présents avec des teneurs inférieures à 4% : le γ -terpinène (3.71%), le 4-terpinéol (2.89%), le caryophyllène (1.15%), le β - eudesmol (1.13%), le β -myrcène (0.93%), le α - phellandrène (0.71%), le α -terpinéol (0.58%), le

germacrène (0.36%), le 3-carène (0.34%), le β -thujène (0.14%), le camphène et β -bourbonène avec (0.09%), le α -pinène (0.02%).

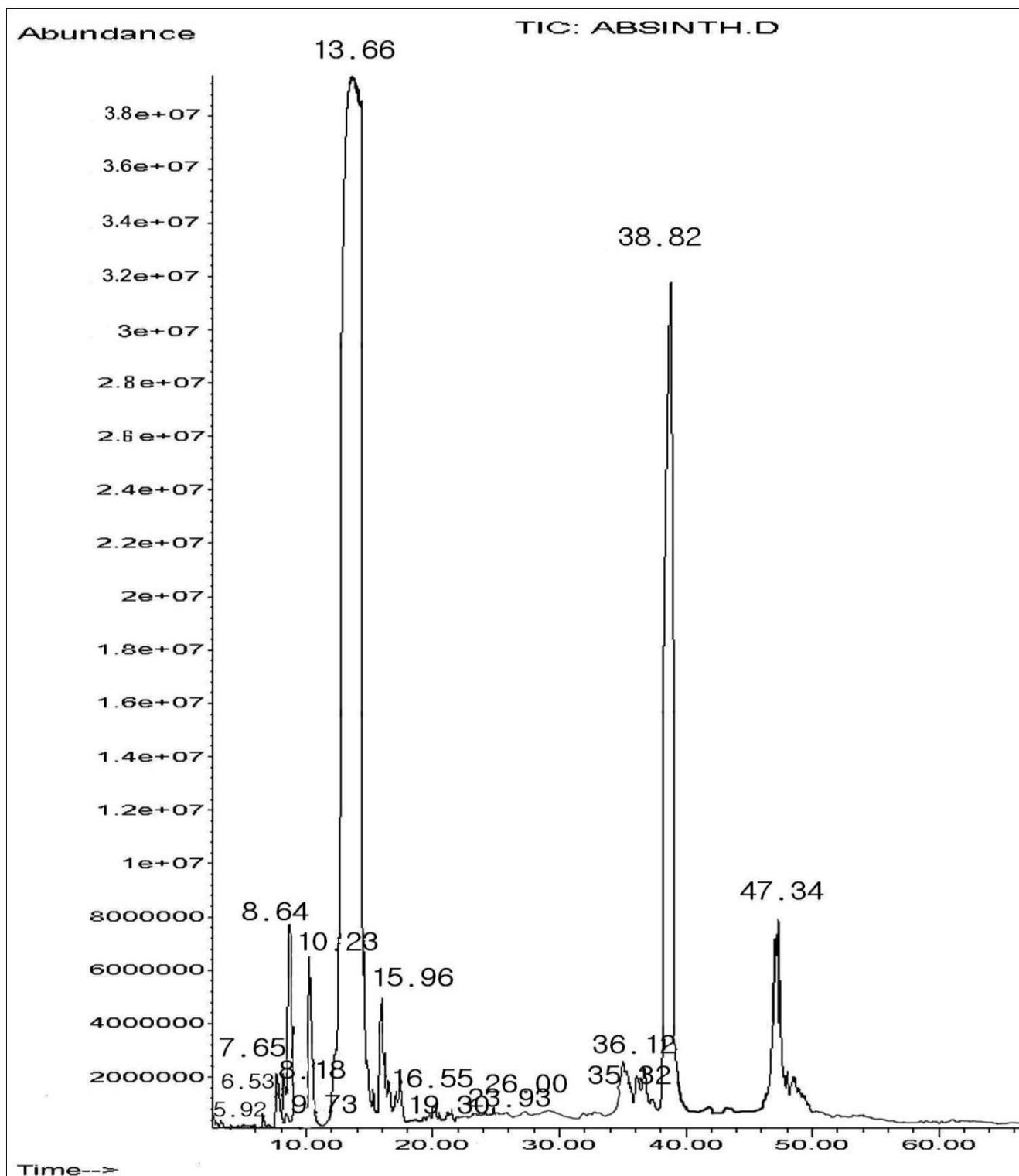


Figure 4.3: Profil chromatographique de la composition chimique de l'huile essentielle de l'absinthe extraite par l'hydrodistillation

Tableau 4.2 : Composition chimique de l'huile essentielle de l'absinthe extraite par l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur d'eau

Numéro	Temps de rétention (min) moyen	Constituants	Hydrodistillation (%)	Entraînement à la vapeur d'eau (%)
1	5.92	α -Pinène	0.02	0.41
2	6.83	β -Thujène	0.14	3.04
3	7.65	β - Myrcène	0.93	-
4	7.70	β -Pinène	-	3.28
5	8.18	α - Phellandrène	0.71	-
6	8.58	δ - Carène	-	0.38
7	8.64	2-Carène	4.25	-
8	9.73	3-Carène	0.34	-
9	10.20	γ -Terpinène	3.71	1.26
10	13.52	Thujone	60.82	54.07
11	15.99	4-Terpinéol	2.89	2.75
12	16.58	α -Terpinéol	0.58	0.96
13	19.30	Camphène	0.09	-
14	23.57	Copaène	-	0.83

15	23.95	β - Bourbonène	0.09	0.81
16	27.11	Germacrène	0.36	4.24
17	30.8	Caryophyllène	1.15	1.46
18	35.34	β - Eudesmol	1.13	3.71
19	38.72	Chamazulène	16.65	10.23
20	47.36	ρ -Cymène	4.29	9.86
Nombre de constituants identifiés			17	15
TOTAL			98.15	97.29

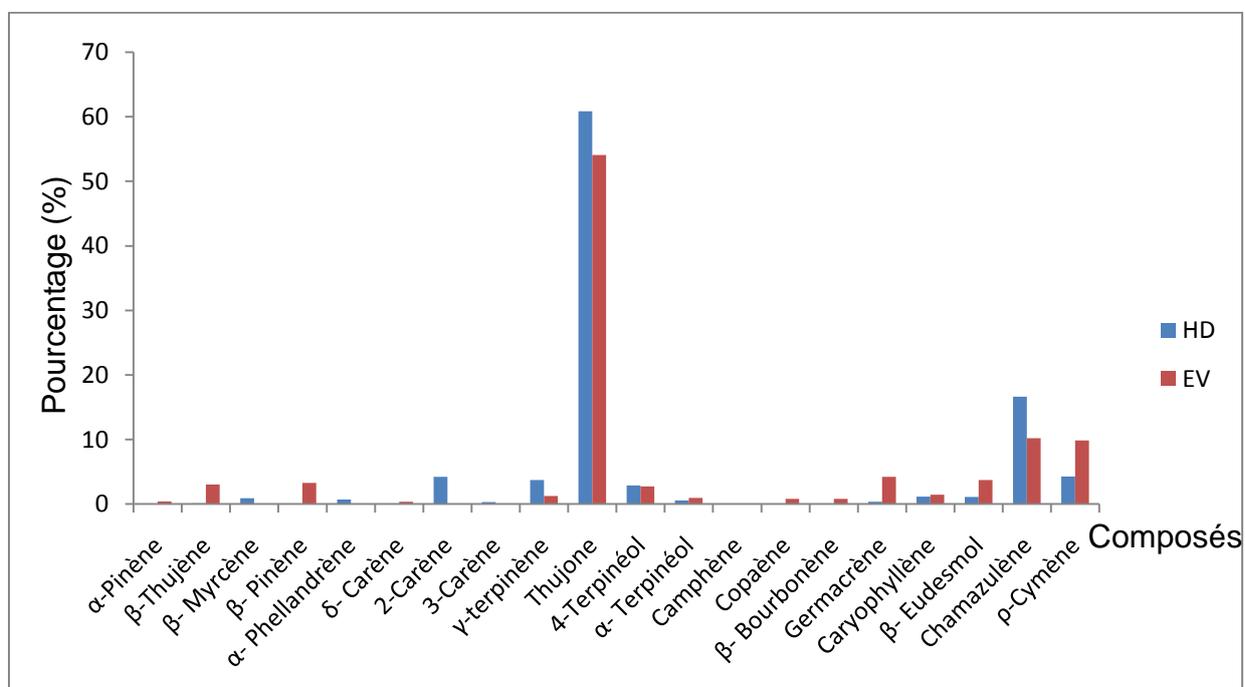


Figure 4.4: Histogramme des différents constituants de l'huile essentielle d'*Artemisia absinthium* L extraite par l'hydrodistillation (HD) et l'entraînement à la vapeur d'eau (EV).

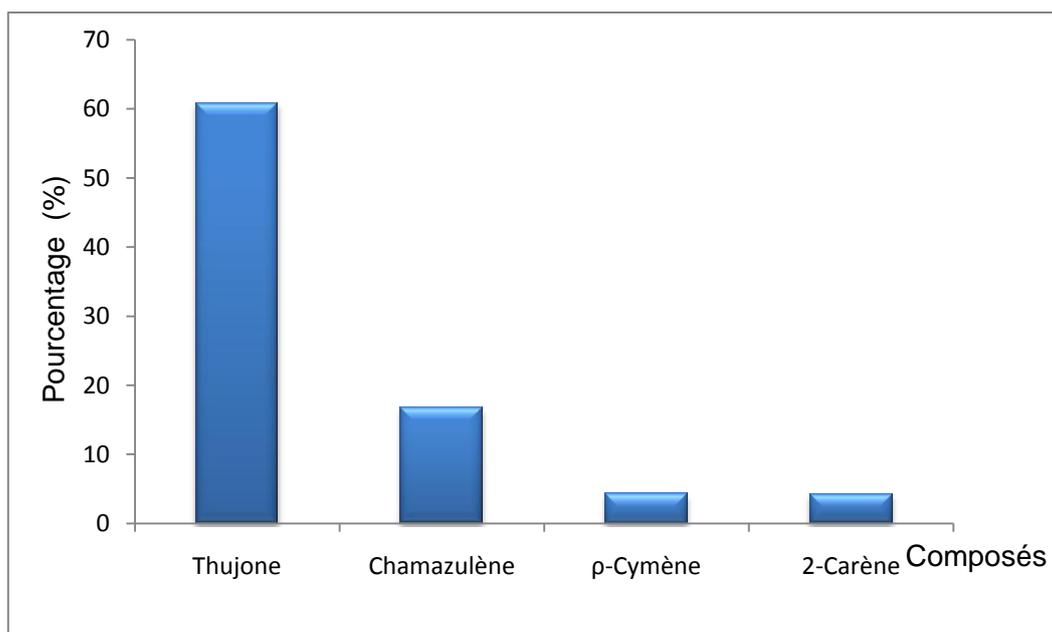


Figure 4.5 : Histogramme des constituants majoritaires de l'huile essentielle d'*Artemisia absinthium* L extraite par l'hydrodistillation.

4.1.2.2. Entraînement à la vapeur d'eau

Le profil chromatographique de l'HE extraite par l'entraînement à la vapeur d'eau est rapporté dans la figure 4.6 et les résultats d'analyse par CG/SM sont regroupés dans le tableau 4.2. Quinze constituants (appendice D₂) représentant environ 97.29% de l'essence ont été identifiés (Figure 4.4).

L'HE de l'absinthe est composée principalement par le thujone (54.07%) accompagnée par d'autres constituants et à un degré moindre, le chamazulène (10.23%), le p-cymène (9.86%) et le germacrène (4.24%) (Figure 4.7), totalisant environ 78.4% de la composition chimique totale. Cette huile est d'une couleur verdâtre.

Les autres composés sont présents avec des teneurs inférieures à 4% : le β-eudesmol (3.71%), le β-pinène (3.28%), le β-thujène (3.04%), le 4-terpinéol (2.75%), le caryophyllène (1.46%), le γ-terpinène (1.26%), le α-terpinéol (0.96%), le copaène (0.83%), le β-bourbonène (0.81%), le α-pinène (0.41%) et le δ-carène (0.38%).

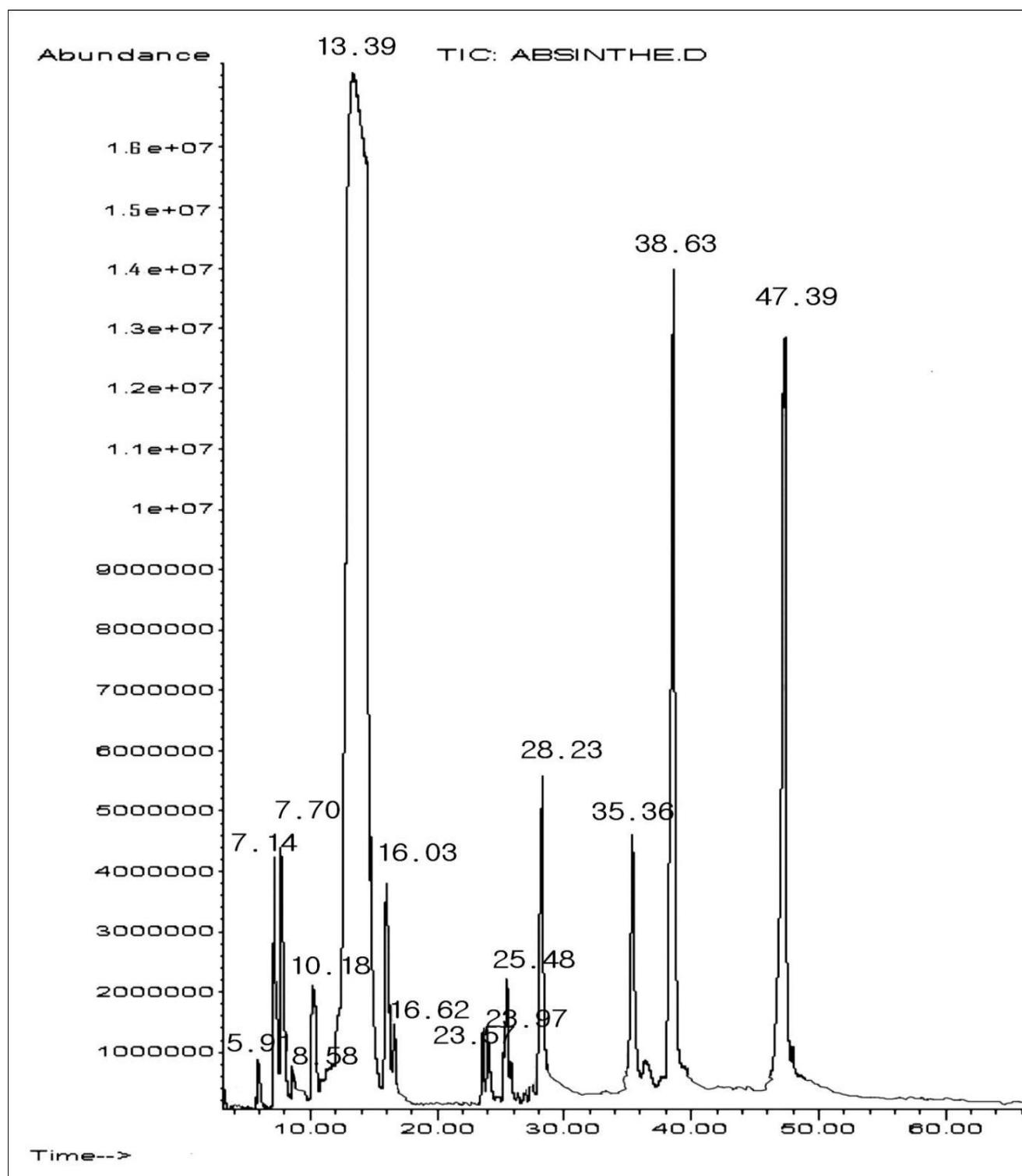


Figure 4.6 : Profil chromatographique de la composition chimique de l'huile essentielle de l'absinthe extraite par l'entraînement à la vapeur d'eau

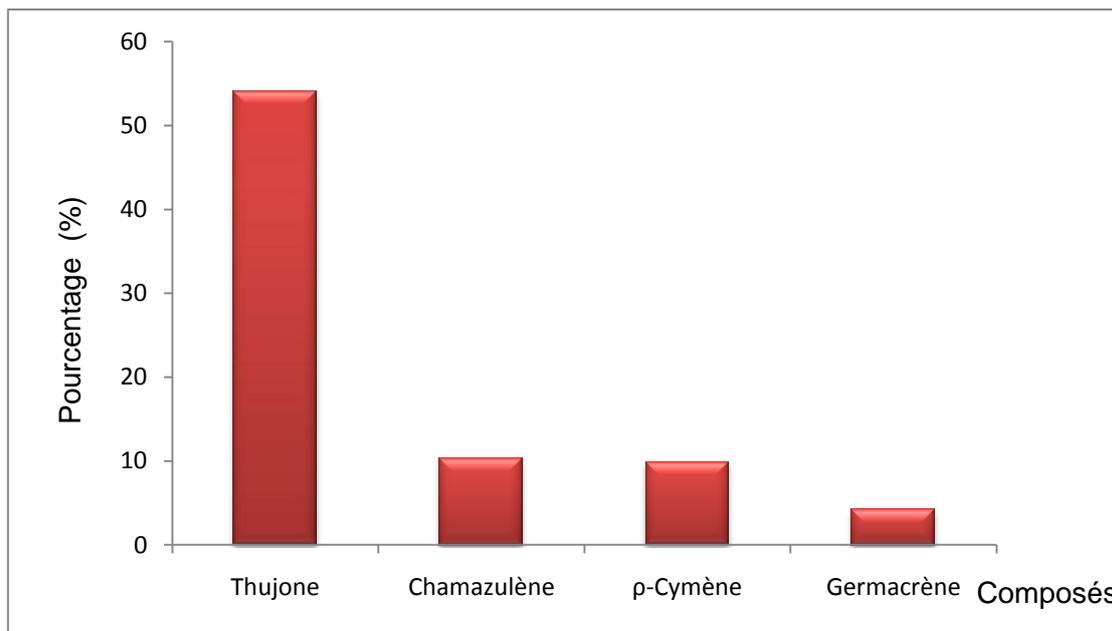


Figure 4.7 : Histogramme des constituants majoritaires de l'huile essentielle de l'absinthe extraite par l'entraînement à la vapeur d'eau.

