

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

UNIVERSITE MUSTAPHA STAMBOULI DE MASCARA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Thèse présentée par :

M^{me} BOUZIDI Nebia

Pour l'obtention du diplôme de Doctorat

Spécialité: Sciences de la Vie

**Etude des activités biologiques de l'huile essentielle de l'armoise
blanche « *Artemisia herba alba Asso* »**

Soutenue le

Devant le jury

Mr. BELABID Lakhdar	Professeur, Université de Mascara	Président
Mr. MEDERBAL Khalladi	Professeur, Université de Tiaret	Rapporteur
Mr. MEDDAH Boumediène	Professeur, Université de Mascara	Examineur
Mme TIR TOUIL Aicha	Professeur, Université de Mascara	Examinatrice
Mr. BENABADJI Noury	Professeur, Université de Tlemcen	Examineur
Mr. BENMANSOUR Djamel	MCA, Université de Tlemcen	Examineur

Année universitaire 2015/2016

Etude des activités biologiques de l'huile essentielle de l'armoise blanche « *Artemisia herba alba* »

Résumé

L'armoise blanche « *Artemisia herba alba* » est une plante médicinale aromatique utilisée depuis longtemps dans la médecine traditionnelle algérienne. C'est l'armoise la plus connue en Algérie, elle est très abondante sur les Hauts Plateaux.

Cette étude a pour objectif d'examiner les activités antioxydante et antimicrobienne de l'huile essentielle extraite de la partie aérienne de l'armoise blanche récoltée dans la région de Saida à l'interface Tell- steppe.

L'analyse qualitative par CG/SM de l'huile essentielle obtenue nous a permis d'identifier trente et un composés correspondant à 99,61% de la surface des pics totaux. Les composés majoritaires de cette huile sont le camphre (29,81%), le cyclopentadiène, 1,2,5,5-tetraméthyl (15,58%), le chrysanthène (8,21%) et Eucalyptol (6,51%).

Sur le plan biologique, l'huile essentielle examinée s'est montrée active contre les six microorganismes testés, à savoir: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25213), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (fusariose du pois chiches) (FOC), *Fusarium solani* (pourriture des racines de pois chiches) (FS) et *Globisporangium ultimum* (fonte des semis et la pourriture des racines de Pin d'Alep) (GU). En addition, cette huile possède une capacité antioxydante, mesurée par la méthode au DPPH et le test FRAP, très importante.

Nous avons essayé d'exploiter ces résultats obtenus *in vitro* dans le domaine alimentaire, premièrement par le suivi de l'état oxydatif de l'huile de tournesol en présence de l'huile essentielle de l'armoise blanche, et deuxièmement, par l'appréciation de l'effet de cette huile essentielle sur l'altération totale de la viande hachée.

Cette étude a montré que l'huile essentielle testée possède des activités antioxydantes et antimicrobiennes intéressantes

Dans l'ensemble, les résultats obtenus sont prometteurs et ouvrent de nouvelles perspectives dans le domaine des applications naturelles qui peuvent être une alternative valable pour remplacer les produits chimiques.

En fin, si l'armoise blanche est considérée comme matière pleine de substances médicinales et nutritionnelles (plante fourragère), elle est aussi une source de substances (huile essentielle) qui possèdent des effets remarquables sur le plan biologique.

Mots clés: Activité antimicrobienne, Activité antioxydante, Activité biologique, Armoise blanche, CG/SM, Huile essentielle

Study of the biological activities of the essential oil of white wormwood « *Artemisia herba alba* »

Abstract

White wormwood « *Artemisia herba alba* » is a medicinal and aromatic plant uses for long time in Algerian traditional medicine. It is the most type of wormwood popularly known in Algeria. It is very abundant in highs plateau.

This study aims to examine the antioxidant and antimicrobial activities of essential oil squeezed out from aerial parts of white wormwood gathered in Saida region in Tell-Steppe interface.

The qualitative analysis by CG/SM of essential oil allowed us to identify 31 composites relevant for 99.61% the total peak areas. The main composites of this oil are Champor (29.81%), cyclopentadian 1,2,2,5 tetra methyl (15.58%), Chrysanthenone (8.21%) and eucalyptol (6.51%).

At the biological level, the essential oil analyzed proved active against six microorganisms, which are: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25213), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (Chickpea Fusarium Wilt) (FOC), *Fusarium solani* (Chickpea root-rot) (FS) and *Globisporangium ultimum* (Aleppo pine damping off and root-rot diseases) (GU). In addition, this oil has a very important antioxidant ability measured by DPPH method and FRAP test.

We have tried to make use of results reached in vitro in the food sector, First, in following through the oxidative state of sunflower oil with essential oil of white wormwood, secondly, by assessing the effect of this essential oil on total alteration of minced meat.

This study has to assert that the essential oil tested has valuable antioxidant and antimicrobial activities

Finally, if the white wormwood is regarded as a material full with medicinal and nutritional substances (fodder plant), it contains substances with important effects on the biological level

Key words: Antimicrobial activity, Antioxidant activity, Biological activity, Essential oil, CG/SM, White wormwood

دراسة الخصائص البيولوجية للزيت الأساسي للشايح « *Artemisia herba alba* »

ملخص

الشايح « *Artemisia herba alba* » هو نبات معطر و طبي يستخدم منذ زمن طويل في الطب الجزائري التقليدي. هو النبات المعروف جدا من جنس *Artemisia* في الجزائر و يتواجد بكثرة في الهضاب العليا.

تهدف هذه الدراسة إلى فحص الخصائص المضادة للأكسدة و المضادة للمكروبات للزيت المستخلص من الجزء الهوائي لنبات الشايح المقتطف من المنطقة الجنوبية لولاية سعيدة والتي تفصل بين التل و منطقة السهوب.

التحليل الكيفي بطريقة CG/SM للزيت الأساسي الذي تم الحصول عليه أظهر وجود واحد و ثلاثون مركب الموافق ل 99.61 % من المساحة القمم الكلية. المركبات الموجودة بنسبة عالية هي الكافور (29.81 %), البنثادين 1.2.5.5. ميثيل (15.58 %), كريزانتونون (8.21 %) و يوكالبيتول (6.51 %).

على المستوى البيولوجي, فان الزيت الأساسي أبدى فعالية كبيرة ضد المكروبات السنتة المختبرة, وهي *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25213), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*, *Fusarium solani*, *Globisporangium ultimum*. بالإضافة إلى ذلك فان هذا الزيت له قدرة مضادة للأكسدة عالية جدا و التي تم قياسها بطريقتي DPPH و القدرة الأرجاعية.

لقد حاولنا استغلال هذه النتائج المتحصل عليها مخبريا في الصناعات الغذائية، أولا من خلال متابعة حالة تأكسد زيت عباد الشمس مع وجود الزيت الأساسي للشايح ، وثانيا عن طريق تقييم تأثير هذه الزيت الأساسية على التحلل الكلي للحم المفروم. لقد أثبتت هذه الدراسة على أن الزيت له قدرة مضادة للأكسدة و مضادة للميكروبات عالية جدا.

النتائج المتحصل عليها واعدة و تفتح مجالات جديدة في الاستعمالات الطبيعية التي يمكن أن تكون بديلا جيدا للمواد الكيميائية.

في النهاية، لا يعتبر شايح « *Artemisia herba alba* » نبات طبي و غذائي (العلف) فقط، بل هو أيضا مصدر للمواد الطبيعية (الزيت الأساسي)، والتي لها تأثير كبير على المستوى البيولوجي.

الكلمات المفتاحية: الشايح, مضاد الأكسدة, مضاد للمكروبات, زيت أساسي, الخصائص البيولوجية, CG/SM.

Table des Matières

Résumé	
Tables des matières	i
Liste des figures.....	ix
Liste des tableaux	xiii
Liste des abréviations	xv
Introduction.....	1

Partie I

Etude Bibliographique

Chapitre 01: Les huiles essentielles

I.1. Les huiles essentielles.....	3
I.1.1. Généralités.....	3
I.1.1.1. Genèse de l'essence	3
I.1.1.2. Plante aromatique	4
I.1.1.3. Mode d'obtention des matières premières de la phytothérapie.....	5
<i>1. Poudres végétales</i>	5
<i>2. Distillation</i>	5
I.1.2. Définition des huiles essentielles	5
I.1.3. Localisation et lieu de synthèse des huiles essentielles	5
I.1.4. Propriétés physico-chimiques	6
I.1.5. Composition chimique	7
I.1.6. Méthodes d'extraction	8
<i>I.1.6.1. La distillation</i>	8
<i>I.1.6.2. L'expression</i>	8

I.1.7. Méthodes d'identification chimique des huiles essentielles.....	10
I.1.8. Facteurs de variabilité des huiles essentielles.....	10
I.1.8.1. Facteurs extrinsèques.....	10
a) <i>L'origine géographique</i>	10
b) <i>Les conditions environnementales</i>	10
c) <i>Les facteurs technologiques</i>	11
I.1.8.2. Facteurs intrinsèques.....	11
a) <i>L'origine botanique</i>	11
b) <i>L'organe producteur</i>	11
c) <i>Le chémotype ou spécificité biochimique</i>	11
d) <i>Le stade végétatif</i>	12
I.1.9. Propriétés biologiques et pharmacologiques.....	12
I.1.9.1. Propriétés appétentes et digestives.....	13
I.1.9.2. Activités antimicrobienne.....	13
I.1.9.2.1. <i>Généralités</i>	13
I.1.9.2.2. <i>Activité antifongique</i>	14
I.1.9.2.3. <i>Activité antibactérienne</i>	14
a) Mode d'action contre les bactéries.....	15
b) Analyse de l'action thérapeutique des huiles essentielles « aromatoigramme ».....	15
I.1.9.3. Propriétés carminatives.....	16
I.1.9.4. Propriétés antioxydantes.....	16
I.1.9.4.1. <i>Méthode d'évaluation de l'activité antioxydante</i>	17
I.1.9.5. autres propriétés.....	17
I.1.10. condition de stockage et de conservation des huiles essentielles.....	18

I.1.11. Toxicité des huiles essentielles	18
--	----

Chapitre 02: *Artemisia herba alba*

I.2. Armoise blanche (<i>Artemisia herba alba</i> Asso)	21
I.2.1. Généralité sur la famille des Asteraceae martinov (1820) « Compositae Giseke (1971)	21
I.2.1.1. Caractères botaniques	21
1. Appareil végétatif.....	21
2. Appareil producteur.....	22
I.2.1.2. Applications biologiques et pharmacologiques	22
I.2.2. armoises « genre <i>Artemisia</i> ».....	23
I.2.2.1. Activités pharmacologiques	24
I.2.2.2. composition chimiques des huiles essentielles du genre <i>Artemisia</i>	24
I.2.2.3. Armoise blanche « <i>Artemisia herba alba</i> Asso »	25
1. Appellation locales.....	25
2. Description morphologique.....	25
3. Nomenclature et taxonomie.....	26
4. Description géographique.....	27
5. Ecologie	27
6. Composition chimique	27
7. Médecine traditionnelle	27
8. L'huile essentielle d' <i>Artemisia herba alba</i>	28
9. Toxicité	29

Chapitre 03: Altération des aliments

I.3. Altération des aliments	30
I.3.1. Dégradation chimiques des denrées alimentaires	30
1. Dégradation des matières grasses	30
1.1. <i>Mécanisme de l'oxydation</i>	31
1.2. <i>Conséquences des réactions d'oxydation</i>	31
1.3. <i>Inhibition de la peroxydation de lipides</i>	32
1.3.1 Antioxydants	33
1.4. <i>Evaluation analytique de la dégradation des matières grasses</i>	34
2. Dégradation des protides.....	35
2.1. <i>Dégradation de natures chimiques</i>	35
2.2. <i>Dégradation de nature enzymatique</i>	36
3. Dégradation des sucres	37
3.1. <i>Altérations causées par les hydrolases (polysaccharidases)</i>	37
3.2. <i>Brunissement non enzymatique « réaction de Maillard »</i>	37
3.3. <i>Dégradation thermique des sucres</i>	37
I.3.2. Altération d'origine microbienne	37
1. Les différentes catégories de maladies liées à la consommation des aliments.....	38
2. Principales altérations alimentaires d'origine microbienne	38
2.1. <i>Altération des viandes et des volailles</i>	38
2.2. <i>Altération des fruits et des légumes</i>	39
I.3.3. Contamination par les produits chimiques	40
I.3.4. Conservation des aliments.....	41
I.3.4.1. Classification des techniques	42

I.3.4.1.1. Procédés physiques de conservation	42
1. Inhibition ou destruction des agents biologiques d'altérations des aliments (enzymes et microorganismes)	42
2. Destruction ou élimination des microorganismes.....	42
3. Abaissement de l'activité de l'eau.....	42
I.3.4.1.2. Procédés chimiques.....	42
I.3.4.1.3. Contrôle de l'atmosphère.....	42
I.3.4.2. Conservateurs alimentaires.....	42
I.3.4.2.1. La bioconservation.....	43

Partie II

Matériels et méthodes

II. Matériels et méthodes	44
II.1. Présentation et état actuel de la zone d'étude.....	46
II.2. Matériel utilisés	47
II.2.1. Matériel végétal	47
II.2.2. Les souches microbienne	48
II.2.3. Les produits alimentaires	49
1. L'huile de tournesol.....	49
2. La viande hachée	50
II.3. l'extraction de l'huile essentielle de l' <i>Artemisia herba alba</i> Asso par hydrodistillation	50
II.4. Cinétique d'extraction et calcul du rendement en huile essentielle.....	51
II.5. Analyse physique de l'huile essentielle.....	52
II.5.1. Détermination de la densité relative.....	52
II.5.2. Détermination de l'indice de réfraction.....	52
II.6. Analyse qualitative de l'huile essentielle de l'armoise blanche	53

II.7. Etude des activités biologiques	53
II.7.1. Etude de l'activité antioxydante	53
II.7.1.1. Essai de piégeage du radical libre DPPH.....	54
II.7.1.2. Méthode de réduction de fer « <i>Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)</i> »	55
II.7.2. Etude de l'activité antimicrobienne.....	57
II.7.2.1. Etude de l'activité antimicrobienne.....	57
II.7.2.1.1. Préparation de la concentration de l'huile essentielle.....	57
II.7.2.1.2. Préparation des suspensions microbiennes.....	58
II.7.2.1.3. L'antibiogramme	58
II.7.2.1.3.1. Méthode de l'aromatogramme	59
II.7.2.1.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	61
II.7.2.1.4.1. Méthode de microdilution (méthode standard)	61
II.7.2.2. Tests antifongiques	63
II.7.2.2.1. Test de la croissance mycélienne	63
II.7.2.2.2. Test de sporulation	64
II.7.2.2.3. Test de la germination conidienne	65
II.7.3. Essai d'application de l'huile essentielle dans les produits alimentaires	65
II.7.3.1. Evaluation de la stabilité oxydative de l'huile de tournesol	65
II.7.3.1.1. Préparation des échantillons de l'huile de tournesol	66
II.7.3.1.2. Détermination de l'indice de peroxyde	66
II.7.3.1.3. Détermination de l'absorbance spécifique en rayonnement ultra-violet	67
II.7.3.2. Evaluation de la stabilité microbienne de la viande hachée	68
1. Préparation des échantillons	70
2. Appréciation sensorielle	70
3. Analyses microbiologiques	70

II.8. Analyses statistiques	74
-----------------------------------	----

Partie III

Résultats et discussion

III. Résultats et discussion	76
III.1. Cinétique d'extraction et calcul du rendement en huile essentielle	76
III.2. Evaluation de la qualité de l'huile essentielle d' <i>Artemisia herba alba</i>	77
III.2.1. Caractéristiques organoleptiques	77
III.2.2. Caractéristiques physiques	78
III.2.2.1. Indice de réfraction	78
III.2.2.2. Densité	78
III.2.3. Analyse chimique de l'huile essentielle	79
III.3. Activités biologiques	85
III.3.1. activité antioxydante	85
III.3.1.1. Détermination de l'activité antioxydante par des tests chimiques « <i>in vitro</i> »	85
1. Test du radical libre DPPH	85
2. Test du pouvoir réducteur	88
III.3.2. Activité antimicrobienne	89
III.3.2.1. Résultats de l'antibiogramme	90
III.3.2.1.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d' <i>A. herba alba</i>	91
III.3.2.2. Détermination de la CMI.....	94
III.3.3. Activité antifongique	97
III.3.3.1. Résultats du test de la croissance mycélienne	97
III.3.3.2. Résultats du test de la germination conidienne	101
III.3.3.3. Résultats du test de sporulation	103

III.4. Evaluation de l'effet stabilisateur de l'huile essentielle d' <i>Artemisia herba alba</i> dans les denrées alimentaires	103
III.4.1. Evaluation de la stabilité oxydative de l'huile essentielle de tournesol	103
III.4.1.1. Indice de peroxyde	104
III.4.1.2. Détermination de l'absorbance spécifique en rayonnement ultra-violet	108
III.4.2. Etude de l'effet antimicrobien de l'huile essentielle d' <i>Artemisia herba alba</i> dans la viande hachée.....	110
III.4.2.1. Identification d' <i>Escherichia coli</i>	115
Conclusion générale	116
Références bibliographique.....	118
Annexes	133

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Exemples d'aldéhydes et d'alcools monoterpéniques	9
Figure 2: <i>Artemisia</i>	23
Figure 3: Structures chimiques de quelques composés rencontrés dans les H.E.	25
Figure 4: <i>Artemisia herba alba</i> : (A) la plante au début de la saison de floraison, (B) la plante à la fin de la saison de floraison	26
Figure 5: Structures chimiques de quelques composés rencontrés dans l'huile essentielle d' <i>Artemisia herba alba</i>	28
Figure 6: Oxydation des lipides	32
Figure 7: Formules des tocophérols	33
Figure 8: Antioxydants utilisés couramment dans les produits alimentaires	34
Figure 9: Protocole expérimental	45
Figure 10: Localisation de la commune de Sidi Ahmed dans la wilaya de Saida	46
Figure 11: <i>Artemisia herba alba</i> Asso recueillie de la région de Sidi Ahmed (wilaya de Saida)	47
Figure 12: Réaction du DPPH avec un antioxydant	54
Figure 13: Schéma récapitulatif du test au DPPH	57
Figure 14: Réalisation pratique de l'antibiogramme par diffusion	59
Figure 15: Schéma simplifié de la méthode de microdilution	63
Figure 16: Schéma récapitulatif de la méthodologie expérimentale suivie pour l'étude de l'effet de l'HE sur la stabilité microbiologique de la viande hachée	69
Figure 17: schéma récapitulatif des étapes de l'analyse microbiologique de la viande hachée additionnée de l'HE de l'armoise blanche	75
Figure 18: Cinétique d'extraction de l'huile essentielle d' <i>A herba alba</i> par hydrodistillation	76
Figure 19: Les principaux composants identifiés dans l'huile essentielle d' <i>Artemisia herba alba</i> analysée par la technique CG/SM sur colonne capillaire HP-5MS	79

Figure 20: Distribution en fonction du pourcentage des différents composants existants dans l'HE d' <i>A. herba alba</i>	81
Figure 21: Spectre de Masse du 1,3-Cyclopentadiene, 1,2,5,5- tetramethyl de l'huile essentielle d' <i>A. herba alba</i>	83
Figure 22: Spectre de Masse d'eucalyptol de l'huile essentielle d' <i>A. herba alba</i>	84
Figure 23: Spectre de Masse du camphre de l'huile essentielle d' <i>A. herba alba</i>	84
Figure 24: Variation du pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration de l'huile essentielle et du BHT	86
Figure 25: Pouvoir réducteur de l'huile essentielle (A) et de l'acide ascorbique (B) par la méthode de FRAP	89
Figure 26: Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition de <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i> vis-à-vis de différents antibiotiques (ATM ₃₀ : aztreonam ; CT ₁₀ : colistine ; GN : gentamicine ; P ₁₀ : pénicilline)	90
Figure 27: représentation graphique des diamètres d'inhibition en mm des souches testées (1: <i>E coli</i> ; 2: <i>S. aureus</i> ; 3: <i>C. albicans</i>) en présence de l'huile essentielle de l'armoise blanche	91
Figure 28: Effet de l'huile essentielle d' <i>Artemisia herba alba</i> sur les trois souches testées ...	92
Figure 29: Effet de l'huile essentielle de l'armoise blanche sur la croissance de <i>C. albicans</i> .	95
Figure 30: Effet de l'huile essentielle de l'armoise blanche sur la croissance de <i>S. aureus</i>	95
Figure 31: Effet de l'huile essentielle de l'armoise blanche sur la croissance de <i>E coli</i>	96
Figure 32: Le taux d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i> , <i>Fusarium solani</i> et <i>Globisporangium ultimum</i> en fonction de la dose de l'huile essentielle	98
Figure 33: Evolution de l'indice de peroxyde (en meq d'O ₂ /Kg) dans l'huile de tournesol chauffée en présence de différentes doses de l'huile essentielle	105
Figure 34: Evolution de l'indice de peroxyde (en meq d'O ₂ /Kg) dans l'huile de tournesol chauffée en présence de différentes doses de α tocophérol.....	106
Figure 35: Evolution des diènes conjugués dans les échantillons de l'huile de tournesol additionnés de différentes doses de l'huile essentielle et de l' α tocophérol.....	109
Figure 36: Evolution des triènes conjugués dans les échantillons de l'huile de tournesol additionnés de différentes doses de l'huile essentielle et de l' α tocophérol.....	110
Figure 37: Les trois formes chimiques de la myoglobine	111

Figure 38: Cinétique de la croissance de <i>E. coli</i> en présence de l'huile essentielle de l'armoise blanche	138
Figure 39: Cinétique de la croissance de <i>S. aureus</i> en présence de l'huile essentielle de l'armoise blanche	139
Figure 40: Cinétique de la croissance de <i>C. albicans</i> en présence de l'huile essentielle de l'armoise blanche	139

LISTE DES PHOTOS

Photo 1: Etat actuel de la zone d'étude	47
Photo 2: Montage d'hydrodistillation employé pour l'extraction de l'huile essentielle d' <i>Artemisia herba alba</i>	51
Photo 3: Sensibilité des souches bactérienne vis-à-vis des antibiotiques testés: (A) <i>S. aureus</i> ; (B) <i>E. coli</i>	91
Photo 4: observation microscopique de la germination conidienne de <i>Fusarium solani</i> X 40	102
Photo 5: observation microscopique de la germination conidienne de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i> X 40	102
Photo 6: observation microscopique de la germination conidienne de <i>Globisporangium ultimum</i> X 40	102
Photo 7: Effet de l'huile essentielle sur l'aspect visuelle des échantillons de viande hachée (a: témoin, b: Viande + 5µL HE ; c: Viande + 20µL HE)	112

LISTE DES Planches

Planche 1: L'effet de l'HE d'A. <i>herba alba</i> sur la croissance mycélienne de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i> après 7 jours d'incubation	99
Planche 2: L'effet de l'HE d'A. <i>herba alba</i> sur la croissance mycélienne de <i>Fusarium solani</i> après 7 jours d'incubation	100
Planche 3: L'effet de l'HE d'A. <i>herba alba</i> sur la croissance mycélienne de <i>Globisporangium ultimum</i> après 7 jours d'incubation	100
Planche 4: Symptômes de flétrissement vasculaire aux champs	137
Planche 5: Photos des essais préliminaires de l'activité antifongique de l'huile essentielle d' <i>Artemisia herba alba</i> contre : A) <i>Fusarium sp</i> , B) <i>Globisporangium ultimum</i>	138
Planche 6: Aspect macroscopique des colonies apparues sur les milieux de culture non sélectif	141
Planche 7: Aspect macroscopique des colonies apparues sur les milieux sélectifs	142

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Huiles essentielles et familles biochimiques	20
Tableau 2: Applications biologiques et pharmacologiques de quelques espèces de la famille des Asteraceae en fonction de leurs principes actifs	22
Tableau 3: Formation des amines biogènes à partir des acides aminés correspondants	36
Tableau 4: Les principaux microorganismes pathogènes d'origine alimentaire	40
Tableau 5: Quelques principes de conservation	41
Tableau 6: Description et pouvoir pathogène des souches testées	49
Tableau 7: antibiotiques d'antibiogramme	60
Tableau 8: Les principaux composés identifiés par CPG/SM	80
Tableau 9: Les principaux composés de l'huile essentielle d' <i>Artemisia herba alba</i> de différents pays	82
Tableau 10: Zone d'inhibition et concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle d' <i>Artemisia herba alba</i>	96
Tableau 11: Examen macroscopie des colonies ayant poussées sur les différents milieux de culture	114
Tableau 12: Résultats d'identification de la souche <i>E coli</i> isolée sur milieu Hecktoen	115
Tableau 13: Effet des doses sur la croissance mycéliennes de la croissance mycélienne de <i>F. solani</i>	143
Tableau 14: Effet des doses sur la croissance mycéliennes de la croissance mycélienne de <i>F. oxysporum</i>	143
Tableau 15: Effet des doses sur la croissance mycéliennes de la croissance mycélienne de <i>G. ultimum</i>	144
Tableau 16: Effet des doses sur la germination de <i>F. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>G. ultimum</i>	144
Tableau 17: Effet des doses sur la sporulation de <i>F. solani</i>	145
Tableau 18: Effet des doses sur la sporulation de <i>F. oxysporum</i>	145
Tableau 19: Effet des doses sur la sporulation de <i>G. ultimum</i>	145

Tableau 20: Résultats de la sporulation de <i>F. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> et <i>G. ultimum</i>	147
Tableau 21: Résultats de la germination de <i>F. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> et <i>G. ultimum</i>	147
Tableau 22: Résultats de la croissance mycélienne de mycélienne de <i>F. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> et <i>G. ultimum</i>	148
Tableau 23: pourcentage d'inhibition de l'H. E. d' <i>A. herba alba</i> de la croissance mycélienne, la germination conidienne et la sporulation de <i>F. solané</i> , <i>F. oxysporum</i> et <i>G. ultimum</i>	149
Tableau 24 : Analyse statistique des résultats du test au DPPH	150
Tableau 25: Analyse statistique des résultats de l'évolution de l'indice de peroxyde (en meq d'O ₂ /Kg) dans l'huile de tournesol chauffée en présence de différentes doses de l'huile essentielle	150
Tableau 26: Analyse statistique des résultats de l'évolution de l'indice de peroxyde (en meq d'O ₂ /Kg) dans l'huile de tournesol chauffée en présence de différentes doses de tocophérol	150
Tableau 27: Analyse statistique des résultats de l'évolution des diènes conjugués dans l'huile de tournesol chauffée en présence de différentes doses de l'huile essentielle	151
Tableau 28: Analyse statistique des résultats de l'évolution des triènes conjugués dans l'huile de tournesol chauffée en présence de différentes doses de l'huile essentielle	151

Liste des abréviations

AFNOR: Association Française de Normalisation

Afssaps: Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé

ATCC: American Type Culture Collection

BHA: butylhydroxyanisol

BHT: butylhydroxytoluène

CPG/ SM: Chromatographie en Phase Gazeuse/ Spectrométrie de Masse (CPG/SM)

CE₅₀: Concentration Efficace (mg/ml)

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DPPH: 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

f. sp: forme spéciale

H.E.: Huile essentielle

ISO: *International Organization for Standardization*

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

UFC: Unité Formant Colonie

UFT: Unité Formant Trouble

Introduction générale

De tout temps l'homme a cherché à lutter contre l'altération des denrées alimentaires de base, pour des raisons vitales d'abord, mais aussi psychologiques. Ces altérations surviennent depuis la production des denrées jusqu'à leur consommation et elles résultent des actions physiques, chimiques ou biologiques.

Pour lutter contre ces facteurs d'altérations, plusieurs techniques de conservation sont utilisées telles que la chaleur (pasteurisation, stérilisation), le froid (réfrigération, congélation), le conditionnement sous atmosphère modifiée, ou par l'ajout d'un agent conservateur (antioxydant, antimicrobien, pesticide), etc.

Les antioxydants inhibent la peroxydation des lipides et d'autres processus radicalaires libres; par conséquent, ils sont en mesure de protéger le corps humain de plusieurs maladies attribuées aux réactions des radicaux tels que l'arthrite, le cancer, la maladie d'alzheimer et le vieillissement.

Les antioxydants sont également un ingrédient en plus important dans la transformation des aliments. Leur rôle essentiel est d'inhiber le développement de rancissement oxydatif dans les produits alimentaires à base de graisse, en particulier la viande et les aliments frits. Les antioxydants synthétiques tels que le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT) sont largement utilisés dans l'industrie alimentaire en raison de leurs capacités à prévenir les détériorations des aliments et de prolonger leur durée de conservation, mais bon nombre d'entre eux étant considérés comme néfastes pour la santé et présentent des risques de cancérogénicité [Chang et al., 2007; Akrouf et al., 2010].

Ainsi, les maladies des plantes sont principalement contrôlées par des pesticides chimiques et dans certains cas par des pratiques culturales. Cependant, l'utilisation massive de produits chimiques dans l'agriculture a été un sujet de préoccupation public en raison des effets indésirables de certains produits chimiques sur les organismes non cibles et leurs effets cancérogènes et nocifs sur l'environnement [Cook et Baker, 1983].

Face aux risques liés aux additifs chimiques et résidus des produits de synthèse en termes de santé publique ainsi qu'aux problèmes d'acquisition de résistance des microorganismes et l'accroissement vertigineux de la demande d'aliments contenant moins de

produits chimiques de synthèse, la recherche accrue d'agents naturels remplaçant ces additifs pour améliorer la sécurité alimentaire et gérer les maladies des plantes est l'une des priorités des chercheurs.

Une grande partie du territoire algérien se trouve en zone steppique. Cette zone se caractérise par une diversité biologique appréciable. Mais Malheureusement, durant ces dernières décennies, les écosystèmes steppiques connaissent une forte tendance à la dégradation qui se traduit par la réduction du potentiel biologique et la rupture des équilibres écologiques et socioéconomiques [Mederbal et al., 2010].

Le genre *Artemisia* comprend quelque 400 espèces, réparties sur les cinq continents. En Algérie, il est présenté par dix espèces dont certaines sont rares et d'autres très répandues [Abdelguerfi, 2003].

L'*Artemisia herba alba*, ou encore l'armoise blanche désignée en arabe sous le nom de « chih » de la famille des Asteraceae, pousse généralement en touffes de tailles réduites. C'est une plante à différents usages. Elle se caractérise par sa richesse en huile essentielle de composition différente qui a conduit à la définition de plusieurs chémotypes; sa forte valeur fourragère et son rôle écologique très important contre l'érosion et la désertification.

A travers notre étude, nous avons essayé d'étudier la composition chimique de l'huile essentielle d'*A. herba alba* obtenue par hydrodistillation, et aussi l'évaluation de ses effets antioxydant et antimicrobien contre six microorganismes: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (fusariose du pois chiches), *Fusarium solani* (pourriture des racines de pois chiches) et *Globisporangium ultimum* (fonte des semis et la pourriture des racines de Pin d'Alep).

Notre but essentiel était d'exploiter une partie des immenses vertus et potentialités de l'armoise blanche et son huile essentielle dans le contrôle biologique des plantes contre les microorganismes pathogènes et savoir la possibilité de son utilisation comme agents de stabilisation et de conservation en agroalimentaire (antioxydant et antimicrobien).

I.1. Les huiles essentielles

I.1.1. Généralités

Le terme « huile essentielle » a été inventé au 16^{ème} siècle par le médecin suisse Paracelsus vonhhenheim afin de désigner le composant actif d'un remède naturel. Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles essentielles, dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums [El-Kalamouni, 2010].

Les huiles essentielles sont des mélanges de composés lipophiles, volatils et souvent liquides, synthétisés et stockés dans des structures cellulaires spécialisées (cellules à huile essentielle, poils sécréteurs, canaux sécréteurs). Ces huiles sont responsables de l'odeur de la plante et vont servir de signaux chimiques permettant à la plante de contrôler ou réguler son environnement et assurer leur ultime défense [Deans et Waterman, 1993; Rahini 2002; Tenscher et al., 2005].

L'utilisation par l'homme des plantes aromatiques et donc des huiles essentielles est très ancienne et assez universelle ; on s'en sert traditionnellement pour se soigner, se détendre, aromatiser la nourriture et conserver les aliments.

L'utilisation des huiles essentielles exige une connaissance parfaite de leur composition chimique. En effet, chacune d'entre elles renferme des molécules chimiques qui peuvent se révéler toxiques, comme les phénols (hépatotoxiques et dermocaustiques), les coumarines (risque d'hémorragie), les thuyones (neurotoxiques) les pinocamphones (épileptisantes) ou les furocoumarines (photosensibilisantes). Les huiles essentielles résultent d'une distillation et sont donc des substances très concentrées dont l'action est supérieure aux autres formes phytothérapeutiques (tisanes, gélules, eaux florales,...). Une huile essentielle contient en moyenne 75 molécules actives différentes, tandis que, dans le médicament de synthèse, on ne peut évaluer les interactions que de trois molécules [Zahalka, 2010].

I.1.1.1. Genèse de l'essence

Les substances chimiques qui constituent les divers tissus végétaux et qui interviennent dans leurs métabolismes appartiennent à deux catégories.

- La première catégorie comprend des molécules relativement simples, qui sont des substances minérales (eau, métaux).
- La seconde catégorie comporte des substances organiques constituées de molécules complexes, plus ou moins volumineuses. Dans cette catégorie, trois familles sont particulièrement importantes, ce sont les glucides (sucres), les lipides (graisses) et les protides.

En complément aux constituants de base de la plante, il existe de nombreuses autres substances, dont certaines interviennent directement dans le métabolisme de la plante et contribuent à donner à chaque individu (quelquefois à des genres entiers) son caractère spécifique. Ainsi les huiles essentielles (essences volatiles) et les résines (gouttelettes colloïdales) qui sont en réalité des produits résiduels ou produits d'excrétion (résultant d'un mécanisme complexe) s'expriment par une odeur ou un arôme et donne à la plante son cachet particulier [Baba Aissa, 2000].

Les essences végétales sont élaborées par une catégorie de plantes que l'on appelle plantes aromatiques au sein de cellules sécrétrices.

I.1.1.2. Plante aromatique

La plante aromatique est une plante qui contient des molécules aromatiques volatiles ou odorantes dans un ou plusieurs organes producteurs que sont les feuilles, les fleurs, les fruits, les graines, l'écorce et les racines.

Les plantes aromatiques capables de synthétiser une essence sont peu nombreuses. Parmi les 800 000 espèces végétales, seules 10% en sont capables. Parmi les familles aromatiques les plus représentatives ;

- **Les Abiétacées** (sapins, cèdres, pins),
- **Les Apiacées** (coriandre, cumins, anis vert,..),
- **Les Astéracées** (tanaïsie, inule, **armoïse**,...),
- **Les Cupressacées** (cyprès, genévrier, thuya,...),
- **Les Ericacées** (gaulthérie, ledon),
- **Les Lamiacées** (lavande, thym, romarin, menthe marjolaine, mélisse, sauge,...),
- **Les Lauracées** (cannelle, laurier, camphrier,...),
- **Les Myrtacées** (eucalyptus, giroflier, myrte,...),

- **Les Poacées** (citronnelles, verveines, vétivers,...),
- **Les Rutacées** (citron, pamplemousse, mandarine,...) [Zahalka, 2010].

I.1.1.3. Mode d'obtention des matières premières de la phytothérapie

1. Poudres végétales

Les poudres végétales apportent une grande souplesse à l'utilisation thérapeutique des plantes, permettant leur incorporation facile à toutes les formes galéniques sèches (gélules, cachet, etc.); elles ont également une grande importance en tant que matière première pour la préparation d'autres formes galéniques.

Après élimination des corps étrangers et des parties inertes et dessiccation soignée à température peu élevée (de 25°C pour les plantes à essences à 40-45°C pour les autres), les drogues sont réduites en poudre [Duraffourd et lapraz, 2002].

2. Distillation

La distillation est une opération pharmaceutique qui a pour but de séparer les principes volatils de ceux qui ne le sont pas, ou le sont moins qu'eux [Duraffourd et lapraz, 2002].

I.1.2. Définition des huiles essentielles

La définition retenue, très proche de celle de la norme ISO 9235, est celle adoptée par la commission de la pharmacopée européenne : « Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition ». [Afnor, 1986 et Afssaps, 2008]

I.1.3. Localisation et lieu de synthèse des huiles essentielles

Toutes les parties des plantes aromatiques peuvent contenir de l'huile essentielle:

- les fleurs: oranger, rose, lavande ; le bouton floral (girofle) ou les bractées (ylang-ylang) ;
- les feuilles le plus souvent: eucalyptus, menthe, thym, laurier, sauge, aiguilles de pin
- les organes souterrains: racines, rhizomes (gingembre) ;
- les fruits: fenouil, anis, épicarpes des Citrus ;

- les graines: noix de muscade, coriandre ;
- le bois et les écorces: cannelle, bois de rose [El Kalamouni, 2010].

Les huiles essentielles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule. Elles sont alors soit stockées dans une cellule transformée en cellule à essence, ou dans des poils glandulaires, des poches sécrétrices, des canaux sécréteurs [Rahili, 2002; Tenscher, 2005].

- les poils sécréteurs épidermiques rencontrés souvent chez les Lamiacées. Ils produisent les essences dites superficielles.
- les organes sécréteurs sous-cutanés comprenant des cellules et des poches sécrétrices qui sont généralement disséminées au sein du tissu végétal chez les Myrtacées, ainsi que les canaux sécréteurs chez les Apiacées [El Kalamouni, 2010].

Sur le site de stockage, les gouttelettes d'huile essentielle sont entourées de membranes spéciales constituées d'esters d'acides gras hydroxylés hautement polymérisés, associés à des groupements peroxydes. En raison de leur caractère lipophile et donc de leur perméabilité extrêmement réduite vis-à-vis des gaz, ces membranes limitent fortement l'évaporation des huiles essentielles ainsi que leur oxydation à l'air. On comprend ainsi pourquoi les huiles essentielles des plantes aromatiques conservées entières, c'est-à-dire non incisées, persistent sensiblement plus longtemps que lorsque les plantes sont pulvérisées et dont les parois protectrices ont été détruites [Tenscher, 2005].

I.1.4. Propriétés physico-chimiques

Autrefois, les essences étaient appréciées pour leurs propriétés organoleptiques (odeur, goût, couleur et aspect) vu l'usage qui en était fait comme matières aromatisantes et parfumantes.

Aujourd'hui, les propriétés physico-chimiques sont exigées pour leurs évaluations commerciales. Malgré leurs différences de constitution, les huiles essentielles possèdent en commun un certain nombre de propriétés physiques :

- ✓ elles sont généralement liquides à température ordinaire;
- ✓ elles sont volatiles et entraînaibles à la vapeur d'eau;

- ✓ elles sont généralement incolores ou jaune pâle lorsqu'elles viennent d'être préparées. Cependant, on rencontre quelques-unes d'entre elles qui sont colorées comme l'essence de cannelle, d'absinthe et de camomille qui sont respectivement colorées en rouge, vert et bleu;
- ✓ elles sont plus légères que l'eau. Il existe toutefois des huiles plus lourdes comme par exemple les essences de cannelle et de girofle. Leur densité varie de 0.8 à 1.08, leur température d'ébullition de 160°C à 240°C;
- ✓ elles sont peu solubles dans l'eau mais lui communiquent leur odeur;
- ✓ elles sont solubles dans la plupart des solvants organiques et dans les huiles fixes;
- ✓ elles ont des indices de réfraction élevés et elles sont le plus souvent optiquement actives car elles contiennent des molécules asymétriques;
- ✓ elles se caractérisent par des indices chimiques qui permettent d'évaluer approximativement la quantité de fonctions chimiques (acide, ester, alcool...) présente dans les composants de l'essence [**Bruneton, 1987 in Rahili, 2002 ; El Abed et Kambouche, 2003, Catier et Roux, 2007**].

I.1.5. Composition chimique

La composition chimique des huiles essentielles est généralement très complexe d'un double point de vue, à la fois par le nombre élevé de constituants présents et surtout par la diversité considérable de leurs structures. En effet, elles comprennent deux classes de composés caractérisés par des origines biogénétiques bien distinctes.

Le groupe des terpénoïdes, d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane d'autre part. IL existe également d'autres corps qui entrent en faible proportion dans la constitution de certaines huiles essentielles (acides organiques, esters et autres...) [**Rahili, 2002 ; El Abed et Kambouche, 2003**].

Jusqu'à présent, plus de 3000 constituants ont été isolés à partir des huiles essentielles. La plupart d'entre eux sont des carbures monoterpéniques acycliques ou cycliques, des aldéhydes et des alcools monoterpéniques (Figure 1), des cétones et des époxydes monoterpéniques. On rencontre également des hydrocarbures sesquiterpéniques, des alcools sesquiterpéniques, des cétones et des époxydes sesquiterpéniques. Parallèlement à ces terpènes qui se différencient par la présence de doubles liaisons et par leurs diverses

fonctions, des dérivés du phénylpropane peuvent également exister ; ils peuvent être accompagnés de leurs produits de dégradation comme par exemple des dérivés hydroxylés ou méthylés du benzaldéhyde ou de l'alcool benzylique.

Une partie des composants alcooliques et phénoliques peut être estérifiée avec des acides carboxyliques. Bien que généralement ces esters ne soient présents qu'en faible quantité, ce sont souvent eux qui déterminent la finesse caractéristique de l'odeur d'une huile essentielle. Les dérivés aliphatiques non ramifiés sont souvent sensibles à l'oxygène de l'air et leurs dérivés oxygénés, particulièrement les aldéhydes ou les cétones mais aussi les alcools, les époxydes, les esters d'acides carboxyliques, peuvent également être présents dans les huiles essentielles.

Les composés volatils contenant du soufre et/ou de l'azote, comme ceux présents dans le poireau ou la moutarde, sont parfois assimilés à des huiles essentielles.

La composition d'une huile essentielle est en général très complexe. Les méthodes analytiques modernes rendent possibles, la détection, l'identification et la quantification de plus d'une centaine de constituants pour une même huile essentielle [Tenscher et al., 2005].

I.1.6. Méthodes d'extraction

I.1.6.1. La distillation

C'est le procédé le plus ancien et le mieux adapté pour extraire les essences des végétaux aromatiques. La méthode est basée sur la distillation des composés volatils et de l'eau simultanément à une température inférieure à 100°C sous pression atmosphérique normale. En conséquence, les produits aromatiques sont entraînés par la vapeur d'eau sans subir d'altérations majeures. Il existe précisément trois différents procédés utilisant ce principe : l'hydrodistillation, l'hydro diffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau [Piochon, 2008].

I.1.6.2. L'expression

Cette technique s'adresse essentiellement aux agrumes (citron, pamplemousse, orange,...). Elle consiste à presser mécaniquement les zestes de ces agrumes pour extraire des poches sécrétrices une substance appelée : essence. L'expression des citrons, par exemple, s'effectue à froid : les zestes sont râpés sous jet d'eau, l'émulsion eau et essence est séparée

par centrifugation ; on parle ainsi d'essence de citron et non d'huile essentielle de citron car les agrumes ne peuvent être distillés. La conservation de cette essence s'effectue au frais, car la chaleur déstabiliserait celle-ci [Zahalka, 2010].

