

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE DE LAGHOUAT



DÉPARTEMENT : BIOLOGIE

MÉMOIRE DE MAGISTER

En vue de l'obtention du diplôme de Magister en Biologie

Option : Valorisation Des Bio-ressources Végétales

THÈME DU PROJET:

**Étude de l'effet synergétique sur l'activité antioxydante et antimicrobienne
de trois huiles essentielles
(*Artemisia campestris* L., *Citrus limon* L. et *Citrus Aurantium* L.)**

Présenté par :

M. BENAMAR Aïssa Boualem

Dirigé par :

Dr. GOURINE Nadhir

Pr. OUINTEN Mohamed

DEVANT LES MEMBRES DU JURY

M. SAÏDAT Boubakeur	Pr.	Université de Laghouat	Président
M. YOUSFI Mohamed	Pr.	Université de Laghouat	Examineur
M. DJERIDANE Amar	Pr.	Université de Laghouat	Examineur
M. GOURINE Nadhir	M.C.A.	Université de Laghouat	Encadreur
M. OUINTEN Mohamed	Pr.	Université de Laghouat	Co-encadreur

ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2017-2018

Dédicace

Je dédie ce mémoire

A mes parents, que dieu les garde, en témoignage de ma profonde affection. Qu'ils sachent que ce travail est en partie le fruit de leur soutien.

Leur fierté à mon égard, aujourd'hui, est pour moi la meilleure des récompenses.

Mes remerciements s'adressent également à ma femme, qui est la personne la plus chère à mon cœur, pour son soutien et sa patience durant ces années, qui resteront inoubliables pour nous.

Merci à mes frères et sœurs.

Remerciements

Je tiens à remercier avant tous **Allah** le tout puissant qui m'a donné la santé, le courage, la volonté et la patience de réaliser ce travail.

Ce travail a été réalisé en majeure partie au Laboratoire de Recherche Sciences Fondamentales (LSF) de l'université de Laghouat. Une autre partie a été complétée au Laboratoire pédagogique de département de Biologie à la même université.

Je tiens tous d'abord à exprimer mes vifs respects ainsi que mes chaleureuses salutations au directeur du Laboratoire des Sciences Fondamentales, monsieur le professeur **Mohamed Yousfi** (ex. directeur de l'ENSL) pour nous avoir accueillies (nous étudiants Magister de l'ENSL) à bras ouverts dans son laboratoire, et de nous avoir mis à notre disposition son local, ses appareillages, ainsi que les produits chimiques pessaires pour réaliser nos mémoires et sans aucun engagement. Je n'oublie pas de remercier tous les membres d'équipes de ce laboratoire de nous avoir aidés et dirigés. J'ajoute que le travail n'aurait jamais été réalisé sans l'implication du laboratoire LSF ainsi que son directeur **M. Yousfi**.

J'exprime ma profonde reconnaissance et toute ma gratitude à mon encadreur **Gourine Nadhir** et à mon co-encadreur **Ouinten Mohamed** pour l'aide et le suivi qu'ils m'ont fournis tout au long de la réalisation de ce mémoire. Leurs conseils et leurs encouragements m'ont permis de mener à bien ce travail.

J'exprime aussi mes vifs remerciements à monsieur le professeur **SAÏDAT Boubakeur** de l'université de Laghouat, qui consenti à participer à cette commission et pour avoir accepté de présider ce jury, qu'il trouve ici toute l'expression de ma considération.

Mes vifs remerciements vont également à monsieur le professeur **YOUSFI Mohamed**, qui m'a fait l'honneur de participer à cette commission et d'apporter un regard critique sur ce travail.

Je remercie monsieur le professeur **DJERIDANE Amar** de l'université de Laghouat pour avoir accepté d'examiner ce travail; qu'il trouve ici l'expression de toute ma gratitude.

Je remercie très sincèrement mes maîtres et collègues pour leur compréhension, leur patience et leur encouragement continu à mon égard tout au long de ce travail.

Titre du mémoire

Étude de l'effet synergétique sur l'activité antioxydante et antimicrobienne de trois huiles essentielles (*Artemisia campestris* L., *Citrus limon* L. et *Citrus aurantium* L.)

Résumé

Les maladies d'origine alimentaire constituent un problème de santé publique de plus en plus important dans le monde entier. La contamination microbienne et l'oxydation des aliments sont des facteurs les plus importants de développement de maladies d'origine alimentaire et d'altération des aliments. La présente étude a été réalisée dans le but d'évaluer les interactions synergiques possibles sur l'efficacité antibactérienne et antioxydante des huiles essentielles de certaines plantes sélectionnées (Zestes de *Citrus limon* et *Citrus aurantium*, et les parties aériennes d'*Artemisia campestris*) et ceci en étudiant leur effet sur la base de plusieurs combinaisons de leurs extraits. L'activité antibactérienne des mélanges a été évaluée contre cinq souches bactériennes en utilisant la méthode de diffusion sur disque. L'activité antioxydante a été évaluée par le test du DPPH. La composition des huiles essentielles individuelles, et leurs rendements ont été déterminés. Après détermination de l'activité antioxydante et antimicrobienne, les résultats obtenus ont indiqué que les mélanges utilisés ont présenté plusieurs effets synergiques et antagonistes. Pour le test DPPH, les différentes combinaisons d'extraits ont présenté des gains d'activités qui varient de 16,83 à 80,01%. Pour l'activité antimicrobienne l'effet synergétique a donné des gains d'activité allant jusqu'à 67,65%, alors que l'effet antagoniste a produit un effet maximum de 72,87%. Cela suggère que les mélanges des huiles essentielles peuvent être utilisés dans l'industrie des aliments et/ou en cosmétique afin de réduire les doses requises, et par la suite, réduire les éventuels effets indésirables/toxiques et diminuant la saveur et l'odeur de chaque composant qui aurait été plus apparent à une concentration plus élevée si les huiles essentielles sont utilisées seules. Les résultats obtenus montrent que la stratégie de combinaison des extraits naturels permet d'améliorer leurs caractéristiques antioxydantes et antimicrobiennes. Et nous stimulent à l'appliquer dans les différents domaines agroalimentaires et pharmaceutiques.

Mots clés

Citrus aurantium ; *Citrus limon* ; *Artemisia campestris* ; huiles essentielles ; activité antioxydante et antimicrobienne; synergie.

Memory title

Study of the synergistic effect on the antioxidant and antimicrobial activity of three essential oils (*Artemisia campestris* L., *Citrus limon* L. and *Citrus aurantium* L.)

Abstract

Food-borne disease is an increasingly major public health problem all over the world. Microbial contamination and food oxidation are the two most important factors for developing food-borne diseases and food spoilage. The present study was carried out to evaluate the possible synergistic interactions on antibacterial and antioxidant efficacy of essential oils of some selected herbs (Peel of *C. limon* and *C. aurantium* and aerial part of *A. campestris*) in combination. Antibacterial combination effect was evaluated against five important food-borne bacteria using the disk-diffusion methods. Antioxidant combination effect was assessed by DPPH free radical scavenging method. The individual composition of each essential oil as well as that of the yield was also determined.

After determining the antioxidant and antimicrobial activity, the obtained results indicated that the mixtures used presented several synergistic and antagonistic effects. For the DPPH assay, the different combinatory extracts exhibited different gains in activity ranging from 16.83 to 80.01%. For the antimicrobial activity, the synergistic effect gave activities gains up to 67.65%, while the antagonistic effect exhibited a maximum value of 72.87%. This suggests that mixtures of essential oils could be used in processed foods and cosmetic in order to decrease required doses, reducing both cost and adverse/toxic side effects and they decrease the odour of each individual component which would have been more apparent at the higher concentration if the essential oils were used singly.

Keywords

Citrus aurantium, *Citrus limon*, *Artemisia campestris*, essential oils, antioxidant antibacterial activity, synergetic.

عنوان المذكرة

دراسة التأثير التآزري على النشاطات المضادة للأكسدة وللميكروبات لثلاثة زيوت عطرية (*Artemisia campestris* L. و *Citrus aurantium* L. و *Citrus limon* L.)

ملخص

تشكل الأمراض التي تنتقل عن طريق الأغذية مشكلة صحية عامة و متزايدة في جميع أنحاء العالم. إن تلوث الأغذية بالميكروبات وتأكسدها هما العاملان الأكثر أهمية لإنتشار الأمراض التي تنتقل عن طريق الأغذية والمسببة لتلفها. لقد تم إجراء هذه الدراسة لتقييم التفاعلات الممكنة لتآزر الزيوت العطرية على النشاطية المضادة للجراثيم والمضادة للأكسدة لبعض الأعشاب المنتقاة (قشور الليمون *Citrus limon* وال نارنج *Citrus aurantium* والأجزاء الهوائية للثقف *Artemisia campestris*). لقد تم قياس النشاط المضاد للجراثيم لمختلف التوليفات ضد خمسة أنواع من البكتيريا التي تنتقل عن طريق الأغذية باستخدام طريقة الإنتشار على القرص. ومن ثم تم كذلك تقييم التأثير المضاد للأكسدة للمزيج باستعمال طريقة الـ DPPH. كما قمنا بتحديد التركيب الكيميائي للزيوت العطرية الفردية بالإضافة إلى تقييم المرودية لكل منها. بعد تحديد نشاط مضادات الأكسدة والميكروبات، أشارت النتائج المتحصل عليها إلى أن الخلائط المستخدمة كان لها العديد من التأثيرات التآزرية والتضادية. بالنسبة لإختبار الجذور الحرة DPPH، أظهرت نتائج استخدام الخلائط مكاسباً في النشاط تتراوح ما بين 16,83 و 80,01%. أما بالنسبة للنشاط المضاد للميكروبات، فقد أعطى التأثير التآزري مكاسباً في النشاط في حدود 67,65%، في المقابل أنتج الفعل التضادي أقصى تأثير بقيمة 72,87%. واستناداً لما ورد سابقاً، فإنه يمكن استخدام مزيج من الزيوت العطرية في صناعة المواد الغذائية ومستحضرات التجميل وذلك للتقليل من الجرعات المطلوبة، وبالتالي الحد من الآثار السلبية / السمية المحتملة وكذا تقليل نكهة ورائحة كل عنصر عند استعماله منفرداً، والتي تكون أكثر وضوحاً عند التركيز العالي باستخدام الزيوت العطرية منفردة.

كلمات مفاتيح

Citrus aurantium، *Citrus limon*، *Artemisia campestris*، الزيوت العطرية، النشاط المضاد للأكسدة والميكروبات، التآزر.

Liste des abréviations

AFNOR	Association Française de Normalisation
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adénosine triphosphate
AVC	Accident vasculaire cérébrale
BHA	Hydroxyanisole butylé
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPPH	2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl
DZI	Diamètre de la zone d'inhibition
FID	Détecteur à ionisation de flamme
GC-MS	Chromatographie en Phase Gazeuse - Spectrométrie de Masse
HE	Huile essentielle
IC₅₀	Concentration inhibitrice à 50%
IRL	Indices de rétention linéaire
MH	Meuller-Hinton
NIST	National Institute of Standards and Technology
OMS	Organisation mondiale de la santé
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
THF	Tétrahydrofurane
tr	Temps de rétention
UFC	Unité Formant Colonie
UV-Vis	Ultraviolet-Visible

Liste des tableaux

Tableau I.1	Utilisation traditionnelle d' <i>Artemisia campestris</i>	5
Tableau I.2	Utilisation traditionnelle du <i>Citrus aurantium</i>	7
Tableau I.3	Utilisation traditionnelle du <i>Citrus limon</i>	10
Tableau II.1	Régions et dates de récolte des trois plantes étudiées	29
Tableau II.2	Souches et leurs origines utilisées dans les différents tests d'activité antimicrobienne	30
Tableau III.1	Les densités des huiles essentielles des plantes étudiées comparées avec celles de références	49
Tableau III.2	Composition chimique des huiles essentielles des parties aériennes d' <i>Artemisia campestris</i> des régions de Charef, S. Bouzid, R. d'Alger, Aflou et Milok	50
Tableau III.3	Composition chimique des huiles essentielles des zestes de <i>Citrus aurantium</i>	54
Tableau III.4	Composition chimique des huiles essentielles des zestes de <i>Citrus limon</i>	56
Tableau III.5	Résultats de l'activité antioxydante de l'huile essentielle des parties aériennes d' <i>Artemisia campestris</i> et des zestes de <i>Citrus aurantium</i> et de <i>Citrus limon</i>	58
Tableau III.6	Activité antibactérienne des huiles essentielles des parties aérienne d' <i>Artemisia campestris</i> et des zestes de <i>Citrus aurantium</i> et <i>Citrus limon</i> sur les souches bactériennes	60
Tableau III.7	Valeurs expérimentales de l'activité antioxydante des huiles essentielles combinée comparée avec les valeurs théoriques.....	66
Tableau III.8	Valeurs expérimentales de l'activité antibactérienne des huiles essentielles combinée comparée avec les valeurs théoriques	71

Liste des figures

Figure I.1	Photo représentant la partie aérienne d' <i>Artemisia campestris</i>	4
Figure I.2	Photo représentant le <i>Citrus aurantium</i>	6
Figure I.3	Photo représentant le <i>Citrus limon</i>	8
Figure I.4	Structure semi-développé de l'isoprène (C ₅ H ₈).....	13
Figure I.5	Structures de quelques constituants des huiles essentielles.....	14
Figure I.6	Schéma simplifié de configuration d'un appareil CPG.....	23
Figure II.1	Organigramme de la méthodologie de l'étude	28
Figure II.2	Schéma du montage d'hydrodistillation.....	31
Figure II.3	Réaction d'un antioxydant avec le radical libre DPPH.....	36
Figure II.4	Schéma illustrant le protocole opératoire de l'activité antioxydante par test du DPPH	38
Figure II.5	Détermination graphique de l'IC ₅₀	39
Figure II.6	Schéma de principe de la méthode de diffusion par disque	40
Figure III.1	Cinétique d'extraction des HEs obtenus par hydrodistillation.....	44
Figure III.2	Rendement en HE des partie aériennes de l' <i>Artemisia campestris</i> récoltée dans Différents régions	46
Figure III.3	Rendement en huile essentielle des zestes de <i>Citrus aurantium</i> et de <i>Citrus limon</i>	47
Figure III.4	Photos montrant l'effet d'huile essentielle brute d' <i>Artemisia campestris</i> sur certaines bactéries	61
Figure III.5	Photos montrant l'effet d'huile essentielle brute de <i>Citrus aurantium</i> sur certaines Bactéries	62
Figure III.6	Photos montrant l'effet d'huile essentielle brute de <i>Citrus limon</i> sur certaines bactéries	63
Figure III.7	Variation de l'IC ₅₀ du mélange en fonction du rapport d'huile essentielle de l' <i>Artemisia campestris</i>	68
Figure III.8	Photos de l'effet du mélange binaires Ac/Cl avec des rapports différents sur la souche <i>S. aureus</i>	73
Figure III.9	Photos de l'effet du mélange tertiaires Ac/Ca/Cl avec des rapports différents sur la souche <i>B. cereus</i>	73

Table des matières

Table des matières	
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
PRÉMIÈRE PARTIE : RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE	3
CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉ SUR LES PLANTES ÉTUDIÉES	4
I-1- <i>Artemisia campestris</i>	4
I-1-1- Description botanique	4
I-1-2- Systématique de la plante	4
I-1-3- Origine et distribution	5
I-1-4- Utilisation traditionnelle	5
I-2- <i>Citrus aurantium</i>	6
I-2-1- Description botanique	6
I-2-2- Systématique de la plante	6
I-2-3- Origine et distribution	7
I-2-4- Utilisation traditionnelle	7
I-3- <i>Citrus limon</i>	8
I-3-1- Description botanique	8
I-3-2- Systématique de la plante	9
I-3-3- Origine et distribution	9
I-3-4- Utilisation traditionnelle	9
CHAPITRE II : GÉNÉRALITÉS SUR LES HUILES ESSENTIELLES	11
II-1- Définitions	11
II-2- Répartition et localisation	11
II-3- Rôle dans la plante	12
II-4- Caractéristiques physiques	12
II-5- Composition chimique	12
II-5-1- Groupe des terpénoïdes	13
II-5-2- Groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane	13
II-6- Facteurs de variabilité	15
II-7- Chémotypes	15
II-8- Utilisations des huiles essentielles	15
II-8-1- Parfumerie et cosmétologie	15

II-8-2- Pharmacie	16
II-8-3- Agroalimentaire	16
II-8-4- Aromathérapie	17
II-9- Activités biologiques des huiles essentielles	17
II-9-1- Activité antioxydante	17
II-9-2- Activité antimicrobienne	18
II-9-3- Propriétés pesticides	18
II-9-4- Propriétés antihelminthiques	18
II-10- Synergie entre les huiles essentielles	19
CHAPITRE III : MÉTHODES D'EXTRACTION ET D'ANALYSE DES HUILES	
ESSENTIELLES	
III-1- Méthodes d'extraction	21
III-1-1- Hydrodistillation	21
III-1-2- Distillation à la vapeur saturée	21
III-1-3- Hydro-diffusion	21
III-1-4- Expression à froid	21
III-1-5- Enfleurage	22
III-1-6- Extraction par les solvants	22
III-1-7- Extraction au CO2 supercritique	22
III-1-8- Extraction par micro-ondes	22
III-2- Méthodes d'analyse des huiles essentielles	23
III-2-1- Analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG)	23
III-2-1-1- Principe de la chromatographie en phase gazeuse	23
III-2-1-2- Identification préliminaire par les indices de rétention (indices de Kovats)	23
III-2-2- Identification par couplage chromatographie en phase gazeuse spectrométrie de masse (CG/SM)	24
III-3- Conservation des huiles essentielles	25
DEUXIÈME PARTIE : MATÉRIEL ET MÉTHODES	
I- Méthodologie générale du travail expérimental	27
II-Matériel	27
II-1- Appareillage	27
II-2- Solvants et réactifs chimiques	27
II-3-Matériel végétal	29

II-4- Microorganismes testés	29
II-5- Milieux de culture	30
II-6- Antibiotiques	30
III-Méthodes	31
III-1- Extraction des huiles essentielles	31
III-1-1- Principe de l'hydrodistillation	32
III-1-2- Démarches expérimentales de l'obtention des huiles essentielles par hydrodistillation	32
III-1-3- Cinétique de l'extraction	32
III-1-4- Rendement en huile essentielle	33
III-1-5- Propriétés organoleptiques	33
III-1-6- Détermination de la densité	33
III-2- Analyses des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse CPG	34
III-3- Identification des composés volatils	34
III-4- Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des HEs seules	35
III-4-1- Activité antioxydante	35
III-4-1-1- Principe du test DPPH	35
III-4-1-2- Protocole expérimental	36
III-4-2- Activité antimicrobienne	39
III-4-2-1- Méthode de diffusion de disques	39
III-4-2-2- Méthodologie des tests antimicrobienne	40
III-4-2-2-1- Repiquage des espèces bactériennes	40
III-4-2-2-2- Préparation de l'inoculum	40
III-4-2-2-3- Préparation des milieux de culture	41
III-4-2-2-4- Ensemencement	41
III-4-2-2-5- Dépôt des disques	41
III-4-2-2-6- Lecture	41
III-5- Étude de synergie entre les huiles essentielles (Test de combinaison)	42
III-5-1- Activité antioxydante	42
III-5-2- Activité antimicrobienne	42
TROISIÈME PARTIE : RÉSULTATS ET DISCUSSION	42
I- Extraction et analyse des huiles essentielles	44
I-1- Cinétique de l'extraction des huiles essentielles	44

I-2- Rendement en huile essentielle	45
I-2-1- Rendement en huile essentielle de l' <i>A. campestris</i>	45
I-2-2- Rendement en huile essentielle de <i>C. aurantium</i> et <i>C. limon</i>	47
I-3-Propriétés organoleptiques des huiles essentielles	48
I-4- Détermination de la densité	49
I-5- Etude de la composition chimique des huiles essentielles	49
I-5-1- Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>A. campestris</i>	49
I-5-2- Composition chimique de l'huile essentielle des Citrus	53
I-5-2-1- Composition chimique du <i>Citrus aurantium</i>	53
I-5-2-2- Composition chimique du <i>Citrus limon</i>	55
II- Évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des HEs	58
II-1-Évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des HEs individuelles	58
II-1-1- Activité antioxydante	58
II-1-2- Activité antibactérienne	59
II-2- Étude de synergie entre les huiles essentielles (Test de combinaison)	64
II-2-1- Activité antioxydante	64
II-2-2- Activité antibactérienne	69
Conclusion générale	75
Perspectives	77
Références bibliographiques	78
Annexe	87
Annexe 1. Les milieux de culture	87
Annexe 2. Chromatogrammes des huiles essentielles étudiées	88
Annexe 3. Les graphiques de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'huile essentielle	91
Annexe 4. Photos montre l'effet de quelques mélanges sur les souches bactériennes testés	95

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les maladies d'origine alimentaire constituent un problème de santé publique de plus en plus important dans le monde entier. La contamination microbienne et l'oxydation des aliments sont les deux facteurs les plus importants de développement de maladies d'origine alimentaire et de d'altération des aliments. La prévention de la contamination microbienne et l'oxydation des aliments est généralement réalisée par des conservateurs alimentaires synthétiques. Ces derniers peuvent être classés principalement en deux types généraux, les antimicrobiens qui inhibent la croissance des microbes, et les antioxydants qui ralentissent l'oxydation des aliments qui conduisent à la rancidité. Mais ces conservateurs alimentaires synthétiques sont nocifs pour la santé humaine et ont de nombreux effets secondaires tels que maux de tête, nausées, faiblesse, retard mental, crises épileptiques, cancer et anorexie ainsi qu'une préoccupation croissante de l'émergence de microbes multi-résistants. Par conséquent, il existe un intérêt croissant pour le développement de conservateurs alimentaires naturels ([Bag et Chattopadhyay, 2015](#)).

Les plantes médicinales sont traditionnellement utilisées depuis des milliers d'années par de nombreuses cultures non seulement comme agents aromatisants, mais aussi comme conservateurs alimentaires. Ils sont peu coûteux, montrent une meilleure tolérance du patient et sont facilement disponibles pour une population socio-économique faible. En raison de leurs effets bénéfiques, les plantes médicinales prennent de plus en plus d'importance ces dernières années en tant que source potentielle de conservateurs alimentaires naturels. Mais le principal obstacle à leurs utilisations est leur forte concentration dans les aliments pour inhiber la croissance microbienne et l'oxydation. Cette forte concentration provoque des effets organoleptiques négatifs, altérant le goût, la couleur, l'odeur et la texture des aliments et limiter leur utilisation dans le système de conservation des aliments ([Kehal, 2013](#) ; [Bag et Chattopadhyay, 2015](#)).

En Algérie, l'industrie pharmaceutique, mais également des médecins et des chimistes cherchent à mieux connaître le patrimoine des espèces spontanées utilisées en médecine traditionnelle. Leurs modes d'utilisation, leurs indications dans diverses pathologies ainsi les principes actifs sont étudiés depuis une vingtaine d'années ([Ould el hadj et al, 2003](#)).

Les huiles essentielles sont très utilisées en aromathérapie, en pharmacie, en parfumerie, en cosmétique et en agroalimentaire. Leur utilisation est liée à leurs différentes activités biologiques reconnues. Des études récentes ont montré que les huiles essentielles et leurs composés présentent un potentiel important en tant qu'agents antimicrobiens, antioxydants et dans

plusieurs domaines industriels et médicaux (Satrani et al, 2007). Les effets individuels des huiles essentielles des plantes médicinales sur l'activité antimicrobienne contre les bactéries d'origine alimentaire ainsi que leur activité antioxydante ont été largement rapportés par plusieurs chercheurs. Mais leurs effets combinés sur les activités antimicrobiennes et antioxydantes semblent douteux. Cette approche peut augmenter leur efficacité antimicrobienne et antioxydante à une concentration suffisamment faible en prenant leurs avantages d'interactions synergiques possibles. Cette interaction synergique peut réduire leurs effets secondaires indésirables ainsi que les effets organoleptiques négatifs dans les aliments et faciliter leur utilisation dans le système de conservation des aliments (Toure, 2015).

Nous nous proposons, dans ce travail, de tester des ressources végétales, utilisées séparément dans la médecine traditionnelle (*Artemisia campestris*, *Citrus limon* et *Citrus aurantium*), afin d'évaluer scientifiquement l'intérêt de tels usages, optimiser l'utilisation ; donc valoriser cette richesse spontanée. Ainsi, nous Testons la présence probable de certains effets de synergie (entre autres d'antagonisme), sur l'activité antioxydante et antibactérienne, et ceci à partir de plusieurs combinaisons (binaires et tertiaires) des huiles essentielles. Pour atteindre cet objectif, les démarches spécifiques suivantes ont été dégagées :

- Étudier la composition chimique des huiles essentielles par CPG ;
- Évaluer les propriétés antioxydantes de ces huiles essentielles et de leurs mélanges (effets combinatoire) ;
- Évaluer l'activité antibactérienne de ces huiles essentielles et de leurs mélanges sur quelques souches bactériennes.

Le manuscrit de ce mémoire se subdivise en trois grandes parties. La première partie (Partie I), est réservée à une revue bibliographique générale. Cette première partie est à son tour structuré en trois chapitres. Le premier chapitre décrit les espèces végétales choisies dans le présent mémoire. Le deuxième chapitre, expose brièvement des généralités sur les huiles essentielles. Dans le troisième chapitre, les principales méthodes d'extraction et d'analyse des huiles essentielles ont été brièvement abordées. La deuxième partie (Partie II) a été consacré à la description du matériels et des méthodes utilisés, notamment dans l'extraction des huiles essentielles ainsi que l'analyse de leur composition chimique ; l'évaluation de l'activité antioxydante et l'étude de leur activité antibactérienne. La troisième et dernière partie (Partie III) a été destinée au traitement et à la discussion des résultats obtenus. Enfin, ce mémoire se termine par une conclusion générale et des perspectives.

PREMIÈRE PARTIE :
RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉ SUR LES PLANTES ÉTUDIÉES

I-1- *Artemisia campestris* :

I-1-1- Description botanique :

Le genre *Artemisia*, qui appartient à la famille d'Astraceae, comprend environ 500 espèces dans tout le monde (Bora et Sharma, 2011). En Algérie, le genre *Artemisia* est représenté par 11 espèces spontanées, parmi ces espèces nous avons *Artemisia campestris* connu par le nom « Dgoufd » ou l'armoise rouge (Quezel & Santa, 1963).

Artemisia campestris (Figure I.1) est une plante vivace de hauteur 25-80 (150) cm, sa floraison est en août à septembre, presque ligneuse et couchée à la base, ascendante, glabre à l'état adulte, très rameuse, à rameaux étalés, non visqueuse. Feuilles caulinaires bipennatiséquées, celles des jeunes tiges argentées, soyeuses, les inférieures pétiolées, les suivantes sessiles, à segments très étroits, linéaires, mucronulées. Involucre de longueur 1,5-2,5 mm, glabre ou rarement poilu. Capitules brièvement pédicellés, ovoïdes, formant une grande panicule, entremêlée de feuilles linéaires, entières. Varie dans les sables maritimes à segments de feuilles plus larges, plus courts, épaissis, à capitules plus gros. La plante est une diploïde ($2n = 36$) (Chalchat et Cabassu, 2003).



Figure I.1: Photo représentant la partie aérienne d'*Artemisia. campestris*.

I-1-2- Systématique de la plante :

D'après Al-Snafi, 2015, la classification qu'occupe *Artemisia campestris* est la suivante:

Règne :	Plantae
Division :	Magnoliophyta
Classe :	Magnoliopsida
Ordre :	Asterales
Famille :	Asteraceae
Genre :	<i>Artemisia</i>
Espèce :	<i>Artemisia campestris</i> L.

Noms vernaculaires (Al-Snafi, 2015)

En berbère : Taguq

En arabe : Alala / Dgoufd

En français : Armoise des champs

En anglais : Field or Northern Wormwood

I-1-3- Origine et distribution :

Selon [Al-Snafi, 2015](#) l'*Artemisia campestris* serait originaire de l'Asie. En générale, le genre *Artemisia* (Asteraceae) comprend des espèces qui poussent de façon spontanée dans plusieurs régions de l'hémisphère nord de la terre, surtout dans les zones semi arides et le bassin méditerranéen, et s'étendent jusqu'à l'Himalaya, dans l'hémisphère sud elles sont trouvées en Afrique du sud, l'Australie et l'Amérique du sud ([Bakchiche et al., 2013](#)). L'*A. campestris* est très fréquente en zones steppique et déserts ([Dob et al., 2005](#)).

I-1-4- Utilisation traditionnelle :

De l'Antiquité à nos jours, les plantes sont utilisées comme médicaments. Les industries pharmaceutiques sont de plus en plus intéressées par l'ethnobotanique des plantes. L'usage empirique de la différente préparation traditionnelle de plantes est donc très important pour une sélection de plantes car la plupart des métabolites de plantes utilisées en médecine moderne, ont été découverts par l'intermédiaire d'investigations ethnobotaniques ([Saihi, 2011](#)).

Tableau I.1: Utilisation traditionnelle d'*Artemisia campestris*.

Région	Partie	Préparation	Indications	Références
Tunisie	Feuilles	Décoction	Antispasmodique, anti-inflammatoire, antirhumatismal, antimicrobien, antihelminthique, anti venin et plaies.	Ghlissi et al, 2016 Ksouri et al, 2014
Italie	--	--	Ulcère gastrique, lénitif, émollient ou cicatrisant des plaies, la furonculose, les selles, les verrues et les cors.	Leporatti et Ghedira, 2009
Japon	--	--	jaunisse, diabète, troubles des reins et de foie.	Aniya et al., 2000
Europe	P. aérienne	--	Troubles digestives et les douleurs menstruelles.	Lis et Kowal, 2015
	Racines	--	Traitement des infections de scalp	
Algérie (Sahara)	P. aérienne	Décoction, infusion.	Règles irrégulières et douloureuses, Nausées, accouchement, indigestions et douleurs abdominales. Cicatrise les plaies et les brûlures	Gherib, 2009 ; Chahma et Djebar, 2008 Gherib, 2009

Tableau I.1: Suite.

Algérie (Ouargla)	Feuilles, sommités	Infusion, décoction, macération, cataplasme.	Emménagogue, vermifuge, vulnéraire, règles douloureuses, cicatrisant, maux d'estomac	Ould Elhadj et al., 2003
Algérie (M'Sila)	P. aérienne	Décoction	Antidiabétique, anti hypertensive.	Boudjelal et al., 2013

I-2- *Citrus aurantium*

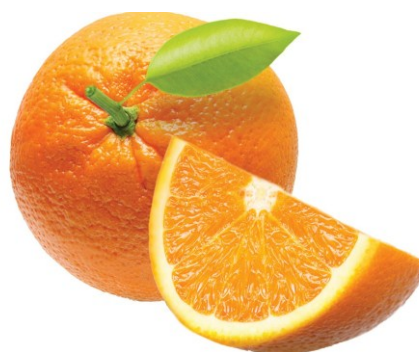
I-2-1- Description botanique :

Le bigaradier (*Citrus Aurantium*) (Figure I.2) appartient à la famille des Rutacées ou Aurantiacées. Regroupant près de 2000 espèces et 150 genres, parmi ces genres le Citrus qui comprend environ 70 espèces (Hadrich et al., 2008 ; Campelo et al., 2011).

Citrus aurantium est un arbrisseau épineux atteignant 4 à 5m de haut, qui produit l'orange amère, son tronc ramifié et feuillage toujours vert brillant et à la floraison abondante. Les feuilles sont entières, elliptiques, persistantes. Les fleurs actinomorphes d'un blanc très pur, d'odeur agréable, sont groupées par 2 à 3 à l'aisselle des feuilles et possèdent 5 à 8 pétales charnus ponctués de poches sécrétrices à huile essentielle. De nombreuses étamines présentent un filet fusionnant en larges faisceaux dans la partie basale. Les fruits (Figure 3) sont souvent des baies cloisonnées à pulpe vésiculeuse et juteuse, récolté de janvier à mars. Ils possèdent une partie blanche ou mésocarpe plus épaisse que celle de l'oranger doux (Ghédira et Goetz, 2015 ; Hadrich et al., 2008).



(a)



(b)

Figure I.2 : Photo représentant le *Citrus aurantium*. (a) Arbre ; (b) Fruits.

I-2-2- Systématique de la plante

Selon Ghédira et Goetz, 2015, la plante *Citrus aurantium* est classée dans:

Règne :	Plantae (Végétal)
Division :	Magnoliophyta (Tracheophyta)
Classe :	Magnoliopsida
Ordre :	Sapindales
Famille :	Rutaceae
Genre :	<i>Citrus</i> L.
Espèce :	<i>Citrus aurantium</i> L.

Noms vernaculaires (Ghédira et Goetz, 2015 ; Hadrich et al., 2008)

En français : Bigaradier, Oranger amer

En anglais : Bitter orange, Seville orange, Sour orange, Bigarade orange

En arabe : Zanbouâ, Anreje.