L'HE extraite par l'hydrodistillation est dominée par les cétones monoterpéniques (60.82%), suivis par les hydrocarbures sesquiterpéniques (18.25%), puis par les hydrocarbures monoterpéniques (14.48%) et enfin les alcools avec 4.6% qui sont réparties entre les alcools monoterpéniques (3.47%) et les alcools sesquiterpéniques (1.13%).

L'HE extraite par l'entraînement à la vapeur d'eau est aussi dominée par les cétones monoterpéniques avec (54.07%), suivis par les hydrocarbures monoterpéniques (18.23%), puis les hydrocarbures sesquiterpéniques (17.57%) et en dernier les alcools avec 7.42% qui sont réparties avec une même teneur(%) entre les monoterpènes et les sesquiterpènes.

La répartition des différentes familles chimiques de l'HE d'absinthe extraite par l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur d'eau est regroupée dans le tableau 4.3 et présentées dans la figure 4.8.

Tableau 4.3 : Comparaison entre les teneurs (%) des différentes familles chimiques de composé de l'huile essentielle d'absinthe extraite par deux procédés d'extraction

Familles chimiques	Hydrodistillation (%)	Entraînement à la vapeur d'eau (%)
Monoterpènes :		
Hydrocarbures	14.48	18.23
Cétones	60.82	54.07
Alcools	3.47	3.71
Sesquiterpènes :		
Hydrocarbures	18.25	17.57
Cétones	-	-
Alcools	1.13	3.71
TOTAL	98.15	97.29

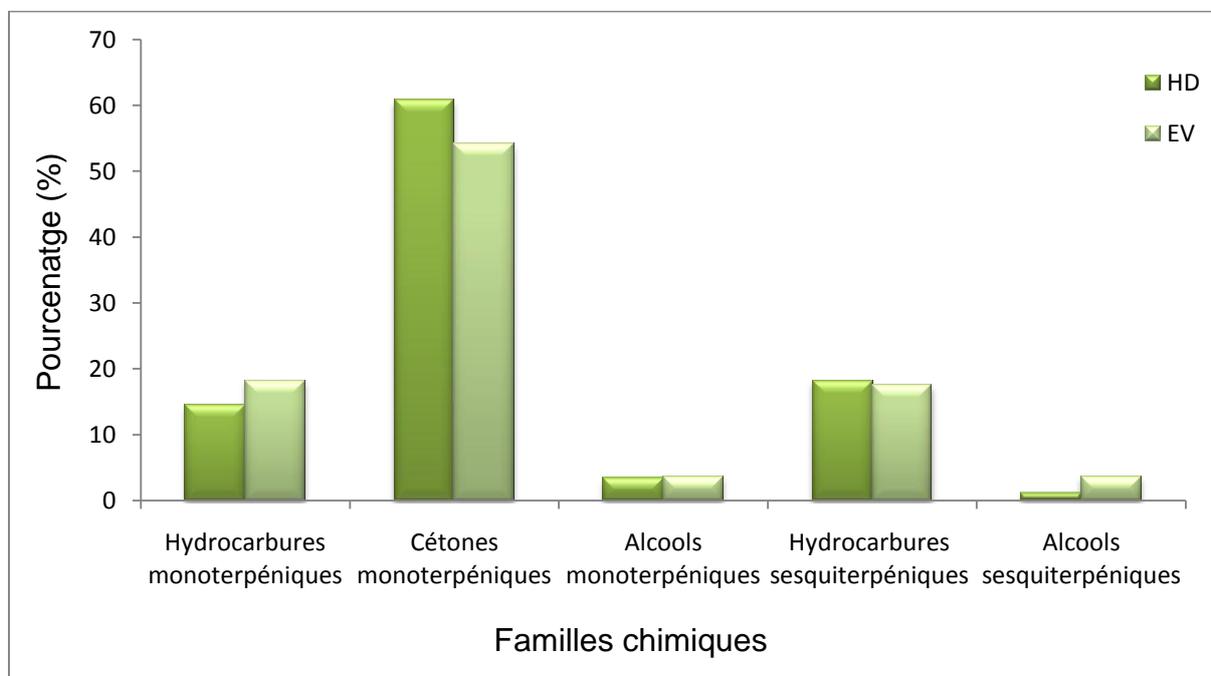


Figure 4.8 : Histogramme représentant les différentes familles chimiques de composés de l'huile essentielle d'absinthe extraite par l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur d'eau

D'après la figure 4.8 et les résultats d'analyse CG/SM de l'HE obtenus par les deux procédés d'extraction, nous constatons que malgré la technique d'extraction utilisée, le chimiotype et le chémotype de la plante est globalement le même, néanmoins, la teneur des composés chimique différent selon le procédés d'extraction.

La méthode de l'hydrodistillation a présenté un taux élevé en composés majoritaires de cette HE (86.01%) par rapport à celui obtenu par l'entraînement à la vapeur d'eau (78.4%). Ceci est dû au constituant majoritaire cétonique, il s'agit de la « thuyone » : l'hydrodistillation a présenté une teneur de 60.82% alors que la méthode d'entraînement à la vapeur a fourni une teneur de 54.07% pour la thuyone.

Du moment que, l'hydrodistillation présente un chimiotype plus riche en composé majoritaire, il est intéressant d'utiliser l'HE extraite par cette technique pour effectuer des tests biologiques.

Le tableau 4.4 regroupe les principaux constituants de l'HE d'absinthe de différents pays.

Tableau 4.4: Comparaison entre les teneurs (%) des composés majoritaires de l'huile essentielle d'absinthe de l'Algérie avec ceux des autres pays

Pays Composés	Algérie Cherchell (HD)	Algérie Cherchell (EV)	Algérie Gouraya [58]	Maroc Gigou [9]	Turquie Erzurum [5]	Iran Khorasan Razavi [8]	Iran Guilan [7]	Canada Alberta [6]
Thuyone	60.82	54.07	90.12	46.94	0.7	0.07	18.6	β:10.1
Chamazulène	16.65	10.23	-	-	17.8	-	0.9	0.3
ρ-Cymène	4.29	9.86	-	1.02	0.6	10.35	1.9	1.2
Acétate de Sabinyl	-	-	-	10.96	-	-	-	26.4
β-Pinène	-	3.28	-	0.29	-	0.42	23.8	0.1
Sabinène	-	-	-	0.25	-	-	8.9	1.6
Myrcène	0.93	-	1.38	-	0.2	0.04	4.0	10.8
Camphor	-	-	5.01	-	1.4	14.83	-	-
Isodène	-	-	-	-	-	8.52	-	-
Nuciferol butanoate	-	-	-	-	8.2	-	-	-
Nuciferol propionate	-	-	-	-	5.1	-	-	-

Nous avons remarqué que la teneur du composé majoritaire « thuyone » de l'HE de l'absinthe obtenue en Algérie (2010, 2011) et au Maroc [9] présente des quantités respectivement de 90.12% ,60.82/54.07% et 46.94% en thuyone. L'absinthe récoltée en Algérie et au Maroc est chimiotaxonomique de type thuyone. Ce dernier est présent dans l'huile à des pourcentages entre 40-70% et selon l'origine de plante [199 ; 31 ; 200 ; 18 ; 201 ; 202 ; 196 ; 47 ; 71 ; 198]. Par exemple, en Iran [7], l'analyse de l'HE de l'absinthe récoltée dans le Nord-Ouest du pays, présente le chimiotype suivant par ordre majoritaire décroissant: β -pinène, thuyone et le sabinène, alors que celle récoltée dans le Nord-Est du pays [8] donne le chimiotype composé de : camphor, p-cymène et isodène. Par ailleurs, l'analyse de l'HE de la même plante, récoltée au Canada [6], présente le chimiotype suivant : sabinyl acétate, myrcène et thuyone. Tandis que, en Turquie [5], l'analyse de l'HE montre un chimiotype composé de : chamazulène, nuciferol butanoate et nuciferol propionate.

A l'issu de ces résultats, nous constatons que l'origine géographique a un effet important sur la composition chimique de l'HE d'*Artemisia absinthium* L [6 ; 10]. En effet, nos résultats présentent un chimiotype qui ne concorde pas avec ceux du Canada [6], de l'Iran [7 ; 8] et de la Turquie [5].

Les résultats des teneurs en monoterpènes oxygénés, hydrocarbures monoterpéniques, sesquiterpènes oxygénés et en hydrocarbures sesquiterpéniques de l'HE de l'absinthe de différents pays du monde sont regroupés dans le tableau 4.5.

Tableau 4.5: Comparaison entre les teneurs (%) des différentes familles chimiques de composés de l'huile essentielle d'absinthe de l'Algérie avec ceux des autres pays

Composés	Mono- terpènes oxygénés	Hydro- carbures mono- terpéniques	Sesqui- terpènes oxygénés	Hydro- carbures sesqui- terpéniques	Année de la récolte
Algérie Cherchell (HD)	64.29	14.48	1.13	18.25	2011
Algérie Cherchell (EV)	57.78	18.23	3.71	17.57	2011
Algérie Gouraya [58]	95.63	4.07	0	0	2010
Maroc Gigou [9]	53.47	2.21	1.12	0.60	2008
Turquie Erzurum [5]	23.5	0.4	19.9	6.0	2003
Iran Khorasan Razavi [8]	22.06	20.6	7.5	29.55	2010
Iran Guilan [7]	27.6	47.8	8.8	9.1	2005
Canada Alberta [6]	49.3	18.0	0.8	1.6	2004

JUDPENTIENE et MOCKUTE [203] ont rapporté que l'HE de l'absinthe est majoritairement formée de monoterpènes oxygénés avec un taux de (47,1- 66,7%) et des hydrocarbures monoterpéniques (8,2 à 24%).

Dans le cas des monoterpènes oxygénés, les résultats obtenus en Algérie (Cherchell), au Maroc [9] et au Canada [6] sont cohérents avec ceux trouvés par JUDPENTIENE et MOCKUTE [203], par contre les résultats des HE d'*Artemisia absinthium* collectée dans les autres pays : Algérie (Gouraya) [58], Iran [7 ; 8] et Turquie [5] ne sont pas inclus dans l'intervalle cité par JUDPENTIENE et MOCKUTE [203].

Dans le cas des hydrocarbures monoterpéniques, les résultats de l'Algérie (Cherchell), du Canada [6] et de l'Iran [8] s'intègrent dans l'écart de 8,2 à 24%, quant aux HE d'absinthe récoltée dans les autres pays Iran [7], Turquie [5], Algérie (Gouraya) [58] et Maroc [9] leurs résultats sont différents.

La qualité et le rendement en HE de l'absinthe sont influencés par divers facteurs tels que l'origine, le stade phénologique, les influences environnementales, le patrimoine génétique, le mode de séchage, les méthodes d'étude (extraction et détection) et l'année de la récolte [204-210].

4.2. Propriétés de l'extrait

L'extrait méthanolique d'absinthe est d'une couleur marron foncé, d'un aspect liquide et d'une odeur forte piquante (figure 4.9)



Figure 4.9 : Extrait d'absinthe

4.3. Effets biologiques

4.3.1. Pouvoir antimicrobien

4.3.1.1. Etude de l'effet antifongique par la méthode de diffusion sur gélose

Nous avons effectué l'analyse de la variance du facteur : souches phytopathogènes, afin de déterminer leur effet sur le diamètre des zones d'inhibitions (appendice E).

L'analyse de la variance pour le facteur souche phytopathogènes, montre l'existence d'une action très hautement significative sur le diamètre des zones d'inhibitions.

D'après le test de NEWMAN et KEULS au seuil de 5%, nous remarquons que la moyenne des diamètres des zones d'inhibition les plus élevées sont obtenue avec la souche *Botrytis cinerea* avec une moyenne de 24.67 ± 0.58 mm et *Fusarium culmorum* avec une moyenne de 24.33 ± 0.58 mm, suivie de celle de *Helminthosporium* sp avec une moyenne de 17.17 ± 1.04 mm, et en dernier l'*Aspergillus* sp avec une moyenne de 11.33 ± 0.58 mm. Donc le test de NEWMAN et KEULS révèle trois groupes homogènes pour l'effet de souche phytopathogène sur le diamètre des zones d'inhibitions.

Le tableau 4.6 reporte les résultats en mm des zones d'inhibitions atteintes avec les différentes souches étudiées, et illustrées par la figure 4.10.

Tableau 4.6 : Test de NEWMAN et KEULS du facteur souche phytopathogène sur le diamètre des zones d'inhibitions ZI (mm)

Traitements	Moyenne \pm δ	Groupes homogènes
<i>Botrytis cinerea</i>	24.67 ± 0.58	A
<i>Fusarium culmorum</i>	24.33 ± 0.58	
<i>Helminthosporium</i> sp	17.17 ± 1.04	B
<i>Aspergillus</i> sp	11.33 ± 0.58	C

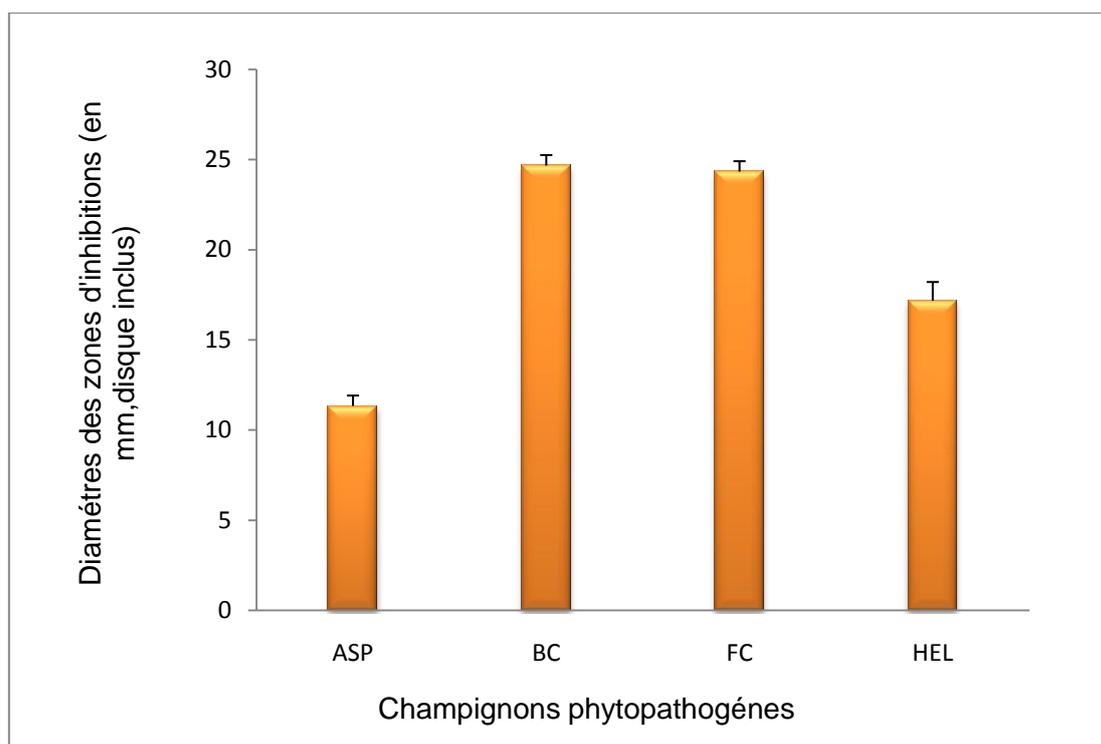


Figure 4.10 : Histogramme représentant l'activité antifongique de l'huile essentielle étudiée vis-à-vis de différentes souches : ASP (*Aspergillus sp*), BC (*Botrytis cinerea*), FC (*Fusarium culmorum*) et HEL (*Helminthosporium sp*) (moyenne $\pm \delta$ de trois mesures).