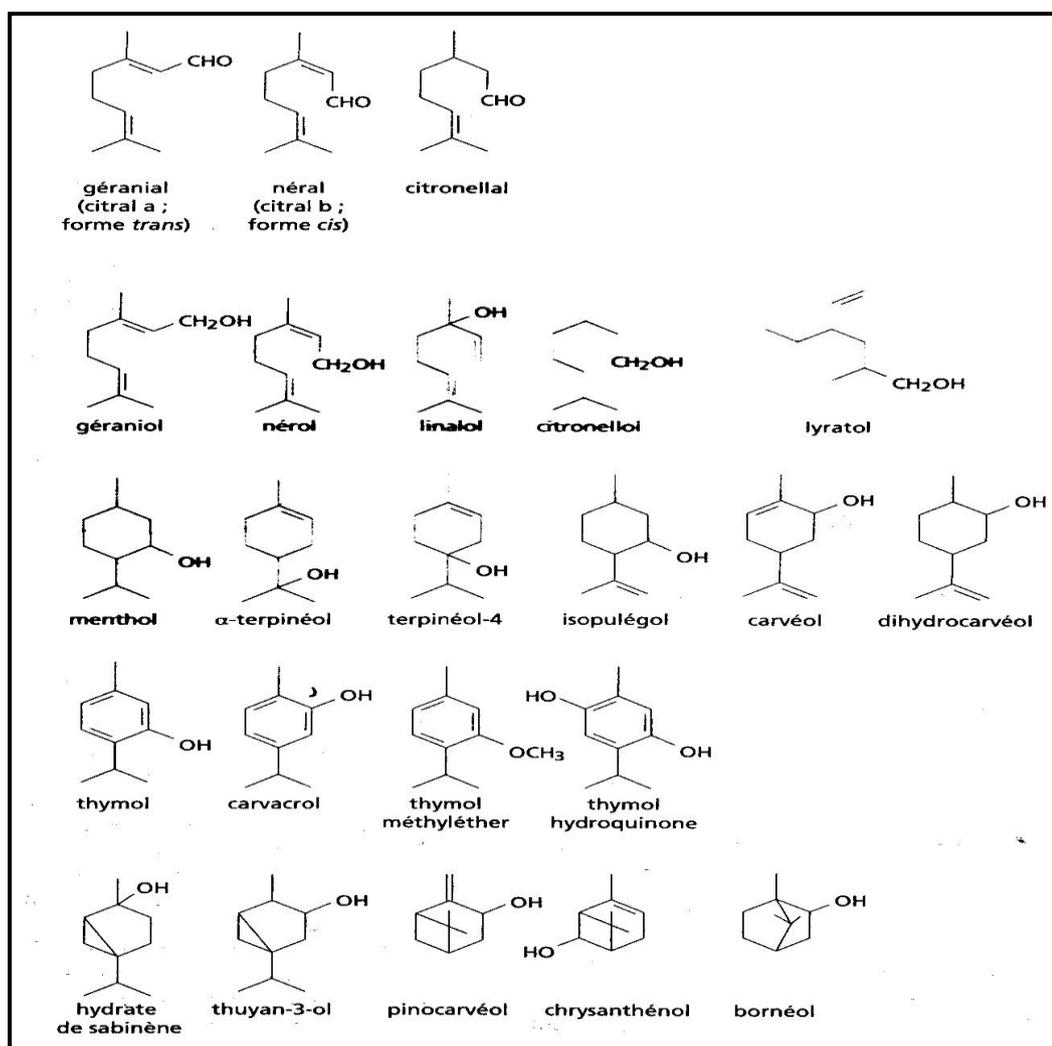


Figure 1: Exemples d'aldéhydes et d'alcools monoterpéniques

[Tenscher et al., 2005]

I.1.7. Méthodes d'identification chimiques des huiles essentielles

Une fois l'extrait le plus représentatif obtenu, l'analyse permet d'identifier et de quantifier les produits qui le composent.

La séparation des composés s'effectue en général par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) notamment pour les composés volatils (mon- et sesquiterpènes) et par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) pour les composés pas ou peu volatiles.

La méthode couramment utilisée pour l'identification des huiles essentielles est le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/ Spectrométrie de Masse (CPG/SM). Il permet de connaître, dans la grande majorité des cas, la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation [Harkati, 2011].

I.1.8. Facteurs de variabilité des huiles essentielles

Les huiles essentielles obtenues de différentes ou de même espèce végétale peuvent varier quantitativement et/ou qualitativement. Cette variation peut être due aux différents facteurs suivants:

I.1.8.1. Facteurs extrinsèques

a) L'origine géographique

Le nom du pays ou d'une région apporte des précisions intéressantes sur le biotope de la plante aromatique et caractérisera sa composition biochimique particulière [Zahalka, 2010].

b) les conditions environnementales

Selon les conditions environnementales, le profil chimique peut également être modifié : la qualité et la quantité de lumière, la température, l'indice de pluviométrie, les facteurs édaphiques et le stress (par exemple la contamination par des microorganismes conduisant à la synthèse de phytoalexines) sont autant de facteurs influençant la composition d'une plante donnée [Tenscher et al., 2005].

c) facteurs technologiques

- *Le mode culture*

Le mode de culture de la plante induit des variations dans la finesse de l'arôme, la puissance d'action et la pureté [Zahalka, 2010].

- *Conservation du matériel végétal*

La période de récolte, traitement après récolte ainsi que la durée de stockage du matériel végétal peuvent entraîner de profondes modifications sur l'essence [El Abed et Kambouche, 2003 ; Tenscher et al., 2005].

- *Le mode d'extraction*

Le mode d'extraction d'une huile essentielle marque son empreinte la composition chimique de celle-ci [Burt, 2004].

I.1.8.2. Facteurs intrinsèques

a) L'origine botanique

L'aromathérapie scientifique exige une connaissance parfaite de la classification botanique des plantes aromatiques. Il faut connaître exactement l'espèce botanique (en latin) de la plante utilisée pour la distillation. Ceci permet avec cette dénomination scientifique internationale d'éviter les confusions et de savoir avec précision la plante à distiller [Zahalka, 2010].

b) L'organe producteur

C'est la partie utilisée du végétal pour la distillation (ou l'expression). La composition chimique d'une plante varie selon la nature de ces organes, car la biosynthèse y est nettement différenciée [Tenscher et al., 2005].

c) Le chémotypes ou spécificité biochimique

Les chémotypes (chimiotypes) ou les races chimiques existent chez de nombreuses plantes aromatiques et fournissent des essences différentes par leur composition [El Abed et Kambouche, 2003].

La composition chimique d'une plante est avant tout déterminée par sa biosynthèse et son profil génétique. Ainsi, pour une même espèce, de nombreux chémotypes aux profils chimiques différents peuvent exister. C'est le cas bien connu du thym dont l'huile essentielle renferme majoritairement du thymol, du carvacrol, du *p*-cymène, du linalol ou de l' α -terpinéol, selon la race chimique. Celle-ci sera sélectionnée selon l'usage aromatique et/ou thérapeutique recherché.

Une plante aromatique à usage strictement culinaire sera ainsi sélectionnée en fonction de ces qualités gustatives et odorantes, alors que des critères beaucoup plus stricts seront imposés pour la même plante destinée à des fins thérapeutiques [Tenscher et al., 2005].

d) Le stade végétatif

Pour bénéficier du potentiel maximal offert par les plantes aromatiques, on effectuera la récolte pendant le stade végétatif où elle est plus riche en essence [Zahalka, 2010].

I.1.9. Propriétés biologiques et pharmacologiques

Par leurs nombreuses et diverses propriétés, les plantes aromatiques et leurs essences trouvent leur emploi dans de multiples domaines telles que : l'alimentation, la pharmacie, la parfumerie, l'aromathérapie. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origines bactériennes.

Dans les préparations pharmaceutiques, les terpènes phénoliques, comme le thymol et le carvacrol, sont souvent utilisés comme antiseptiques, antimicrobiens et antifongiques. Le thymol est très irritant, astringent et caustique.

Dans les domaines phytosanitaires et agro-alimentaires, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient être employés comme agents de protection contre les champignons et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires [El Abed et Kambouche, 2003; El Kalamouni, 2010].

Les propriétés biologiques des huiles essentielles sont innombrables et variables selon les espèces. Leurs multiples et diverses propriétés, nées de la complexité de leur structure, se résument dans ce qui suit :

I.1.9.1. Propriétés appétentes et digestives

La principale activité des plantes aromatiques consiste à stimuler physiologiquement les sécrétions enzymatiques des glandes salivaires, les sécrétions gastriques, pancréatiques et intestinales ainsi que l'excrétion biliaire, ce qui se traduit globalement par un effet stimulant sur la digestion [Tenscher et al., 2005].

I.1.9.2. Activités antimicrobiennes

I.1.9.2.1. Généralités

Les qualités antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20^{ième} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. Ces propriétés antimicrobiennes sont dues à la fraction des huiles essentielles contenues dans les plantes. La tendance actuelle des consommateurs à rechercher une alimentation plus naturelle, a entraîné un regain d'intérêt des scientifiques pour ces substances [Essawi et al., 2000 *in* El Kalamouni, 2010].

Depuis deux décennies, des études ont été menées sur le développement de nouvelles applications et l'exploitation des propriétés naturelles des huiles essentielles dans le domaine alimentaire.

Les huiles essentielles, actuellement employés comme arômes alimentaires sont également connues pour posséder des activités antimicrobiennes et pourraient donc servir d'agents de conservations alimentaires, et ce d'autant plus qu'ils sont pour la plupart classés « généralement reconnus comme sains », ou approuvés comme additifs alimentaires par la *Food and Drug administration*. Ils n'ont, par conséquent, pas besoin d'autorisation d'emploi dans les aliments ; cependant, des études préalables sont nécessaires afin de mieux cerner leur activité antimicrobienne.

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celle des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique. Elles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Pour les levures, elles agissent sur la biomasse et la production des pseudomycéliums alors qu'elles inhibent la germination des spores, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures [El Kalamouni, 2010].

I.1.9.2.2. Activité antifongique

Plusieurs études rapportent les propriétés antifongiques des huiles essentielles [Blaskara Reddy et al., 1998; Regnault- Roger et al., 2002 ; Chebli et al., 2003; Duru et al., 2003; Dohou et al., 2004 et Mohammedi, 2006; Talibi et al., 2012].

Un grand nombre de composés volatils ont été testés contre une large gamme de champignons : *Candida* (*C. albicans*), *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*), *Penicillium chrysogenum*. La plupart de ces composés sont également de très bons agents antifongiques : le thymol, le carvacrol, l'eugénol, etc. [Piochon, 2008].

Benjilali et al. (1986), ont enregistré le pouvoir antifongique de 26 huiles essentielles testées : huile essentielle de l'armoise blanche (de trois régions), du thym, d'eucalyptus et du romarin. L'huile essentielle du thym s'est révélée la plus active sur les 37 souches de moisissures étudiées, suivie de l'armoise blanche, celle du romarin et de l'eucalyptus étant les moins efficaces.

Les travaux de Chebli et al. (2003), ont permis de mettre en évidence l'effet antifongique de 25 huiles essentielles distillées à partir de plantes médicinales marocaines contre *Penicillium digitatum*, *Phytophthora citrophthora*, *Geotrichum citriaurantium* et *Botrytis cinerea*. L'huile essentielle de *Ghrysanthemum viscidhirtum* à une concentration de 150 ppm a fortement inhibé la croissance in vitro de quatre champignons. Les 24 autres huiles réduisent le développement des champignons à une concentration de 250ppm. Ainsi selon Mohammedi (2006), les huiles essentielles de *Lavandula stoechas* et *Citrus ladaniferus* se sont avérées active sur les sept moisissures testées : *Rhizopus stolonifier*, *Mucor sp*, *Trichoderma sp*, *Alternaria sp*, *Fusarium sp*, *Penicillium sp* et *Aspergillus flavus*.

I.1.9.2.3. Activité antibactérienne

Origan, thym, sauge, romarin, clou de girofle sont autant de plantes aromatiques fréquemment utilisés comme ingrédients alimentaires. Les huiles essentielles de ces plantes ont toutes une particularité commune : elles sont riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces trois composés possèdent une forte activité antibactérienne contre un large spectre de bactéries : *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogène*, *Salmonella enterica*, *Clostridium jejuni*, *Lactobacillus sake*, *Satphylococcus aureus* et *Helicobacter pyroli* [Piochon, 2008].

a) Mode d'action contre les bactéries

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles a fait l'objet d'un grand nombre de publications à l'échelle internationale. Cependant, la majorité des travaux cités dans ces publications s'arrêtent au niveau de la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de ces huiles essentielles.

D'une manière générale, en raison de leur caractère lipophile, les constituants des huiles essentielles se lient aux membranes cellulaires des microorganismes. Ils inhibent notamment les échanges d'électrons membranaires lors des phosphorylations oxydatives et freinent ainsi le métabolisme énergétique. De fortes concentrations en huiles essentielles conduisent également à la lyse membranaire et à la dénaturation des protéines cytoplasmiques [Tenscher et al., 2005].

b) Analyse de l'action thérapeutique des huiles essentielles « aromatoگرامme »

La méthode d'aromatoگرامme, inspirée de la pratique des antibiogrammes, permet d'étudier la sensibilité des germes aux huiles essentielles. On peut ainsi mesurer le pouvoir antibactérien et antifongique des huiles essentielles de manière fiable et reproductible.

La technique se fonde sur la « méthode des disques ». Une suspension bactérienne, ou fongique prélevée, ensemencée sur surface plane d'un milieu gélatinisé coulé en boîte de Pétri. Les disques imprégnés d'huiles essentielles choisies sont déposés sur le milieu.

Après un temps d'incubation à l'étuve (24h), on constate la présence ou non d'une auréole claire et transparente et dont la mesure du diamètre (incluant le disque), permet de définir l'activité microbienne *in vitro* des huiles essentielles testées.

Par cette méthode, deux catégories d'huile essentielle apparaissent:

- Les huiles essentielles actives sur les germes et qui seront utilisées dans le traitement;
- Les huiles essentielles peu actives ou inactives sur les germes ; ces derniers seront dits : « résistants » à ces huiles essentielles qui seront écartées [Zahalka, 2010].

I.1.9.3. Propriétés carminatives

L'effet carminatif des épices et des aromates, qui se manifeste par une réduction des ballonnements et des flatulences, peut impliquer trois mécanismes :

Les plantes aromatiques stimulent la sécrétion des glandes digestives. La stimulation des sécrétions enzymatiques par les différents organes digestifs ainsi que l'augmentation des sécrétions biliaires garantissent une bonne dégradation des aliments et limitent les fermentations indésirables.

En raison de leur contenu en huile essentielle, les plantes aromatiques sont également spasmolytiques. Les constituants des huiles essentielles, lipophiles et de faible poids moléculaires, s'intègrent de manière réversible aux membranes des cellules musculaires lisses, notamment au niveau d'entrée de l'estomac (cardia). Ils influencent négativement la perméabilité de certains canaux ioniques, diminuant ainsi la contractibilité de ces organes. Ce qui limite l'aérophagie et supprime les spasmes intestinaux.

L'introduction dans le gros intestin d'huiles essentielles, sous forme d'émulsions diluées, réduit les spasmes.

Les plantes médicinales possèdent enfin des propriétés antimicrobiennes marquées qui peuvent réduire la multiplication de bactéries pathogènes et ainsi empêcher la formation de gaz et de métabolites toxiques au niveau intestinal.

Parmi les plantes aromatiques carminatives, citons notamment l'anis, le fenouil, le carvi, la menthe et la cannelle [Tenscher et al., 2005].

I.1.9.4. Propriétés antioxydantes

Les plantes aromatiques élaborent des molécules caractérisées par de nombreuses fonctions capables de piéger les radicaux libres, d'où leurs effets antioxydants.

Les antioxydants transmettent aux radicaux oxygénés l'hydrogène des fonctions phénoliques ou forment des produits stables avec des radicaux d'acides gras et interrompent ainsi les réactions radicalaires en chaîne.

De bons capteurs de radicaux libres sont par exemple les dérivés de l'*o*-dihydroxybenzène (comme les flavonoïdes et les isoflavonoïdes), les dérivés de l'acide caféique (comme les

acides rosmarinique), les anthocyanes, les *o*-dihydroxycoumarines, les lignanes et les dihydroxyterpènes aromatiques. C'est le cas également des huiles essentielles soufrées, des aldéhydes mono- et diterpéniques, du tocophérol, des caroténoïdes, de l'acide ascorbique et des monophénols (comme l'eugénol) qui peuvent former des hémiquinones relativement stables.

Citons parmi les plantes aromatiques très antioxydantes : la sarriette, le clou de girofle, le gingembre, le poivre, le romarin, la sauge, le thym et l'oignon [Tenscher et al., 2005].

1.1.9.4.1. Méthode d'évaluation de l'activité antioxydante

Dans la littérature, plusieurs méthodes et techniques ont été trouvées pour suivre l'état d'oxydation des lipides et ainsi évaluer l'activité antioxydante. A cause de la propriété essentielle de l'antioxydant (piégeur des radicaux libres), plusieurs méthodes ont été mises en place pour évaluer l'efficacité de l'antioxydant à piéger les radicaux libres (DPPH).

Afin de choisir la bonne méthode, il faut savoir ce que l'on va mesurer et évaluer. Par exemple, la quantité des hydroperoxydes accumulée doit être mesurée avant qu'ils ne commencent à diminuer, après la décomposition des hydroperoxydes, le degré d'oxydation de l'échantillon doit être mesuré en se basant sur la formation des produits d'oxydation secondaire [El Kalamouni, 2010].

1.1.9.5. Autres propriétés

Certaines plantes aromatiques riches en huile essentielles sont utiles en cas de catarrhe bronchique grâce à leurs propriétés bronchospasmodique et sécrétolytique : c'est le cas surtout de l'anis, du fenouil et du thym.

Le fenugrec, le clou de girofle, le gingembre et l'ail présentent une activité antiulcéreuse, qui s'explique par leur potentiel d'inhibition d'*Helicobacter pylori*.

Un effet hypoglycémiant a été observé avec le fenugrec et le tamarin (éventuellement par le ralentissement de la résorption des sucres induit par les mucilages) ainsi qu'avec le cumin, la feuille de laurier, l'olive et l'oignon.

En raison de leur composition flavonoïdique, le persil, la baie de genévrier ainsi qu'un certain nombre d'autres plantes aromatiques ont une réputation de plantes diurétiques.

L'ail, la noix de muscade, l'huile de muscade, l'huile essentielle de girofle, l'olive et l'oignon sont des antiagrégants plaquettaires qui diminuent également la formation de thromboxane A₂. L'ail et l'oignon contribuent à augmenter l'activité fibrinolytique sanguine [Tenscher et al., 2005]. Le tableau (1) présente les principaux composés avec leurs caractéristiques.

I.1.10. Condition de stockage et de conservation des huiles essentielles

La relative instabilité des molécules constitutives des huiles essentielles implique des précautions particulières pour leur conservation: utilisation de flacons propres et secs en aluminium vernissé, en acier inoxydable ou en verre teinté, presque entièrement remplis et fermés de façon étanche (l'espace libre étant rempli d'azote ou d'un autre gaz inerte), stockage à l'abri de la chaleur et de la lumière.

Il existe des normes spécifiques sur l'emballage, le conditionnement et le stockage des huiles essentielles (norme AFNO NF T 75-001, 1996) [Afssaps, 2008].

I.1.11. Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Comme tous les produits naturels : «ce n'est pas parce que c'est naturel que c'est sans danger pour l'organisme ». Cet aspect des huiles essentielles est d'autant plus important que leur utilisation, de plus en plus populaire, tend à se généraliser avec l'émergence de nouvelles pratiques thérapeutiques telle que l'aromathérapie [Piochon, 2008].

La toxicité des huiles essentielles se manifeste par la présence de certaines substances qui, ingérées à très fortes doses, peuvent déclencher des crises épileptiformes, convulsions, asphyxie, hémorragie utérines, ... [Rahili, 2002].

Certaines huiles essentielles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leur pouvoir irritant (huile riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huile riches en cinnamaldehyde ou phototoxique (huile de *citrus* contenant des furocoumarines). D'autres huiles essentielles ont un effet neurotoxique.

Les cétones comme l' α thujone sont particulièrement toxiques pour les tissus nerveux. Il existe aussi quelques huiles essentielles dont certains composés sont capables d'induire la formation de cancers. C'est le cas par exemple de dérivés d'allylbenzènes ou de propénylbenzenes comme le safrole (*sassafras*), l'estragole (*Artemisia dracuncululus*).

Les risques de toxicité des huiles essentielles peuvent être liés à la variabilité des matières premières ainsi qu'à d'éventuelles confusions. En effet, les matières premières végétales évoluent au cours du temps et ces sources peuvent engendrer des variations importantes au niveau de la composition de leurs huiles essentielles.

Les indications thérapeutiques d'une huile essentielle sont bien souvent différentes de celles relatives aux matières premières végétales dont elles sont issues. Ainsi, la feuille de romarin possède des vertus cholérétiques et cholagogues, alors que son huile essentielle, qui est dépourvue des principes phénoliques responsables de ces activités sur la sphère, digestive, est surtout antiseptique [**Tenscher, 2005**].

Des modifications chimiques des produits natifs peuvent également prendre naissance lors de l'extraction, comme l'hydrolyse et l'isomérisation de composés thermolabiles, la diminution du pH par libération des acides organiques initiaux et l'hydrolyse des liaisons esters [**Piochon, 2008**]. Citons à titre d'exemple les capitules de matricaire qui biosynthétisent une lactone sesquiterpénique, la matricaire, alors que son huile essentielle contient le chamazulène (carbure insaturé à doubles liaisons conjuguées, de couleur bleue), un produit de dégradation résultant de l'ouverture du cycle lactone, d'une décarboxylation et d'une aromatisation. Enfin, les profils chimiques des huiles essentielles diffèrent selon les procédés d'extraction utilisés [**Tenscher, 2005**].

Rappelons que la délivrance au public de certaines essences est réservée au pharmacien. Il s'agit notamment des huiles essentielles neurotoxiques, qui bénéficient d'une législation pharmaceutique spéciale, comme celles à thuyone (HE de tanaïsie, d'absinthe, the thuya, de sauge), à pinocamphone (HE d'hysope), ou à anéthole (HE de fenouil, d'anis vert) [**Tenscher, 2005**].

Tableau 1: Huiles essentielles et familles biochimiques [Roux et al., 2008]

Famille	Action pharmacologique	Exemple de principe actif	Exemple d'huile essentielle
Monoterpènes	Antiseptique Action révulsive	Limonène α et β pinène	Pin sylvestre Sapin Genevrier
Sesquiterpènes et Azulènes	Anti-inflammatoire Anti histaminique	Bisabolène Chamazulène	Matricaire
Phénols	Bactéricide, virucide Fongicide Immunostimulant Tonique à faible dose	Thymol Carvacrol Eugénol	Thym à thymol ou carvacrol Sariette Giroflier
Alcools monoterpénique	Bactéricide, virucide Antifongique	Linalol Géranol α Terpineol Menthol Bornéol	Arbre à thé Menthe poivrée Géranium
Alcools sesquiterpéniques	Tonique Décongestionnant Veineux et lymphatique	Farnésol Viridifloral Cédrol	Niaouli Cyprés
Aldéhydes monoterpéniques	Anti-inflammatoire Anti hypertensif Sédatif Antiviral antimycosique	Citral Geranial	Mélisse Eucalyptus
Aldéhydes aromatiques	Anti infectieux Antalgique Sédatif	Aldéhyde cinnamique Aldéhyde cummique	Cannelle Cumin
Cétones	Faible dose: mucolytique Cholagogue Cholérétique	Mentone Carvone Camphre Thuyone Pinocamphone	Carvi Menthe poivrée Sauge Romarin à camphre
Esters	Antispasmodique Anti inflammatoire	Acétate de linalyle Acétate de geranyle Acétate de méthyl	Lavande Carotte sauvage
Coumarines	Sédatifs Anticoagulants Spasmodiques	Coumarine Bergaptène	Citrus
Composés soufrés	Antibactériennes Antiparasitaires	Composés soufrés	Ail Oignon

I.2. Armoise blanche « *Artemisia herba alba Asso* »

I.2.1. Généralité sur la famille des *Asteraceae* martinov (1820) « *Compositae* Giseke (1792)

Il s'agit de la plus vaste famille de phanérogames, avec 1530 genres et plus de 23000 espèces. Les *Asteraceae* peuvent se rencontrer sur toute la surface du globe. Néanmoins, elles sont particulièrement diversifiées dans les régions sèches, comme le Bassin Méditerranéen, l'Afrique australe, le Mexique et le Sud-Ouest des Etats-Unis, les régions arides d'Amérique du sud. Cette famille est définie par deux caractères suivants: groupement des fleurs en capitules et soudure des étamines par leurs anthères [Ozenda, 1983].

Les principaux genres sont *Senecio*, avec 1500 espèces, *Vernonia*, avec 1000 espèces, *Cousinia*, avec 600 espèces, *Eupatorium*, avec 600 espèces, *Hieracium*, avec 500 espèces, *Helichrysum*, avec 500 espèces, *Artemisia*, avec 400 espèces, *Baccharis*, avec 400 espèces.....[Botineau, 2013].

I.2.1.1. Caractères botaniques

1. Appareil végétatif

L'appareil végétatif se caractérise par quatre caractères :

- Ce sont principalement des herbes, vivaces par des parties souterraines tubérisées, mais quelquefois annuelles ; on rencontre aussi quelques espèces ligneuses : lianes, arbustes et même arbres (*Seneçon*).

Les feuilles, toujours sans stipules, sont le plus souvent alternes, mais parfois opposées (*Arnica*), verticillées, ou regroupées en rosette. Ces feuilles sont souvent simples, profondément découpées, et dans les pays tropicaux, peuvent devenir succulentes ou au contraire se réduire à des écailles.

- Les *Asteraceae* sont pourvues d'un appareil sécréteur :
 - soit des cellules et canaux sécréteurs, responsables de l'odeur caractéristique de certaines espèces (armoise, Camomille...)
 - soit laticifères comme chez le groupe des Chicorées et plantes affines (Pissenlit, Laiterons...). Lorsqu'on brise la tige de ces plantes, il s'exsude un suc blanchâtre.
- Les organes de réserve contiennent de l'inuline, hydrolysable en fructose.
- Les *Asteraceae* sont riches en polyacétyléniques et en lactones sesquiterpéniques [Guignard, 1998 ; Botineau, 2013]

2. appareil reproducteur

Celui-ci présente trois caractères originaux:

- l'inflorescence en capitule ;
- les fleurs, très particulières dont les anthères sont soudées entres elles, ce qui a valu à cette famille le qualificatif de Synanthérées ;
- le fruits, un akène généralement surmonté d'un pappus [Gausсен et al., 1982 ; Guignard, 1998]

I.2.1.2. Applications biologiques et pharmacologiques

Les applications biologiques et pharmacologiques des espèces de la famille des Asteraceae sont le résultat de leur importance dans la médecine traditionnelle et le fruit de plusieurs études chimiques et pharmacologiques.

La majorité des applications biologiques et thérapeutiques des espèces de la famille des Asteraceae concernent des effets antimicrobiens, antifongique,(tableau 2).

Tableau 2: Applications biologiques et pharmacologiques de quelques espèces de la famille des Asteraceae en fonction de leurs principes actifs [Botineau, 2013]

Espèces	Propriétés	Principe actif
<i>Arctium lappa</i> L	Antimicrobienne, antifongique, traitement de la furonculose et dermatose	Dérivés acétyléniques ou polyines
<i>Carlina acaulis</i> L.	Antistaphylococcique, antidermatosique	
<i>Cynara scolymus</i> L.	efficace vis-a-vis des troubles hépatobiliaires	Acides - Phénols
<i>Chamaemelum nobile</i> L.	diurétique action antibiotique spécifique, contre <i>Brucella melitensis</i>	Coumarines
<i>Chamaemelum nobile</i> L.	stomachiques, antiprurigineux	Flavonoïdes
<i>Artemisia annua</i> L. <i>Artemisia maritima</i> L.	anti-malariques molluscicides	Lactones sesquiterpénique

I.2.2. Armoises « Genre *Artemisia*»

Le genre *Artemisia* comprend des plantes médicinales importantes qui font actuellement l'objet d'une attention phytochimique en raison de leur diversité biologique et chimique.

Un grand nombre d'armoises (environ 250 espèces) sont réparties à travers l'hémisphère Nord. Plus d'une dizaine d'espèces ont été déterminées en Algérie ; certaines sont rares et disséminées en hautes montagnes, ou cantonnées dans certaines limites; d'autres sont au contraire particulièrement abondantes et répandues sur de grandes étendues, par exemple : *Artemisia herba alba* (chih), espèce typique du paysage steppique et saharien. Leur détermination n'est pas très délicate, d'autant qu'elles sont pour la plupart, vivaces et aromatiques [Baba Aissa, 2000].

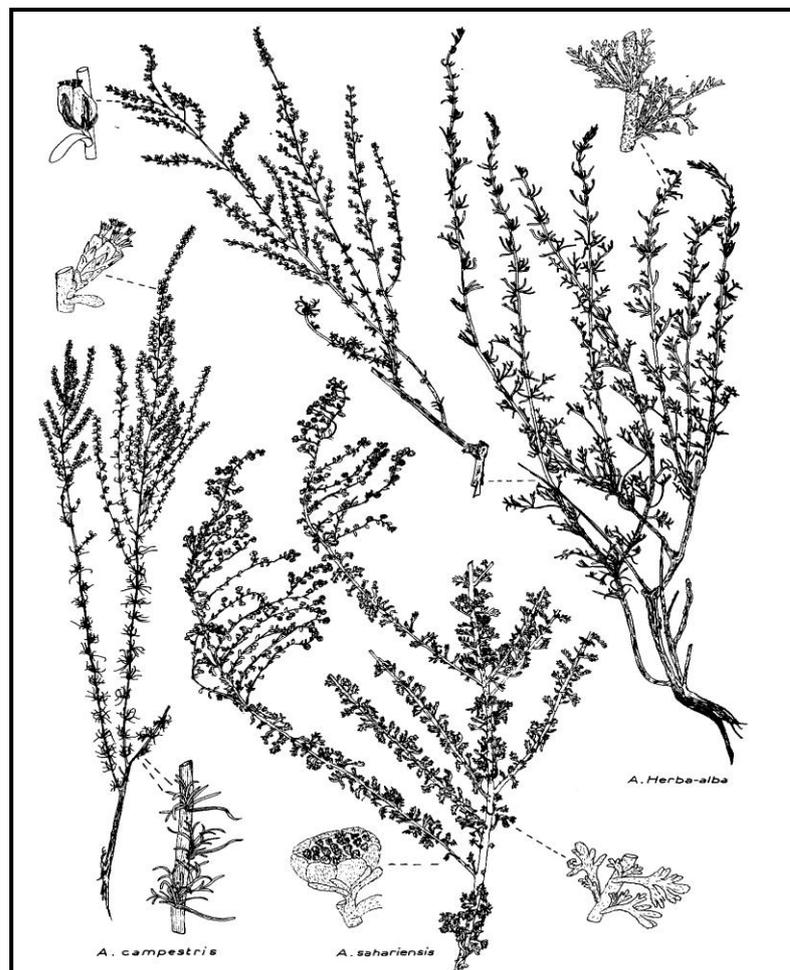


Figure 2: *Artemisia* [Ozenda, 1983]

Les dessins de détail représentent pour chaque espèce un fragment de rameau portant quelques feuilles (X2) et un capitule très grossi (X7)

I.2.2.1. Activités pharmacologiques

Le genre *Artemisia* a fait l'objet de nombreux travaux scientifiques mettant en évidence des activités variées. Des espèces d'*Artemisia* sont fréquemment utilisées pour le traitement des maladies telles que la malaria, l'hépatite, le cancer, les inflammations et les infections [Willcox, 2009].

- ❖ *Artemisia absinthium* L. est utilisée pour ses effets antiparasitaires et pour traiter l'anorexie et l'indigestion. Les parties aériennes sont présentes dans de nombreuses préparations à base de plantes gastriques, en complément alimentaires et des boissons alcoolisées ;
- ❖ *A. afra* est utilisée pour de nombreuses affections, y compris le rhume, la toux, le diabète, les brûlures d'estomac, et l'asthme ;
- ❖ *A. annua* L. est utilisé comme un thé pour le traitement du paludisme ;
- ❖ *A. campestris* L. possède une large gamme de propriétés antimicrobienne, anti-inflammatoire et anti venin;
- ❖ *A. herba alba* Asso est utilisée sous forme d'une décoction contre la fièvre et les problèmes menstruels et nerveux ;
- ❖ *A. vulgaris* L est largement utilisée pour ces actions anti hypertenseurs, anti inflammatoires, antispasmodiques, carminatives et vermifuges [Abad et al., 2012].

I.2.2.2. Composition chimique des huiles essentielles du genre *Artemisia*

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels très complexes qui peuvent contenir plusieurs composés à des concentrations différentes. Elles sont caractérisées par 2 à 3 composants principaux à des concentrations assez élevées (20 – 70%) (Figure 3).

La composition chimique des huiles essentielles extraites à partir de genre *Artemisia* a été largement étudiée dans plusieurs espèces partout dans le monde. L'odeur forte et aromatique de certaines espèces de ce genre est due principalement à la haute concentration de terpènes volatiles.

De nombreuses études ont montré que les espèces du genre *Artemisia* affichent des variations intra-spécifiques significatives dans les constituants terpéniques de leurs huiles essentielles. Dans certains cas, la variation dans les composés volatiles de ces plantes peut se produire lors de la croissance de la plante aux différentes altitudes [Abad et al., 2012].

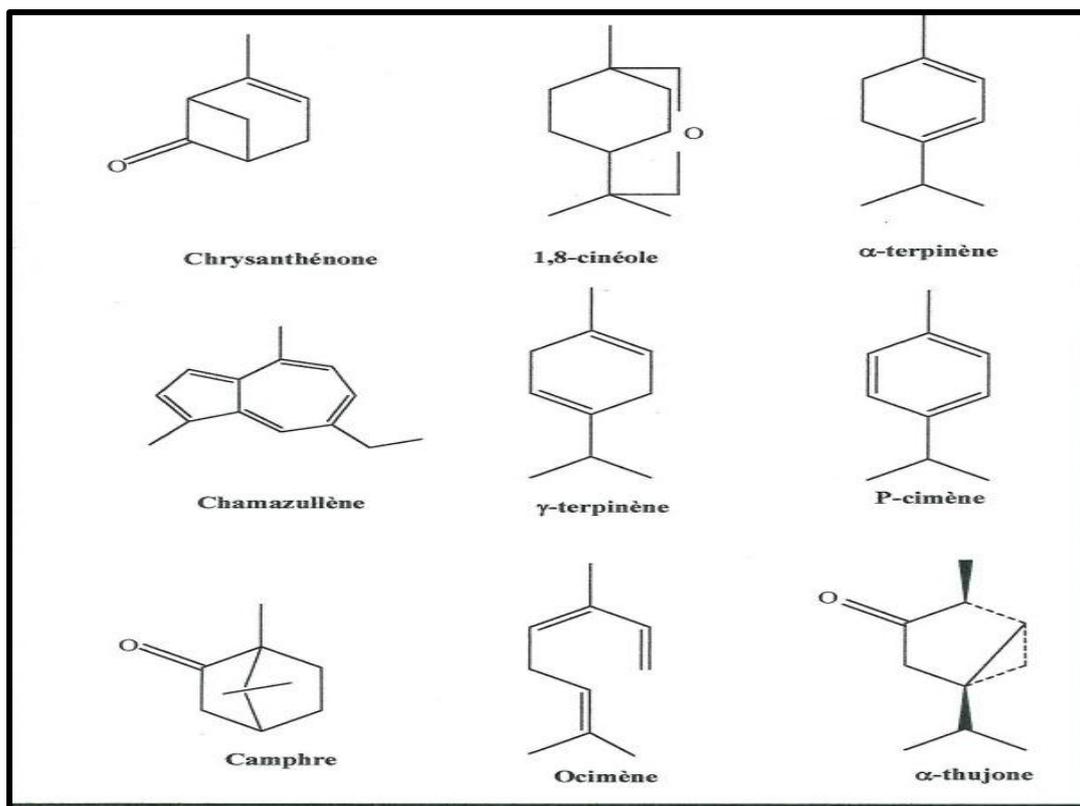


Figure 3: Structures chimiques de quelques composés rencontrés dans les huiles essentielles [Khebri, 2011]

I.2.2.3. Armoise blanche « *Artemisia herba alba* Asso »

1. Appellation locales

Arabe: Chih

Tamazight: ifsi

2. Description morphologique

Sous arbrisseau tomenteux blanchâtre, de 30 à 50cm, à nombreuses tiges dressées, ligneuses à la base; feuilles pubescentes, divisées en petites et fines languettes d'un vert argenté; inflorescences très petits capitules jaunâtre, sessiles, groupés par 2 à 12 (suivants les variétés); bractées de l'involucre glanduleuses. Odeur aromatique caractéristique [Ozenda, 1983; Baba Aissa, 2000].

3. Nomenclature et taxonomie

Règne : Plantae

Embranchement: Spermaphytes (Phanérogames) ou « plantes à graines »

Sous- embranchement: Angiospermes (Plantes à fleurs)

Classe: Dicotyledones (Magnoliopsida)

Sous- classe: Asteridae

Ordre: Asterales

Famille: Asréracées ou composée

Tribu: Anthemideae

Sous- tribu: Aremisiinae

Genre: *Artemisia*

Espèce: *Artemisia herba alba* Asso [Guignard, 1998].



(A)

(B)

Figure 4: *Artemisia herba alba*: (A) la plante au début de la saison de floraison, (B) la plante à la fin de la saison de floraison [Messai, 2011]

4. Description géographique

- Local: les Hauts plateaux et le Sahara septentrional
- Regional: Afrique du Nord
- Mondial: Espagne, Afrique du Nord et Asie occidentale

5. Ecologie

Arbrisseau méditerranéen qui abonde au Moyen-Orient, dans le Sud Algérien et au Maroc sur des sables profonds [Boullard, 2001].

L'armoise blanche présente une vaste répartition géographique couvrant, en Algérie, environ 4 millions d'hectares et se développe dans les steppes argileuses et les sols tassés relativement peu perméables. Elle se trouve sur les dayas, les dépressions et les secteurs plus ou moins humide. Elle constitue un moyen de lutte contre l'érosion et la désertification [Ayad et al., 2013].

6. Composition chimique

L'armoise blanche est la principale espèce végétale pâturée surtout au printemps et en été. Elle constitue une source très importante pour le cheptel. La biomasse de cette plante steppique constitue un aliment de substitution pour l'élevage du bétail en période de disette.

En effet la valeur énergétique de l'armoise blanche est de l'ordre de 0.45 UF/ Kg MS. Cette plante présente un équilibre harmonieux entre le calcium (0.5%) et le phosphore (0.07%). Elle est assez riche en cellulose (26,73%) [Ayed et al., 2014].

Il est à noter aussi que la composition biochimique d'une espèce végétale est liée directement à la qualité du substrat (sol). Une grande variabilité de la teneur en éléments minéraux de l'armoise blanche a été enregistrée dans différentes stations de la région de Saida [Bouzidi, 2001].

7. Médecine traditionnelle

Artemisia herba alba, connue aussi sous l'absinthe du désert, est une plante essentiellement fourragère, très appréciée par le bétail comme pâturage d'hiver [Messai, 2011]. Cette espèce a été utilisée dans la médecine traditionnelle par de nombreuses cultures depuis les temps anciens pour ses actions stomachique, antispasmodique, antigestralgique, vermifuge

C'est l'armoise la plus connue en Algérie. Le chih est un remède très populaire auquel on a souvent recours: pour faciliter la digestion, calmer les douleurs abdominales et certains malaises du foie et antidiabétique. Ses racines sont indiquées contre certains troubles nerveux [Baba Aissa, 2000].

Le miel butiné sur l'armoise blanche partagerait les propriétés de la plante elle-même [Boullard, 2001].

8. L'huile essentielle d'*Artemisia herba alba*

Au cours des dernières décennies, l'huile essentielle de l'armoise blanche a été soigneusement étudiée et la diversité dans la composition de cette huile recueillie dans différents pays a conduit à de nombreux chemotypes. Généralement, l'huile a été en grande partie rapporté être composée de monoterpénoïdes, principalement oxygénés tels que le 1-8 cinéole, chrysanthenone, α et β thujones et le camphre comme composants majeurs [Mohamed et al., 2010].

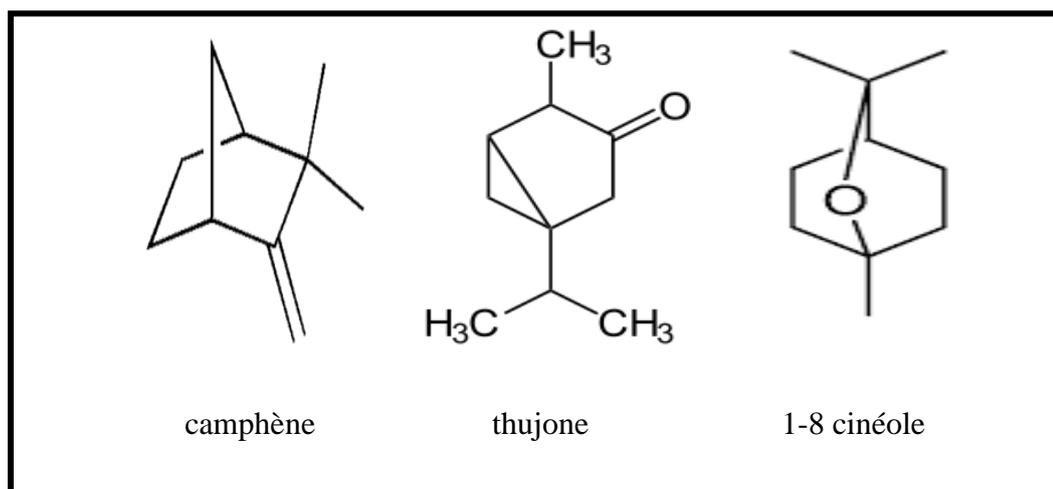


Figure 5: Structures chimiques de quelques composés rencontrés dans l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba*

Le Maroc détient 90% du marché mondial de l'huile essentielle extraite de l'armoise blanche [Mounni et al., 2013].

L'examen de la littérature scientifique disponible publiée sur *A. herba alba* a montré que l'effet antidiabétique de cette plante était similaire à celle de répaglinide et l'insuline ordinaire [Ribnicky et al., 2004; Tastekin et al., 2006].

Des essais sur les propriétés insecticides de l'huile essentielle d'*A. herba alba* sont menés dans le cadre de la lutte biologique contre *Euchorthippus albolineatus*, un grand ravageur des cultures agricoles [Zaim et al., 2012]. Les résultats obtenus ont montré que cette huile a manifesté une bonne activité acridicide. Ainsi, Sharifian et al. (2012) ont suggéré que l'huile essentielle de l'armoise blanche pourrait avoir un effet potentiel comme agent de contrôle contre *Callosobruchus maculatus* et *Rhyzopertha domonica*.

9. Toxicité

Manger trop de l'armoise blanche a un effet purgatif en particulier sur les moutons, et peut causer la mort des jeunes agneaux [Ghrabi et al., 2005].

La toxicité de certaines populations de l'armoise serait liée à la concentration élevée en thuyone. A forte dose, l'armoise blanche est abortive, neurotoxique et hémorragique [Lahsissene et al., 2009].

I.3. Altération des aliments

On entend par denrée alimentaire (ou aliment), toute substance ou produit, transformé, partiellement transformé ou non transformé, destiné à être ingéré par l'être humain. La fonction première de l'alimentation est de maintenir l'organisme en bonne santé. Il est donc nécessaire d'apporter chaque jour la quantité et la qualité d'aliments dont le corps a besoin.

Les modes d'alimentation et leur évolution au cours du temps dépendent, à des degrés divers, des interactions de quatre groupes de facteurs essentiels : socioculturels, économiques, technologiques et scientifiques [Dupin et al., 1992].

L'aliment, considéré comme indispensable à la survie, devient inesthétique en raison de certaines modifications biologiques ou chimiques indésirables qui entraînent la perte de ses qualités nutritionnelles et gustatives.