I-2-3- Origine et distribution :

Le bigaradier est originaire d'Asie mineure et il a été introduit dans toute l'Europe et sur le pourtour méditerranéen. Il est maintenant cultivé dans le sud de l'Europe, le littoral méditerranéen et dans d'autres régions subtropicales notamment dans le sud de la France, en Italie, Espagne, Tunisie, Algérie, Côte d'Ivoire, Haïti, États-Unis, Brésil, etc. La Tunisie est le principal producteur mondial. Il est possible que l'oranger amer soit un hybride entre *C. reticulata* et *C. maxima* (Ghédira et Goetz, 2015).

I-2-5- Utilisation traditionnelle :

Les extraits de différents organes de *Citrus aurantium* ont été utilisés en médecine traditionnelle pour lutter contre divers maux. Le Tableau I.2 présente quelques exemples d'utilisation traditionnelle du *Citrus aurantium*.

Tableau I.2. Utilisation traditionnelle du *Citrus aurantium*.

Région	Partie	Préparation	Indications	Références
Tunisie	Fleurs	Eau de fleur Eau de fleur mélangée à du savon	Tranquillisant et analeptique cardiaque, soulager les maux de tête. Fébrifuge.	Ghédira et Goetz, 2015
Maroc	Zeste Fleurs Zeste, fleurs et feuilles.	Décoction, poudre Eau de fleur Infusion, décoction et macération.	Préconisée dans les coliques. Donnée aux nourrissons pour calmer. Insomnie, manque d'appétit, crampes d'estomac, perte de poids, fièvre, anxiété, migraine et palpitations cardiaques.	Ghédira et Goetz, 2015 ; Fadil et al., 2014
Tchad	Fleurs, zeste	Infusion.	Insomnie, maux de tête et contre les parasites intestinaux.	Chahad et al., 2015

Tableau I.2. Suite.

Côte d'Ivoire	Fruits Feuilles	Jus Décoction	Hypertension Hypertension	N'guessan et al., 2011
Chine	Zeste immature	--	Utilisé pour l'indigestion, douleurs abdominal, constipation et la diarrhée dysentérique.	Suryawanshi, 2011
Mexique	Feuilles Zeste	-- --	Utilisée comme fortifiante, laxative, sédatrice et pour l'insomnie. Contre les douleurs de l'estomac et l'hypertension.	Suryawanshi, 2011
Europe	Feuilles Zeste	-- --	Contre les douleurs de l'estomac, insomnie et palpitations. Comme antispasmodique.	Suryawanshi, 2011
Espagne	Fleurs	Eau de fleur	Pour ressusciter l'inconscience.	Arias et al., 2003
Caraïbes	--	--	Hypertension.	N'guessan et al., 2011

I-3- *Citrus limon*

I-3-1- Description botanique :

Citrus limon (Figure I.3) est une plante arbrisseau épineux qui appartient à la famille des Rutacées et atteint 2,5 à 3 m de haut. Ses feuilles sont oblongues lancéolées de couleur verte. Ses fleurs ont des pétales blancs, à teinte violacée, axillaires, réunis en petits groupes. Son fruit (Figure I.3-b) est oblong, ovoïde, pointu, de 8 à 12 cm de long. Sa couleur verte vire au jaune à la maturité. Sa pulpe est acide, son écorce (zeste) épaisse (2-3 mm) contenant une essence à odeur caractéristique. Les grains qu'il contient ont des cotylédons blancs (Goetz, 2014; Shah et Seth, 2010). Le fruit est une baie constituée de trois parties ; (i) le zeste ou flavédo, partie extérieure colorée d'où seront extraites les essences par expression mécanique à froid du zeste frais et les HE par distillation à la vapeur d'eau du zeste sec ; (ii) l'albédo, partie blanchâtre à saveur amère d'épaisseur inégale; cette partie ne se mange pas ; (iii) la pulpe, gorgée de jus est utilisée en alimentation (Millet, 2014).



(a)



(b)

Figure I.3 : Photo représentant le *Citrus limon*. (a) Arbre ; (b) Fruits.

I-3-2- Systématique de la plante :

Selon **Goetz, 2014**, la plante *Citrus limon* est classée dans:

Règne :	Plantae
Division :	Magnoliophyta
Classe :	Magnoliopsida
Ordre :	Sapindales
Famille :	Rutacées
Genre :	<i>Citrus</i>
Espèces :	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm. F., 1768

Noms vernaculaires (**Goetz, 2014**)

En français : Citron (nier)

En italien : Limone

En anglais : Lemon

En espagnol : Limonero

En arabe : Lîmûn

En allemand : Zitrone.

I-3-3- Origine et distribution :

Le Citronnier serait originaire asiatique et plus précisément d'Asie du Sud-est et d'Inde, avant de se disperser dans le pourtour méditerranéen, puis dans les pays chauds. Ce fruit émigra ensuite vers la Mésopotamie. Pendant la famine de Babylone, les Hébreux apprirent à le cultiver et l'importèrent en Palestine. Avec l'avènement de l'Empire romain en Orient, sa culture fut introduite à Rome même. Cet arbre ne fut propagé par les Romains vers l'Ouest du bassin méditerranéen que vers le V^{ème} siècle et par les Arabes à partir du VIII^{ème} siècle (**Goetz, 2014**).

Actuellement, sa culture s'étend aux régions tempérées du monde entier car il craint le froid et les températures trop élevées. Sous climat aux étés sans excès de chaleur et aux hivers peu prononcés, il prospère sur le pourtour de la Méditerranée, en Californie, en Amérique du Sud et en Afrique (**Millet, 2014 ; Munier et al., 2011**).

I-3-4- Utilisation traditionnelle :

Les extraits de différents organes de *Citrus limon* ont été utilisés en médecine traditionnelle pour

lutter contre divers maux. Le Tableau I.3 présente quelques exemples d'utilisation traditionnelle du *Citrus limon*.

Tableau I.3. Utilisation traditionnelle du *Citrus limon*.

Région	Partie	Préparation	Indications	Références
Mexique	Racines et bois	Infusion	Contre l'obésité	Goetz, 2014
Guyane	Fruit	--	Utilisé comme fébrifuge	Goetz, 2014
Brésil	Fruit	Jus	Diurétique, antiscorbutique, antirhumatismal, antidysentérique, fébrifuge, l'acidité gastrique, hyperuricémie et goutte, varices, hémorroïdes, lithiase urinaire, grippe, piqûre d'insecte, eczéma, congestion bronchique.	Goetz, 2014
	Fruit	Jus	Contre les plaies, aphtes et eczéma	
	Fruit	Jus dilué avec l'eau	Contre la goutte	
	Fruit	Jus associé avec l'acide acétylsalicylique	Contre la fièvre ou la grippe	
	Feuilles et zeste	Infusion	Contre la fièvre	
	Zeste et albédo	Infusion	Varices et dilatations veineuse	
	Graine	--	Contre les plaies, aphtes et eczéma	
Cote d'Ivoire	--	--	Contre la fièvre typhoïde	Annick et al., 2016
Cameroun		--	Antitussive et contre la fatigue	Mpondo et al., 2012
Ghana	--	Pâte	Contre le ténia et des dermatoses	Goetz, 2014
Inde	Fruits et épines	Jus	Utilisé contre le ténia	Goetz, 2014
Europe	Fruits	Jus	Rafraîchissant et fébrifuge, rhumatisme, hémorragie après accouchement, carminatif et stimulant, astringent dans le prurit du scrotum, la pharyngite, dans une lotion pour coup de soleil, élimine calculs rénaux.	Goetz, 2014
Espagne	Fruits	Jus avec le miel et l'oignon	Dysphonia.	Gonzalez et al. 2010
	Fruits	--	Morsures d'animaux venimeux.	Arias et al. 2003
Maroc	Fruits	Jus mélangé au miel	Employé contre les angines et les maladies rénales.	El Azzouzi et Zidane, 2015
	Fruits	--	Appliquées sur les tempes contre les céphalées.	Doukkali et al. 2015
	Feuilles	Infusion	Traitement de l'anxiété.	

CHAPITRE II : GÉNÉRALITÉS SUR LES HUILES ESSENTIELLES

II-1- Définitions

Le terme "huile essentielle" a été utilisé pour la première fois au 16^{ème} siècle, il provient de «*Quinta essentia*», un nom donné à la composante efficace d'un médicament par le pionnier médical Suisse Paracelsus von Hobenheim. Cependant, Le terme « huile » souligne le caractère visqueux et hydrophobe de ces substances et le terme « essentielle » désigne le caractère principal typique de la fragrance. Ce sont des composés aromatiques volatils à l'aspect huileux, obtenus à partir des plantes. Par conséquent, ils ont également appelés huiles volatiles (**Hart et al, 2008 ; Burt, 2004**).

D'après **maria et al, 2012**, les huiles essentielles sont des substances naturelle volatiles, elles sont constituées d'un mélange complexe de molécules organiques. Elles sont sécrétées par des plantes aromatiques en tant que des métabolites secondaires.

Selon la définition d'**AFNOR (2000)**, une huile essentielle est un produit obtenu à partir d'une matière végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques, soit par distillation à sec à partir de l'épicarpe des Citrus. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques.

II-2- Répartition et localisation dans la plante :

Les huiles essentielles se rencontrent dans tout le règne végétal cependant, elles sont particulièrement abondantes chez certaines familles : Conifères, Rutacées, Ombellifères, Myrtacées, Labiées (**Kabouche, 2005**). Les huiles essentielles sont synthétisées, stockées et libérées dans l'environnement par diverses structures histologiques spécialisées, épidermiques ou mésophiles. Ces structures sont trouvées dans tous les organes végétaux, surtout les sommités fleuries (Labiées) mais on en trouve dans les racines ou rhizomes (Vétiver), fruits (Poivres), les graines (Muscade), les écorces (Cannelles), le bois (Camphrier), ces structures souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante : cellules à l'huiles essentielles des Zingiberaceae (*Zingiber officinale*) ou des Lauracées (*Camphora officinarium*), poils sécréteurs des Lamiacées (*Mentha spicata*), des poches sécrétrices des Rutacées (*Citrus limon*) ou des Myrtacées (*Eucalyptus leucoxylon*), canaux sécréteurs des Astéracées (*Anthemis tomentosa*) ou des Apiacées (*Daucus carota*) (**Sangwan et al., 2001; Kabouche, 2005**).

Les diverses espèces du genre *Citrus* synthétisent et accumulent, dans des poches schizolysigènes trouvées dans la partie externe d'écorce du fruit (Flavedo). C'est cette localisation particulière qui permet de les récupérer facilement par expression (Bruneton, 1999).

II-3- Rôle dans la plante :

Dans la nature, les huiles essentielles jouent un rôle important dans la protection des plantes en tant que des facteurs antibactériens, antivirus, antifongiques, insecticides et contre les herbivores par la diminution du goût et par les effets défavorables sur le système nerveux. Les huiles essentielles ont également attiré les insectes pour favoriser la pollinisation (María et al, 2012).

Cependant, Akrouf et al, 2011 ont signalé que l'*A. campestris* possède un effet allélochimique due à les huiles essentielles, cette espèce inhibe la germination de certaines espèces qui se pousse autour de lui. De plus l'huile essentielle de feuilles du *C. aurantium* possède un effet inhibiteur contre le développement de certaines espèces testées (Alsaadawi et Alrubeaa, 1985).

II-4- Caractéristiques physiques :

Les huiles essentielles sont des substances odorantes volatiles contenues dans les plantes aromatiques. En général, elles sont incolores, mais il en existe certaines colorées. Leur densité est généralement inférieure à celle de l'eau ; Elles ont un indice de réfraction élevé; elles sont douées d'un pouvoir rotatoire. Peu solubles dans l'eau, elles sont solubles dans l'alcool, les huiles fixes et la plupart des solvants organiques. Sensibles à l'altération par l'oxygène atmosphérique et à la lumière. Elles sont volatiles à température ambiante bien que leur point d'ébullition soit relativement haut (150°C–300°C) (Bakkali et al, 2007 ; Shah et Seth, 2010 ; Randrianarivelo, 2010).

II-5- Composition chimique :

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes comprend environ 20 à 60 composés volatiles avec différents concentrations. Elles sont caractérisées par 2 à 3 composés majoritaires avec concentrations élevés (20–70%). Les autres composés présentent comme des traces (María et al, 2012). Selon la méthode d'extraction, ils contiennent une variété de molécules volatiles telles que les terpénoïdes, le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane et composés aliphatiques (Figure I.5) (Bakkali et al, 2008).

II-5-1- Groupe terpénoïdes :

Il s'agit d'une famille de composés largement répandus dans le règne végétal. Selon la définition moderne, les terpénoïdes sont des hydrocarbures d'origine végétale de formule générale $(C_5H_8)_n$. Le terme "terpène" provient du mot terpentine, une substance liquide volatile isolée des pins (Shah et Seth, 2010).

En 1887, Otto Wallach envisageait que les terpènes devaient être construits à partir d'unités isopréniques. Cette hypothèse a été transformée par Ruzicka (1953), en une règle générale qui postule que chaque groupe de terpènes est issu de la condensation " tête-à-queue" d'un nombre variable d'unités isopréniques. Les terpènes sont subdivisés, selon le nombre d'entités isoprène (Figure I.4) qui sont incorporés dans leurs structures, en monoterpènes (C_{10}), sesquiterpènes (C_{15}), diterpènes (C_{20}), sesterpènes (C_{25}), triterpènes (C_{30}) (Kabouche, 2005).

L'hypothèse précédente n'est pas toujours une règle fixe, par exemple les caroténoïdes sont issus de la condensation " queue-à-queue" (Shah et Seth, 2010).

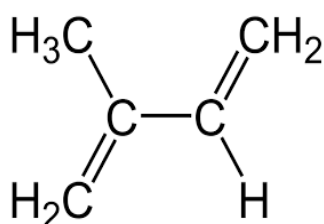


Figure I.4. Structure semi-développée de l'isoprène (C_5H_8).

Ils sont classés selon :

- leurs fonctions : alcools (géraniol), esters (acétate de linalyle), aldéhydes (citral), cétones (menthone, thuyone), éthers-oxydes (cinéole).
- leur structure : linéaire (farnésène) ou cyclique : monocyclique (humulène), bicyclique (cadinène) ou tricyclique (cubébol).

II-5-2- Groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane :

Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane sont beaucoup moins fréquents que les précédents. Les huiles essentielles de certaines espèces contiennent des proportions abondantes de ces composés. Quand ils se produisent, leur nature et leurs propriétés modifient de manière significative la valeur sensorielle de l'huile. Ils comprennent les aldéhydes (cinnamaldéhyde), les alcools (alcool cinnamic), les phénols (chavicol, eugénol), les dérivés méthoxy (anéthole, élémicine, estragole, méthyleugénols) et les composés de méthylène dioxy (apiole, myristicine, safrole) (Sangwan et al., 2001).

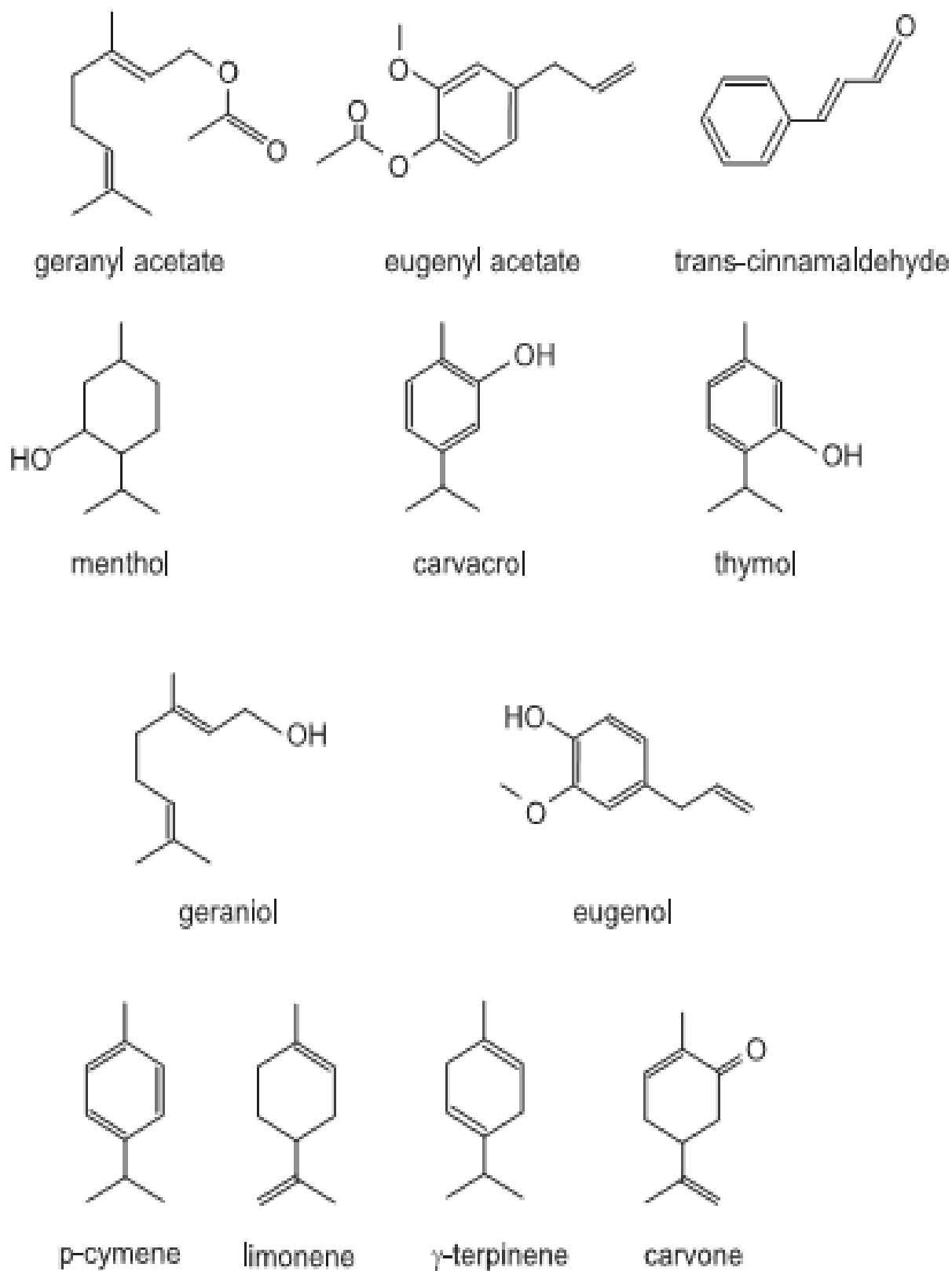


Figure I.5. Structures de quelques constituants des huiles essentielles.

II-6- Facteurs de variabilité :

La qualité et la quantité des constituants présentes dans l'huile essentielle peuvent varier en fonction des conditions climatiques et géographiques, de la composition chimique de sol, de l'organe végétale, de la période de récolte, de la méthode d'extraction, etc. De plus, pour obtenir des huiles essentielles similaires, doivent être faire l'extraction sous les mêmes conditions opératoires, et utiliser un même organe végétale qui pousse dans le même sol, et sous même conditions climatiques, et récolté dans le même saison (**Bakkali et al, 2008**).

D'après **Ennajjar et al., 2010**, la méthode de séchage a un impact sur le composition des huiles. Par ailleurs **Djerrari et Crtuzet, 1990**, ont constaté une variabilité dans la composition en fonction de la durée d'hydrodistillation appliquée. Alors que d'autres auteurs (**Gourine et al., 2010**) ont enregistré des variations selon le sexe de l'espèce botanique.

II-7- Chémotypes :

Plusieurs auteurs ont signalé l'existence des variétés chimiques ou chémotype. Ce dernier indique le composant majoritaire et distinctif présent dans l'huile essentielle. Il permet ainsi de différencier entre les huiles essentielles extraites d'une même espèce végétale mais de composition chimique différente et par conséquent aux propriétés différentes. En effet, deux plantes identiques peuvent produire des huiles plus au moins différentes, selon les conditions de culture. Le chémotype est retrouvé grâce à une analyse chromatographique et spectrométrique identifiant les molécules contenues dans l'huile essentielle. Par exemple, pour l'espèce *Thymus*, l'huile essentielle de *Thymus vulgaris CT thujanol* a des propriétés anti infectieuses avec une action stimulante et régénératrice au niveau hépatique, alors que l'huile essentielle de *Thymus vulgaris CT thymol* est antibactérienne mais hépatotoxique à doses élevées (**Lakhdar, 2015**).

II-8- Utilisations des huiles essentielles :

Actuellement, environ 3000 huiles essentielles sont connues, dont 300 sont commercialisées. Elles sont utilisées dans de nombreux domaines : pharmacies, agro-alimentaire, santé, aromathérapie, parfumerie et cosmétologie, etc. (**Bakkali et al., 2008**).

II-8-1- Parfumerie et cosmétologie :

Les huiles essentielles et certaines leurs constituants sont utilisées dans la parfumerie. Par exemple le D-limonène, le géranyl acetate et le D-carvone sont employées dans les parfums, les crèmes, les savons et les produits de ménages (**Bakkali et al., 2008**). En particulier, les huiles essentielles ont été l'un des ingrédients les plus importants des produits cosmétiques tels que les

parfums et les crèmes de soin de la peau, pour leurs propriétés antimicrobiennes, antioxydantes et anticancérogène (Spadaro et al, 2011).

Par exemple, Munier et al., 2011 ont réalisé une crème cosmétique antirides, vise à lutter contre les signes du vieillissement de la peau. Cette crème a été réalisée à partir d'huile essentielle de citrons, provenant d'Espagne, grâce à ses propriétés antioxydantes.

II-8-2- Pharmacie :

Depuis l'Antiquité, les huiles essentielles sont utilisées en tant que des agents thérapeutiques. Par exemple, les huiles essentielles de lavande et camomille sont employées contre l'insomnie. Les problèmes digestifs sont traités par les huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*, de *Coriandrum sativum* et de *Mentha piperita*. Les douleurs musculaires sont traitées par l'huile essentielle de l'eucalyptus (Wei et Shibamoto, 2007).

Les huiles essentielles sont actuellement utilisées dans des formulations pharmaceutiques pour l'aromatisation les médicaments destinées à la voie orale (Shah et Seth, 2010). Dans l'industrie pharmaceutique, l'huile essentielle de *Citrus lemon* est utilisée pour aromatisée les médicaments et masquée leurs goûts indésirables (Kirbaslar and Kirbaslar, 2004). Certaines de huiles essentielles, pour leur propriété médicinales, sont utilisées en tant que des agents antimicrobiens, analgésiques, sédatives, anti-inflammatoires, spasmolytiques et anesthésiques (Bakkali et al., 2008).

II-8-3- Agroalimentaire :

Les huiles essentielles végétales ont été utilisées à de nombreuses fins, notamment pour aromatiser et colorer les aliments et les boissons (Wei et Shibamoto, 2007). Leur utilisation dépend de la facilité de leur incorporation dans la matrice alimentaire et de leur efficacité à faible dose. Elles ne doivent pas être toxiques et n'entraîner ni coloration, ni odeur, ni saveur indésirables (Himed et Barkat, 2014).

Pour leurs propriétés antimicrobiennes, antioxydantes, anti-carcinogène, etc., elles sont utilisées comme agents naturels de conservation des aliments (Spadaro et al, 2011). À titre d'exemple, Himed et Barkat, 2014 ont indiqué que les margarines à huiles essentielles de *Citrus limon* sont plus résistantes *vis-à-vis* l'oxydation forcée que celle au Tocoblend. De plus Charai et al., 1999 ont signalé que l'addition de l'huile essentielle de Thyme, Oregano et Limon à l'huile d'olive améliorer les caractéristiques organoleptiques et empêche leur oxydation durant le stockage.

II-8-4- Aromathérapie :

Le terme « Aromathérapie » apparaît en 1937 (Kaloustian et al., 2008), et signifie la thérapeutique par les essences végétales ou huiles essentielles (Kabouche, 2005). On utilise des huiles essentielles végétales que l'on emploie par massage, inhalation ou ingestion afin d'obtenir les effets recherchés. Elles exercent un effet harmonisateur sur le plan physique, psychique et mental. L'une des propriétés les plus remarquables des essences est leur pouvoir d'améliorer l'humeur. Par exemple, le Basilic est tout indiqué quand on est surmené ou quand il faut se concentrer. Le Jasmin, l'Ylang-ylang et la rose sont des essences aptes à remonter le moral (Kabouche, 2005).

Khosravi et al, 2014 ont enregistré que l'huile essentielle de *Citrus aurantium* possède une propriété anti-anxiété grâce à ses effets sur le système nerveux centrale. De plus Goetz, 2014 a signalé que le limonène est utilisé en aromathérapie contre l'anxiété. Son époxyde est également anxiolytique.

II-9- Activités biologiques des huiles essentielles :

Les huiles essentielles végétales sont connues depuis longtemps, pour leurs propriétés biologiques. Ils ont été largement utilisées en tant que des bactéricides, virucides, fongicides, antiparasites et insecticides (Bakkali et al, 2008).

II-9-1- Activité antioxydante :

Les radicaux libres sont connus pour être la principale cause de diverses maladies chroniques et dégénératives, y compris le vieillissement, les maladies coronariennes, l'inflammation, les AVC, le diabète sucré et le cancer (Munier et al., 2011). Les antioxydants synthétiques présentent des effets secondaires tels que des dommages au foie et la cancérogenèse. C'est pour cela, on a besoin d'isolement et de caractérisation des antioxydants naturels ayant moins ou pas d'effets secondaires, pour une utilisation dans les aliments ou les médicaments afin de remplacer les antioxydants synthétiques (karoui et Marzouk, 2013).

Himed et Barkat, 2014 ont démontré que les huiles essentielles obtenues à partir du zeste de citron frais, sont des excellents antioxydants naturels. Elles possèdent des capacités de neutralisation de DPPH^{*} puissantes à de faibles doses en les comparant à celle du Tocoblend. Des études réalisées par Aniya et al., 2000 ont suggéré que l'extrait d'*Artemisia campestris* a un effet hépatoprotecteur sur le stress oxydant induit par le tétrachlorure de carbone (CCl₄) chez la souris.

II-9-2- Activité antimicrobienne :

La résistance microbienne aux antibiotiques est devenue une véritable préoccupation. Ce phénomène de résistance aux antibiotiques est général et concerne toutes les espèces microbiennes et ne cesse d'augmenter (Toure, 2015). Des études récentes ont montré que les huiles essentielles et leurs constituants présentent un potentiel important en tant qu'agents antimicrobiens et dans plusieurs domaines industriels et médicaux (Satrani et al, 2007).

Elharas et al., 2013 ont signalé que les huiles essentielles des fleurs de *Lavandula officinalis* et les feuilles de *Laurus nobilis* inhibent la croissance de *Staphylococcus aureus*. Les CMI sont de 200 µL/mL pour le laurier noble et 500 µL/mL pour la Lavande. Des études réalisées par Guerra et al., 2011 suggèrent que les huiles essentielles de *Citrus limon* et *Citrus zeylanicum* peuvent inhiber la croissance des espèces d'*Acinetobacter*.

D'après Hamdani et Allem, 2015 les résultats de l'activité antifongique des huiles essentielles des feuilles de citrus mentionnent le grand pouvoir inhibiteur des huiles essentielles de *Citrus aurantium*, *Citrus limon* et *Citrus reticulata*, sur la croissance mycélienne radiale *Alternaria alternata* et *Penicillium sp.* Les propriétés antifongiques sont liées à la présence des terpènes (D-limonène, β-pinène et citrals) (Millet, 2014).

II-9-3- Propriétés pesticides :

Les huiles essentielles peuvent être utilisées comme une alternative aux insecticides synthétiques pour les programmes de lutte anti-vectorielle. En général, les huiles essentielles de plantes ont été reconnues comme une ressource importante naturel d'insecticides (El-Akhal et al., 2014).

Cependant, Zarrad et al., 2015 ont prouvé que l'huile de zestes de *Citrus aurantium* est un fumigant (anti-acétylcholinestérase) contre les adultes de *B. tabaci*. Ces résultats suggèrent que cette huile peut être un modèle prometteur pour développer de nouveaux insecticides. D'autre part, El-Akhal et al., 2014 ont montré que l'huile essentielle de *Citrus aurantium* et de *Citrus sinensis*, cultivées au centre du Maroc, possède une activité larvicide intéressante contre les larves de moustiques *Culex pipiens* avec des CL50 et des CL90 respectivement égales à (139,48 et 212,04 ppm) et (280,82 et 516 ppm).

II-9-4- Propriétés antihelminthiques :

Le chénopode (*Chenopodium ambrosioides* L.) est connu depuis longtemps en Amérique centrale, pour son action vermifuge. Son huile essentielle est efficace contre les ascaris et les

ankylostomes (**Samate, 2002**). Le D-limonène, avec sa non-toxicité, pourrait devenir un traitement contre la bilharziose (*Schistosoma mansoni*) (**Millet, 2014**).

II-10- Synergie entre les huiles essentielles :

Le terme synergie vient du mot grec « *synergos* » et signifie "*travailler ensemble*" en ce sens que l'effet total du mélange dépasse la somme des effets des composés individuels. L'additivité signifie "*travailler l'un plus l'autre*" en ce sens que l'effet total du mélange n'est que la somme des effets des composés individuels. L'antagonisme signifie "*travailler l'un contre l'autre*" (**Sonam et Guleria, 2017 ; Adolphe Christian, 2012**). Les études de combinaison de substances médicinales sont de plus en plus souvent décrites dans la littérature. Cette stratégie est en effet d'un grand intérêt en raison d'un certain nombre de considérations importantes à savoir. (i) elle augmente l'activité par l'utilisation de composés ayant une activité synergique ou additive ; (ii) diminuant la dose de composé utilisé permet de réduire les éventuels effets secondaires des traitements actuels car différents composants du mélange renforcent ou complètent l'activité des uns et des autres ; (iii) limitant ainsi également de développement des phénomènes de résistances en raison de la présence de multiples composants actifs ayant des structures et des groupes fonctionnels divers et (iv) possède un large spectre d'activité. (**Sonam et Guleria, 2017 ; Toure, 2015**).

Les effets individuels des huiles essentielles végétales sur l'activité antimicrobienne et antioxydante ont été largement rapportés par plusieurs auteurs. Mais leurs effets combinés sur ces activités semblent douteux (**Bag et Chattopadhyay, 2015**).

Les aromathérapeutes croient implicitement à l'effet synergique des mélanges d'huiles essentielles, sans aucune preuve scientifique. Cependant, les études sur l'effet pharmacologique n'ont montré aucune synergie lorsqu'ont été utilisés des mélanges par rapport à l'utilisation d'huiles essentielles seules (**Balchin et Deans, 1998**).

D'après **Bag et Chattopadhyay, 2015**, l'efficacité antibactérienne et antioxydante des huiles essentielles de certaines espèces sélectionnées [feuilles de laurier, poivre noir, coriandre (graine et feuille), cumin, ail, gingembre, moutarde, oignon et curcuma] en combinaison ont montré des interactions synergiques. L'évaluation de différentes combinaisons possibles de ces espèces a montré que seule la combinaison coriandre / graines de cumin produit des interactions synergiques dans les activités antibactériennes et antioxydantes, alors que d'autres combinaisons ont montré des effets additifs.

Cependant, **Misharina et Samusenko, 2008** ont réalisé des études sur les HE de citron, de coriandre, d'ail et de girofle et leurs mélanges sur l'inhibition de l'auto oxydation d'un aldéhyde

(hexanal) à un acide carboxylique (hexanoïque). Le mélange binaire de citron et de coriandre présente une activité antioxydante inférieure à celle des huiles individuelles. Alors que le mélange tertiaire de citron, d'ail et de coriandre montre une activité antioxydante supérieure à celle des huiles individuelles.

De plus, des résultats obtenus avec un mélange à base de 41 huiles essentielles en pulvérisation destiné à l'assainissement de l'air testé montrent un intérêt majeur dans l'utilisation de ce mélange en prévention des contaminations microbiennes et l'assainissement microbiologique de l'air (Aouni et al, 2013). D'autre part, les résultats obtenus par Barbosa et al, (2016) ont révélé une interaction synergique entre *Origanum vulgare* et *Rosmarinus officinalis*, la combinaison de ces huiles essentielles a révélé une action inhibitrice forte contre des microorganismes pathogènes (*L. monocytogenes*, *E. coli* et *S. Enteritidis*).

CHAPITRE III : MÉTHODES D'EXTRACTION ET D'ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES

III-1- Méthodes d'extraction :

Les techniques d'extractions des huiles essentielles, de plantes aromatiques, sont connues de puis l'Antiquité. De nos jours, différentes méthodes utilisées pour obtenir des essences végétales (**Shah et Seth, 2010**). Les critères de sélection d'une méthode d'extraction de composés d'arômes doivent tenir compte de la volatilité, du point d'ébullition, de la polarité et de la stabilité des constituants. La concentration, le type d'analyse et la distribution des composés volatiles dans le produit sont également des facteurs dont il faut tenir compte (**Djerrari et Crtuzet, 1990**).