Nous avons testé l'activité antimicrobienne de l'HE d'absinthe par la méthode standard des disques. Les résultats montrent que l'huile testée a présenté une activité plus au moins modérée vis-à-vis des souches microbiennes testées.

Nous constatons par ailleurs que cette huile présente une activité beaucoup plus élevée au contact de *Botrytis cinerea* (24.67 mm) et *Fusarium culmorum* (24.33 mm) que celle de l'*Helminthosporium sp* (17.17 mm).

La zone d'inhibition est presque inexistante (11.33 mm sachant que les disques ont un diamètre de 9mm) pour l'*Aspergillus sp*.

Les mesures des zones d'inhibition figurant dans le tableau 4.6 nous ont permis de classer les souches testées.

Les champignons phytopathogènes : *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum* et *Helminthosporium sp* ont montré un diamètre de zone d'inhibition supérieur à 15mm. Ces trois champignons présentent une sensibilité variable à l'HE d'absinthe.

L'*Helminthosporium* sp a montré une sensibilité plus faible que *Fusarium culmorum* et *Botrytis cinerea*. Ces deux dernières souches présentent un même degré de sensibilité pour cette huile.

En revanche, l'*Aspergillus* sp a donné un diamètre inférieure à 15mm, donc cette souche a manifesté une certaine résistance pas rapport aux autres champignons testées.

Nous constatons que la majorité des champignons testés ont montré une sensibilité à l'HE d'absinthe (figure 4.11).

L'apparition des zones d'inhibitions indique l'existence de l'effet antifongique d'HE d'*Artemisia absinthium* L vis-à-vis de différentes souches testées.

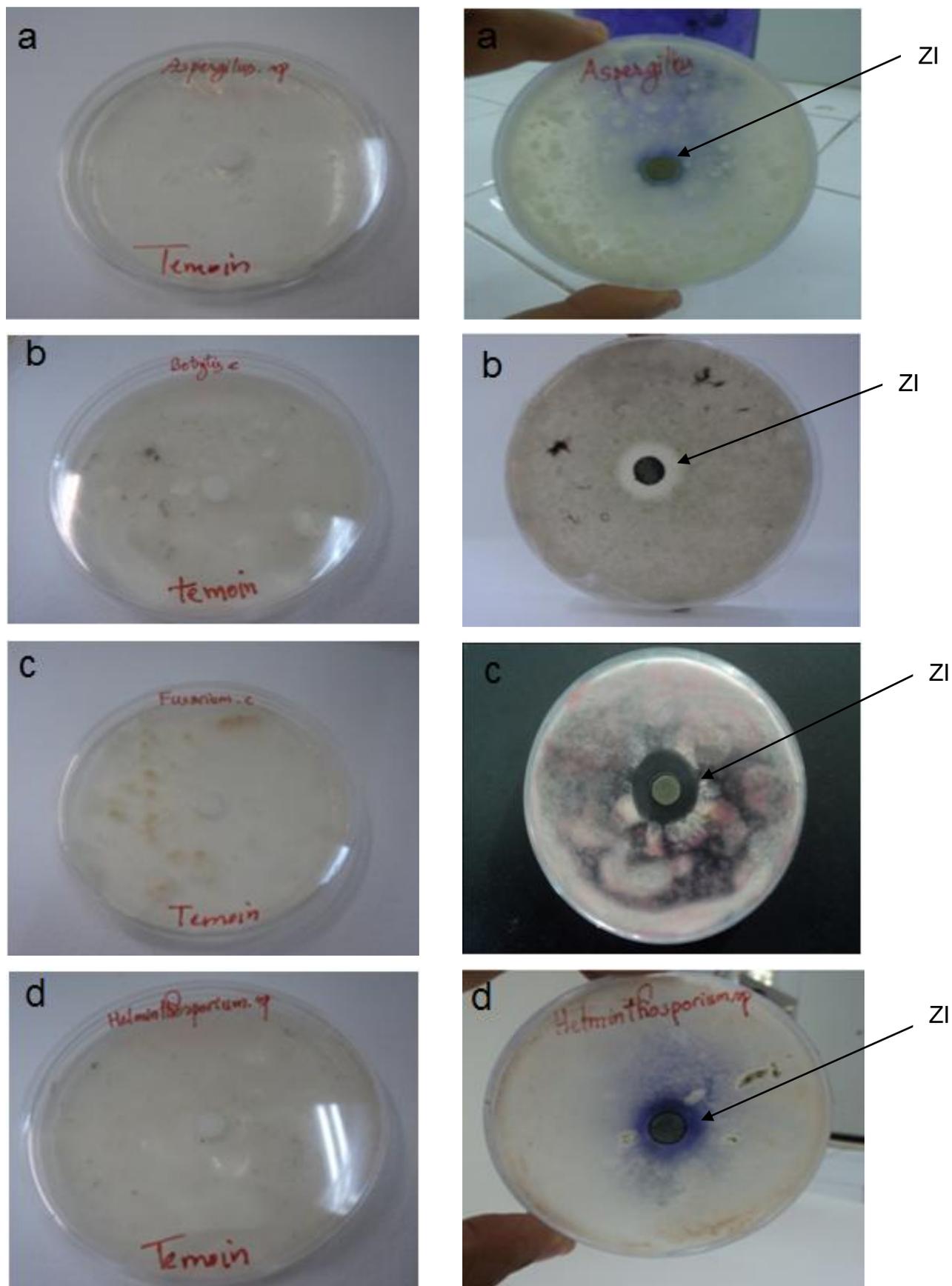


Figure 4.11 : Représentation des zones d'inhibition des souches testées : (a) *Aspergillus* sp ;(b) *Botrytis cinerea* ;(c) *Fusarium culmorum* ;(d) *Helminthosporium* sp.

4.3.1.2. Etude de l'effet antifongique par la méthode de microdilution

Les résultats du test de l'activité antifongique de l'HE extraite des feuilles d'absinthe sont résumés dans le tableau 4.7 et présenté par la figure 4.12.

Tableau 4.7 : Activité antifongique de l'huile essentielle d'*Artemisia absinthium* à différentes concentrations

Dilutions v/v Souches	1/100	1/250	1/500	1/1000	1/2000	1/5000	1/10000	T
Concentrations d'HE dans le milieu (µg/ml)	9300	3720	1860	930	465	186	93	0
ASP	-	-	+	+	+	+	+	+
BC	-	-	-	+	+	+	+	+
FC	+	+	+	+	+	+	+	+
HEL	-	+	+	+	+	+	+	+

Avec :

ASP: *Aspergillus sp.*

BC: *Botrytis cinerea.*

FC: *Fusarium culmorum.*

HEL: *Helminthosporium sp.*

+ : croissance.

- : Inhibition.

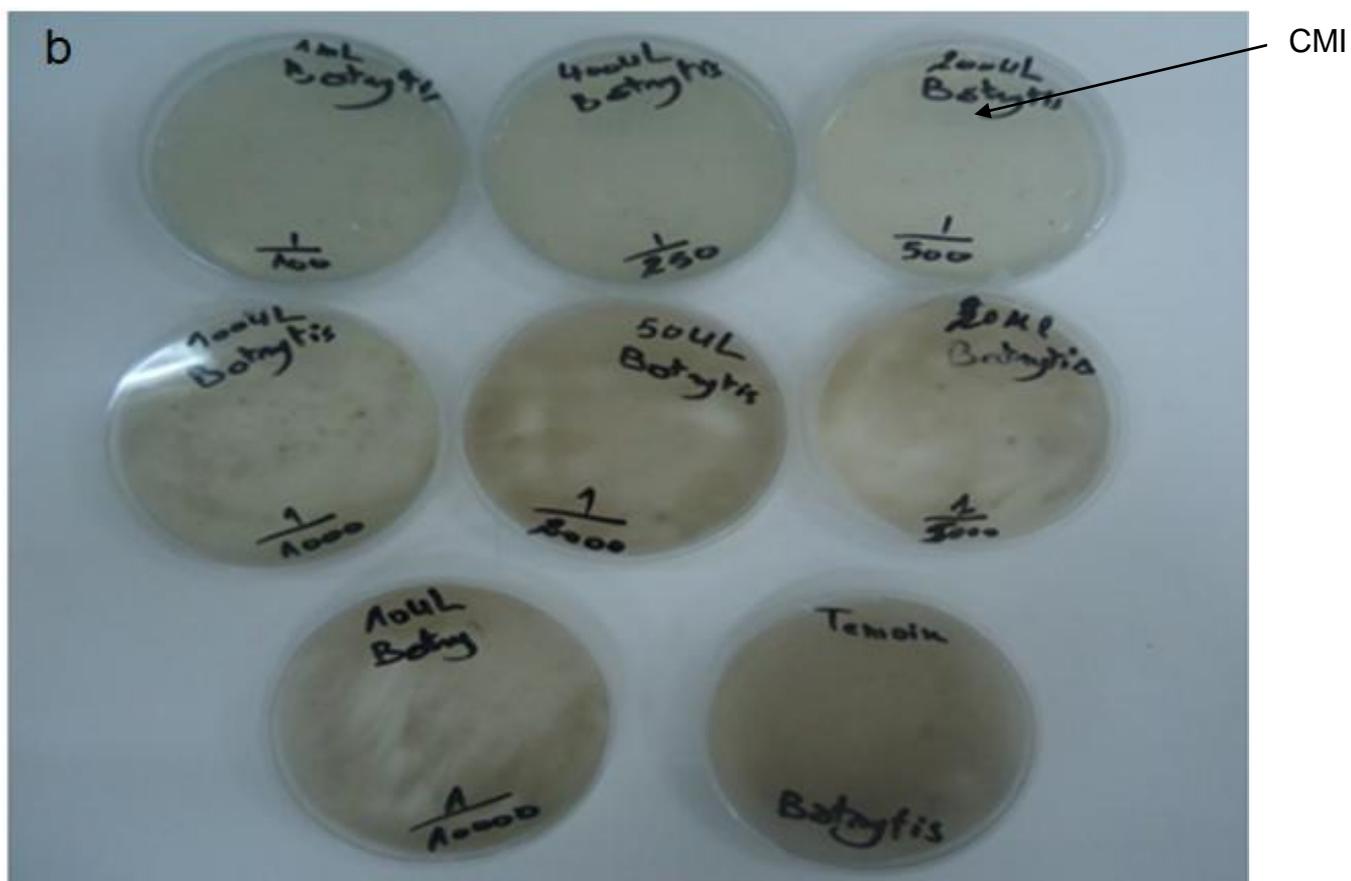
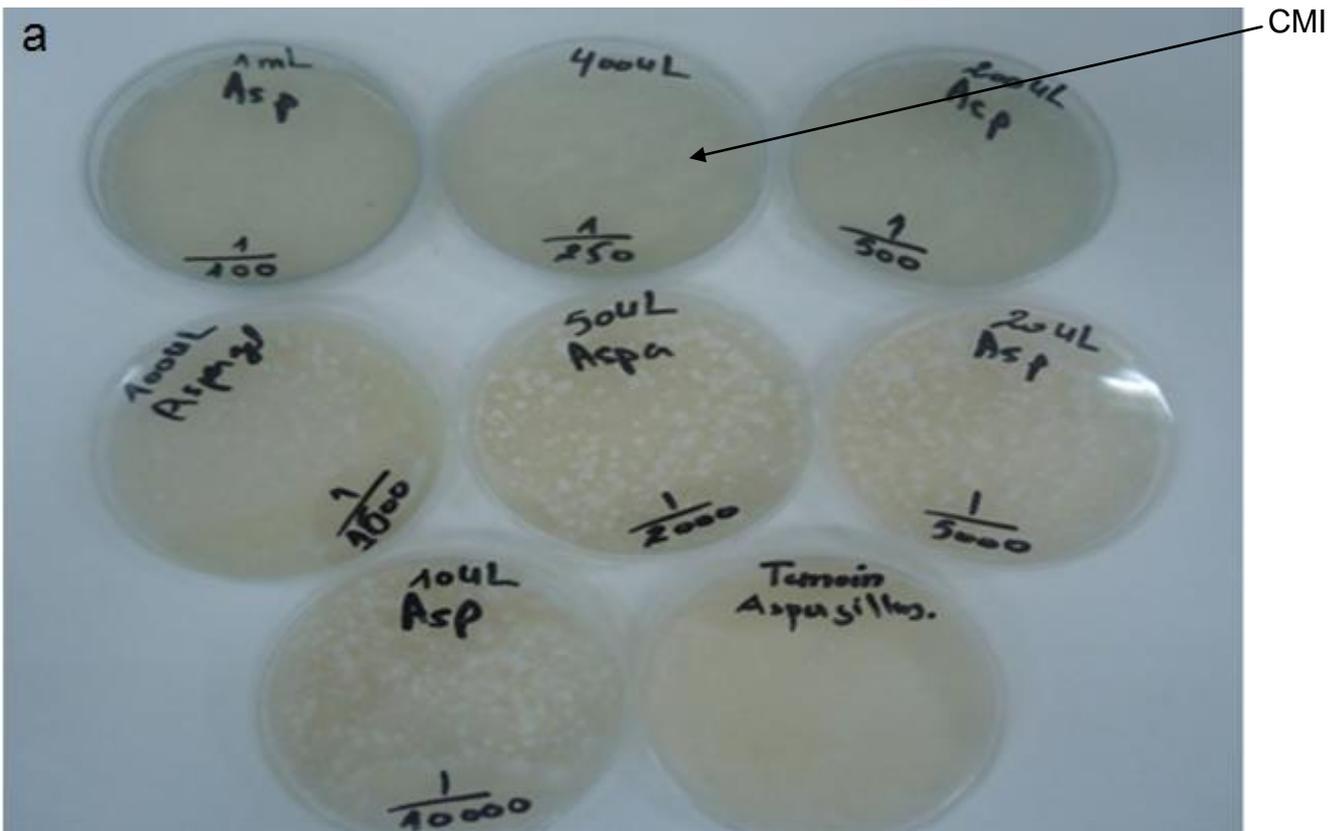
T : témoin.

L'HE étudiée s'est montrée active et a inhibé presque tous les microorganismes testés. Ainsi, *Botrytis cinerea* est le germe le plus sensible, il a été inhibé à partir de la concentration minimale de 1/500 v/v.

On note aussi que l'*Aspergillus sp* a été inhibé à la concentration de 1/250 v/v alors que l'inhibition de l'*Helminthosporium sp* a lieu à partir de la concentration minimale de 1/100 v/v. Nous avons relevé que l'HE testée n'a présenté aucune activité envers la souche fongique *Fusarium culmorum*.

Les trois champignons phytopathogènes testés ont montré une sensibilité à l'HE d'*Artemisia absinthium* L, à l'exception de *Fusarium culmorum* qui a manifesté une résistance face à cette essence.

Fusarium culmorum a résisté à l'action de l'huile testée par rapport aux autres espèces fongiques. Ceci pourrait être attribué au fait que les concentrations d'HE dans le milieu n'étaient pas suffisantes, pour inhiber la croissance de ce champignon, car cette huile diluée est inactive envers cette souche, par contre dans la méthode de diffusion sur gélose, l'HE était utilisée pure envers *Fusarium culmorum*. Par ailleurs, cette activité antifongique dépend de la nature de l'huile et du germe lui-même.