Ces altérations surviennent depuis la production des denrées jusqu'à leur consommation et elles résultent de causes diverses:

- ❖ *altérations physiques*: les blessures, la variation de la teneur en eau, le changement de couleur, déstabilisation des émulsions
- ❖ *altérations chimiques*: oxydation, brunissement non enzymatique, dénaturation des macromolécules azotées;
- ❖ *altérations enzymatiques*: elles se produisent surtout entre + 15°C et +50°C. Il s'agit de réactions d'hydrolyse et d'oxydation par les enzymes propres aux produits ou exogènes, apportées par les microorganismes [Vierling, 1998].

I.3.1. Dégradation chimique des denrées alimentaires

Les dégradations ou altérations (autres que microbiologiques) que la denrée a pu subir avant sa consommation, sont des modifications de sa composition, qui l'ont diminuée dans sa valeur intrinsèque, comme le rancissement, une réaction de Maillard non désirée, etc.

1. Dégradation des matières grasses

Les triglycérides, composants principaux des matières grasses, peuvent subir soit une oxydation, soit une hydrolyse, l'oxydation pouvant être suivie d'une hydrolyse et l'hydrolyse d'une oxydation, conduisant dans tous les cas à des produits secondaires et tertiaires odorants caractéristiques du rancissement [Bauer et al., 2010].

Les réactions d'oxydation peuvent se produire même dans des aliments contenant moins de 1% de lipides. Les principaux substrats de l'oxydation sont les acides gras non saturés, ils s'oxydent en général plus vite à l'état libre que lorsqu'ils font partie de molécules de triglycérides ou phospholipides. D'autres substrats non saturés peuvent subir des réactions d'oxydation comme la vitamine A et les caroténoïdes. Les facteurs favorisant l'oxydation sont la chaleur, l'air, la lumière et la présence de certains métaux [Alais et al., 2008].

1.1. Mécanisme de l'oxydation

On distingue dans l'oxydation des matières grasses trois types de réactions:

- les réactions d'initiation qui, à partir d'acides gras non saturés, conduisent à la formation de radicaux libres ou de peroxydes lipidiques;
- les réactions de propagation aboutissant à une accumulation de peroxydes lipidiques ;
- les réactions de terminaison (ou d'arrêt) au cours desquelles les radicaux libres s'associent pour donner des composés non radicalaires très divers (Figure 6) [Dilmi-Bouras, 2004; Alais et al., 2008; Durand et al., 2010].

1.2. Conséquences des réactions d'oxydation

Les réactions d'oxydation donnent naissance à de nombreux composés. En premier lieu, il convient de citer les aldéhydes et cétones de faible masse moléculaire qui sont responsables de l'odeur de rance; c'est la première altération qui se manifeste d'autant que certains d'entre eux sont perçus à des concentrations très faibles, par ailleurs, les composés carbonylés peuvent réagir avec les protéines ou plus généralement favoriser le brunissement non enzymatique, la présence de lipides peut aussi provoquer l'oxydation secondaire de divers arômes [Alais et al., 2008; Cuvelier et Maillard, 2012].

Les dégradations oxydatives affectent les qualités nutritionnelles, sensorielles et commerciales des aliments et peuvent avoir des répercussions sur la santé du consommateur. Elles sont également mises en cause dans le vieillissement des tissus biologiques ainsi que dans de nombreuses pathologies comme l'athérosclérose, les maladies neurodégénératives, les complications du diabète (diabète non insulino-dépendant, aussi appelé diabète gras) et inflammation [Manchado et Cheynier, 2006; Genot et Michalski, 2010].

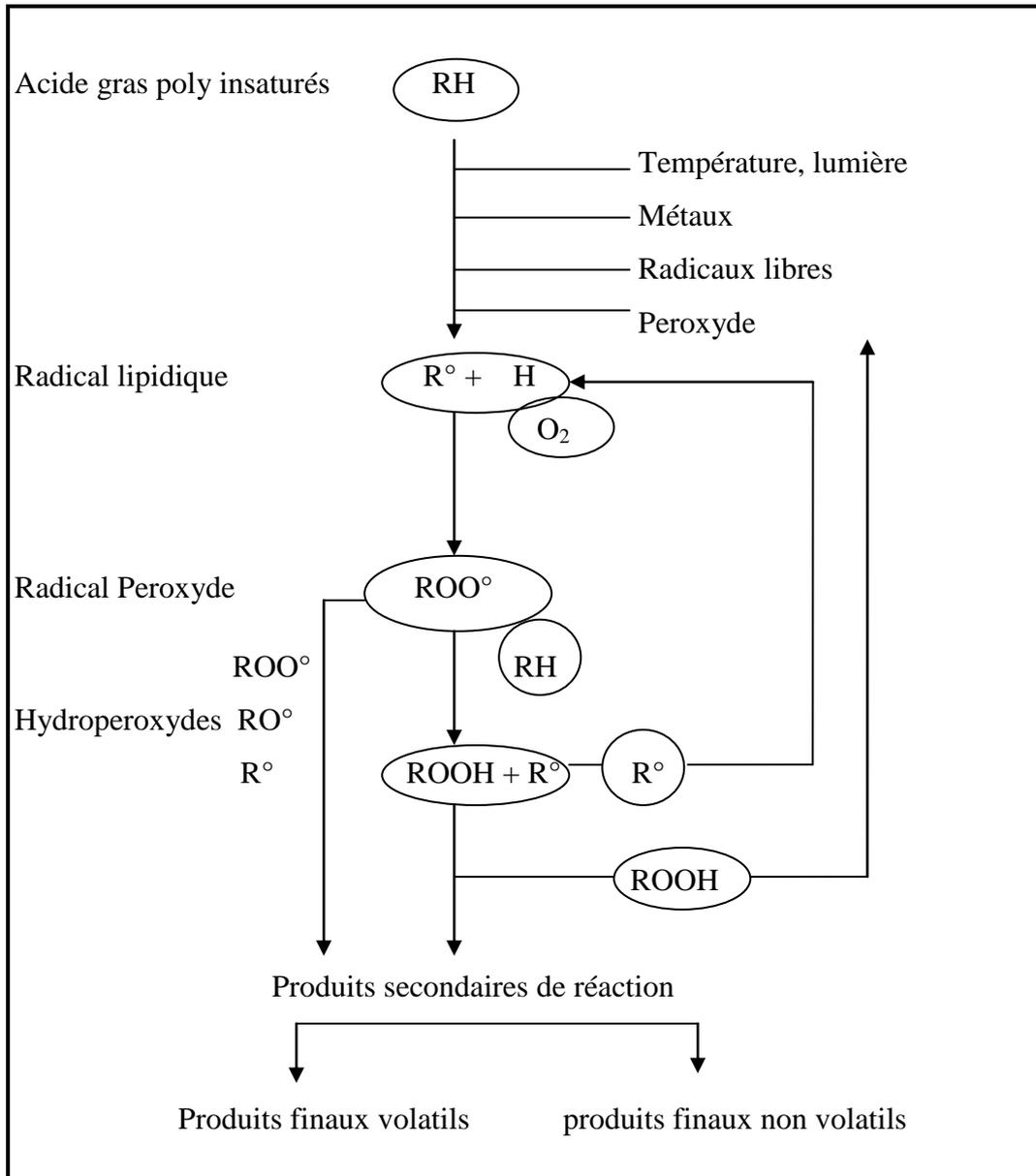


Figure 6: Oxydation des lipides [Durant et al., 2010]

1.3. Inhibition de la peroxydation de lipides

Depuis plusieurs années, les consommateurs exigent une sécurité alimentaire accrue, ce qui donne une importance primordiale aux caractéristiques qualitatives des produits. Ainsi, il convient de limiter la présence de composés défavorables à la santé humaine. Parmi ceux-ci figurent les composés issus de la peroxydation des lipides.

La peroxydation de lipides ne peut jamais être totalement exclue, mais uniquement freinée ou retardée en mettant en œuvre les moyens suivants:

- exclusion partielle de l'oxygène: possible par un emballage sous vide ou par adjonction de glucose oxydase dont l'action est de consommer l'oxygène résiduel,
- entreposage à basse température et dans l'obscurité. Pour les fruits et les légumes qui contiennent l'enzyme lipoxygénase, cette mesure est insuffisante ; une dégradation peut uniquement être évitée si l'enzyme a été inactivée par un blanchiment préalable,
- addition des antioxydants [Bauer et al., 2010].

1.3.1. Antioxydants

On entend par antioxydant «toute substance qui, présente à faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat » [Bauer et al., 2010].

Les antioxydants peuvent être classés en deux groupes selon leur mode d'action :

- ❖ Les antioxydants primaires, également appelés antiradicalaires, sont des molécules capables de bloquer les radicaux lipidiques par transfert d'un H°.

L'antioxydant devient alors lui-même porteur d'un radical, mais à la différence des radicaux lipidiques, il est peu réactif, ce qui stoppe la propagation radicalaire.

Ce groupe d'antiradicalaires est constitué exclusivement de composés phénoliques en raison de la grande stabilité apportée par leur cycle aromatique. On trouvera ainsi dans ce groupes les additifs antioxydants ; BHT, BHA, gallate, mais aussi les tocophérols (vitamine E) (Figure 7) et les polyphénols végétaux [Cuvelier et Maillard, 2012].

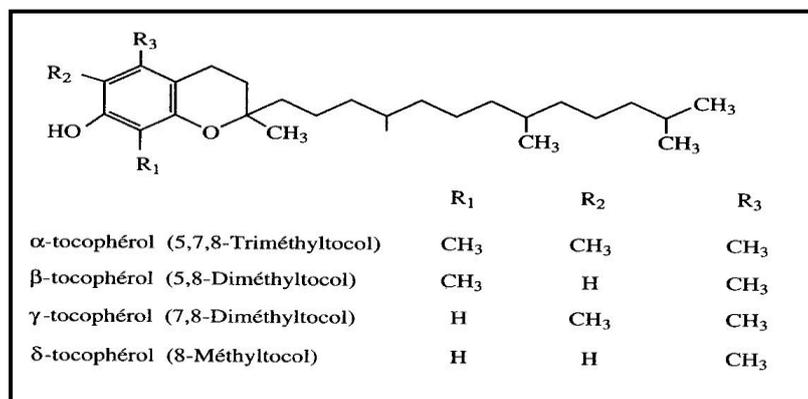


Figure 7: Formules des tocophérols [Berset, 2006]

- ❖ Les antioxydants secondaires agissant par des mécanismes indirects tels que la chélation des ions métalliques ou la réduction d'oxygène. Les agents chélateurs de métaux les plus couramment utilisés sont l'EDTA et l'acide citrique. Parmi les réducteurs d'oxygène, citons principalement l'acide ascorbique (vitamine C) [Cuvelier et Maillard, 2012].

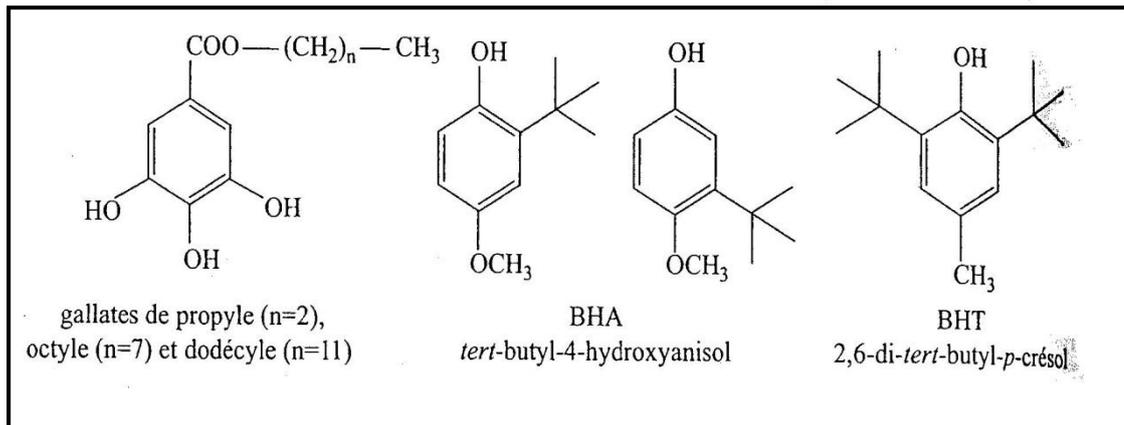


Figure 8: Antioxydants utilisés couramment dans les produits alimentaires [Bauer et al., 2010].

1.4. Evaluation analytique de la dégradation des matières grasses

Du point de vue pratique, la mesure de l'altération des matières grasses est appliquée principalement dans deux cas précis :

- la détermination du taux d'altération d'une huile de friture;
- la détermination de la rancidité d'une huile ou d'une graisse [Bauer et al., 2010].

L'état d'oxydation dans lequel se trouve les matières grasses peut être mesuré de diverses manières, selon que l'on dose l'apparition des produits primaires d'oxydation ou des produits secondaires, la consommation d'oxygènes ou d'acides gras saturés, ou encore la co-oxydation d'autres substrats, tels que des pigments ou des protéines.

Chaque mesure apporte ainsi une information partielle sur un phénomène global, l'idéal étant d'évaluer l'état d'oxydation par plusieurs méthodes complémentaires permettant de suivre en parallèle la formation des produits primaires et secondaires [Cuvelier et Maillard, 2012].

2. Dégradation des protides

Les dégradations des protides, principalement des protéines, qui peuvent se produire lors des processus technologiques ou lors des préparations culinaires, sont soit de nature chimique, soit le résultat de réactions enzymatiques.

2.1. Dégradation de natures chimiques

Lors des traitements thermiques appliqués aux denrées, diverses dégradations des protides peuvent avoir lieu, telles que:

- la formation de ponts covalents intra- ou intermoléculaire de nature isopeptidique ou de type lysinoalanine: baisse de la digestibilité;
- la formation des amines biogènes ;
- des changements indésirables dans la couleur et la flaveur des denrées dus à un début de réaction de Maillard [**Nout et al., 2003**].

a. La réaction de Maillard

La réaction de Maillard ou brunissement non enzymatique est un ensemble de réactions aboutissant à la formation de polymère bruns ou noirs (appelés mélanoidines) à partir de la condensation d'un composé carbonyle (sucre réducteur) et d'une fonction amine libre d'une protéine ou d'un acide aminé. Elle débute par la formation de glycosylamines, produits d'addition qui se réarrangent en des composés intermédiaires stables appelés amino-sucres ou « composés d'Amadori » [**Dilmi-Bouras, 2004**].

❖ **Conséquences et prévention de la réaction de Maillard**

La réaction de Maillard affecte plusieurs aspects de la qualité des aliments, notamment :

- la couleur, l'odeur, l'arome et le gout ;
- perte de la valeur nutritionnelle due principalement à son impact sur les protéines ;
- cependant, elle forme des composés qui ont des propriétés antioxydantes.

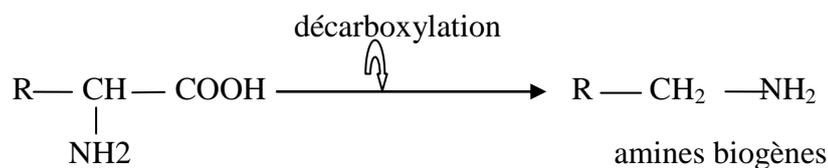
Les moyens de prévenir le brunissement non enzymatique sont relativement peu nombreux. L'addition d'agents inhibiteurs est un moyen efficace de prévenir la réaction de

Maillard. Le seul inhibiteur efficace est, jusqu'à présent, l'anhydride sulfureux, utilisé sous forme de gaz (SO₂) ou de sels (NaHSO₃).

Les sulfites réagissent avec les composés carbonylés, les bases de Schiff, les composés instables, en donnant des sulfonates qui sont des produits stables. L'anhydride sulfureux et les sulfites sont utilisés dans : le moût de raisin et le vin, les fruits déshydratés, les pulpes pour confiture, les jus concentrés, la purée déshydratée de pomme de terre; les tranches de pomme de terre déshydratées [Nout et al., 2003].

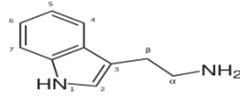
2.2. Dégradation de nature enzymatique : formation des amines biogènes

Les amines biogènes sont des substances qui se forment dans les denrées sous l'action de certaines bactéries par décarboxylation des acides aminés, selon l'équation:



Selon les acides aminés de départ, on obtient les amines biogènes mentionnées dans le tableau 3 [Bauer et al., 2010].

Tableau 3: Formation des amines biogènes à partir des acides aminés correspondants [Bauer et al., 2010].

Acides aminés	Amines biogènes
Histidine	histamine 
Tryptophane	tryptamine 
Lysine	cadavérine $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}_2$
Arginine	putrescine $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$

3. Dégradation des sucres

3.1. Altérations causées par les hydrolases (polysaccharidases)

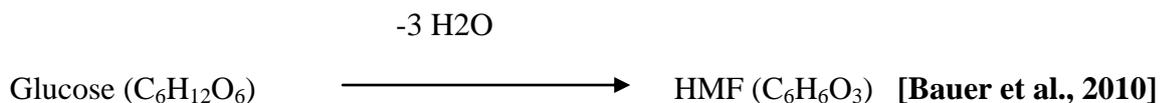
Ce sont essentiellement les pectinases, les cellulases et les amylases. Elles sont naturellement présentes dans les aliments et sont aussi produites par les microorganismes. Leurs activités influent sur la texture et le goût des aliments [Nout et al., 2003].

3.2. Brunissement non enzymatique « réaction de Maillard »

Les pentoses, et notamment le ribose, sont les sucres réducteurs les plus réactifs ; les hexoses (glucose, fructose) sont un peu moins réactifs, et les disaccharides réducteurs (lactose, maltose) encore moins [Nout et al., 2003].

3.3. Dégradation thermique des sucres

L'hydroxyméthylfurfural (HMF) est le principal composé qui se forme lors de la dégradation thermique des sucres, notamment des hexoses, selon la réaction



1.3.2. Altération d'origine microbienne

La plupart des produits alimentaires contiennent des microorganismes; exceptés quelques rares produits alimentaires qui sont naturellement stériles (comme par exemple le contenu des œufs frais) [Nout et al., 2003].

L'action microbienne sur un aliment est variée et affecte les caractères physico-chimiques, nutritifs, et organoleptiques. La prolifération non contrôlée de microorganismes dans un aliment peut poser des problèmes au niveau industriel mais aussi au niveau sanitaire.

Les microorganismes peuvent être les causes des maladies. Les risques encourus varient en fonction de nombreux paramètres : nature du microorganisme, niveau de contamination (dose infectante), nature de l'aliment, état physiologique du consommateur [Guiraud, 2003].

1. Les différentes catégories de maladies liées à la consommation des aliments

- ❖ *Les maladies infectieuses*: sont dues à la prolifération du germe au détriment du tissu de l'hôte. Les bactéries susceptibles d'introduire une infection chez le consommateur: *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*.
- ❖ *Les toxi-infections*: les germes (10^6 - 10^9) produisent des substances toxiques spécifiques dont le pouvoir toxique dépend de la charge microbienne. Les bactéries qui peuvent entraîner une toxi-infection liée à une prolifération massive de bactéries dans l'intestin: *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni*.
- ❖ *Les intoxications*: sont dues à des exotoxines produites par des microorganismes, dans ces cas, la présence des germes eux-mêmes dans l'organisme de l'hôte n'est pas indispensable. Les bactéries qui peuvent provoquer une intoxication par les toxines qu'elles produisent: toxines botuliques, hautement neurotoxique de *Clostridium botulinum*, les entérotoxines de *Staphylococcus aureus* [Nout et al., 2003 ; Leyral et Vierling, 2007 ; Bauer et al., 2010].
- ❖ Certaines moisissures sont capables de synthétiser des métabolites secondaires toxiques, appelés mycotoxines, responsables d'intoxications ou de maladies diverses regroupées sous le nom de mycotoxicoses. Les mycotoxines les plus toxiques sont celles produites par la moisissure *Aspergillus flavus*; ces substances, appelées aflatoxines [Bauer et al., 2010].

2. Principales altérations alimentaires d'origine microbienne

2.1. Altération des viandes et des volailles

Dans la filière des viandes et produits carnés, quelle que soit l'espèce, les viandes sont naturellement contaminées. Même si les sources de contamination sont diverses, la majorité de la contamination trouve son origine aux trois stades critiques suivants:

- a) la contamination liée à l'animal vivant (cuir, peau, plumes, etc.) ;
- b) la contamination au cours de l'abattage, notamment au stade de l'éviscération ;
- c) celle inhérente aux différentes étapes de transformation (découpe, hachage, conditionnement, etc.)

De par sa forte teneur en eau et sa richesse en éléments nutritifs, la viande fraîche est une matrice périssable, car propice à la contamination bactérienne qui peut conduire (selon la charge initiale) à l'altération organoleptique du produit ou à la croissance des bactéries

pathogènes, potentiellement présentes lorsque les conditions optimales de conservation ne sont pas respectées (rupture de la chaîne du froid, par exemple). La garantie de la qualité de la viande est donc essentielle pour le consommateur et devient cruciale lorsque la viande est consommée crue ou peu cuite, ou bien lorsqu'elle est destinée à une population à risque (enfants, personnes âgées, femmes enceintes) [Feurer et al., 2013].

Les principales bactéries responsables de toxi-infections pouvant résulter de la consommation de viande et de produits carnés sont *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica*, les *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC) [Feurer et al., 2013].

2.2. Altération des fruits et des légumes

La flore microbienne des fruits et des légumes est constituée presque exclusivement de bactéries de l'environnement. Accidentellement, peuvent s'y rajouter des microorganismes pathogènes provenant de la fumure, de l'eau ou des manipulations: *Yersinia*, *Campylobacter*.

Les altérations exercées sur le végétal avant la récolte sont la conséquence du développement de divers microorganismes phytopathogènes.

- **Les altérations d'origine bactérienne**

Elles concernent essentiellement les légumes. L'altération la plus fréquente est la pourriture molle qui se manifeste par le rancissement, le noircissement et le dessèchement combinés des racines et des tubercules. Deux groupes bactériens peuvent être responsables : *Erwinia* et *Pseudomonas*.

Des bactéries cellulolytiques peuvent détruire la paroi cellulosopectique (*Cellulomonas*, *Arthrobacter*) [Leyral et Vierling, 2007].

- **Les altérations d'origine fongique**

Le développement de leur mycélium entraîne l'apparition de zones colorées, puis la dissociation des tissus sous-jacents. Quelques altérations fongiques parmi les plus fréquentes:

- la pourriture grise due à *Botrytis cinerea*
- la pourriture bleue ou verte (*Penicillium*)
- la pourriture verte (*Trichoderma*)
- la pourriture rouge (*Fusarium*)
- la pourriture brune (*Sclerotinia*) [Leyral et Vierling, 2007].

Tableau 4: Les principaux microorganismes pathogènes d'origine alimentaire
[Nout et al., 2003]

Microorganisme	Maladie	Type	Sources
<i>Campylobacter jejuni</i>	diarrhée	maladie infectieuse	lait, volaille, viande
<i>Listeria monocytogenes</i>	méningite	maladie infectieuse	lait cru, produits laitiers non ou mal pasteurisés, viandes, poissons
<i>Shigella</i>	diarrhée et fièvre	shigellose	aliments crus (légumes, salades,...)
<i>Clostridium perfringens</i>	diarrhée, nausée vomissement	toxi-infection et intoxication	viandes, poissons
<i>E coli</i>	entéropathogène entérotoxique	toxi-infection	viandes mal cuites, produits laitiers crus, pâtisseries
<i>Salmonelles</i>	gastro-entérite et fièvre intestinal fièvre typhoïde	toxi-infection et maladie infectieuse	viandes, volaille, poissons, œufs
<i>Clostridium botulinum</i>	troubles nerveux, Vomissement, crampes abdominales troubles respiratoires paralysie et la mort du sujet si aucun soin adéquat ne lui est apporté	botulisme	conserves qui subissent un traitement thermique insuffisant
<i>Staphylococcus aureus</i>	gastro-entérite, vomissement	intoxication	fromages, viandes, volaille, poissons séchés

I.3.3. Contamination par les produits chimiques

Les contaminants de nature chimique sont traditionnellement séparés en produits inorganiques et produits organiques

- **Contaminants chimiques inorganiques**

Les métaux lourds sont les principaux représentants de ce type de contaminants ; parmi ceux-ci ; ceux dont les effets délétères les plus importants sont les suivants : le mercure, le plomb, le cadmium, les contaminants radioactifs

- **Contaminants chimiques organiques**

- les résidus de pesticides : insecticides, fongicides ;
- les résidus de médicaments vétérinaires ;
- les nitrates, les nitrites, les nitrosamines ;
- les phycotoxines : toxines secrétées par les algues, et qui s'accumulent dans les fruits de mer [Bauer et al., 2010].

I.3.4. Conservation des aliments

La conservation des aliments vise à préserver leur comestibilité et leurs propriétés gustatives et nutritives. Elle implique notamment d'empêcher la croissance de microorganismes et de retarder l'oxydation des graisses qui provoque le rancissement. Des techniques de conservation ont été mises au point pour modifier ou supprimer les facteurs éventuels d'altération liés au milieu de conservation ou à l'aliment lui-même [Vierling, 1998]. Si on veut pouvoir limiter ou supprimer les mécanismes de dégradation des aliments, on doit donc jouer sur les facteurs qui y contribuent directement ou indirectement. Quelques principes importants de conservation sont résumés dans le tableau 5 [Nout et al., 2003].

Tableau 5: Quelques principes de conservation [Nout et al., 2003]

Facteur	Niveau	Procédés
Température	élevée basse	Pasteurisation, stérilisation, cuisson, blanchiment réfrigération, congélation
activité de l'eau	basse	séchage, lyophilisation, concentration, salage
pH	bas	acidification par fermentation ou addition de produits acides (vinaigre etc.)
potentiel d'oxydoréduction	bas	emballage ou stockage sous vide ou sans oxygène
Stabilité par additifs bactériostatiques ou bactéricides, ou par compétition microbiologique		alcool, produits chimiques de conservation, antibiotiques, substances de la fumée (phénols)

I.3.4.1. Classification des techniques

Les modes de conservation peuvent être classés de la manière suivante:

I.3.4.1.1. Procédés physiques de conservation

1. Inhibition ou destruction des agents biologiques d'altérations des aliments (enzymes et microorganisme)

Elles sont obtenues par

- le froid : réfrigération et congélation
- la chaleur : pasteurisation et stérilisation. Les effets de la chaleur sont fonction du couple temps/température.

2. Destruction ou élimination des microorganismes

Elles sont obtenues par:

- les radiations électromagnétiques et l'ionisation: les rayonnements ultra-violets (10 à 400nm), les rayonnements γ (0.1 à 0.01 nm), les rayonnements X.

3. Abaissement de l'activité de l'eau

Il est obtenu par l'élimination de ce constituant par:

- concentration, séchage, déshydratation, lyophilisation;
- incorporation des solutés (sel, sucre) [Vierling, 1998 ; Guiraud, 2003].

I.3.4.1.2. Procédés chimiques

Additifs chimiques: antioxydant, antifongique, antimicrobien

I.3.4.1.3. Contrôle de l'atmosphère

Conditionnement sous vide ou sous atmosphère à forte pression partielle en dioxyde de carbone [Vierling, 1998 ; Leyral et Vierling, 2007].

I.3.4.2. Conservateurs alimentaires

Les produits microbiostatiques ou microbicides susceptibles d'être ajoutés aux aliments sont qualifiés de conservateurs alimentaires. Un bon conservateur alimentaire doit être bactéricide plutôt que bactériostatique; il doit agir sur les levures et les champignons, il doit être actif sur les germes pathogènes et sur ceux responsables d'altération, il doit être stable et inoffensif et sans action sur la valeur nutritionnelle.

Les agents minéraux utilisés sont le NaCl (dans tous les aliments) ; les nitrates et nitrites de sodium et de potassium: dans les charcuteries; l'anhydride sulfureux et sulfites ; dans le vin et des produits végétaux. Parmi les agents organiques, les plus importants sont les acides organiques et leurs dérivés.

On peut citer également les antioxydants (Butylhydroxytoluène BHT ou Butylhydroxyanisol BHA) [Guiraud, 2003].

I.3.4.2.1. La bioconservation

La bioconservation, ou biopréservation, est une méthode de conservation des aliments faisant appel à des microorganismes, appelés encore culture protectrices, ou à leurs métabolites naturels. Ces termes sont généralement utilisés en opposition à l'ajout de conservateurs dits «chimiques» classiquement utilisés dans les industries agro-alimentaires. La biopréservation, comme toute autre méthode de conservation, doit permettre de maîtriser la croissance de flores pathogènes ou d'altération, tout en préservant les qualités organoleptiques et nutritionnelles du produit au cours de sa vie. Outre les microorganismes et leurs métabolites, La biopréservation peut faire appel à d'autres composés, comme la lactoperoxydase, une enzyme naturellement présente dans le lait, ou à des extraits végétaux (de romarin, thym, thé vert ou de pépin de raisin, huiles essentielles) [Zagorec et Christieans, 2013].

Les essences naturelles et les épices ont un pouvoir bactéricide lié à la présence de composés phénoliques, d'alcools, etc. et sont souvent remplacées par leurs composés actifs (eucalyptol, thymol, eugénol, etc.) utilisés comme conservateurs [Guiraud, 2003].

II. Matériels et méthodes

Réalisée au niveau du laboratoire de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, cette étude menée avec l'huile essentielle de l'armoise blanche vise à valoriser cette plante médicinale et aromatique très répandue en Algérie, ayant comme objectifs de déterminer la qualité de l'huile essentielle de l'armoise blanche et d'étudier quelques activités biologiques dont elle pourrait être dotée. La démarche scientifique suivie pour aboutir à ces objectifs est schématisée dans la figure 9.

La démarche de la stratégie expérimentale est la suivante:

➤ **Etude des activités biologiques de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba***

Pour étudier les activités biologiques de l'HE d'*A. herba alba*, on a établi le plan suivant:

- faire l'extraction de l'huile essentielle;
- réalisation des analyses physico-chimiques et chromatographiques sur l'huile essentielle obtenue;
- évaluation des activités antioxydantes et antimicrobiennes *in vitro*.

➤ **Application de l'huile essentielle testée dans des matrices alimentaires**

D'après les résultats obtenus lors du premier plan expérimental, on a effectué des essais d'application de l'huile essentielle obtenue dans deux produits alimentaires à savoir: l'huile de tournesol et la viande hachée. Ces applications peuvent être considérés à la fois comme affirmation des propriétés étudiées et une valorisation de ces propriétés dans le domaine agroalimentaire.

Pour cela on a établi le plan suivant:

- évaluation de la stabilité oxydative de l'huile de tournesol en présence de l'huile essentielle;
- mise en application de l'effet antimicrobien de l'huile essentielle dans la viande hachée.

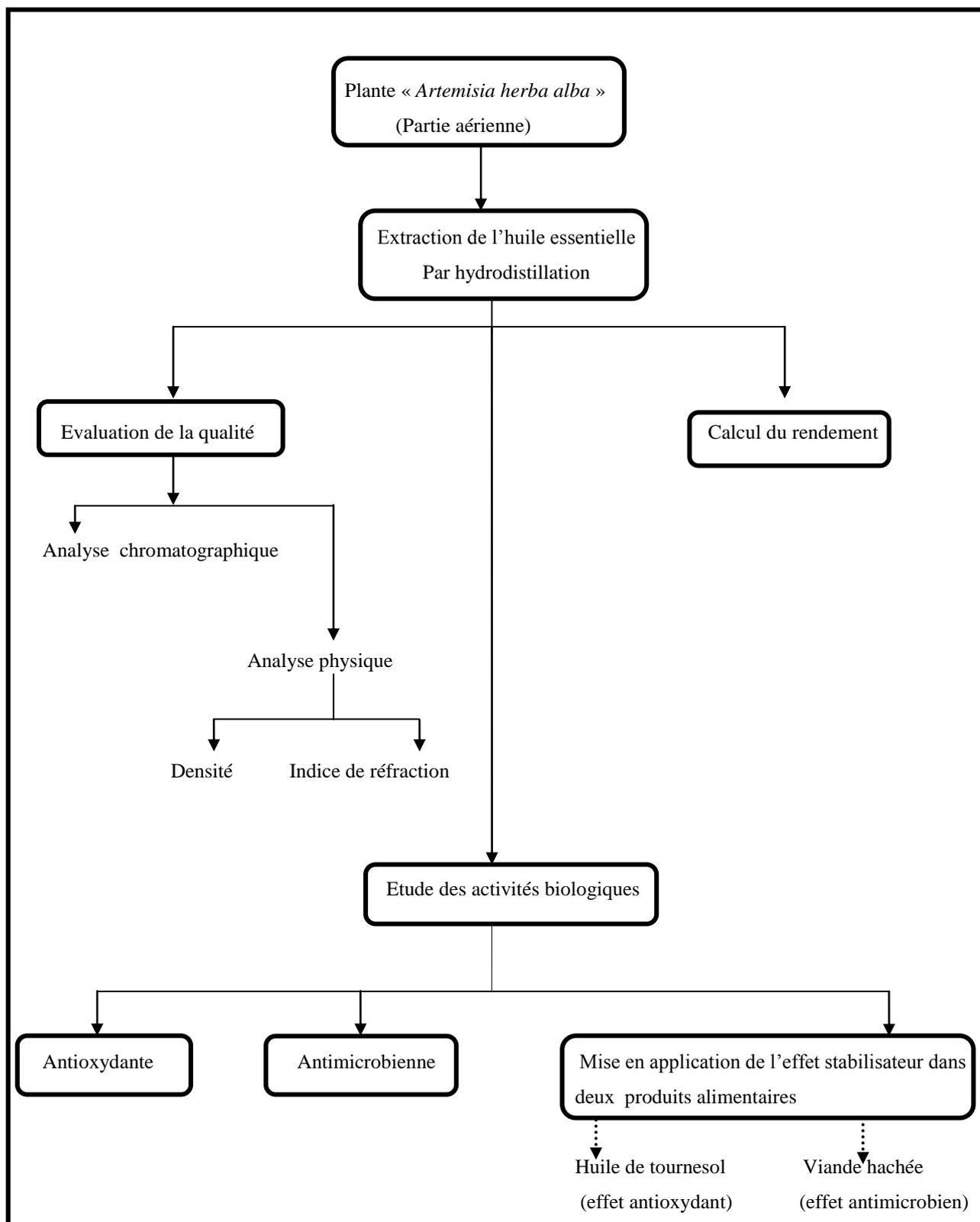


Figure 9: Protocole expérimental

II.1. Présentation et état actuel de la zone d'étude

La zone sur laquelle s'est portée notre étude est une zone semi-aride située au Sud de la wilaya de Saida (Algérie) à l'interface Tell-steppe et s'inscrit dans l'ensemble des Hautes Plaines Steppiques et couvre une superficie de 1218Km². La région de Saida Appartient à l'étage bioclimatique semi-aride à hiver frais.

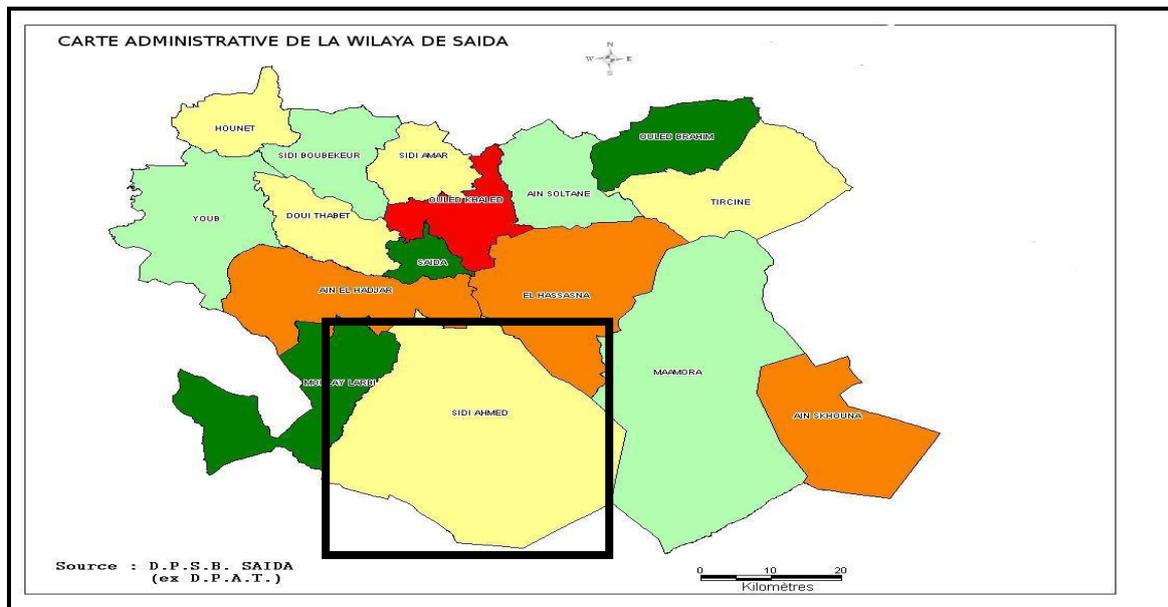


Figure 10: Localisation de la commune de Sidi Ahmed dans la wilaya de Saida

Les sols de la zone d'étude se caractérisent par une texture limono-sableuse, pH basique et une faible qualité chimique.

La première analyse du couvert végétal existant dans la zone d'étude montre une forte dégradation de ce couvert végétal, la présence de *Noaea mucronata* et *Peganum harmala* [Bouzidi, 2001].



Photo 1: Etat actuel de la zone d'étude

II.2. Matériels utilisés

II.2.1. Matériel végétal

L'armoise blanche « *Artemisia herba alba* » est une plante appartenant à la famille des *Asteraceae*. C'est une plante fourragère, médicinale et aromatique. Elle est utilisée comme remède de beaucoup de maladies tel que le traitement de diabète, diarrhée et comme vermifuge et son huile essentielle est destinée à l'industrie de la cosmétologie et de la parfumerie.

La partie aérienne (feuilles et sommités fleuries) de l'armoise blanche a été récoltée de la station de sidi Ahmed (wilaya de Saida) à l'interface Tell-Steppe au Nord-Ouest de l'Algérie.



Figure 11: *Artemisia herba alba* Asso recueillie de la région de Sidi Ahmed (wilaya de Saida)

II.2.2. Les souches microbiennes

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* a été testée contre: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25213), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (fusariose du pois chiches) (FOC), *Fusarium solani* (pourriture des racines de pois chiches) (FS) et *Globisporangium ultimum* (fonte des semis et la pourriture des racines de Pin d'Alep) (GU).

Les souches bactériennes et la souche de *C. albicans*, pures et identifiées, ont été obtenues à partir du laboratoire de biotoxicologie expérimentale, biodépollution et phytoremédiation de l'université d'Oran.

Les moisissures utilisées pour déterminer l'activité antifongique *in vitro* ont été fournies par le laboratoire de phytopathologie de la faculté des sciences de la Nature et de la vie de l'université de Mascara.

1. *Fusarium solani*

Le genre *Fusarium* appartient au phylum des *Deuteromycetes* (champignons imparfaits).

Fusarium solani cause la pourriture des racines et des tiges et même des semences, cette pourriture est accompagnée par une production de mycotoxines [Tlemsani, 2010].

2. *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*

Fusarium oxysporum est un parasite tellurique doué d'une vie saprophytique. Il appartient au *hyphomycetes*, à l'ordre des *Moniliales* [El Aoufir, 2001].

Parmi les maladies causées par *Fusarium oxysporum*, on trouve le flétrissement vasculaire appelé fusariose vasculaire, la pourriture racinaire et du collet et la pourriture des semis (planche 4, annexe2) [Ramirez-Suero, 2009].

Le Flétrissement vasculaire induit par *Fusarium oxysporum* est considéré comme la maladie la plus grave du complexe de flétrissement et de pourriture racinaire qui affecte les cultures du pois chiche (*Cicer arietinum*) [El Aoufir, 2001].

3. *Globisporangium ultimum*

En pépinière forestière, la fonte des semis est une maladie très connue qui affecte principalement les essences résineuse et parfois le Hêtre. Cette maladie se caractérise par un taux faible de levée et un affaiblissement des plantules avant qu'elles aient atteint leurs maturités [Soutrenon et Perrin, 1988; Richard et Boivin, 1994 in Lazreg, 2014].

Parmi les agents responsables de cette pathologie végétale, on peut citer le champignon *Globisporangium sp.*

Globisporangium sp est un champignon ubiquiste, vit sur terre (terrestre) et dans l'eau (aquatique). L'espèce *Globisporangium ultimum* appartient à la classe des *Oomycètes*, ordre des *Péronosporales* et la famille des *Pythiaceae* [Lazreg, 2014].

Tableau 6: Description et pouvoir pathogène des souches testées [Assous et al., 1999, Beddou, 2015]

Groupe de genre	Espèce	Référence	Habitat et mode de contamination
Gram positif, cocci en grappe de raisin	<i>Stapylococcus aureus</i>	ATCC	Nez, peau, pénètre par les lésions de la peau et des muqueuses, ingestion de nourriture contenant de la toxine
Gram négatif, bacilles, nombreuses souches se distinguant par leurs mécanismes pathogènes	<i>Escherichia coli</i>	ATCC	Contamination fécale de l'eau, de la nourriture, contacts interhumains, ingestion
L'espèce de levure la plus importante et la plus connue du genre Candida. Champignon unicellulaire, hétérotrophe	<i>Candida albicans</i>	ATCC	Tube digestif
Champignons filamenteux, hétérotrophe. Le principal caractère morphologique des <i>Fusarium</i> est la présence de macro conidies fusiformes et cloisonnées.	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Fusarium solani</i> <i>Globisporangium ultimum</i>		Ils sont présents dans les sols sous forme sporulée

II.2.3. Les produits alimentaires

1. L'huile de tournesol

L'huile de tournesol est la quatrième huile par ordre d'importance dans le monde, en raison de son prix par rapport à d'autres huiles comestibles et de sa qualité nutritionnelle. La consommation d'huile de tournesol a enregistré une forte hausse ces dernières années [Codex alimentarius, 2013].

L'huile de tournesol est extraite des graines d'*Helianthus annuus*. Cette huile présente une aptitude intéressante à l'oxydation de par sa teneur élevée en acide linoléique (oméga 6) [Apfelbaum et al., 2009].

2. La viande hachée

Afin d'étudier l'effet antimicrobien de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba*, notre choix s'est porté sur un produit constituant une source importante de germes de contamination telle que la viande hachée.

La viande est le produit de transformation du muscle après la mort de l'animal. Elle est traditionnellement considérée comme le véhicule de nombreuses maladies d'origine alimentaire chez l'homme à cause des défauts d'hygiène. Elle est une denrée alimentaire hautement périssable [Salifou et al., 2013].

La viande hachée est la viande désossée qui a été soumise à une opération de hachage en fragments.

II.3. L'extraction de l'huile essentielle de l'*Artemisia herba-alba* Asso par hydrodistillation

L'extraction de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* se fait par hydrodistillation. 100g de la partie aérienne de la plante est introduite dans un ballon de 2 litres, imprégné d'eau distillée, l'ensemble est porté à ébullition; en prenant garde de ne pas chauffer jusqu'à sec.

L'HE s'évapore avec les vapeurs d'eau dégagées qui se condensent en traversant un réfrigérant puis elle est recueillie à l'autre bout du montage (photo 2). Les vapeurs condensées obtenus conduisent à deux phases :

- une phase organique contenant HE à laquelle nous avons ajouté un déshydratant, sulfate de sodium (Na_2SO_4), afin d'éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans cette phase. L'huile essentielle obtenue est gardée dans des bouteilles en verre et conservée à 4°C et à l'abri de la lumière.
- une phase aqueuse (hydrolat aromatique) contient une quantité non négligeable d'huile essentielle.



Photo 2: Montage d'hydrodistillation employé pour l'extraction de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba*

II.4. Cinétique d'extraction et Calcul du rendement en huile essentielle [AFNOR, 1986]

Pour étudier la cinétique d'extraction de l'huile essentielle d'*A. herba alba*, nous avons récupéré des quantités de l'HE correspondantes à des intervalles de temps de 30 min. qui s'étalent de 0 à 4 heures. Les quantités d'huile obtenues vont être exploitées dans le but de calculer le rendement à chaque intervalle de temps.