III-1-1- Hydrodistillation :

Cette méthode, très simple et primitive, a été longtemps utilisée. C'est une technique d'extraction dans laquelle le solvant est l'eau, et la plante est broyée et immergée dans l'eau. Le principe consiste à porter à ébullition dans un ballon un mélange d'eau et de plante dont on souhaite extraire l'huile essentielle. Les cellules végétales éclatent et libèrent les molécules odorantes, lesquelles sont alors entraînées par les vapeurs d'eau créée. Elles passent par un réfrigérant à eau où elles sont condensées, puis sont récupérées dans un récipient (**Toninoli et Meglioli, 2013 ; Samate, 2002**).

III-1-2- Distillation à la vapeur d'eau :

Avec cette méthode les végétaux sont mis dans un récipient placé dans l'alambic. Sans entrer direct avec l'eau, ils sont traversés par la vapeur qui provient d'une eau située en dessous. Cette vapeur ainsi chargée en fines gouttelettes d'huile essentielle passe par un réfrigérant à eau où elles sont condensées, puis sont récupérées par un système de sur verse (**Toninoli et Meglioli, 2013**).

III-1-3- Hydro-diffusion :

Lors de cette technique, la vapeur arrive aux plantes du haut vers le bas. La condensation du mélange de vapeur contenant l'huile se produit sous la grille retenant la matière végétale. Les avantages de cette méthode : une huile essentielle de très haute qualité, moins de vapeur, un temps d'extraction plus court, un meilleur rendement en huile (**Toninoli et Meglioli, 2013**).

III-1-4- Expression à froid :

L'expression à froid est la méthode la plus simple mais aussi le plus limité. Cette technique d'extraction est employée pour obtenir des huiles essentielles d'agrumes (le citron, l'orange et la

mandarine) contenues dans les zestes. Cette technique est basée sur la rupture des parois des sacs oléifères. L'essence obtenue est ensuite entraînée par un courant d'eau froide. Une émulsion constituée d'eau et d'essence se forme, l'essence est alors séparée par décantation (Kehal, 2013 ; Bousbia, 2011).

III-1-5- Enfleurage :

C'est une méthode que l'on utilisait beaucoup dans l'Antiquité. Cette antique technique fut très employée en parfumerie, mais à cause de sa lenteur elle a aujourd'hui presque disparu. En générale, elle était utilisée pour extraire l'huile essentielle de fleurs très délicates qui ne peuvent pas supporter les températures élevées. Elle se fait au moyen de graisses ou d'huiles. Il existe deux méthodes d'enfleurage, l'enfleurage à froid et l'enfleurage à chaud (Toninoli et Meglioli, 2013).

III-1-6- Extraction par solvants :

Cette technique consiste à dissoudre la substance contenant l'huile essentielle dans un solvant chimique comme l'hexane, l'alcool, l'éther de pétrole, etc. elle se fait en trois étapes : macération et filtration, évaporation et purification (Toninoli et Meglioli, 2013).

III-1-7- Extraction au dioxyde de carbone supercritique :

Est une méthode très moderne qui n'est pas très développée car elle est très coûteuse. Le solvant utilisé est le CO₂ en phase supercritique. Dans cet état, le CO₂ n'est ni liquide, ni gazeux, ce qui lui confère un excellent pouvoir d'extraction. Lors de cette méthode, la plante est introduite dans l'extracteur. Le CO₂ arrive vers l'extracteur après avoir été comprimé sous plusieurs dizaines de bars et chauffé de 30 à 40°C. Le liquide présent dans l'extracteur se charge en composé extrait puis est détendu. Le CO₂ retrouve alors une forme de gaz qui lui permet de se séparer de l'extrait qui est récupéré par décantation. Les huiles essentielles obtenues avec ce système sont de très bonne qualité, mais beaucoup plus chères (Toninoli et Meglioli, 2013).

III-1-8- Extraction par micro-ondes :

Une nouvelle méthode récemment développée et rapportée par plusieurs auteurs. Elle permet d'extraire les huiles essentielles en un temps court et avec un rendement relativement élevé. Ce procédé, très rapide est consommant peu d'énergie et d'eau, consiste à chauffer la plante par une micro-onde, dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle. Les huiles essentielles sont entraînées par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés (Hellal, 2011).

III-2- Méthodes d'analyse des huiles essentielles :

III-2-1- Analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG) :

III-2-1-1- Principe de la chromatographie en phase gazeuse :

C'est la technique la plus utilisée pour les huiles essentielles. Elle permet à la fois une analyse qualitative et quantitative, et le calcul de leurs indices de rétention. Le principe est basé sur la séparation des différents solutés gazeux par migration différentielle le long de la phase stationnaire liquide imprégnée sur un support solide inerte (colonne de chromatographie). La phase mobile est un gaz (Hélium, Azote, Argon ou Hydrogène), appelé gaz vecteur. L'appareil de CPG comprend les parties suivantes (Figure I.6) (Samate, 2002 ; Lakhdar, 2015) :

- Une bouteille de gaz vecteur A ;
- Un dispositif de régulateur de débit R pour suivre la pression ;
- Un système d'introduction d'échantillon B ;
- Une colonne capillaire C ;
- Un détecteur D en relation avec un enregistreur E.

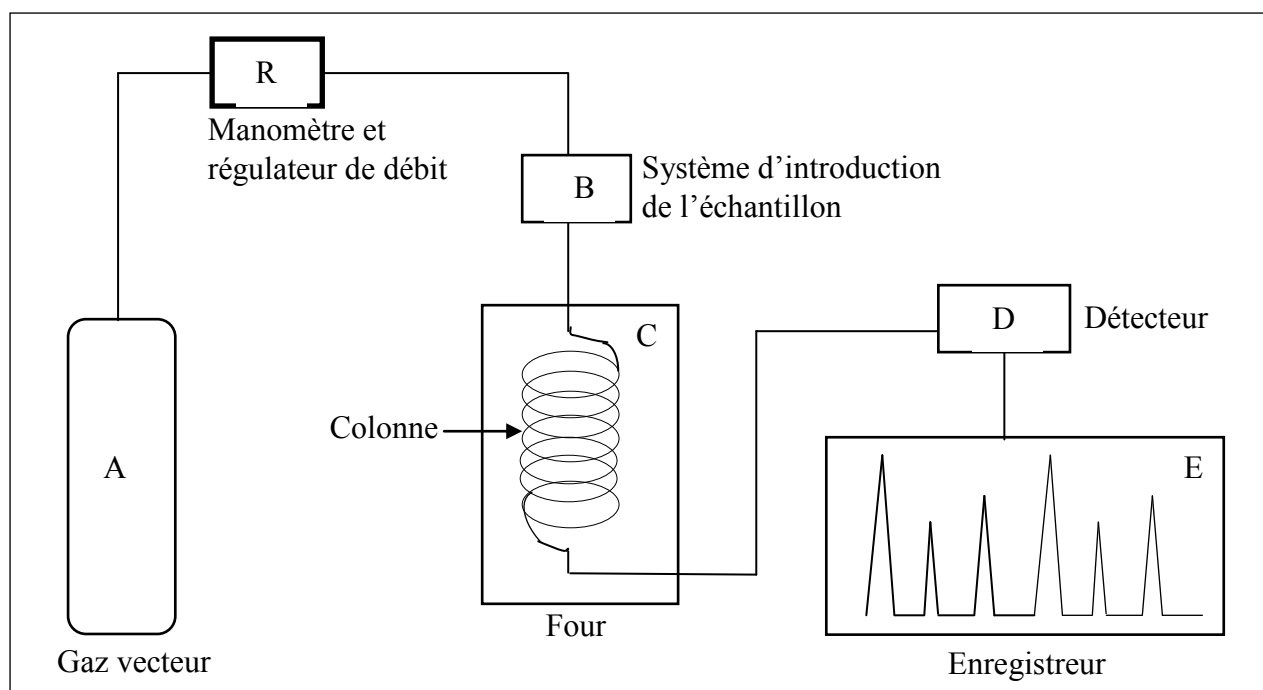


Figure I.6. Schéma simplifié de configuration d'un appareil CPG.

III-2-1-2- Identification préliminaire par les indices de rétention (Indices de Kovats) :

Le système d'indice est suggéré par Kovats à 1958, mais il est développé plus tard à un système d'indice linéaire pour les conditions de la température programmée (Babushok et al, 2007). En général, la technique des IK est largement employée pour identifier les constituants

habituels des HE, mais elle est insuffisante pour déterminer la composition chimique totale. Des tables d'IK spécifiques à chaque produit sont proposées dans la littérature. Elles ont été élaborées en utilisant des analyses sur différents types de colonnes. Ces indices de références sont comparés à ceux calculés à partir de nos échantillons (**Ghanmi et al, 2010**). Les indices de Kovats vont permettre de normaliser les produits élués pour un type de colonne donnée. Chaque produit va être associé à un indice de rétention déterminé au préalable par un étalonnage avec des alcanes linéaires de formule C_nH_{2n+2} . On peut ainsi transformer la série des valeurs de temps de rétention (tr) en une série de valeurs d'indice de rétention. La conversion s'effectue par l'utilisation de deux formules, l'une (1) en isotherme (définies par Kovats en 1958), l'autre (2) pour le mode de programmation de température (Indice de Rétention linéaire) (**Babushok et al, 2007**).

$$IK = 100n + 100 \left(\frac{\log tr(x) - \log tr(n)}{\log tr(n+1) - \log tr(n)} \right) \dots (1)$$

$$IRL = 100n + 100 \left(\frac{tr(x) - tr(n)}{tr(n+1) - tr(n)} \right) \dots (2)$$

L'indice de rétention ou l'IK d'un composé « A » est indépendant du débit, de la longueur de la colonne et de la quantité injectée (dans une certaine limite). L'indice de rétention d'un composé « A » dépend de la phase stationnaire et de la température (**Ghanmi et al, 2010**).

III-2-2- Identification par couplage chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse (CG/SM) :

En général, la technique des IK est largement employée pour identifier les composés habituels des HE, mais elle est insuffisante pour déterminer la composition chimique totale (**Ghanmi et al, 2010**). L'identification est confirmée par la technique de couplage CG/SM. La technique consiste à injecter une solution d'huile essentielle dans une colonne, chaque soluté passe dans la source d'ionisation du spectromètre où les molécules sont bombardées par un faisceau électronique qui provoque leur ionisation positive. Les fragments chargés sont séparés selon leur masse et détectés en proportion de leur nombre. Ils fournissent des informations sur la nature et la structure de la molécule qui les a produits. Dans le spectre d'une substance pure, l'ion moléculaire, s'il est présent, sera le dernier du spectre, suivi toutefois des pics correspondants à la présence des isotopes, et donnera la masse moléculaire de la substance (**Samate, 2002**).

III-3- Conservation des huiles essentielles :

La plupart des molécules constitutives des huiles essentielles sont insaturées, ce qui les rend instables et sensibles à l'altération par l'oxygène atmosphérique, la lumière et l'humidité, ce qui provoque un changement dans les propriétés organoleptiques. Selon les conditions du stockage, les essences peuvent être sujettes à des réactions secondaires telles que: l'oxydation, le réarrangement moléculaire, la fermentation, l'hydrolyse, la polymérisation, etc. On peut limiter ces dégradations en prenant certaines précautions ([Samate, 2002](#) ; [Shah et Seth, 2010](#)) :

- l'utilisation des flacons de faible volume en verre brun, en acier inoxydable ou en aluminium entièrement remplis et fermés de façon étanche ;
- la conservation à basse température sous atmosphère d'azote ;
- l'adjonction d'antioxydants, etc.

**DEUXIÈME PARTIE :
MATÉRIEL ET MÉTHODES**

I- Méthodologie générale du travail expérimental :

Les différentes étapes de réalisation de la présente partie expérimentale sont résumées dans l'organigramme de la figure II.1.

II- Matériel :

II-1- Appareillage :

On donne ci-après la liste des principaux dispositifs et appareils utilisés lors de la réalisation de ce mémoire.

- Hydrodistillateur de type Clevenger ;
- Spectrophotomètre de type UV-Vis (de marque Shimadzu 1601) ;
- Chromatographe en phase gazeuse (de marque Skyray Instruments GC-5400), muni d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) ;
- Étuve bactériologique à 37°C.

II-2- Solvants et réactifs chimiques :

Tous les réactifs chimiques, ainsi que les solvants utilisés sont de grade analytique élevé :

- Acétone (Sigma-Aldrich) ;
- DPPH' « 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl » (Sigma-Aldrich) ;
- BHA « hydroxyanisole butylé » (Sigma-Aldrich) et vitamine C (Sigma-Aldrich) (antioxydants de références synthétiques) : ont été utilisés pour des motifs de comparaison lors de la détermination de l'activité antioxydante ;
- Éthanol (Sigma-Aldrich) : a été utilisé comme solvant des huiles essentielles lors la détermination de l'activité antioxydante ;
- DMSO « diméthylsulfoxyde » (Biochim) : a été utilisé comme solvant des HES lors la détermination l'activité antimicrobienne ;
- Sulfate de sodium anhydre (Sigma-Aldrich) : a été utilisé pour séché l'huile essentielle ;
- THF « Tétrahydrofurane » (Sigma-Aldrich) : a été comme solvant de dilution des HES lors de l'injection dans l'appareil CPG.

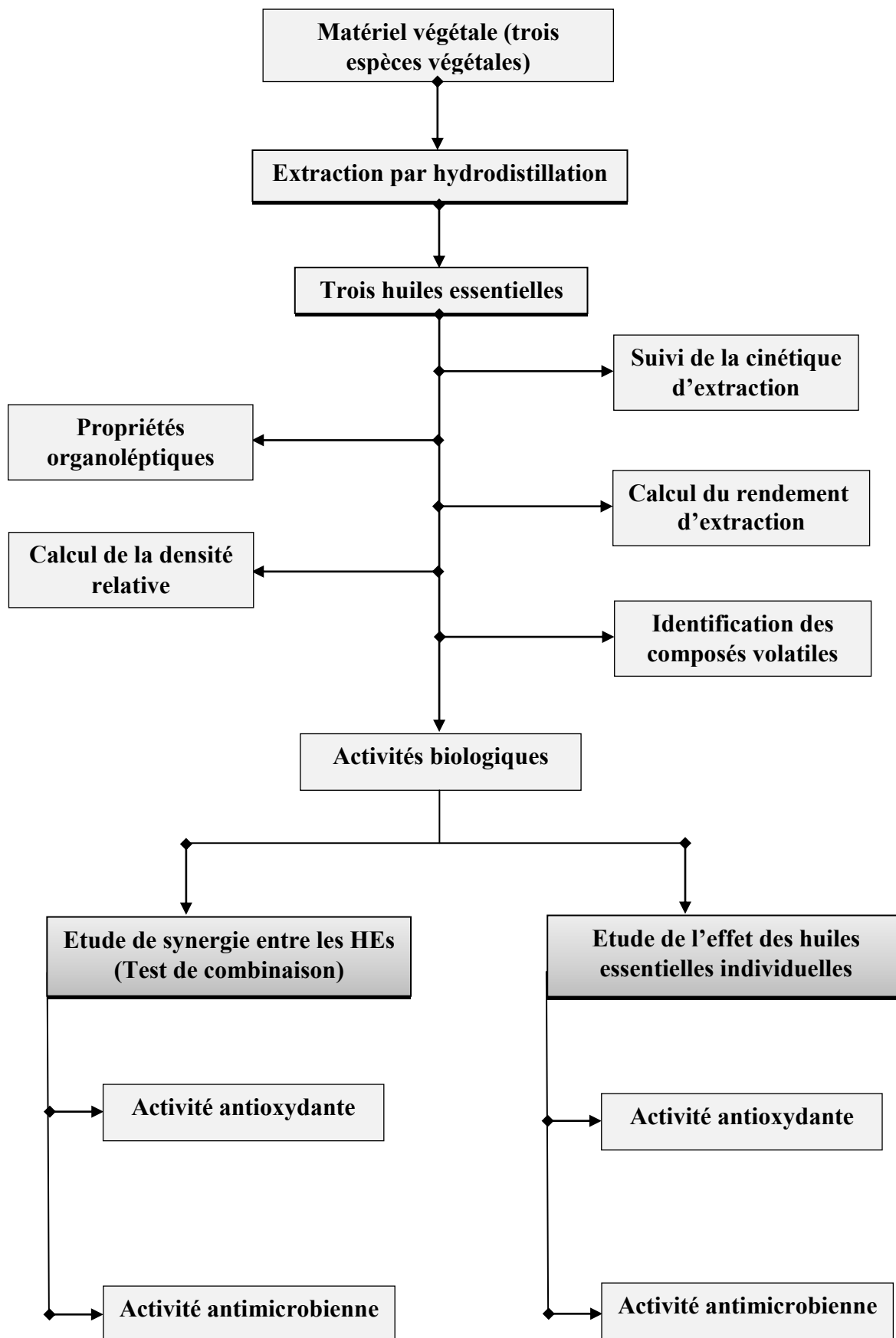


Figure II.1 Organigramme de la méthodologie de l'étude.

II-3-Matériel végétal :

Afin de réaliser le présent travail, trois plantes médicinales ont été choisies à savoir : *Artemisia campestris*, *Citrus limon* et *Citrus aurantium*. Pour l'*A. campestris* cinq différents sites de collectes ont été adoptés (Tableau II.1). Ces différents sites représentent les principales zones steppiques et nord saharienne de la distribution de cette espèce. Le choix de ces plante été basé sur leur large utilisation en médecine traditionnelle locale.

Tableau II.1 Régions et dates de récolte des trois plantes étudiées.

Nom scientifique	Nom commun	Culture	Partie	Date de récolte	Région
<i>Artemisia campestris</i>	Armoise rouge	Sauvage	Partie aérienne	Novembre 2016	Milok (Laghouat)
					Aflou (Laghouat)
					Charef (Djelfa)
					Sidi Bouzid (Djelfa)
					Route d'Alger (Djelfa)
<i>Citrus limon</i>	Oranger amer	Cultivée	Zeste	Février 2017	Laghouat
<i>Citrus aurantium</i>	Citron	Cultivée	Zeste	Février 2017	Laghouat

Juste après leur collecte, les parties aériennes de la plante *A. campestris* ont été séchées au laboratoire de recherche en Sciences Fondamentales (LSF), université de Laghouat, et ceci à l'abri de la lumière et de l'humidité pendant 7 à 10 jours. Alors, que les écorces de fruit (zestes) des Citrus, elles ont été extraites aussitôt de leur collection (à leur état frais c-à-d sans conservation et sans séchage).

II-4- Microorganismes testés :

Les microorganismes cités ci-après sont choisis pour leurs fréquences élevées à contaminer les denrées alimentaires et pour leur pathogénicité (Tableau II.2) :

Tableau II.2 Souches et leurs origines utilisées dans les différents tests d'activité antimicrobienne.

<i>Bactéries</i>	Gram	Code	Origine
<i>Escherichia coli</i>	Négatif	ATCC 8739	MNHN
<i>Staphylococcus aureus</i>		ATCC 6538	MNHN
<i>Listeria monocytogenes</i>	Positif	ATCC 19111	LAPRONA
<i>Bacillus cereus</i>		ATCC 25921	LAPRONA
<i>Micrococcus luteus</i>		ATCC 9341	MNHN

MNHN : Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris) ; **LAPRONA** : Laboratoire des Produits Naturels (Université de Tlemcen).

II-5- Milieux de culture :

Il existe une grande variété de milieux de culture en rapport avec la diversité des exigences nutritives des micro-organismes. Dans notre étude les milieux utilisés sont :

- Milieu de Mueller- Hinton (MH) pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux différents extraits ;
- Bouillon nutritif ;
- Eau physiologique (NaCl 0,9 g/L).

De plus, tout ce qui est nécessaire (cuves, disques à papiers, pipettes, micropipettes, boites de Pétri, bec benzènes, etc.) pour les tests bactériologiques ont été utilisés pour la détermination de l'activité antimicrobienne.

II-6- Antibiotiques :

Les disques d'antibiotiques utilisés pour les essais de diffusion sont :

- Streptomycine (S) ;
- Gentamicine (GM).

III- Méthodes :

III-1- Extraction des huiles essentielles :

L'obtention des HEs a été effectuée par hydrodistillation en utilisant un appareil de type Clevenger. Avant l'emploi, l'appareil a été nettoyé avec l'acétone puis rincé à l'eau distillée afin d'éliminer les poussières et les graisses probablement présentes dans l'appareil pour d'éviter toute contamination de l'huile au cours de l'extraction (Figure II.1).

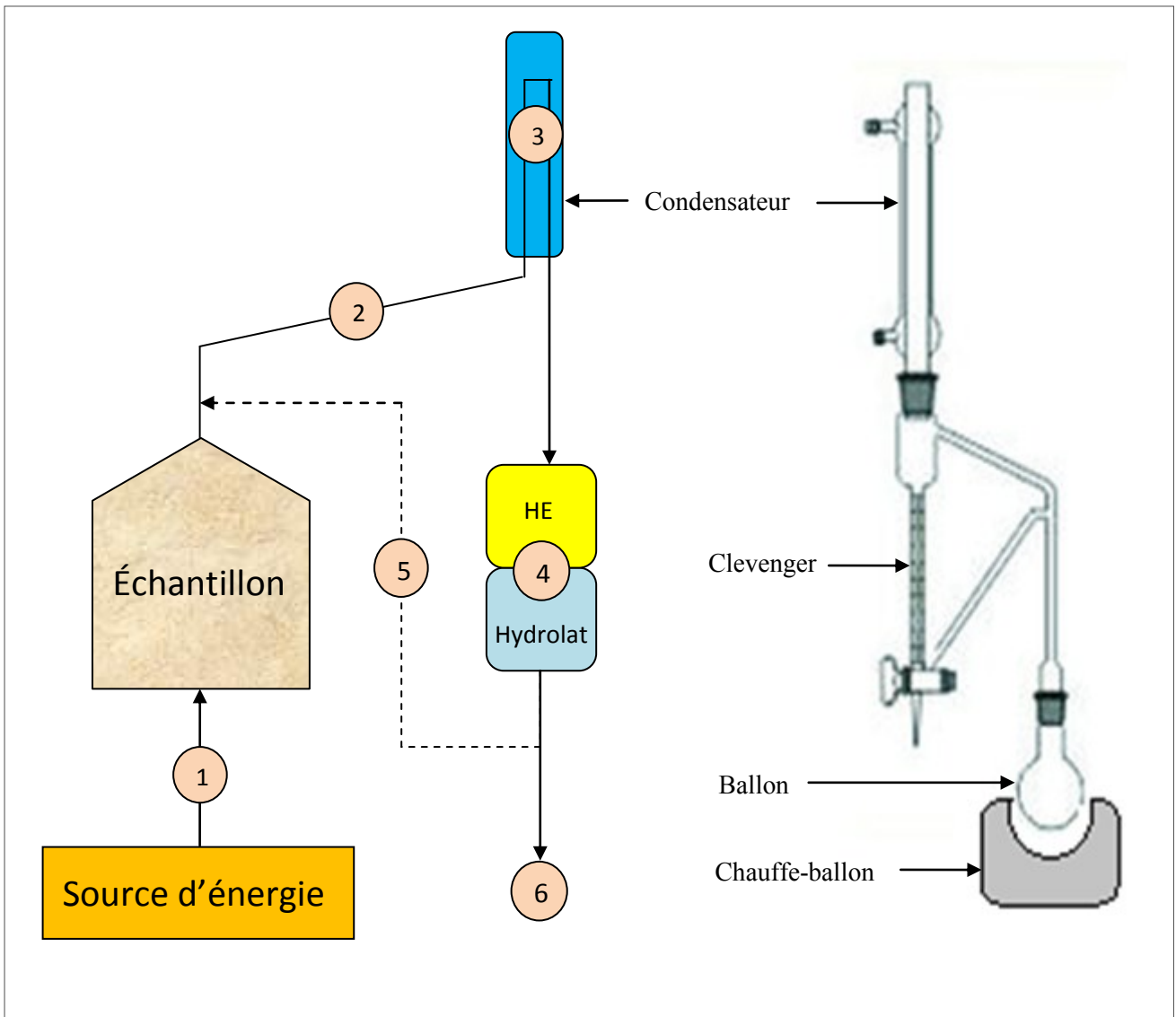


Figure II.2 Schéma du montage d'hydrodistillation.

1 : Chauffage, 2 : Évaporation, 3 : Condensation, 4 : Séparation physique des phases « HE/eau », 5 : Reflux d'eau, 6 : Récupération des huiles essentielles.

III-1-1- Principe de l'hydrodistillation :

L'hydrodistillation est une méthode d'extraction dans laquelle le solvant est l'eau. Le principe consiste à porter à ébullition, dans un ballon, une plante immergée dans l'eau. Les cellules végétales s'éclatent et libèrent les molécules volatiles, lesquelles sont alors entraînées par la vapeur d'eau formée. Elles passent par une surface froide où elles sont condensées, refroidies, puis sont récupérées par décantation. Le point faible de ce procédé c'est que les plantes restent continuellement en contact avec l'eau, ce qui peut les altérer car cela apporte de l'hydrolyse et par conséquent change la composition de l'huile obtenue ([Toninoli et Meglioli, 2013](#) ; [Samate, 2002](#)).

III-1-2- Démarches expérimentales de l'obtention des huiles essentielles par hydrodistillation :

Une quantité de 100 g de matériel végétal, trié et nettoyé, est introduite dans un ballon à un seul col de 2 litres rempli d'eau distillée jusqu'aux deux tiers de sa capacité ; cet ensemble est porté à ébullition pendant une durée déterminée après le suivi de la cinétique d'extraction ([kehal, 2013](#)).

La vapeur chargée des composées volatiles arrive dans le réfrigérant où elles sont condensées, refroidies, puis décantées. Par la suite, l'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse (hydrolat) par sa différence de densité et de couleur. Elle est ensuite séchée par ajout de petites quantités de sulfate de sodium anhydre ([Bousbia, 2011](#)).

L'huile obtenue est conservée à l'obscurité dans un réfrigérateur à une température de +4°C, dans des flacons en verre bien fermés et emballés avec du papier aluminium à l'abri de la lumière, jusqu'à son usage pour les tests chimiques et biologiques.

III-1-3- Cinétique de l'extraction :

D'après [kehal, 2013](#), le but d'entreprendre une cinétique d'extraction, est de déterminer la durée nécessaire pour extraire le maximum d'huile et d'éviter les pertes du temps et d'énergie. Le suivi de cette cinétique consiste à mesurer le rendement des HEs en fonction du temps écoulé. Dans notre cas le rendement a été mesuré pendant des intervalles de temps réguliers (voir résultats et discussion) dès la formation de la première goutte du distillat.

III-1-4- Rendement en huile essentielle :

Selon [Sadou et al., 2015](#), le rendement en huile essentielle est estimé par le rapport entre le volume d'huile essentielle (en millilitre) et la masse de la matière végétale utilisée, évaluée à partir de plusieurs échantillons de 100 g. Il est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$Rdt(\%) = \frac{V}{M} \times 100$$

Avec :

- Rdt (% « vol/m ») : rendement en HE (ml/g) ;
- V : volume moyenne d'HE recueilli ;
- M : masse moyenne de matériel végétale.

III-1-5- Propriétés organoleptiques :

Les différentes caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) des HES d'*A. campestris*, *C. limon* et *C. aurantium* ont été notées.

III-1-6- Détermination de la densité :

La densité d'une huile essentielle est un paramètre très intéressant pour évaluer la qualité de l'huile dans le domaine pharmaceutique, cosmétique, chimique et agroalimentaire, etc. Grâce à ce paramètre, on peut identifier la nature du produit et détecter les tentatives de fraudes et d'altération. D'après [Munier et al, 2011](#), la densité d'un fluide (huile essentielle) est par définition le rapport entre la masse d'un volume du fluide et celle d'un même volume d'eau distillée. Les deux masses sont mesurées par la méthode de pesée à la même température (20°C), cette densité est symbolisée par : d

La densité est donnée par la formule : $d = \frac{m1}{m2}$

Avec :

- $m1$ est la masse moyenne en (g) de l'huile essentielle ;
- $m2$ est la masse moyenne en (g) de l'eau distillée.

III-2- Analyses des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse CPG :

Les analyses chromatographiques des composés volatils ont été effectuées, au Laboratoire de recherche (LSF) à l'université de Laghouat, à l'aide d'un appareil de la chromatographie en phase gazeuse de type Skyray instruments (GC-5400) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et une colonne capillaire (apolaire) en silice fondue de type DB-5 (30 m × 0,32 mm, épaisseur du film de 0,10 µm).

Le gaz vecteur utilisé été l'hydrogène avec un débit de 1 mL/min. La température de la colonne été programmée à raison d'une montée de 5 °C/min de 50 °C à 250 °C. La température de l'injecteur et celui du détecteur ont été fixée à 250°C à 280°C, respectivement. Les solutions à injectées des HEs ont été préparées, en dissolvant 10µL de chaque HE dans 1 mL du solvant organique volatile THF (Tétrahydrofurane). Le volume injecté été de 0,2 µL. Dans les mêmes conditions opératoires, un même volume de 0,2 µL d'une série homologue de *n*-alcanes (C₈-C₂₀ dans le n-C₆) a été injecté.

III-3- Identification des composés volatils :

L'identification des constituants présents dans l'huile essentielle a été réalisée par comparaison de leurs indices de rétention linéaire (IRL) avec ceux des composés standards de la banque de données informatisée (NIST), et avec les données de la littérature.

Les IRL sont les données de rétention les plus utiles dans la pratique et les plus valables. On les calcule à partir des temps de rétention lorsque l'on connaît toutes les conditions opératoires **(Kaiser, 1970)**.

Le système d'indice compare la rétention d'un produit quelconque à celle d'un alcane linéaire. Ce système est applicable en CPG à tout composé sur toute colonne. Les IRL sont déterminés en injectant un mélange des alcanes de C₈ à C₂₀ dans les mêmes conditions opératoires **(Ghanmi et al, 2010)**. On peut ainsi transformer toute la série des valeurs (tr) en une série de valeurs d'indice de rétention. La conversion s'effectue par l'utilisation de formules **(Babushok et al, 2007) :**

$$IRL = 100n + 100 \left(\frac{tr(x) - tr(n)}{tr(n+1) - tr(n)} \right) ; \text{Condition: } tr(n) < tr(x) < tr(n+1).$$

Avec :

- IRL : indice de rétention linéaire ;
- n : nombre d'atome de carbone ;
- tr (n) et tr (n+1) : temps de rétention des alcanes linéaires à n et à n + 1;
- tr (x) : temps de rétention de composé (x).

III-4-Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles seules :

III-4-1- Activité antioxydante :

Une méthode a été choisie pour leur facilité de mise en œuvre et leur fiabilité pour l'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles. Il s'agit de test du DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl).

Nous avons évalué l'activité antioxydante des HEs des différentes espèces végétales (*A. campestris*, *C. limon*, *C. aurantium*) et également des standards (BHA, Vitamine C) par la détermination de l'IC₅₀ de chaque huile essentielle.

III-4-1-1- Principe du test DPPH :

Cette méthode reste largement utilisée pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de plantes végétales. Le DPPH est un radical libre stable, il présente une maximum absorbance caractéristique à $\lambda = 517$ nm avec couleur violet foncé ([Gourine et al. 2010](#)). La présence d'un composé antioxydant provoque un changement de couleur de la solution initiale, du violet foncé au jaune suite à la réduction du DPPH[•] en DPPH-H (diphényl-picrylhydrazine) (Figure II.2). L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons. On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation :

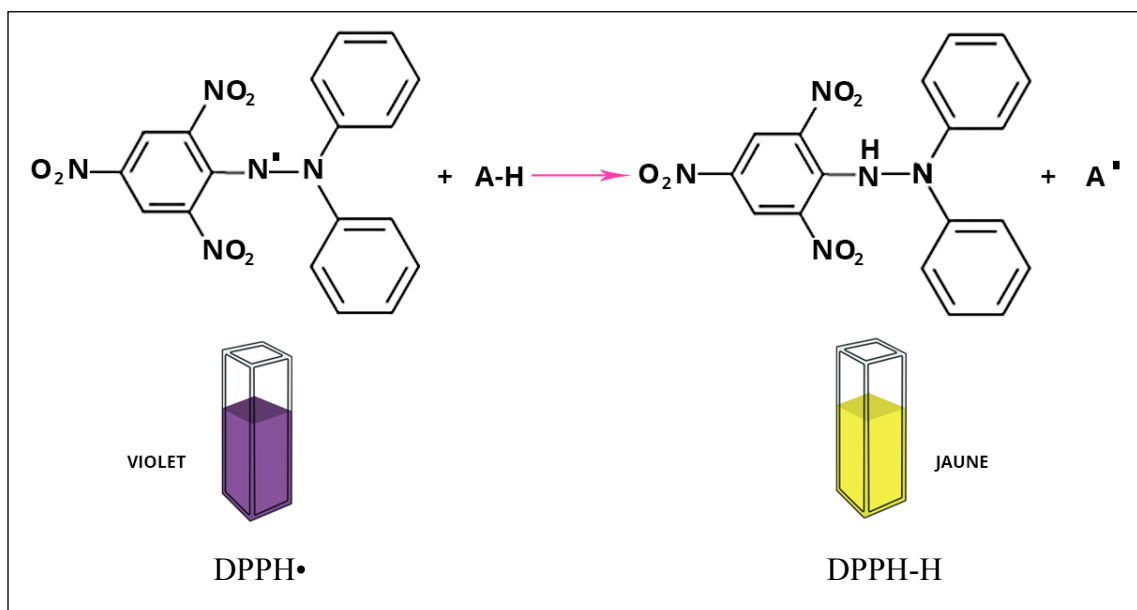


Figure II.3 Réaction d'un antioxydant avec le radical libre DPPH.