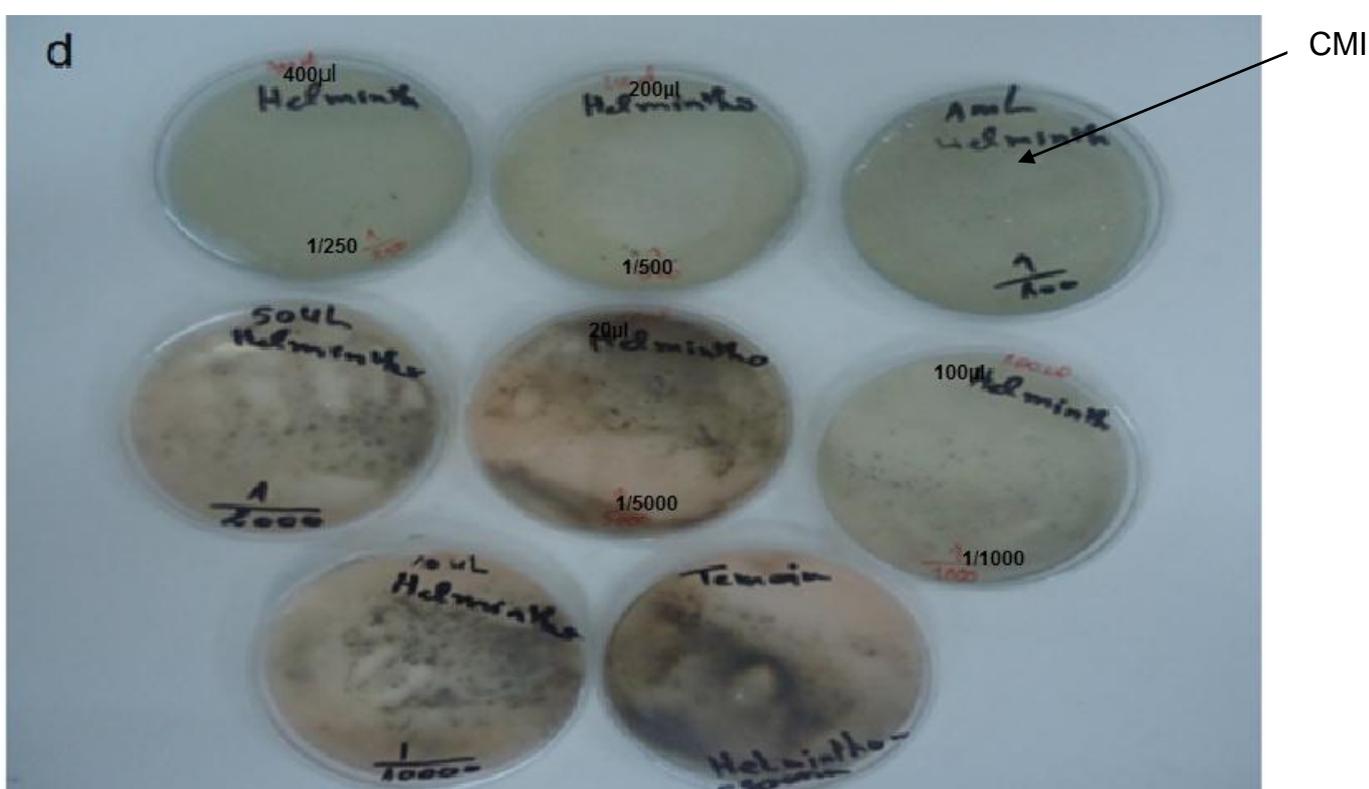


Figure 4.12 : Représentation de l'aspect des champignons testés à différentes concentrations de l'huile essentielle de l'absinthe : (a) *Aspergillus* sp ; (b) *Botrytis cinerea* ;(c) *Fusarium culmorum* ;(d) *Helminthosporium* sp.

Cette activité antifongique de l'huile d'absinthe peut être expliquée par sa richesse en composés oxygénés monoterpéniques (64.29%) comme le thuyone, le 4-terpinéol et le α -terpinéol contenus dans cette huile, qui agissent comme des antiseptiques, anti-inflammatoires et antimicrobiens [211].

Par ailleurs, il existe une corrélation proportionnelle établie entre la présence des monoterpènes oxygénés et le pouvoir antimicrobien.

L'étude menée par JUTEAU et *al.* [18], a montré que le taux élevé de thuyone est la principale cause de l'activité antimicrobienne de l'huile. Cette activité pourrait être liée à la présence du thuyone qui est le majoritaire dans cette huile.

Cependant, nous avons comparé nos résultats avec ceux de KORDALI et *al.* [5 ; 19], qui ont étudié le pouvoir antimicrobien sur plusieurs souches, notamment *Fusarium culmorum* et *Aspergillus sp.* ; ils ont obtenu respectivement les résultats suivants : 5.5 ± 0.2 mm et 6.9 ± 0.6 mm pour l'huile de la Turquie. Les zones d'inhibition constatées dans notre étude (huile d'Algérie) se sont avérées plus larges; 24.33 ± 0.58 mm et 11.33 ± 0.58 mm.

L'huile est un mélange complexe de plusieurs composés dont on ne peut pas attribuer un composé responsable de cet effet antimicrobien.

Cependant, certaines études ont trouvé que l'activité antimicrobienne des HE peut être supérieure à celle de leurs composés majoritaires testés séparément. Cette dominance d'activité des essences sur celle d'un composant majoritaire confirme bien l'effet de synergie que pourraient apporter les composants minoritaires à l'activité des HE.

Les différences trouvées entre les résultats concernant l'activité antimicrobienne de l'huile d'absinthe est liée à sa composition chimique, aux groupements fonctionnels de ses composés majoritaires et à leurs effet synergie, mais dépend aussi de la méthode et au type de solvant utilisé pour l'extraction, aux conditions d'analyse expérimentale, aux facteurs écologiques et aux variations saisonnières.

4.3.2. Pouvoir antioxydant

4.3.2.1. Activité de piégeage du radical DPPH par les échantillons étudiés

Les résultats d'activité antioxydante de l'HE et l'extrait d'absinthe présentés dans le tableau 4.8 et dans la figure 4.13 montrent que malgré l'activité de piégeage de l'extrait est inférieure à celle de l'huile et la concentration de la solution mère de l'extrait est de 2mg/ml alors que celle de l'huile est de 20mg/ml (figure 4.14), nous constatons que l'activité de l'extrait est plus élevée que celle de l'HE d'*Artemisia absinthium* (appendice F).

Tableau 4.8 : Variation du taux de piégeage du radical DPPH en fonction des différentes concentrations de l'huile essentielle et de l'extrait d'absinthe

Echantillons Tube n°	HE		Extrait méthanolique	
	Concentration (mg/ml)	Activités (%)	Concentration (mg/ml)	Activités (%)
1	0.00000	0.00±0.00	0.00000	0±0.00
2	0.099502	32.35 ±3,68	0.0099502	22.42±2,24
3	0.19802	45.80±1,20	0.019802	37.00±8,41
4	0.392157	65.68±1,24	0.0392157	38.87±0,56
5	0.582524	71.57±0,69	0.0582524	44.29±0,37
6	0.769231	72.48±0,13	0.0769231	52.05±2,14
7	0.952381	72.48±0,13	0.0952381	62.42±2,80

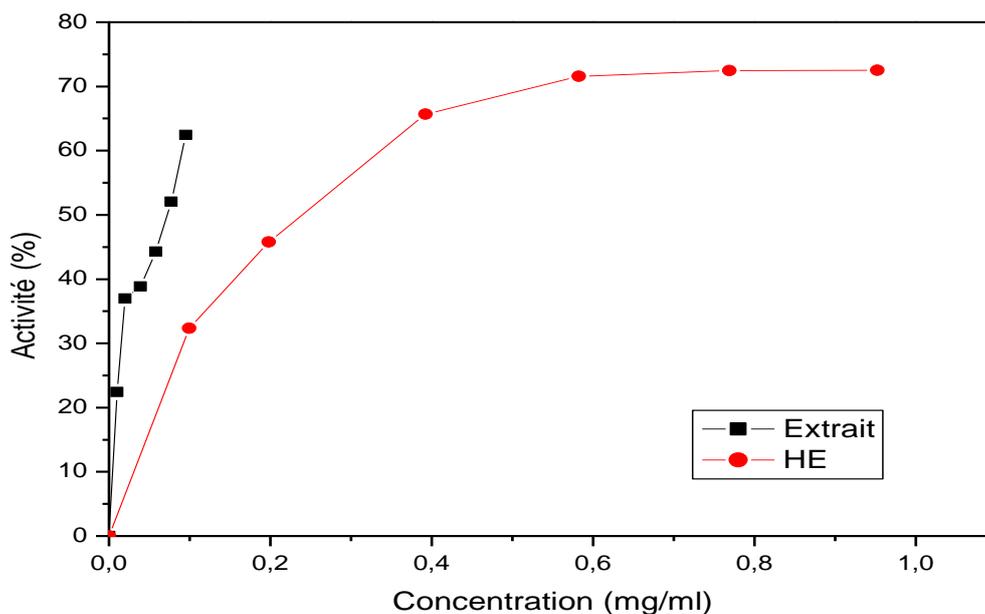


Figure 4.13 : Activité antioxydante de l'huile et d'extrait d'absinthe

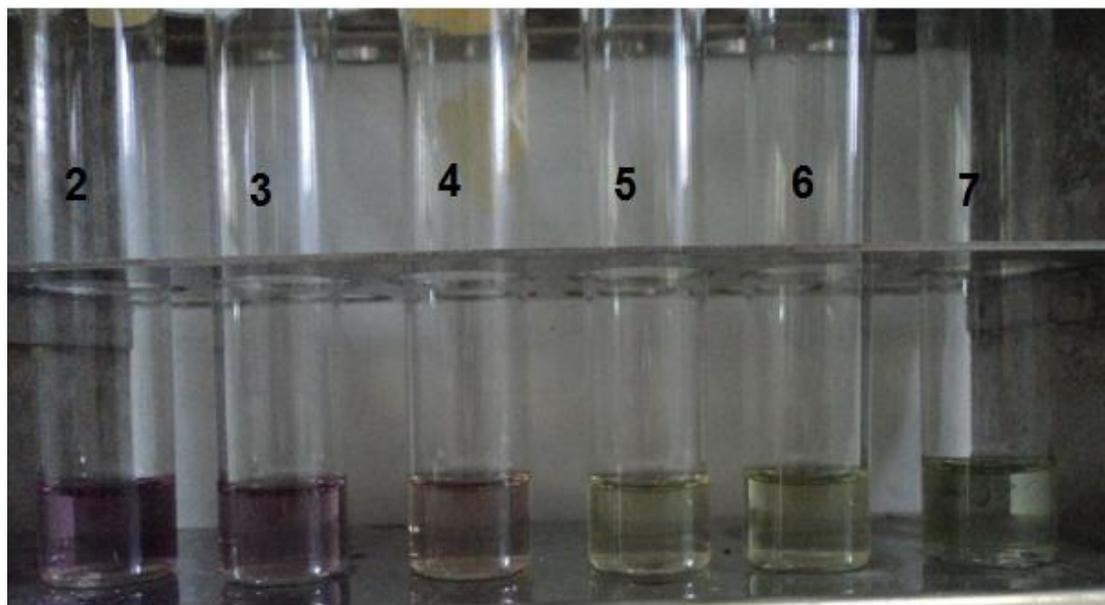


Figure 4.14 : Evolution de l'activité antioxydante en fonction de la concentration des échantillons testés

La figure 4.14 montre lisiblement la variation de la couleur, qui exprime le passage du DPPH de la forme radicale (DPPH^{\cdot}) à la forme réduite stable non radical (DPPH-H) en fonction des différentes concentrations de nos échantillons naturels.

L'augmentation de l'activité antioxydante en solution est observée avec l'élévation de la concentration de l'huile et de l'extrait étudié.

4.3.2.2. Activité de piégeage du radical DPPH par les étalons d'antioxydants

D'après les résultats d'activité antioxydante des différents standards obtenus au tableau 4.9 et la figure 4.15, nous remarquons que la VE est la plus active suivie de la BHA et de celle de la BHT (figure 4.16) (appendice F).

Tableau 4.9 : Variation du taux de piégeage du DPPH en fonction des différentes concentrations des étalons d'antioxydants

Tube n°	Concentration (mg/ml)	Activité de piégeage du radical DPPH en %		
		VE	BHT	BHA
1	0.0000	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
2	0.000498753	17.19±5.54	8.51±3.06	10.90±1.61
3	0.00295567	54.25±3.72	26.32±2.56	42.55±1.40
4	0.00861244	57.71±0.79	49.64±1.07	56.02±3.54
5	0.033333333	72.16±4.02	74.37±1.88	76.94±1.73
6	0.046153846	82.71±0.79	82.00±0.30	80.31±2.39
7	0.057142857	84.75±1.10	82.53±0.93	82.88±0.30

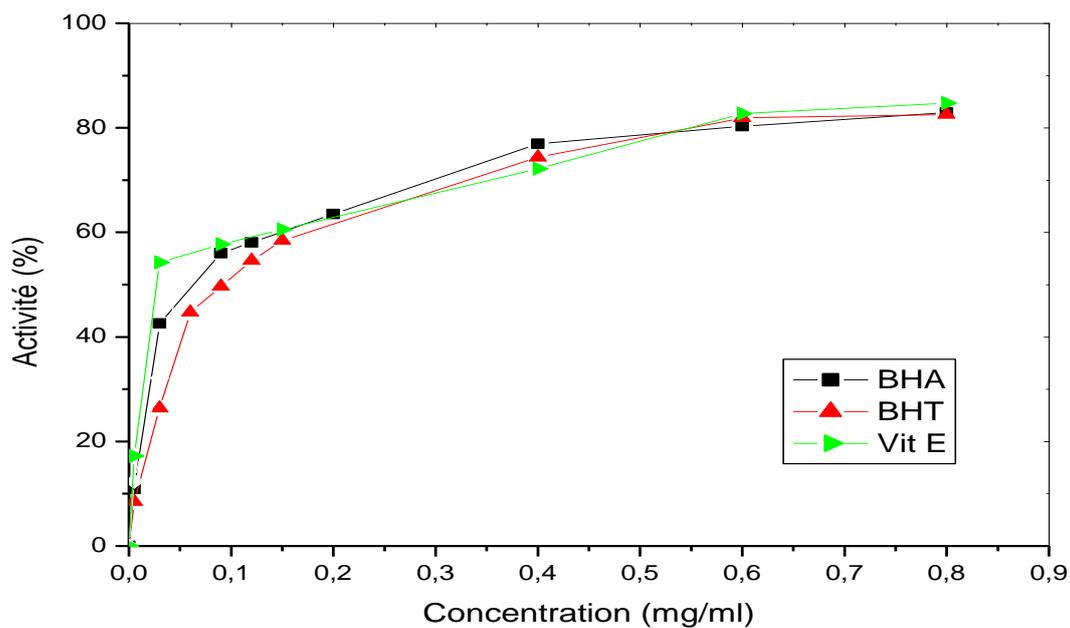


Figure 4.15 : Activité antioxydante des différents standards.

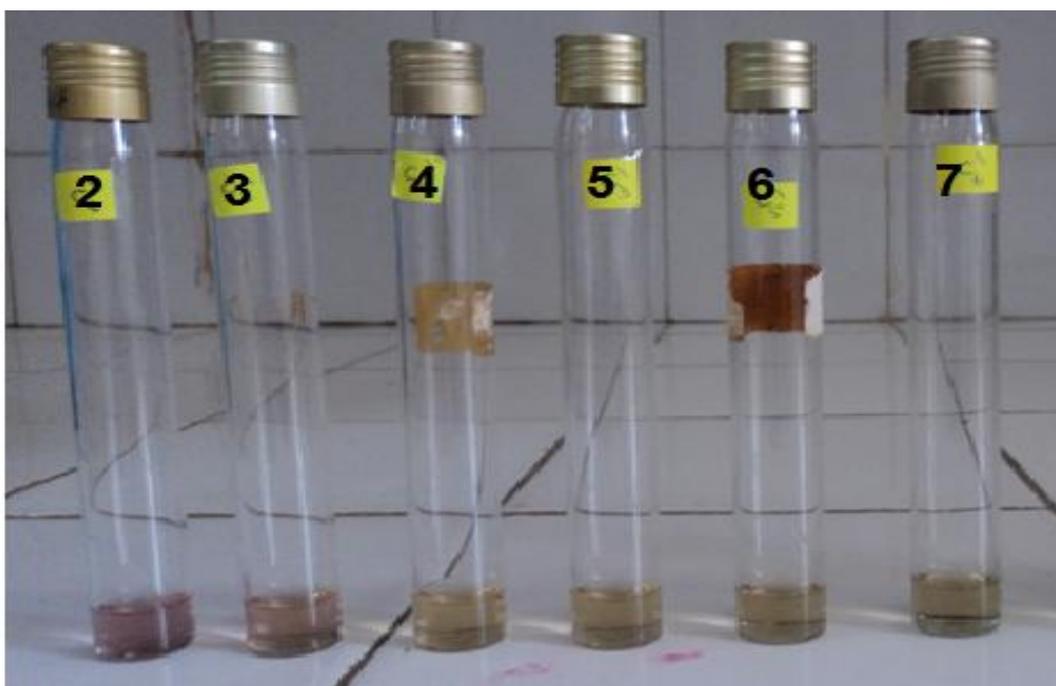


Figure 4.16 : Evolution de l'activité antioxydante en fonction de la concentration des étalons d'antioxydants

La figure 4.16 montre le changement de couleur du DPPH en fonction des différentes concentrations des antioxydants standards. Il existe une corrélation établie entre l'activité antioxydante en solution et la concentration des antioxydants de synthèses.

Afin de déterminer l'effet des antioxydants standards sur l'activité antioxydante, nous avons effectué l'analyse de la variance (appendice G).

L'analyse de la variance montre que pour le facteur antioxydants de synthèse (le BHA, le BHT et la VE) à un effet hautement significative sur l'activité antioxydante.

D'après le test de NEWMAN et KEULS au seuil de 5% (tableau 4.10), nous pouvons classer les antioxydants de synthèse en trois groupes homogènes (Figure 4.17).