Selon la norme AFNOR (1986), le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids du matériel végétal utilisé. Le rendement, exprimé en pourcentage (%), est calculé par la formule suivante :

$$R\% = (m_1/m_0) \times 100 \text{ d'où}$$

R : rendement en huile essentielle

m_1 : masse en grammes de l'huile essentielle

m_0 : masse en grammes du matériel végétal

II.5. Analyse physique de l'huile essentielle

II.5.1. Détermination de la densité relative

Selon la norme **AFNOR (1986)**, la densité est définie comme étant le rapport de la masse d'un volume de l'huile essentielle à 20°C et la masse d'un égal volume de l'eau distillée à la même température.

La densité relative est donnée par la formule suivante :

$$D_{20}^{20} = m' / m$$

m' : la masse en gramme de l'huile essentielle

m : la masse en gramme de l'équivalent volume en eau dans les mêmes conditions.

II.5.2. Détermination de l'indice de réfraction [AFNOR, 1986]

L'indice de réfraction d'une huile essentielle est défini comme étant le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus d'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante. La détermination se fait grâce à un réfractomètre.

1. Protocole expérimental

- ✓ Faire passer un courant d'eau dans le réfractomètre afin de maintenir l'appareil à la température à laquelle les lectures doivent être effectuées.
- ✓ Ajuster l'appareil de manière à donner à la température de 20°C, l'indice de réfraction 1.3330 pour l'eau distillée.
- ✓ Avant de le placer dans l'instrument, porter l'échantillon pour essai à une température à peu près égale à celle à laquelle le mesurage doit être effectué.

2. Expression des résultats

L'indice de réfraction, n_D^t à la température de référence t , est donné comme suit :

$$n_D^t = n_D^{t'} + 0.0004 (t' - t)$$

$n_D^{t'}$ est la valeur de la lecture, obtenue à la température t' , à laquelle a été effectuée la détermination

II.6. L'analyse qualitative de l'huile essentielle de l'armoise blanche

L'huile essentielle de l'armoise blanche a été étudiée en utilisant un chromatographe HP (Agilent technologies) MDS 5973 couplé à un spectromètre de masse 6890, plus, équipée de colonne capillaire de silice fondue HP-5MS (30m; 0,25 mm id; épaisseur de film 0,25 um). Les conditions opératoires étaient les suivantes: température de l'injecteur a été maintenue à 250°C. L'hélium a été utilisé comme gaz porteur (0,5 ml / min), le volume d'injection était de 0.2µl, rapport de division est ajusté à 1:20, la température du four a été programmée à partir de 60 (8 min) à 280°C à raison de 2°C/min et ensuite maintenu de façon isotherme à 280 ° C pendant 10 min. Mode d'analyse: numériser, la température de l'interface: 280°C, le type d'ionisation: électronique, l'intensité du filament: 70eV, type d'analyseur de masse: quadripôle, la température Source: 230°C, vide: 65m torr.

II.7. Etudes *in vitro* des activités biologiques

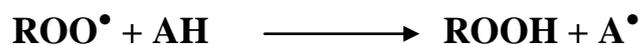
II.7.1. Evaluation de l'activité antioxydante

Les antioxydants sont devenus un sujet d'intérêt croissant récemment. Une recherche documentaire a révélé que le nombre de publication sur les antioxydants et le stress oxydatif à presque quadruplé ces dernières années [Huang et al., 2005].

Un antioxydant est « une substance naturelle ou synthétique ajoutée aux produits pour prévenir ou retarder leur détérioration par action de l'oxygène de l'air ».

Sur la base des réactions mises en jeu, les principaux tests chimiques d'évaluation de la capacité antioxydante *in vitro* peuvent être divisés en deux types [Huang et al., 2005 ; Karadag et al., 2009]:

- Les dosages basés sur le transfert d'atome d'hydrogène;



ROO[•]: radical libre

AH: antioxydant (donneur d'atome d'hydrogène)

ROOH: radical libre stable

A•: antioxydant stable

- Les dosages basés sur le transfert d'électron



$M_{(n)}$: oxydant (capteur d'électron)

Pour évaluer la capacité antioxydante de l'huile essentielle testée on a utilisé deux méthodes, à savoir: le piégeage du radical 2, 2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP).

II.7.1.1. Essai de piégeage du radical libre DPPH

1. Principe

DPPH, connu officiellement comme le 2,2-diphényl 1- picrylhydrazyl, est un radical libre stable qui est couramment utilisé pour évaluer la capacité des composés à agir comme piégeurs de radicaux libres ou des donneurs d'hydrogène et de mesurer l'activité antioxydante des extraits. La réaction du DPPH avec un antioxydant ou un composé réducteur peut être suivie par le changement de couleur de pourpre au jaune (absorbance à 515 – 528nm) [Arulpriya *et al.*, 2010].

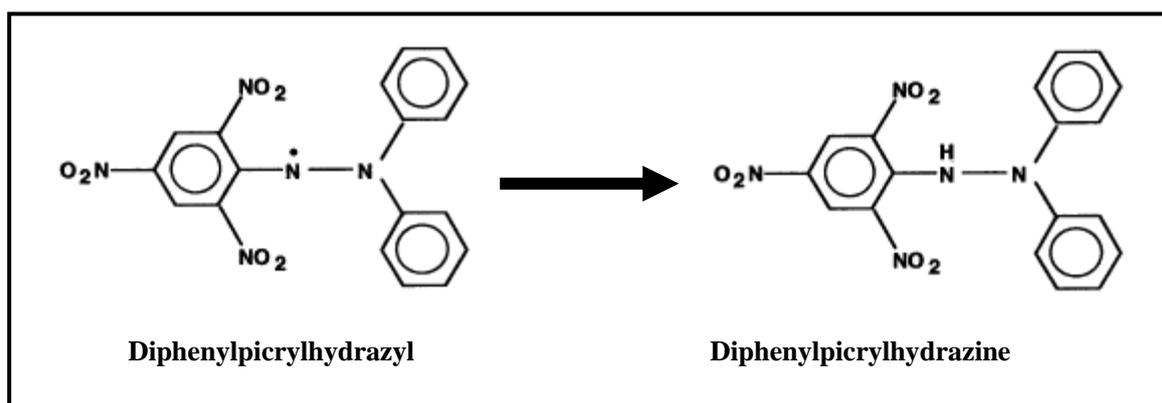


Figure 12: Réaction du DPPH avec un antioxydant [Molyneux, 2004]

2. Mode opératoire

Dans ce test, le DPPH de couleur violette se réduit en un composé jaune, le diphénylpicrylhydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité réductrice des antioxydants présents dans le milieu [Amarti et al., 2011].

1 ml d'une solution 1mM de DPPH dans du méthanol a été mélangé avec 3 ml d'huile essentielle à tester à différentes concentrations. Les échantillons d'huile essentielle ont été préparés par dissolution dans le méthanol à raison de 500µg/ml. Cette solution, dite solution mère, a subi ensuite des dilutions pour avoir les concentrations suivantes : 250, 125, 62.5, 31.25µg/ml. Ces mêmes concentrations ont été préparées avec le BHT pour servir en tant que témoin positif. On réalise également un blanc avec l'éthanol absolu seul. Pour chaque concentration, le test est répété trois fois. Les échantillons sont ensuite laissés à l'obscurité pendant 30 minutes, et la décoloration par rapport au témoin négatif contenant uniquement la solution du DPPH est mesurée à 517 nm. Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH est calculé comme suit :

$$\% \text{ inhibition} = [(A \text{ control} - A \text{ test}) / A \text{ control}] \times 100$$

A control: Absorbance du DPPH

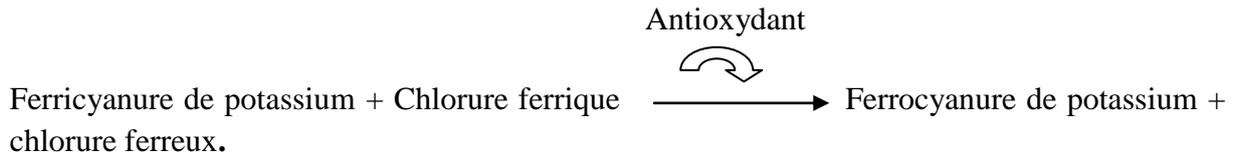
A test : absorbance de l'échantillon

Le graphique de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'huile essentielle permet de déterminer la IC50 (autrement appelée EC50, concentration correspondant à 50 % d'inhibition et qui constitue l'activité antioxydante de l'huile essentielle). Cette valeur est comparée à celle trouvée pour le composé de référence ; BHT [Bouhdid et al., 2008; Amarti et al., 2011; Mansouri et al., 2011].

II.7.1.2. La méthode de réduction de fer « *Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)* »

1. Principe

Les substances qui ont un potentiel de réduction, réagissent avec le ferricyanure de potassium (Fe^{3+}) pour former le ferrocyanure de potassium (Fe^{2+}) qui réagit ensuite avec le chlorure ferrique pour former un complexe ferreux ferrique qui a un maximum d'adsorption à 700 nm [Arulpriya et al., 2010; Jayanthi et Lalitha, 2011].



2. Préparation de l'échantillon

- On a pris quatre doses de l'huile essentielle : 5, 10, 16 et 20 μ l
- On a ajouté 1ml d'eau distillée à Chaque dose.

3. Préparation de la solution tampon

Le tampon phosphaté est préparé comme suit

- Diluer 31.2 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ à 1000 ml \longrightarrow tampon A phosphaté
- Préparer tampon B phosphate en diluant 53.64 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ à 1000ml.
- Mélanger 62.5 % de tampon A avec 37.5% de tampon B.
- Ajuster le pH à l'aide de Na OH et H_3PO_4 .

4. Mode opératoire

Dans un tube à essai contenant 1ml de chaque concentration de l'huile essentielle de l'armoise blanche, on a ajouté 0.5 ml de tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 2.5 ml d'hexacyanoferrate de potassium (10 g/l). Le tube est chauffé à 50°C pendant 20 min. dans un bain marie. Un volume de 2.5 ml d'acide trichloracétique (100 g/l) est ajouté au mélange qui est centrifugé à 3000 tours/min pendant 10min. Enfin, 2,5 ml du surnageant ont été mélangé avec 2.5 ml d'eau distillée et 0.5 ml de chlorure ferrique (1 g/l). Un contrôle sans échantillon est préparé dans les mêmes conditions. La lecture est mesurée à 700 nm. L'acide ascorbique est utilisé comme témoin positif [Bouhdid et al., 2008; Arulpriya et al., 2010].

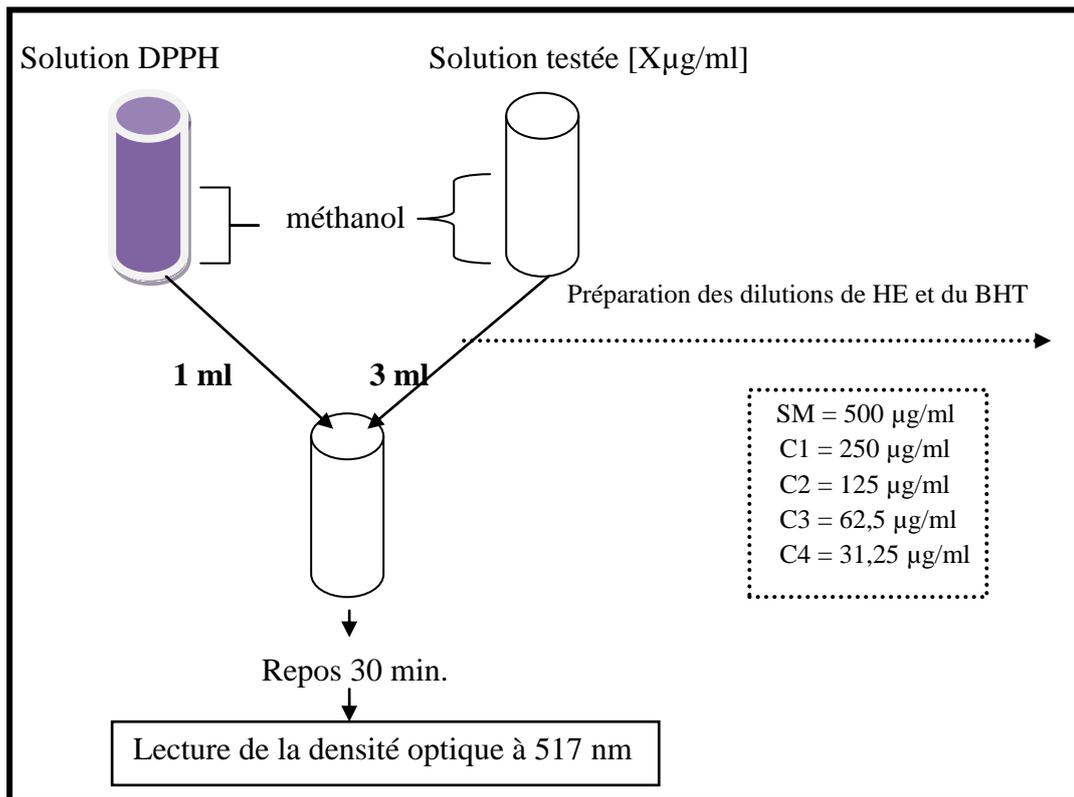


Figure 13: Schéma récapitulatif du test au DPPH

II.7.2. Etude de l'activité antimicrobienne

II.7.2.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Dans la présente étude de l'activité antimicrobienne *in vitro* de l'HE d'*A. herba alba* contre *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25213) et *Candida albicans* (ATCC 10231) a été évaluée qualitativement et quantitativement par la méthode de diffusion sur disque (aromatogramme) pour tester la sensibilité des souches et ensuite par la méthode de micro-dilution pour déterminer les valeurs de CMI.

II.7.2.1.1. Préparation de la concentration de l'huile essentielle

La concentration de l'huile essentielle d'*A. herba alba* appliquée dans cette étude a été choisie d'après des essais préliminaires sur l'efficacité de différentes concentrations sur les microorganismes testés.

Pour solubiliser l'huile essentielle, on a utilisé le diméthylsulfoxyde (DMSO) qui ne possède aucune efficacité antimicrobienne.

Les huiles essentielles sont généralement très peu solubles dans l'eau, ce qui rend leur étude biologique et pharmacologique difficile, pour résoudre ce problème plusieurs auteurs suggèrent l'utilisation des solvant organiques comme l'acétone, DMSO ou l'utilisation des produits émulsifiants (tension actif comme le tween 20 ou tween 80) pour aider l'huile essentielle de se solubiliser dans le milieu de culture [**Duraffourd et Lapraz, 2002 in Khebri, 2011**].

II.7.2.1.2. Préparation des suspensions microbiennes (inoculum)

Les souches microbiennes testées sont repiquées dans des tubes à essai contenant environ 9 ml de bouillon nutritif (BN) et incubées pendant 18 heures afin d'obtenir une culture jeune. Après homogénéisation des suspensions microbienne, leurs opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland ou à une densité optique de 0.08 à 0.1 lue à 625 nm. Cette densité est ajustée en ajoutant du milieu de culture (BN) si elle est trop élevée, correspond à 1.5×10^8 c/ml, ou en incubant davantage les souches si jamais elle est trop faible.

II.7.2.1.3. L'antibiogramme

L'antibiogramme repose sur le principe de la compétition entre la croissance d'une bactérie et la diffusion d'un antibiotique dans un milieu gélosé à partir d'un support papier pré imprégné. Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques.

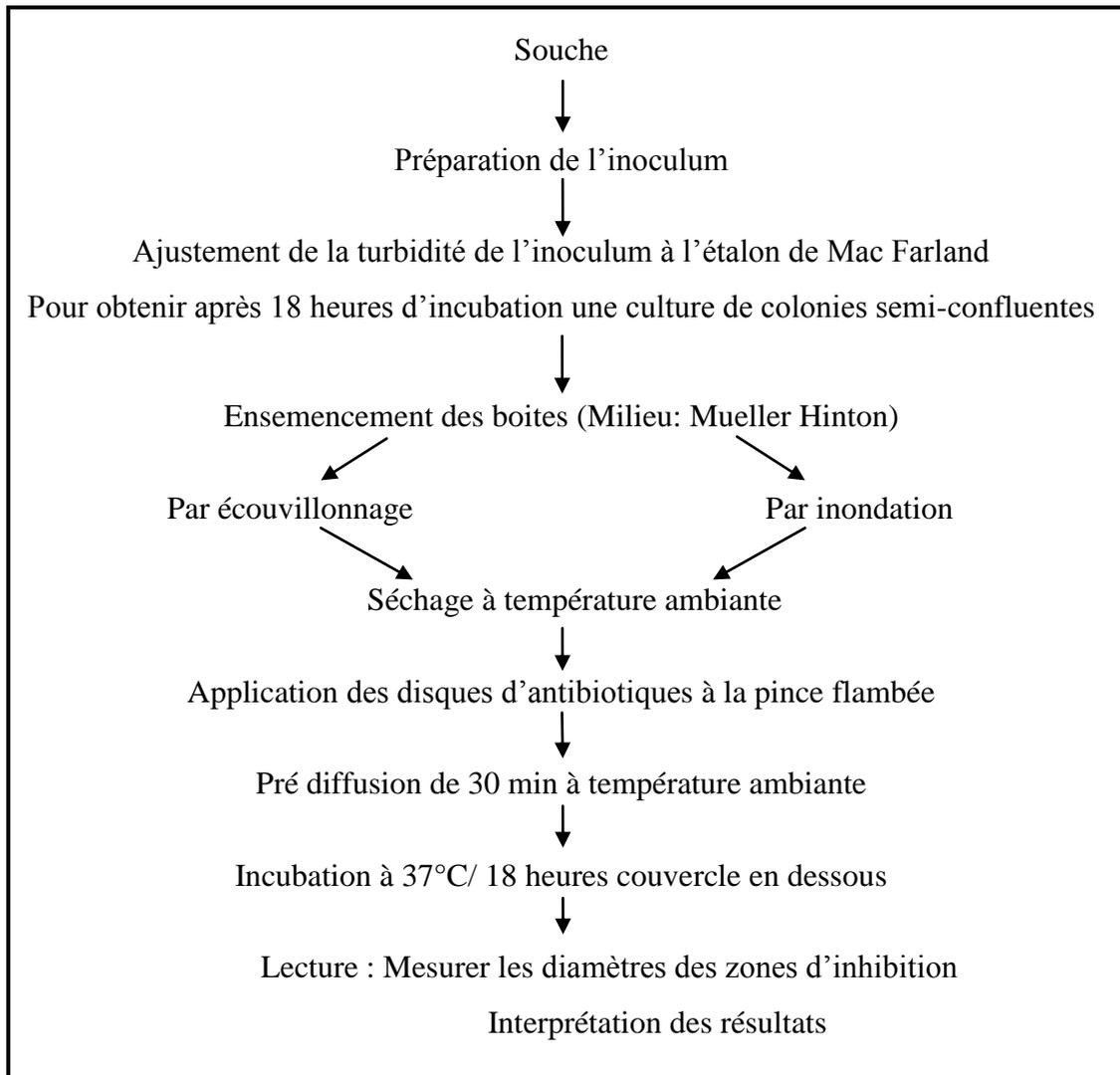


Figure 14: Réalisation pratique de l'antibiogramme par diffusion [fauchère et Avril, 2002]

II.7.2.1.3.1. La méthode de l'aromatogramme

Appelée aussi la méthode de diffusion des disques, la méthode de l'aromatogramme est la technique choisie pour déterminer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle à tester à cause de son large utilisation par les chercheurs.

1. Principe

La technique de l'aromatogramme utilise des disques de papier buvard imprégnés d'une concentration donnée de l'huile testée. Ces disques sont déposés à la surface d'une gélose spécifique (Mueller Hinton) coulée en boîtes de Petri uniformément ensemencée d'une suspension microbienne. Cette méthode nous permet de mettre en évidence l'effet antimicrobien de l'huile essentielle sur la souche étudiée. Ainsi la souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante [Amhis et al., 2001].

2. Protocole expérimental

- Couler aseptiquement le milieu de culture gélosé Mueller Hinton (M.H) en surfusion dans des boîtes de Pétri à raison de 15 ml par boîte. On laisse refroidir et solidifier sur la paillasse, 1ml de solution standardisée d'inoculum ($0.8 \text{ à } 1 \times 10^8$) est versé dans chaque boîte puis uniformément reparti. Toutes les boîtes sont laissées sécher pendant 5 min.
- L'huile essentielle a été préparée à une concentration de 20 mg/ml avec le DMSO.
- Des disques stériles en papier (6 mm de diamètre) sont imprégnés avec 5 μl de HE à la concentration de 20 mg/ml en mettant seulement en contact le bout du disque, celui-ci va absorber progressivement l'huile essentielle jusqu'à l'imprégnation totale du disque, puis déposer sur la gélose.
- Les boîtes de Petri étaient maintenues pendant 15 min. à température ambiante puis incubées à 37°C pendant 24 h. Chaque essai a été réalisé en triplicata pour chaque espèce bactérienne.
- L'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*A. herba alba* est comparée avec des antibiotiques (Tableau 7), qui ont été utilisés en tant que témoins positifs [Djenane et al., 2012].

Tableau 7: antibiotiques d'antibiogramme

Antibiotique (standard)	Concentration (μg)
Pénicilline (G)	10
Aztreonam (ATM)	30
Colistine (CT)	10
Oxacilline (OX)	5
Gentamicine	10

3. expression des résultats

L'activité antibactérienne et anti candida de l'huile essentielle a été mise en évidence par la mesure de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques.

La sensibilité des souches testées envers l'huile essentielle est classée selon les diamètres des halos d'inhibition [Ponce et al., 2003]:

- diamètre < 8mm: non sensible (-) ou résistante
- diamètre compris entre 9 à 14 mm: sensible (+)
- diamètre compris entre 15 à 19 mm: très sensible (++)
- diamètre > 20 mm: extrêmement sensible (+++).

II.7.2.1.4. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice « CMI »

La sensibilité d'une bactérie est mesurée par la concentration minimale inhibitrice de l'antibiotique considéré. C'est la méthode de référence préconisée par l'OMS [Amhis et al., 2001].

La CMI ou concentration minimale inhibitrice, est la concentration la plus petite d'un antibiotique qui empêche les bactéries de se multiplier. C'est le paramètre le plus utilisé pour mesurer in vitro l'activité d'un antibiotique ; elle s'exprime en mg/l [Fauchère et avril, 2002; Toutain, 2010]. Elle est définie par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) comme étant la plus faible concentration d'une gamme de dilutions d'antibiotique de demi en demi qui entraîne l'inhibition de toute croissance bactérienne visible [Nelly et Anthony, 2003].

La CMI a été réalisée par le procédé décrit ci-dessous sur les souches testées qui ont montré une sensibilité vis-à-vis de l'huile essentielle par la méthode de diffusion sur disque.

II.7.2.1.4.1. Méthode de Microdilution (méthode standard)

La microdilution est généralement effectuée dans des plaques de microtitration à 96 puits à fond arrondi. Le seuil de lecture ou concentration minimale inhibitrice est

normalement lu comme la première dilution qui ne montre pas de croissance visible [Kahlmeter et Turnidge, 2012].

1. Protocole expérimental

La cinétique de croissance est réalisée en microplaque de 96 puits, pour chaque germe on a réalisé trois essais (test en triplicata).

- ✓ Dans chaque puits, on a introduit 50 µl de bouillon nutritif, par la suite, dans le premier puits on a ajouté 50 µl de la concentration préparée de l'huile essentielle testée. On a pris 50 µl du mélange (Bouillon + H.E.) et on les a mis dans le 2^{ème} puits et à partir de ce dernier, on a transféré 50 µl du mélange dans le 3^{ème} puits et ainsi de suite jusqu'à le 12^{ème} puits afin de réaliser une série de dilution à 1/2 (figure 13);
- ✓ La dernière étape est l'ajout de 50 µl de chaque suspension microbienne ajusté à 0.5 Mac Farland dans chaque puits;
- ✓ Pour le test témoin le puits est rempli par 50 µl du bouillon nutritif et 50 µl de la suspension microbienne ajustée;
- ✓ Les microplaques sont recouvertes par un papier aluminium stérile et incubé aux différentes températures de croissances des souches testées.

2. Lecture des résultats

La lecture des résultats est faite par le suivie spectrométrique de la cinétique de la croissance microbienne mesurable à 620 nm, à l'aide à un lecteur ELISA, pour déterminer la concentration des germes (UFC/ml).

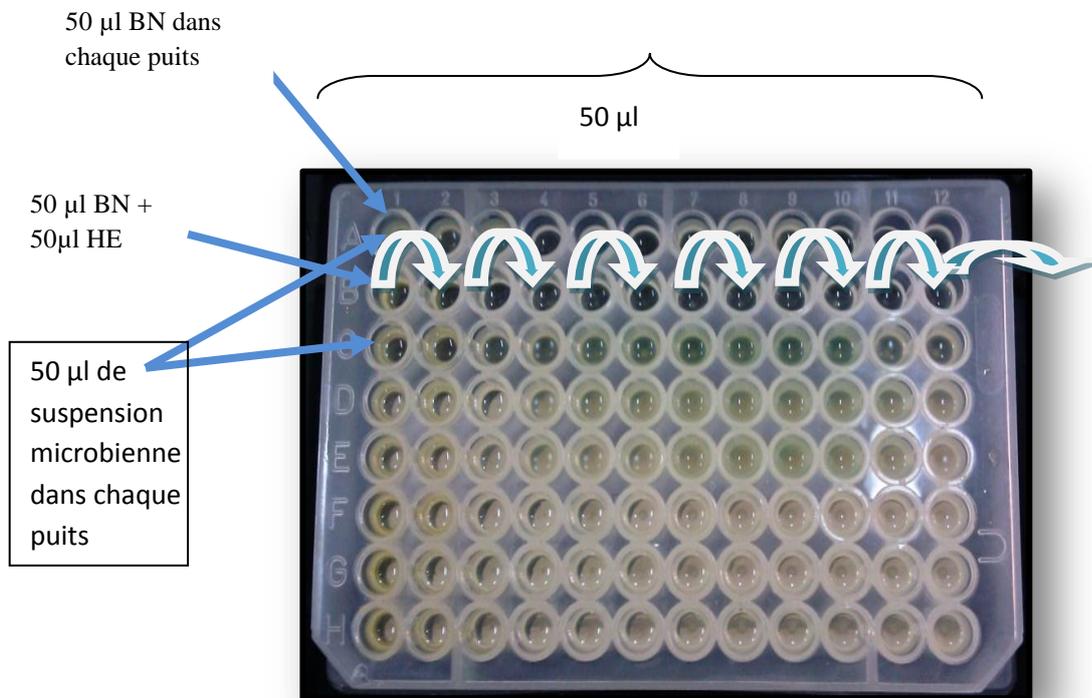


Figure 15: Schéma simplifié de la méthode de microdilution

II.7.2.2.. Tests antifongiques [Dohou *et al.*, 2004; Mohammedi, 2006; Khaladi *et al.*, 2012]

II.7.2.2.1. Test de la croissance mycélienne

Les isolas fongiques sont cultivés sur un milieu PDA pendant sept jours à 25°C. Le choix des concentrations de l'huile essentielle est effectué sur la base des essais préliminaires (Planche 5, Annexe 2). Un volume approprié de l'huile essentielle (0.12 ml) est ajouté au milieu PDA stérile encore liquide sous agitation afin d'obtenir les concentrations finales de 1000 ppm, 500 ppm et 250 ppm. La dispersion de l'HE dans le milieu a été facilitée par l'ajout de 0.2% de tween 80. Après solidification du milieu de culture dans des boîtes de Petri (15 ml / boîte), les disques mycéliens de 1cm de diamètre, issue d'une culture âgée de 7 jours de chaque souche fongique sont déposés au centre de chaque boîte de Petri. Les boîtes de contrôle contenant le milieu de culture et le disque de mycélium de chaque isolat sans huile essentielle ont été réalisées. Chaque essai est répété trois fois. Après incubation à 25 ° C

pendant 7 jours, en tenant compte de la croissance du témoin, le pourcentage d'inhibition (PI) est calculé par la formule suivante:

$$\text{PI}\% = [dT - dE / dT] \times 100$$

Où : PI (%): pourcentage d'inhibition,

dT: Diamètre moyen de la zone de croissance du témoin

DE la croissance: le diamètre moyen de la zone de croissance de l'essai.

II.7.2.2.2. Test de sporulation

Des disques de 05 mm de diamètre sont prélevés à la bordure des souches âgées de 10 jours ayant servi pour la croissance mycélienne et ont été mis dans un tube contenant 1 ml d'eau distillée. La suspension fongique est ensuite agitée à l'aide d'un vortex afin de libérer les spores des conidiophores. Ces expériences sont répétées trois fois. Après avoir compté le nombre total des spores en utilisant une cellule de Malassez à un taux de 10 comptages par suspension, les valeurs sont exprimées en nombre de spores par unité de surface (mm²).

Le pourcentage d'inhibition de la sporulation (IS %) est calculée par la formule suivante:

$$\text{IS}\% = [N_0 - N_c / N_0] \times 100$$

Où :

N₀: le nombre moyen de spores estimés pour le témoin

N_c: le nombre moyen estimé en présence de l'huile essentielle

II.7.2.2.3. Test de la germination conidienne

La suspension recueillie des spores est ajustée à un taux de 10^5 spores / ml d'eau distillée en utilisant une cellule de Malassez. Nous diffusons 0,1 ml de cette suspension sur des boîtes de Pétri contenant du milieu de PDA additionné de l'huile essentielle aux mêmes concentrations mentionnées précédemment. Trois répétitions sont effectuées simultanément pour chaque concentration. Le comptage des spores germées ou non a été réalisé sur un total de 200 spores après 5 à 18 heures d'incubation à 25 °C. Une spore est considérée germée si la longueur du tube germinatif est supérieure à son plus petit diamètre.

Pourcentage d'inhibition de la germination des spores (Ig%) est donné selon la formule suivante:

$$Ig\% = [N_0 - N_c / N_0] \times 100$$

Où: N_0 : le nombre de spores ayant germé dans le milieu de culture sans huile essentielle (contrôle),

N_c : le nombre des spores germées en présence d'huile essentielle

II.7.3. Essais d'application de l'huile essentielle dans les produits alimentaires

De nombreuses études ont été publiées sur les activités biologiques des huiles essentielles, mais la plupart de ces activités sont inconnues dans les conditions associées au processus de transformation des aliments telles que la cuisson, friture, conservation,.....

Donc il est nécessaire de déterminer les capacités de ces huiles dans ces conditions.

II.7.3.1. Evaluation de la stabilité oxydative de l'huile de tournesol

L'évaluation de la stabilité oxydative des corps gras peut répondre à plusieurs objectifs tels que:

- ✓ l'évaluation de l'efficacité des antioxydants;
- ✓ la résistance d'une matière grasse à l'oxydation ;
- ✓ la conformité à un cahier de charge ;
- ✓ la détermination de la durabilité d'un corps gras [Rahmani, 2007].

Plusieurs techniques sont utilisées pour le dosage des produits d'oxydation telles que :

- ✓ la détermination de l'indice de peroxyde ;
- ✓ la détermination de l'absorbance spécifique en rayonnement ultraviolet [AFNOR, 1988].

Pour obtenir une meilleure image de la stabilité de l'huile, il est recommandé que l'huile doive être chauffée dans des conditions contrôlées (temps/température).

Le chauffage de l'huile végétale présente un double intérêt :

- accélérer l'oxydation des huiles: la température est un facteur favorisant l'oxydation ;
- voir si le chauffage peut avoir un effet négatif (peut altérer le pouvoir antioxydant) sur l'huile essentielle.

II.7.3.1.1. Préparation des échantillons de l'huile de tournesol

Différentes doses (0.02, 0.04, 0.06, 0.08g) de l'huile essentielle ont été additionnées à 100ml d'huile de tournesol. Le choix de ces doses est effectué de telle façon qu'elles n'altèrent pas les caractéristiques organoleptiques (couleur, odeur) de l'huile de tournesol. Les échantillons ainsi préparés ont subi un traitement thermique à 180°C pendant 1heure. Ce traitement thermique permet d'accélérer la vitesse de l'oxydation de l'huile de tournesol. Nous avons procédé à une comparaison avec un antioxydant usuel le α Tocopherol.

Le suivi de l'état oxydatif de l'huile de tournesol est réalisé par la mesure de l'indice de peroxyde et la détermination de l'absorbance spécifique en rayonnement ultra-violet entre 225 et 320 nm.

II.7.3.1.2. Détermination de l'indice de peroxyde [AFNOR, 1988]

1. Définition

On entend par indice de peroxyde d'un corps gras le nombre de microgrammes actif du peroxyde contenu dans un gramme de produit et oxydant l'iodure de potassium avec libération d'iode dans les conditions de la méthode décrite.

2. Principe

Traitement du corps gras, en solution dans de l'acide acétique et du chloroforme, par une solution d'iodure de potassium.

Titration de l'iode libéré par une solution titrée de thiosulfate de sodium.

3. Mode opératoire

A une prise d'essai de 2 g, on ajoute 10 ml de chloroforme, 15 ml d'acide acétique pure et 1 ml de solution d'iodure de potassium saturée. Le flacon est bouché, agité et laissé à l'abri de la lumière pendant 5 mn. Il s'ensuit une libération d'iode par action de peroxyde sur l'iodure de potassium. 75 ml d'eau distillée sont ajoutés avec quelques gouttes d'empois d'amidon puis on titre avec une solution de thiosulfate de sodium 0.01N.

Parallèlement et simultanément, on a préparé sans l'utilisation de corps gras un essai à blanc.

L'indice de peroxyde (I_p) est exprimé en milliéquivalents d'oxygène actif par kilogramme de corps gras selon la formule suivante:

$$I_p = [V \times T / E] \times 1000 \quad \text{d'où}$$

V: le volume de la solution de thiosulfate de sodium utilisée pour l'essai, corrigé compte tenu de l'essai à blanc, exprimé en millilitres de solution.

E : la masse, en grammes, de la prise d'essai.

II.7.3.1.3. Détermination de l'absorbance spécifique en rayonnement ultra-violet [AFNOR, 1988.]

1. Principe

Mesurage spectrophotométrique, en rayonnement ultra-violet, dans un domaine spécifié de longueur d'onde, de l'absorbance d'un échantillon de corps gras en solution dans un solvant.

2. Mode opératoire

Dans une fiole jaugée de 25ml, dissolvez une prise d'essai (0.05g à 0.25g) avec quelques millilitres de cyclohexane et complétez jusqu'au trait repère avec le même solvant. Puis vous mesurez l'absorbance de la solution de matière grasse, dans une cuve en quartz, par rapport à celle du solvant, à l'aide du spectrophotomètre à des longueurs d'onde comprises entre 225 et 320nm.

L'absorbance spécifique d'une solution à la concentration de 1% mesurée en utilisant un parcours optique de 1cm à une longueur d'onde λ , est donnée par la formule:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%}(\lambda) = A(\lambda) / c \times d$$

où:

- $A(\lambda)$ est l'absorbance à la longueur d'onde λ
- c est la concentration, en gramme pour 100ml, de la solution.
- d est la concentration, en centimètre, de la solution placée dans la cuve.

II.7.3.2. Evaluation de la stabilité microbienne de la viande hachée

Un intérêt particulier a été manifesté ces dernières années pour les huiles essentielles qui constituent une alternative effective pour les produits de conservation chimique. Toutefois, l'application pratique des huiles essentielles dans les aliments est limitée parce que leur efficacité est modérée en raison de l'interaction avec les ingrédients alimentaires et la structure de l'aliment et leur toxicité.

L'objectif de cette recherche est de mettre en évidence la capacité antimicrobienne de l'huile essentielle de l'armoise blanche appliquée sur une viande hachée bovine.

Cette étude est réalisée selon la méthodologie suivante (figure16) :

- Préparation des échantillons
- Appréciation organoleptique
- Analyse microbiologique

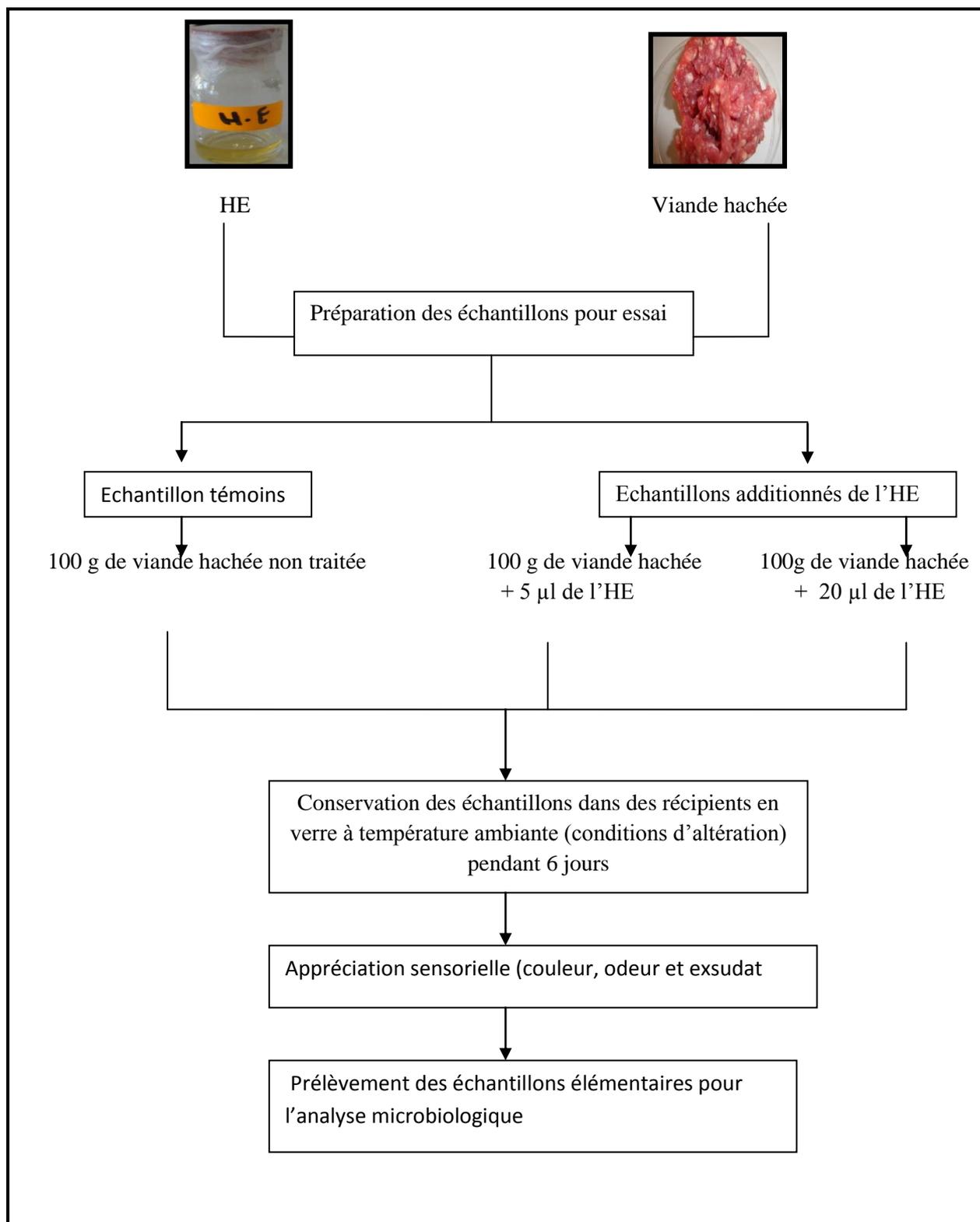


Figure 16: Schéma récapitulatif de la méthodologie expérimentale suivie pour l'étude de l'effet de l'huile essentielle sur la stabilité microbiologique de la viande hachée

1. Préparation des échantillons

500 grammes de viande hachée bovine sont achetés chez un bouché local dans la ville de Mascara, puis transportés au laboratoire de la faculté des sciences de la nature et de la vie dans les 15 min. qui en suivit l'achat et maintenu environ une heure à 4 °C. Ensuite l'échantillon global est divisé en trois parties de 100 g. Deux parties ont été mélangées avec un volume approprié de l'HE: 5µl et 20µL. Le choix de ces doses est effectué de telle façon qu'il n'altère pas les caractéristiques organoleptiques de la viande car l'utilisation des huiles essentielles dans les aliments est limitée par leurs propriétés sensorielles. Un échantillon témoin n'a subi aucun traitement. Les échantillons ont été placés dans des récipients en verre et stockés à la température ambiante afin de créer les conditions favorables à l'altération de la viande hachée

2. Appréciation sensorielle

Une attention particulière a été accordée à la couleur, l'odeur anormale et la présence de l'exsudat afin de suivre l'état d'altération de la viande hachée.

3. Analyse microbiologique [Leclere et al., 1995; Journal officiel N° 35, 1998; Oumokhtal et al., 1998; Bonnefoy et al., 2002; Barthe et al., 2003; Guiraud, 2003]

3.1. But

Analyser la viande hachée crue en déterminant les microorganismes qu'elle contient et en appréciant l'effet de l'huile essentielle sur sa contamination totale (Figure 17).

3.2. Principe

Le principe consiste en premier lieu à faire isoler la population microbienne qui se trouve dans la viande hachée en présence ou en absence de l'huile essentielle, puis faire étaler les différentes dilutions préparées à partir de la suspension mère sur différents milieux de cultures pour favoriser la croissance de telle ou telle population qui se trouve dans nos échantillons, et par la suite ça va nous donner une idée sur l'état microbiologique de notre produit.

3.3. Mode opératoire

Les paramètres microbiologiques de la viande hachée recherchés sont:

- Germes aérobies à 30°C ;
- Coliformes fécaux ; *Escherichia coli* ;
- *Staphylococcus aureus* ;

➤ *Clostridium sulfito reducteur* à 46°C

❖ **Préparation des dilutions décimales AFNOR NFV08 010 de 1996/ ISO 6887 de 1983**

10 g de viande hachée est mélangés avec 90 ml de l'eau peptonée tamponnée. Le mélange est agité à l'aide d'un vortex puis laissé reposer pendant une heure à température ordinaire (revivification).

Effectuer à partir de cette suspension les différentes dilutions décimales.

Prélever aseptiquement 1 ml de la solution mère, mettre le dans un tube contenant 9 ml d'eau tamponnée, ce qui fait la dilution à 10^{-2} . Après homogénéisation, reprendre 1 ml de la première dilution, mettre le dans un autre tube qui contient 9 ml d'eau tamponnée, pour obtenir la dilution 10^{-3} et ainsi de suite jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-6} .

❖ **Recherche et dénombrement de la flore aérobique mésophile totale (FAMT) ISO 04833**

La flore aérobique mésophile reflète la qualité microbiologique générale d'un produit naturel et permet d'en suivre l'évolution. Le nombre de germes totaux pourra donner une indication de l'état de fraîcheur ou de l'état de décomposition du produit: il peut aussi dans certains cas constituer un indicateur de qualité sanitaire. Un nombre de germes peut être compatible avec un produit sain alors qu'un petit nombre de germes peut correspondre à un produit dangereux.

Le dénombrement de cette microflore est réalisé par la méthode d'ensemencement en surface sur gélose PCA. L'incubation est conduite à 30°C pendant 72 heures (Figure 17).

Le dénombrement est exprimé en unité formant colonie par gramme. Pour calculer le nombre de microorganismes par unité d'échantillon, on a appliqué la formule suivante :

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1 n_2)d} \times \frac{1}{v}$$

$\sum C$: Nombre total de colonies comptées sur les boites retenues;

n_1 : nombre de boites comptées à la dilution retenue la plus faible ;

n_2 : nombre de boites comptées à la seconde dilution retenue ;

d : facteur de dilution à partir duquel les premiers comptages sont réalisés: la dilution la plus faible ;

V : volume de la prise d'essai inoculé en ml.