Où:

(A-H) représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphenyle picryl hydrazine (jaune).

NB : l'évaluation doit être interprétée avec précaution du fait que l'absorbance du DPPH• à 517 nm diminue sous l'action de l'oxygène, de la lumière, en fonction du pH et le type du solvant ajouté à l'antioxydant (Popovici et al, 2009).

III-4-1-2- Protocol expérimental :

La méthode du DPPH est proposée par Gourine et al, 2010 et Nazik et al, 2011 avec quelques modifications (Figure II.3).

La solution de DPPH est préparée à l'avance, en dissolvant 4 mg de la poudre de DPPH dans 100 ml d'éthanol ($\geq 99,8\%$) pour obtenir une concentration initiale en ce radical égal à 100 μ M. Les échantillons des huiles essentielles ont été initialement préparés par dilution dans l'éthanol pour obtenir des solutions mères ($C = [HE]/\text{facteur de dilution}$). À partir de cette solution mère, on prépare une gamme des concentrations filles de la manière suivante : on prend plusieurs volumes : 20 μ L, 40 μ L, 60 μ L, 80 μ L, 100 μ L de cette solution mère, puis on les complètent (dilution) jusqu'au 100 μ L par ajout d'éthanol. Par la suite, chaque solution fille (volume total de 100 μ L) est mélangée avec 1mL de la solution éthanolique de DPPH.

L'absorbance est mesurée avec un spectrophotomètre à 517 nm contre blanc après 30 minutes d'incubation à la température ambiante et à l'obscurité. Les antioxydants de références (contrôle positifs : BHA et vitamine C) sont aussi préparé selon la même méthode. L'activité antioxydant est estimée en pourcentage d'inhibition ($I\%$) comme suivant :

$$I\% = \left(1 - \frac{A_{test}}{A_{blanc}}\right) \times 100$$

Avec :

- $I\%$ est le pourcentage d'inhibition ;
- A_{blanc} est l'absorbance du control (contenant tous les réactifs sans l'échantillon testé) ;
- A_{test} est l'absorbance de l'échantillon testé.

Le IC_{50} (autrement appelée EC_{50} , concentration correspondant à 50% d'inhibition et qui constitue l'activité antioxydante de l'huile essentielle) a été déterminé par le graphique de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'huile essentielle (Figure II.4). Cette valeur est comparée à celle trouvée pour le composé de référence (BHA ou vitamine C).

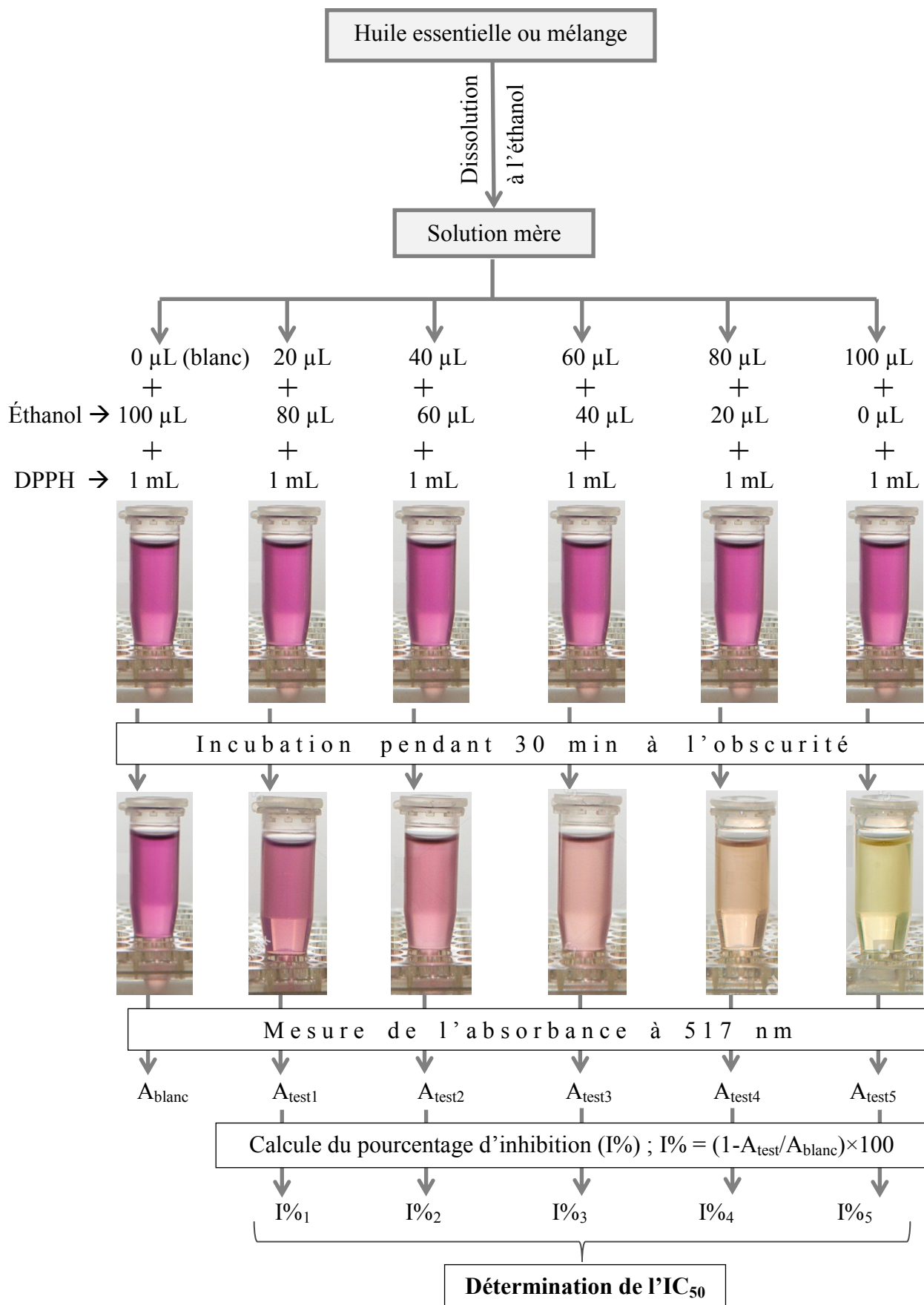


Figure II.4 Schéma illustrant le protocole opératoire de l'activité antioxydante par test du DPPH.

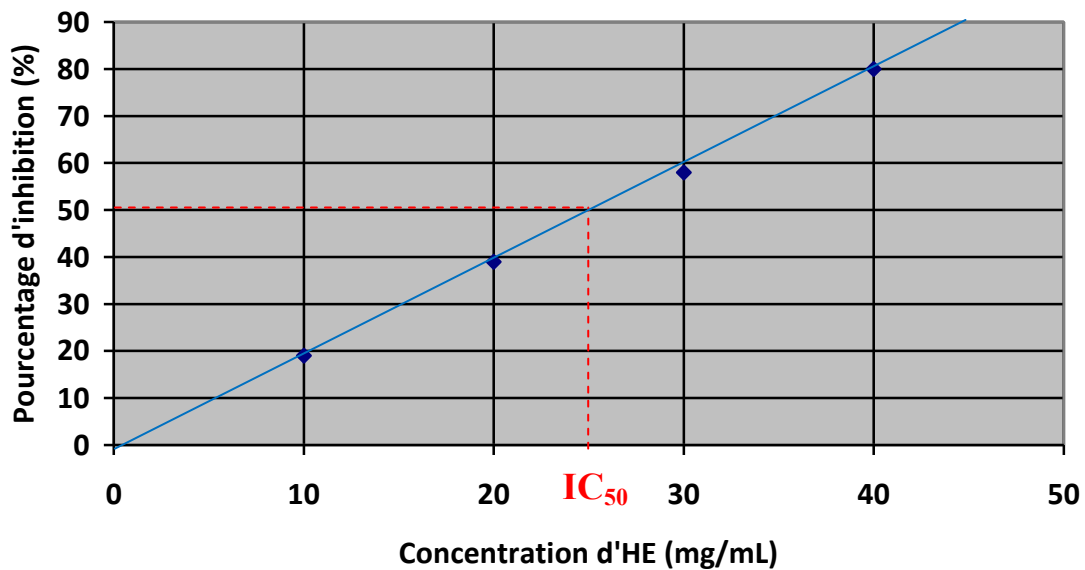


Figure II.5 Détermination graphique de l'IC₅₀.

III-4-2- Activité antimicrobienne :

L'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles a été réalisée au laboratoire pédagogique de département de Biologie à l'université de Laghouat. Le test a été réalisé par la méthode de diffusion sur milieu gélosé ou aromatoگرامme.

Nous avons testés les HEs des différentes espèces végétales (*A. campestris*, *C. limon*, *C. aurantium*) vis-à-vis des souches bactériennes.

Trois concentrations d'huile essentielle ont été testées, l'extrait naturel brut (100%) ainsi que deux dilutions : (50%) et (20%). Ces huiles ont été diluées dans le DMSO (Diméthyle sulfoxide).

III-4-2-1- Méthode de diffusion de disques :

L'aromatoگرامme (Figure II.5) est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien des huiles essentielles. Elle est une méthode inspirée de l'antibiogramme. C'est l'équivalent d'un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par les huiles essentielles (Kaloustian et al., 2008). Elle consiste à utiliser des disques de papier imprégnés d'un produit à base d'huile essentielle. Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. L'huile essentielle diffuse à partir du disque au sein de la gélose et provoque une zone d'inhibition autour des disques. Les bactéries croissent sur toute la

surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'huile essentielle suffisante pour inhiber leur croissance. Plus le diamètre de zone d'inhibition est grand, plus la souche est sensible à l'huile essentielle. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante (Fauchère et Avril, 2002 ; De Billerbeck, 2007).

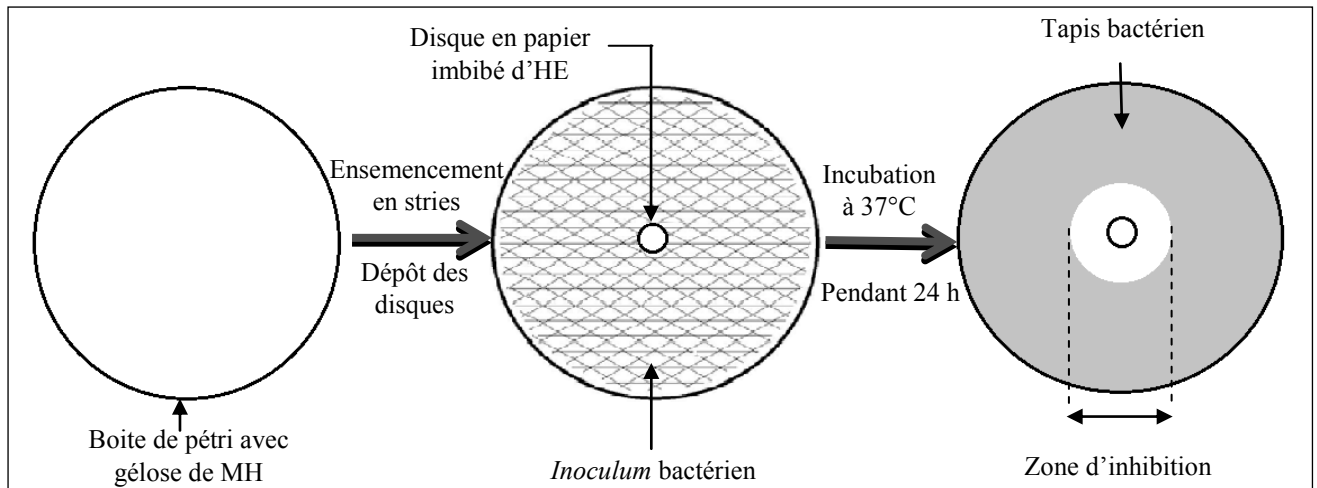


Figure II.6 Schéma de principe de la méthode de diffusion par disque.

III-4-2-2- Méthodologie des tests antimicrobienne :

Pour réaliser le test de l'aromatogramme, nous avons réalisé par les étapes suivantes (Guerra et al, 2013 ; Akrouf et al, 2010 ; Ksouri et al, 2014 ; Spadaro et al, 2011 ; Sadou et al, 2015 ; Ghilissi et al, 2016) :

III-4-2-2-1- Repiquage des espèces bactériennes :

Les tests antimicrobiens doivent être effectués à partir des cultures jeunes (18 à 24 h) en phase de croissance exponentielle. Les différentes souches bactériennes ont été repiquées sur gélose de Mueller Hinton par la méthode des stries, puis incubées à 37°C pendant 24 h afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.

III-4-2-2-2- Préparation de l'inoculum :

Des colonies bien séparées des espèces bactériennes concernées ont été prélevées, et homogénéisées dans un volume de 10 mL de bouillon nutritif, puis on ajoute un volume de l'eau physiologie (0,9 g/L) afin d'obtenir des suspensions microbiennes d'une densité optique de 0,5 McFarland, ce qui correspond à un inoculum d'environ 10^6 à 10^8 UFC/mL.

Il est recommandé d'employer un spectrophotomètre pour vérifier la densité de la suspension. L'absorbance à 625 nm contre blanc doit être comprise entre 0,08 to 0,13.

III-4-2-2-3- Préparation des milieux de culture :

Une masse de 38 g de poudre de Mueller Hinton ont été dissous dans un litre d'eau distillée puis chauffés jusqu'à la dissolution complète. La solution obtenue a été stérilisée à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes. Après refroidissement, la gélose de Mueller Hinton stérile prête à l'usage a été coulée et répartie uniformément dans des boites de pétrie stériles. Ces dernières doivent être séchées 30 min à une température ambiante du laboratoire avant leur emploi.

L'épaisseur de la gélose doit être de $4 \pm 0,5$ mm (approximativement 25 mL pour une boîte de pétrie de 90 mm de diamètre).

III-4-2-2-4- Ensemencement :

À l'aide d'un écouvillon en coton stérile, La suspension bactérienne (10^6 à 10^8 UFC/mL), préalablement préparée, est répartie distinctement sur des boites gélosées de Mueller-Hinton puis homogénéisé dans tous les sens de sorte à couvrir toute la surface de la boîte gélosée.

III-4-2-2-5- Dépôt des disques :

Des disques de 6 mm de diamètre en papier stérile sont imprégnés par 10 μ L d'huile essentielle. À l'aide d'une pince stérilisé, les disques sont déposés à la surface de la boîte gélosée de Mueller-Hinton précédemment encensé. La boîte gélosée est stockée à la température de +4°C pendant 2 heures afin de permettre la pré-diffusion, trois répétitions sont réalisées pour chaque essai. Les boites de Pétri sont incubées à l'étuve pendant 24 h à 37°C.

III-4-2-2-6- Lecture :

La lecture a été réalisées par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition, avec un pied de coulisse, qui se traduit par un halo translucide autour de chaque disque; la présence ou l'absence d'un halo expliquerait la sensibilité ou la résistance des germes *vis-à-vis* des extraits testés, les résultats sont exprimés selon une échelle de notation symbolique comprend quatre niveaux d'activité :

- $\emptyset < 10$ mm : HE sans action inhibitrice ;
- $16 > \emptyset \geq 10$ mm : HE à une action inhibitrice intermédiaire ;
- $25 > \emptyset \geq 16$ mm : HE à une action inhibitrice importante ;
- $\emptyset \geq 25$ mm : HE à une action inhibitrice très efficace.

III-5- Étude de synergie entre les huiles essentielles (Test de combinaison) :

III-5-1- Activité antioxydante :

L'effet synergique entre les huiles essentielles des trois plantes est évalué par la méthode de DPPH décrite précédemment (voir figure II.3). L'huile essentielle de l'*A. campestris* provenant de Milok a été testée en combinaison d'une part avec celle de *C. limon*, et d'autre part avec celle de *C. aurantium*. Les huiles essentielles de deux citruses ont été également testées en combinaison. Nous avons choisi l'huile essentielle de l'*A. campestris* provenant de Milok à cause de son activité antioxydante élevée ($IC_{50}=1,04\mu\text{g/ml}$) par rapport aux autres régions préalablement investiguées.

III-5-2- Activité antimicrobienne :

L'effet synergique entre les huiles essentielles des trois plantes est évalué par la méthode de diffusion des disques décrite précédemment. Des combinaisons binaires et tertiaires entre les HEs issus des parties aériennes d'*A. campestris* originaire du Milok et des zestes de *C. aurantium* et *C. limon* sont testées sur toutes les souches bactériennes pour déterminer s'il existe une éventuelle synergie. Les résultats obtenus sont exprimés en diamètres des zones d'inhibition pour les différentes combinaisons des différents extraits *vis-à-vis* des souches testées et sont comparées à la moyenne des zones d'inhibition des HEs testés seuls.

TROISIÈME PARTIE :
RESULTATS ET DISCUSSION

I- Extraction et analyse des huiles essentielles :

I-1- Cinétique d'extraction des huiles essentielles :

Les résultats du suivi de la cinétique d'extraction des huiles essentielles d'*A. campestris*, *C. limon* et *C. aurantium* obtenues par extraction en utilisant l'appareil d'hydrodistillation (Clevenger) sont représentés respectivement dans les figures (III.1.a et III.1.b).

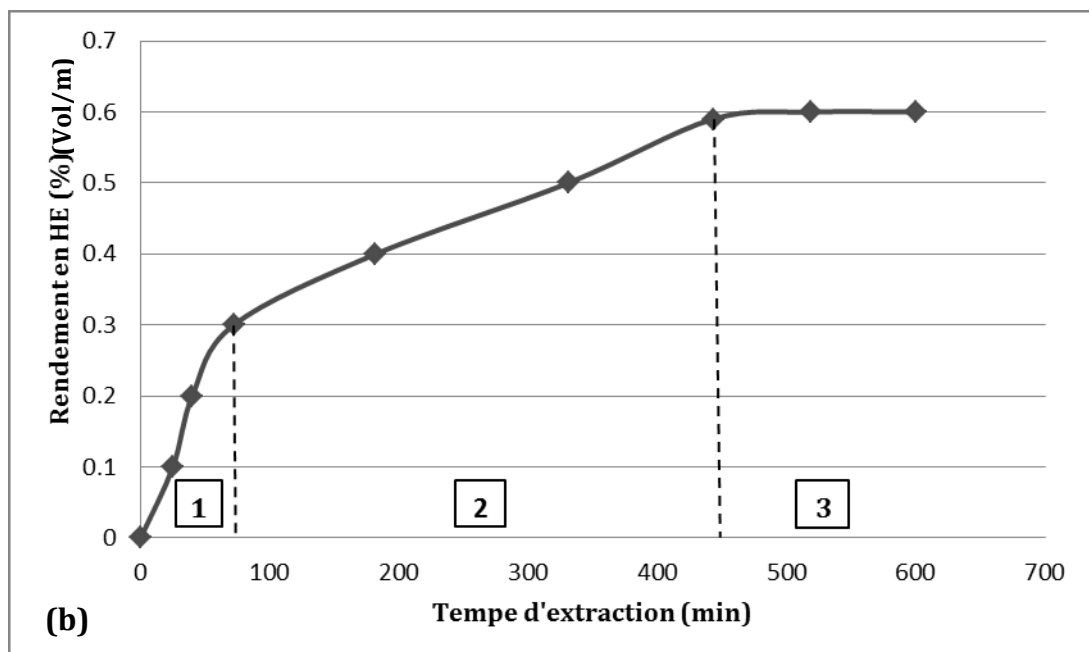
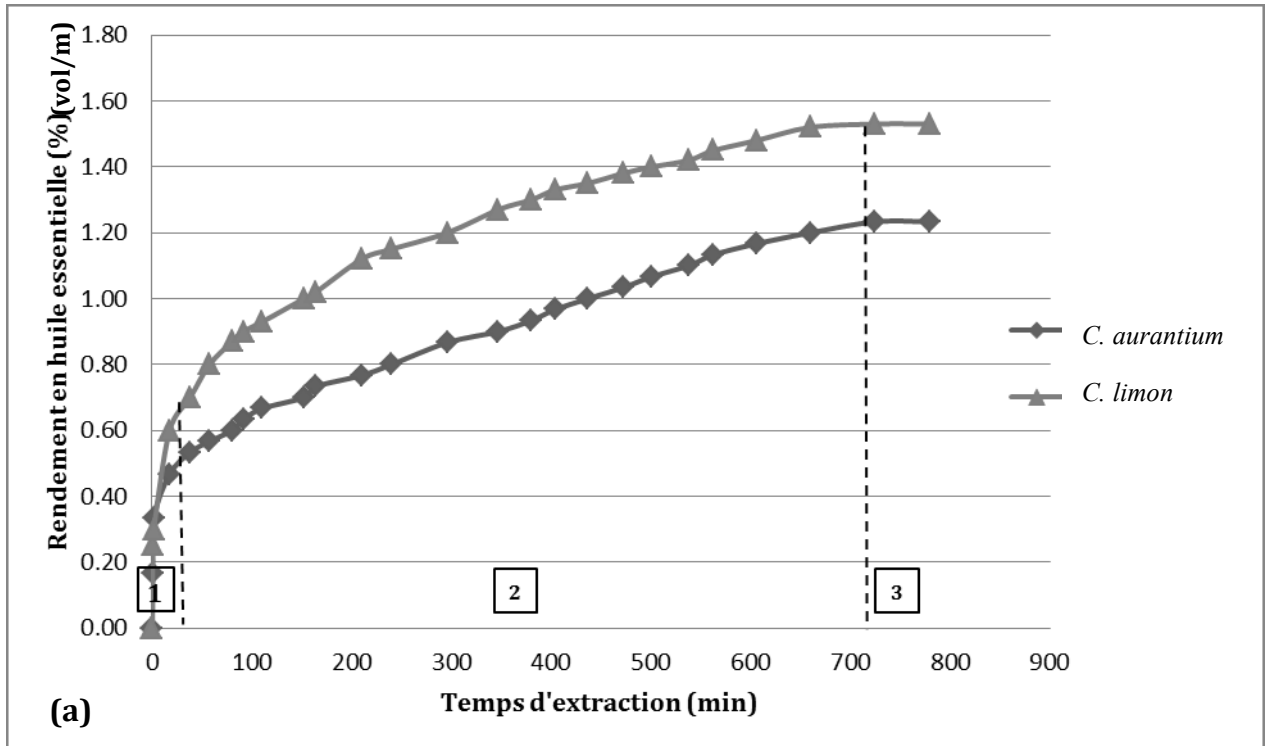


Figure III.1. Cinétique d'extraction des HEs obtenus par hydrodistillation ; (a) *C. aurantium* et *C. limon* ; (b) *A. campestris*.

L'allure des courbes du suivi de la cinétique d'extraction des deux Citrus sont presque similaires, et montrent que cette dernière passe par trois phases importantes (Figure II.1.a). La première phase (1) est représentée par une ligne croissante qui caractérise les premières quantités d'huile essentielle extraite suite à l'éclatement intense des poches schizolysigènes, elle représente approximativement 50% du rendement obtenu après les premières 38 min. Cette phase est suivie d'une deuxième courbe croissante « pratiquement une ligne droite » (étape 2), dans cette étape, réalisée en 600 min, la quantité d'huile extraite représente près de 50% du rendement global. La troisième phase (étape 3) correspond à une ligne horizontale qui marque la fin du processus d'extraction où le rendement d'extraction a atteint un taux constant de 1,53% pour *Citrus limon* et 1,23% pour *Citrus aurantium*, cette stagnation pourrait s'expliquer par l'épuisement des cellules de l'écorce en huile essentielle. Le profil de la cinétique d'extraction pour l'*Artemisia campestris* présente également trois étapes similaires aux profils des citrus (Figure I.b) mais avec des phases différentes de celles obtenues par les deux Citrus ; seule la première étape conduite en 58 min permet d'obtenir environ 50% du rendement total. La fin du processus d'extraction est atteinte après 435 min.

I-2- Rendement en huile essentielle :

Les extractions par hydrodistillation de différentes plantes étudiées ont fourni des HEs.

I-2-1- Rendement en huile essentielle de l'*Artemisia campestris* :

Les rendements en HE (région de Laghouat et Djelfa), exprimés en millilitre par rapport à 100 g de matière végétale sèche d'*Artemisia campestris*, récoltée dans différentes stations varient de 0,6% à 1,13% (Figure II.3). Le meilleur rendement en HE a été obtenu à partir de l'échantillon récolté à Sidi Bouzid avec un taux égal à (1,13 %), suivi du Charef (0,9%), du Route d'Alger et Aflou (0,7%), et finalement de Milok (0,6%). Plusieurs auteurs mentionner la variabilité du rendement en huiles essentielles selon la localisation géographique (**Babazadeh, 2014 ; Mansouri et al, 2011**).

En comparant séparément les rendements des HEs obtenus au cours de notre étude avec ceux rapportés dans la littérature. Les huiles essentielles de provenance de Route d'Alger et d'Aflou, présentent des résultats similaires à ceux rapportés par **Erel et al, 2010** et par **Houicher et al, 2015**. Ces derniers ont rapportés des rendements égaux à 0,70% et 0,71% pour la partie aérienne de cette espèce végétale originaire du Turquie et d'Algérie (Laghouat), respectivement.

Pour l'huile essentielle de Milok, le rendement est en accord avec les résultats signalés par [Akrouit et al, 2001](#). Ces derniers auteurs, ont montré que le rendement en huile essentielle de la même espèce végétale récolté en Tunisie (*Artemisia campestris*) été de 0,65%.

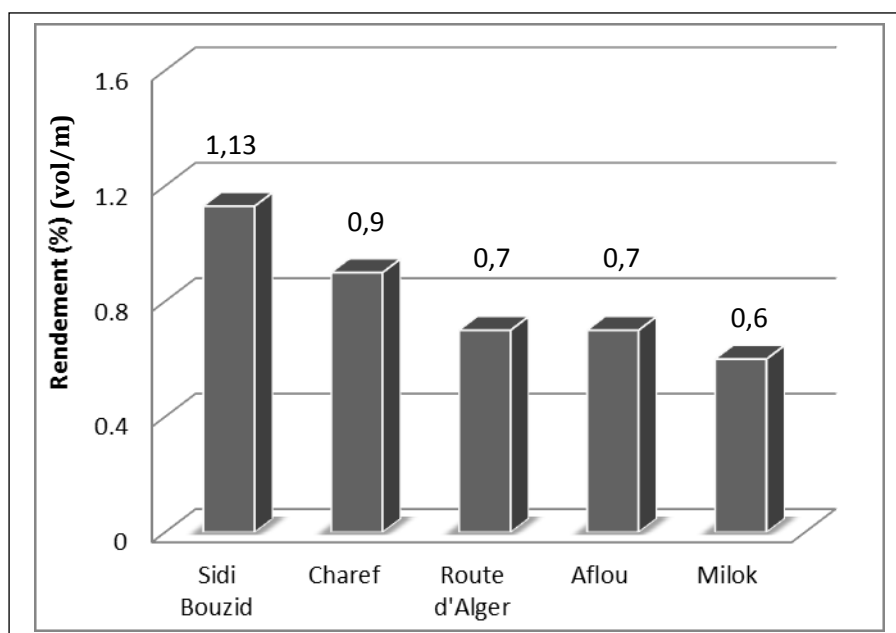


Figure III.2. Rendement en HE des partie aériennes de l'*A. campestris* récoltée dans différents régions.

Pour l'huile essentielle de Sidi Bouzid et de Charef, le résultat sont en accord avec les études rapportées par [Akrouit et al, 2003](#) et par [Boutemak et al, 2015](#), respectivement. Ces auteurs ont montré que les teneurs en huile essentielle d'*A. campestris* provenant de Tunisie et de l'Algérie (Blida) sont 1,20% et 0,88%, respectivement. Les teneurs en huiles essentielles obtenus sont relativement élevé par rapport à certaines auteurs [Chalchat et Cabassu, 2003](#). Ceux-ci ont trouvé un rendement de 0,20% pour la partie aérienne de cette plante récolté en Serbie.

Les variations détectées dans les teneurs en huiles essentielles d'*A. campestris* issue de différents pays sont étroitement liées à plusieurs paramètres tels que : le facteur environnemental, les conditions climatiques et géographiques qui changent d'un pays à un autre, la période de la récolte, la technique de distillation et la durée de l'extraction ([Njoku et Evbuomwan, 2014](#)).

Par ailleurs, [Boutemak et al, 2015](#) ont amélioré le rendement en huile essentielle d'*A. campestris*, obtenu par hydrodistillation en utilisant l'enzyme hémicellulase. Ils ont obtenus un rendement de 0,88% pour l'échantillon non traitée, puis 1,50% pour l'échantillon traitée par l'enzyme. Cette dernière technique permet de perturber la paroi cellulaire et provoque la libération des HEs.

Cependant, la teneur obtenue reste relativement faible par rapport à d'autres espèces d'*Artemisia*, telles que l'*A. sieberi* (1,7%) ([Ghasemi et al, 2006](#)), et l'*A. herba alba* (1,23%)

(Ghanmi et al, 2010). Cette différence en rendement entre les espèces d'Artemisia peut être attribuée à la méthode d'extraction, la nature séchée ou fraîche, la nature de l'espèce, l'effet du stade végétatif de la plante et les conditions édaphiques de la région (Maria et al, 2012).

I-2-2- Rendement en huile essentielle de *C. aurantium* et *C. limon*

Les rendements en huiles essentielles des deux plantes Citrus (région de Laghouat), et exprimés en millilitre par rapport à 100 g de matériel végétal fraîche, sont représentés dans la figure III.3. L'hydrodistillation des zestes de *C. aurantium* a fourni 1,28 % d'huile essentielle, alors que celle de *C. limon* a donné un rendement légèrement plus élevé de 1,38 %. Cette légère différence de résultats pourrait être expliquée selon Rega et al, 2003, par l'existence de différences entre les espèces végétales du Citrus, dont le rendement varie de 1 à 3%.

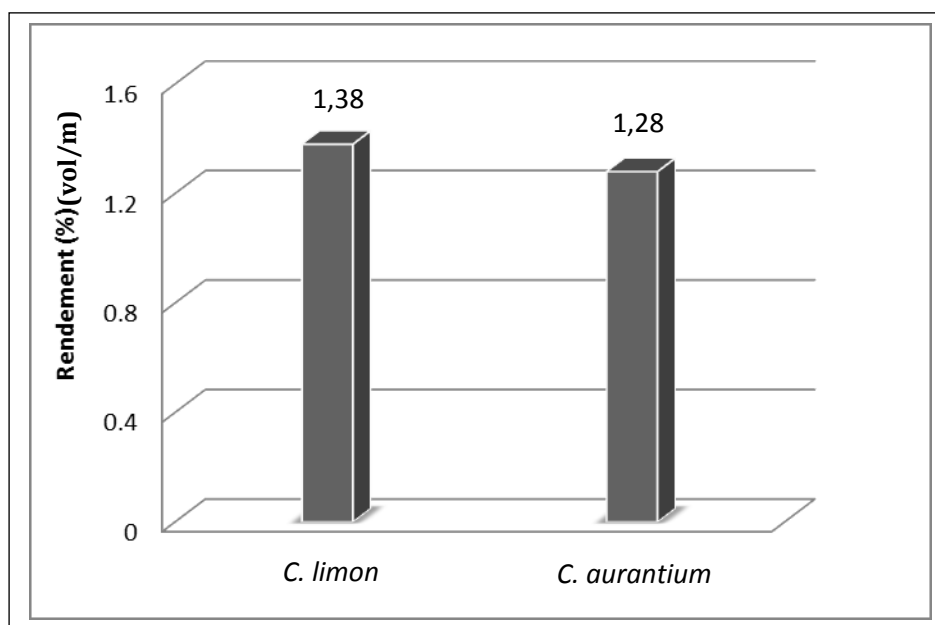


Figure III.3. Rendement en huile essentielle des zestes de *C. aurantium* et de *C. limon*.