Tableau 4.10 : Test de NEWMAN et KEULS du facteur antioxydants de référence sur l'activité antioxydante

Traitements	Moyenne \pm δ	Groupes homogènes
VE	52.68 \pm 1.34	A
BHA	49.94 \pm 0.79	B
BHT	46.20 \pm 0.91	C

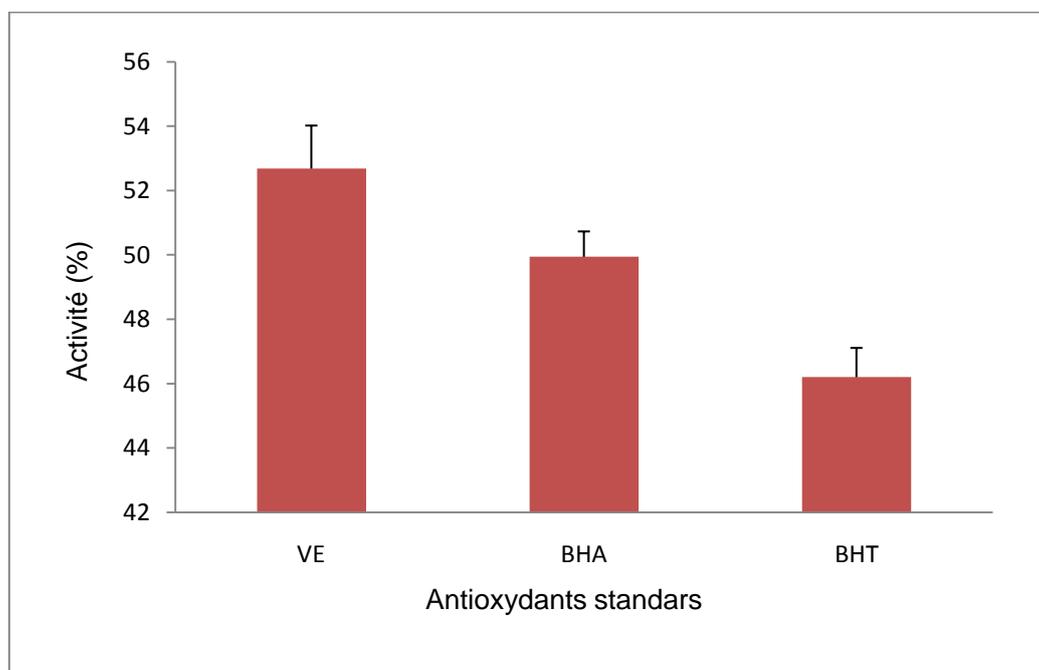


Figure 4.17 : Histogramme représentant l'activité antioxydante des antioxydants standards (moyenne \pm δ de trois mesures)

L'activité antioxydante la plus élevée a été enregistrée chez la VE avec une moyenne de 52.68 ± 1.34 %, suivie de BHA avec une moyenne de 49.94 ± 0.79 %, l'antioxydant de synthèse qui présente l'activité antioxydante la plus basse est obtenue avec le BHT avec une moyenne de 46.20 ± 0.91 %.

4.3.2.3. Détermination de EC_{50}

Les activités antioxydantes de l'HE et de l'extrait ont été comparées avec celles des différents antioxydants de synthèse : BHA, BHT et VE.

Les valeurs de EC_{50} (mg/ml) de nos échantillons testés et les antioxydants de référence sont déterminées graphiquement. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.11 et illustré par la figure 4.18. Ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour confirmer leurs résultats. Il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (couleur) [185], sachant qu'une faible valeur de EC_{50} correspond à une forte activité antioxydante.

Tableau 4.11 : EC_{50} des échantillons naturels et des standards

Echantillons	EC_{50} (mg.ml ⁻¹)
VE	$0,0028 \pm 0,0002$
BHA	$0,006 \pm 0,0010$
BHT	$0,0086 \pm 0,0005$
Extrait de l'absinthe	$0,0703 \pm 0,0022$
HE de l'absinthe	$0,2359 \pm 0,0078$

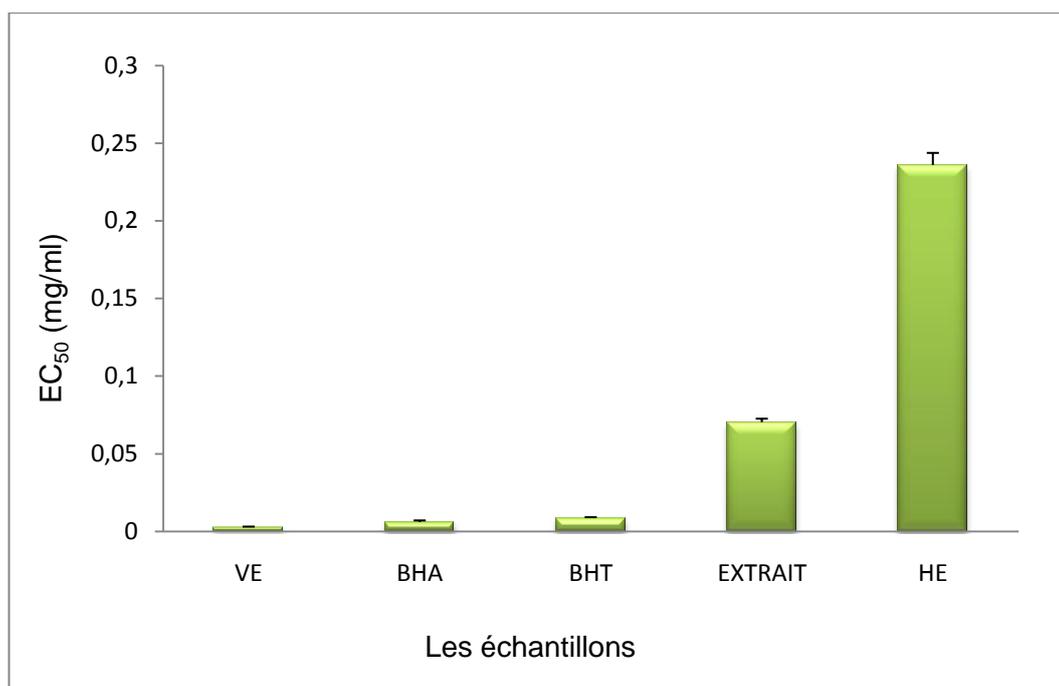


Figure 4.18: Histogramme représentant les valeurs de EC₅₀ des échantillons testés et les antioxydants de référence.

D'après le tableau 4.11, nous remarquons que les EC₅₀ des antioxydants de référence sont comprises entre 2 et 9 µg/µl, alors que les échantillons naturels testés s'échelonnent entre 70-250 µg/µl.

Nous remarquons que les capacités antioxydantes de l'HE et l'extrait d'absinthe sont très faibles, probablement cela est dû à leurs faibles teneurs en composés phénoliques.

En comparant les résultats de EC₅₀ des échantillons testées, nous pouvons déduire que l'extrait a donné un pouvoir antiradicalaire meilleur que l'huile avec une moyenne respectivement de 0.0703 ± 0.0022 mg/ml et 0.2359 ± 0.0078 mg/ml. La valeur de EC₅₀ de l'extrait méthanolique est faible en comparant avec celui de l'huile.

Nous pouvons conclure que l'extrait d'absinthe est doté d'un pouvoir antiradicalaire potentiellement élevé pas rapport à son HE.

Nous constatons que les EC₅₀ relatifs aux antioxydants standards sont très bas par rapport à ceux des échantillons testés. La BHA, la BHT et la VE sont des excellents antioxydants, car elles possèdent des capacités de neutralisation du radical libre DPPH et sont puissantes en agissant à de faibles doses. Parmi ces antioxydants, la

VE s'est avérée la plus efficace avec une moyenne de $0,0028 \pm 0,0002$ mg/ml suivie de la BHA avec une moyenne de $0,006 \pm 0,0010$ mg/ml et enfin la BHT avec $0,0086 \pm 0,0005$ mg/ml

A l'issu des résultats obtenus avec l'HE, l'extrait et les standards, on peut classer le pouvoir antioxydant suivant l'ordre :

$$\text{VE} > \text{BHA} > \text{BHT} > \text{Extrait} > \text{HE}$$

4.4. Analyse phytochimique

Afin de déterminer la teneur des phénols totaux et des tanins. Des courbes d'étalonnage à différentes concentrations de solutions d'étalons ont été tracées à 760nm pour les polyphénols totaux et à 685nm pour les tanins (figure 4.19 et 4.20).

4.4.1. Teneur des phénols totaux

La valeur moyenne de la concentration en phénols totaux de l'extrait d'absinthe est calculée à partir de la valeur moyenne des absorbances obtenue à une longueur de 760nm en utilisant la courbe d'étalonnage de l'acide gallique, et exprimée en milligrammes d'équivalents d'acide gallique utilisé par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 4.19 et rapportés dans le tableau 4.12.

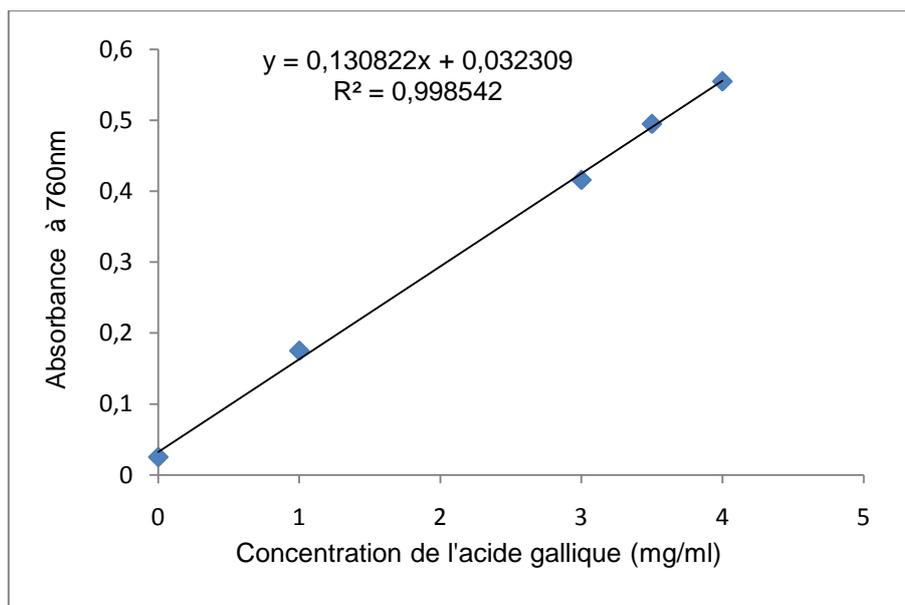


Figure 4.19 : Courbe d'étalonnage des phénols totaux

Tableau 4.12 : Teneur en phénols totaux

Espèce	Teneur en phénols totaux (mg EAG/g d'extrait)
<i>Artemisia absinthium L</i>	0.8 ± 0.138

4.4.2. Teneur des tanins

La valeur moyenne de la concentration en tanins de l'extrait d'absinthe est calculée à partir de la valeur moyenne des absorbances obtenue à une longueur de 685nm. La quantification des tanins est exprimée en milligrammes d'équivalents d'acide tannique utilisé par gramme d'extrait (mg EAT/g d'extrait). Le résultat est illustré par la figure 4.20 est présenté dans le tableau 4.13.

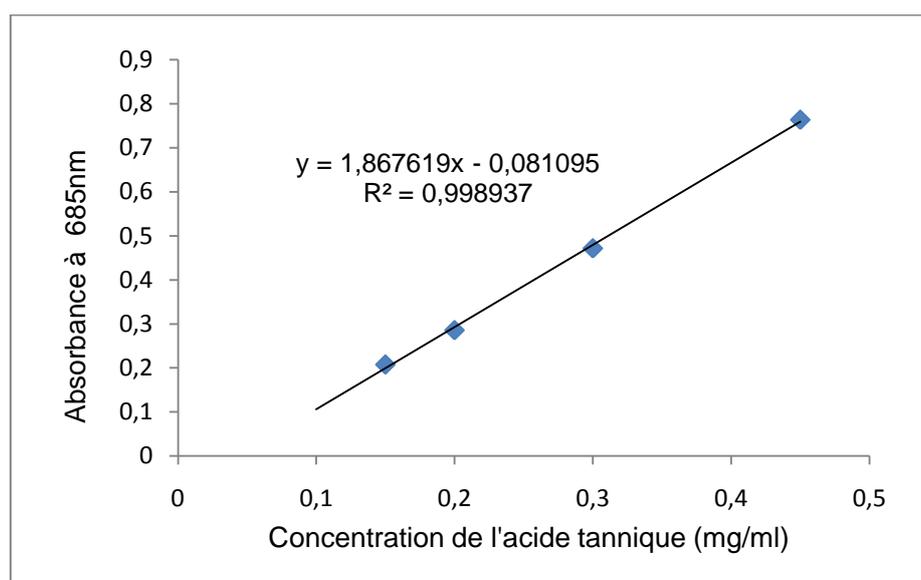


Figure 4.20 : Courbe d'étalonnage des tanins.

Tableau 4.13 : Teneur en tanins

Espèce	Teneur en tanins (mg EAT/g d'extrait)
<i>Artemisia absinthium L</i>	0.272 ± 0.006

Concernant la teneur des polyphénols totaux, on a enregistré en équivalent d'acide gallique : 0.8 mg/g d'extrait sec avec l'extrait méthanolique d'absinthe, cette dernière représente une faible teneur en phénols totaux. La détermination quantitative des tanins révèle que l'extrait d'absinthe est plus faible en tanins avec une teneur de 0.272 mg EAT/g d'extrait.

La figure 4.21 représente un histogramme qui récapitule les teneurs en phénols totaux et en tanins de l'extrait étudié.

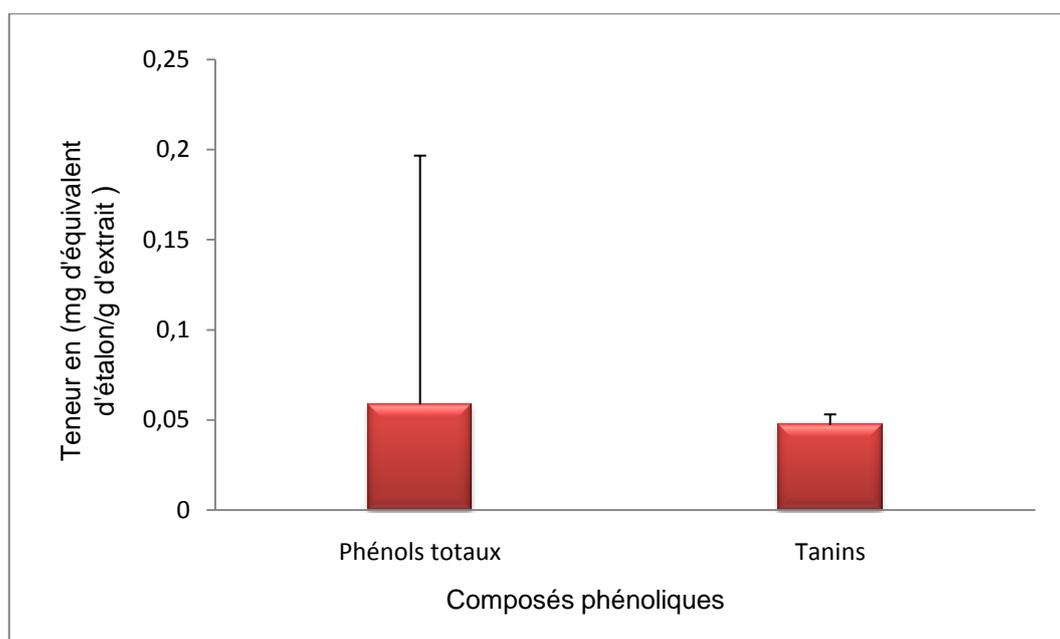


Figure 4.21: Teneur en phénols totaux et en tanins (mg d'équivalent étalon/g d'extrait)

Nous remarquons que l'activité antiradicalaire de l'huile et l'extrait augmente avec une concentration croissante de ces derniers, ce qui a été confirmé par MAHMOUDI et *al.* [212], et KORDALI et *al.* [5].

Les résultats d'activité antioxydante de l'huile d'absinthe sont en accord avec ceux obtenus par LOPES et *al.* [6]. En effet, l'activité est testée par une même technique (test du DPPH). Ce même auteur a constaté que cette huile étudiée a une faible activité antioxydante. Celle-ci est due à sa composition chimique, qui est riche en composés non phénoliques.

Par ailleurs, nos résultats ne correspondent pas avec ceux de KORDALI et *al.* [5] qui ont trouvé que l'huile d'*Artemisia absinthium* L a une activité antioxydante, cette

dernière est liée au profil chimique de l'huile étudiée. Il est difficile d'attribuer cette activité à un seul composé puisque un effet de synergie entre les différents composés peut avoir lieu.

Les composés phénoliques contenus dans plusieurs HE sont le thymol, le carvacrol et l'eugénol, ces derniers montrent une très forte activité antioxydante.

Le résultat obtenu dans l'analyse quantitative des composés phénoliques (polyphénols totaux) ne concorde pas avec celui obtenu par CANADANOVIC et *al.* [22], et MAHMOUDI et *al.* [212]. Les résultats des auteurs sont respectivement de 25.6 mg EAC/g et 194.9 mg EAG/g. Nous pouvons constater que ces teneurs en phénols totaux obtenus sont très élevées que celle obtenue au cours de notre expérimentation qui était de 0.8 mg EAG/g.