Cette formule est valable aussi pour le dénombrement des autres germes étudiés.

❖ **Recherche et dénombrement des coliformes fécaux et d'*Escherichia coli***

Les coliformes sont définis comme des entérobactéries fermentant rapidement le lactose et leur mise en évidence est basée sur ce principe.

La fermentation du lactose en acide est révélée, en présence de pourpre de bromocrésol (BCP), par le virage du bleu violacé au jaune.

Parmi les coliformes totaux, il existe un sous-groupe de bactéries, « les coliformes fécaux » (coliformes thermotolérants) et en particulier une espèce, « *Escherichia coli* », qui indiquent une contamination fécale puisqu'ils sont présents en grand nombre dans le tube digestif des animaux supérieurs et de l'homme.

Les coliformes fécaux sont dénombrés par comptage de colonies sur milieu solide (milieu hecktoen). Après incubation à 44°C pendant 24, les colonies jaune saumon ayant poussées dans les boites de pétri sont comptées.

❖ **Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus***

Les Staphylocoques peuvent signaler des contaminations humaines par manipulation ou par voie aérienne, ou une contamination originelle d'un produit animal.

Les intoxications alimentaires sont en majorité causées par *S. aureus*. Etant thermosensible, les souches de cette dernière sont détruites au cours de la pasteurisation ou de la cuisson des aliments; cependant, les entérotoxines thermostables peuvent résister si elles ont été préalablement synthétisées.

Dans des boites de pétri contenant le milieu sélectif Chapman, 0.1ml des dilutions 10^{-5} et 10^{-6} sont ajoutés. L'inoculum ainsi préparé est étalé et les boites sont ensuite retournées et incubées à 37°C pendant 24heures.

Le milieu Chapman est recommande pour l'isolement des bactéries appartient au genre *Staphylococcus*. La forte concentration en chlorure de sodium inhibe la croissance de la plupart des bactéries autres que les Staphylocoques.

❖ Recherche des spores d'anaérobies sulfito-réducteur

Les germes anaérobies sulfito réducteurs sont des hôtes normaux de l'intestin, mais ils peuvent se rencontrer également dans le sol et dans les matières organiques en voie de putréfaction.

Les anaérobies sulfito réducteurs se présentent sous forme de Bactéries Gram⁺, se développant sur gélose viande foie en donnant des colonies typiques réduisant le sulfite de sodium (Na₂SO₃) qui se trouve dans le milieu, en sulfure qui en présence de Fe⁺² donne FeS (sulfure de fer) de couleur noire.

La suspension bactérienne mère est traitée par un choc thermique à 80°C pendant 10 min., puis refroidie immédiatement dans l'eau froide. Ce traitement thermique sert à tuer toutes les formes végétatives et récupérer la forme sporulée. 1 ml de cette suspension est ajouté à 5 ml de gélose Viande Foie, fondue puis refroidie à 45°C ± 1°C, additionnée d'une ampoule d'Alun de fer et d'une ampoule de sulfite de sodium. Le milieu de culture et l'inoculum sont agités doucement pour éviter la formation de bulles d'air. Les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 à 48 Heures.

3.4. Identification de *E coli* [Guiraud, 2003]

L'identification d'un microorganisme ne peut avoir lieu que lorsqu'il a été isolé à l'état pur. Les technique utilisées pour l'identification sont nombreuses et varient en fonction de la nature du germe étudié.

L'identification d'*E coli* est basée essentiellement sur l'étude des caractères suivants, dont les principaux concernent la mobilité, l'utilisation des sucres et les caractères : Indole, Citrate (Annexe 1).

1. Mobilité

Elle est étudiée par un examen microscopique à l'état frais ou par l'utilisation de la gélose mannitol-mobilité, qui permet aussi de tester l'utilisation du mannitol.

1.1. Etat frais

Cette préparation consiste à examiner le microorganisme vivant en milieu liquide entre lame et lamelle. Cet examen permet d'apprécier la forme et parfois la mobilité des germes étudiées.

2. Coloration différentielle de Gram

La coloration différentielle la plus connue est celle de Gram, qui permet de diviser les bactéries en deux groupes ; Gram⁺ et Gram⁻. Celles qui retiennent le violet de gentiane après lavage à l'alcool sont Gram⁺; celles qui sont décolorées et prennent ensuite la couleur d'un second colorant sont dites Gram⁻.

3. Mise en évidence des enzymes respiratoires

Oxydases: elles sont mises en évidence par leur propriété de catalyser la réaction d'oxydation d'un substrat organique par l'oxygène de l'air. Le substrat utilisé est l'oxalate de N-diméthylparaphénylène diamine.

4. Fermentation avec ou sans gaz, utilisation du lactose et production d'H₂S

Cette étude est réalisée, soit sur des milieux distincts, milieu MEVAG additionné de glucose, soit sur des milieux combinés spécifiques des Enterobactéries, le milieu TSI.

5. Dégradation de l'urée et production d'indole

Le milieu urée indole de Fergusson permet d'étudier simultanément la dégradation de l'urée et la production d'indole.

6. Utilisation du citrate

Elle est testée par culture sur le milieu gélosé incliné de Simmons. Le citrate est la seule source de carbone : son utilisation se traduit par une alcalinisation du milieu.

II.8. Analyse statistique

Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata et les résultats sont présentés sous formes de valeur moyennes \pm écart-type. L'analyse statistique des données a été effectuée par analyse de variance (Anova) et le test de PPDS de Scheff. Une valeur de probabilité de p 1% a été considérée pour désigner une différence significative entre les valeurs moyennes des résultats obtenus.

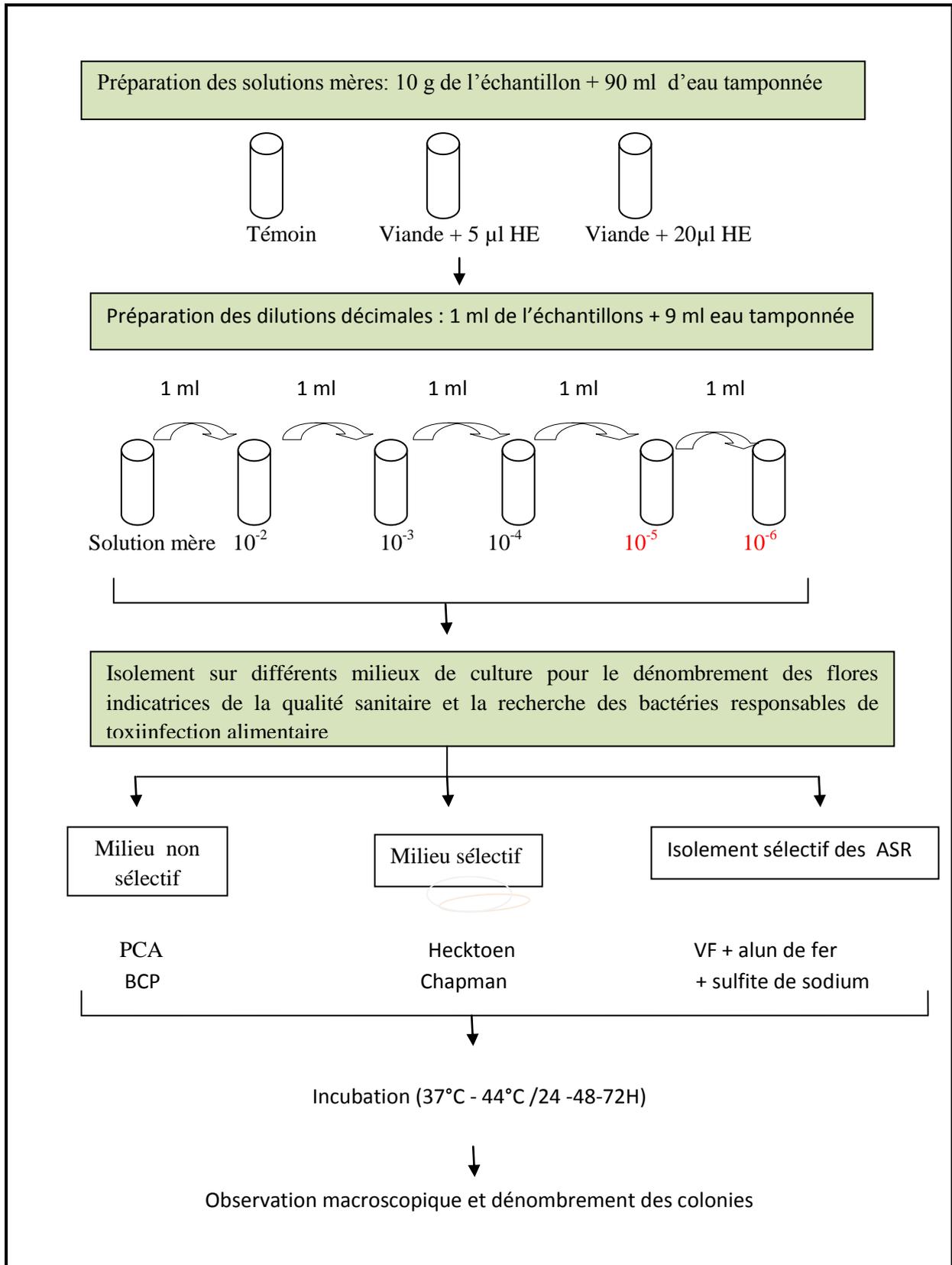


Figure17: Schéma récapitulatif des étapes de l'analyse microbiologique de la viande hachée additionnée de l'huile essentielle de l'armoise blanche

III. Résultats et discussion

III.1. Cinétique d'extraction et rendement en l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba*

La durée d'extraction est le temps nécessaire à la récupération de la totalité de l'huile contenue dans la matière végétale. Lors de cette étude, un suivi de la cinétique a été réalisé sur l'extraction de l'huile essentielle.

La figure 18 présente l'évolution du rendement en huile essentielle d'armoise blanche en fonction du temps.

Cette étude a pour but de fixer le temps nécessaire pour extraire le maximum d'huile et pour éviter les pertes de temps et d'énergie.

L'huile essentielle est extraite à partir de la partie aérienne de l'armoise blanche par la méthode d'hydrodistillation. Le suivi de la cinétique d'extraction de l'huile essentielle indique que le rendement augmente en fonction du temps puis il tend à se stabiliser à partir de 3 heures et demi. On estime donc que le temps optimum de cette hydrodistillation est d'environ 3 heures.

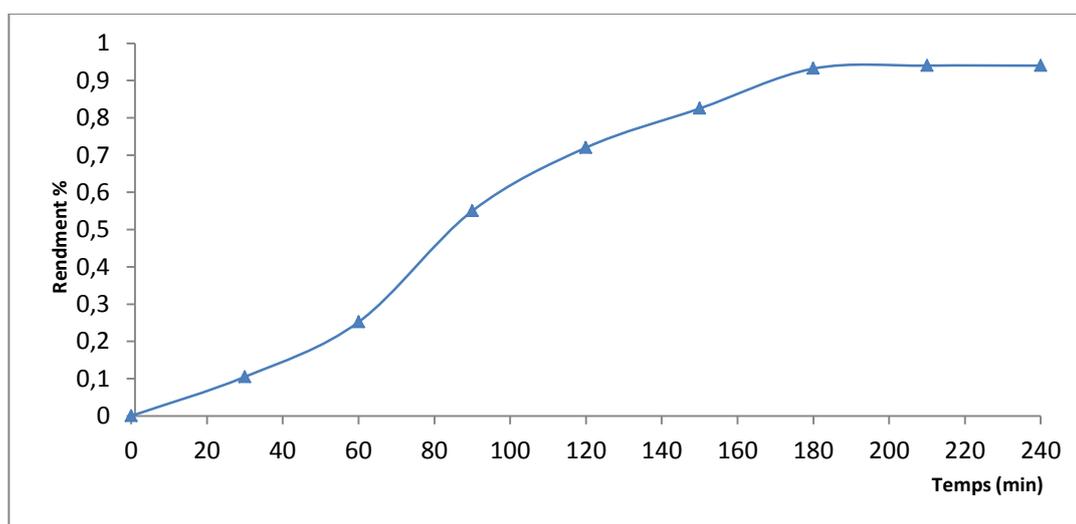


Figure 18: Cinétique d'extraction de l'huile essentielle d'*A herba alba* par hydrodistillation

Le rendement en huile essentielle atteint un maximum de 0.932 %. Des rendements comparables sont obtenus chez les échantillons d'armoise blanche de différentes régions en Algérie (de 0.2% à 0.95%) [Bezza et al., 2010 ; Belhattab et al., 2012]. Les mêmes variations du rendement d'huile essentielle d'armoise blanche ont été notées en Espagne (0,41% à 2,30%) [Salido et al., 2004].

Il semble donc que le rendement d'extraction d'huile essentielle de l'armoise blanche est variable suivant l'origine géographique de la plante; En Tunisie (0.68% à 1.93%) [Mohsen et Ferchichi, 2009] et En Jordanie (1.3%) [Hudaib et Aburjai, 2006]. Nous pouvons aussi dire que le rendement obtenu représente une valeur moyenne par rapport à d'autres plantes qui sont exploitées industriellement comme source d'huile essentielle. IL est plus élevé que celui de la rose (0.1-0.35%) et plus faible que celui du thym (2.2.5%) [Bencheqroun et al., 2012].

Le rendement et la qualité des huiles essentielles des espèces du genre *Artemisia* sont influencées par le pH des sols [Abad et al., 2012]. Les sols de la zone d'étude sont caractérisés par une texture sablo-limoneuse, pH basique et une faible qualité chimique [Bouzidi, 2001].

III.2. Evaluation de la qualité de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba*

L'analyse des huiles essentielles, l'identification des constituants, la recherche d'éventuelles falsifications peuvent se faire à l'aide des techniques telle que la chromatographie en phase gazeuse. Cependant, en routine et selon les référentiels classiques (Pharmacopée Européenne, ISO, AFNOR), l'évaluation de la qualité des huiles essentielles est réalisée par la mesure d'un certain nombre d'indice et des analyses chromatographiques :

- ❖ indices physiques: densité relative, indice de réfraction...
- ❖ analyses chromatographiques: chromatographie en phase gazeuse: c'est la méthode de choix qui permet de réaliser le profil chromatographie de l'huile essentielle [Afssaps, 2008].

III.2.1. Caractéristiques organoleptique

Les propriétés physico-chimiques constituent un moyen de vérification et de contrôle de qualité des huiles essentielles. Mais certaines propriétés organoleptiques comme la couleur, l'odeur et la viscosité peuvent aussi être pertinentes pour juger la qualité d'une huile.

Après l'extraction, l'huile obtenue est d'une couleur jaune pâle avec un aspect liquide et une odeur forte et agréable. Ces propriétés sont liées aux conditions climatiques et édaphiques de la région d'étude et de l'état de la plante.

III.2.2. Caractéristiques physiques

Les mesures physiques permettent d'évaluer le degré de pureté d'une huile essentielle. Les caractéristiques physiques étudiées de l'huile essentielle de l'armoise blanche sont la densité et l'indice de réfraction.

III.2.2.1. Indice de réfraction

L'indice de réfraction mesuré est de l'ordre de 1.4811. Ce résultat correspond aux normes. La valeur est supérieure à l'indice de réfraction de l'eau à 20°C (1.333) [Afssaps, 2008]. Notre résultat obtenu est supérieur à celui rapportés par Benjlali et Richard (1980), qui ont montré que l'indice de réfraction, de 24 échantillons de l'huile essentielle d'armoise blanche de différentes régions de Maroc, varie de 1.4562 à 1.4696.

Cela pourrait s'expliquer par la nature de la composition de l'huile essentielle. L'indice de réfraction varie selon la composition chimique, la masse volumique et augmente avec l'insaturation ou la présence de fonctions secondaires [Kardesking, 1992, Boukhatem et al., 2010].

III.2.2.2. Densité

La densité relative à 20°C d'une huile essentielle est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile essentielle à 20°C à la masse d'un volume égal d'eau distillée à la même température.

Nous avons remarqué que la densité de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* est de 0.912. Ce paramètre est lié à la composition chimique de cette huile qui est affectée par un grand nombre de facteurs tels que le phénotype, le moment de récolte, le type de terrain, la conservation, le procédé et les conditions d'extraction [Tenscher et al., 2005].

III.2.3. Analyse chimique de l'huile essentielle

La composition chimique de l'huile essentielle de la partie aérienne de l'armoise blanche obtenue par hydrodistillation a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les pourcentages et temps de rétention des composants identifiés sont répertoriés dans le tableau 8 dans l'ordre de leur élution.

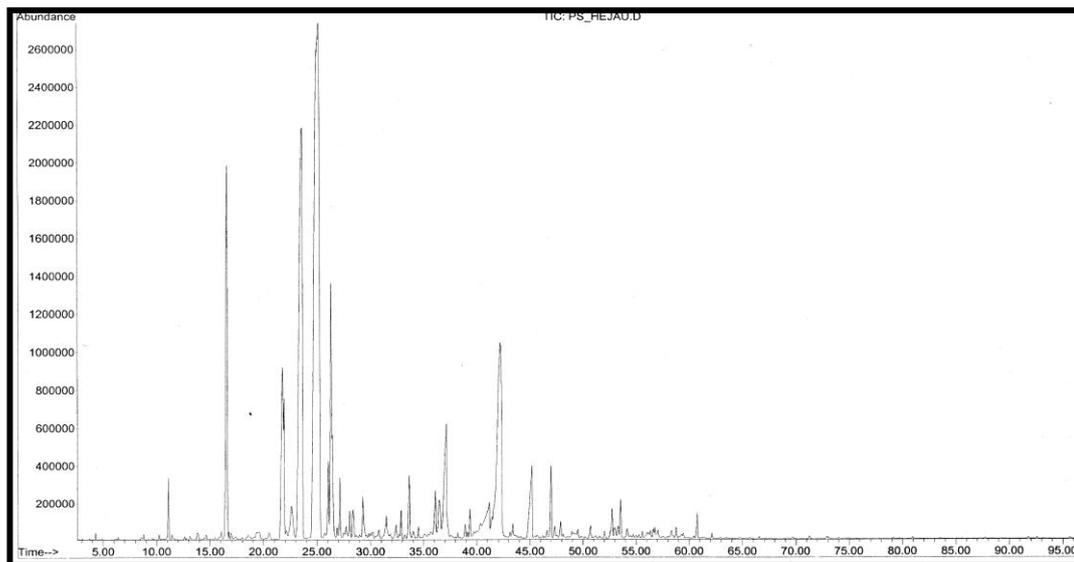


Figure 19: Les principaux composants identifiés dans l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* analysée par la technique CG/SM sur colonne capillaire HP-5MS

L'analyse qualitative par CG/SM de l'huile essentielle de l'armoise blanche nous a permis d'identifier 31 composés correspondant à 99,61% de la surface des pics totaux.

Les résultats obtenus montrent que cette huile est formée principalement du camphre (29.8 %), 1,3-Cyclopentadiene, 1,2,5,5-tetramethyl- (15.6 %), Chrysanthenone (8.2 %), Eucalyptol (6,5 %), Arthole (4,5 %). Ces composés sont accompagnés d'autres constituants minoritaires qui ne sont pas dénués d'importance avec des quantités relativement faibles comme le thujone (1,08% - 1,40%), camphene (0.67%), eugenol (0.47%),....(Tableau 8).

Selon la base de données NIST (National Institute of Standards and Technology) utilisée dans nos analyses CG/SM, Les composants majeurs de cette huile identifiés semblent être des monoterpènes oxygénés, de nature $C_{10}H_{16}O$, qui est la structure du camphre. Notre plante peut donc être considérée comme chémotype camphre.

Tableau 8: Les principaux composés identifiés par CPG/SM

N°	Name	R.T	%
1	Camphene	11.102	0.66
2	Eucalyptol	16.595	6.51
3	Bicyclo [3.2.0] hept-2-ene, 2-methyl	21.806	4.31
4	Thujone (alpha)-	21.942	1.40
5	Thujone (beta)-	22.623	1.09
6	1,3-Cyclopentadiene, 1,2,5,5- tetramethyl-	23.634	15.60
7	1,6-Dimethylhepta-1,3,5-triene	23.672	2.33
8	Camphre	25.218	29.81
9	Bicyclo [2.2.1] heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl-, (1S)-	25.245	4.20
10	2(10)-Pinen-3-one-	26.066	1.10
11	Arthole	26.315	4.52
12	Borneol	26.439	1.16
13	Terpinen-4-ol	27.148	0.81
14	3-Carene	28.050	0.36
15	Bicyclo [3.1.1] hept-2-ene-2-carboxaldehyde,6,6-dimethyl-	28.342	0.58
16	Verbenone	29.256	0.75
17	Octadiyne	31.467	0.45
18	Bicyclo [3.1.1] hept-2-en-4-ol, 2,6,6-trimethyl-, acetate	32.873	0.33
19	2-Cyclohexen-1-one, 3,5,5-trimethyl-	33.657	1.08
20	1,5-Hexadiene, 2,5-dimethyl-3-methylene-	36.106	0.77
21	1,3-Cyclopentadiene, 5,5-dimethyl-2-ethyl-	36.462	1.10
22	1,3-Cyclopentadiene, 5,5-dimethyl-1-ethyl	37.138	3.80
23	Eugenol	39.355	0.38
24	Pipéritenone	41.204	1.07
25	Chrysanthenone	42.198	8.21

26	2,4-Cycloheptadien-1-one, 2,6,6-trimethyl-	42.247	2.66
27	1-Penten-3-one, 2-methyl-	45.193	2.40
28	Germacrène D	46.988	1.03
29	(-)-Spathulenol	47.875	0.22
30	g- Gurjunene	52.724	0.51
31	Heptanoic acid, phenyl ester	53.524	0.50
Total			99.61

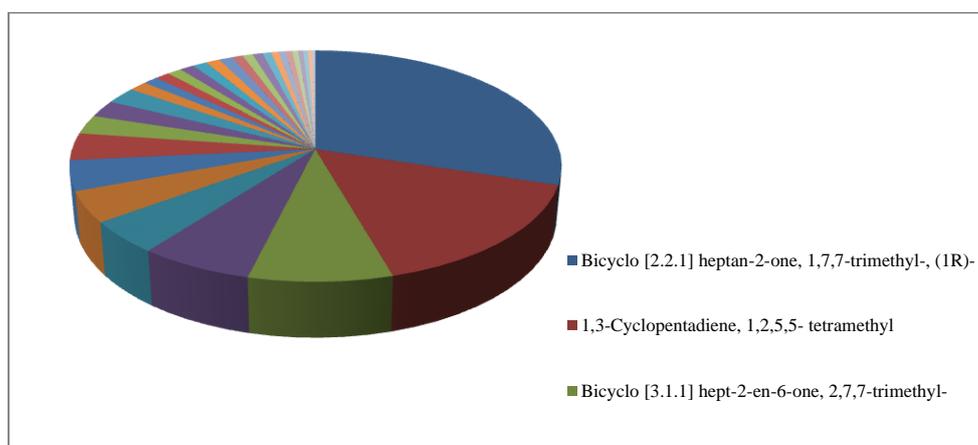


Figure 20: Distribution en fonction du pourcentage des différents composants existants dans l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba*

En tenant compte des composés majoritaires identifiés dans l'huile essentielle que nous avons analysée dans cette étude nous dressons un tableau de comparaison avec l'huile essentielle de la même plante mais de provenances différentes (tableau 9).

Selon le tableau ci-dessous, les principaux composants de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* de la région de Saida sont différents de ceux rapportés par plusieurs auteurs pour les huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* de différentes provenances, dans laquelle le α et β thuyone (7,85% à 30%) [Benjilali et Richard, 1980, Hudaib et Tallal, 2006., Akrouit et al., 2010, Zouari et al., 2010., Belhattab et al., 2012], et le Cis-chrysanthenyl acetate (10,60% à 25,12 %) [Salido et al., 2004, Zouari et al., 2010 et Bezza et al., 210] se sont révélés les éléments les plus abondants.

Tableau 9: Les principaux composés de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* de différents pays

Pays	Rendement %	Les principaux composants	Référence
Maroc		α -pinène, camphène, β -pinène, sabinène, p-cymène, cinéol-1,8, α et β -thujones, camphre, myrténal, cuminaldéhyde, .. α et β -thujones, et camphre représentent entre 60 et 80% de l'huile essentielle totale	Benjilali et Richard, 1980
Spain	0,41- 2.30	Davanone, le 1,8-cinéole, chrysanthone, cis-chrysanthol, p-cymène et l'acétate de cis-chrysanthényl.	Salido et al., 2004
Jordan	1.3	α and β -thujones (24,7%), santolina alcohol (13%), artemisia ketone (12,4%), trans-sabinyl acetate (5,4%), germacrene D (4,6%), α -eudesmol (4,2%) and Caryophyllene acetate (5,7%).	Hudaib and Tallal , 2006.
Algeria	0,95	Cis-chrysanthényl acetate (25,12%), (2F, 3Z) 3,5-heptadienal-2- ethyliden-6-methyl (8,39%), α -thujone (7,85%), myrtenyl acetate (7,39%), verbenone (7,19%), chrysanthone (4,98%).	Bezza et al., 210
Tunisie	1	β -thujone (30%), α -thujone (25,7%), 1,8-cineole (6%), bornyl acetate (5,7%) and camphre (4,5%).	Akrout et al., 2010
Algeria	0,2 à 0,9	Le camphre (17-33%), thuyone (7-28%) et chrysanthone (4-19%).	Belhattab et al., 2012
Tunisie	1.45	Acetate de cis-chrysanthényl (10,60%), acetate de sabinyl (9,13%) et α -tujone (8,73%).	Zouari et al., 2010.

La composition chimique de l'huile essentielle de cette plante provenant de diverses régions de l'Algérie a été caractérisée par la présence des pourcentages élevés de thujone [Bezza et al., 210 et Belhattab et al., 2012].

Cette thujone (appelée aussi thuyone), un monoterpène cétone (C₁₀H₁₆O), est une substance naturelle constituant des huiles essentielles d'un certain nombre de plantes largement utilisées pour l'alimentation et/ou à des fins médicinales. Le thujone a été considéré comme une substance neurotoxique convulsivante et hallucinante à forte dose [Zahalka, 2010]. Il est intéressant de noter que la thuyone est détectée en faible quantité dans notre étude (1,40%).

Donc, cette variation dans la composition chimique de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* (différents chémotypes), peut être due à des facteurs exogènes comme la nature et les composants du sol, la température, l'altitude et des facteurs endogènes tel que le patrimoine génétique des individus [Bencheqroun et al., 2012].

Les conditions écologiques de différents pays peuvent influencer le profil chimique des matières végétales, certains composés peuvent être accumulés à une période particulière en réponse aux conditions environnementales. Les huiles essentielles recueillies dans différentes régions à différentes saisons comprennent une composition chimique différente et peuvent ainsi présenter différentes activités biologiques [Hussain et al., 2010]. Selon Rota et al. (2008), L'activité biologique des huiles essentielles dépend de leur composition chimique en substances actives.

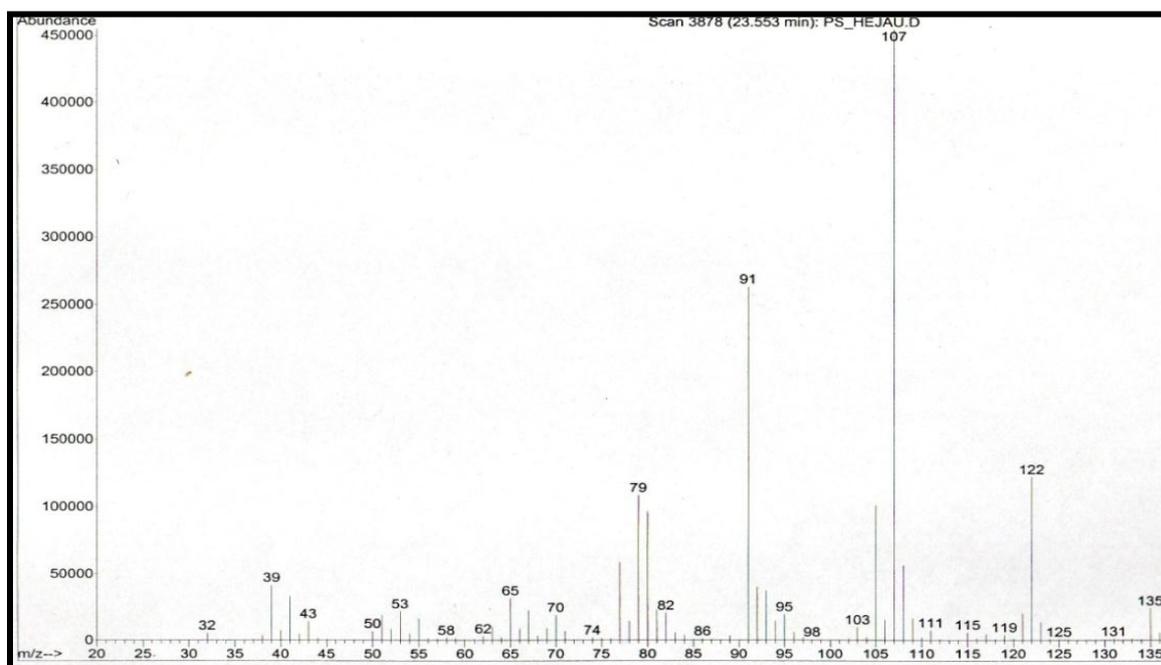


Figure 21: Spectre de Masse du 1,3-Cyclopentadiene, 1,2,5,5- tetramethyl de l'huile essentielle d'*A. herba alba*

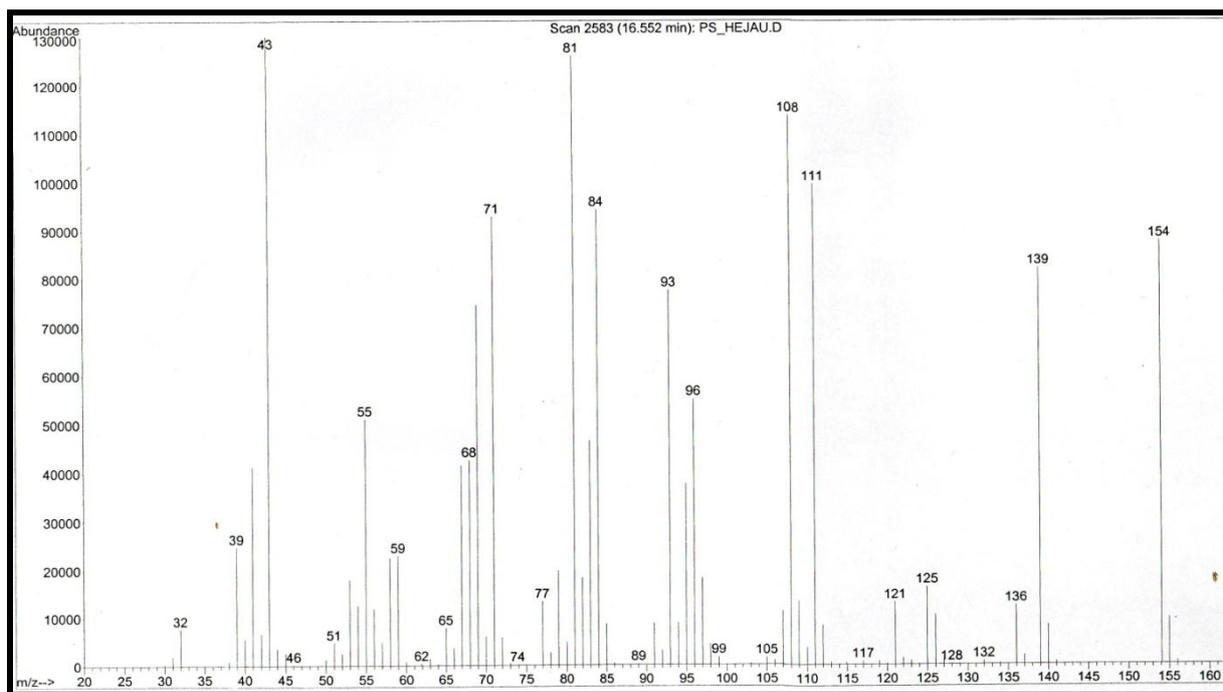


Figure 22: Spectre de Masse d'eucalyptol de l'huile essentielle d'*A. herba alba*

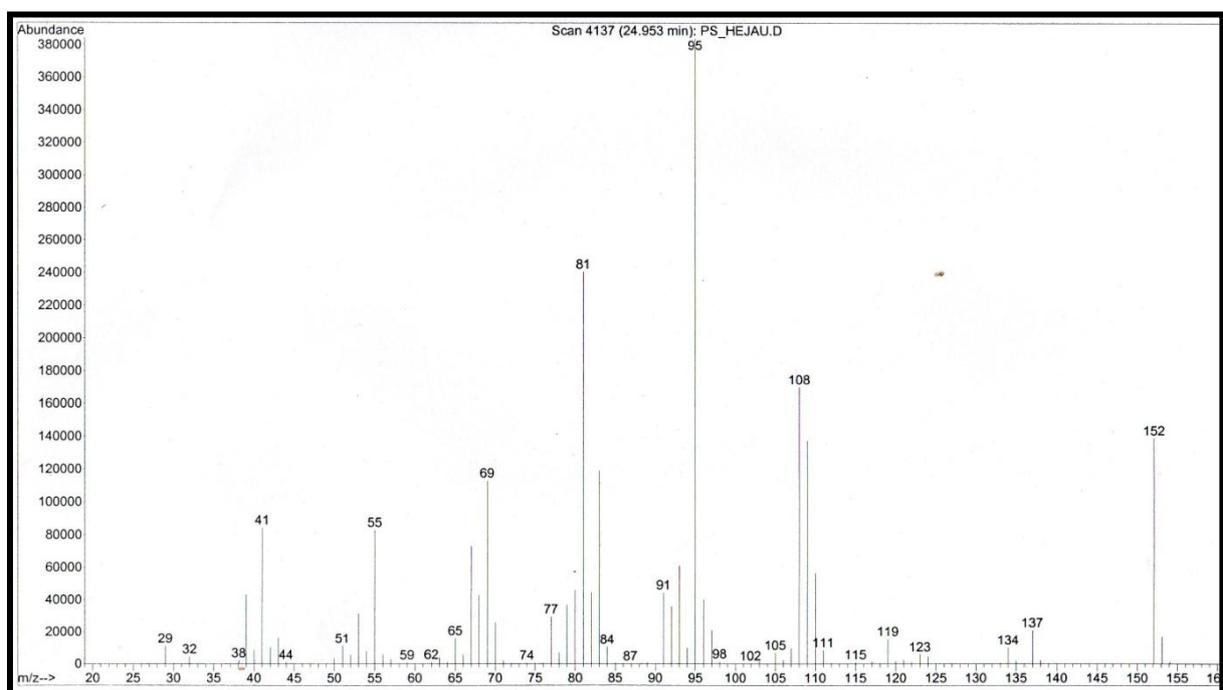


Figure 23: Spectre de Masse du camphre de l'huile essentielle d'*A. herba alba*

III.3. Activités biologiques

III.3.1. capacité antioxydante

III.3.1.1. Détermination de la capacité antioxydante par des tests chimiques « *in vitro* »

Pour évaluer le pouvoir antioxydant de l'huile essentielle, notre choix s'est porté sur l'utilisation de deux tests chimiques : le test évaluant le piégeage des radicaux libres et employant le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle sous sa forme radicalaire (DPPH[•]), impliquant le transfert d'atome d'hydrogène et le transfert d'électron, et le test déterminant le pouvoir réducteur antioxydant (FRAP, *Ferric Reducing Antioxydant Power*) basé sur le transfert d'électron.

1. Test de piégeage du radical libre DPPH

L'activité anti-radicalaire de l'HE *vis-à-vis* du radical DPPH[•] a été évaluée par spectrophotométrie en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm et en comparaison avec le BHT qui est un antioxydant standard. En calculant pour chaque concentration le pourcentage d'inhibition correspondant (PI%), on a tracé l'histogramme de la figure 24, qui représente la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'HE.

Cet histogramme nous montre que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration, que ce soit pour le BHT ou l'HE. Ainsi, on remarque que l'H.E. est considérablement antiradicalaire avec un pourcentage d'inhibition supérieur à 70%.

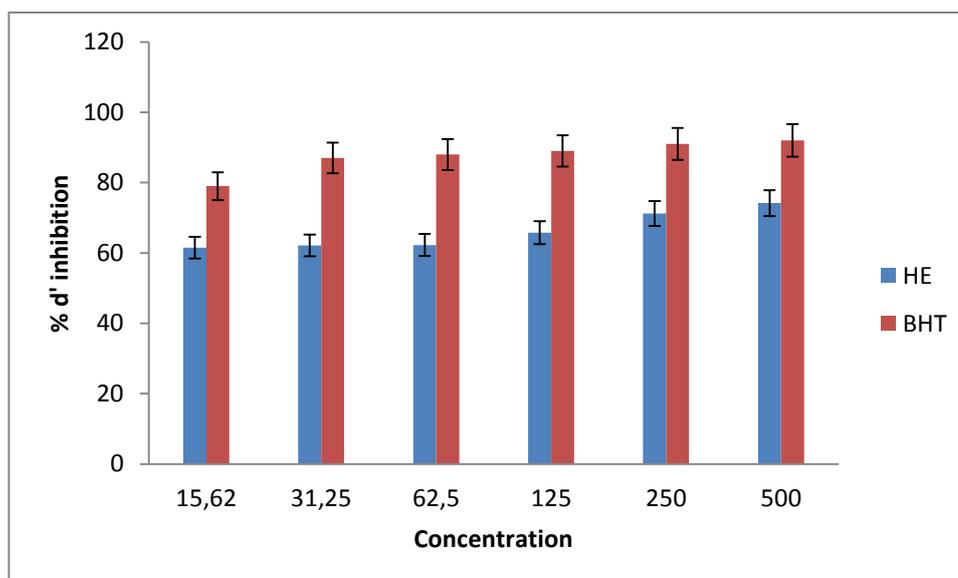


Figure 24: Variation du pourcentage de piégeage du radical DPPH en fonction de la concentration de l'huile essentielle et du BHT

Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature. Dans une étude réalisée sur certaines plantes médicinales algériennes y compris *Artemisia herba alba*, il a été noté que ces plantes sont de forts piégeurs de radicaux et peuvent être considérées comme une bonne source d'antioxydant naturel à des fins médicinales et commerciales [Mohamed et al., 2010]. Abid et al. (2007) ont comparé les effets à long terme de la décoction d'armoise blanche avec la décoction du thé vert ou noir, préparée sans sucres, sur les processus antioxydants chez les rats. Les résultats obtenus ont montré que l'armoise blanche pourrait constituer un bon adjuvant pour lutter contre l'obésité, l'hyperglycémie, l'hypercholestérolémie et le stress oxydatif.

Le pouvoir de piégeage du radical libre DPPH par les huiles essentielles est généralement présenté par la valeur IC_{50} . Elle est définie comme étant la concentration de l'antioxydant nécessaire pour piéger 50% du DPPH présent dans la solution d'essai. On a déduit graphiquement la concentration correspond à 50% d'inhibition (IC_{50}).

L'huile essentielle et le BHT ont exercé une activité antiradicalaire avec des valeurs de IC_{50} de 2.66 $\mu\text{g/ml}$ ($Y = 11.47X + 15.76$) et 1.66 $\mu\text{g/ml}$ ($Y = 13.51X + 27.2$) respectivement. En comparaison avec l'antioxydant standard (BHT), l'huile essentielle testée semble à premier regard moins actifs. Mais avec une réflexion attentive et prudente, Il est intéressant de noter que le BHT est une substance chimique pure, alors que l'huile essentielle d'*A. herba*

alba utilisée se compose de plusieurs substances naturellement actives dont l'une ou quelques unes d'entre elles doivent posséder ce pouvoir antioxydant. Si on considère que c'est le camphre qui a le pouvoir antioxydant dans notre huile essentielle (à cause de sa structure cétonique), et elle est majoritaire avec 29%, on peut donc recalculer le IC₅₀ qui devrait être 29% de la valeur de 2,66 µg/ml, et qui serait donc 0,77 µg/ml, c'est donc une valeur qui attribue à notre huile essentielle, qui est biologique et naturelle, un pouvoir anti-radicalaire plus puissant que le BHT lui-même. Ce résultat nous encourage encore à donner plus d'importance aux substances naturelles dans le domaine des additifs, des traitements divers de stabilité et de la lutte biologique.

L'effet antiradicalaire est aussi remarqué dans les travaux de **Khelifi et al. (2013)** qui ont rapporté que l'extrait d'*Artemisia herba alba* a montré une forte activité antioxydante mais avec une IC₅₀ beaucoup plus élevée que la notre qui est de 20.64 mg/l (l'équivalent de 20,64 µg/ml).

On rappelle que plus la valeur de la IC₅₀ est faible plus l'huile essentielle est puissante vis-à-vis des radicaux libres. En outre, il convient de noter que la valeur de la IC₅₀ dépend de plusieurs paramètres: le rapport entre la quantité de l'huile essentielle et la quantité de solution de DPPH utilisée dans le mélange, la concentration de la solution du DPPH et le temps d'incubation [**Akrout et al., 2010**].

Les résultats de l'analyse statistique (Tableau 26, Annexe 3) ont indiqué que l'huile essentielle et le BHT réduisent d'une manière très significative le radical DPPH par rapport au contrôle négatif (témoin). L'huile essentielle d'*A. herba alba* s'est avérée efficace quelle que soit la dose utilisée, puisque le pourcentage d'inhibition du radical DPPH était de l'ordre de 61.47 % à la faible dose 15.62 µl.

La différence entre les doses est très significative avec un F calculé de 44.9 contre un F théorique à 1% de 10.97. La corrélation entre les moyennes des doses et le pourcentage d'inhibition du DPPH semble être très significative, cette corrélation est positive indiquant que plus la dose augmente plus le pourcentage d'inhibition augmente d'une façon très linéaire.

L'activité antiradicalaire de l'huile essentielle de l'armoise blanche pourrait être attribuée à sa teneur élevée en monoterpènes oxygénés [**El Massry et al., 2002; Akrou et al., 2010; Riahi et al., 2010; Zouali et al., 2010**]. En revanche, le camphre, prédominant dans

l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* de la région de sidi Ahmed (% ??), est doté d'un pouvoir antioxydant considérable [Teixeira da Silva, 2004; Bourkhiss et al., 2010].

2. Test du pouvoir réducteur

L'essai du pouvoir réducteur est utilisé pour tester la capacité de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* à convertir le ferricyanure de potassium (Fe^{3+}) en ferrocyanure de potassium (Fe^{2+}) qui réagit ensuite avec le chlorure ferrique pour former des complexes ferreux. Comme le montre la figure 25, le pouvoir réducteur de l'armoise blanche augmente avec les concentrations croissantes de l'huile essentielle. Comparativement à l'acide ascorbique qui est utilisée comme référence, ce pouvoir semble plus faible, mais comme dans le cas du BHT, l'acide ascorbique est une substance pure, alors que notre huile essentielle est un ensemble qui peut comporter une ou quelques substances qui possèdent ce pouvoir réducteur. En plus de ça, l'aspect naturel de notre extrait lui accorde plus d'importance dans les applications futures.

L'augmentation de l'absorbance du mélange réactionnel indique une augmentation de la capacité réductrice de l'huile testée. Cette capacité peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante [Chang et al., 2007; Degryse et al., 2008].

Concernant alors le test du pouvoir réducteur, les résultats obtenus semblent être en accord avec ceux du test de piégeage du radical libre DPPH.

En effet, le pouvoir réducteur de l'huile essentielle testée indique qu'elle cède des électrons et peut réagir avec les radicaux libres pour les convertir en produits plus stables et mettre fin aux réactions radicalaires en chaîne [Yen et Chen, 1995].