En comparant séparément les rendements des Citrus avec ceux rapportés dans la littérature. Le taux de *C. aurantium* reste le plus élevé par rapport à certains pays et régions : Iran : 0,86% (Azhdarzadeh et Hojjati, 2016), Égypte 0,71% (Sherif et al, 2015), Italie : 0,2% (Tundis et al, 2012) et l'Algérie (Tizi-ouzou) : 0,60% (Hellal, 2011). En revanche, ce taux reste relativement faible comparativement à celui de certaines autres auteurs (Azadi et al, 2012 ; Sarrou et al, 2013). Ceux-ci ont trouvé des rendements de 1,95% et 1,67% sur des zestes de cette plante provenant d'Iran (Sari) et de la Grèce, respectivement.

Pour le *C. limon*, la distillation des zestes a donné un rendement de 1,38 %. Ce résultat est très proche à celui rapporté par [Himed et al. 2016](#), où ils ont trouvé un rendement de 1,34% sur la même espèce végétale provenant de Bejaïa (Algérie). Cependant, cette teneur reste plus élevée par rapport à certains pays et régions : Iran (Tahran) 0,46%, Algérie (Boufarik) 0,70% et l'Italie 0,9% ([Kamaliroosta et al, 2015](#) ; [Bousbia et al, 2008](#) ; [Spadaro et al, 2011](#)). D'autre part, ce taux est moins important que celle indiqué par [Himed et Barkat, 2014](#). Ces derniers ont trouvé un rendement de 2,18% à partir du zeste de *C. limon*. De plus, plusieurs études sur différents organes de *C. aurantium* et de *C. limon* montre que les zestes du fruit de Citrus est la partie la plus riche en huile essentielle par rapport aux autres parties (feuilles et fleurs, bourgeons) ([Sarrou et al, 2013](#) ; [Azhdarzadeh et Hojjati, 2016](#) ; [Azadi et al, 2012](#) ; [Flamini et al, 2007](#)).

La comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature a révélé des incohérences. Les variétés, les différentes conditions de plantation et de récolte ainsi que les conditions météorologiques, le degré de maturation des fruits, le séchage pourraient avoir affecté le rendement des huiles essentielles ([Bourgou et al., 2012](#)). La fertilisation du sol et l'irrigation peuvent influencer sur la teneur en huile essentielle chez les Citrus ([Babazadeh, 2014](#)). Cependant, le broyage et la méthode d'extraction appliquée peuvent également agir sur la teneur des huiles essentielles ([Djerrari et Crtuzet, 1996](#)). Ceux-ci ont observé que le rendement obtenu par hydrodistillation sans broyage est légèrement supérieur à celui obtenu après broyage, ce qui peut s'expliquer par une perte par volatilisation lors du broyage.

Enfin en comparant les rendements obtenus pour les trois plantes étudiées, on peut dire que ces plantes contiennent effectivement des HEs avec des quantités satisfaisantes, et que la teneur en HE d'*A. campestris* est moins importante en comparaison avec celles obtenue par des deux Citrus.

I-3-Propriétés organoleptiques des huiles essentielles :

Les propriétés organoleptiques constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'HE. Les huiles essentielles des espèces de Citrus ont présenté un aspect liquide, limpide avec couleur jaune pâle pour *C. limon* et jaune orangé pour *C. aurantium*. Elles ont été caractérisées par une odeur fraîche et zestée. Alors que l'huile essentielle d'*A. campestris* a présenté un aspect liquide et limpide avec couleur jaune foncée et caractérisée par une odeur fraîche et épicée.

I-4- Détermination de la densité :

Les résultats de calcul des densités des huiles essentielles des trois plantes étudiées obtenus par hydrodistillation sont évalués et enregistrés. D'après le tableau III.1, les densités sont presque similaires ; cela confirme leurs similitudes en propriétés physiques. La comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature, a montré que les densités de nos huiles essentielles sont en accord avec plusieurs travaux antérieurs (Tableau III.1). D'autre part, les densités des huiles essentielles étudiées sont toutes inférieures à celle de l'eau, ça explique leurs surnageant à la surface de l'hydrolat pendant la distillation.

Tableau III.1. Les densités des huiles essentielles des plantes étudiées comparées avec celles de références.

Plantes	Régions	Densité des HEs	Littérature
<i>A. campestris</i>	Sidi Bouzid (Djelfa)	0.861±0.022	
	Charef (Djelfa)	0.883±0.026	
	Route d'Alger (Djelfa)	0.894±0.019	0.891 (Saihi, 2011)
	Aflou (Laghouat)	0.897±0.011	
	Milok (Laghouat)	0.897±0.038	
<i>C. limon</i>	Laghouat	0.824±0.005	0.857 (Millet, 2014) ; 0.847 (Munier et al, 2011) ; 0.840 (Spadaro et al, 2011).
<i>C. aurantium</i>	Laghouat	0.809±0.007	0.857 (Hellal, 2011) ; 0.863 (Hamdani et Allem, 2015).

I-5- Étude de la composition chimique des huiles essentielles :

La composition chimique d'une huile essentielle est très complexe et soumise à de très nombreuses variables. Connaître avec exactitude les constituants d'une huile essentielle est fondamental, à la fois pour vérifier sa qualité, expliquer ses propriétés et prévoir sa toxicité potentielle (Marinier et Lobstein, 2013).

I-5-1- Composition chimique de l'huile essentielle d'*A. campestris*

L'analyse chromatographique CPG réalisée sur les huiles essentielles issues des parties aériennes d'*A. campestris* des différents stations a permis d'obtenir les chromatogrammes rassemblé en Annexe 2. L'ensemble des IRLs (indices de rétention linéaire) et le pourcentage de quelques constituants volatiles sont présentés dans le Tableau II.2.

Tableau III.2. Composition chimique des huiles essentielles des parties aériennes d'*A. campestris* des régions de Charef, S. Bouzid, R. d'Alger, Aflou et Milok.

N°	Constituants	Formule brute	IRL	Région de Djelfa			Région de Laghouat	
				Charef %	Sidi Bouzid %	Route d'Alger %	Aflou %	Milok %
	Monoterpènes			66,45	70,12	65,60	57,89	86,34
1	α -Pinene	C ₁₀ H ₁₆	929	9,01	8,36	6,28	15,56	8,13
2	β -Pinene	C ₁₀ H ₁₆	972	26,50	27,59	25,32	12,51	-
3	β -Myrcene	C ₁₀ H ₁₆	992	8,07	5,98	11,62	7,63	46,97
4	α -Terpinene	C ₁₀ H ₁₆	1013	0,34	0,55	0,26	0,15	5,61
5	<i>p</i> -Cymene	C ₁₀ H ₁₄	1032	12,51	14,43	10,76	11,15	-
6	Limonene	C ₁₀ H ₁₆	1036	2,12	1,76	3,50	4,37	0,60
7	<i>trans</i> - β -Ocimene	C ₁₀ H ₁₆	1044	1,90	2,41	3,31	2,28	-
8	γ -Terpinene	C ₁₀ H ₁₆	1054	5,33	8,38	4,10	3,75	22,43
9	α -Terpinolene	C ₁₀ H ₁₆	1082	0,67	0,68	0,47	0,49	2,60
	Monoterpènes oxygénées			3,47	2,89	1,27	1,99	11,02
10	Linalool	C ₁₀ H ₁₆ O	1098	-	-	0,06	0,12	2,73
11	α -Thujone	C ₁₀ H ₁₆ O	1107	0,17	0,11	-	0,07	6,62
12	β -Thujone	C ₁₀ H ₁₆ O	1115	0,12	0,12	0,13	0,16	-
13	<i>cis-p</i> -mentha-2-en-1-ol	C ₁₀ H ₁₆ O	1121	0,14	0,12	-	0,18	-
14	<i>cis-p</i> -mentha-2,8-dien-1-ol	C ₁₀ H ₁₆ O	1132	0,67	0,39	0,19	0,18	-
15	Camphor	C ₁₀ H ₁₈ O	1144	0,09	0,08	-	0,15	0,58
16	Neroloxide	C ₁₀ H ₁₈ O	1152	0,29	0,17	0,10	0,16	-
17	Borneol	C ₁₀ H ₁₈ O	1164	-	0,12	-	-	-
18	Terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₆ O	1172	0,93	1,07	0,46	0,47	-
19	α -Terpineol	C ₁₀ H ₁₄ O	1188	0,70	0,44	0,17	0,22	0,12
20	Myrtenol	C ₁₀ H ₁₆ O	1195	0,21	0,15	0,08	0,10	0,10
21	Verbenone	C ₁₀ H ₁₆ O	1205	-	-	-	0,06	-
22	<i>cis</i> -1(7),8-p-Menthadien-2-ol	C ₁₀ H ₁₄ O	1232	-	-	0,08	0,06	-
23	Carvone	C ₁₀ H ₁₆ O	1238	0,10	0,12	-	0,06	0,48
24	Thymol	C ₁₀ H ₁₄ O	1286	-	-	-	-	0,26
25	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-2,4-Decadienal	C ₁₀ H ₁₄ O	1318	0,05	-	-	-	0,13
	Sesquiterpènes			13,38	14,90	13,902	26,05	1,97
26	δ -Elemene	C ₁₅ H ₂₄	1339	0,08	0,10	-	-	1,23
27	α -Copaene	C ₁₅ H ₂₄	1372	0,11	-	-	-	0,19
28	Methyl eugenol	C ₁₅ H ₂₄	1401	0,46	0,51	0,30	0,29	0,23
29	α -Cedrene	C ₁₅ H ₂₄	1412	0,22	0,21	0,13	0,13	-
30	β -Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	1422	0,25	0,15	0,06	0,09	-
31	β -Copaene	C ₁₅ H ₂₄	1434	0,29	0,41	0,25	0,20	-
32	Aromadendrene	C ₁₅ H ₂₄	1444	0,14	0,11	-	0,07	-
33	(<i>Z</i>)- β -Farnesene	C ₁₅ H ₂₄	1449	0,10	-	-	-	-
34	α -Humulene	C ₁₅ H ₂₄	1454	0,58	1,01	0,33	1,94	-
35	Alloaromadendrene	C ₁₅ H ₂₄	1464	2,77	5,26	7,91	2,32	-
36	Germacrene D	C ₁₅ H ₂₄	1476	0,30	0,32	0,63	0,81	-
37	β -Selinene	C ₁₅ H ₂₄	1482	1,17	0,88	0,36	-	-
38	α -Farnesene	C ₁₅ H ₂₄	1488	-	0,91	0,07	-	-

Tableau III.2. Suite

39	Bicyclogermacrene	C ₁₅ H ₂₄	1493	2,49	0,25	0,18	17,88	-
40	β -Bisabolene	C ₁₅ H ₂₄	1508	2,74	3,18	2,38	1,89	-
41	Capillene	C ₁₂ H ₁₄	1513	1,24	1,68	0,47	0,48	-
	Sesquiterpènes oxygénés			11,77	8,17	6,15	8,55	0,19
42	δ -cadinene	C ₁₅ H ₂₆ O	1525	0,10	0,12	-	-	-
43	(Z)-Nerolidol	C ₁₅ H ₂₆ O	1543	0,11	0,26	0,16	0,22	-
44	(E)-Nerolidol	C ₁₅ H ₂₄ O	1562	6,24	2,01	2,07	6,05	-
45	Spathulenol	C ₁₅ H ₂₆ O	1574	1,50	0,43	0,55	0,37	-
46	<i>epi</i> -Globulol	C ₁₅ H ₂₆ O	1584	0,20	0,12	0,12	0,10	-
47	Caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	1589	-	0,08	0,09	0,07	-
48	α -Guaiol	C ₁₅ H ₂₆ O	1595	-	0,09	0,18	0,07	-
49	α -Humulene oxide	C ₁₅ H ₂₆ O	1601	0,23	0,22	-	0,16	0,19
50	Humulene epoxide II	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	1607	1,68	2,83	1,45	0,48	-
51	Viridiflorol	C ₁₅ H ₂₄ O	1616	-	-	-	0,07	-
52	<i>epi</i> -Cubenol	C ₁₅ H ₂₆ O	1623	0,09	-	0,22	0,16	-
53	γ -Eudesmol	C ₁₅ H ₂₆ O	1630	0,17	-	-	-	-
54	Isospathulenol	C ₁₅ H ₂₆ O	1633	1,55	2,13	1,31	0,80	-
	Autres composés oxygénés			0,93	1,15	5,64	0,49	0,23
55	Bornyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	1276	-	-	0,06	0,08	-
56	Neryl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	1365	0,47	0,64	-	0,12	-
57	β -Curcumene	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	1386	0,80	0,31	0,25	1,05	0,55
58	Ethyl-tetradecanoate	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	1799	-	-	5,28	-	-
	Totale			96,00	97,23	91,68	94,97	99,75
	Rendement % (v/m)			0,9	1,13	0,7	0,7	0,6
	Monoterpènes totales			69,92	73,01	66,87	59,88	97,36
	Sesquiterpènes totales			25,15	23,07	19,17	34,60	12,16
	Composés oxygénés			16,17	12,21	13,06	11,03	11,44
	Composés non oxygénés			79,83	85,02	78,62	83,94	88,31

Les analyses chromatographiques de l'HE d'*A. campestris* de la région de Charef, Sidi Bouzid et Aflou ont révélé la présence de 47 constituants contre 41 et 19 composés pour celles récoltées à Route d'Alger et Milok respectivement. Ces composés représentent environ 96,00 ; 97,23 ; 91,68 ; 94,97 et 99,75 % de la totalité des HEs des plantes récoltées à Charef, Sidi Bouzid, Route d'Alger, Aflou et Milok, respectivement.

Comme le montre le Tableau III.2, les huiles essentielles obtenues étaient qualitativement presque similaires mais différents par la quantité relative de leurs composés majoritaires. On note que chacune des régions est caractérisée par sa richesse en certains constituants majoritaires. En effet, les composés majoritaires dans l'huile d'*A. campestris* de Charef sont : le β -pinène (26,50%), le *p*-cymène (12,51%), l' α -pinène (9,01%) et le β -myrcène (8,07%). Alors que dans la région de Sidi Bouzid on trouve le β -pinène (27,59%), le *p*-cymène (14,43%) et le γ -terpinène (8,38%) et l' α -pinène (8,36%). On remarque également que l'huile essentielle cueillie

de la région de Route d'Alger est composée principalement du β -Pinène (25,32%), le β -myrcène (11,62%), le *p*-cymène (10,76%) et α -Pinène (6,28%). Alors que dans la région d'Aflou est constituée du bicyclogermacrène (17,88%), α -pinène (15,56%), β -pinène (12,51%) et *p*-cymène (11,15%). Dans le cas de l'huile essentielle appartenant à la région de Milok, les principaux composés sont le β -myrcène (46,97%), le γ -terpinène (22,43%), l' α -Pinène (8,13%) et α -thujone (6,62%) ; cet échantillon peut être considéré comme une source importante en β -myrcène qui représente environ la moitié de son huile essentielle.

En parlant chimiquement, la composition des huiles essentielles des cinq stations sont principalement constituées de composés hydrocarbonés (varient de 79,83 à 88,31%), les monoterpènes étant les plus abondants à raison respectivement de 66,45 ; 70,12 ; 65,60 ; 57,89 et 86,34 % dans l'huile originaire de Charef, Sidi Bouzid, Route d'Alger, Aflou et Milok, alors que les sesquiterpènes sont minoritaires. La fraction oxygénée, très minoritaire, est principalement constituée de monoterpènes à raison de 11,77% ; 8,17% ; 6,15% ; 8,55% et 0,19%, respectivement, dans l'huile provenance de Charef, Sidi Bouzid, Route d'Alger, Aflou et Milok ; les sesquiterpènes sont présents en quantité très faible. La prédominance nette des constituants terpéniques hydrogénés dans les huiles essentielles d'*A. campestris* (varient de 70,12 à 86,34 %) indique que, dans la biosynthèse des différents constituants de la fraction aromatique, il y a une nette prépondérance de la voie des terpénoïdes sur celle des phénylpropanoïdes au sein de cette espèce (**Mansouri et al, 2011**).

La différence observée entre les cinq provenances étudiées au niveau de la composition chimique pourrait peut s'expliquer par une adaptation de la plante aux facteurs abiotiques, tels que le climat spécifique aux régions de provenance des échantillons, aux facteurs géographiques, comme l'altitude et la nature du sol qui orientent la biosynthèse vers la formation préférentielle de produits précis (**Mansouri et al, 2011**).

Plusieurs investigations réalisées en Algérie sur la composition chimique de l'HE des parties aériennes d'*A. campestris*, ont montré qu'il existe plusieurs chémotypes pour cette même espèce. La région de Djelfa est caractérisée par le chémotype (Z,E)-farnesol (10,3 %), cedrol (5,4%), verbenone (3,8%) et myrcène (3,3%) (**Dob et al, 2005**). Alors que la région Bousaada est caractérisée par le α -terpenyl acétate (18,8%), α -pinène (18,4%), camphor (9,2%) et camphène (7,7%) (**Belhattab et al, 2011**). Par contre, le chémotype de l'HE de la région de Laghouat (Djebel Amour) est caractérisée par le β -pinène (25,6%), sabinène (17,0%), α -pinène (9,9%), limonène (6,6%) (**Bakchiche et al, 2013**). Nous avons par la suite comparé la composition chimique de nos huiles essentielles à celles issues principalement de la Tunisie

(Akrouit et al, 2010), la France (Juteau et al, 2002) et l'Iraqe (Al-Snafi, 2015). Les études réalisées sur l'*A. campestris* cueillie en Tunisie, France et Iraqe, montrent une importante variation dans la composition chimique de l'huile essentielle comparée à nos résultats. En effet l'huile essentielle d'*A. campestris* cueillie en Tunisie est constituée essentiellement de β -pinène (34,2%), limonène (8,2%), Germacrene D (7,3%) et γ -terpinène (6,1%). Alors que celle d'*A. campestris* cueillie en France est composé principalement de γ -terpinène (46,5%), 1-phenyl-2,4-pentadiyne (26,9%), capillène (8,9%), *O*-methyleugenol (4,5%). Par contre l'huile essentielle d'*A. campestris* cueillie en Iraqe est constituée essentiellement de β -myrcène (16,4%), α -pinène (14,18%), trans- β -Ocimène (12,61%), β -cymène (8,15%).

La comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature a révélé plusieurs incohérences. Cela peut être lié à des facteurs environnementaux tels que l'altitude, l'ensoleillement, la température, l'humidité, pH et la composition chimique du sol qui peut influencer sur la composition d'huile (Babazadeh, 2014 ; Maria et al, 2012). Cependant, cette composition peut varier en fonction du mode d'extraction appliqué et selon la période de récolte (Djerrari et Crtuzet, 1996). D'après Akrouit et al, 2011, la composition de l'HE d'*A. campestris* varie selon la provenance géographique. La présence ou l'absence de certains composés peut permettre d'indiquer l'origine de l'HE. Par railleurs Lis et Kawal, 2015 ont signalé que la composition chimique de l'huile essentielle varie selon l'organe étudié d'*A. campestris* (feuilles, fleurs, tiges et racines).

I-5-2- Composition chimique de l'huile essentielle des Citrus :

I-5-2-1- Composition chimique du *Citrus aurantium*

L'identification par chromatographie CPG réalisée sur l'huile essentielle de *C. aurantium* a permis d'obtenir un chromatogramme composé de 36 pics dont 2 principaux (Annexe 2). L'ensemble des IRL et les pourcentages de quelques composés volatiles sont présentés dans le Tableau III.3.

L'analyse chromatographique des zestes de *C. aurantium* ont révélé la présence de 27 constituants, ce qui correspond à environ 99,40 % de la totalité de l'HE, parmi lesquels on distingue des constituants majoritaires tels que: le limonène (91,69%) et le (Z)-Nerolidol (2,14%). Les autres composés sont présents en faibles quantités. Différents études montre que le limonène est le composé majoritaire dans les HEs extrait de zeste du *C. aurantium* (Azadi et al, 2012 ; Azhdarzadeh et Hojjati, 2016 ; Njoku et Evbuomwan, 2014).

Tableau III.3. Composition chimique des huiles essentielles des zestes de *C. aurantium*.

N°	Constituants	Formule brute	IRL	%
	Monoterpènes			94,46
1	α -Pinene	C ₁₀ H ₁₆	937	0,54
2	β -Pinene	C ₁₀ H ₁₆	983	0,39
3	β -Myrcene	C ₁₀ H ₁₆	1004	1,68
4	Limonene	C ₁₀ H ₁₆	1038	91,69
5	α -Terpinolene	C ₁₀ H ₁₆	1082	0,16
	Monoterpènes oxygénés			0,84
6	Linalool	C ₁₀ H ₁₆ O	1100	0,07
7	cis limonene oxide	C ₁₀ H ₁₆ O	1113	0,55
8	trans limonene oxide	C ₁₀ H ₁₆ O	1124	0,01
9	α -Terpineol	C ₁₀ H ₁₆ O	1182	0,04
10	Decanal	C ₁₀ H ₂₀ O	1200	0,13
11	Nerol	C ₁₀ H ₁₆ O	1216	0,02
12	Citral	C ₁₀ H ₁₆ O	1293	0,02
	Sesquiterpènes			1,51
13	(Z)-Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	1411	0,04
14	(E)-Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	1423	0,02
15	α - humulene	C ₁₅ H ₂₄	1438	0,02
16	Germacrene D	C ₁₅ H ₂₄	1478	1,40
17	bicyclogermacrene	C ₁₅ H ₂₄	1494	0,01
18	δ - Cadinene	C ₁₅ H ₂₄	1503	0,01
	Sesquiterpènes oxygénés			2,20
19	(Z)-Nerolidol	C ₁₅ H ₂₆ O	1524	2,14
20	(E)-Nerolidol	C ₁₅ H ₂₆ O	1572	0,04
21	Caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	1574	0,03
	Autres composés oxygénés			0,39
22	Octanal	C ₈ H ₁₆ O	1014	0,03
23	(E) β -Ocimene	C ₉ H ₁₄ O	1056	0,23
24	Nonanal	C ₉ H ₁₈ O	1094	0,01
25	Linalyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	1265	0,08
26	Neryl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	1377	0,01
27	Geranyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	1398	0,02
	Totale			99,40
	Rendement % (v/m)			1,28
	Monoterpènes totales			95,30
	Sesquiterpènes totales			3,71
	Composés oxygénés			3,43
	Composés non oxygénés			95,97

Plusieurs études effectuées en Algérie ont révélé quelques différences sur la composition chimique de l'HE des zestes d'*C. aurantium*. L'HE de la région de Tizi-Ouzou, est caractérisée

par forte teneur en acétate linalyl (37,28%), linalol (23,36%), acétate de néryl (4,10%), β -myrcène (3,19%) (Hellal, 2011). Le profil chimique de l'huile étudiée est différent de ce qui a été rapporté dans la littérature. En effet, Sherif et al, 2015 ont trouvé que l'HE de zeste du *C. aurantium* récolté en Egypte présente un différent chémotype : linalool (49,90%), linalyl acétate (13,09%), α -terpineol (8,81%) et géraniol (4,69%). De plus, Sarrow et al, 2013 ont signalé que limonène (94,67%), myrcène (2%) et linalool (0,67%), sont les composés majoritaires dans l'HE de zeste du *C. aurantium* cultivé en Grèce.

I-5-2-2- Composition chimique du *Citrus limon* :

L'identification par chromatographie CPG réalisée sur l'huile essentielle de *C. limon* a permis d'obtenir un chromatogramme composé de 50 pics dont 4 principaux (Annexe 2). L'ensemble des IRL et les pourcentages de quelques composés volatiles sont présentés dans le Tableau III.4. Au total, 43 constituants ont été caractérisés pour *C. limon* ce qui correspond à un pourcentage de 97,13% par rapport à l'ensemble des composés isolés. Le Limonène apparaît comme le composé majoritaire de l'HE (43,86%), suivi du (E)-caryophyllène (9,09%), du α -humulène oxide (4,88%), et du γ -terpinène (4,37%). On note aussi la présence, à un degré moindre, du γ -eudesmol (4,34%), β -pinène (3,58%), caryophyllenyl alcohol (3,07%) et α -humulène (2,38%).

Plusieurs travaux réalisés en Algérie sur la composition chimique de l'HE des zestes d'*C. limon*, ont signalé qu'il existe plusieurs chémotypes pour cette plante, le chémotype de l'HE de la région de Bejaïa est composé essentiellement de : limonène (64,19%), β -pinène (7,76%), α -terpinène (5,45%) et géraniol (3,65%) (Himed et al. 2016). La région de Boufarik est représenté par le chémotype : limonène (69,65%), β -pinène (10,20%), γ -terpinène (8,25%), α -pinène (1,60%) (Bousbia et al, 2008). Entre autres, nous avons comparé la composition chimique de notre HE à celles issue du Cameroun et d'Iran ; l'analyse menée par Dongmo et al. 2001 sur la même espèce de Cameroun, montre que la composition est dominée par le Limonène (56,99%), le β -Pinène (9,74%), géraniol (5,43%) et γ - terpinène (4,79%), alors que celle d'Iran est à dominance de limonène (83,03%), N-méthyl-D3-aziridine (4,42%), cytidine (4,16%), 4-vinyl-2-methoxy-phenol (2,79%) (Kamaliroosta et al, 2015).

Tableau III.4. La composition chimique des huiles essentielles des zestes de *C. limon*

N°	Constituants	Formule brute	IRL	%
	Monoterpènes			54,06
1	α -Pinene	C ₁₀ H ₁₆	927	0,88
2	β -Pinene	C ₁₀ H ₁₆	969	3,58
3	β -Myrcene	C ₁₀ H ₁₆	992	0,99
4	δ -3-Carene	C ₁₀ H ₁₆	1013	0,13
5	Limonene	C ₁₀ H ₁₆	1026	43,86
6	γ -Terpinene	C ₁₀ H ₁₆	1053	4,37
7	α -Terpinolene	C ₁₀ H ₁₆	1084	0,26
	Monoterpènes oxygénées			3,99
8	Linalool	C ₁₀ H ₁₆ O	1105	0,30
9	Terpinen 4-ol	C ₁₀ H ₁₆ O	1174	0,42
10	α -Terpineol	C ₁₀ H ₁₆ O	1192	0,57
11	Nerol	C ₁₀ H ₁₆ O	1217	0,13
12	Neral	C ₁₀ H ₁₆ O	1234	0,14
13	Geraniol	C ₁₀ H ₁₆ O	1241	0,60
14	Geranial	C ₁₀ H ₁₆ O	1263	1,01
15	Thymol	C ₁₀ H ₁₆ O	1274	0,81
	Sesquiterpènes			19,73
16	β -Elemene	C ₁₅ H ₂₄	1389	0,14
17	(Z)-Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	1404	0,13
18	(E)-Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	1424	9,09
19	α -cis-Bergamotene	C ₁₅ H ₂₄	1438	0,78
20	α -Humulene	C ₁₅ H ₂₄	1443	2,38
21	β -cis-Farnesene	C ₁₅ H ₂₄	1458	0,48
22	β -(E)Farnesene	C ₁₅ H ₂₄	1464	0,14
23	Germacrene D	C ₁₅ H ₂₄	1470	0,82
24	Valencene	C ₁₅ H ₂₄	1482	1,97
25	α -(Z)-Bisabolene	C ₁₅ H ₂₄	1486	1,64
26	β -Bisabolene	C ₁₅ H ₂₄	1503	0,19
27	Germacrene B	C ₁₅ H ₂₄	1507	1,38
28	γ -Cadinene	C ₁₅ H ₂₄	1526	0,58
	Sesquiterpènes oxygénées			17,23
29	Caryophyllenyl alcohol	C ₁₅ H ₂₆ O	1546	3,07
30	Spathulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	1559	1,05
31	Caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	1565	0,41
32	Globulol	C ₁₅ H ₂₆ O	1575	0,45
33	α -Humulene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	1601	4,88
34	γ -Eudesmol	C ₁₅ H ₂₆ O	1626	4,34
35	Isospathulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	1635	0,48
36	β -Eudesmol	C ₁₅ H ₂₆ O	1642	0,14
37	α -Bisabolol	C ₁₅ H ₂₆ O	1666	1,44
38	(Z,Z) farnésol	C ₁₅ H ₂₆ O	1679	0,35
39	β -Sinensal	C ₁₅ H ₂₂ O	1701	0,61

Tableau III.4. Suite

	Autres composés oxygénés			2,12
40	Citronellyl acetate	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	1330	0,72
41	Terpinyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	1350	0,28
42	Neryl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	1368	0,25
43	Geranyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	1382	0,87
	Totale			97,13
	Rendement % (v/m)			1,38
	Monoterpènes totales			58,05
	Sesquiterpènes totales			36,96
	Composés oxygénés			23,33
	Composés non oxygénés			73,79

En fin, la comparaison de nos données sur les HEs des deux espèces (*C. limon* et *C. aurantium*) avec ceux de la littérature a révélé quelques différences sur la composition chimique. Ces différences sont probablement liées à des facteurs génétiques, environnementales, climatiques, géographiques, saisonnières, le stade végétative, les techniques d'agricultures et le mode d'extraction appliqué pouvant influencer sur la composition d'huile et provoques des différents chémotypes de même espèce (Babazadeh, 2014 ; Akrouit et al, 2011 ; Azhdarzadeh et Hojjati, 2016 ; Spadaro et al, 2001 ; Djerrari et Crtuzet, 1996).

Selon Fisher et Phillips 2008, le composé majoritaire d'huile essentielle de genre *Citrus* est le Limonène, avec un taux de 32% à 98%. D'après Hamdani et Allem, 2015, les composants majoritaires souvent rencontrés chez les Citrus sont le limonène, myrcène, α -pinène, sabinène, β -pinène, camphène, α -phellandrène, Z(β)-ocimene, E(β)-ocimène, α -terpinène, γ -terpinène.

En parle chimiquement, la composition des huiles essentielles des deux *Citrus* est principalement constituée de composés hydrocarboné (73,79 % pour *C. limon* et 95,97 % pour *C. aurantium*), les monoterpènes étant les plus abondants à raison respectivement de 58,05 % et 95,30% dans l'huile issue de *C. limon* et de *C. aurantium*, alors que les sesquiterpènes sont minoritaires. La fraction oxygénée, très minoritaire (23,33 % pour *C. limon* et 3,43 % pour *C. aurantium*), est principalement composée de sesquiterpènes à raison respectivement de 17,23 % et 2,20 % dans l'huile issue de *C. limon* et de *C. aurantium*, les monoterpènes présents en quantité très faible. Des recherches plus approfondies sur la composition chimique pourront donner plus de détails sur la similitude qualitative des huiles essentielles des citrus testées et rapportent que les monoterpènes sont présents en fort pourcentage dans les huiles essentielles des Citrus africains dont la fraction la plus importante revient aux monoterpènes hydrocarbonés.

Les auteurs rapportent que les composés terpéniques pourraient constituer des traceurs (Hamdani et Allem, 2015).

II- Évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des HEs

II-1 Évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des HEs individuelles

II-1-1- Activité antioxydante

Les activités antioxydantes des HEs des parties aériennes d'*A. campestris* et des zestes de *C. aurantium* et de *C. limon* a été évaluée par les méthodes de DPPH sont envisagées dans le Tableau III.5.

D'après le tableau III.5, les résultats les pouvoirs antioxydants des HEs mesurés par le test DPPH sont presque similaires pour toutes les régions investiguées (IC_{50} varie de 1,04 à 1,81 mg/mL), La meilleure valeur d'activité a été obtenu pour l'HE en provenance de Milok avec un IC_{50} de (1,04 mg/mL) suivi de Route d'Alger (1,10 mg/mL), puis d'Aflou (1,27 mg/mL), puis de Charef (1,69 mg/mL), puis de Sidi Bouzid (1,81 mg/mL). Ces résultats sont très différents de ceux obtenus avec les Citrus. En effet, l'activité d'*A. campestris* provenant de Milok est environ 14 fois supérieure que celle de *C. aurantium* et environ 25 fois supérieure que celle de *C. limon*.

De façon générale, les sept échantillons montrent une faible activité antioxydante par rapport les standards (BHA avec $IC_{50}=0,0088$ mg/mL et vitamine C avec $IC_{50}=0,0044$ mg/mL), avec un ordre décroissant suivant : Milok (1,04 mg/mL) > Route d'Alger (1,10 mg/mL) > Aflou (1,27 mg/mL) > Charef (1,69 mg/mL) > Sidi Bouzid (1,81 mg/mL) > *C. aurantium* (14,47mg/mL) > *C. limon* (25,23 mg/mL).

Tableau III.5. Résultats de l'activité antioxydante de l'huile essentielle des parties aériennes d'*A. campestris* et des zestes de *C. aurantium* et de *C. limon* mesurés par test du DPPH.