La distribution des métabolites secondaires peut varier pendant le développement de la plante. Ceci peut être liée aux conditions climatiques sévères (la température élevée, exposition solaire, sécheresse, salinité), qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols. En effet, la teneur phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques (conditions climatiques, la maturité de la récolte et les conditions de stockage, méthodes d'étude (extraction et procédure...) [213; 214].

L'activité antioxydante de l'extrait obtenu au cours de notre étude (0.0703 mg/ml) est très importante que celle obtenu par MAHMOUDI et *al.* [212] (0.612 mg/ml), les résultats sont exprimés en EC_{50} , sachant qu'une forte activité antioxydante correspond à une faible valeur de EC_{50} .

Il est bien connu qu'il existe une corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur en composés phénoliques des extraits de plantes [215 ;216]. La propriété antioxydante des extraits méthanoliques de l'espèce d'*Artemisia* peut être attribuée aux contenus phénoliques.

L'extrait méthanolique obtenu au cours des travaux de MAHMOUDI et *al.* [212], contient une très forte teneur en polyphénols totaux, mais il présente une très faible activité antioxydante. Par conséquent, l'extrait devrait présenter une forte activité.

Ceci peut être expliqué par la très faible concentration de l'extrait ou par une courte durée de la réaction avec les radicaux libres à l'obscurité (15 min).

Nous remarquons que l'activité antioxydante dépendra de la nature, de la concentration et de la puissance de la substance antioxydante pourvoyeur d'hydrogènes.

CONCLUSION

Le présent travail vise à valoriser une plante médicinale et aromatique très répandue dans le monde et en Algérie connue sous le nom d'absinthe. Notre étude a porté sur l'analyse chimique de son huile et l'analyse phytochimique de son extrait ainsi que leur activité antimicrobienne et antioxydante *in vitro*.

La détermination des rendements en HE des deux techniques d'extraction a révélé que la meilleure teneur en huile a été obtenue par la méthode d'hydrodistillation que celle de l'entraînement à la vapeur.

L'analyse de la composition chimique des huiles d'*Artemisia absinthium* a permis d'identifier 17 composés pour l'hydrodistillation et 15 composés pour l'entraînement à la vapeur, parmi lesquels il existe trois composés majoritaires pour chaque méthode d'extraction avec des taux différents, les principaux constituants sont : le thuyone suivi de chamazulène et ensuite de p-cymène.

Cette huile révèle un chémotype très riche en cétone. Par conséquent, la méthode de l'hydrodistillation a fourni les meilleurs taux de ces composés majoritaires de cette huile. Cette méthode est supérieure qualitativement et quantitativement à la méthode de l'entraînement à la vapeur.

L'activité antifongique de l'huile d'absinthe a été testée *in vitro* selon deux méthodes sur quatre souches fongiques phytopathogènes à savoir : l'*Aspergillus sp*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum* et l'*Helminthosporium sp*.

Les résultats de la méthode de diffusion sur gélose ont montré que les souches *Botrytis cinerea* et *Fusarium culmorum* se sont avérées plus sensibles à cette huile et en degré moindre la souche de l'*Helminthosporium sp* suivie par l'*Aspergillus sp*. Les résultats issus de la méthode de microdilution ont révélé une sensibilité accrue du *Botrytis cinerea* suivie respectivement par l'*Aspergillus sp* et par l'*Helminthosporium sp* avec un moindre degré. Cependant, l'huile n'a présenté aucune activité envers *Fusarium culmorum*. L'huile a une efficacité contre les microorganismes testés en particulier le champignon *Botrytis cinerea*. Ce pouvoir bioactif observé chez cette huile est attribué principalement par sa teneur élevée en

monoterpènes oxygènes. Par ailleurs, cette activité dépend de la nature de l'huile et du germe lui-même.

Ces résultats présentent un intérêt pour des applications phytosanitaires comme des procédés de lutte biologique basés sur des substances naturelles afin d'éradiquer les infections d'origine fongique et en vue d'une utilisation dans le cadre d'une agriculture biologique.

Le pouvoir antioxydant *in vitro* a été testé avec la méthode au DPPH. L'activité antiradicalaire de l'huile et l'extrait d'*Artemisia absinthium* est très négligeable par rapport à celles des antioxydants de synthèses. L'étude comparative du pouvoir antioxydant de l'huile et de l'extrait d'absinthe montre que ce dernier est plus puissant. Cette différence d'activité est attribuée aux composés phénoliques que contient l'extrait.

Le dosage des composés phénoliques contenus dans l'extrait méthanolique par la méthode de Folin-Ciocalteu a révélé des concentrations très faibles en polyphénols totaux et en tanins chez l'absinthe.

L'ensemble des résultats obtenus ne constitue qu'une première étape dans la recherche des substances de sources naturelles biologiquement actives.

Néanmoins, il serait judicieux en guise de perspectives de :

- Etudier la toxicité de l'huile de l'absinthe ;
- Tester l'huile sur d'autres germes phytopathogènes ;
- Déterminer le ou les principes actifs responsables de l'activité antimicrobienne de l'huile afin de produire des formules antifongiques naturelles ;
- Tester *in vivo* l'activité antifongique de l'huile ;
- Etudier l'activité antimicrobienne de l'extrait et la comparer à celle de l'huile ;
- Réaliser des études pour l'isolement et l'identification des composés actifs responsables de l'activité antioxydante de l'extrait ;
- Confirmer nos résultats en étudiant la même espèce provenant des différentes régions ;
- Etudier l'activité antimicrobienne de l'huile d'*Artemisia absinthium* en fonction du stade végétatif de la plante.

APPENDICE A**LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS**

- Abs_{blanc} : absorbance du témoin à 517nm.
- Abs_{échan} : absorbance de l'échantillon à 517nm.
- ACP : Analyse en Composantes Principales.
- AFNOR : Association Française de la Normalisation.
- ASP : *Aspergillus sp.*
- ATCC : American Type Culture Collection.
- BC : *Botrytis cinerea*.
- BHA : Butylated Hydroxyl Anisole.
- BHT : Butylated Hydroxyl Toluène.
- °C : degré Celsius.
- CG/SM : Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse.
- CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.
- CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse.
- C.V : covariance.
- D.D.L : degré de liberté.
- DPPH : radical stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.
- EAG : équivalent d'acide gallique.
- EAT : équivalent d'acide tannique.
- EC50 : concentration nécessaire pour l'inhibition de 50% des radicaux libres.
- Eq : équivalent.
- EV : entraînement à la vapeur d'eau.
- eV : électron-Volte.
- FC : *Fusarium culmorum*.

- g : gramme.
- HD : hydrodistillation
- HE : huile essentielle.
- HEL : *Helminthosporium sp.*
- HP : Haute Performance
- I % : pourcentage d'activité antioxydante.
- Kg : Kilogramme.
- MeOH : méthanol.
- mg : milligramme.
- M_{HE} : masse de l'huile essentielle.
- min : minute.
- ml : millilitre.
- mm : millimètre.
- MS : Spectre de Masse
- M_{vs} : masse de la matière végétale sèche.
- n° : numéro.
- nm : nanomètre.
- O₂^{·-} : anion superoxyde.
- P : pluviométrie.
- PDA : Potatoes Dextrose Agar.
- PG : Gallate Propylée
- R² : coefficient de corrélation.
- Rdt_{HE} : rendement.
- T : témoin.
- TBHQ : Ter-Butyl-Hydroxy-Quinone
- T_{max} : température maximale.
- T_{min} : température minimale.

T_{moy} : température moyenne.

μg : microgramme.

μl : microlitre.

μm : micromètre.

UV : Ultraviolet.

VE : vitamine E.

ZI : zone d'inhibition.

δ : écart-type.

% : pourcentage.

APPENDICE B

Constituants de milieu de culture du PDA :

Agar	20g
Saccharose.....	20g
Eau distillé.....	11g
Pomme de terre.....	200g

APPENDICE C

Tableau : Analyse de la variance de l'effet des procédés d'extraction sur le rendement en huile essentielle

	S.C.E.	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
Variance Totale	0.07	9	0.01		--	--	--
Variance Facteur 1	0.03	1	0.03	7.21	0.0270(S)	--	--
Variance Résiduelle 1	0.03	8	0.00		--	0.07	13.1 %

APPENDICE D (1)

Composition chimique de l'huile essentielle de l'absinthe extraite par l'hydrodistillation

Numéro	Temps de rétention (min)	Constituants	Pourcentage(%)
1	5.92	α -Pinène	0.02
2	6.53	β -Thujène	0.14
3	7.65	β - Myrcène	0.93
4	8.18	α - Phellandrène	0.71
5	8.64	(+)-2-Carène	4.25
6	9.73	3-Carène	0.34
7	10.23	γ -Terpinène	3.71
8	13.66	Thujone	60.82
9	15.96	4-Terpinéol	2.89
10	16.55	α -Terpinéol	0.58
11	19.30	Camphène	0.09
12	23.93	β - Bourbonène	0.09
13	26.00	Germacrène	0.36
14	35.32	β - Eudesmol	1.13
15	36.12	Caryophyllène	1.15
16	38.82	Chamazulène	16.65
17	47.34	p -Cymène	4.29

APPENDICE D (2)

Composition chimique de l'huile essentielle de l'absinthe extraite par l'entraînement à la vapeur d'eau.

Numéro	Temps de rétention (min)	Constituants	Pourcentage(%)
1	5.91	α -Pinène	0.41
2	7.14	β -Thujène	3.04
3	7.70	β -Pinène	3.28
4	8.58	δ - Carène	0.38
5	10.18	γ -terpinène	1.26
6	13.39	Thujone	54.07
7	16.03	4-Terpinéol	2.75
8	16.62	α - Terpinéol	0.96
9	23.57	Copaène	0.83
10	23.97	β - Bourbonène	0.81
11	25.48	Caryophyllène	1.46
12	28.23	Germacrène	4.24
13	35.36	β - Eudesmol	3.71
14	38.63	Chamazulène	10.23
15	47.39	p -Cymène	9.86

APPENDICE E

Tableau : Analyse de la variance de l'effet des souches phytopathogènes sur le diamètre des zones d'inhibitions

	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
Variance Totale	370.56	11	33.69	--	--	--	--
Variance Facteur 1	366.40	3	122.13	234.49	0.0000 (THS)	--	--
Variance Résiduelle 1	4.17	8	0.52	--	--	0.72	3.7 %

APPENDICE F

Variation des absorbances en fonction des différentes concentrations des échantillons naturels et standards

Nature de la substance chimique	Concentration (mg/ml)	Absorbance			Abs (moyenne± δ)
		Abs1	Abs2	Abs3	
Huile essentielle de l'absinthe	0.00000	0.000	0.000	0.000	0±0.00
	0,099502	0,28	0,304	0,311	0,298333±0,013275
	0,19802	0,237	0,245	0,235	0,239±0,00432
	0,392157	0,146	0,151	0,157	0,151333±0,004497
	0,582524	0,128	0,122	0,126	0,125333±0,002494
	0,769231	0,121	0,122	0,121	0,121333±0,000471
	0,952381	0,121	0,122	0,121	0,121333±0,000471
Extrait d'absinthe	0.00000	0.000	0.000	0.000	0±0.00
	0,0099502	0,427	0,403	0,415	0,415±0,012
	0,019802	0,292	0,382	0,337	0,337±0,045
	0,0392157	0,324	0,33	0,327	0,327±0,003
	0,0582524	0,3	0,296	0,298	0,298±0,002
	0,0769231	0,245	0,268	0,256	0,256±0,0115
	0,0952381	0,186	0,216	0,201	0.201±0,015
BHT	0.00000	0,000	0,000	0,000	0±0.00
	0,000498753	0,333	0,356	0,343	0,344±0,01153256
	0,00295567	0,284	0,281	0,266	0,277± 0,00964365
	0,00861244	0,190	0,193	0,185	0,189±0,00404145
	0,03333333	0,095	0,104	0,090	0,096±0,0070946
	0,046153846	0,067	0,067	0,069	0,068±0,0011547
	0,057142857	0,062	0,066	0,069	0,066±0,00351188
BHA	0.00000	0.000	0.000	0.000	0±0.00
	0,000498753	0,342	0,332	0,331	0,335±0,00608276
	0,00295567	0,222	0,212	0,214	0,216±0,0052915
	0,00861244	0,162	0,154	0,18	0,165±0,01331666
	0,03333333	0,08	0,093	0,087	0,087±0,00650641
	0,046153846	0,074	0,065	0,083	0,074±0,009
	0,057142857	0,065	0,063	0,065	0,064±0,0011547

VE	0.00000	0.000	0.000	0.000	0±0.00
	0,000498753	0,307	0,334	0,293	0,311±0,02084067
	0,00295567	0,188	0,162	0,166	0,172±0,014
	0,00861244	0,156	0,159	0,162	0,159±0,003
	0,03333333	0,122	0,098	0,094	0,105±0,01514376
	0,046153846	0,065	0,068	0,062	0,065±0,003
	0,057142857	0,062	0,056	0,054	0,057±0,00416333

APPENDICE G

Tableau : Analyse de la variance de l'effet des antioxydants de référence sur l'activité antioxydante

	S.C.E.	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
Variance Totale	70.02	8	8.75		--	--	--
Variance Facteur 1	63.55	2	31.78	29.47	0.0011(HS)	--	--
Variance Résiduelle 1	6.47	6	1.08		--	1.04	2.1 %

REFERENCES

1. Majinda R.R.T., Abegaz B.M., Bezabih M., Ngadjui B.T., Wanjala C.C.W., Mdee L.K., Bojase G., Silayo A., Masesane I. and Yeboah S.O., 2001- Resent resultants from naturel product research at the university of Botswana, *Pure. Appl. Chem.* 73 (7): 1197-1208.
2. Quezel R. et Santa S., 1963- Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 2. Ed, Centre National de la Recherche Scientifique., Paris 977p.
3. Furlenmeir M.M., 1983- Wunderwelt der Heilpflanzen. RVG. Zurich.
4. Hose S., 2002- Der Wermut - *Artemisia absinthium* L. Zeitschrift Phytother 23: 187-194.
5. Kordali S., Cakir A., Mavi A., Kilic H and Yildirim A., 2005a- Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential from three Turkish *Artemisia* species J. Agric. Food Chem. 53, 1408 – 1416.
6. Lopes-Lutz D., Alviano D.S., Alviano C.S., Kolodziejczyk P.P., 2008- Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*.; 69 (8) :1732-1738.
7. Rezaeinodehi A and Khangholi S., 2008- Chemical composition of the essential Oil of *Artemisia absinthium* growing wild in Iran. Pakistan journal of biological sciences 11 (6): 946-949.
8. Nezhadali A., Parsa M.,2010- Study of the volatile compounds in *Artemisia absinthium* from Iran using HS/SPME/GC/MS, Advances in Applied Science Research, 1 (3): 174-179.
9. Derwiche E., Benziane Z and Boukir A.,2009- Chemical compositions and insectisidal activity of essential oils of three plants *Artemisia* species : *Artemisia Herba-Alba*, *Artemisia Absinthium* and *Artemisia Pontica* (Morocco) EJEAF Che, 8 (11). [1202 – 1211].