Selon la courbe de régression obtenue, le pouvoir réducteur montre une relation beaucoup plus linéaire pour l'huile essentielle ($R^2 = 0.956$) que pour le contrôle positif ($R^2 = 0.752$). Cela peut indiquer que l'effet réducteur de l'huile d'*A. herba alba* est plus corrélé avec sa concentration, son effet est directe et ne présente pas de phase affectée par l'effet de masse (effet ou réaction qui se déclenche ou qui s'accélère qu'au-delà d'une certaine concentration).

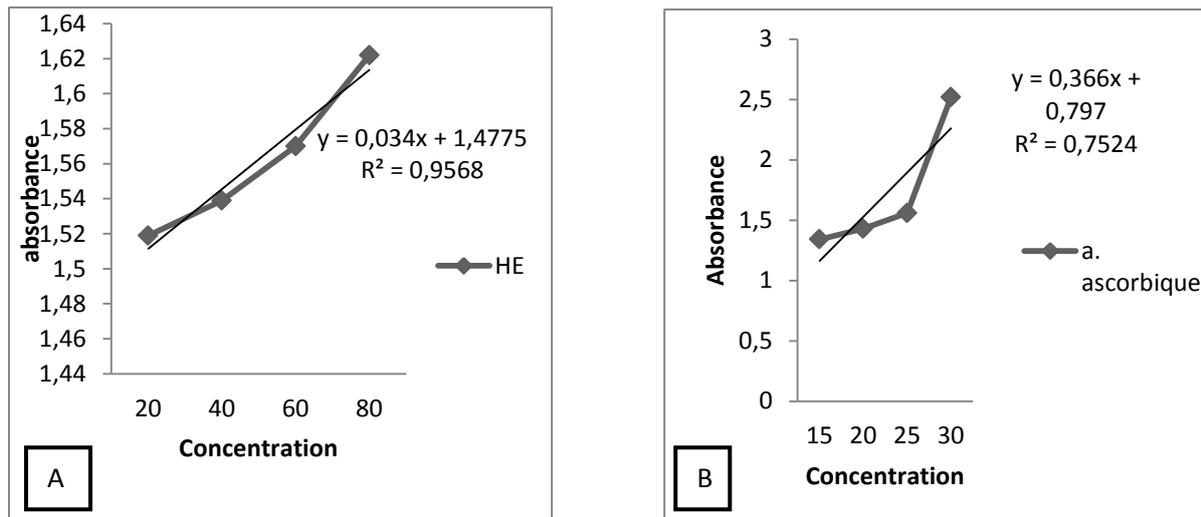


Figure 25: Pouvoir réducteur de l'huile essentielle (A) et de l'acide ascorbique (B) par la méthode de FRAP

Nos résultats sont conformes à ceux de **Burt, 2004; Bruneton, 2005; Degryse et al., 2008 et Riahi et al., 2013** qui ont déclaré qu'il y a une relation entre la capacité antioxydante et la présence du camphre, eugénol, α -thujène, pinène.

Certaines études rapportent des activités antioxydantes faibles pour les huiles essentielles d'autres espèces du genre *Artemisia* qui peut être liée à la domination des composés non phénoliques [**Burits et al., 2001**].

Selon **Riahi et al. (2013)**, l'activité antioxydante des extraits de plantes est généralement attribuée aux composés phénoliques. Ces substances sont parmi les groupes de composants alimentaires non essentiels qui ont été associés à l'inhibition de l'athérosclérose et le cancer. La bio-activité de ces composés peut être liée à leur capacité à chélater les métaux, inhiber la lipoxigénase et piéger les radicaux libres [**Chang et al., 2007**].

Pour conclure, on peut dire que nos résultats mettent en évidence une importante capacité antioxydante *in vitro* de l'huile essentielle de l'armoise blanche du Nord-Ouest algérien.

III.3.2. Activité antimicrobienne

Pour étudier l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba*, nous avons utilisé deux souches bactériennes qui sont : *Escherichia coli* (ATCC 25922), et *Staphylococcus aureus* (ATCC 25213), une souche fongique : *Candida albicans* (ATCC 10231) et trois moisissures: *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (fusariose du pois chiches) (FOC), *Fusarium solani* (pourriture des racines de pois chiches) (FS) et *Globisporangium ultimum* (fonte des semis et la pourriture des racines de Pin d'Alep) (GU).

III.3.2.1. Résultats de l'antibiogramme

L'antibiogramme permet de mesurer la capacité d'un antibiotique à inhiber la croissance bactérienne *in vitro*.

La représentation graphique des diamètres d'inhibition des bactéries étudiées vis-à-vis de différents antibiotiques sont illustrés dans la photo 3 et reportés sur la figure 26.

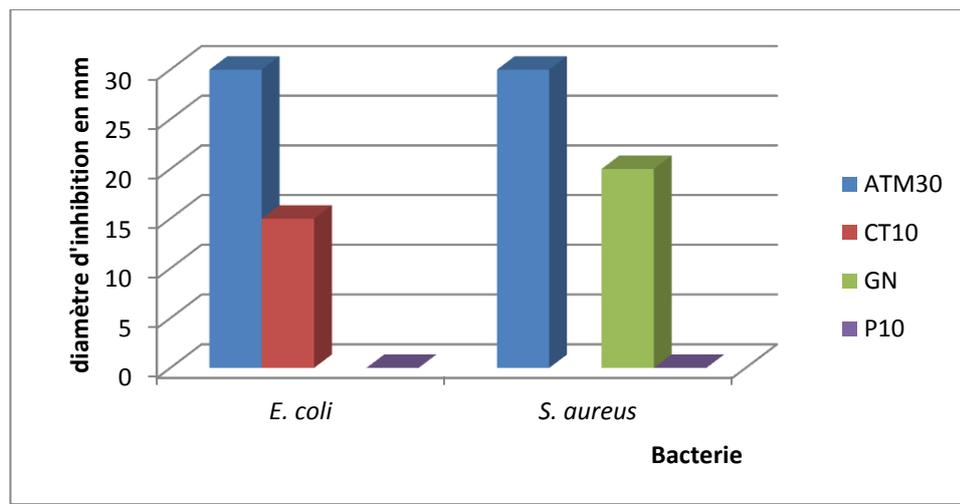


Figure 26: représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition de *E. coli* et *S. aureus* vis-à-vis de différents antibiotiques (ATM₃₀ : aztreonam ; CT₁₀: colistine ; GN : gentamicine ; P₁₀ : pénicilline)

Selon **Bonnet et al. (2012)**, et en fonction des diamètres des zones d'inhibition induites par les antibiotiques utilisés, les résultats obtenus révèlent que:

- *S. aureus* est très sensible à la gentamicine et l'aztreonam avec des diamètres des zones d'inhibition qui varie entre 20 et 30 mm respectivement. Par contre, elle est s'est montrée résistante à la pénicilline.
- *E. coli* est sensible à l'aztreonam et la colistine. Cependant, cette souche apparait insensible à la pénicilline.

La pénicilline est un antibiotique connu pour être utilisé contre *E. coli* et *S. aureus*, mais les résultats obtenus peuvent être expliqués par une résistance acquise par ces bactéries vis-à-vis de cet antibiotique. Selon **Fauchère et avril (2002)**, les antibiotiques sont de plus en plus souvent mis en échec par les bactéries qui prennent à leur résister.

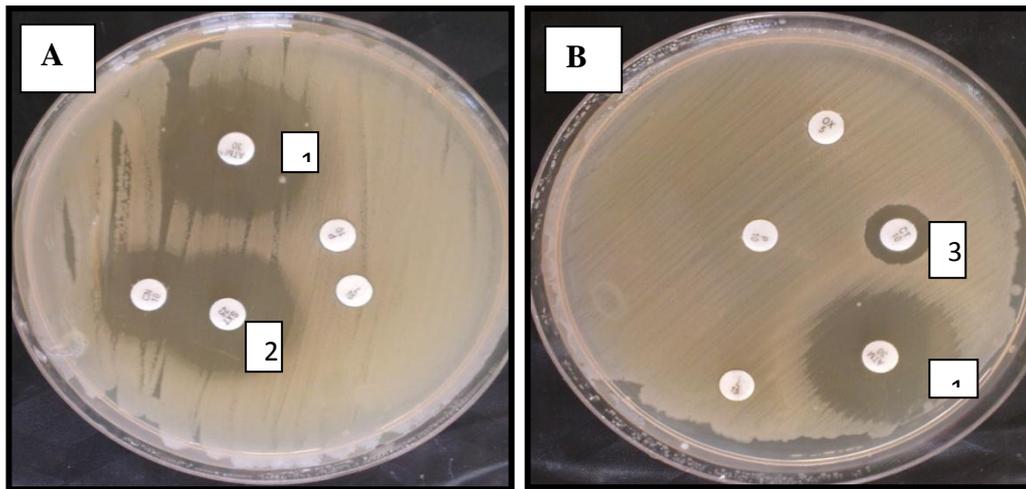


Photo 3: Sensibilité des souches bactérienne vis-à-vis des antibiotiques testés : A : *S. aureus* ; B : *E. coli*

1 : ATM₃₀, 2 : GN, 3 : CT₁₀

III.3.2.1.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*A. herba alba*

Les résultats de l'activité antibactérienne et anti candida en utilisant le test de diffusion sur disque sont présentés dans la figure 27.

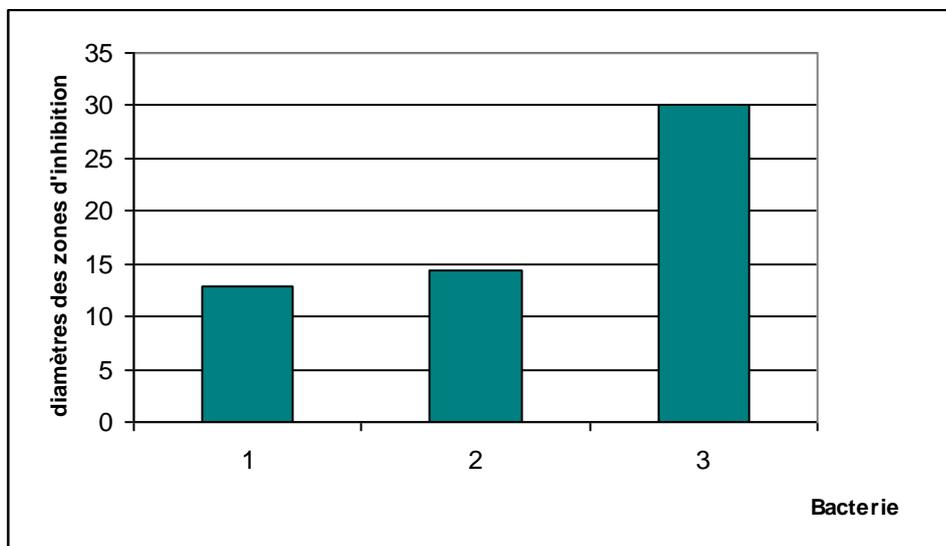


Figure 27: représentation graphique des diamètres d'inhibition en mm des souches testées (1: *E coli* ; 2: *S. aureus* ; 3: *C. albicans*) en présence de l'huile essentielle de l'armoise blanche

L'huile essentielle s'est révélée active contre tous les microorganismes testés. Comme cela a été rapporté dans la littérature, un extrait est considéré comme actif lorsqu'il induit une zone d'inhibition de ≥ 8 mm [Tekwu et al., 2012].

L'activité de l'huile essentielle varie d'une souche à une autre, cette variation peut être observée dans les diamètres des zones d'inhibition qui montre que certaines souches sont plus sensibles que d'autres.

Selon le classement effectué par **Ponce et al. (2003)** et **Rota et al. (2008)**, nous remarquons que *Candida albicans* est la souche la plus sensible à l'huile essentielle par rapport aux souches bactériennes, car le diamètre de la zone d'inhibition était le plus grand, il est de l'ordre de 30 ± 3.60 mm. La sensibilité de *S. aureus* (14.33 ± 0.57) était plus élevée que celle de *E. coli* (12.83 ± 0.76) (Figure 27).

Ces différences de sensibilité des microorganismes contre l'huile essentielle d'*A. herba alba* peuvent être expliquées par la quantité et la qualité des molécules bioactives ou la nature et la composition de la paroi cellulaire ainsi que la puissance du système enzymatique de la cellule qui contrôle son métabolisme.

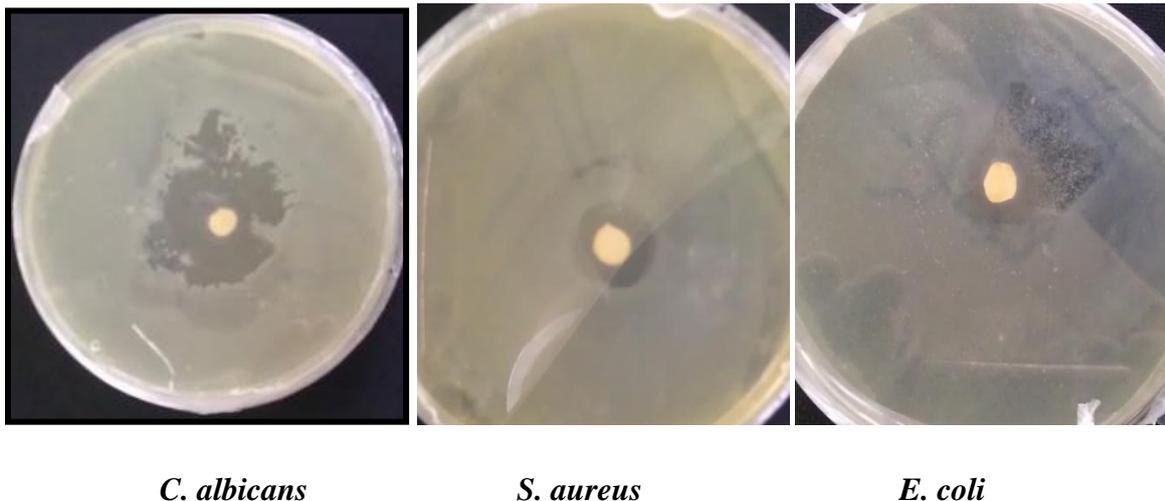


Figure 28: Effet de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* sur les trois souches testées

Selon **Friedman et al. (2002)**, trois principaux facteurs peuvent influencer les résultats d'un test de l'activité antimicrobienne d'une huile essentielle:

- ❖ la composition et la solubilité de l'huile essentielle;
- ❖ le microorganisme et la vitesse de sa croissance.

La comparaison de nos résultats avec ceux rapportés dans la littérature montre qu'ils sont meilleurs que ceux de **Mighri et al. (2010)** qui ont testé quatre types d'huiles essentielles d'A

herba alba sur *C. albicans* et ils ont mentionné un diamètre d'inhibition varie entre 13.3 mm à 19 mm. Ainsi, **Lopes-Lutz et al. (2008)** ont montré que *C. albicans* et *E. coli* ont été moins sensible aux huiles essentielles extraites à partir de sept espèces sauvages du genre *Artemisia* récoltées dans la région Ouest de Canada.

Dans le cas de *S. aureus*, nos résultats sont conformes à ceux publiés par **Zouali et al. (2010)** qui ont également trouvé que l'huile de romarin riche en camphre présentait une action modérée contre cette bactérie. Les huiles essentielles de camphre en tant que composant majeur présente une action modérée sur *S. aureus* [**Jordan et al., 2013**]. Plusieurs composés majoritaires sont plus puissants que l'action seule du premier composé majoritaire [**Daroui, 2012**].

Jiang et al. (2011) ont trouvé que l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle du romarin était supérieure à celle du pinène et 1.8 cinéole; les composés majoritaires de cette huile. Donc, ils ont déduit que cette capacité de l'huile essentielle est l'effet synergique de ses constituants actifs.

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*A. herba alba* contre *S. aureus* et *E. coli* peut être attribué à la combinaison des différents composants présents dans cette huile, qui agissent en synergie pour affaiblir le métabolisme microbien et inhiber ou ralentir son adaptation [**Jordan et al., 2013**].

Cette activité est liée à leur configuration structurale, les groupes fonctionnels, les proportions dans lesquelles ils sont présents et les interactions synergiques possibles entre eux [**Dorman et deans, 2002; Akrouf et al., 2010; Jordan et al., 2013**].

Les monoterpènes oxygénés comme le camphre, le bornéol, le terpinène -4- ol ont un large spectre d'activité antimicrobienne [**Salamci et al., 2007**]. La présence d'une fonction d'oxygène augmente les propriétés antimicrobiennes des terpénoïdes (cétone) [**Dorman et Deans, 2000**]. A la suite de leur caractère lipophile, les monoterpènes cycliques influent sur la perméabilité des membranes cellulaires [**Cox et al., 2000; Zouari et al, 2010**].

Il a été rapporté aussi que les monoterpènes provoquent une inhibition du métabolisme énergétique mitochondriale, notamment les oxydations phosphorylantes. Ce qui entraîne des perturbations dans les processus physiologique et biochimiques dans la cellule [**Daroui, 2012**].

Le mode d'action des huiles essentielles dépend aussi du type de microorganisme. Il est connu que les bactéries expriment différents degrés de résistance à la présence des huiles essentielles. En raison de leur nature hydrophobe, les huiles essentielles ont tendance à affecter un plus grand nombre de bactéries à Gram positif, suivi par les bactéries à Gram négatif [Dussaut et al., 2014]. La membrane extérieure des bactéries à Gram négatif est plus riche en lipo-polysaccharides et en protéines que ceux des bactéries à Gram positif qui la rend plus hydrophile, ce qui empêche les composés hydrophobes d'y adhérer [Cox et al., 2000; Calsamiglia et al., 2007; Akrouf et al., 2010; Khebri, 2011; Daroui, 2012]. Néanmoins, certaines molécules de bas poids moléculaires peuvent adhérer à la bactérie à Gram négatif par fixation aux protéines et aux lipopolysaccharides membranaires grâce à leurs groupes fonctionnels et atteindre aussi la membrane intérieure [Calsamiglia et al., 2007 ; Daroui, 2012].

Bien que l'action principale des huiles essentielles comme antibactérien semble être centrée dans leur activité sur la membrane cellulaire, d'autres mécanismes d'action peuvent intervenir tels que la dénaturation des protéines, inactivation des enzymes et elles peuvent interagir avec les acides nucléiques.

III.3.2.2. Détermination de la CMI

L'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* s'est révélée active contre *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Cela, nous a permis de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI).

La CMI est le paramètre le plus couramment utilisé par les chercheurs pour l'étude de la bactériostase. Ce test a été réalisé par la méthode de micro-dilution sur milieu liquide. Les résultats obtenus pour les souches étudiées nous ont permis de réaliser les courbes suivantes (figure 29, 30 et 31).

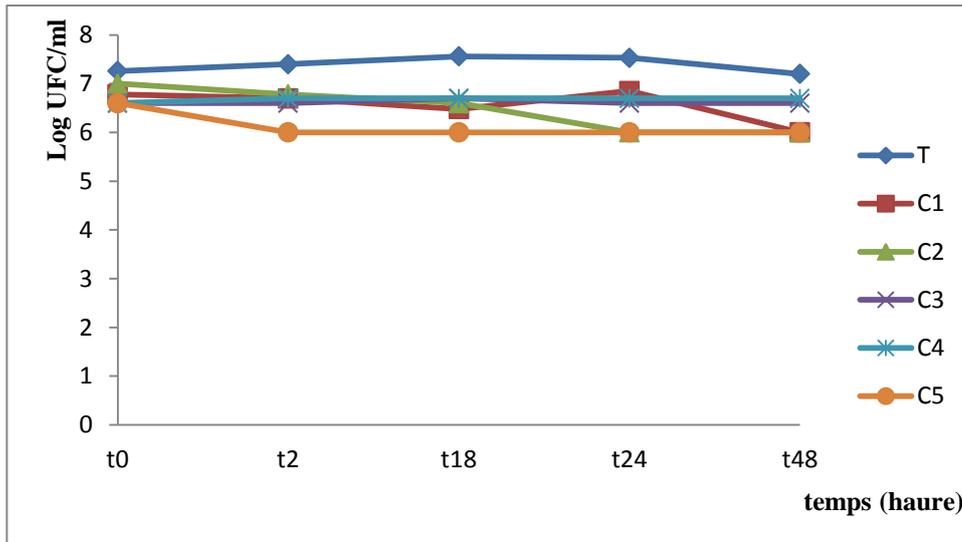


Figure 29: effet de l'huile essentielle de l'armoise blanche sur la croissance de *Candida albicans*

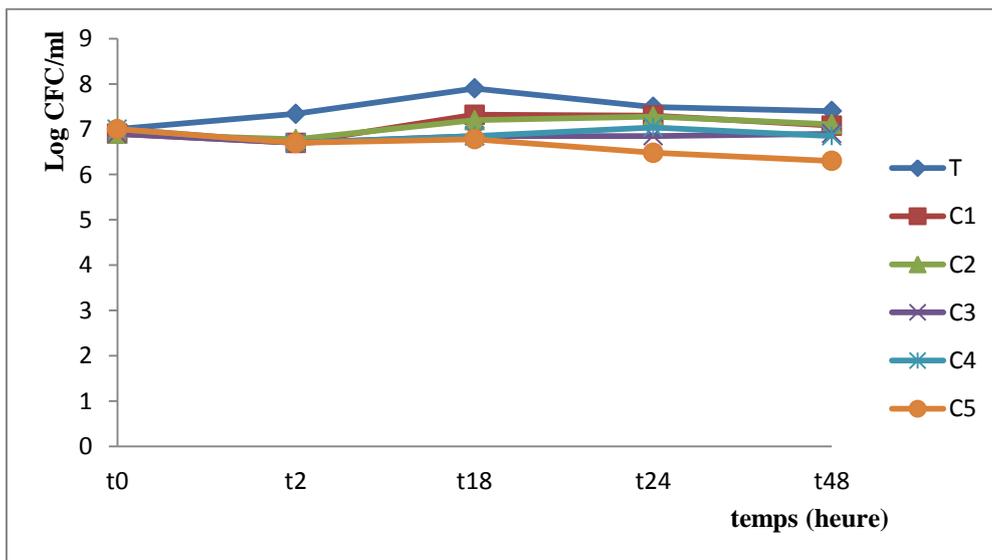


Figure 30: effet de l'huile essentielle de l'armoise blanche sur la croissance de *S. aureus*

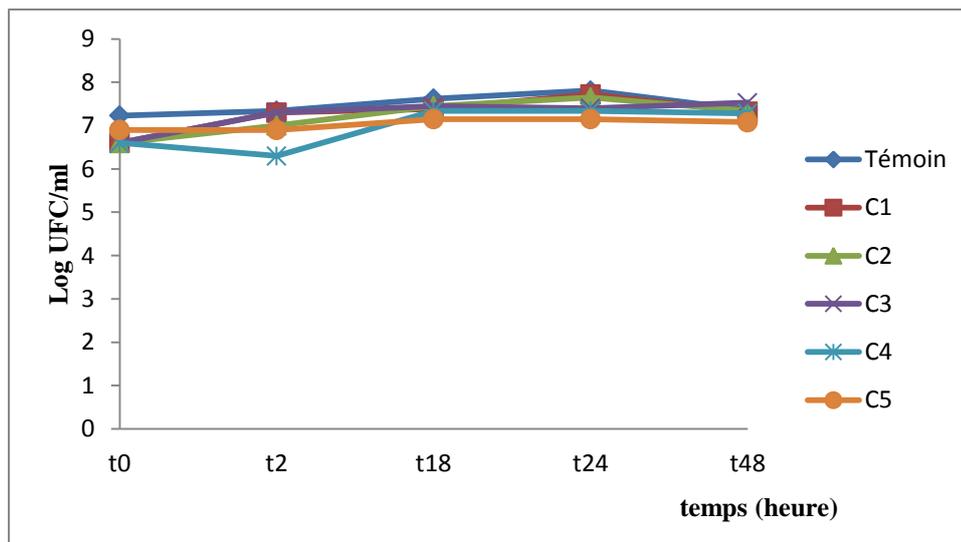


Figure 31: effet de l’huile essentielle de l’armoise blanche sur la croissance de *E. coli*

Ces figures nous montrent que l’huile essentielle exerce une activité contre *E. coli*, *S. aureus* et *C. albicans*, ce qui confirme les résultats obtenus de l’aromatogramme.

Les valeurs des CMI se concordent d’une manière générale avec celles des diamètres d’inhibition, les souches sensibles à l’huile essentielle avec une zone d’inhibition importante présentent les plus petites concentrations minimales inhibitrices (tableau 10).

Table 10: Zone d’inhibition et concentration minimale inhibitrice ($\mu\text{l/ml}$) de l’huile essentielle d’*Artemisia herba alba*.

Microorganisme	Zone d’inhibition (mm)	MIC ($\mu\text{l/ml}$)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	12.83 \pm 0.76	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25213)	14.33 \pm 0.57	6.25
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	30 \pm 3.60	3.12

En se référant aux résultats illustrés dans les figures 29, 30, 31, le rapport CMF/CMI pour *C. albicans* ($2.5 \text{ mg.ml}^{-1} / 1.21 \text{ mg.ml}^{-1}$) égale à 2, donc, l'huile essentielle d'*A. herba alba* possède un effet fongicide contre cette souche.

En ce qui concerne les souches bactériennes, le rapport CMB/CMI est supérieur à 2. Ce qui indique que cette huile est bactériostatique plutôt que bactéricide à cette concentration.

III.3.3. Activité antifongique

La difficulté de lutte contre les maladies racinaires par les pesticides de synthèse expliquerait l'usage abusif de ces produits phytosanitaires par les producteurs. En conséquence, cet usage abusif des pesticides pose un problème de rentabilité de culture, de risque de résidus de produits de synthèse dans les fruits et de pollution de l'environnement [Doubouya et al., 2012].

Face à l'inquiétude concernant la croissance de l'utilisation des pesticides de synthèse et l'effet de leurs résidus sur la santé des consommateurs, plusieurs études ont été axées sur l'exploitation des extraits de plantes pour développer de nouveaux fongicides pour lutter contre les maladies fongiques des plantes.

Cette étude a pour but d'évaluer l'activité antifongique de l'huile essentielle extraite de l'armoise blanche « *Artemisia herba alba* » contre trois souches pathogènes: *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (FOC), *Fusarium solani* (FS) et *Globisporangium ultimum*.

III.3.3.1. Résultats du test de la croissance mycélienne

L'activité antifongique de l'huile essentielle a été testée par la méthode de diffusion et l'appréciation des diamètres des zones d'inhibition *in vitro*. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 32 et les planches 1,2,3.

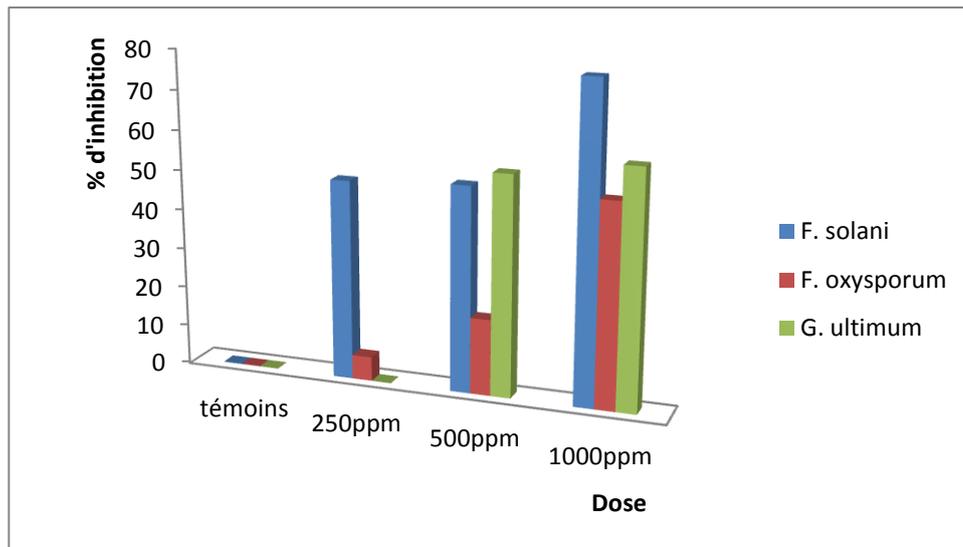


Figure 32: Le taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*, *Fusarium solani* et *Globisporangium ultimum* en fonction de la dose de l'huile essentielle

L'analyse des résultats représentés sur la figure 32 montre que la croissance mycélienne des souches testées est influencée par les différentes doses de l'huile essentielle. En effet, plus la dose augmente plus le taux d'inhibition augmente. Un maximum d'effet est obtenu par la dose de 1000 ppm. A cette dose, huile essentielle réduit le développement de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* et *Globisporangium ultimum* avec des taux d'inhibition qui varie de 50.61% à 78.33%.

Nous remarquons aussi, qu'il y a des différences dans la sensibilité entre les espèces qui appartiennent au même genre (*Fusarium oxysporum* et *Fusarium solani*).

Par comparaison du comportement des espèces et souches pour chaque dose de l'HE, des différences de sensibilité ou de résistance sont notées.

D'après les résultats statistiques (annexe 3), nous notons que la différence existe entre le dose 1000 ppm et les autres doses et entre le témoin et les autres doses pour les trois souches étudiées. En observant les moyennes des résultats de l'effet de 500 ppm, on peut dire que *Fusarium oxysporum* est la plus résistante que les autres souches avec seulement 19,14% d'inhibition de croissance. Pour la dose de 1000 ppm, *Fusarium solani* est très sensible avec 78.33% d'inhibition, alors que *Fusarium oxysporum* et *Globisporangium ultimum* ont le même seuil de sensibilité à cette dose.

Les mécanismes d'action des huiles essentielles par lesquels la croissance mycélienne peut être réduite ou totalement inhibée ont été proposés. Ainsi, **Lucini et al. (2006)** et **El badawy et al. (2014)** ont indiqué que les huiles essentielles agiraient sur l'hyphe du mycélium, ce qui provoque la sortie des composants du cytoplasme, la perte de la rigidité et l'affaiblissement de l'intégrité de la paroi cellulaire de l'hyphe, entraînant son effondrement et la mort du mycélium.

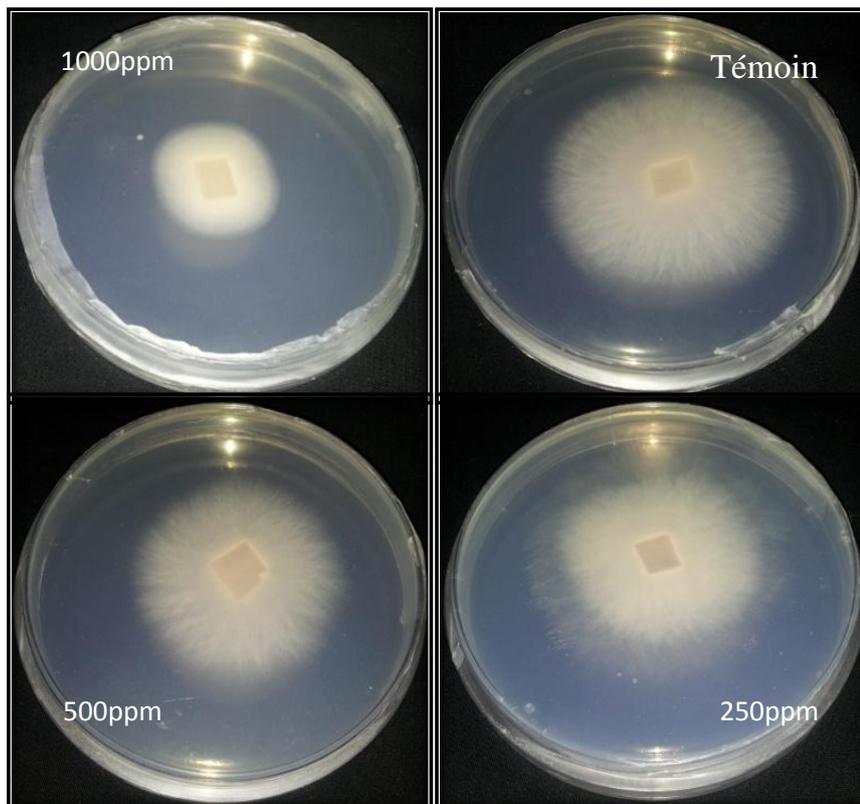


Planche 1: L'effet de l'HE d'*A. herba alba* sur la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* après 7 jours d'incubation

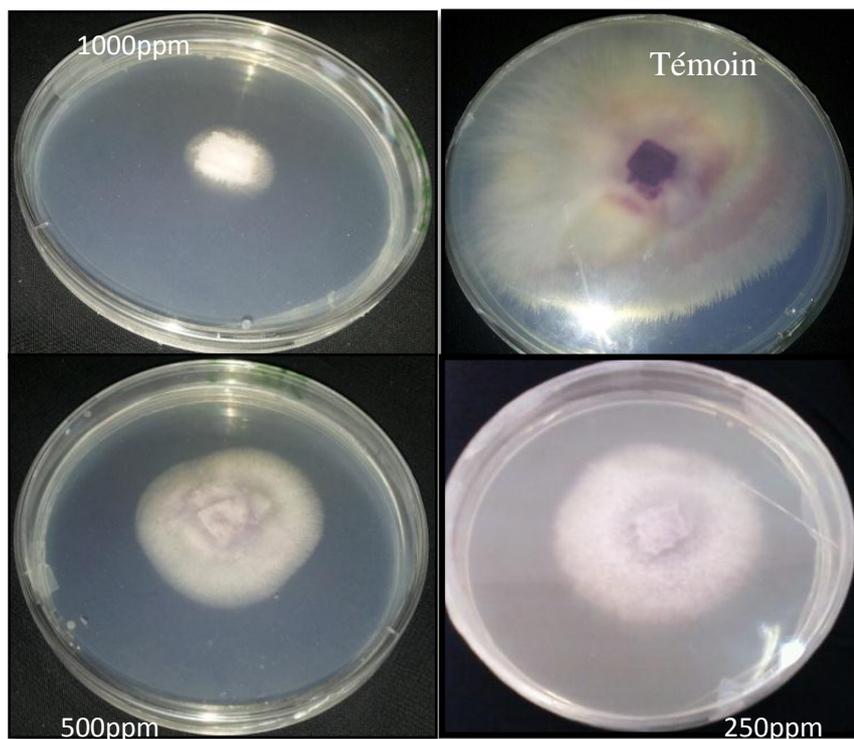


Planche 2 : L'effet de l'HE d'*A. herba alba* sur la croissance mycélienne de *Fusarium solanée* après 7 jours d'incubation

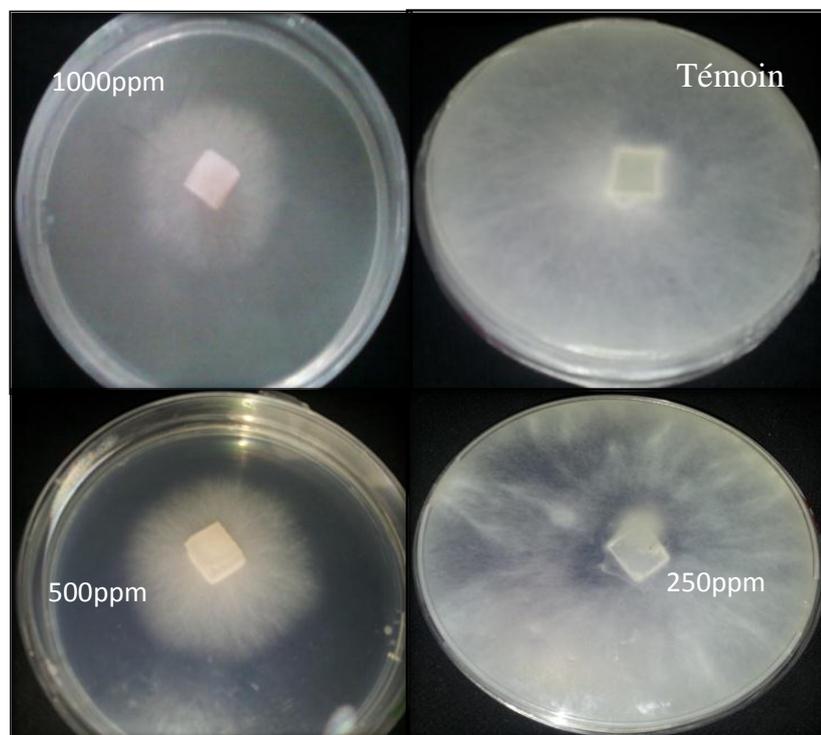


Planche 3: L'effet de l'HE d'*A. herba alba* sur la croissance mycélienne de *Globisporangium ultimum* après 7 jours d'incubation

III.3.3.2. Résultats de test de la germination conidienne

L'huile essentielle a eu des activités variables sur la germination conidienne des souches testées. Il apparaît que l'effet le plus important a été observé pour *Globisporangium ultimum*. Une activité d'inhibition de 100% a été observée par l'application des deux concentrations (500 ppm et 1000 ppm) sur la germination de ce germe.

En se basant sur les résultats du pourcentage d'inhibition de la germination conidienne, l'huile essentielle d'*A. herba alba* semble être effective sur toutes les souches testées.

L'analyse de la variance en fonction de l'espèce, l'état et la dose montre qu'il y a une différence significative entre les deux états germé et non germé (Tableau 17, annexe 3).

Globisporangium sp est largement étudié en raison de son importance économique. En effet, il peut causer des dégâts très importants sur les végétaux, il est considéré comme un redoutable parasite des cultures forestières. Ainsi, avec d'autres traitements, **Lazrag (2014)** a analysé la capacité antifongique de l'huile essentielle de l'inule « *Inula viscosa L.* », des agents de lutte biologique *Bacillus subtilis* et *Trichoderma atroviride* et un fongicide chimique « le bénomyl » contre *Globisporangium sp*. Les résultats obtenus ont montré que ces traitements utilisés n'ont pas affecté ni la germination des conidies, ni la croissance mycélienne de cette espèce. Cependant nos résultats ont montré une forte activité antifongique de l'huile essentielle d'armoise blanche contre *Globisporangium sp*. Donc on peut dire et affirmer avec une certaine prudence que notre plante, et à travers l'utilisation de son huile essentielle, peut constituer une solution très efficace, et tellement attendue, pour lutter contre ce parasite féroce et chronique.

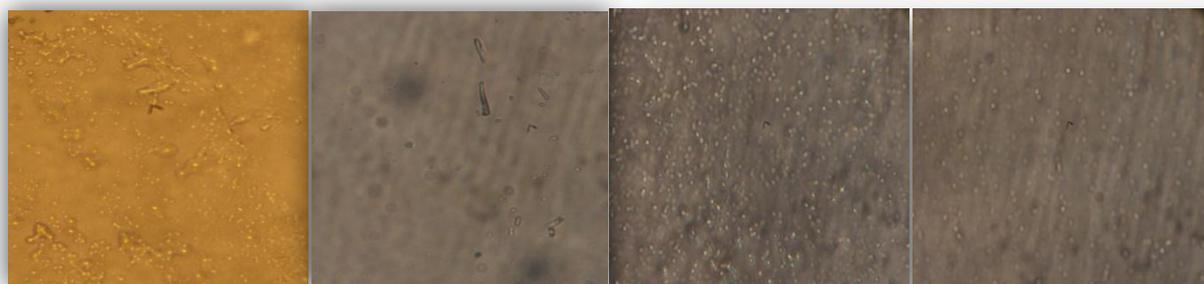
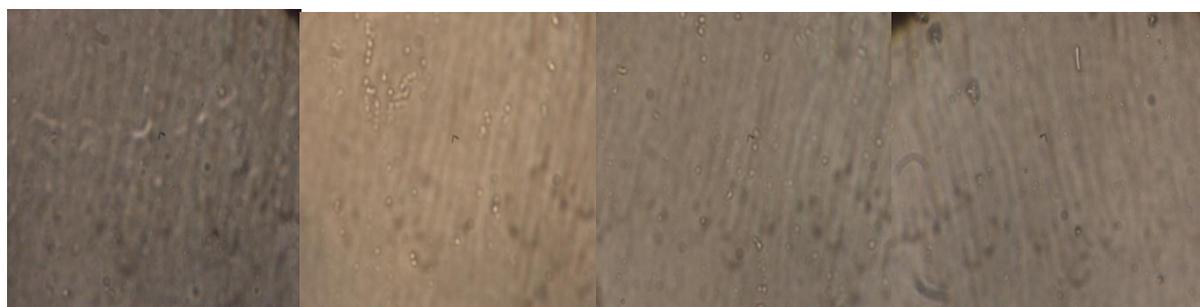


Photo 4: Observation microscopique de la germination conidienne de *Fusarium solani* 40X



Photo 5: Observation microscopique de la germination conidienne de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* 40X



Témoins

1000ppm

500ppm

250ppm

Photo 6: Observation microscopique de la germination conidienne de *Globisporangium ultimum* 40X

III.3.3.3. Résultats du test de sporulation

L'analyse des résultats indique que les trois souches testées sont sensibles à l'huile essentielle. Cette sensibilité se traduit par une réduction des spores avec l'augmentation de la dose.

Concernant *F. oxysporum*, l'huile essentielle a donné un taux d'inhibition supérieur à 50% pour les différentes doses allant de 58.53 % à 91.86%.

Quand à *F. solani* et *Globisporangium ultimum*, les doses de 500 ppm et 1000 ppm ont donné des taux d'inhibition supérieurs à 50%. D'après l'analyse statistique, nous constatons que toutes les doses sont significativement différentes dans leurs effets sur la sporulation des espèces étudiées (Annexe 3).

Suite aux résultats obtenus (ci-dessous), nous pourrions déduire que l'huile essentielle d'armoise blanche a un large spectre d'action sur les moisissures testées. Elle a inhibé la croissance mycélienne, la germination et la sporulation chez *F. oxysporum*, *F. solani* et *Globisporangium ultimum*. Son activité antifongique est principalement fonction de sa composition.

Beaucoup de travaux ont démontré l'efficacité antifongique des monoterpènes [Chebli et al., 2003 ; Salamci et al., 2007; Ahmadi et al., 2010 ; Kordali et al., 2012]. Ainsi l'activité antifongique de l'huile essentielle d'armoise blanche dans la présente étude peut être attribuée à la présence des pourcentages élevés des monoterpènes oxygénés. Cependant, d'autres composés mineurs dans l'huile testée (tableau 8) tels que: terpinene-4 -ol.... peuvent donner lieu à une activité antifongique intéressante [Wang et al., 2005; Donman et al., 2008; Hu et al., 2012 ; Jordant et al., 2013].

L'activité antifongique décroît selon le type de fonctions chimiques :

hydrocarbures < éthers < cétones < aldéhydes < alcools < phénols [Hernandez Ochoa, 2005].

III.4. Evaluation de l'effet stabilisateur de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* dans les denrées alimentaires

III.4.1. Evaluation de la stabilité oxydative de l'huile de tournesol

Le traitement et la stabilisation des huiles végétales sont les facteurs critiques pour la qualité lors de la friture et au cours du stockage. L'oxydation est le principal mécanisme de dégradation des huiles entre 60 et 130°C en raison du contact plus intense avec l'oxygène et la présence de catalyseurs (comme des minéraux) [Gertz et Stier, 2011].

Maitriser l'oxydation est indispensable pour gérer l'évolution des systèmes biologiques dans leur complexité, en particulier dans le cas des aliments dont la dégradation peut avoir des conséquences indésirables en sécurité alimentaire. Ainsi, la lutte contre l'oxydation des denrées alimentaires au cours de leurs transformations technologiques, du stockage et de la distribution s'impose. Parmi les diverses solutions technologiques possibles, l'addition d'agents antioxydants aux huiles et aux aliments riches en lipides qui est pratiquée depuis forts longtemps. Toutefois, les antioxydants synthétiques comme le butylhydroxytoluène (BHT) et le butylhydroxyanisole (BHA) ont des effets négatifs sur la santé humaine et sont facilement volatiles à haute température. L'ampleur de ce problème a fait que les antioxydants naturels deviennent de plus en plus recommandés pour remplacer les antioxydants synthétiques [Kahouli, 2010].