Plantes	Organes	Régions	IC_{50} (mg HE/mL)
<i>A. campestris</i>	Partie aérienne	Sidi Bouzid (Djelfa)	1,81±0,21
		Charef (Djelfa)	1,69±0,03
		Route d'Alger (Djelfa)	1,10±0,01
		Aflou (Laghouat)	1,27±0,02
		Milok (Laghouat)	1,04±0,03
<i>C. aurantium</i>	Zeste	Laghouat	14,47±0,46
<i>C. limon</i>	Zeste	Laghouat	25,23±1,05
BHA (standard)	-	-	0,0088±0,0001
Vitamine C (standard)	-	-	0,0044±0,0005

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes par leur nature. Étant un mélange cela représente un potentiel pour le développement d'interactions synergiques, additives ou antagonistes (**Adolphe Christian, 2012**). La variation des valeurs moyennes de l'IC₅₀ des différentes huiles essentielles de plantes étudiées serait due à leur composition chimique. En général, les huiles essentielles riches en composés oxygénés présentent une activité antioxydante plus marquée que celles à composés hydrocarbonés (**Toure, 2015**). La manifestation de ces activités n'est pas cohérente avec l'hypothèse ci-dessus et peut être due à la présence de certains composés particuliers ou à leurs effets de synergie.

Il est établi dans de nombreux travaux que l'activité d'une huile essentielle est en rapport avec les composés majoritaires et les possibles effets synergiques entre les constituants. L'absence d'activité antioxydante des terpènes hydrocarbonés serait due à leur faible capacité donatrice d'un atome d'hydrogène (**Toure, 2015**).

En comparant les IC₅₀ des HEs d'*A. campestris* obtenus au cours de notre étude avec ceux rapportés dans la littérature, on remarque que nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Akrouf et al, 2010**. Ceux-ci ont trouvé un IC₅₀ de 1,87 mg/mL pour la même espèce végétale originaire du Tunisie (Beni Khedache). D'autre part, ces valeurs sont relativement supérieures à celle de **Boulanouar et al. 2013**. En effet, ces auteurs ont trouvé par la méthode de DPPH un IC₅₀ de 9,96 mg/mL (régions de Laghouat et Djebel Amour). D'autre part, **Lopes et al, 2008** ont indiqué que les HEs du genre *Artemisia* possédaient une faible activité antioxydante et ceci lors des études qui ont été faites sur certaines espèces d'*Artemisia* (*A. absinthium*, *A. biennis*, *A. cana*, *A. dracunculus*, *A. frigida*, *A. longifolia* et *A. ludoviciana*). L'huile essentielle d'*Artemisia* est riche des composés non phénoliques.

Les activités obtenues avec les huiles essentielles des Citrus étudiée restent très faibles par rapport aux rapports de la littérature. En effet, **Tundis et al, 2012** ont trouvé un IC₅₀ de 0,189 mg/mL pour l'espèce *C. aurantium* provenant de l'Italie. Cependant, **Ghoorchibeigi, 2017** ont signalé un IC₅₀ de 0,285 mg/mL pour l'espèce *C. limon* originaire de l'Iran, alors que **Himed et Barkat, 2014** ont indiqué un IC₅₀ de 0,0054 mg/mL pour la même espèce de l'Algérie (Constantine). Cette faible activité des Citrus est en rapport avec les composés majoritaires. Selon **Fisher et Phillips 2008**, le composé majoritaire d'huile essentielle de genre Citrus est le Limonène (32% à 98%). **Bacanli et al, 2015**, ont rapporté que le Limonène possède une activité antioxydante de l'ordre de (IC₅₀ = 1265 µM testé par TEAC) et elle est proportionnelle à la concentration de ce composé majoritaire.

De plus, L'huile essentielle des zestes de *C. aurantium* possède une faible activité selon [Sarrou et al 2013](#), lors d'une étude de comparaison réalisée entre plusieurs organes (zestes, feuilles et fleurs).

II-1-2- Activité antibactérienne :

Les huiles essentielles pures des parties aériennes d'*A. campestris* et des zestes de *C. aurantium* et *C. limon* ont été testées sur cinq souches cliniques. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés pour chaque disque imprégné. Les résultats du test de sensibilité microbienne au mélange des trois HE sont reportés dans le Tableau III.6.

Selon le tableau ci-dessous (Tableau III.6), l'activité antibactérienne, exprimé par millimètre du diamètre de zone d'inhibition, est proportionnelle avec la concentration en huile essentielle et varie également en fonction de la bactérie cible. Les tests biologiques effectués ont confirmé l'activité antibactérienne des huiles essentielles de ces trois espèces. Il est à noter que les cinq souches manifestent une sensibilité à l'action de ces huiles essentielles même aux les faibles concentrations.

Tableau III.6. Activité antibactérienne des huiles essentielles des parties aérienne d'*A. campestris* et des zestes de *C. aurantium* et *C. limon* sur les souches bactériennes.

HEs	Concentrations	Diamètre d'inhibition (mm)				
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
<i>Artemisia campestris</i>	100 %	33,17±3,40	28,63±1,96	30,08±0,89	28,00±4,95	28,40±4,20
	50 %	14,10±1,27	11,33±0,76	16,00±1,32	10,00±0,87	11,29±3,94
	20 %	14,00±2,18	7,90±0,00	10,07±0,75	7,50±0,00	9,23±0,68
<i>Citrus aurantium</i>	100 %	24,95±3,97	27,20±2,34	23,90±1,33	15,36±0,89	22,99±6,53
	50 %	15,27±0,46	21,23±1,46	24,43±2,11	11,79±0,83	11,67±3,87
	20 %	10,90±0,53	8,45±1,06	10,53±0,85	9,86±1,87	10,68±0,84
<i>Citrus limon</i>	100 %	28,88±4,19	22,20±0,00	17,57±2,10	14,35±4,74	13,81±2,72
	50 %	23,03±5,61	15,73±1,50	15,53±2,37	12,85±1,20	10,30±0,50
	20 %	18,41±2,10	11,17±1,67	10,47±0,06	-	-
Gentamicine		25,16±2,46	33,64±1,76	24,90±1,76	33,93±1,48	34,03±0,69
Streptomycine		22,66±1,40	36,91±1,42	24,12±1,72	34,67±1,01	34,98±1,35

L'activité antibactérienne la plus élevée a été observée chez l'huile d'*A. campestris* (Figure III.4) qui a montré une efficacité inhibitrice très efficace ($\varnothing \geq 25$ mm) contre tous les bactéries *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, *M. luteus* et *L. monocytogenes* ; nous avons trouvé des zones d'inhibition autour des disques d'huile essentielle brute. En effet, les diamètres sont de l'ordre de $33,17 \pm 3,40$ mm contre *E. coli*, de $28,63 \pm 1,96$ mm contre *S. aureus*, de $30,08 \pm 0,89$ mm contre *B. cereus*, de $28,00 \pm 4,95$ mm contre *M. luteus* et de $20,40 \pm 4,20$ mm contre *L. monocytogenes*. Ce pouvoir inhibiteur de cette huile est dû essentiellement à sa composition chimique riche en monoterpènes dont le taux global atteint environ 97,34%. Il y a une corrélation directe entre l'activité antibactérienne et la concentration en monoterpènes (Balchin et Deans, 1998). Le Linalool et l' α -Pinène sont indiqués comme étant responsables d'activité bactériostatique à faible concentration et bactéricide à plus forte concentration (Aouni et al, 2013).

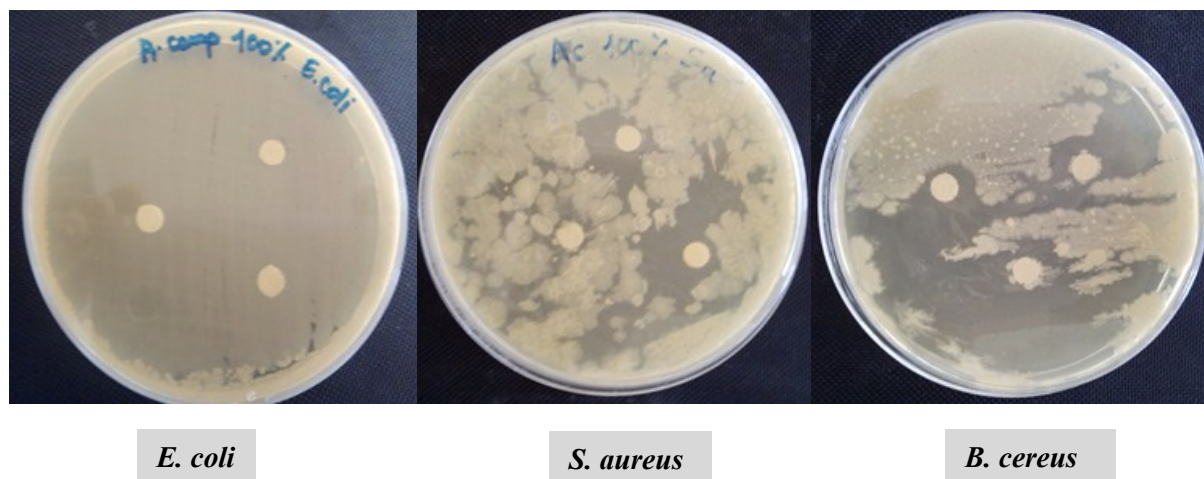


Figure III.4. Photos montrant l'effet d'huile essentielle brute d'*A. campestris* sur certaines bactéries.

Les huiles essentielles des *Citrus* présentent une activité antibactérienne remarquable contre tous les souches (Tableau III.6). Ces derniers présentent une sensibilité différentielle avec l'ensemble des huiles essentielles de *Citrus*. De nombreux auteurs relient leur pouvoir antimicrobien à la composition chimique et annoncent qu'il peut être corrélé positivement aux composants phytochimiques tels que les monoterpènes (Lis-Balchin et Deans, 1998). Beaucoup de travaux rapportent la richesse des huiles essentielles des *Citrus* en monoterpènes.

Les résultats montrent que l'huile essentielle brute de *C. aurantium* présente une action inhibitrice importante ($25 > \varnothing \geq 16$ mm) contre tous les souches bactérienne (les diamètres sont de l'ordre de $24,95 \pm 3,97$ mm contre *E. coli*, de $20,20 \pm 2,34$ mm contre *S. aureus*, de $23,90 \pm 1,33$ mm contre *B. cereus* et de $22,99 \pm 6,53$ mm contre *L. monocytogenes*), sauf pour la souche *M. luteus*. D'après les aromatoigrammes, l'huile de *Citrus aurantium* a une activité de niveau intermédiaire ($\varnothing = 15,36 \pm 0,89$ mm) sur cette souche.

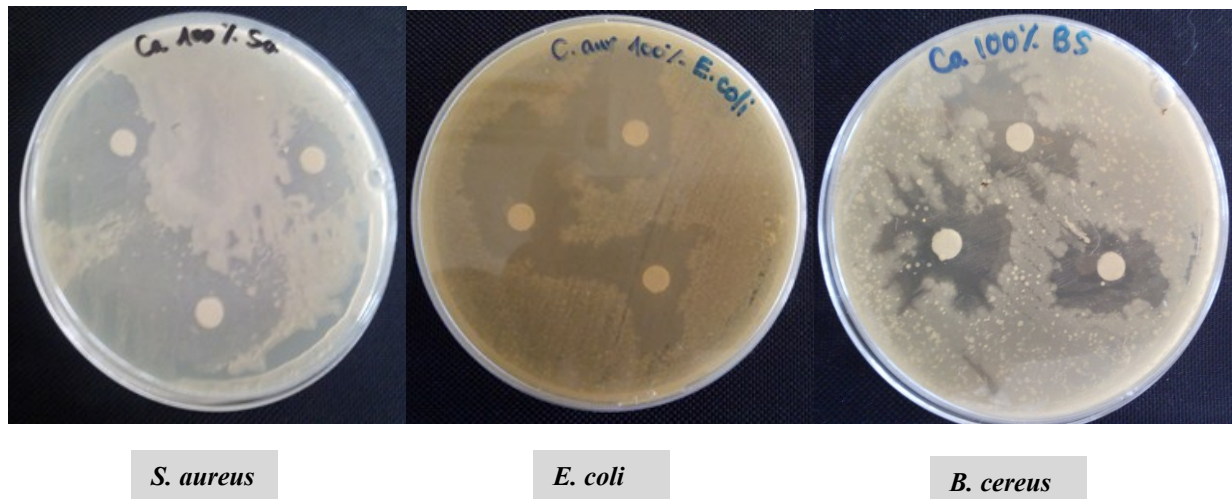


Figure III.5. Photos montrant l'effet d'huile essentielle brute de *C. aurantium* sur certaines bactéries.

Concernant l'huile essentielle de *C. limon*, nous avons une activité antibactérienne variable contre les microorganismes. Cette huile montre une action inhibitrice intermédiaire contre les souches *M. luteus* et *L. monocytogenes* avec diamètres de zone d'inhibition de $14,35 \pm 4,7$ mm et $13,81 \pm 2,72$ mm, respectivement, et présente une activité inhibitrice importante sur les germes *S. aureus* ($22,20 \pm 0,00$ mm) et *B. cereus* ($17,57 \pm 2,10$ mm), alors que même huile montre une action inhibitrice très efficace contre *E. coli* avec un diamètre de $28,88 \pm 4,19$ mm et elle est la souche la plus sensible.

De ce qui précède, on remarque que l'huile de *C. aurantium* possède une activité supérieure à celle de *C. limon* sauf dans le cas de la bactérie *E. coli*. Cette souche manifeste une certaine résistance vis-à-vis d'huile de *C. aurantium* ($\varnothing = 24,95 \pm 3,97$ mm) par rapport l'huile de *C. limon* ($\varnothing = 28,88 \pm 4,19$ mm).

Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles dépendent à leur composition chimique. Ce dernier est probablement lié à des facteurs tels que le génotype, l'organe végétal, les conditions géographiques et écologiques, la période de récolte, et la méthode d'extraction

(Settanni et al, 2013). D'après Spadaro et al, 2001 la différence entre les techniques d'agricultures cause des changements dans la composition chimique des HEs et, par conséquence, dans leurs activités antimicrobienne.

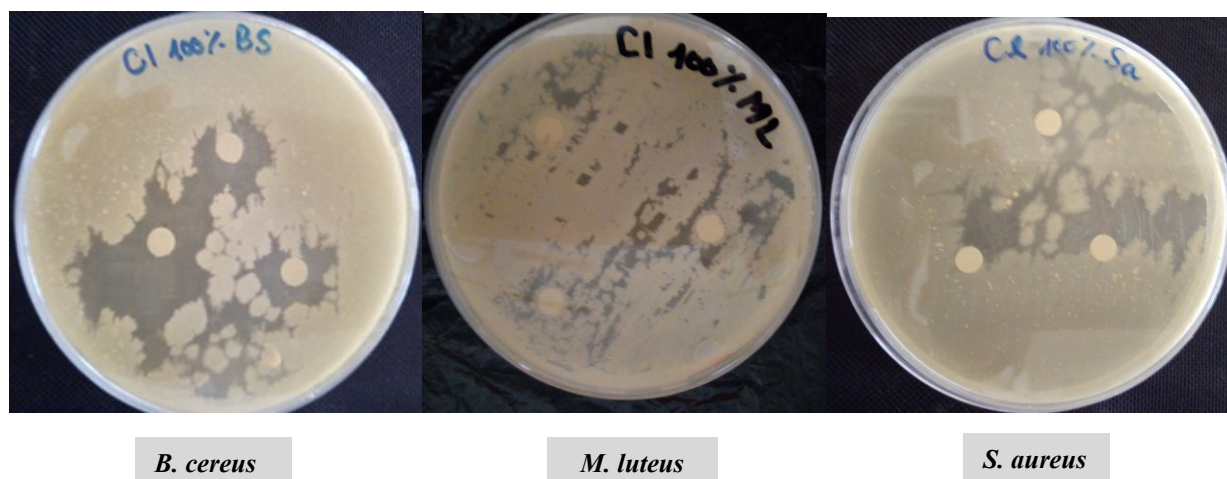


Figure III.6. Photos montrant l'effet d'huile essentielle brute de *C. limon* sur certaines bactéries.

Plusieurs auteurs ont travaillé sur l'activité antimicrobienne des composés majeurs des huiles essentielles, qu'ils ont classés dans l'ordre suivant : phénols (forte activité) > alcools > aldéhydes > cétones > éthers > hydrocarbures. De même, d'autres auteurs ont prouvé que les huiles essentielles, riches en terpénols, sont dotées d'un grand pouvoir bactéricide (Satrani et al., 2006). De plus Fisher et Phillips 2008, ont démontré que les huiles essentielles à des fortes concentrations de terpènes, sont plus efficaces contre les microorganismes. Cependant, Akrouf et al, 2010, ont signalé que l'activité antibactérienne des huiles essentielles est probablement due à la synergie entre les composés majoritaires. Certaines études ont été conclues que l'huile essentielle possède une activité antibactérienne supérieure à celle du mélange de leurs composés majoritaires, ce qui suggère que les composés minoritaires contribuent également à améliorer cette activité et probablement possède un effet synergique (Burt, 2004).

La diversité des molécules à pouvoir antimicrobien, présentes dans les HEs provoque des effets efficaces contre une grande variété d'organismes, y compris les bactéries, et rend la résistance difficile, voire même impossible, puisque les souches microbiennes ne peuvent pas opérer des mutations conduisant à des résistances simultanées *vis-à-vis* de toutes les molécules bioactives. À cause de cette diversité, les HEs possédant une l'activité antibactérienne semble résulter de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (Bakkali et al, 2008 ; Aouni et al, 2013).

Les mécanismes des HEs sur les cellules bactériennes sont incomplètement compris, mais il existe un certain nombre de mécanismes proposés (Fisher et Phillips, 2008 ; Bakkali et al., 2008 ; Azhdarzadeh et Hojjati, 2016).

La principale caractéristique des constitués des HEs est leur hydrophobicité. Elle permet de traverser la paroi cellulaire et la membrane plasmique, ce qui provoque une déstabilisation de la structure de leurs différentes couches de polysaccharides, d'acides gras et de phospholipides et une augmentation de la perméabilité membranaire. Ces modifications entraînent une fuite d'ions qui provoque la chute de la force motrice et, donc, de la synthèse d'ATP. L'altération de la paroi cellulaire et de la membrane entraîne une perte du matériel intracellulaire. Les huiles essentielles peuvent coaguler le cytoplasme et endommager les lipides et les protéines.

Les monoterpènes sont des composés apolaires doués d'un grand pouvoir pénétrant. Ils se diffusent dans les structures membranaires bactériennes et les endommagent en augmentant leur perméabilité. Ils inhibent les enzymes intercellulaires et extracellulaires. Ils agissent comme un régulateur du métabolisme cellulaire et ils affectent la synthèse enzymatique dans le noyau ou le ribosome. Ils interagissent avec l'absorption de nutriments provenant de l'environnement ce qui affecte la croissance bactérienne. Les monoterpènes oxygénés (Linalool, α -Terpinéol et Linalyl acétate) sont les composés qui possèdent une forte activité antimicrobienne, et l'augmentation de leurs concentrations dans l'HE amélioré les propriétés antimicrobiennes (Azhdarzadeh et Hojjati, 2016).

Certaines études ont trouvé que les bactéries Gram positives sont plus sensibles aux HEs que les bactéries Gram négatives, cela peut être dû à l'imperméabilité liée à la membrane externe entourant les bactéries Gram négatives (Fisher et Phillips, 2008). De plus, l'activité antimicrobienne dépend aussi de l'état de croissance cellulaire, les cellules en division étant beaucoup plus sensibles probablement parce que les HEs pénètrent plus efficacement aux sites de bourgeonnement (Bakkali et al, 2008).

II-2- Étude de synergie entre les huiles essentielles (Test de combinaison) :

Différentes plantes possèdent différents constituants bioactifs avec différentes activités antioxydantes. Lorsqu'ils sont pris ensemble, les mélanges présentent une capacité antioxydante supérieure ou inférieure à leurs extraits individuels. Cela peut être dû à une interaction synergique, additive ou antagoniste entre différents composés (Sonam et Guleria, 2017).

II-2-1- Activité antioxydante :

L'activité antioxydante de certaines formulations binaires et tertiaires des trois huiles essentielles a été évaluée face au DPPH. Les résultats de ce test (les valeurs expérimentales), ainsi les valeurs théoriques et le gain d'activité sont présentés dans le Tableau III.7.

Plusieurs combinaisons ont été utilisées avec des rapports volumiques différents (10:90, 30:70, 50:50, 70:30, 90:10 « pour les combinaisons binaires » et 10:45:45, 30:35:35, 50:25:25, 70:15:15 « pour les combinaisons tertiaires »), car les interactions synergiques sont très sensibles et dépendent des types de composés différents dans la combinaison et également de leurs proportions relatives (Sonam et Guleria, 2017).

Les résultats de l'activité antioxydante relatives aux mélanges des huiles essentielles (Tableau III.7), montrent de manière claire que les valeurs expérimentales sont pour la majorité supérieures à celles des valeurs issues de l'additivité (valeurs théoriques calculées), avec un gain d'activité allant de 16,83 à 80,01%. Ces valeurs confirment l'existence de différentes interactions de type synergétiques entre les différents mélanges d'HEs (binaires et tertiaires) lors de la détermination de cette activité antioxydante.

Les mélanges tertiaires ont démontré les effets synergétiques les plus élevés et ceci pour toutes les combinaisons des mélanges utilisés (pour les proportions volumiques adoptées). Le meilleur effet a été enregistré pour la combinaison 30/35/35 (v/v/v), avec un gain d'activité de 80,01% par rapport la valeur théorique. Les meilleurs effets enregistrés pour les mélanges binaires AC/CA et AC/CL sont toutes les deux relatives à la combinaison (50/50) (v/v), avec des gains d'activités de 68,92% et de 77,85%, respectivement. Par ailleurs pour le mélange CA/CL on a trouvé le meilleur effet synergétique pour la proportion 10/90 (v/v), avec un gain d'activité de 38,35% par rapport la valeur théorique.

L'évaluation de synergie de différentes combinaisons possibles de trois huiles essentielles a montré des interactions synergiques dans l'activité antioxydante indique que la capacité de don de protons de ces combinaison est élevée par rapport à la seule combinaison CA/CL 70/30 (v/v) (Sonam et Guleria, 2017).

Tableau III.7. Les valeurs expérimentales de l'activité antioxydante des huiles essentielles combinée comparée avec les valeurs théoriques.

	Mélange	Rapports volumiques des combinaisons	IC ₅₀ , DPPH (mg/mL) Expérimental	IC ₅₀ , DPPH (mg/mL) Théorique (additivité)*	Gain d'activité (%)
HES individuelles	<i>A. campestris</i>	-	1,04	-	-
	<i>C. aurantium</i>	-	14,47	-	-
	<i>C. limon</i>	-	25,23	-	-
Combinaisons binaires	AC/CA	10/90 (v/v)	6,74	13,13	48,66
		30/70 (v/v)	3,58	10,44	65,71
		50/50 (v/v)	2,41	7,76	68,92
		70/30 (v/v)	1,63	5,07	67,84
	AC/CL	10/90 (v/v)	9,62	22,81	57,83
		30/70 (v/v)	4,29	17,97	76,13
		50/50 (v/v)	2,91	13,14	77,85
		70/30 (v/v)	2,2	8,30	73,48
	CA/CL	10/90 (v/v)	14,89	24,15	38,35
		30/70 (v/v)	14,97	22,00	31,96
		50/50 (v/v)	16,51	19,85	16,83
		70/30 (v/v)	20,66	17,70	-16,74
Combinaisons tertiaires	AC/CA/CL	10/45/45 (v/v/v)	9,43	17,97	47,52
		30/35/35 (v/v/v)	2,84	14,21	80,01
		50/25/25 (v/v/v)	2,31	10,45	77,88
		70/15/15 (v/v/v)	1,72	6,68	74,26

*L'additivité a été calculé selon la formule suivante : $(\sum X_{vi} \times IC_{50i}) \times 100\%$,

Où X_{vi} est la fraction volumique de l'huile « i » dans la combinaison volumique.

AC : *Artemisia campestris*, CA : *Citrus aurantium*, CL : *Citrus limon*.

Parmi les mélanges testées, seule la combinaison CA/CL 70/30 (v/v) n'a pas montré un effet synergétique et on observe une perte d'activité dans ce cas de 16,74% par rapport la valeur théorique calculée. Ce résultat pourrait être expliqué par un effet d'antagonisme entre les différents constituants biologiques de différentes huiles essentielles étudiées (*C. aurantium* et *C. limon*). Les interactions synergiques sont très sensibles et dépendent des types de composés différents dans la combinaison et également de leurs proportions relatives (Sonam et Guleria, 2017).

D'après ces résultats obtenus, une utilisation des mélanges des huiles essentielles à la place de certains antioxydants de synthèse pourrait être envisagée (ou suggérée) dans le domaine de l'industrie agro-alimentaire, pharmaceutique et de la cosmétique. Ils peuvent être utilisés pour

réduire les concentrations d'une partie des huiles utilisées dont les rendements ou l'abondance sont faibles, et par la suite réduire aussi les éventuels effets secondaires et garantir les propriétés organoleptiques désirées.

D'après **Bag et Chattopadhyay, 2015**, l'efficacité antioxydante des huiles essentielles de certaines espèces sélectionnées (feuilles de Laurier, Poivre noir, Coriandre « graine et feuille », Cumin, Ail, Gingembre, Moutarde, Oignon et Curcuma) en combinaison ont montré des interactions synergiques. L'évaluation de différentes combinaisons possibles de ces espèces a montré que seule la combinaison Coriandre/« graines de Cumin » produit des interactions synergiques dans les activités antioxydantes, alors que d'autres combinaisons ont montré seulement des effets additifs.

Cependant, **Misharina et Samusenko, 2008** ont réalisé des études sur les HE de Citron, de Coriandre, d'Ail et de Girofle et leurs mélanges sur l'inhibition de l'auto-oxydation d'un aldéhyde (Hexanal) à un acide carboxylique (Hexanoïque). Le mélange binaire de Citron et de Coriandre a présenté une activité antioxydante inférieure à celle des huiles individuelles. Alors que le mélange tertiaire de Citron, d'Ail et de Coriandre a montré une activité antioxydante supérieure à celle des huiles individuelles.

Différentes plantes possèdent différents constituants bioactifs avec différentes activités antioxydantes. Lorsqu'ils sont pris ensemble, les mélanges présentent une capacité antioxydante supérieure ou inférieure à leurs extraits individuels. Cela peut être dû à une interaction synergique, additive ou antagoniste entre différents composés (**Sonam et Guleria, 2017**).

Nous avons aussi suivi la variation de l'IC₅₀ de trois mélanges AC/CA, AC/CL et AC/CA/CL en fonction du rapport d'huile essentielle de l'*A. campestris* (Figure III.7). De façon générale, on remarque que l'activité antioxydante des trois mélanges augmente (soit IC₅₀ diminue) avec l'augmentation du rapport d'huile essentielle de l'*A. campestris* (huile essentielle la plus active). La variation de l'activité antioxydante des trois mélanges passe par deux phases importantes. La première phase (de 0 à 30%) est caractérisée par une augmentation rapide de l'activité antioxydante. La deuxième phase (de 30 à 100%) est caractérisée par une augmentation lente de cette activité.

De ce qui précède et compte-tenu que le rendement d'huile d'*A. campestris* est inférieure à celle de deux *Citrus* et *vice-versa* pour l'activité antioxydante, on peut considérer la combinaison AC/(CA ou CL) (30/70) (v/v) comme la combinaison optimale, car dans ce rapport, l'activité antioxydante reste plus élevée (l'IC₅₀ ne pas dépasser 2,2 mg/mL) et on utilise un faible volume (30%) d'huiles essentielles « précieuses » avec les huiles essentielles abondantes (70%).

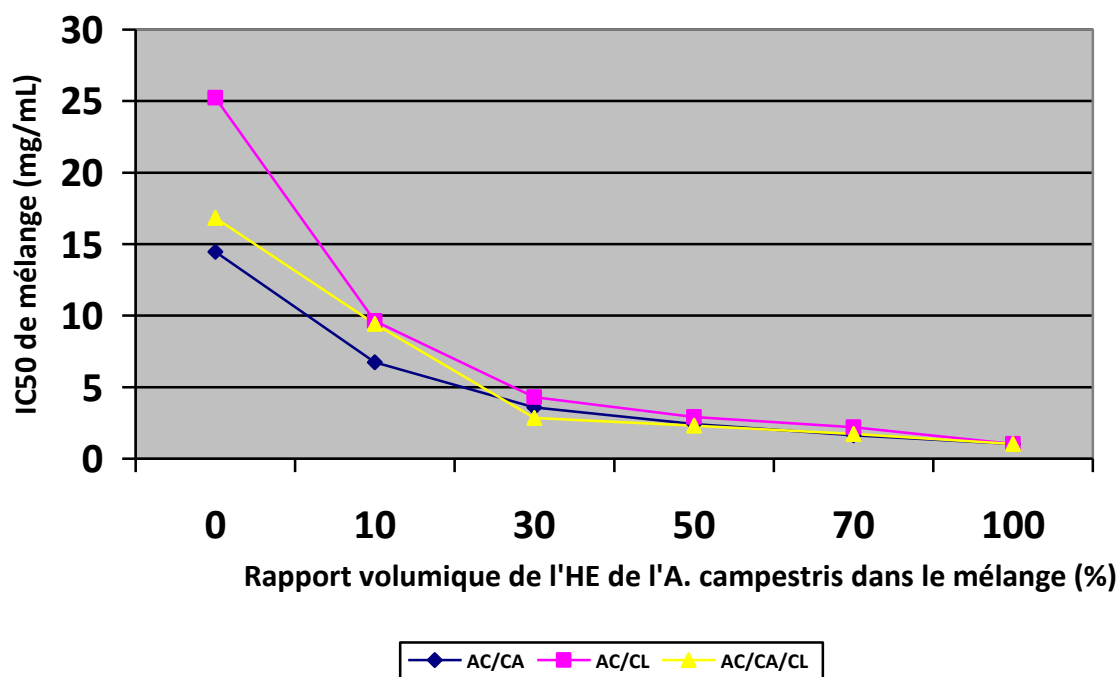


Figure III.7. Variation de l'IC₅₀ du mélange en fonction du rapport d'huile essentielle de l'*A. campestris*. (Pour le mélange tertiaire les fractions volumiques de CA et CL sont similaires)

II-2-2- Activité antibactérienne

Les mélanges des huiles essentielles ont ensuite été soumis à une activité antimicrobienne, les résultats (Tableau III.8, figures III.7&8) obtenus sont exprimés en diamètres des zones d'inhibition (valeurs expérimentales) pour les différentes combinaisons de différentes huiles essentielles *vis-à-vis* des souches testées et sont comparées aux valeurs théoriques calculées. Les valeurs du gain d'activités sont évaluées.

Plusieurs combinaisons ont été utilisées avec des rapports différents (30:70, 50:50, 70:30) pour les combinaisons binaires et (20:20:60, 20:60:20, 30:30:30, 60:20:20) pour les combinaisons tertiaires.

Les résultats de sensibilité microbienne aux mélanges des huiles essentielles représentés sur le tableau III.8, montrent une synergie tandis que d'autres combinaisons ont montré des effets additifs et antagonistes. On observe que toutes les combinaisons binaires et tertiaires ont montré des effets antagonistes contre la souche *E. coli* (bactérie Gram négative) avec une perte d'activité entre 46,73 et 72,87%. Les bactéries Gram-négatives sont insensibles aux huiles essentielles par rapport les bactéries Gram-positives, cela peut-être dû à l'imperméabilité relative à la membrane externe entourant les bactéries Gram-négatives (Fisher et Phillips, 2008).

L'antibiogramme réalisé avec *S. aureus* montre que les mélanges tertiaires et le mélange AC/CL : 70/30 (v/v) possèdent des effets synergétiques avec des zones d'inhibitions supérieures à celles des valeurs théoriques, les valeurs du gain d'activité de ces mélanges sont toutes supérieures à 14%. Les différentes combinaisons de CA/CL ainsi que la combinaison AC/CA : 30/70 (v/v) montrent des effets antagonistes contre même souche. Les autres combinaisons ont montré des effets additifs, les valeurs expérimentales de ces combinaisons sont presque similaires avec celles de la théorie.

Le mélange AC/CA/CL : 20/20/60 (v/v/v) et les deux mélanges CA/CL : 30/70 (v/v) et CA/CL : 50/50 (v/v) montrent des effets antagonistes sur la souche *B. cereus*. Alors que les autres mélanges montrent une synergie contre cette souche, et en particulier avec les combinaisons AC/CA/CL : 30/30/30 (v/v/v), AC/CL : 30/70 (v/v) et AC/CL : 50/50 (v/v), qui représentent des gains d'activités considérables et égales à 29,78%, 30,05%, 31,46%, respectivement.