10. Baykan Erel S., Reznicek G., Şenol S.G., Karabay Yavasogulu N.U., Konyalioglu S., Ulvi Zeybe A., 2012- Antimicrobial and antioxidant properties of *Artemisia* L., species from western Anatolia. *J Biol* 36, 75-84.
11. Kaul, V.K., Nigam S.S., Dhar K.L., 1976- Antimicrobial activities of the essential oils of *Artemisia absinthium* L., *Artemisia valesiaca* Wall. And *Artemisia vulgaris* L. *India J Pharmacol*; 38: 21- 2
12. Nin S., Arfaioli P., Bosetto M., 1995- Quantitative determination of some essential oil components of selected *Artemisia absinthium* plants. *J Essent Oil Res*; 271 – 7.
13. Bourrel C., Vilarem G., Michel G and Gaset A., 1995a- Study of the bacteriostatic and fungistatic properties in solid media of 24 previously analysed essential oils. *Rivista Italia EPPOS*; 6: 3 – 12.
14. Bourrel C., Dargent R., Vilrem G., Gaset A., 1995b- Chemical analysis and fungistatic properties of some essential oils a liquid medium. Effects on hyphal morphogenesis. *Rivista Italiana EPPOS*; 6: 31 – 42.
15. Knobloch K., Pauli A., Iberl B., Weigand H., Weis N., 1989- Antibacterial and antifungal properties of essential oils components. *J Essent Oil Res*; 1: 119 – 28.
16. Carta C., Moretti M.D.L., Peanan A.T., 1996- Activity of the oil of *Salvia officinalis* L. against *Botrytis cinerea*. *J Essent Oil Res*; 8: 399 – 404
17. Pitarokili D., Tzakou O., Kalamararkiy A., 2002- Activity of the essential oil of *Salvia pomifera* L. ssp. *Calycina* (Sm.) Hayek against soil borne pathogens *J. Essent Oil Res*; 14: 72 – 5
18. Juteau F., Jerkovic I., Masotti V., Milos M., Masterlic J., Bessiere J., J Viano., 2003- Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia absinthium* from Croatia and France. *Planta Medica*.;69 (2) :158-161.
19. Kordali S., Kotan R., Mavi A., Cakir A., Ala A and Yildirim A., 2005b- Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* Essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 9452 – 9458

20. Alma M.H., Mavi A., Yildirim A., Digrak M., Hirata T., 2003- Screening chemical composition and *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in turkey. *Biochem. Pharm Bull.*, 26, 1725 – 1729.
21. Miguel M. G., Figueiredo A. C., Costa M.M., Martins D., Duarte J., Barroso J.G., Pedro L.G., 2003- Effect of the volatile constituents isolated from *Thymus albicans*, *Th. Mastichina*, *Th. Carnosus* and *Thymbra capitata*. *Nahrung / Food*, 47,397-402.
22. Canadanovic–Brunet J.M., Djilas S.M., Cetkovic G.S and Tumbas V.T., 2005- Free radical scavenging activity of wormwood (*Artemisia absinthium* L) extracts *J Sci Food Agric* 85: 265 – 272.
23. Bruneton J., 2005- Plante toxique végétaux dangereux pour l’Homme et les animaux, Ed. Tec & Doc, Paris, 185.
24. Deysson, G., 1979- Organisation et classification des plantes vasculaires (2^{ème} partie : systématique), société d’édition d’enseignement supérieur et CDU réunis, Paris.
25. Bachelot C., Blaise A., Corbel T., Guernic A., 2006- Les huiles essentielles. Licence 2 Biologie. Université Catholique de l’Ouest Bretagne Nord, France, 26p.
26. De Lima T.C.M., Morato G.S and Takahachi R.N., 1993: *Planta Med.*, 59: 326-329.
27. Rustaiyan A., Balalaei S., Mohammadi F., Masoudi S et Yari M., 2000- La comparaison des huiles volatiles de l’*Artemisia santoline* Schrenk et *Artemisia Krash gypsacea*, M. Pop et Lincz ex Poljak de l’Iran. *J. Essent oil Res*, 12, 330 – 332 p.
28. Kalemba, D.; Kusewicz, D.; Swiader, K. Antimicrobial properties of the essential oil of *Artemisia asiatica* Nakai. *Phytother. Res.* 2002, 288-291.
29. Schauenberg F et Paris P., 2006- Guide des plantes Médicinales, analyse, description et utilisation des 400 plantes, Ed Delachaux et niestlé, Espagne, 396p.
30. Gilly G., 2005- Les plantes aromatiques et huiles essentielles à grasse. Ed. L’harmattan, Paris: 193-197.

31. Weiss R.F., Thieme Verlag M.D.G., 2001- Weiss's Herbal Medicine, 6^{ème} édition. Stuttgart: Thieme, pp 79-80.
32. Swerdlow J.L., 2000- Médecine plantes qui guérissent de la nature, Washington, DC : National Geograohic Society.
33. Bruneton J., 1999- Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales ,(3^{ème} édition) .Paris Ed.Techniques et Documentations, Lavoisier, 575p.
34. Ariño A., Arberas I., Renobales G., Dominguez S et Arriaga J.B., 1999b- Essential oil of *Artemisia absinthuim* L, from the Spanish Pyrenees. J Essent Oil Res 11: 182-184.
35. Teuscher E., Anton R et Lobstein A., 2005- Plantes aromatiques, Épices, aromates, condiments et huiles essentielles, Edition Tec and Doc, Lavoisier ,Paris, (6), p 522.
36. Aslan I., Kordali S et Calmasur O., 2005- Toxicity of vapours of *Artemisia absinthium* essential oils to the *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn. Fresenius Environ. Bull, 14. 413- 417.
37. Kordali S., Aslan I., Calmasur O and Cakir A., 2006- Toxicity of essential oils isolated from three *Artemisia* species and some of their major components to granary weevil, *Sitophilus garanarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). Ind. Crops Prod., 23 (2): 162-170.
38. Ait Youssef M., 2006- Plantes médicinales de kabylie , Mohand Ait yousef. Préface du docteur Jean-philippe Brette. Editions. Ibis. Press. Paris, 2006, p349, pp48_53.
39. Ozenda P., 1983- Flore du Sahara. Edition centre national de recherche scientifique, 2^{ème} édition. Paris. 662p.
40. Ghemour G., 2004- Les plantes médicinales dans la région des Ouadhia et Boghni. Thèse d'ingénieur. Institut d'agronomie, U.M.M.T.O : 93p.
41. Delille L., 2007- Les plantes médicinales d'Algérie. Ed. Berti, Alger: 19.

42. Boullard B., 2001- Plante médicinales du monde : croyances et réalités, Ed Estem, Paris , P622, pp 57-58.
43. Wichtl M et Anton R., 2003- Plantes thérapeutiques-tradition, pratique officinale, science et thérapeutique 2^{ème} édition, Edition : Tec et Doc, Paris : 2-7430-0631-5.
44. Reynaud J., 2002- La flore du pharmacien. Ed. Tec & Doc, Paris : 37-39.
45. Thomé O.W., 1885- Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz Gera,Germany, Köhler.
46. Skiredj A., Elattir H et Elfadi A., 2002- Bulletin mensuel d'information et de liaison du Programme National de Transfert de Technologie en Agriculture (PNTTA), DERD, Rabat.
47. Heinrich M., Barnes J., Gibbons S & Williamson E. M. 2004- *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. Churchill Livingstone, Edinburg, 209–210.
48. Kothe Hans W., 2007- 1000 Plantes aromatiques et médicinales P 335, Terres Editions.
49. Andreas B., 1997- Guide des plantes du bassin méditerranéen, Ed. EUGEN ULMER GmbH et Co, Germany.
50. Gravot A., 2002- Etude de P450s impliqués dans la biosynthèse des furano-coumarines chez *Ruta graveolens*. Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Lorraine.
51. Shahidi F et Naczki M., 2004- Phenolics in food and nutraceuticals. Ed.CRC Press LLC : 138-139.
52. Paul S et Ferdinand P., 1977- Guide des plantes Médicinales ; 3^{ème} édition Delachaux & Niestlé .Paris, France ; 396 P.
53. Bézanger-Beauquesne L., Pinkas M., Torck M., Trotin F., 1980- Plantes médicinales des régions tempérées, Paris.
54. Schneider G., Mielke B., 1978- Zur Analytik der Bitterstoffe Absinthin, Artabsin und Matrizin aus *Artemisia absinthium* L. Teil I: Nachweis in der Droge und Dünnschichtchromatographie, Dtsch. Apoth. Ztg, 118, 469-472.

55. Kalembe D., Gora J., Kurowska A., Majda T and Mielniczuk Z., 1993- Analysis of essential oils in aspect of their influence on insects. Part I. Essential oils of absinthium. *Zeszyty Naukowe Politechniki Lodzkiej, Technologia I Chemia Spozywcza* 589, 5–14.
56. Bouksil H et Khelili A., 2008- Activité biologique de trois huiles essentielles à l'égard d'un ravageur des denrées stockées. Mémoire d'ingénieur. Institut d'agronomie, U.M.M.T.O : 74p.
57. Chabab H., 2009- effet insecticide de trois plantes spontanées le thym (*Thymus algeriensis*), le bourrache (*Borago officinalis* L) et l'absinthe (*Artemisia absinthium* L) sur l'insecte ravageur de blé dur *Tribolium castaneum* herbst. p 112.
58. Hamdani F/Z et Ameer H., 2010- Comparaison de l'activité insecticide des molécules des huiles essentielles de la lavande, l'absinthe, l'origan, la citronnelle et le faux poivrier contre la *Sitophilus oryzae*. p 108.
59. Afnor., 2000- Huiles essentielles, échantillonnage et méthode d'analyse. Ed. PARA Graphic, T-1, p 471.
60. Milpied H., 2009- Progrès en dermato-allergologie, Bardeaux 2009. Edition John Libbey EUROTEXT : 128p.
61. Sallé J.L., 2004- Les huiles essentielles synthèse d'aromathérapie, 2^{ème} Edition, Ed Frison-Roche, Paris : 31-51 p, 220p.
62. Bardeau F., 2009- les huiles essentielles. Découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale, Ed : Fernand Lenore, 315p.
63. Roquebert M.F., 2002- Les contaminants biologiques des biens culturels. Edition Elsevier MASSON : (334, 335) pp.
64. Pharmacopées européenne., 2005- 6^{ème} édition: Tome 1 et 2, Strasbourg.
65. Voet D., Voet J-G., 2005- Biochimie, 2ème Edition De Boeck : 72p.
66. Degryse A.C., Delpla I et Voinier M.A., 2008- Atelier santé environnement risques et bénéfiques possibles de huiles essentielles, Article 94p.

67. Rouillier G., 1990- Les Huiles essentielles pour notre santé. Editions Dangles, st. Jean De Braye , France.
68. Alilou H et *al.*, 2008- Chemical composition and antifungal activity of *Bubonium imbricatum* volatile oil. *Phytopathol. Mediterr.* 47, 3–10.
69. Khelfi H.O., 2007- Evaluation du potentiel biocide et étude de l'influence de la composition des huiles essentielles de quelques plantes algériennes sur *Rhizopertha dominai* et *Oallosobruchus*. Thèse de doctorat l'Institut National Agronomique EL - Harrach. p9-12.
70. Willem j.P., 2002- Les Huiles essentielle : médecine d'avenir. Editions du Dauphin, Paris.
71. Sipailiene A., Venskutonis P.R., Baranauskiene R et Sarkinas A.,2006- antimicrobial activity of commercial samples of thyme and marjoram oil. *Journal of Essential Oil Research.* 18 ; 698 – 703.
72. Pibiri M.C., 2005- Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse doctorat, Lausanne : 161p.
73. Deans S.G et Ritchie G., 1987- Antimicrobial proprieties of plants essential oils. *Journal of food microbiology*, vol. 5, p.p. 165-180.
74. Mbarek L.A., Mouse H.A., Elabbadi N., Bensalah M., Gamouh A., Aboufatima R., Benharref A., Chait A., Kamal M., Dalal A., Zyad A., 2007- Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. Anti-tumor effect of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40: 839-847.
75. Lubinic E., 2003- Manuel pratique d'aromathérapie, Les huiles essentielles et leur utilisation. Ed. Vigot : 7-9.
76. Teixeira da Silva J.A., 2004- Mining the essential oils of the Anthemideae African *Journal of Biotechnology* 3 [12], 706-720.
77. Ochoa L.H., 2005- Substitution de solvants et matière active de synthèse par une combine « solvant/actifs » d'origine végétale. Thèse doctorat. Toulouse : 225p

78. Blancou J et Vin-Niveaux P., 2006- Relations historiques et anecdotiques sur les anciens traitements par les plantes des maladies infectieuses et parasitaires des animaux Historical and anecdotal activity regarding ancient plant therapy of infectious and parasitic animal diseases. *Phytothérapie*. Volume 4, Number 2.
79. Bruneton J., 1993- *Pharmacognosie et Phytochimie des plantes médicinales Tec et Doc*, Ed Lavoisier, Paris; 2^{ème} édition, 915p.
80. Orav A., Raal A., Arak E., Müürisepp M and Kailas T., 2006- Composition of the essential oil of *Artemisia absinthium* L. of different geographical origin; 155–165, *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences. Chemistry* Volume 55 No.3.
81. Roux D et al .2008- *Conseil en aromathérapie* .2^{ème} édition pro-officina ,14-31 pp
82. Peyrefitte G et Martini M.C., 2008- *Esthétique cosmétique CAP*. Edition Masson : 241p.
83. Franchomme, P., Pénéol D., 1990- *L'aromathérapie exactement*. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jallois éditeur. Limoges. 445 p.
84. Jean E., Rene., Revuz., 2009- *Traite EMC : cosmétologie et dermatologie esthétique de* : Elsevier Masson. 500p.
85. Huard D., 1999- *Les Huiles essentielles- L'aromathérapie*, éditeur Quebecor.
86. Duraffourd C & Lapraz J.C., 2002- *Traité de phytothérapie clinique, médecine et endobiogenie*. Edition masson : p (7, 139).
87. Amand L & Langlois N., 2004- *Métiers et activités en milieu rural, Agriculture biologique, Les grands principes de production et l'environnement professionnel*. Edition Sonia Rougier : 133p.
88. Huard D et Huard I.,1993- *les huiles essentielles, l'aromathérapie*, Québec. Canada. 197p.

89. Pauli A., 2001- Antimicrobial properties of essential oil constituents. *Int. J. Aromather.* 11, 126-133.
90. Fabian D., Sabol M., Domaracké K., Bujnéková D., 2006- Essential oils-their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicol. in vitro* 20,1435-1445.
91. Vautrin D., 2005- Une peau zéro défauts. Guide pratique, des soins cosmétiques aux aliments beauté. Edition Alpen : 68p.
92. Willem J.P.,2004- les huiles essentielles, médecine d'avenir, Edition la source d'or, Paris, France, 318p.
93. Gee J.M., Johnson I.T., 2001- Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health. *Current Medicinal Chemistry.* 8: 1-182.
94. Marouf A., 2000- Dictionnaire de botanique : Phanérogames. Ed. Dunod, Paris, 199P.
95. Dacosta E., 2003- Les phytonutriments bioactifs. Ed. Yves dacosta, Paris, p371.
96. Beta T., Nam S., Dexter J.E et Sapirstein H.D., 2005- Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal chem*, 390-393 pp.
97. Rakipov N., 1987- Biochimie des cultures tropicales, Ed : Mir, pp151-165.
98. Sarni-Manchado P et Cheynier V., 2006- Les polyphénols en agroalimentaire , édition Tec and Doc, Lavoisier, p. 56, 57, 60-62, 270.
99. Martin S., Andriantsitohaina R., 2002- Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie.* 51 : 304-315.
100. Brown J. E., Khodr H., Hider R. C., Rice-Evans C., 1998- Structural dependence of flavonoid interactions with Cu^{2+} ions. *Biochem. J.* 330: 1173-1178.
101. Paganga G., Miller N., Rice-Evans C.A.,1999- The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. *Free Radic Res.* 30: 62-153.

102. Van Acker S.A.B.E., van den Berg D.J., Tromp M.N.J.L , Griffioen D.H., van Bennekom W.P., van der Vijgh W.J.F et Bast A. 1996- Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Biol.Med.*, 20: 331-342.
103. Jovanovic S.V., Steenken S., Simic M.G., Hara y., 1998- Antioxidant properties of flavonoids. *AHDIE Q Journal*. 7: 137-161.
104. Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J.P., Cimanga K., Van-Poel B., Pieters L., Vlietinck Vanden A.J. et Berghe D., 1998- Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J.Nat. Prod*, 61: 71-76.
105. Landolfi R., Mower R.L et Steiner M., 1984- Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. *Biochem Pharmacol*. 33: 1525-1530.
106. Hanasaki Y., Ogawa, S, Fukui, S, 1994, The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids, *Free Radic, Biol, Med*, 16: 845-850
107. Biondi D., Cianci P., Geraci C., Ruberto G., 1993- Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from sicilian aromatic plants. *Flav. Frag.*, vol.8,p.p.331-337.
108. Scalbert A., 1991- Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, vol . 30, p.p 3875- 3883.
109. Nacoulma O.G., 1996- Plantes médicinales et pratiques médicales traditionnelles au Burkina Faso : cas du Plateau central. Thèse de Doctorat d'État. Université de Ouagadougou, Burkina Faso. Tome I et II.581p.
110. Richard H., 1992- Épices et aromates. Technologie et Documentation Lavoisier. Paris. 339p.
111. Robert G., 2000- Les Sens du Parfum. Osman Eroyllles Multimedia . Paris. 224p.

112. Macheix J.J., Fleuriet A et Jay-Allemand C., 2005- Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed. Presses polytechniques et universitaires Romandes. Lausanne, 192 pages.
113. Psotová J., Lasovský J et Vičar J 2003- Metal–chelating Properties, Electrochemical Behavior, Scavenging And Cytoprotective Activities Of Six Natural Phenolics. *Biomed. Papers* 147 (2), 147-153.
114. Harborne J.B., et Williams C.A.,2000- advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*,55: 481-504
115. Verbois S., 2002- Plantes et herbes aromatiques : saveurs et vertus. Ed. Fernand lanore, Paris, p 234.
116. Milane H., 2004- La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat Strasbourg. 268p.
117. Roux D et Catier O., 2007- Botanique, pharmacognosie, phytothérapie. Ed. Porphre, Paris, p141.
118. Paris M et Hurabeille M., 1981- Abrégé de matière médicale, Ed : Massm, 82-101.
119. Remesy C., Manach C., Demigne C., Texier O., Regeat F., 1996- Intérêt nutritionnel des flavonoïdes *Méd Nurt*, 32 : 17-27.
120. Bronner W.E et G.R. Beecher., 1995- Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates. *Journal of Chromatography A*, 705: 247-256.
121. Guignard J.L., 2000- Biochimie végétale. 2^{ème} Ed. Dunod. Paris, p274.
122. Berthod A., Billardello B et Geoffroy S., 1999- Polyphenols in contercurrent chromatography. An example of large scale separation 1. *Analisis* . Edp Sciences, Wiley- Vch. 27,750-757.