La possibilité d'utilisation des huiles essentielles, en tant qu'antioxydants, 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. Elles doivent être résistantes aux processus technologiques et stables dans le produit fini [Himed et Barkat, 2014].

L'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* contient des principes actifs doués d'une propriété antioxydante (test *in vitro*). Cette huile mérite une attention particulière par son valorisation en tant qu'un antioxydant naturel dans les huiles végétales. Dans ce travail, cette valorisation s'est réalisée grâce à son incorporation dans l'huile de tournesol pour diminuer l'oxydation de cette dernière en condition de chauffage.

Nous avons testé la capacité antioxydante de l'huile essentielle de d'*Artemisia herba alba* dans l'huile de Tournesol et nous avons procédé à une comparaison avec un antioxydant de référence qui est l' α -Tocophérol. L'huile végétale est chauffée à 180°C pendant 1 heure. Un suivi de l'indice de peroxyde et de l'absorbance spécifique en rayonnement ultra-violet de l'huile de tournesol, en fonction du temps et pendant 15 jours de conservation en présence de l'huile essentielle à des doses de 0.02, 0.04, 0.06 et 0.08 g, a été effectué. La comparaison avec l' α -Tocophérol a été effectuée aux mêmes concentrations et dans les mêmes conditions.

III.4.1.1. Indice de peroxyde

Les peroxydes, ou les radicaux libres, sont des molécules chimiques comportant un ou plusieurs atomes d'oxygène possédant un électron célibataire (R-O-O-R').

L'indice de peroxyde est une mesure largement utilisée pour mesurer la quantité des peroxydes formés dans les graisses et les huiles lors de l'oxydation [Ozkan et al., 2007].

C'est l'une des méthodes classiques et normalisées correspond au titrage iodométrique. En milieu acide, les hydroperoxydes (réaction A) et les ROOR (réaction B) réagissent avec l'ion iodure, pour générer de l'iode qui est titré par une solution de thiosulfate de sodium en présence d'empois d'amidon (réaction C).



L'indice de peroxyde (IP) est alors défini comme étant la quantité d'oxygène actif, exprimée en mg, contenue dans 1 g de corps gras et susceptible d'oxyder l'iodure de potassium avec libération d'iode. L'IP atteindra un maximum durant la phase de propagation, puis diminuera lors de la phase de terminaison [Laguerre et al., 2007].

Les valeurs de l'indice de peroxyde des différents échantillons de l'huile de tournesol en présence de différentes doses de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* et de l' α -Tocophérol sont reportés sur les figures 33 et 34.

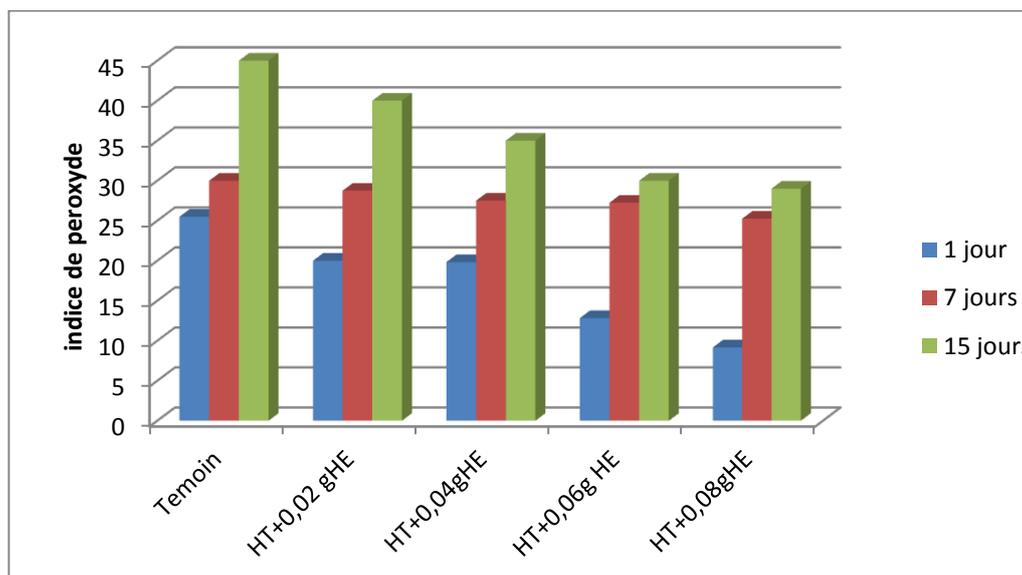


Figure 33: Evolution de l'indice de peroxyde (en meq d'O2/Kg) dans l'huile de tournesol chauffée en présence de différentes doses de l'huile essentielle

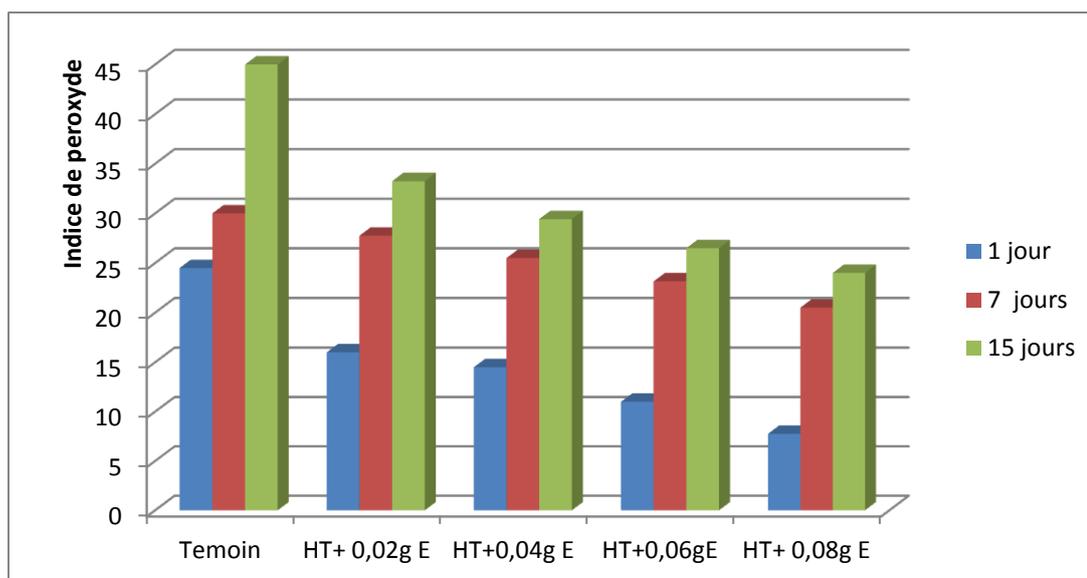


Figure 34: Variation de l'indice de peroxyde (en meq d'O₂/Kg) dans l'huile de tournesol chauffée en présence de différentes doses de α tocophérol.

Une augmentation remarquable de l'indice de peroxyde est constatée dans l'huile de tournesol témoin sous l'effet du traitement thermique. L'huile de tournesol témoin, avant le traitement thermique, possède un indice de peroxyde de 6 meq/kg. Cette valeur passe à 24.5 meq/kg après le traitement thermique à 180°C. Il semble qu'il-y-a un début d'oxydation très fort après ce traitement. Donc, l'huile de tournesol devient très fragile et ne peut pas supporter le traitement thermique.

En comparaison avec le témoin, nous remarquons que les autres échantillons additionnés de l'H.E. représentent un indice de peroxyde plus réduit au 1^{er} jour malgré le traitement thermique. Il semble donc qu'ils sont mieux protégés que le témoin contre l'oxydation.

Durant la période de stockage, nous avons remarqué une augmentation de l'indice de peroxyde dans tous les échantillons. Cependant, les valeurs de l'indice de peroxyde des échantillons additionnés de différentes doses de l'H.E. d'*Artemisia herba alba* restent toujours inférieures à celui du témoin stocké dans les mêmes conditions. Il est aussi très intéressant de remarquer un phénomène très particulier concernant la période de stockage, plus la dose de l'huile essentielle augmente, plus la différence entre les valeurs du 7^{ème} et 15^{ème} jour diminue, donnant ainsi l'impression d'une certaine stabilité à long terme contre l'oxydation.

De manière générale, l'oxydation plus marquée dans le cas du témoin par rapport aux autres échantillons explique l'effet stabilisateur de l'H.E. d'A. *herba alba*.

Il est clair que l'H.E. d'A. *herba alba* a un effet sur l'oxydation par la capacité antiradicalaire et réductrice (tests de DPPH et de *FRAP*) que possède les terpènes oxygénés qu'elle contient, c'est pourquoi on observe une réduction de l'indice de peroxydes des échantillons auxquels elle a été incorporée.

Par comparaison avec un antioxydant de référence, qui est le tocophérol, l'effet antioxydant de l'huile essentielle ressemble à celui de l'antioxydant de synthèse, une diminution de peroxydes en 1^{er} jour après traitements thermiques, qui signifie une protection contre les chocs thermiques, et aussi une réduction des valeurs entre le 7^{ème} et le 15^{ème} jour qui signifie une stabilité à long terme. Mais l'effet de l' α -tocophérol est beaucoup plus remarquable avec un indice de peroxyde à la fin de la durée de conservation égale à 24 meq/Kg pour la dose de 0.08 g. Les tocophérols ont pour rôle principale de piéger les radicaux alkoxyles et inhibe la décomposition des hydroperoxydes ce qui diminue la formation des aldéhydes [Ohshima, 2003; Kahouli, 2010].

Là aussi, dans ce cas comparatif, nous sommes amené à signaler que l' α -tocophérol est une substance pure alors que l'huile essentielle employée contient des concentrations limitées d'une ou d'un ensemble de substances ayant cet effet stabilisateur. Ceci peut nous invité à penser que si la substance antioxydante contenue dans l'huile essentielle de l'A. *herba alba* sera extraite et purifiée, elle doit avoir une efficacité extraordinaire à très faibles doses!

Le traitement statistique des résultats obtenus par l'analyse de la variance (Annexe 3), montre une différence hautement significative entre les échantillons car le F calculé qui est de 12.27 est supérieur au F théorique 3.88 à un risque de 1%. En se référant à l'analyse statistique, on peut suggérer que l'H.E. d'A. *herba alba* exerce une influence très significative sur la teneur en peroxyde de l'huile de tournesol.

En définitive, nous pouvons dire que l'indice de peroxyde représente un des paramètres de qualité des huiles, mais ne peut être un indicateur seul de la stabilité oxydative de l'huile végétale. Il faut donc surveiller son comportement et suivre son aboutissement vers les réactions d'arrêt

Donc, pour voir plus clair sur le comportement de l'huile de tournesol concernant l'indice de peroxyde, provenance et devenir des peroxydes, des analyses des autres substances

intermédiaires ou secondaires d'oxydation sont nécessaire pour ratifier les résultats obtenus de l'analyse de l'indice de peroxyde. Les diènes conjugués et triènes conjugués qui accompagnent la formation des peroxydes sont analysés dans la partie qui suit.

III.4.1.2. L'absorbance spécifique en rayonnement ultra violet

Cette absorbance spécifique nous renseigne sur les diènes conjugués et les triènes conjugués qui représentent une bonne mesure de l'état d'oxydation des huiles [Mc Ginely, 1991 in Raza et al., 2009].

L'analyse des diènes conjugués est une méthode rapide réalisée par mesure spectrophotométrique sur l'extrait lipidique dans l'hexane, le cyclohexane ou des alcools tels que l'éthanol, le méthanol ou l'isopropanol. La détermination de l'absorbance $E_{1\text{ cm}(\lambda)}^{1\%}$ à 225 nm ou au voisinage de 320 nm permet la détection et éventuellement le dosage des acides gras conjugués ou des produits d'oxydation conjugués présents dans les corps gras [AFNOR, 1988].

Les diènes conjugués, produits primaires de l'oxydation des lipides se forment par réarrangement des doubles liaisons du radical lipoylé des acides gras polyinsaturés (par exemple l'hydroperoxyde linoléique) [Eymard, 2003].

La figure 35, illustre l'évolution des diènes conjugués dans l'huile de tournesol en présence de différentes doses de l'HE et de l' α tocophérol.

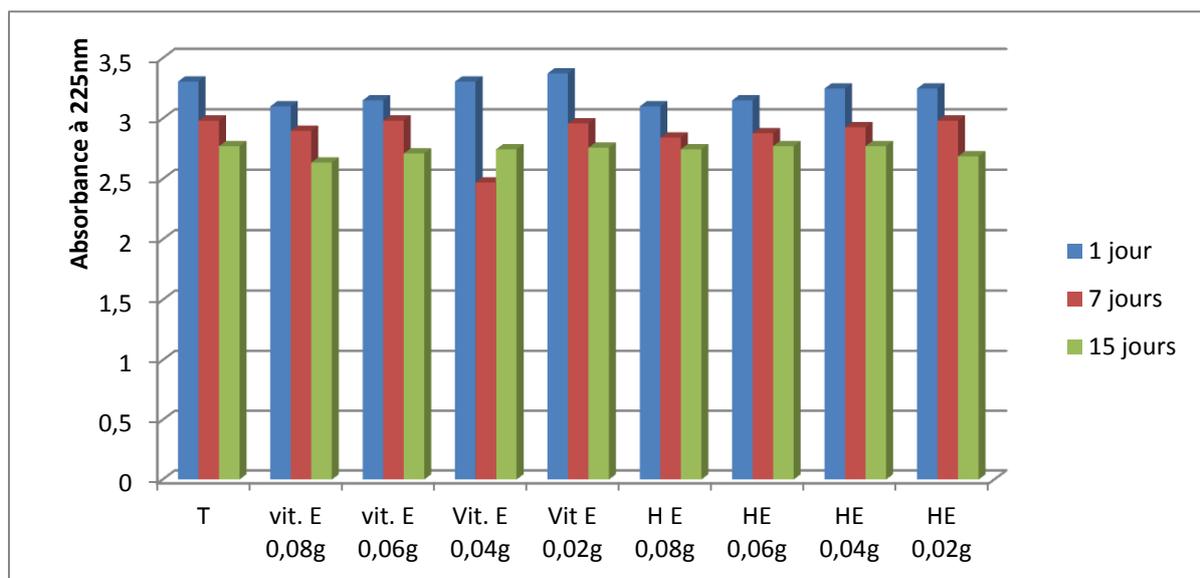


Figure 35: Evolution des diènes conjugués dans les échantillons de l'huile de tournesol additionnés de différentes doses de l'huile essentielle et de l' α tocophérol.

L'analyse des résultats obtenus montre une évolution des diènes conjugués dans tous les échantillons traités ainsi que dans celui du témoin durant toute la période de stockage.

La dégradation la plus importante a été observée dans le témoin. La forte présence des diènes conjugués traduit une forte oxydation de cette huile. Ces résultats confirment ceux obtenus par la détermination de l'indice de peroxyde. Il faut rappeler que les diènes conjugués sont des substances intermédiaires, de passage, leur diminution signifie leur continuation vers les réactions d'arrêt si l'huile n'est pas protégée, et se sont ces réactions d'arrêt qui affectent réellement la qualité de l'huile (rancissement).

Les échantillons additionnés de 0.08 g et 0.06 g de l'huile essentielle et de l' α tocophérol présentent une quantité de diènes conjugués inférieure à celle du témoin indiquant ainsi et certainement une protection de l'huile de tournesol par ces additifs.

L'absorbance à 225 nm diminue avec la durée de stockage dans tous les échantillons montrant que les diènes conjugués sont utilisés dans les réactions d'arrêts.

Nous remarquons aussi d'après l'étude statistique (Annexe 3) que la variation des quantités de diènes conjugués est significative dans tous les échantillons.

L'évolution des composés secondaires d'oxydation dans tous les échantillons par la mesure de l'absorbance à 320 nm connaît la même tendance que celle des diènes conjugués (Figure 36). En effet, plus l'absorbance à 320 nm est forte, plus l'huile est riche en substances secondaires.

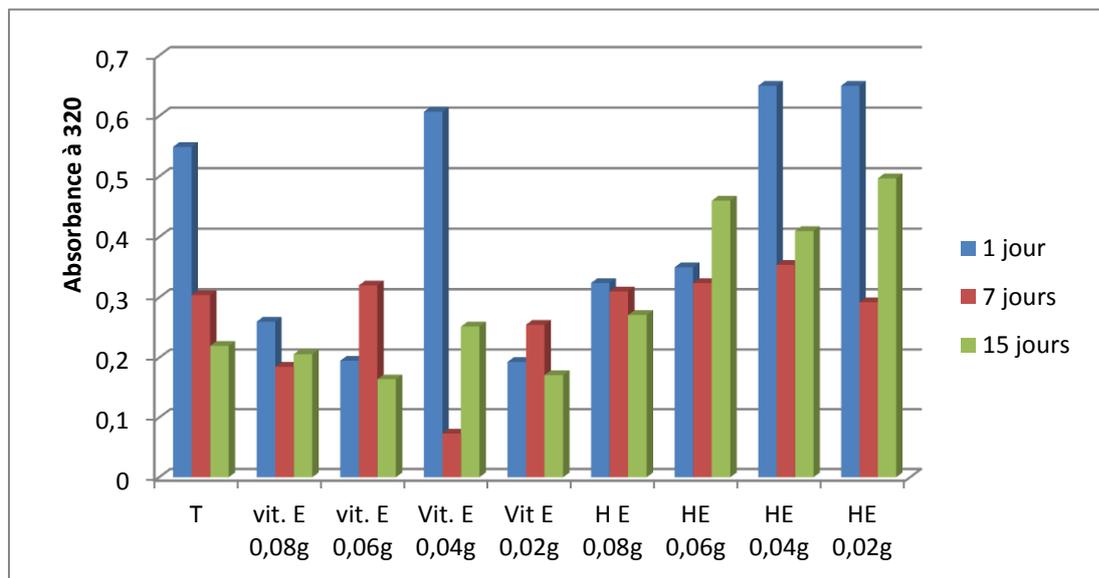


Figure 36: Evolution des triènes conjugués dans les échantillons de l'huile de tournesol additionnés de différentes doses de l'huile essentielle et de l' α tocophérol.

L'étude de l'état oxydatif de l'huile de tournesol en présence de l'huile essentielle d'*A. herba alba* par la mesure de l'indice de peroxyde et l'absorbance de la lumière ultraviolette à 225 nm et 320 nm permet d'affirmer que l'huile essentielle testée possède une capacité antioxydante intéressante.

III.4.2. Etude de l'effet antimicrobien de l'huile essentielle d'*A. herba alba* dans la viande hachée

Plusieurs rapports sur l'efficacité antimicrobienne des huiles essentielles dans les aliments suggèrent que l'utilisation de ces huiles peut améliorer la sécurité alimentaire.

Skandamis et al (2001) ont constaté que l'origan à inhiber la croissance des microorganismes d'altération dans la viande hachée. Toutefois, l'application pratique des huiles essentielle dans les aliments est limitée parce que leur efficacité est modérée en raison des interactions avec les ingrédients alimentaires et la sécurité de l'aliment. Cette efficacité

limitée est causée aussi par l'application des doses très limitées des huiles essentielles, pour ne pas affecter les caractéristiques organoleptiques de l'aliment (odeur et arôme).

En se référant aux signes d'altérations des viandes et selon nos remarques visuelles au cours de notre expérimentation, nous avons observé un changement de couleur, présence d'odeur et exsudat qui sont plus réduits avec la présence de l'huile essentielle.

Au cours de la conservation, la couleur de la viande dépend de deux composantes qui peuvent modifier la teinte du produit:

- L'état chimique de la myoglobine: la myoglobine réduite (rouge pourpre), l'oxymyoglobine (rouge vif), qui est la teinte recherchée par le consommateur, et la metmyoglobine (couleur marron) (figure 37);
- Le développement des bactéries en surface de la viande et ses interactions possibles avec la forme chimique du pigment [Denoyelle, 2012].

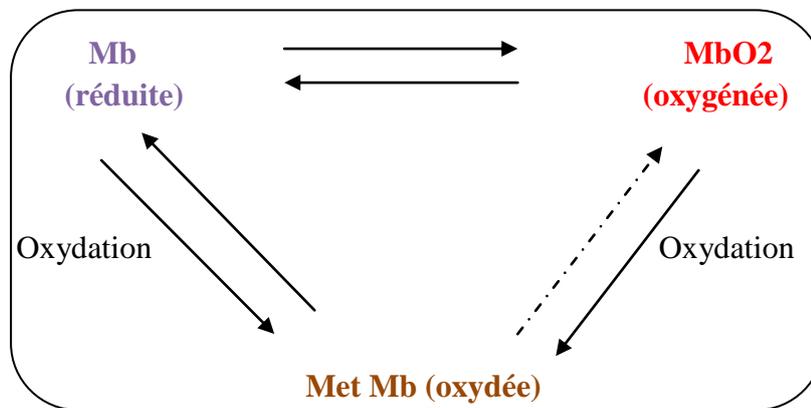


Figure 37: Les trois formes chimiques de la myoglobine [Denoyelle, 2012]

L'oxydation de myoglobine en metmyoglobine altère la couleur des viandes, sa présence se manifeste par des taches brunes à la surface de la viande.

Nous avons remarqué que l'altération de la couleur était plus prononcée dans la viande hachée témoin par rapport aux autres échantillons additionnés de l'huile essentielle (photo 8), ce qui témoigne d'un effet antioxydant et stabilisateur de cette l'huile.

Effectivement, l'étude de la composition chimique de l'huile essentielle d'*A. herba alba* (tableau 8) indique que cette huile contient des substances actives douées d'une capacité antioxydante. Donc, huile peut être à l'origine de la réduction du mécanisme d'oxydation de la myoglobine.

Ces résultats sont en accord avec ceux de **Lopes Lutz et al. (2008)**, qui ont indiqué que certaines espèces d'*Artemisia* sont ajoutées à la viande et les produits de volaille pour prévenir ou ralentir la dégradation par oxydation.



(a)

(b)

(c)

Photo 7: Effet de l'huile essentielle sur l'aspect visuelle des échantillons de viande hachée (a: témoin, b: Viande + 5µL HE ; c: Viande + 20µL HE)

L'évaluation microbiologique a porté sur l'appréciation de l'effet de l'huile essentielle sur la contamination totale de la viande hachée par le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale, les coliformes fécaux ainsi que la recherche des germes pathogènes responsables de l'altération des viandes hachées (Planches 6, 7, annexe 2).

L'analyse des données expérimentales montre que comparativement au témoin de contrôle de croissance, il y a une diminution de l'altération microbienne dans les échantillons contenant l'huile essentielle.

❖ La flore aérobie mésophile totale

D'après les résultats obtenus, on a remarqué un développement intense de la flore totale mésophile dans la viande hachée témoin. Cependant, la présence de l'HE semble avoir un effet très remarquable sur le taux de ces germes, car son nombre diminue de façon claire avec l'augmentation de la dose de l'HE. Les résultats affichent des taux de 7.9×10^7 et 1.6×10^7 germe/g avec les doses 5µl et 20µl après 6 jours de stockage à la température ambiante.

❖ Les coliformes

Leur nombre peut constituer un bon indice de qualité hygiénique d'un aliment. *E coli* est considéré comme un bon indicateur de contamination fécale pour les produits crus; dans les autres cas, il s'agit d'un indicateur d'hygiène générale [Guiraud, 2003].

On a enregistré un taux élevé dans la viande hachée témoin, mais pour leur dénombrement dans les échantillons additionnés de l'huile essentielle, il y a une réduction remarquable du nombre de ces germes surtout pour la dose de 20µl (tableau 11).

❖ Les germes pathogènes

En ce qui concerne les germes pathogène, on a essayé de chercher certains germes tels de *Staphylococcus aureus* et les anaérobies sulfito-réducteurs qui sont obligatoirement recherchées dans la viande.

La présence des Staphylocoques dans la viande et les produits à base de viande indique une contamination lors de l'abattage, le découpage, le hachage.....Nos résultats obtenus indiquent que ces germes sont absents dans tous les échantillons.

La recherche des anaérobies sulfito-réducteurs est nécessaire pour déterminer la qualité hygiénique d'un aliment. Les résultats montrent la présence de ces germes dans tous les échantillons, dont les taux sont variables entre eux. Ainsi, ce taux à tendance à diminuer parallèlement en fonction de la dose utilisée de l'huile essentielle, plus la dose est importante plus il y a augmentation de l'efficacité inhibitrice de cette huile (Planche 6, annexe 2).

En conclusion, les charges microbiennes enregistrées au niveau de la viande hachée et le changement de son aspect, sont assez importants dans le témoin par rapport aux autres échantillons additionnés de l'huile essentielle. Cela nous permet de dire que les substances actives contenues dans l'huile essentielle testée sont responsables des ces effets protecteurs contre l'altération de la viande hachée.

Tableau 11: Examen macroscopie des colonies ayant poussées sur les différents milieux de culture

	Milieux de culture	Aspect macroscopique des colonies			Bactéries recherchées
		Témoin	5µl H.E	20µl H.E	
Milieux non sélectifs	PCA	colonies de différentes tailles (petite, moyenne et grande) et de différentes couleurs (marron foncé, marron clair et blanc crème), à bord régulier et irrégulier (annexe 2).	colonies de différentes tailles, de couleur blanc crème.	colonies de différente taille et de couleur marron et blanc crème, à bord régulier et irrégulier.	FTAM (Flore Totale aérobie mésophile)
	BCP	colonies de petite taille, jaunâtres et bleuâtres.	colonies de taille moyenne et de couleur bleue.	Absence totale des colonies (aucune colonie n'est observée).	Colonies jaunes : suspecte d' <i>E.coli</i> . Colonies bleus : susception de <i>Salmonella sp.</i>
Milieux sélectifs	Hecktoen	Colonies saumonées et verte de taille moyenne.	Quelques colonies jaunes saumonées et vertes.	02 colonies vertes de grande taille.	Colonies jaune saumonées : suspecte d' <i>E.coli</i> . Colonies verte
	Chapman	Nappe de colonies de petite taille, de couleur blanc crème. Aucune colonie de la bactérie recherchée, <i>Staphylococcus aureus</i> , n'est observée.	Aucune colonie n'est observée sur la surface de la gélose.	Aucune colonie n'est observée sur la surface de la gélose.	Colonies blanc crème : <i>Streptococcus sp.</i> Colonies dorées : <i>S. aureus</i> .
	V.F	Noircissement totale de la gélose.	Présence de noircissement dans quelques parties de la gélose.	02 colonies noires et de petites tailles.	Colonies à centre noires : suspecte de <i>Clostridium sp.</i>

III.4.2.1. Identification d'*Escherichia coli*

Les tests biochimiques permettent de connaître certaines caractéristiques du métabolisme de la bactérie analysée.

Les résultats obtenus confirment que la souche isolée sur milieu Hecktoen est l'espèce *Escherichia coli* (tableau 12)

Tableau 12: résultats d'identification de la souche *E coli* isolée sur milieu Hecktoen

Caractères	résultat
Mobilité	mobile
Coloration de Gram	Bacille, Gram ⁻
Oxydases	-
Etude de la voie d'attaque du glucose	+
Fermentation du lactose	+
Utilisation du saccharose	-
Production de gaz	+
Production H ₂ S	-
Dégradation de l'urée	-
Production d'Indole	+
Dégradation du mannitol	+
Utilisation du citrate	-

Conclusion générale

L'armoise blanche « *Artemisia herba alba* » est une plante médicinale et aromatique, utilisée depuis longtemps dans la médecine traditionnelle algérienne, mais elle est exploitée à une échelle assez réduite, malgré ses effets biologiques potentiels.

Le présent travail est axé sur la recherche des substances naturelles qui par leur activités antioxydantes et antimicrobiennes pourraient être utilisées pour la conservation des aliments et la protection des plantes.

Cette étude réalisée sur la partie aérienne de l'armoise blanche, récoltée dans la région de Saida à l'interface Tell-Steppe, a pour but de déterminer la qualité physico-chimique de son huile essentielle extraite par hydrodistillation et de mettre en évidence quelques propriétés biologiques de cette huile.

Après l'extraction, l'huile essentielle obtenue est de couleur jaune foncé avec une odeur forte et un aspect liquide. Le rendement en huile essentielle obtenu est de l'ordre de 0.932%.

A travers cette étude et d'après les résultats obtenus, l'huile essentielle de l'armoise blanche a montré, *in vitro*, des activités antioxydante et antimicrobienne intéressantes.

Les phénomènes d'altérations des aliments ne sont pas une préoccupation exclusive de l'industrie alimentaire, mais un risque commun où un lipide ou substrat organique périssable est présent !

Par le biais de ce travail, nous avons essayé d'exploiter les résultats obtenus sur les activités antioxydantes et antimicrobiennes de l'huile essentielle d'*A. herba alba* dans le domaine alimentaire. Le but de cette étude est d'augmenter la durée de vie et la stabilité des aliments.

Pour réaliser cet objectif, notre choix s'est porté sur des matrices alimentaires à savoir: l'huile de tournesol et la viande hachée.

Le suivi de l'état oxydatif de l'huile de tournesol chauffée en présence de l'huile essentielle testée, comme additif, a été évalué par l'analyse de quelques paramètres de qualité dont l'indice de peroxyde et l'absorbance spécifique en rayonnement ultra-violet à 225 nm et 320 nm.

Les résultats obtenus, nous ont montré que cette huile essentielle possède une capacité antioxydante intéressante qui peut être l'une des solutions les plus efficaces pour la stabilité des denrées alimentaires.

L'évaluation microbiologique a porté sur l'appréciation de l'effet de L'HE de l'armoise blanche sur l'altération totale de la viande hachée par le dénombrement des flores indicatrices de la qualité sanitaire et la recherche des bactéries responsables de toxi-infection alimentaire. Dans l'ensemble, cette huile testée s'est révélée très efficace et les résultats obtenus sont prometteurs et ouvrent de nouvelles perspectives dans le domaine des applications naturelles qui peuvent être une alternative valable pour remplacer les produits chimiques.

L'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* s'est montrée biologiquement active. De ce fait, les composés responsables de ces propriétés biologiques pourraient servir de principes actifs dans la formulation des conservateurs naturels dans les industries alimentaires et des biopesticides.

En fin, si l'armoise blanche est considérée comme matière pleine de substances médicinales et nutritionnelles (plante fourragère), elle est aussi une source des substances qui possèdent des effets remarquables sur le plan biologique. Nous pouvons prédire avec discrétion que quels que soient les travaux de recherche et les efforts entrepris dans ce sens, ils restent toujours insuffisants pour arriver à déchiffrer, à saisir et à bénéficier totalement de toutes les vertus et les qualités que représentent les plantes médicinales steppiques, parmi lesquelles on trouve une plante légendaire et historique dont l'utilisation est très bien conservée dans nos traditions à travers des générations, cette mythique plante c'est la fameuse armoise blanche « Artemisia herba alba ».

Références bibliographiques



- **Abad M.J., Bedoya L.M., Apaza L. and Bermejo P. 2012:** The *Artemisia L.* Genus: A review of bioactive essential oil. *Molecule*; 17: 2542-2566.
- **Abdelguerfi A., 2003:** Evaluation des besoins en matières de renforcement des capacités nécessaires à la conservation et l'utilisation durable de la biodiversité importante pour l'agriculture. Rapport de synthèse. Projet ALG/97/G31, 2003.
- **Abid Z.B., Fekir M., Hédhili A., and Hamdaoui M.H., 2007:** *Artemisia herba alba* Asso (Asteraceae) has equivalent effects to green and black tea decoctions on antioxydant processes and some metabolic parameters in rats. *Ann. Natr. Metab* ; 51 (3): 216-222.
- **AFNOR, 1986:** Huiles essentielles. Recueil de normes françaises. Edition Tec&Doc Lavoisier. 2^e édition.
- **AFNOR, 1988:** Corps gras, graines, oléagineuses, produits dérivés. 4^e édition. ISDN.
- **Afssaps, 2003:** Recommandations relatifs aux critères de qualité des huiles essentielles.
- **Afssaps, 2008:** Recommandations relatifs aux critères de qualité des huiles essentielles.
- **Ait Kaki A., 2014:** Recherche de nouvelles potentialités de bactéries du genres *Bacillus* pour l'agriculture et l'agroalimentaire. Thèse de doctorat. Université de Constantine1.
- **Akrout A., El-Janil H., Amouri S. et Neffati M., 2010:** Screening of antiradical and antibacterial activities of essential oils of *Artemisia campestris L.*, *Artemisia herba alba* Asso, & *thymus capitatus Hoff.* and *Link* Growing wild in the southern of Tunisia. *Rec Res Sci Tech* 2: 29-39.
- **Alais C., Linden G. et Miclo L., 2008:** Biochimie alimentaire 6^e édition de l'abrégé. Edition DUNOD. Pp 69-71 ; 231-238.
- **Almadi f., Sadeghi S., Madarresi M., Abiri R and Mikacli A., 2010:** Chemical composition, in vitro, antimicrobial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanolic extract of *Hymenocrater longiflorus Benth* of Iran. *Food and chemical toxicology* 48: 1137-1144.

- **Amarti F., El Ajjouri M., Ghanmi M., Satrani B., Aafi A., Farah A., Khia A., Guedira A., Rahouti M. et Chaouch A., 2011:** Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc. Phytothérapie. DOI 10.1007/s10298-011-0625-6.
- **Amhis W., Benslimane A., Tiout D. et Naim M., 2001:** Tests de sensibilité utiles au traitement antibiotique. *Médecine du Maghreb* n°91.
- **Apfelbaum M., Romon M. et Dubus M., 2009:** Diététique et nutrition. Edition Masson. 7^e édition. Pp. 326-330.
- **Arulpriya P., Lalith P. et Hemalatha S., 2010:** In vitro antioxidant testing of the extract of *Samanea saman* (Jacq.) Merr. *Der Chemica Sinica*. 1(2): 73-79
- **Assous M.V., Anne-lise B.G., Bourhy H., Dhote R. et Pougan a., 1999:** Microbiologie et pathologie infectueuse. 2^e édition américaine. Pp: 874, 918-920.
- **Ayad N., Djennane A., Ayache H. et Hellal B., 2013:** Contribution à l'étude de l'implantation de l'armoise blanche «*Artemisia herba alba* Asso» dans la steppe du sud de Tlemcen. *Revue Ecologie- Environnement*. (9).
- **Ayad N., Hellal B., Hellal T., Rahmani A. et Bensmira Z., 2014:** Qualités nutritionnelles de l'armoise blanche des parcours steppiques du sud de la préfecture de Tlemcen. *Revue Ecologie-Environnement* (10) ; Pp. 71-74

B

- **Baba Aissa F., 2000:** Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb. Substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident. Edition librairie moderne. Rouiba.
- **Barthe c., Cardinal P. et Desroches F.P., 2003:** Lignes directrices pour l'interprétation des résultats analytiques en microbiologie alimentaire. Le Centre Québécois d'inspection des aliments et de santé animale du ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation. 52 pages.
- **Bauer W.J., Badoud R., Löliger J et Eturnaud A., 2010:** Science et technologie des aliments. Principes de chimie des constituants et de technologie des procédés. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes. Pages: 698.
- **Beddou F., 2015:** Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex vesicarius* L. et *Anvillea radiata* Coss et Dur. Thèse de Doctorat. Université de Tlemcen

- **Belhattab R., Amor L., Barroso J.G., Pedro L.G. et Figueiredo A.C., 2012:** Essential oil from *Artemisia herba-alba* Asso grown wild in Algeria: Variability assessment and comparison with an updated literature survey. *Arabian Journal of Chemistry*
- **Benchaqroun H.K., Ghanami M., Satrani B., Aafi A., Chaouch A., 2012:** Antimicrobial activity of the essential oil of an endemic plant in Morocco, *Artemisia mesatlantica*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 81: 4-21.
- **Benjilali B. et Richard H., 1980:** Etude de quelques peuplements d'Armoise blanche du Maroc « *Artemisia herba alba* ». *Rivista Italiana E.P.P.O.S.* n°2. Pp. 69-74.
- **Benjilali B., Tantaoui-Elaraki A., Ismaïli Alaoui M. et Ayadi a., 1986:** Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes médicinales et phytothérapie*. Tome XX, n°2. Pp. 155-167.
- **Berset C., 2006:** Les poly phénols en agroalimentaire. Chapitre 8: Les antioxydants phénoliques –structure, propriétés, sources végétales. Edition Tec&Doc Lavoisier. Pp265-273.
- **Bezza L., Mannarino A., Fattarsi K., Mikail C., Abou L., HadjMinaglon F. et Kaloustian J., 2010:** Chemical composition of the essential oil of *Artemisia herba alba* from the region of Biskra (Algeria). *Phytotherapy* , 8: 277-281.
- **Blaskara Reddy M.V., Angers P., Gosselin A. and Arul J., 1998:** Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. *Phytochemistry*; Vol.47 (8): 1515-1520.
- **Bonnefoy G., Guillet F., Leyral G. et Verne-Bourdais E., 2002:** Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires. Edition doin. 247 pages.
- **Bonnet R., Caron F., Cavallo J.D., chardon H., Chidiac C., Courvalin P., Drugeon H., Dubreuil L., Jarlier V., Jarlier V., Jehl F., Lambert T., Leclercq R., Nicolas-Chanoine M.H., Plesiat P., Ploy M.C., Quentin C., Soussy C.j., Varon E., et Weber P., 2012 :** Concentrations et diamètres critiques pour les diverses classes d'antibiotiques. Société française de microbiologie. Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie
- **Botineau M., 2010:** Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Edition Tec&Doc Lavoisier. Pp. 1143-1193.

- **Bouhdid S, Skali S.N., Idaomar M., Zhiri A., Baudoux D., Amensour M. et Abrini J., 2008:** Antibacterial and antioxidant activities of *Origanum compactum* essential oil. African Journal of Biotechnology Vol. 7 (10), pp. 1563-1570.
- **Boukhatem M., Hamaidi M., Saidi F. et Hakim y., 2010:** Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du géranium rosat « *Pelargonium graveolens* » cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). Nature et technologie. Vol n°3.p.41.
- **Boullard B. 2001:** Plantes médicinales du monde. Réalités et croyances. Dictionnaire. Edition ESTEM. Pp. 129-131
- **Bourkhiss M., Hnach M., Paolini J., Costa J., Farah A. et Satrani B., 2010:** Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles des différentes parties de *tetraclinis articulata* (vahl) masters du Maroc. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège; Vol. 79, 141 – 154.
- **Bouzidi N., 2001:** Essai d'intégration des données de l'inventaire écologique et pastoral dans une base de données en zone semi-aride du Nord-Ouest de l'Algérie. Cas de la région de Saida. Mémoire de Magister. Centre universitaire de Mascara.
- **Bruneton J., 2005:** Plantes toxiques. Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. Edition Tec&Doc Lavoisier. 3^e édition. Pp. 83-85.
- **Burits M., Asers K. et Bucar F., 2001:** The antioxidant activity of the essential oils of *Artemisia afra*, *Artemisia abyssinica* and *Juniperus procera*. Phytotherapy research 15: 103-108.
- **Burt S., 2004:** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. International Journal of Food Microbiology 1: 94(3): 223-253.

C

- **Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P.W., Castillejos L. and Ferret A., 2007:** Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation .Dairy Sci ; 90: 2580-2595.
- **Catier O. et Roux D., 2007:** Botanique, pharmacognosie, phytothérapie. 3eme édition. Cahiers du préparateur en pharmacie. Ed. ISBN. Wolters Kluwer. Pp. 77-79/81-82.

- **Chang H.Y., Ho Y.L., Sheu M.J., Lin Y.H., Tseng M.C., Wu S.H., Huang G.J, et Chang Y.S., 2007:** Antioxidant and free radical scavenging activities of *Phellinus merrillii* extracts. *Botanical Studies* 48: 407-417.
- **Chebli B., Achouri M., Idrissi Hassani M. et Hmamouchi M., 2003:** Antifungal activity of essential oils from several medicinal plants against four postharvest *Citrus* pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*. Vol. 42, N 0.3.
- **Codex alimentarius, 2013:** Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires. Comité du codex sur les graisses et les huiles . 23 Session. Malaisie
- **Cook R. et Baker K.F., 1983:** The nature and practice of biological control of plant pathogens. *The APS. St. Paul. Minnesota*, pp: 539.
- **Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R. et Wyllie S.G., 2000:** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88: 170–175.
- **Cuvelier M.E. et Maillard M.N., 2012:** Stabilité des huiles alimentaires au cours de leur stockage. *OCL* ; 19 (2): 125-132.

D

- **Daroui M.H., 2012:** Etude phytochimique et biologique des espèces *Eucalyptus globulus* (*Myrtaceae*), *Smyrniolum olusatrum* (*Apiaceae*), *Asteriscus maritimus* et *Chrysanthemum trifurcatum* (*Asteraceae*). Thèse de doctorat. Université de Annaba.
- **Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E. et Quentin R., 2007:** Bactériologie médicale. Technique usuelles. Edition Elsevier Masson. Pp. 543-548.
- **Denoyelle C., 2012 :** La couleur des aliments de la théorie à la pratique. Exemple d'application au domaine de la viande. Edition Lavoisier Tec&Doc. Pp : 71-74
- **Djebaili S., Djellouli Y. et Daget P., 1989:** Les steppes pâturées des Hauts Plateaux algériens. *Fourrages*, 120, Pp. 393-400
- **Dilmi-Bouras A., 2004:** Biochimie alimentaire. Edition office des publications universitaire. Pp 69-91.
- **Degryse A.C., Delpha I. et Voinier M.A., 2008:** Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. E.H.E.S.P.
- **Djenane D., Yanguela J., Deriche F., Bouarab L. et Roncales P., 2012:** Utilisation des composés de feuilles d'olivier comme agents antimicrobiens ; application pour la conservation de la viande fraîche de dinde. *Nature et technologie* n°7, 53-61.

- **Dohou N., Yammi K., Badoc A. et Douira A., 2004:** Activité antifongique d'extraits de *Thymelaea lythroides* sur trois champignons pathogènes du riz. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 143, 31-38.
- **Dorman H.J.D. and Deans S.G., 2000:** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology; 88: 308-316.
- **Doumbouya M., Abo k., Lepengue A.N., Camara B., Kanko K., Aidara D. et Kone D., 2012:** Activités comparées in vitro de deux fongicides de synthèse et de deux huiles essentielles, sur des champignons telluriques des cultures maraichères en Côte d'Ivoire. J. Appl. Biosciences ; 50: 3520-3532.
- **Dupin H., Cuq J.L., Malewiak M.I. Leynaud-Rouand C. et Berthier A.M., 1992:** Alimentation et nutrition humaine. Edition ESF. Pp70-74, 162-163.
- **Duraffourd C. et Lapraz J.C., 2002:** Traité de phytothérapie clinique : Médecine et endobiogénie. Edition Masson.
- **Durand D., Gahellier P. et Parafita E., 2010:** Muscle et viande de ruminant. Chapitre 14 : stabilité oxydative et qualité des viandes. Edition Quae. Pp : 183-186
- **Duru M. E., Cakir a., Kordali S., Zengin H., Harmandar M., Izumi S. and Hirata T., 2003:** Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three Pistacia species. Fitoterapia; 74: 170-176.
- **Dussault D., Dang V.K., Lacroix M., 2014 :** In vitro evaluation of antimicrobial activities of various commercial essential oils, oleoresin and pure compounds against food pathogens and application in ham. Meat science; 96: 514-520.

E

- **El Abed D. et Kambouche N., 2003:** Les huiles essentielles. Edition Dar el Gharb.
- **El Aoufir A., 2001:** Etude du flétrissement vasculaire du pois chiche (*Cicer arietenum*) causé par le *Fusarium oxysporum f.sp. ciceri*. Evaluation de la fiabilité de l'analyse isoenzymatique et de la compatibilité végétative pour la caractérisation des races physiologiques. Pp : 1.13. Thèse de doctorat. Université Laval. Quebec.
- **El Badawy M. E. I. and Abdelgaleil S. A. M., 2014:** Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. Industrial crops and products; 52: 776 – 782.