En ce qui concerne *M. luteus*, les mélanges qui représentent des effets synergétiques sont : AC/CL : 50/50 (v/v), AC/CL : 70/30 (v/v), CA/CL : 50/50 (v/v), AC/CA/CL : 20/60/20 (v/v/v),

Ac/Ca/Cl : 60/20/20 (v/v/v), L'antibiogramme réalisé avec cette souche provoque des zones d'inhibitions plus élevés par rapport les valeurs théoriques avec gain d'activité de 24,03 à 67,65%. Les deux combinaisons CA/CL : 70/30 (v/v) et AC/CL : 30/70 (v/v) exercent un effet antagoniste avec une perte d'activité de 22,10% et 33,15%, respectivement. Alors que les autres combinaisons testées montrent des effets additifs.

Pour *L. monocytogenes*, un effet synergique a été obtenu surtout avec les mélanges tertiaires et le mélange AC/CL, et l'effet synergique le plus significatif a été enregistré avec la combinaison AC/CA/CL : 20/20/60 (v/v/v), avec gain d'activité de 51,48%. Les autres mélanges montrent des effets antagonistes surtout avec la combinaison AC/CA : 30/70 (v/v), avec une perte d'activité de 42,63%.

D'après ces résultats, On peut observer une grande variabilité de la sensibilité des souches aux mélanges. On peut également observer que les combinaisons testées de trois huiles essentielles montrent des effets synergiques. Cette dernière serait due aux différents chémotypes présents dans le mélange. Il apparaît évidemment que l'effet optimal ne pourrait être attribué à un seul constituant. La sensibilité des souches utilisées est liée à la combinaison des familles phytochimiques au sein du mélange et surtout à leur synergie. D'autre part, la composition du mélange des huiles essentielles met en évidence les différents groupes chimiques susceptibles d'être à l'origine de cette bio-activité, à savoir les composés terpéniques, phénols, alcools et cétoniques (Aouni et al, 2013).

L'efficacité de ces mélanges des huiles essentielles semble reposer sur des mécanismes tels que la fragilisation de la membrane microbienne la rendant très perméable et entraînant une forte fuite du potassium ayant pour conséquence irréversible la mort microbienne (Aouni et al, 2013). L'effet synergétique peut être dû à la complémentarité entre les constituants des huiles essentielles, ou bien à la formation de complexe entre les agents antibactériens contenus dans ces huiles, qui devient effective dans la destruction d'une souche particuliers de microorganismes probablement en agissant sur la paroi cellulaire ou en causant leur lyse.

Les résultats obtenus avec les mélanges des huiles essentielles montrent un intérêt majeur dans leur utilisation en prévention des contaminations microbiennes et permettent de suggérer l'utilisation de ces mélanges à la place de certains antibiotiques de synthèse pourrait être envisagée dans le domaine de l'industrie agro-alimentaire et de la cosmétique. Ils peuvent être d'utiliser pour réduire les concentrations des huiles utilisées, et donc réduire les éventuels effets secondaires et garantir les propriétés organoleptiques.

Tableau III.8. Valeurs expérimentales de l'activité antibactérienne des huiles essentielles combinées comparée avec les valeurs théoriques.

Mélange	Rapports volumiques des combinaisons	<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>			<i>B. cereus</i>			
		DZI (mm) Expérimental	DZI (mm) Théorique (additivité)*	Gain d'activité %	DZI (mm) Expérimental	DZI (mm) Théorique (additivité)*	Gain d'activité %	DZI (mm) Expérimental	DZI (mm) Théorique (additivité)*	Gain d'activité %	
Combinaisons binaires	AC/CA	30/70 (v/v)	8.95	27.42	-67.35	24.67	27.63	-10.71	28.74	25.75	11.59
		50/50 (v/v)	9.83	29.06	-66.17	28.83	27.92	3.28	31.17	26.99	15.49
		70/30 (v/v)	8.33	30.70	-72.87	29.55	28.20	4.78	32.73	28.23	15.96
	AC/CL	30/70 (v/v)	-	30.17	-	24.5	24.13	1.54	27.73	21.32	30.05
		50/50 (v/v)	10.54	31.03	-66.03	26.83	25.42	5.57	31.32	23.83	31.46
		70/30 (v/v)	8.8	31.88	-72.40	30.55	26.70	14.42	32.83	26.33	24.70
	CA/CL	30/70 (v/v)	16.1	27.70	-41.88	15.5	23.70	-34.60	16.33	19.47	-16.12
		50/50 (v/v)	-	26.92	-	18.28	24.70	-25.99	17.93	20.74	-13.53
		70/30 (v/v)	13.92	26.13	-46.73	22.67	25.70	-11.79	24.9	22.00	13.18
Combinaisons tertiaires	AC/CA/CL	20/20/60 (v/v/v)	12.33	28.95	-57.41	28.67	24.49	17.09	18.57	21.34	-12.97
		20/60/20 (v/v/v)	-	27.38	-	30.71	26.49	15.95	29.02	23.87	21.58
		30/30/30 (v/v/v)	-	29.00	-	31.52	26.01	21.20	30.95	23.85	29.78
		60/20/20 (v/v/v)	-	30.67	-	32.7	27.06	20.85	31.33	26.34	18.94

*L'additivité a été calculé selon la formule suivante : $(\sum X_{vi} \times DZI_i) \times 100$

Où X_{vi} est la fraction volumique de l'huile « i » dans la combinaison volumique.

AC : *Artemisia campestris*, CA : *Citrus aurantium*, CL : *Citrus limon*, DZI : Diamètre de zone d'inhibition.

Tableau III.8. (Suite)

	Mélange	Rapports volumiques des combinaisons	<i>M. luteus</i>			<i>L. monocytogenes</i>		
			DZI (mm) Expérimental	DZI (mm) Théorique (additivité)*	Gain d'activité %	DZI (mm) Expérimental	DZI (mm) Théorique (additivité)*	Gain d'activité %
Combinaisons binaires	AC/CA	30/70 (v/v)	-	19.15	-	14.12	24.61	-42.63
		50/50 (v/v)	23.36	21.68	7.75	22.19	25.70	-13.64
		70/30 (v/v)	24.25	24.21	0.17	24.98	26.78	-6.71
	AC/CL	30/70 (v/v)	12.33	18.45	-33.15	24.75	18.19	36.09
		50/50 (v/v)	26.48	21.18	25.05	30.94	21.11	46.60
		70/30 (v/v)	29.65	23.91	24.03	31.51	24.02	31.17
	CA/CL	30/70 (v/v)	13.63	14.65	-6.98	18.07	16.56	9.09
		50/50 (v/v)	22.68	14.86	52.68	21.76	18.40	18.26
		70/30 (v/v)	11.73	15.06	-22.10	16.71	20.24	-17.42
Combinaisons tertiaires	AC/CA/CL	20/20/60 (v/v/v)	17.1	17.28	-1.05	28.12	18.56	51.48
		20/60/20 (v/v/v)	29.65	17.69	67.65	29.36	22.24	32.04
		30/30/30 (v/v/v)	-	19.23	-	30.96	21.73	42.47
		60/20/20 (v/v/v)	30.17	22.74	32.66	31.37	24.40	28.57

*L'additivité a été calculé selon la formule suivante : $(\sum X_{vi} \times DZI_i) \times 100$

Où X_{vi} est la fraction volumique de l'huile « i » dans la combinaison volumique.

Ac : *Artemisia campestris*, Ca : *Citrus aurantium*, Cl : *Citrus limon*, DZI : Diamètre de zone d'inhibition.



Figure III.8. Photos de l'effet du mélange binaires AC/CL avec des rapports différents sur la souche *S. aureus*.



Figure III.9. Photos de l'effet du mélange tertiaires AC/CA/CL avec des rapports différents sur la souche *B. cereus*.

L'association de plusieurs huiles essentielles augmente la diversité des molécules bioactives à pouvoir antibactérien au niveau d'un mélange rend la résistance difficile, voire impossible car les souches bactériennes ne peuvent pas opérer des mutations conduisant à des résistances simultanées contre toutes les composés actifs (Aouni et al, 2013).

L'association de plusieurs huiles essentielles serait donc un moyen efficace pour diminuer le risque de résistances, augmenter l'efficacité de l'activité antimicrobienne et surtout contribuer à l'élargissement du spectre d'activités contre plusieurs souches microbiennes.

Peu de travaux se sont intéressés à la synergie des mélanges des huiles essentielles et à l'optimisation de l'activité antibactérienne. Des travaux récemment publiés mettent en évidence l'intérêt des mélanges des huiles essentielles dans l'optimisation de leurs effets et la synergie de leurs composés (Aouni et al, 2013).

D'après Bag et Chattopadhyay, 2015, ils ont évalué l'activité antibactérienne de différentes combinaisons possibles de certaines huiles essentielles sélectionnées (feuilles de Laurier, Poivre noir, Coriandre (graine et feuille), Cumin, Ail, Gingembre, Moutarde, Oignon et Curcuma). Cette évaluation a montré que seule la combinaison Coriandre / « Graines de cumin » produit des interactions synergiques, alors que d'autres combinaisons ont montré des effets additifs.

Cependant, les résultats obtenus par Barbosa et al, 2016 ont révélé une interaction synergique entre *Origanum vulgare* et *Rosmarinus officinalis*, la combinaison de ces huiles essentielles a révélé une action inhibitrice forte contre des microorganismes pathogènes (*L. monocytogenes*, *E. coli* et *S. Enteritidis*).

D'après Boutkhilla et al, 2011, la combinaison des huiles essentielles de *Seriphidium herba alba* et *Dysphania ambrosioides* a montré un effet synergique contre *Streptococcus agalactiae*

D'ailleurs, Gutierrez et al, 2009 ont mesuré l'activité antibactériennes des combinaisons de certaines huiles essentielles (*Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* et *Melissa officinalis*). Cette étude a révélé que les combinaisons binaires présentent une action additive sur des microorganismes pathogènes (genre *Listeria*).

Conclusion générale

Le but du présent travail été de testé la présence probable de certains effets de synergie (entre autres d'antagonisme), sur l'activité antioxydante (Test DPPH) et antibactérienne, et ceci à partir de plusieurs combinaisons (binaires et tertiaires) d'huiles essentielles. Nous avons pour cela sélectionné trois plantes aromatiques Algériennes (plus particulièrement du Laghouat et de Djelfa) : *Citrus limon*, *Citrus aurantium* et *Artemisia campestris*. Cette dernière espèce a été récoltée de cinq stations différentes (Sidi Bouzid, Charef, Route d'Alger, Aflou et Milok).

Les huiles essentielles issues de différents organes des plantes étudiées, ont été extraites par hydrodistillation à l'aide de l'appareil de type Clevenger. Les rendements en HE de l'*Artemisia campestris* récoltée à Sidi Bouzid, Charef, Route d'Alger, Aflou et Milok sont respectivement de 1,13 ; 0,9 ; 0,7 ; 0,7 et 0,6 %. La distillation des zestes de *Citrus aurantium* fournit 1,28 %, alors que de *Citrus limon* a donné un rendement de 1.38 %.

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles extraites a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse. Les résultats de l'analyse indiquent un chémotype riche en limonène pour les zestes de *Citrus limon* et *Citrus aurantium*. Les échantillons d'*Artemisia campestris* de la région de Sidi Bouzid, de Charef et de R. d'Alger ont été dominés par le β -pinène, alors que les échantillons provenance d'Aflou et Milok ont été dominés par le bicyclogermacrene et le β -myrcène, respectivement.

Au cours de ce travail, une évaluation des activités antibactérienne et antioxydante des huiles essentielles individuelles a été réalisée. L'activité antioxydante des différents HEs a été évaluée par le test du DPPH. Les résultats du pouvoir piègeur du DPPH par les HEs d'*Artemisia campestris* (exprimés en IC₅₀) varient de 1,04 à 1,81 mg/mL). La meilleure activité a été obtenue à partir d'échantillons en provenance de Milok avec un IC₅₀ de 1,04 mg/mL. Cette activité est environ 14 fois supérieurs que celle du *Citrus aurantium* (14,47mg/mL) et environ 25 fois supérieure que celle du *Citrus limon* (25,23 mg/mL). L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été réalisée sur cinq souches par la méthode de diffusion en disque ou aromatogramme. Les HEs issues de trois espèces ont montrés des activités importantes contre toutes les souches de bactéries testées, sachant l'*Artemisia campestris* a manifesté la plus grande efficacité antimicrobienne. Ces résultats obtenus montrent que les espèces végétales à faible rendement en huile essentielle possèdent une bonne activité.

L'effet synergique, de l'activité antibactérienne et antioxydante, entre les HEs des trois plantes a été évalué. Des combinaisons binaires et tertiaires entre les HEs issus des parties

aériennes d'*Artemisia campestris* originaire du Milok et des zestes de *Citrus aurantium* et *Citrus limon* ont été testées pour déterminer l'existence d'une éventuelle synergie. D'après les résultats obtenus, on a constaté que les mélanges testés ont présenté plusieurs effets : synergiques et antagonistes. Pour le teste DPPH, un gain d'activité qui varie de 16,83 à 80,01% a été obtenu. La meilleure activité a été enregistrée avec la combinaison AC/CA/CL (30/35/35) (v/v/v), le seul effet antagoniste a été enregistré avec la combinaison CA/CL (70/30) (v/v). Pour l'activité antimicrobienne l'effet synergétique a donné des gains d'activité allant jusqu'à 67,65% avec la combinaison AC/CA/CL (20/60/20) (v/v/v) contre la souche *M. luteus*, alors que l'effet antagoniste a produit un effet maximum de -72,87%.

Les résultats obtenus permettent de suggérer une utilisation des mélanges des huiles essentielles à la place de certains antibiotiques ou antioxydants de synthèse, et pourrait être envisagée dans le domaine de l'industrie agroalimentaire et de cosmétique. Ces mélanges peuvent être d'utiliser pour réduire les concentrations des huiles utilisées, et donc réduire les éventuels effets secondaires et garantir les propriétés organoleptiques.

Compte-tenu que le rendement d'huile d'*Artemisia campestris* est inférieure à ceux des deux *Citrus* et *vice-versa*, on peut considérer la combinaison AC/CA(ou CL) (30/70) (v/v) comme une combinaison optimale pour les activités antioxydante et antimicrobienne, car dans ce rapport, on a plusieurs effets synergiques, et on utilise un faible volume (30%) d'huile issue de plante la moins abondante avec un volume élevé (70%) d'huile issue de plantes la plus abondante (produite en énormes quantités et aussi très disponible).

Perspectives

- Des travaux visant à l'optimisation des différents effets (synergie et antagonisme) pour les activités antioxydantes et biologiques, en prenant en compte plusieurs combinaisons nécessaires de ces huiles sont fortement recommandés. Ces travaux permettront probablement de trouver des relations entre : composition-activité-synergie/antagonisme et par la suite d'estimer les composants responsables de ces effets combinatoires.
- Dans le même contexte, il serait en plus intéressant de continuer ces travaux notamment sur de nouvelles souches de bactéries.
- Des études complémentaires doivent être prévues afin de déterminer l'effet antibactérien et antifongique d'autres formulations d'huiles essentielles à long terme dans le dessein de valider leur utilisation dans plusieurs domaines. Concernant l'activité antioxydante, il est important d'élargir le spectre d'étude vers d'autres tests.

Références bibliographiques

- Akrout A, Chemli R, Chreïf I, Hammami M (2001) *Analysis of the essential oil of Artemisia campestris L.* Flavour Fragrance Journal 16:337–339.
- Akrout A, Chemli R, Simmonds M, Kite G, Hammami M, Chreïf I (2003) *Seasonal variation of the essential oil of Artemisia campestris L.* Journal of Essential Oil Research 15:333–336.
- Akrout A, Gonzalez LA, El Jani H, Madrid PC (2011) *Antioxidant and antitumor activities of Artemisia campestris and Thymelaea hirsuta from southern Tunisia.* Food and Chemical Toxicology 49:342–347.
- Alsaadawi IS, Alrubeaa AJ (1985) *Allelopathic effects of Citrus aurantium L. I. Vegetational Patterning.* Journal of Chemical Ecology 11:1527–1534.
- Al-Snafi AE (2015) *The Pharmacological importance of Artemisia campestris – a review.* Asian Journal of Pharmaceutical Research 5:88-92.
- Aniya Y, Shimabukuro M, Shimoji M, Kohatsu M, Gyamfi MA, Miyagi C, Kunii D, Takayama F, Egashira T (2000) *Antioxidant and hepatoprotective actions of the medicinal herb Artemisia campestris from the Okinawa Islands.* Biological and Pharmaceutical Bulletin 23:309–312.
- Annick k, Monian M, Ackah JAAB, Kone MW, Traore K (2016) *Étude ethnobotanique des plantes médicinales : cas des affections les plus fréquentes d'une région agricole Daloa (Centre Ouest, Côte d'Ivoire).* Journal of Animal & Plant Sciences 31:5021-5032.
- Aouni M, Pelen F, Soulimani R (2013) *Étude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles et domaines d'application.* Phytothérapie 11:225-236.
- Azadi B, Nickavar B, Amin G (2012) *Volatile constituents of the peel and leaf of Citrus aurantium L. cultivated in the north of Iran.* Journal of Pharmaceutical and Health Sciences 1:37-41.
- Azhdarzadeh F, Hojjati M (2016) *Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Leaf, Ripe and Unripe Peel of Bitter Orange (Citrus aurantium) Essential Oils.* Nutrition and Food Sciences Research 3:43-50.
- Babazadeh DB (2014) *The Effect of Geographical Location on Sour orange (Citrus aurantium L.) Leaf Components.* Agriculture Science Developments 3:302-307.
- Babushok PJ, Linstrom JJ, Reed IG, Zenkevich RL, Brown WG, Mallard SE (2007) *Development of a database of gas chromatographic retention properties of organic compounds.* Journal of Chromatography 1157:414–421.
- Bacanli M, Başaran AA, Başaran N (2015) *The antioxidant and antigenotoxic properties of citrus phenolics limonene and naringin.* Food and Chemical Toxicology 81:160-170.
- Bag A, Chattopadhyay RR (2015) *Evaluation of Synergistic Antibacterial and Antioxidant Efficacy of Essential Oils of Spices and Herbs in Combination.* PLoS One 10:e0131321.

Bakkali F, Avebeck S, Avebeck D, Idaomar M (2008) *Biological effects of essential oils – A review*. Food and Chemical Toxicology 46:446-475.

Balchin ML, Deans SG (1998) *Studies on the Potential Usage of Mixtures of Plant Essential Oils as Synergistic Antibacterial Agents in Foods*. Phytotherapy Research 12:472–475.

Barbosa IDM, Medeiros JADC, Oliveira KARD, Gomes-Neto NJ, Tavares JF, Magnani M, Souza ELD (2016) *Efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of Escherichia coli, Listeria monocytogenes and Salmonella Enteritidis in leafy vegetables*. Food Control 59:468-477.

Belhattab R, Boudjouref M, Barroso JG, Pedro LP, Figueirido AC (2001) *Essential oil composition from Artemisia campestris grown in Algeria*. Advances in Environmental Biology 5:429-432.

Bora KS, Sharma A (2011) *The Genus Artemisia: A Comprehensive Review*. Pharmaceutical Biology 49:101–109.

Boudjelal A, Henchiri C, Sari M, Sarri D, Hendel N, Benkhaled A, Ruberto G (2013) *Herbalists and wild medicinal plants in M'Sila (NorthAlgeria): An ethnopharmacology survey*. Journal of Ethnopharmacology 148:395-402.

Boulanouar B, Abdelaziz G, Aazza S, Gago C, Miguel MG (2013) *Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils*. Industrial Crops and Products 46:85–96.

Bourgou S, Rahali FZ, Ourghemmi I, Tounsi SM (2012) *Changes of Peel Essential Oil Composition of Four Tunisian Citrus during Fruit Maturation*. The Scientific World Journal 2012:528-593.

Bousbia N, Vian MA, Ferhat MA, Meklati BY, Chemat F (2009) *A new process for extraction of essential oil from Citrus peels: Microwave hydro-diffusion and gravity*. Journal of Food Engineering 90:409–413.

Boutemak K, benali N, Nadji MM (2015) *Effect of hemicellulase on extraction of essential oil from algerian Artemisia campestris*. International Journal of Chemical and Molecular Engineering 9:1508:1511.

Boutkhil S, El Idrissi M, Chakir S, Derraz M, Amechrouq A, Chbicheb A, El Badaoui K (2011) *Antibacterial and antifungal activity of extracts and essential oils of Seriphidium herba alba (Asso) Soják and their combination effects with the essential oils of Dysphania ambrosioides (L) Mosyakin & Clemants*. Acta botanica Gallica 158:425-433.

Bruneton, J (1999) *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. 2nd ed. Intercept Ltd., Andover, UK. 1119p.

Burt S (2004) *Essential oils: their antibacterial properties and potential application in food – A review*. International Journal of Food Microbiology 94:223-253.

- Campêlo LM, de Almeida AA, de Freitas RL, Cerqueira GS, de Sousa GF, Saldanha GB, Feitosa CM, de Freitas RM (2011) *Antioxidant and Antinociceptive Effects of Citrus limon Essential Oil in Mice*. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2011:678-673
- Chahad AM, Michalet S, Bechir AB, Tidjani A, Nkongmeneck BA, Dijoux-Franca MG (2015) *Medicinal Plants from the Ouaddai Province (Chad): An Ethnobotanical Survey of Plants Used in Traditional Medicine*. The journal of alternative and complementary medicine 21:569–577.
- Chahma A, Djebbar MR (2008) *Les espèces médicinales spontanées du Sahara septentrional algérien: distribution spatio-temporelle et étude ethnobotanique*. Revue des Sciences et de la Technologie 17:36-45.
- Chalchat JC, Cabassu P, Petrovic SD, Maksimovic ZA, Gorunovic MS (2003) *Composition of essential oil of Artemisia campestris L. From Serbia*. The Journal of Essential Oil Research 15:251-253.
- Charai M, Faid M, Chaouch A (1999) *Essential Oils from Aromatic Plants (Thymus bmussonetti Boiss., Origanum compactum Benth., and Citrus limon (L.) N.L. Burm.) as Natural Antioxidants for Olive Oil*. The Journal of Essential Oil Research 11:517-521.
- Christian A (2012) *Etude de synergie des effets chimiques et biologiques des lipides de réserves et des huiles essentielles des fruits et graines saisonniers de la sous-région Afrique Centrale*. Thèse de doctorat, Université De Toulouse, France, 169 p.
- De Billerbeck VG (2007) *Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques*. Phytothérapie 5:249–253.
- Djerrari A, Crtuzet J (1990) *Influence du mode d'extraction sur le rendement et la composition des huiles essentielles cas du thym (thymus vulgaris L.)*. 1^{er} séminaire maghrébin sur les huiles essentielles, At Tlemcen, Algérie.
- Dob T, Dahamane D, Beramdane T, Chelghoum C (2005) *Chemical composition of the essential oil of Artemisia campestris L. from Algeria*. Pharmaceutical Biology 43:512–514.
- Dongmo PMJ, Tchoumboungang F, Boyom FF, Sonwa ET, Zollo PHA, Menut C (2013) *Antiradical, antioxydant activities and anti-inflammatoiry potential of the essential oils of the varieties of Citrus limon and Citrus aurantifolia growing in Cameroon*. Journal of Asian Scientific Research 3:1046-1057.
- Doukkali Z, Boudida H, Srifi A, Taghzouti K, Cherrah Y, Alaoui K (2015) *Les plantes anxiolytiques au Maroc. Études ethnobotanique et ethno-pharmacologique*. Phytothérapie 13: 306–313
- El Azzouzi F, Zidane L (2015) *La flore médicinale traditionnelle de la région de Béni-Mellal (Maroc)*. Journal of Applied Biosciences 91:8493 – 8502.
- El-Akhal F, Guemmouh R, Greche H, Lalami AE (2014) *Valorisation en tant que bioinsecticide de deux huiles essentielles de Citrus sinensis et Citrus aurantium cultivées au centre du Maroc*

(Valorization as a bio-insecticide of essential oils of *Citrus sinensis* and *Citrus aurantium* cultivated in center of Morocco). *Journal Of Materials And Environmental Science* 5:2319-2324.

Elharas K, Daagare A, Mesfioui A, Ouhssine M (2013) *Activité antibactérienne de l'huile essentielle des inflorescences de Laurus Nobilis et Lavandula Angustifolia*. *Afrique Science* 09: 134 – 141.

Ennajar M, Bouajila J, Lebrihi A, Mathieu F, Savagnac A, Abderraba M, Raies A, Romdhane M (2010) *The influence of organ, season and drying method on chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities of Juniperus phoenicea L. essential oils*. *Journal of the science of food and agriculture* 90:462–470.

Erel SB, Reznicek G, Şsnol SG, Yavasogulu NUK, Konyalioglu S, Zeybek AU (2012) *Antimicrobial and antioxidant properties of Artemisia L. species from western Anatolia*. *Turkish Journal of Biology* 36:75-84.

Fadil M, Farah A, Haloui T, Rachiq S (2014) *Étude ethnobotanique des plantes exploitées par les coopératives et les associations de la région Meknès-Tafilalet au Maroc*. *Phytothérapie* 13: 19–30

Faucher JL, Avril JL (2002) *Bactériologie générale et médicale*. Tome 1, Ellipses (Ed.), Paris, 214p.

Fisher K, Phillips C (2008) *Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer*. *Trends in Food Science & Technology* 19:156 -164.

Flamini G, Tebano M, Cioni PL (2007) *Volatiles emission patterns of different plant organs and pollen of Citrus limon*. *Analytica Chimica Acta* 589:120–124.

Ghanmi M, Satrani B, Aafi A, Isamili MR, Houti H, El Monfalouti H, Benchakroun KH, Aberchane M, Harki L, Boukir A, Chaouch A, Charrouf Z (2010) *Effet de la date de récolte sur le rendement, la composition chimique et la bioactivité des huiles essentielles de l'armoise blanche (Artemisia herba-alba) de la région de Guerçif (Maroc oriental)*. *Phytothérapie* 8:295–301.

Ghasemi E, Yamini Y, Bahramifar N, Yamini Y (2007) *Comparative analysis of the oil and supercritical CO2 extract of Artemisia sieberi*. *Journal of Food Engineering* 79:306-311.

Ghédira K, Goetz P (2015) *Citrus aurantium L. var. amara Link Oranger amer – Bigaradier (Rutaceae)*. *Phytothérapie* 13:320–327.

Gherib. (2009) *Etude des activités antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielle et des flavonoides d'Artemisia herba alba Asso; Artemisia judaica .L. ssp. sahariensis; Artemisia campestris L; Herniaria mauritanica Murb et Warionia saharae Benth. et Cou*. Mémoire de magister. Université Abou Bekr Belkaid —Tlemcen, Algérie. 111p.

- Ghlassi Z, Sayari N, Kallel R, Bougateg A, Sahnoun Z (2016) *Antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory and wound healing effects of Artemisia campestris aqueous extract in rat*. Biomedicine & Pharmacotherapy 84:115–122.
- Goetz P (2014) *Citrus limon (L.) Burm. f. (Rutacées) Citronnier*. Phytothérapie 12:116–121.
- González JA, García-Barriuso M, Amich F (2010) *Ethnobotanical study of medicinal plants traditionally used in the Arribes del Duero, western Spain*. Journal of Ethnopharmacology 131:343–355.
- Gourine N, Yousfi M, Bombarda I, Nadjemi B, Gaydou E (2010) *Seasonal Variation of Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oil from Pistacia atlantica Desf. Leaves*. Journal of the American Oil Chemists' Society 87:157–166.
- Guerra FQS, Mendes JM, Oliveira WAD, Souza FSD, Trajano VN, Coutinho HDM, Lima EDO (2013) *Antibacterial activity of the essential oil of Citrus limon against multidrug resistant Acinetobacter strains*. Brazilian Journal of pharmacy 94:142-147.
- Guerra FQS, Mendes JM, Sousa JPD, Morais-Braga MFB, Santos BHC, Coutinho HDM, Lima EDO (2011) *Increasing antibiotic activity against a multidrug-resistant Acinetobacter spp by essential oils of Citrus limon and Cinnamomum zeylanicum*. Natural Product Research 26:2235-2238.
- Guimarães R, Barros L, Barreira JCM, Sousa MJ, Carvalho AM, Ferreira ICFR (2010) *Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange*. Food and Chemical Toxicology 48:99–106.
- Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P (2009) *Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components*. Food Microbiology 26:142–150.
- Hadrich B, Dahak K, Abdenouri N, Kechaou N (2008) *Etude de séchage des feuilles de bigaradier*. Revue des Energies Renouvelables 08:145 – 149.
- Hamdani FZ, Allem R (2015) *Propriétés antifongiques des huiles essentielles des feuilles de Citrus vis-à-vis d'Alternaria alternata et Penicillium sp in vitro*. Phytothérapie 15:263–266.
- Hart KJ, Yanez-Ruiz DR, Duval SM, McEwan NR, Newbold CJ (2008) *Plant extracts to manipulate rumen fermentation*. Animal Feed Science and Technology 147:8–35.
- Hellal (2011) *Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (Sardina pilchardus)*. Mémoire de magister, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Algérie, 76p.
- Himed (2011) *Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de Citrus limon : application à la margarine*. Mémoire de magister, Université Mentouri – Constantine, Algérie, 65p.

- Himed L, Barkat M (2014) *Élaboration d'une nouvelle margarine additionnée des huiles essentielles de Citrus limon*. Oilseeds and fats, crops and lipids 21:A102.
- Himed L, Merniz S, Barkat M (2016) *Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle de Citrus limon (variété Lisbon) extraite par hydrodistillation*. Algerian Journal of Natural Products 4:252-260.
- Houicher A, Hechachna H, Özoğul F (2015) *In vitro determination of the antifungal activity of Artemisia campestris essential oil from Algeria*. International Journal of Food Properties 19: 1749-1756.
- Juteau F, Massoti V, Bessière JM, Viano J (2002) *Composition characteristics of the essential oil of Artemisia campestris var. glutinosa*. Biochemical Systematics and Ecology 30:1065-1070.
- Kabouche A (2005) *Etude phytochimique de plantes médicinales appartenant à la famille des Lamiaceae*. Thèse de doctorat. Université Mentouri-Constantine Faculté des Sciences Exactes Département de Chimie. Algérie, 264p.
- Kaiser R (1970) *Retention data and retention indices in gas chromatography part I: How are retention data measured correctly, why are they necessary and its the procedure worth-while?* Chromatographia 3:127–147.
- Kaloustian J, Chevalier J, Mikail C, Martino M, Abou L, Vergnes MF (2008) *Étude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne*. Phytothérapie 6:160–164.
- Kamaliroosta L, Zolfaghari M, Shafiee S, Larijani K, Zojaji M (2016) *Chemical Identifications of Citrus Peels Essential Oils*. Journal of Food Biosciences and Technology 6:69-76.
- Karoui IG, Marzouk B (2013) *Characterization of Bioactive Compounds in Tunisian Bitter Orange (Citrus aurantium L.) Peel and Juice and Determination of Their Antioxidant Activities*. BioMed Research International 2013:345415-345427.
- Kehal (2013) *Utilisation de l'huile essentielle de Citrus limon comme agent conservateur et aromatique dans la crème fraîche*. Mémoire de magister, Université de Constantine, Algérie, 93p.
- Kirbaslar G, Kirbaslar SI (2004) *Composition of Turkish Bitter Orange and Lemon Leaf Oils*. The Journal of Essential Oil Research 16:105-108.
- Ksouri WM, Trabelsi N, Mkadmini K, Bourgou S, Noumi A, Snoussi M, Barbria R, Tebourbi O, Ksouri R (2014) *Artemisia campestris phenolic compounds have antioxidant and antimicrobial activity*. Industrial Crops and Products 63:104-113.
- Lakhdar L (2015) *Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles Marocaines sur aggregatibacter actinomycetemcomitans: Etude in vitro*. Thèse de doctorat, Faculté de médecine dentaire de Rabat, Maroc, 164p.
- Leporatti ML, Ghedira K (2009) *Comparative analysis of medicinal plants used in traditional medicine in Italy and Tunisia a review*. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine 5:31-38

- Lis A, Kowal M (2015) *Constituents of the essential oils from different organs of Artemisia campestris L. subsp. Campestris*. Journal of Essential Oil Research 27: 545-550.
- Lopes-Lutz D, Alviano DS, Alviano CS, Kolodziejczyk PP (2008) *Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils*. Phytochemistry 69:1732–1738.
- Mansouri N, Satrani B, Ghanmi M, El Ghadraoui L, Boukir A, Aafi A (2011) *Effet de la provenance sur le rendement, la composition chimique et l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des rameaux de Juniperus phoenicea L. du Maroc*. Acta botanica Gallica 158 :215-224.
- María AJ, Bedoya LM, Apaza L, Bermejo P (2012) *The Artemisia L. Genus: A Review of Bioactive Essential Oils*. Molecules 17:2542-2566.
- Marinier FC, Lobstein A (2013) *Composition chimique des huiles essentielles*. Actualités Pharmaceutiques 52:22-25.
- Millet F (2014) *Huiles essentielles et essence de citronnier (Citrus limon (L.) Burm. f.)*. Phytothérapie 12:89-97.
- Misharina TA, Samusenko AL (2008) *Antioxidant Properties of Essential Oils from Lemon, Grapefruit, Coriander, Clove, and Their Mixtures*. Applied Biochemistry and Microbiology 45:438–442.
- Mpondo ME, Dibong DS, Priso RJ, Ngoye A, Yemeda CFL (2012) *État actuel de la médecine traditionnelle dans le système de santé des populations rurales et urbaines de Douala (Cameroun)*. Journal of Applied Biosciences 55: 4036–4045.
- N'guessan K, Soro D, Amon ADE (2011) *Plantes utilisées en médecine traditionnelle dans le traitement des maladies cardiovasculaires, en pays Abbey et Krobou, dans le Sud de la Côte d'Ivoire*. Phytothérapie 9:199-208.
- Njoku VI, Evbuomwan BO (2014) *Quantitative and qualitative analysis, and comparative study of essential oil extracted from Nigerian orange, lemon and lime peels*. Journal of Applied Sciences and Engineering Research 3:519-531.
- Ould el hadj MD, Hadj-Mahammed M, Zabeirou H (2003) *Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouargla (Sahara septentrional Est)*. Courrier du Savoir 3:47-51.
- Popovici C, Saykova I, Tylkowski B (2009) *Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH*. Revue de génie industriel 4:25-39.
- Quezel P, Santa S (1963) *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Tome II, Edition du centre national de la recherche scientifique, Paris, 1170p.