123. Cowan M.M., 1999- Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12, 564-582.
124. Haslam E., 1989- Plant polyphenols: vegetable tannins revisited. Ed. Cambridge university press, Cambridge, p230.
125. Ghestem A., Seguin E., Paris M et Orecchibni A.M., 2001- Le préparateur en pharmacie, dossier 2, Botanique, pharmacognosie, phytothérapie-homéopathie. Ed. Tec. & Doc, Paris, 108-117 pp.
126. Mantle D., Anderton J.G., Falkous G., Barnes M., Jones P., Perry E.K., 1998- Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant essential oils. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 121: 385-391.
127. Karioti A., Chatzopoulou A., Bilia A.R., Liakopoulos G., Stavrianakou S., Skaltsa H., 2006- Novel secoiridoid glucosides in *Olea europaea* leaves suffering from boron deficiency. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 1898-1903.
128. Siani A.C., Ramos M.F., Menezes-de-Lima O.Jr., Ribeiro-dos-Santos R., Fernandez-Ferreira E., Soares R.O., Rosas E.C., Susunaga G.S., Guimaraes A.C., Zoghbi M.G et Henriques M.G., 1999- Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *J. Ethnopharmacol.* 66: 57-69.
129. Burt S., 2004- Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review , *International Journal of Food Microbiology*, 94, pp 223–253.
130. Leclerc H., 1983- Microbiologie générale. Doin éditeur. Paris. 369p.
131. Kaufmann S., H, E, 1997- Host response to intracellular pathogens, New York, P 345.
132. Bouchiki T., 1994- Activités antimicrobiennes de quelques huiles essentielles. Thèse de doctorat, université Blaise Pascal, Clermont Ferrand.

133. Fauchère J.L et Avril J.L.,2002- Bactériologie générale et médicales, édition Ellips, Paris, p365.
134. Bennett J V., Brodie J.L., Benner E.J., Kirby W.M.M., 1966- Simplified accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *Application of Microbiology*, vol.14, p.p.170-177.
135. Dormans H. J.,Deans S J., 2000- Antimicrobial agent from plants: antibacterial activity of plants volatil oils. *J. ofappl. Microbial.* Vol.88, PP. 308-316.
136. Lesgards J.F.,(2000- Contribution à l'étude du statut antioxydant de l'homme ; aspect chimiques et biochimiques. Thèse de doctorat, 19-20.
137. Favier A., 2003- Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutiques. *L'actualité Chimique* ; 108 – 115.
138. Butterfield D., Lauderback C., 2002- Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptideassociated free radical oxidative stress. *Free Radie. Biol. Med.* 32,1050-1060.
139. Vansant G .,2004- Radicaux libres et antioxydants: principes de bases symposium "antioxydants et alimentation". Ed Institut Danone.
140. Bonnefont-Rousselot D., Thérond P et Delattre J., 2003- Radicaux libres et anti-oxydants. In : *Biochimie pathologique : aspects moléculaires et cellulaires.* Médecine-sciences. Flammarion (Ed). Paris, pp 59-81.
141. Guinebert E., Durand P., Prost M., Grimand R et Bernigault R., 2005- Mesure de la résistance aux radicaux libres. *Sixièmes Journées de la Recherche Avicole.* Pp : 554-558.
142. Diallo A., 2005- Etude de la phytochimie et des activites biologiques de *Syzygium guineense* willd. (MYRTACEAE). Thèse de Doctorat. Mali.

143. Boyd B., Ford C., Koepke Michael C., Gary K., Horn E., MeAnalley S et MeAnalley B., 2003- Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *GlycoScience & Nutrition*. Vol.4,n.6,7p.
144. Svoboda K.P et Hampson J.B., 1999- Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plant: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, Scotland.
145. Kohen R., Nyska A., 2002- Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. Vol.30, p.p.620-650.
146. Maydani M., 2000a- Effect of functional food ingredients: vitamin E modulation of cardiovascular diseases and immune status in the elderly. *Am J Clin Nutr.*, vol. 71,p.p.1665-1668.
147. Wang B.S., Chen Y.J., Liu S.H., Lin-Shiau S.Y., 2000- An increase in free radical production by means of an anion channel blocker DIDS in mouse peritoneal neutrophils. *Proceedings of the National Science Council. Republic of China*. Vol. 24, n.4, p.p. 178 – 186.
148. Carty J. L., Bevan R., Waller H., et *al.*, 2000- The effects of vitamin C supplementation on protein oxidation in healthy volunteers. *Biochem Biophys. Res Com.* 273, 729-735.
149. Panda K., Chattopadhyay R., Fhosh M.K. et *al.*, 1999- Vitamin C prevents cigarette smoke induced oxidative damage of proteins and increased proteolysis. *Free Radicals Biol Med.* 27, 1067-1079.
150. Hale A.L 2003- Screening Potato Genotypes for Antioxidant Activity, Identification of the Responsible Compounds, and Differentiating Russet Norkotah Strains Using Aflp and Microsatellite Marker Analysis; Office of Graduate Studies of Texas A et M University, Genetics 260p.
151. Packer L et *al.* 1995- Alpha- Lipoic Acid as a Biological Antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*. 19 , 227 – 250.

152. Lisu Wang., Jui-Hung Yen., Hsiao-Ling Liang et Ming-Juan Wul 2003- Antioxidant effect of methanol extracts from lotus plumule and blossom (*Nelumbo nucifera* Gertr.) .Journal of Food and Drug Analysis, 11(1): 60-66.
153. Belaïche P., 1979- Traité de Phytothérapie et d'Aromathérapie. Tome I. L'Aromathérapie. Ed. Maloine .S.A. Paris.
154. Gunstone F., Norris F., 1983- In: lipids in food- chemistry.biochemistry and technology pergamon press, p.p. 161-165.
155. ANRH, 2011- étude climatique de la région de ChercHELL. Agence Nationale des Ressources Hydrauliques.
156. Carré P. (1953) précis de technologie et de chimie industrielle. T3. Ed. Ballière JB et fils.
157. Biallo D., Sanogo R., Yasambou H et autre. 2004- Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae). C.R. chimie-7: 1073 – 1080.
158. Afssa., 2006- Evaluation des risques liés à la présence de mycotoscines dans les chaînes alimentaires humaines et animales – Rapport synthétique.
159. Medina A., Valle-Algarra F.M., Mateo R., Gimeno-Adelautado J.V., Fernando Mateo F., Jiménez M., 2006- Survey of the mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Altermania Aspergillus and fusarium*, Int J Food Microbial, 108 (2), 196 – 203.
160. Etcheverry M., Nesci A., Barros G., Torres A., Chulze S., 1999- Occurrence of *Aspergillus* section *flavi* and aflatoxin. B1 in corn genotypes and corn meal in Argentina, *Mycopathologia* 147 (1), 37-44.
161. Trenholm H.L., Prelusky D.B., Young J.C., Miller J.D.,1988- Reducing mycotoxins in Animal Feeds, Agriculture Canada, A63, 1827 – 1988.
162. Pitt J.L., 2000- Toxigenic fungi. and mycotoxins, Br. Med. Bull., 56 (1), 184–192.
163. Nelson P.E., Toussoum T.A., Marasas W.F.O., 1983- *Fasanium* species; an illustrated manual for identification. Pennsylvania state Unio.editor.

164. Medina-Martinez M.S., Martinez A.J., 2000- Mold concurrence and aflatoxin B (1) and fumonisin B (1) determination in corn samples in Venezuela, J.Agric.Food Chem. 47 (7), 2833 – 2836.
165. Kpodo K., Thrame U., Hald B., 2000- Fusaria and fumonisins in maize from Ghana and their co occurrence with aflatoxins, Int.J.Food Microbiol., 61 (33), 147-157.
166. Gullino, M.L. 1992. Chemical control of *Botrytis* spp, p. 217-222, in: Recent advances in *Botrytis* research. K. Verhoeff, N. E. Malathrakos and B. Williamson, eds. PudocScientific Publishers, Wageningen, The Netherlands.
167. Martinez F., Blancard D., Lecomte P., Levis C., Dubos B., and Fermaud M., 2003- Phenotypic differences between *vacuata* and *transposa* subpopulations of *Botrytis*.
168. Sakhr A., 2009- Estimation du potentiel de résistance de *Botrytis cinerea* à des biofongicides. Thèse Dr. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse Faculté Des Sciences.
169. Trottet M., 2007- Incidence of inoculations during grain filling by *Fusarium culmorum* on the accumulation of TCT in kernels. Colloque Fusariotoxines des Céréales – Arcachon - 11–13 .
170. Celiktas, O.Y., Hames Kocabas, E.E., Bedir, E., Vardar Sukan, F., Ozek, T., Baser, K.H.C., 2007a- Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. Food Chem. 100: 553-559.
171. Rouibi A., Saidi F., Benfares R., Cherif H., Luca E., Boutoumi H., 2009- identification et effet antiseptique des huiles essentielles des deux espèces xérophytes *Cassia Acutifolia* et *Cassia obovata*, Agricultura-stiinta si practica, nr 3-4 [71-72].
172. Chao. SC, Young D, Get Oberg GT, (2000) : Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. J.Essent. Oil Res, 12 : 639 – 649 p

173. Özkan G., Sagdic O., Baydar N.G. et Baydar H., 2003- Inhibition of pathogenic bacteria by essential oils at different concentrations. *Food Science and Technology International*, vol.9, n.2, p.p.85-88.
174. Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S., Radice M., Bruni R., 2005- Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.* 91: 621 – 632.
175. Denis F., Poly M.C., Martin C., Bingen E et Quentin R., 2007- *Bactériologie médicale, Techniques usuelles*, édition Elsevier Masson, Paris, p.546.
176. Leclerc H., Gaillard J.L. et Simonet M., 1995- *Microbiologie générale : la bactérie et le monde bactérien*. édi Doin, Paris, 535p.
177. Pharmacopée européenne., 2002- 4^{ème} édition, Strasbourg.
178. Remmal A., Bouchikhi T., Rhayour K., Ettayebi M., Tantaoui Elaraki A., 1993- Improved method for determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. - *J. Ess. Oil Res.*, 5(2), 179-184.
179. Satrani B., Farah A., Fechtal M., Talbi M., Blaghen M., Chaouch A., 2001- Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Satureja calamintha* et *Satureja alpina* du Maroc. - *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 94 (956), 241-250.
180. Leitão G.G., Leitão S.G et Vilegac W., 2002- Quick Preparative Separation of Natural Naphthopyranones with Antioxidant Activity by High – Speed Counter Current Chromatography. *Z. Naturforsch.* 57C, 1051 – 1055.
181. Chen C-N., Weng M-S., W.U C-L et Lin J- K., 2004- Comparaison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by taiwanese propolis from different sources. *eCAM* 1(2), 175 – 185.
182. Loo A.Y., Jain K et Darah I., 2008- Antioxydant activity of compound isolated from the pyroligneous acid, *Rhizophora apiculata*. *Food chemistry*, 107, p.1151-1160.
183. Celiktas O.Y., Bedir E., Vardar Sukan F., 2007b- *In vitro* antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts treated with supercritical carbon dioxide. *Food Chem.* 101: 1457-1464.

184. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C., 1995- Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm. Wiss. Technol* 28: 25–30.
185. Molyneux P., 2004- The use of the stable free radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarin J. Sci. Technol* 26 (2), pp 211-219.
186. Mensor L.L., Menezes F.S., Leitão G.G., Reis A.S., Santos T.C., Coube C.S. et Leitão S.G., 2001- Screening Brazilian plant extracts for antioxidant isoactivity by the use of DPPH free radical method. *Phy – Tothes. Res.* 15, 127 – 130.
187. Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela – Raventos R.M., 1999- Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-Ciocalten reagent . In : Packer L. (ed). *Methods in Enzymology* Orlando Academic press 299 152 – 178.
188. Heilerová L., Bučková M., Tarapčik P., Silhár S et Labuda J., 2003- Comparaison of antioxidative Activity Data for Aqueous Extracts of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.), Oregano (*origanum Wilgare* L.) Thyme (*Thymis vulgaris* L.), and Agrimony (*Agrimonia eupatoria* L) obtained by conventional methods and the DNA – Based Biosensor. *Czech J. Food sci.* 21 (2), 78 – 84.
189. Patrice W., 2003- Thèse de doctorat : Investigation phytochimique des plantes aquatiques *Potamogeton pectinatus* L., *P. lucens* L., *P. perfoliatus* L. et *P. crispus* L. (Potamogetonaceae) .Université de Lausanne.
190. Mavian N et Fereidoon S 2004- Extraction and analysis of phenolics in Food *Journal of chromatography A*, 1054: 95 – 111.
191. Wong C.C., Li H.B. Cheng K.W., Chen F., 2006- A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chem.* 97: 705 – 711.
192. Li H.B., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., Chen F., Jiang Y., 2007- Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry.* Vol.102,p.p.771-776.

193. Daels-rakotoarison D, 1999- Extraits polyphénoliques d'aubepine, de cola et d'eglantier, Thèse de doctorat, université de Lille II France, 172 (64).
194. Vuorela S., 2005- Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics. Helsinki.
195. Erdogan Orhan, R. Belhattab, F.S. Senol, A.R. Gülpinar, S. Hosbas, M. Kartal 2010- Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Artemisia absinthium*, *A. herba-alba*, *A. fragrans*, *Marrubium vulgare*, *M. astranicum*, *Origanum vulgare subsp. glandulosum* and essential oil analysis of two *Artemisia* species. Industrial Crops and Products 32, 566–571, Industrial Crops and Products.
196. Schulz V., Hansel R., E.Tyler V., Blumenthal M, 2004- Rational phytotherapy: a reference guide for physicians and pharmacists, 417 P,Germany, 5éme édition, Ratgeber für Ärzte und Apotheker Publié par Springer, " Pages 367.
197. Wichtl M., 1989- Teedrogen, 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
198. Khan K.A, Abourashed E.A., 2009- Leung's encyclopedia of common natural ingredients: used in food, drugs, and 7éme éddition,810P,Canada, New jersey.
199. Tucker A.O., Maciareello M. J and Sturtz G., 1993- The essential oils of *Artemisia* 'Powis Castle' and its putative parents, *A. absinthium* and *A. arborescens*. J. Essential Oil Res. 5:239-242
200. Wright C.W., 2002- *Artemisia*. Taylor & Francis. Inc. New York.
201. Capasso F., Gaginella T .S., Gran Dolini G., An Gelo A Izzo., 2003- Phytotherapy a quick reference to herbal medicine, Springer- Verlay Berlin Heidelberg Printed in Germany P424.
202. Kraft K et Hobbos C, 2004- Pocket Guide to herbal Medicine.
203. Judpentionė A and Mockutė D., 2004- Chemical composition of essential oils of *Artemisia absinthium* L. (wormwood) growing wild in Vilnius. Chemija, 15(4): 64-68.
204. Tateo F and Riva G., 1991- Gebiete Lebensm. Hyg, 82, 607-614.

205. Maffei M., Mucciarelli M and Scannerini S., 1994- Essential oils from *Achillea* species of different geographic origin. *Biochem. Syst. Ecol.*, 22(7): 679-687.
206. Senatore F., 1996- Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (southern Italy). *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1327-1332.
207. Kokkini S et al., 1997- Autumn essential oils of Greek oregano. *Phytochemistry*, 44, 883-886.
208. Russo M., Galletti G., Bocchini P & Garnacini A., 1998- Essential oil chemical composition of wild populations of Italian origano spice (*Origanum vulgare* ssp. *Hirtum* Link): a preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 3741-3746.
209. Thompson J.D et al., 2003- Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* Chemotypes. *J. Chem. Ecol.*, 29(4), 859-880.
210. Karousou R., Koureas D.N. & Kokkini S., 2005- Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Phytochemistry*, 66, 2668-2673.
211. Damjanovic B.M., 2000- M.Sc. Thesis, Faculty of Technology and Metallurgy, Belgrade, (in Serbian).
212. Mahmoudi M., Ebrahimzadeh M.A., Ansaroudi F., Nabavi S.F and Nabavi S.M., 2009- Antidepressant and antioxidant activities of *Artemisia absinthium* L. at flowering stage. *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (24). Pp. 7170-7175.
213. Podsedek, A., 2007., Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables : A review. *LWT*. 40: 1-11.
214. Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdely C., 2008- Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities, *Comptes Rendus Biologies*, 331, 372–379.

215. Negro C., Tomassi L., Miceli A., 2003- Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Biosource Tech* 87: 41-44.

216. Albayrak S., Aksoy A., Sağdıç O et al.,2010- Phenolic compounds and antioxidant and antimicrobial properties of *Helichrysum* species collected from eastern Anatolia, Turkey. *Turk J Biol* 34: 463-473,