Randrianarivelo R (2010) *Etude de l'activité antimicrobienne d'une plante endémique de Madagascar « Cinnamosma fragrans », alternative aux antibiotiques en crevetticulture*. Thèse de doctorat. Université d'Antananarivo, Madagascar, 179p.

Rega B, Fournier N, Guichard E, Russell R (2003) *Citrus flavour*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51:117-133.

Sadou N, Seridi R, Djahoudi A, Hadeif Y (2015) *Composition chimique et activité antibactérienne des Huiles Essentielles des aiguilles de Pinus halepensis Mill. du Nord est Algérien*. Revue des Sciences et de la Technologie 30:33-39.

Saihi (2011) *Etude phytochimique, extraction des produits actifs de la plante Artemisia campestris de la région de Djelfa. Mise en évidence de l'activité biologique*. Mémoire de magister, Université d'Oran, Algérie, 76p.

Samate AD (2002) *Compositions chimiques d'huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone Soudanienne du Burkina-Faso : Valorisation*. Thèse de doctorat, Université de Ouagadougou, Burkina-Faso, 162p.

Sangwan NS, Farooqi AHA, Shabih F, Sangwan RS (2001) *Regulation of essential oil production in plants*. Plant Growth Regulation 34:3-21.

Sarrow E, Chatzopoulou P, Dimassi-Therios K, Therios I (2013) *Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flower and leaf oils of Citrus aurantium L. growing in Greece*. Molecule 18:10639-10647.

Satrani B, Aberchane M, Farah A, Chaouche A, Talbie M (2006) *Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites par hydrodistillation fractionnée du bois de Cedrus atlantica Manetti*. Acta botanica Gallica 153:97-104.

Satrani B, Ghanmi M, Farah A, Aafi A, Fougrach H, Bourkhiss B, Bousta D, Talbi M (2007) *Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de Cladanthus mixtus*. Bulletin de la Société de pharmacie 146:85-96.

Settanni L, Randazzo W, Palazzolo E, Moschetti M, Aleo A, Guarrasi V, Mammina C, San Biagio PL, Marra FP, Moschetti G, Germana MA (2014) *Seasonal variations of antimicrobial activity and chemical composition of essential oils extracted from three Citrus limon L. Burm. Cultivars*. Natural Product Research 28:383-391.

Shah BN, Seth AK (2010) *Textbook of Pharmacognosy and Phytochemistry*. Elsevier, 1er Edition, 578p.

Sherif AE, Marzouk AM, Zaghoul MG, Halim AF (2015) *Chemical composition and cytotoxic activity of petitgrain essential oil of Citrus aurantium L. "Russian colon"*. Journal of American Science 11:64-68.

Sonam KS, Guleria SG (2017) *Synergistic Antioxidant Activity of Natural Products*. Annals of Pharmacology and Pharmaceutics 2:1086-1092.

Spadaro F, Circosta C, Costa R, Pizzimenti F, Palumbo DR, Occhiuto F (2012) *Volatile fraction composition and biological activity of lemon oil (Citrus limon L. Burm.): Comparative study of oils extracted from conventionally grown and biological fruits*. The Journal of Essential Oil Research 24:187–193.

Suryawanshi JAS (2011) *An overview of Citrus aurantium used in treatment of various diseases*. African Journal of Plant Science 5:390-395.

Toninolli F, Meglioli V (2013) *Huiles essentielles. L'encyclopédie*. Edition Judena, France, 342p.

Toure MD (2015) *Etude chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatique médicinales de Côte d'ivoire*. Thèse de doctorat, Université Felix Houphouët-Boigny, Côte d'ivoire, 116p.

Tundis R, Loizzo MR, Bonesi M, Menichini F, Mastellone V, Colica C, Menichini F (2012) *Comparative Study on the Antioxidant Capacity and Cholinesterase Inhibitory Activity of Citrus aurantifolia Swingle, C. aurantium L., and C. bergamia Risso and Poit. Peel Essential Oils*. Journal of Food Science 77:H40-46.

Wei A, Shibamoto T (2007) *Antioxidant Activities and Volatile Constituents of Various Essential Oils*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55:1737-1742.

Zarrad K, Ben Hamouda A, Chaieb I, Laarif A, Mediouni-Ben Jemâa J (2015) *Chemical composition, fumigant and anti-acetylcholinesterase activity of the Tunisian Citrus aurantium L. essential oils*. Industrial Crops and Products 76:121–127.

Annexes

Annexe 1. Les milieux de culture

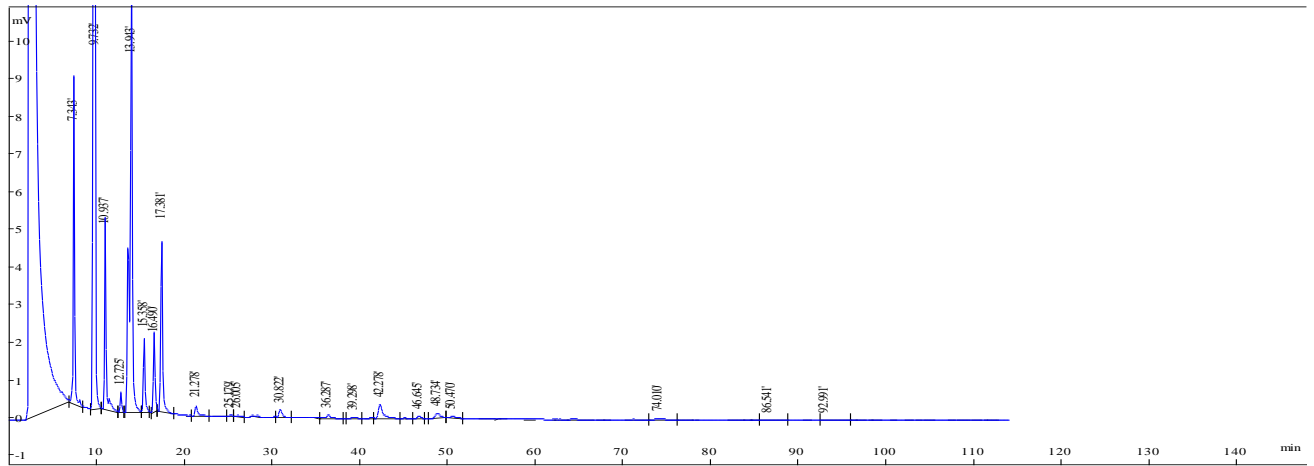
Muller Hinton agar :

Infusion de viande de bœuf déshydraté	300 g
Hydrolysate de caseïne.....	17,5 g
Amidon de maïs.....	5 g
Agar agar.....	13 g
Eau distillée.....	1000 mL

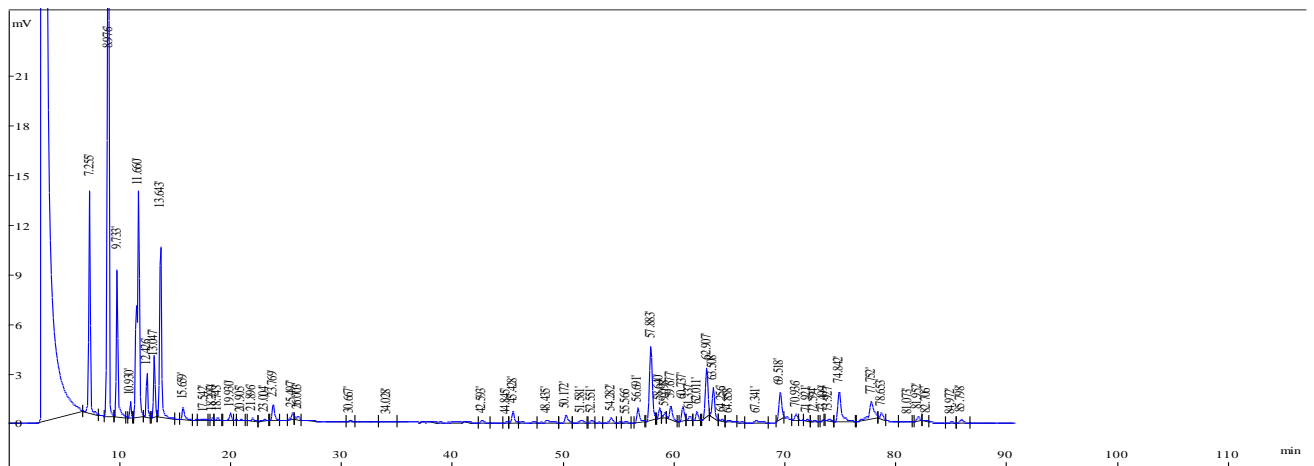
Bouillon nutritif :

Peptone	5 g
Extrait de viande.....	1 g
Extrait de levure	2 g
Chlorure d sodium.....	5 g
Eau distillée.....	1000 mL

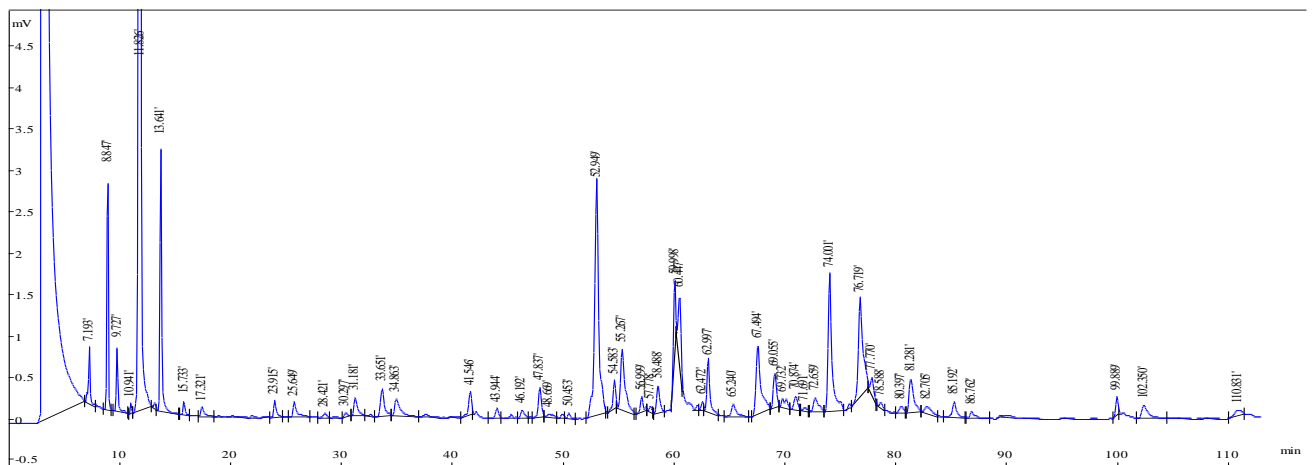
4- *Artemisia campestris* (Milok)



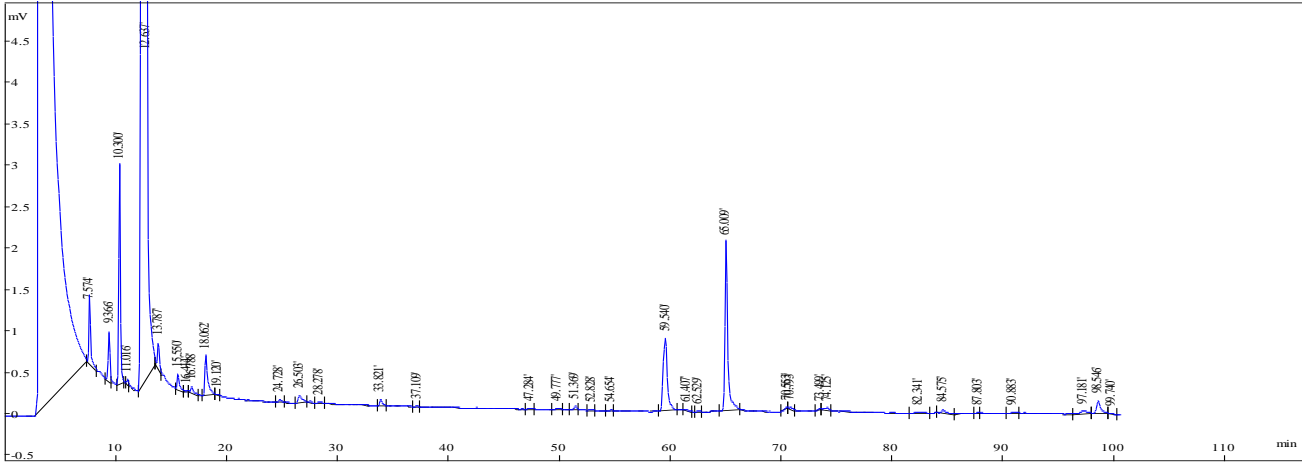
5- *Artemisia campestris* (Sidi Bouzid)



6- *Citrus Limon*

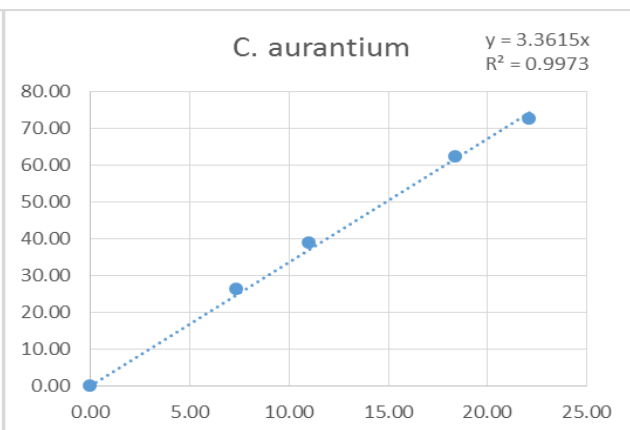
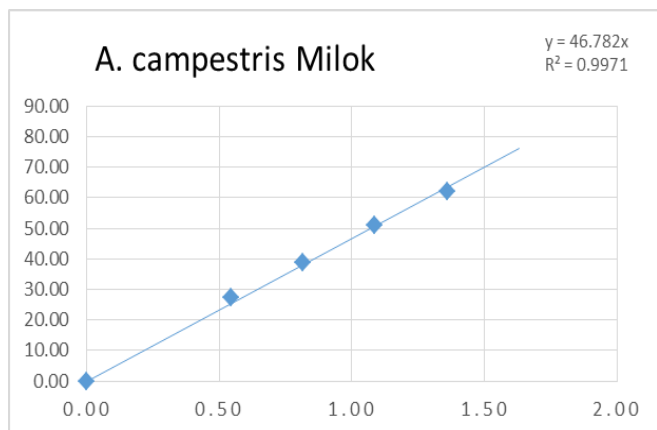
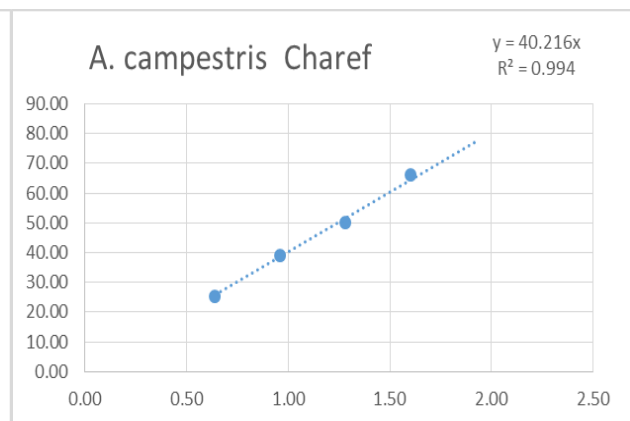
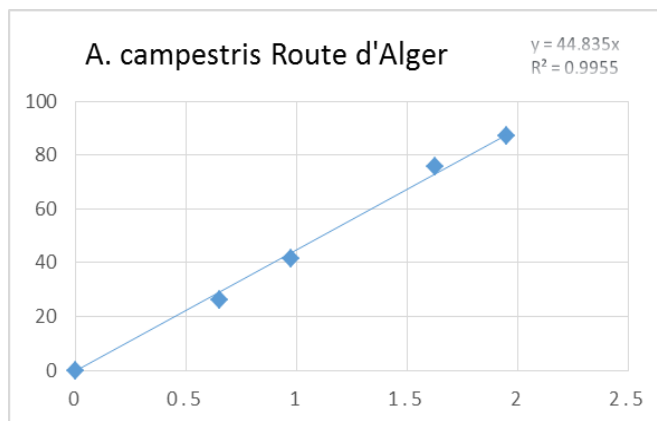
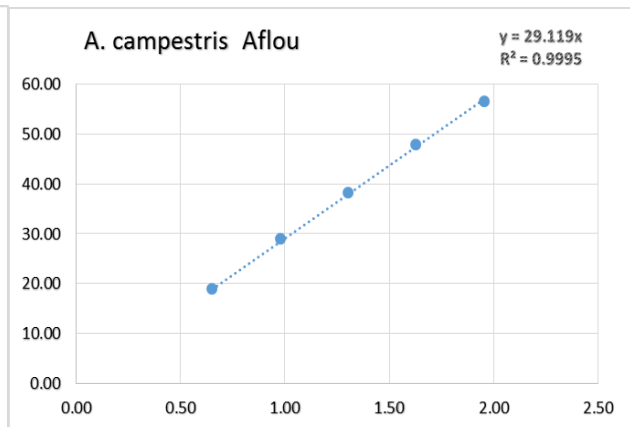
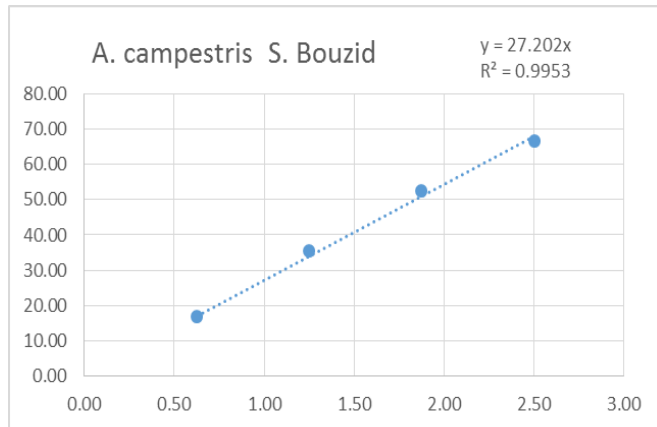


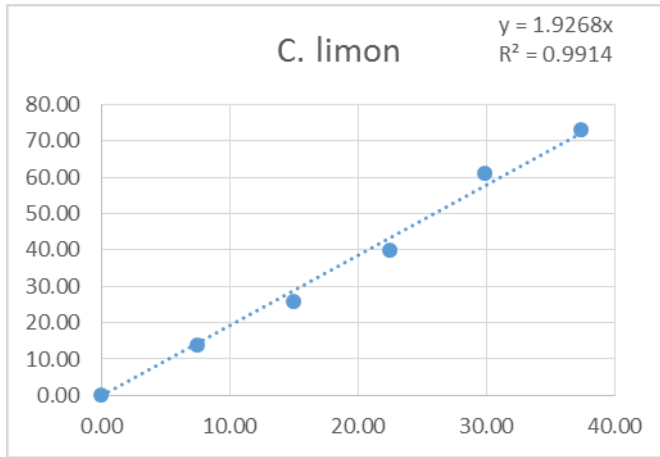
7- *Citrus aurantium*



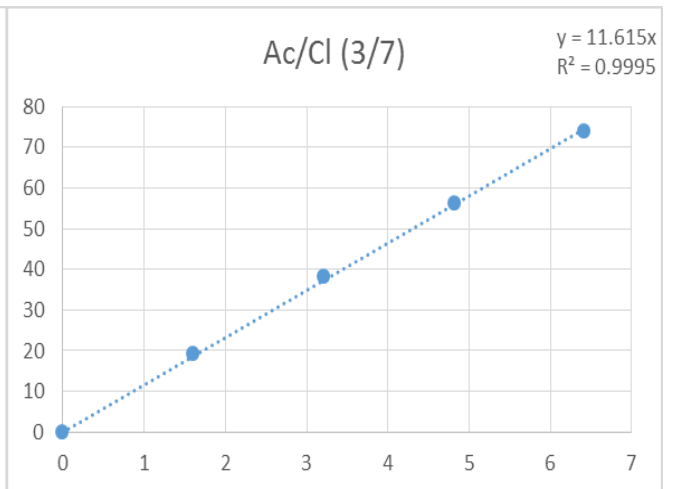
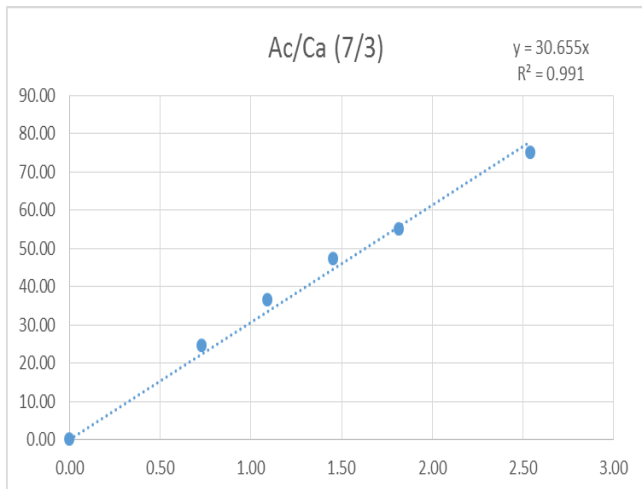
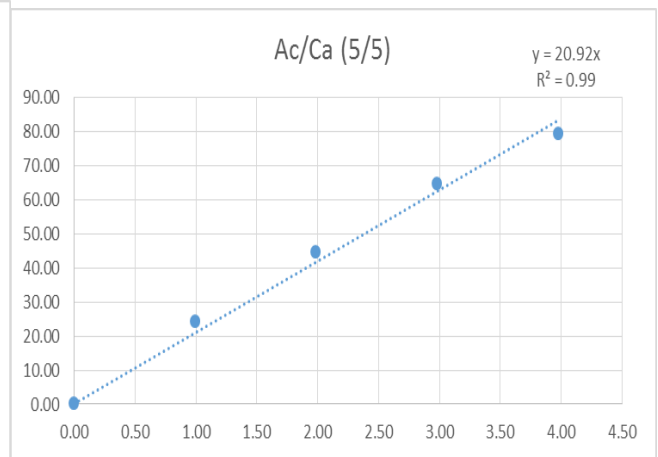
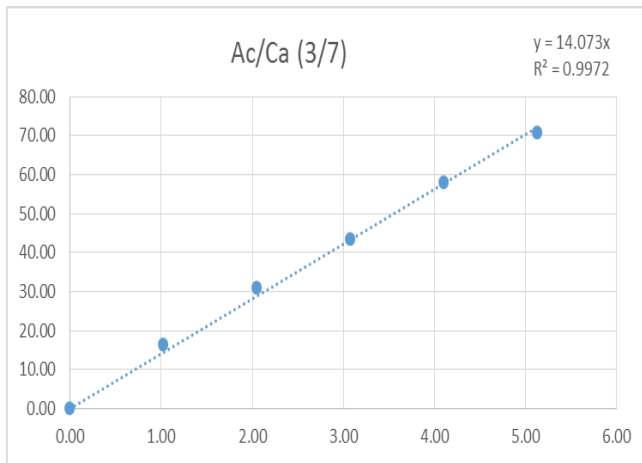
Annexe 3. Les graphiques de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'huile essentielle.

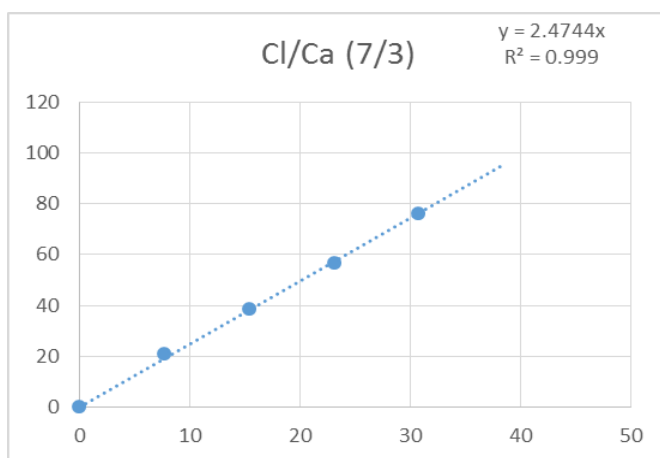
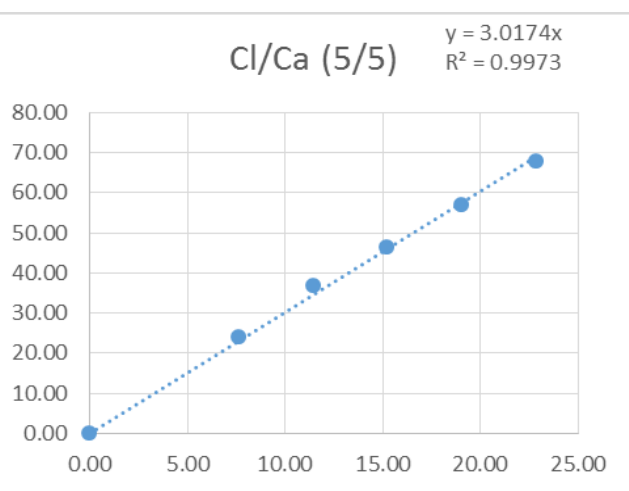
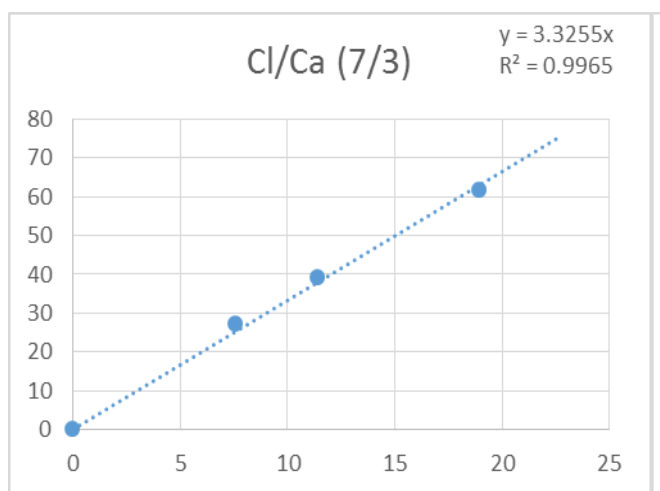
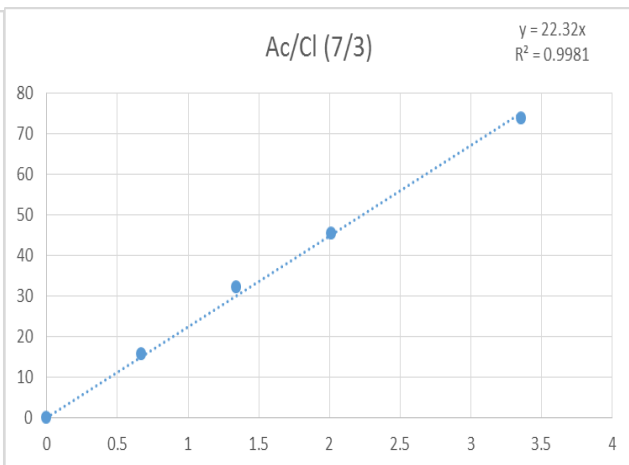
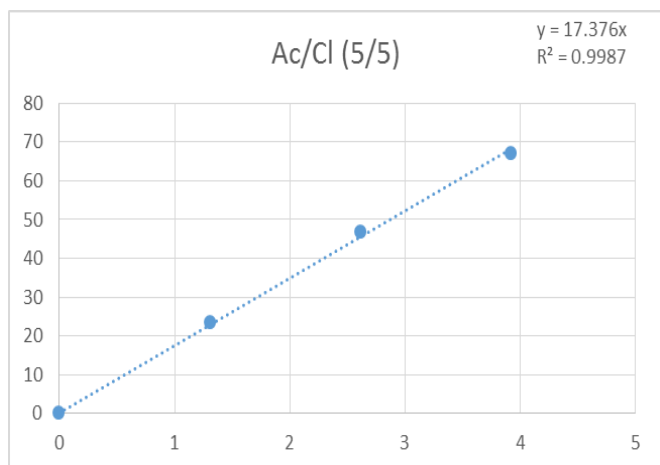
1- Huiles essentielles individuelles



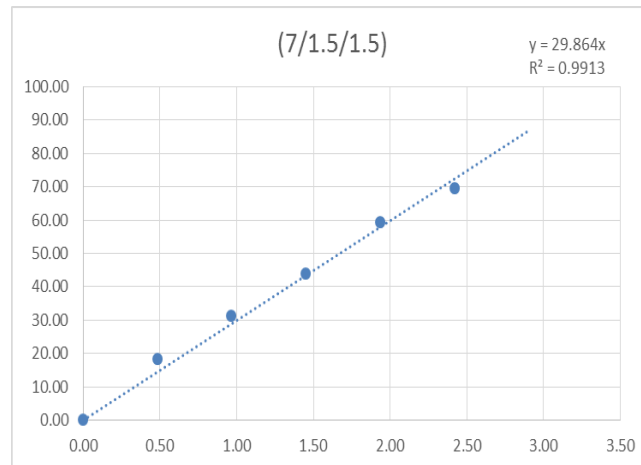
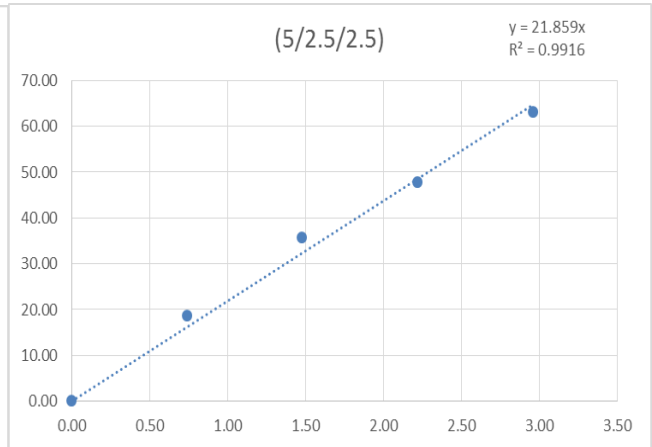
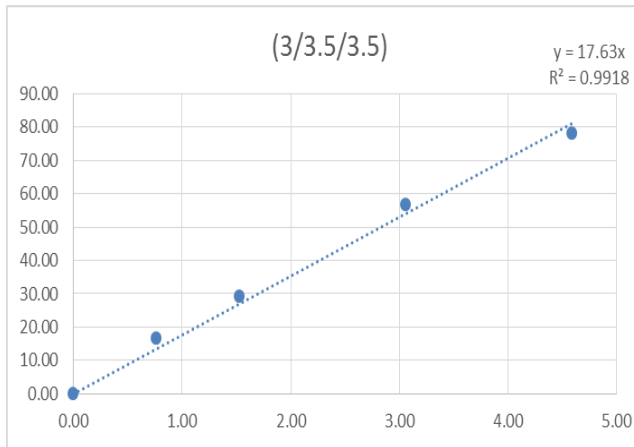


2- Mélanges binaires





3- Mélanges tertiaries



Annexe 4. Photos montre l'effet de quelques mélanges sur les souches bactériennes testés.