- **El Kalamouni C., 2010:** Caractérisation chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse.
- **El-Massry K.F., El-Ghorab A.H. et Farouk A., 2002:** Antioxidant activity and volatile components of Egyptian *Artemisia judaica* L. Food Chemistry 79, 331–336
- **Eymard S., 2003:** Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du chinchard (*Trachurus trachurus*) : choix des procédés. Thèse de Doctorat. Ecole polytechnique de l'Université de Nantes. Pp 64-66.

F

- **Fauchère J.L. et Avril J.L., 2002:** Bactériologie générale et dédiée. Ed. Ellipses. Pp: 141-325.
- **Feurer C., Christieans S., Rivollier M., Leroy S et Talon R., 2013:** Flores protectrices pour la conservation des aliments. Chapitre 4 : Application dans la filière des produits carnés. Edition Quae. Pp.69-78.
- **Friedman M., Hemika P. R. and Mandrell R. E., 2002:** Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. Journal of food protection, vol 65 (10): 1545-1560.

G

- **Gaussen H., Leroy J. F. et Ozenda P., 1982:** Précis de botanique. Tome II. Végétaux supérieurs. Edition Masson. 2^e édition. Pp. 424-426.
- **Genot C. et Michalski M.C., 2010:** Impact métabolique des structures et de l'oxydation des lipides dans les aliments. Innovation agronomique ; 10: 43-67.
- **Gertz C. et Stier R., 2011:** 6th international symposium on deep-frying-Errors and Myths of industrial an catering frying. Hagen, Germany.
- **Ghrabi Z and Al-Rowaily S.L.R., 2005:** A guide to medicinal plants in North Africa. Produced by: International Union for conservation of Nature and Natural Resources. Pp: 43-44
- **Guignard J.L., 1998:** Abrégés botanique. 11^e édition. Edition Masson. Pp.49-205.
- **Guiraud J.P., 2003:** Microbiologie alimentaire. Ed. DUNOD.

H

- **Harkati B., 2011:** Valorisation et identification structurale des principes actifs de la plante de la famille Asteraceae: *Scorzonera undulata*. Thèse de Doctorat. Université de Constantine.
- **Hernandez Ochoa L.R., 2005:** Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combine « solavnat/actif » d'origine végétale. Thèse de doctorat. Institut national polytechnique de Toulouse.
- **Himed L. et Barkat M., 2014:** Élaboration d'une nouvelle margarine additionnée des huiles essentielles de Citrus limon. OCL 21(1) A102
- **Hirasa K. et Takemasa M., 1998:** Spice science and technology. Marcel Dekker, Inc. New York, Pp 3-5.
- **Hu H., Zheng X. and Hu H., 2012:** Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of the essential oil from the leaves of *Acanthopanax leucorrhizus* (oliv.) Harms. Environmental toxicology and pharmacology; 34: 618-623.
- **Huang D., Ou B. et Prior R.L., 2005:** The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 1841-1856.
- **Hudaib M.H. et Aburjai T.A., 2006:** Composition of the essential oil from *Artemisia herba alba* grown in Jordan. Journal of essential oil research. Volume 18, Issue 3.Pp. 301-304
- **Hussain A.I., Anwar F., Shahid Chatha S.A., Jabbar A., Mahboob S. and Nigam P.S., 2010:** *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. Brazilian Journal of Microbiology 41, Pp.: 1070-1078

J

- **Jayanthi P. et Lalitha P., 2011:** Reducing power of the solvent extracts of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. Vol 3, Suppl 3, 126-128.
- **Jiang Y., Nan W., Fu Y.J., Wang W., Luo M., Zhao C.J., Zu Y.G. and Liu X.L., 2011:** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. Environmental Toxicology and Pharmacology. 32, 63-68.
- **JORA ; 035, 1998:** Arrêté interministériel du 25 Ramadhan 1419 correspondant au 24 janvier 1998 modifiant et complétant l'arrêté du 14 safar 1415 correspondant au 23

juillet 1994 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires p.7

- **Jordan J.M., Lax V., Rota M.C., Loran S. and Sotomayor J.A., 2013:** Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. Food control; 30: 436-468.

K

- **Kahlmeter G. et Turnidge J., 2012:** Techniques phénotypique. Chapitre 6. *Antibiogramme*. 3^e édition. Edition ESKA. Pp: 60-62
- **Kahouli I., 2010:** Effet antioxydant d'extraits de plantes (*Laurus nobilis* L., *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*, *Oléa europea* L.) dans l'huile de canola chauffée. Mémoire grade de mitre es sciences. Université Laval Québec.
- **Karadag A., Ozcelik B. and Saner S., 2009:** Review of methods to determine antioxidant capacities. Food Anal. Methods, 2, 41–60
- **Khaladi A., Meddah B., Moussaoui A., Benmehdi H. et Gouri S., 2012:** Screening phytochimique et effet antifongique de certains extraits de plantes sur le développement in vitro des moisissures. European Journal of Scientific Research. Vol 80 n°3. Pp. 311-321.
- **Khebri S., 2011:** Etude chimique et biologique des huiles essentielles de trois *Artemisia*. Mémoire de Magister. Université de Batna
- **Khlifi D., Sghaier R.M., Amouri S., Laouini D., Hamdi M. and Bouajila J., 2013:** Composition and antioxidant, anticancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba alba*, *Ruta chalpensis* L. and *Peganum harmala* L. Food and chemical toxicology; 55: 202-208.

L

- **Laguerre M., Lopez Giraldo L.J., Lecomte J., Pina M. et Villeneuve P., 2007:** Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante. Fondamental, Vol. 14 n°5. Pp. 278-292.
- **Lahsissen H., Kahouadji A., Tijane A. et Hseini S., 2009:** Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaïr (Maroc occidental). Lejeunia. Revue de botanique n° 186. Belgique.

- **Lazreg F., 2014 :** Importance de fonte de semis du pin d'Alep « *Pinus halepensis Mill.*) dans le Nord –Ouest Algérien: Identification morphologique et moléculaire des espèces du genre *Fusarium* et *Globisporangium*, pouvoir pathogène et moyens de lutte. Thèse de Doctorat. Université de Tlemcen.
- **Leclere H., Gaillard J.L. et Simonet M., 1995:** Microbiologie générale. La bactérie et le monde bactérien. Edition Doin. Pp. 424-438.
- **Leyral G. et Vierling E., 2007:** Microbiologie et toxicologie des aliments. Hygiène et sécurité alimentaires. 4^e Edition. Editeurs doin. Pp. 99-101/ 151-178.
- **Lopes-Lutz D., Alviano D.S., Alviano C.S. and Kolodziejczyk P.P., 2008:** Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*; 69: 1732-1738.
- **Lucini E. I., Zunino M. P. and Zygadlo J. A., 2006:** effect of monoterpenes on lipid composition and sclerotial development of *Sclerotium cepivorum* Berk. *Journal of phytopathology*. Vol154, Issue 7-8 : 441 - 446.

M

- **Manchado et Cheynier V., 2006:** Les polyphénols en agroalimentaire. Ed. Tec&Doc Lavoisier.
- **Mansouri N., Satrani B., Ghanmi M., EL Ghadraoui L., Guedira A. et Aafi A., 2011:** Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Jinuperus communus* du Maroc. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, Vol. 80, 791 - 805
- **Mederbal K., Josa R., Boukhari Y., Mas M.T., Khader M., Ouldali O., Regagba Z., Tadjeddine N., et Verdu A.M.C., 2010:** Ecosystème steppiques (cas de Brezina – El Bayadh): Caractérisation et proposition d'une fiche de travail sur terrain. Séminaire International «La Préservation et la Mise en Valeur de l'Ecosystème Steppique». M'sila.
- **Messai L., 2011:** Etude phytochimique d'une plante medicinale de l'Est algérien (*Artemisia herba alba*). Thèse de Doctorat. Université de Constantine.
- **Meziani M., 2012:** Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentés phylogénétiques : Cas des Entérobactéries et *Pseudomonas*. Mémoire de Magister. Université Mentouri Constantine. 68 page.

- **Mighri H., Hajlaoui H., Akrouf A., Najjaa H., et Neffati M., 2010:** Antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia herba-alba* essential oil cultivated in Tunisian arid zone. *Comptes rendus Chimie* 13: 380–386.
- **Modera R., 2007:** Antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.
- **Mohamed A.H., El-Sayed M.A. and Mohamed N.S., 2010:** Chemical constituents and biological activities of *Artemisia herba alba*. *Records of natural products*; 4: 1-25.
- **Mohammedi Z., 2006:** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse de Magister. Université Abou Baker Belkaid Tlemcen.
- **Mohsen H. et Ferchichi A., 2009:** Essential Oil Composition of *Artemisia herba-alba* from Southern Tunisia. *Molecules*, 14: 1585-1594
- **Molyneux P., 2004:** Use of DPPH to estimate antioxidant activity. *Songklanakarin J.Sci. Technol.* 26(2) 212.
- **Mounni M., Elwatik L., Kasimi A et Homrani B.A., 2013:** Induction du chémotype à davone de l'huile essentielle d'armoise blanche « *Artemisia herba alba* » par domestication à Errachidia (Sud-Est du Maroc). *Science Lib. Editions Mersenne* : vol. 5 n°130506

N

- **Nelly B. et Anthony T., 2003:** L'antibiogramme: la détermination des sensibilités aux antibiotiques. *DES bactériologie*.
- **Nout R., Hounhouigan J.D. et Boekel T., 2003:** Les aliments Transformation, Conservation et Qualité. Edition Backhuys Publishers. Pp 15-50/ 85-138.

O

- **Ohshima T., 2003:** Quel avenir pour les antioxydants naturels ?. *Lipides et corps gras alimentaires*. Ed. Tec et Doc. Paris. Pp. : 379 – 391.
- **Ozenda P., 1983:** Flore du Sahara. Edition CNRS. 2^e édition. Pp. 416-442.
- **Oumokhtar B., Karib H., Bouchriti N. et Araba A., 1998:** Appréciation de la qualité bactériologique de la viande et des abats de taurillons fraîchement abattus dans les abattoirs de Rabat. *Actes Int. Agro.Vet. (Maroc)*, vol.18 (3): 169-176.

- **Ozkan G., Simsek B. and Kuleasan H., 2007:** Antioxidant activities of *Satureja cilicica* essential oil in butter and in vitro. Journal of food engineering, 79, 1391-1396.

P

- **Paolini J., 2005:** Caractérisation des huiles essentielles par CPG/IT, CPG/SM et RMN du carbone 13 de *Citrus albidus* et de deux Asteraceae endémiques de Corse: *Eupatorium cannabinum* sub sp. *Corsicum* et *Doronicum corsicum*. Thèse de Doctorat. Université de Corse.
- **Piochon M., 2008:** Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. Université de Québec.
- **Ponce A.G., Fritz R., Del Valle c. et Roura S.I., 2003:** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. Lebensm-Wiss.u.-Technol.36.Pp. 679-684.

R

- **Rahili G., 2002:** Les huiles essentielles et leurs intérêt. La forêt algérienne n°4. Institut national de la recherche forestière. Bainem Alger.
- **Rahmani M., 2007:** Methodes d'évaluation de la stabilité oxydative des lipides. Les techniques de laboratoire n°2.
- **Raminez-Suero M., 2009:** Etude de l'interaction de *Medicago truncatula* avec *Fusarium oxysporum* et du rôle de l'acide salicylique dans les interactions de la plante avec différents agents pathogène et symbiotique. Thèse de doctorat. Université de Toulouse. Pp. 1-90.
- **Raza S.A., Rehman A., Adnan A and Qureshi F., 2009:** Comparison of antioxidant activity of essential oil of *Centella asiatica* and butylated hydroxyanisole in sunflower oil at ambient conditions. Biharean Biologist. Vol. 3, N° 1, Pp.: 71-75.
- **Regnault-Roger C., Philogène B.J.R. et Vincent C., 2002:** Biopesticides d'origine végétale. Edition Tec&Doc Lavoisier.
- **Riahi L., Chograni H., Elferchichi M., Zaouali Y., Zoghlami N., et Mliki A., 2013:** Variations in Tunisian wormwood essential oil profiles and phenolic contents between leaves and flowers and their effects on antioxidant activities. Industrial Crops and Products 46: 290-296.

- **Ribanicky D.M., Poulev A., Oneal J., Wnorowskig G., Mlek D.E., Jager R. and Raskin I., 2004:** Toxicological evaluation of the ethanolic extract of *A. dracunculus* L. for use as a dietary supplement and in functional foods.
- **Rota M.C., Herrera A., Martinez R.M., Sotomayor J.A. et Jordan M.J., 2008:** Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, 19: 681–687.
- **Roux D., Chaumont J.P., Cieur C., Millet J., Morel J.M. et Tallec D., 2008:** Conseil en aromathérapie. Edition Pro-officina. 2^{ème} édition. Pp. 173-174.

S

- **Salamci E., Kordali S., Kotan R., Carin A. et Kaya Y., 2007:** Chemical compositions, antimicrobial and herbicidal effects of essential oils isolated from Turkish *Tanacetum aucheranum* and *Tanacetum chiliophyllum* Var. *chiliophyllum*. *Biochemical systematic and ecology*; 35: 569-581.
- **Salido S., Valenzuela L.R., Altarejos j., Nogueras M., Sa'nchez A. et Carro E., 2004:** Composition and infraspecific variability of *Artemisia herba alba* from southern Spain. *Biochemical Systmatics and Ecology*, 32: 265-277.
- **Salifou C.F.A., Boko K.C., Attakpa Y.E., Agossa R., Ogbankotan I., Farougou S., Mensah G.A., Salifou S., Clinquart A., Youssao A.K.I., 2013:** Evaluation de la qualité bactériologique de viande fraîche de bovins abattus aux abattoirs de Cotonou-Porto-Novo au cours de la chaîne de distribution. *Journal of Animal & Plant Sciences*. Vol.17 (2), 2567-2579
- **Sharifian I., Hashemis M., Aghael M. and Alizadeh M., 2012:** Insecticidal activity of essential oil of *Artemisia herba alba* Asso against three stores product beetles. *Baharean biologist* 6(2): 90-93.
- **Skandamis P. N. and Nychas G. J. E., 2001:** Effect of oregano essential oil on microbial and physic-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied microbiology*, 91: 1011-1022.
- **Soutrenon A et Perrin R., 1988:** La fonte des semis. Enseignement des essais conduits en 1986-1987. En pépinières forestières R.F.F. XL-5 : 393-402.
- **Street K., Rukhkyan N. and Ismail A., 2008:** Directives pour la régénération: pois chiche. In: Dulloo M.E0, Thormann.I., Jorge M.A0 and Hansou J., editors. Corp

specific regeneration guidelines [CD-Rom). CG/AR system-wide Genetic resource Programme (SGRP) Rome. Italy.11pp.

T

- **Talibi L., Askarne H., Boubaker E. H., Boudyach F., Msanda B. and Saadi A.A., 2012:** Antifungal activity of some Moroccan plants against *Geotrichum candidum*, the causal agent of postharvest citrus sour rot. *Crop protection*; 35: 41-46.
- **Tastekin D., Atasever M., Adiguzel G., Keles M. and Tastekin A., 2006:** Hypoglycaemic effect of *Artemisia herba alba* in experimental hyperglucaemic rats. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*; 50: 235-238.
- **Teixeirada Silva J.A., 2004:** Mining the essential oils of the Anthemideae. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 3 (2), Pp.: 706-720.
- **Tekwu E. M., Pieme A. C. and Beny V. P., 2012:** Investigation of antimicrobial activity of some Cameroonian medicinal plant extracts against bacteria and yeast with gastrointestinal relevance. *Journal of Ethno pharmacology*; 142: 265-273.
- **Tlemsani M., 2010:** contribution à l'étude du flétrissement vasculaire du pois chiche (*Cicer arietinum* L.) causé par *Fusarium oxysporum* Schelcht. *Emend. Snyd & hars. F.sp Ciceri (Padwick)*: caractérisation, lutte biologique et comportement varietal. Mémoire de Magister. Université d'Oran.
- **Tenore G.C., Ciampaglia R., Arnold N.A., Piozzi F., Napolitano F., Rigano D. and Senatore F., 2011:** Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil of *Salvia lanigera* from Cyprus. *Food and Chemical Toxicology* 49: 238–243
- **Tenscher E., Anton R et Lobstein A., 2005:** Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Edition Tec&doc. Pp3-50/121-124.
- **Toutain P.L., 2010:** Critères bactériologiques d'action des antibiotiques : les concentrations critiques. Ecole Nationale vétérinaire. Toulouse

V

- **Vierling E., 1998:** Aliments et boissons. Technologie et aspects réglementaires. doin éditeur, Centre Régional de Documentation d'Aquitaine. Biosciences et techniques. Pp : 73-91.

W

- **Wang S.Y., Chen P.F. and Chang S.T., 2005:** Antifungal activities of essentials oil and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. *Bioresource Technology*; 96: 813-818.
- **Willcox M., 2009:** Artemisia species: from traditional medicines to modern antimalarials - and back again. *Journal of alternative and complementary medicine*; 15(2): 101–109

Y

- **Yen G.C. et Chen H.Y., 1995:** Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.* 43: 27-32.

Z

- **Zaim A., El Ghadraoui L. et Farah A., 2012:** Effets des huiles essentielles d'Artemisia herba alba sur la survie des criquets adultes d'*Euchorthippus albolineatus* (Lucas, 1849). *Bulletin de l'institut scientifique, Rabat, Section sciences de la vie*, n°34 (2): 127-133.
- **Zagorec M. et Cristieans S., 2013:** Flores protectrices pour la conservation des aliments. *Edition Quae*. Pp. 1-5.
- **Zahalka J.P., 2010:** Les huiles essentielles (230 huiles essentielles, 170 maux traités. *Edition Dauphin*. Pp. 12-39.
- **Zaouali Y., Bouzaine T. et Boussaid M., 2010:** Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis L.* varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology* 48: 3144-3152.
- **Zouari S., Zouari N., Fakhfakh N., Bougatef A., Aydi M.A. et Neffatil M., 2010:** Chemical composition and biological activities of a new essential oil chemotype of Tunisian Artemisia herba alba Asso. *Journal of Medicinal Plants Research* 4: 871-880.

1. Normes Mc Farland (Technical Data#2900a/2013)

Préparation de l'inoculum de *Candida albicans* pour l'essai de l'aromatogramme

La souche de *C. albicans* testée a été repiquée dans des tubes à essai contenant environ 9 ml de bouillon nutritif (BN) et incubées pendant 18 heures afin d'obtenir une culture jeune. Après homogénéisation de la suspension microbienne, son opacité doit être équivalente à 2 Mc Farland ou à une densité optique de 0.32 à 0.4 lue à 625 nm [Mighri et al., 2007]

La base 0.5 Mc Farland standard contient environ 1×10^7 à 1×10^8 UFC/ml (1×10^{10} à 1×10^{11} UFC/l).

0.5 Mc Farland Standard	
Solution de chlorure de barium (0.048M)	0.5 ml
Acide sulfurique (0.18M)	99.5 ml
D. O. à 625 nm	0.08-0.1
2 Mc Farland Standard	
Solution de chlorure de barium (0.048M)	2.0 ml
Acide sulfurique (0.18M)	98.0 ml
D. O. à 625 nm	0.32-04

2. Milieux de culture

Gélose Hektoen : La gélose Hektoen est un milieu sélectif permettant l'isolement et différenciation des entérobactéries pathogènes à partir des prélèvements biologiques d'origine animale, des eaux, des produits laitiers et des autres produits alimentaires.

Le milieu contient trois glucides: lactose, saccharose et salicine. La forte concentration en lactose favorise la visualisation des entérobactéries en évitant le problème des fermentations tardives.

Le principe de lecture est fondé sur la fermentation éventuelle des 3 glucides présents dans le milieu. Les microorganismes qui fermentent au moins l'un d'entre eux forment des colonies de couleur "saumon", les autres donnant des colonies bleues ou vertes.

Gélose lactosée au BCP

La gélose lactosée au pourpre de bromocrésol (BCP) est un milieu non sélectif, utilisé pour la détection et l'isolement des entérobactériacées dans l'eau et les produits alimentaires.

La fermentation du lactose en acide est révélée, en présence de pourpre de bromocrésol, par le virage du bleu violacé au jaune.

Les germes lactose-négatif donnent des colonies de couleur bleue.

3. Tests d'identification d'*E coli* [Guiraud, 2003; Meziani, 2012]

3.1. Etude morphologique

Etat frais

Une quantité d'eau est déposée sur la lame et une autre très faible quantité de produit est prélevée à l'ose et dissociée dans la goutte. Une lamelle est ensuite appliquée sur la goutte en évitant de créer des bulles d'air. Les grossissements utilisés sont X 40 et X 400.

La coloration différentielle de Gram

Cette méthode est basée sur la différence de structure de la paroi chez les bactéries: forte proportion de lipides (20%) chez les Gram négatif, faibles traces chez les Gram positif, entraînant une augmentation de la perméabilité de la paroi et l'extraction du complexe iode/violet de gentiane ; ceci provoque la décoloration des organismes. Les parois des Gram positif au contraire sont déshydratées par l'alcool: leur perméabilité diminue et le colorant ne peut être extrait.

La méthodologie est la suivante. Réaliser un frottis et le fixer à la flamme. Quelques gouttes de solution aqueuse de violet de gentiane sont répandues sur le frottis puis l'excès de violet est jeté après une minute d'action. Le frottis est ensuite recouvert de lugol de Gram; cette liqueur prend une teinte mordérée; on la jette au bout de quelques secondes et on répète l'opération 1 ou 2 fois jusqu'à ce que la pellicule mordérée n'apparaisse plus. La lame est ensuite décolorée à l'alcool absolu goutte à goutte en l'inclinant au dessus de l'évier, jusqu'à ce que l'alcool ajouté n'ait plus d'action décolorante.

Après lavage à l'eau de robinet, le frottis est recoloré à la fuschine pendant une minute, puis lavé à l'eau, séché à l'air et examiné à l'immersion. Les Gram positif apparaissent en bleu noir et les Gram négatif en rouge.

3.2. Mise en évidence des enzymes respiratoires

L'oxydase

La recherche de l'oxydase consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée à oxyder la forme réduite incolore de dérivés méthylés du paraphénylène diamine, en leur forme oxydée semi-quinonique rose violacé. L'oxydase ou cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires bactériennes, c'est une enzyme qui catalyse une réaction d'oxydo-réduction en impliquant une molécule d'oxygène comme accepteur d'électrons.

3.3. Fermentation avec ou sans gaz, utilisation du lactose et production d'H₂S

Le milieu TSI (Triple Sugar Iron) permet l'identification des entérobactéries par la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose (avec ou sans production de gaz), du saccharose et de la production de sulfure d'hydrogène.

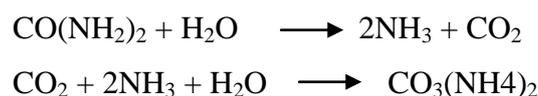
C'est un milieu coulé en pente et en culot, au niveau duquel nous avons recherché 4 caractères :

- la fermentation du lactose sur la pente qui se traduit par virage au jaune,
- la fermentation du saccharose également qui se matérialise par virage au jaune,
- la présence de gaz qui se matérialise par le décollement du culot et/ou la présence de bulles d'air,
- la production de H₂S qui se traduit par une coloration noire.

La pente du milieu TSI estensemencée par stries et le culot par piqure centrale, puis incubation à 37C° pendant 18 heures.

3.4. Dégradation de l'urée et production d'indole

Les microorganismes possédant une uréase très active transforment l'urée en ammoniac et en carbonate d'ammonium.



Cette réaction se traduit par une alcalinisation du milieu, décelable par un indicateur coloré.

La recherche de l'uréase peut s'effectuer par une culture sur milieu liquide de Ferguson (urée- indole). Ce milieu contient du rouge de phénol; après culture, ce milieu prend une teinte rouge due à l'augmentation du pH si l'urée est dégradée. La mise en évidence de l'uréase est faite en utilisant le milieu urée-indole. Ce dernier est inoculé avec quelques gouttes de la suspension bactérienne. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, l'alcalinisation du milieu qui vire au rouge traduit la présence d'une uréase. Le milieu incubé sert ensuite à la caractérisation de l'indole par la réaction de Kovacs.

3.5. Mannitol-mobilité

Le milieu mannitol-mobilité est une gélose molle conditionnée en tubes et qui permet d'étudier la fermentation du mannitol et la mobilité des germes. La fermentation du mannitol se matérialise par un virage du milieu au jaune. En ce qui concerne la mobilité, les bactéries mobiles diffusent à partir de la ligne verticale d'ensemencement en créant un trouble.

L'ensemencement du milieu s'est fait par piqûre centrale jusqu'au fond du tube avec la souche à tester à l'aide d'une anse de platine. Incubation à 37°C° durant 18 heures.

3.6. Utilisation du citrate

Milieu gélosé incliné de simmons est ensemencé par stries à partir d'un milieu solide et incubé durant 24 heures à 37°C. Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone ; le citrate. La bactérie qui utilise le citrate, elle alcalinise le milieu, ce qui fait virer le bleu de bromothymol du vert au bleu en milieu basique.

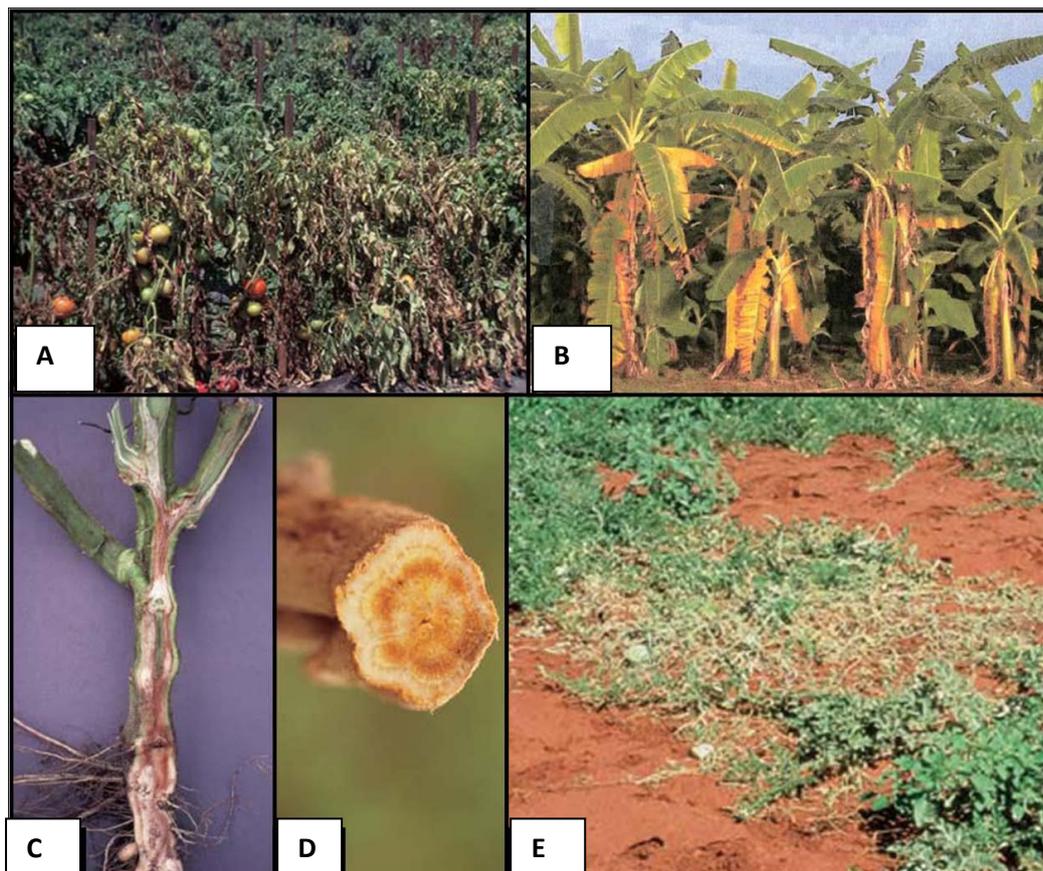


Planche 4 : Symptômes de flétrissement vasculaire aux champs. (A) Plantes de tomate flétrissant suite à l'infection par *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. **(B)** Flétrissement du bananier (maladie du panama) provoquée par *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. **(C)** Coloration sévère des tissus au long de la tige d'une plante de tomate infectée. **(D)** Tissus vasculaires colorés et obstrués en coupe transversale d'une tige de plante de pastèque infecté avec *F. oxysporum* f. sp. *niveum* **(E)** Flétrissement et mort de plantes de melon dans un champ [Ramirez-Suero, 2009].

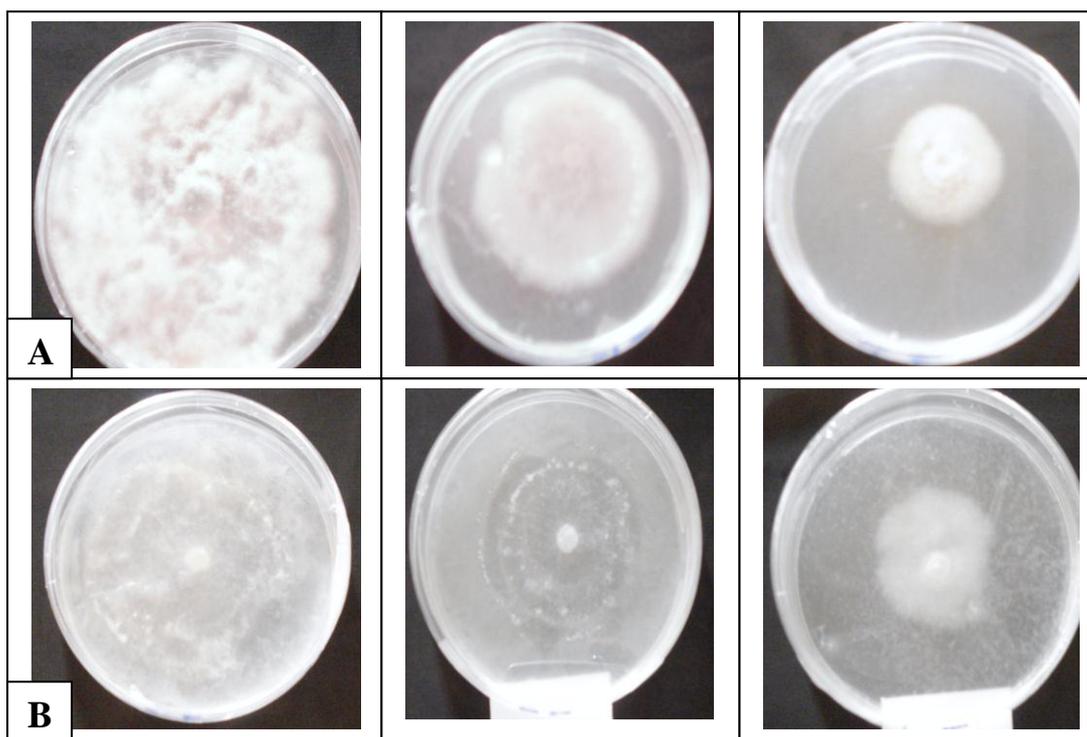


Planche 5: Photos des essais préliminaires de l'activité antifongique de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* contre : A) *Fusarium sp*, B) *Globisporangium ultimum*

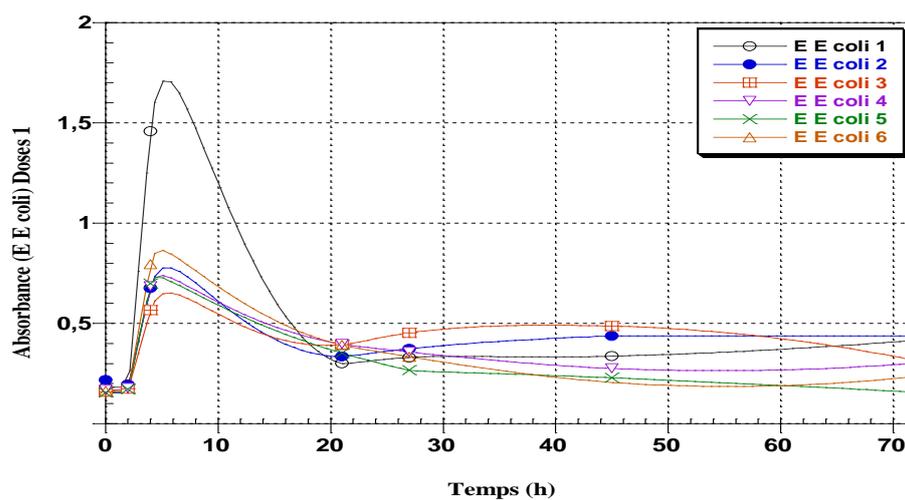


Figure 38: cinétique de la croissance de *E. coli* en présence de l'HE. de l'armoise blanche

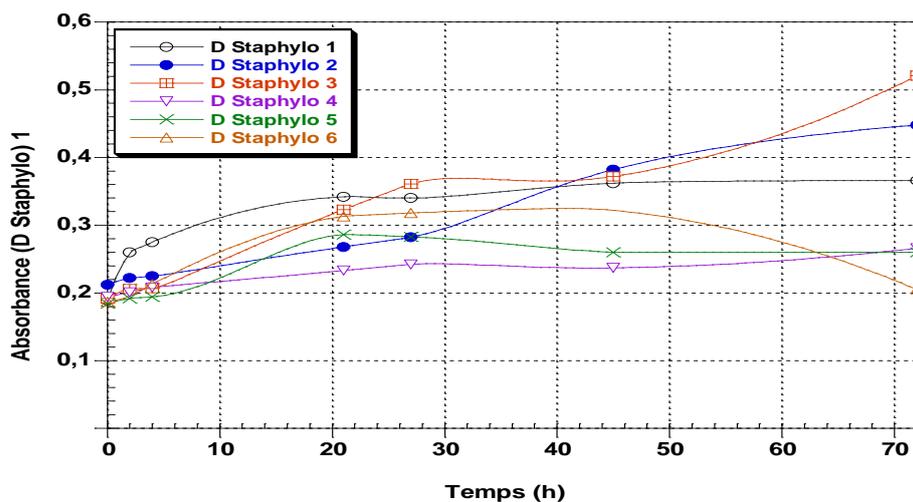


Figure 39: cinétique de la croissance de *S. aureus* en présence de l'HE. de l'armoise blanche

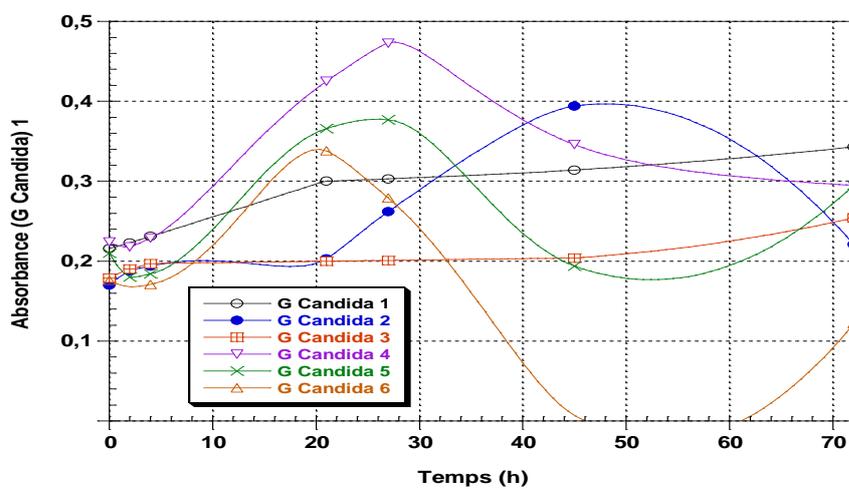


Figure 40: cinétique de la croissance de *C. albicans* en présence de l'HE. de l'armoise blanche

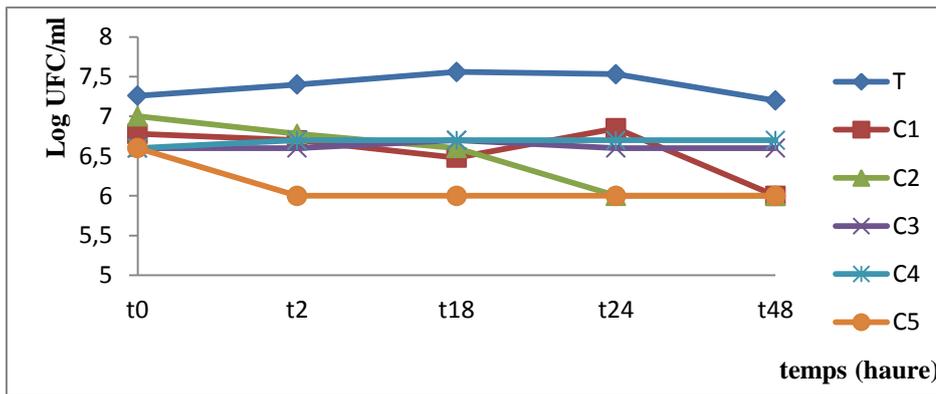


Figure 41: effet de l'huile essentielle de l'armoise blanche sur la croissance de *Candida albicans*

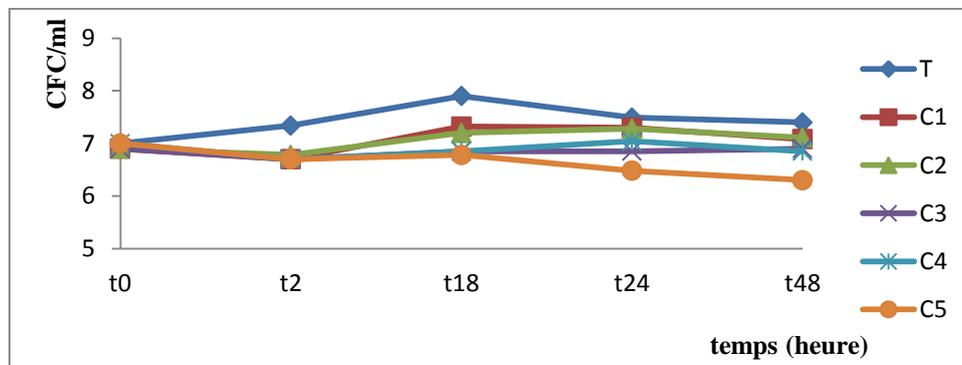


Figure 42: effet de l'huile essentielle de l'armoise blanche sur la croissance de *S. aureus*

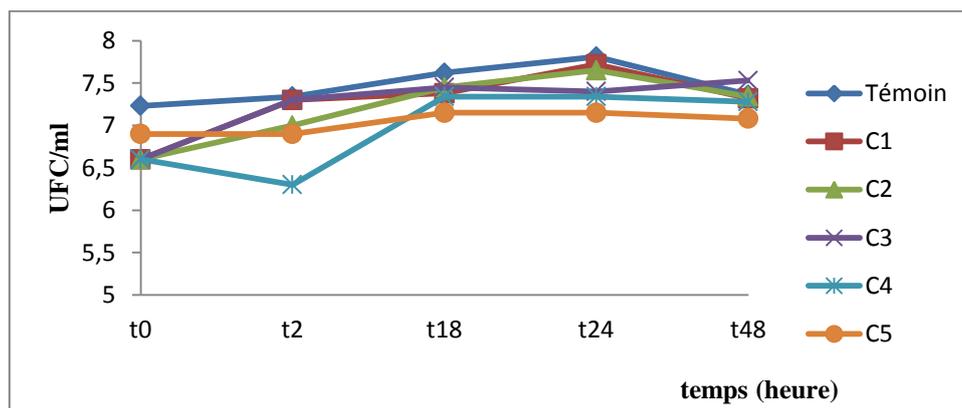


Figure 43: effet de l'huile essentielle de l'armoise blanche sur la croissance de *E. coli*

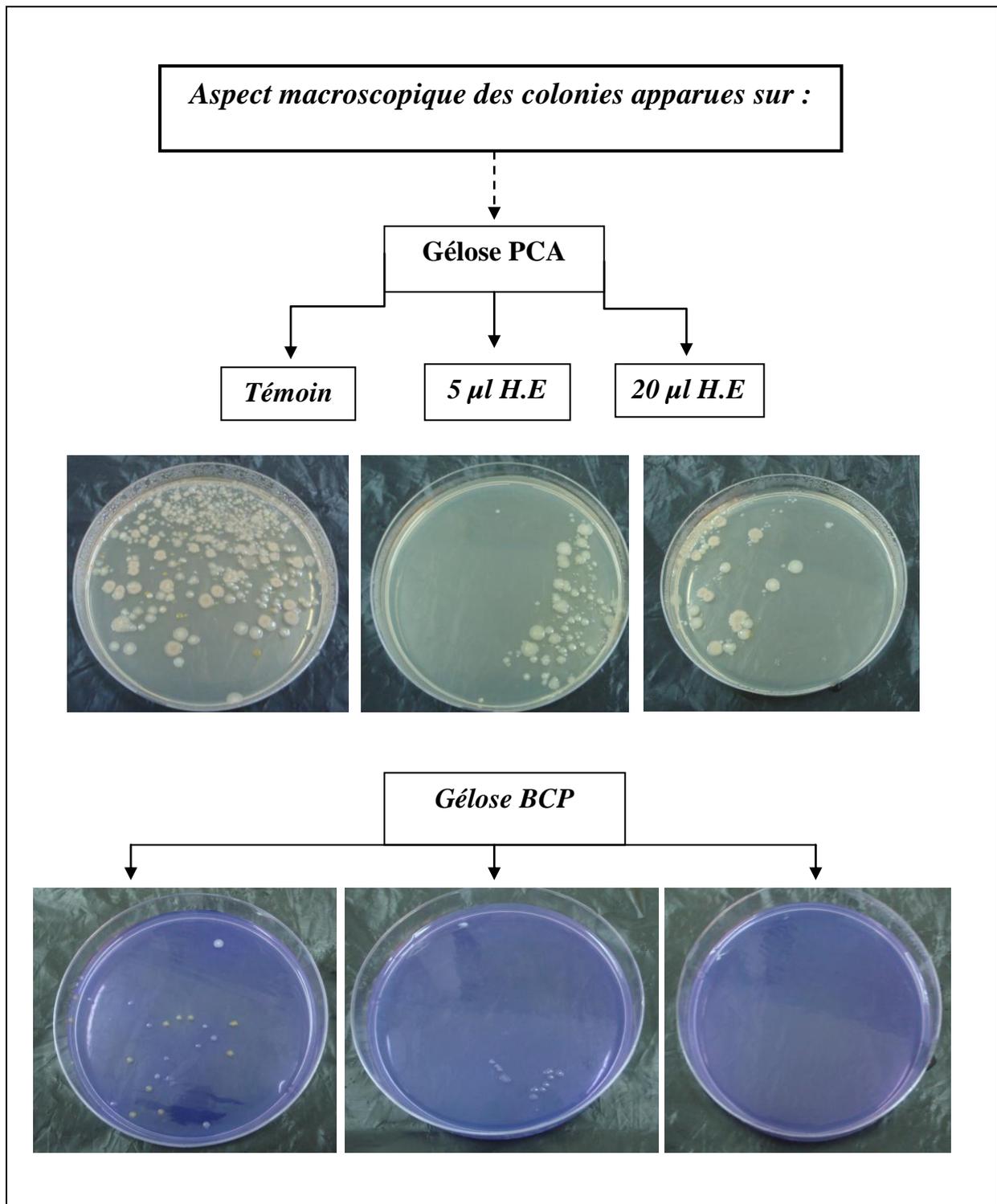


Planche 6: Aspect macroscopique des colonies apparues sur les milieux de culture non sélectifs

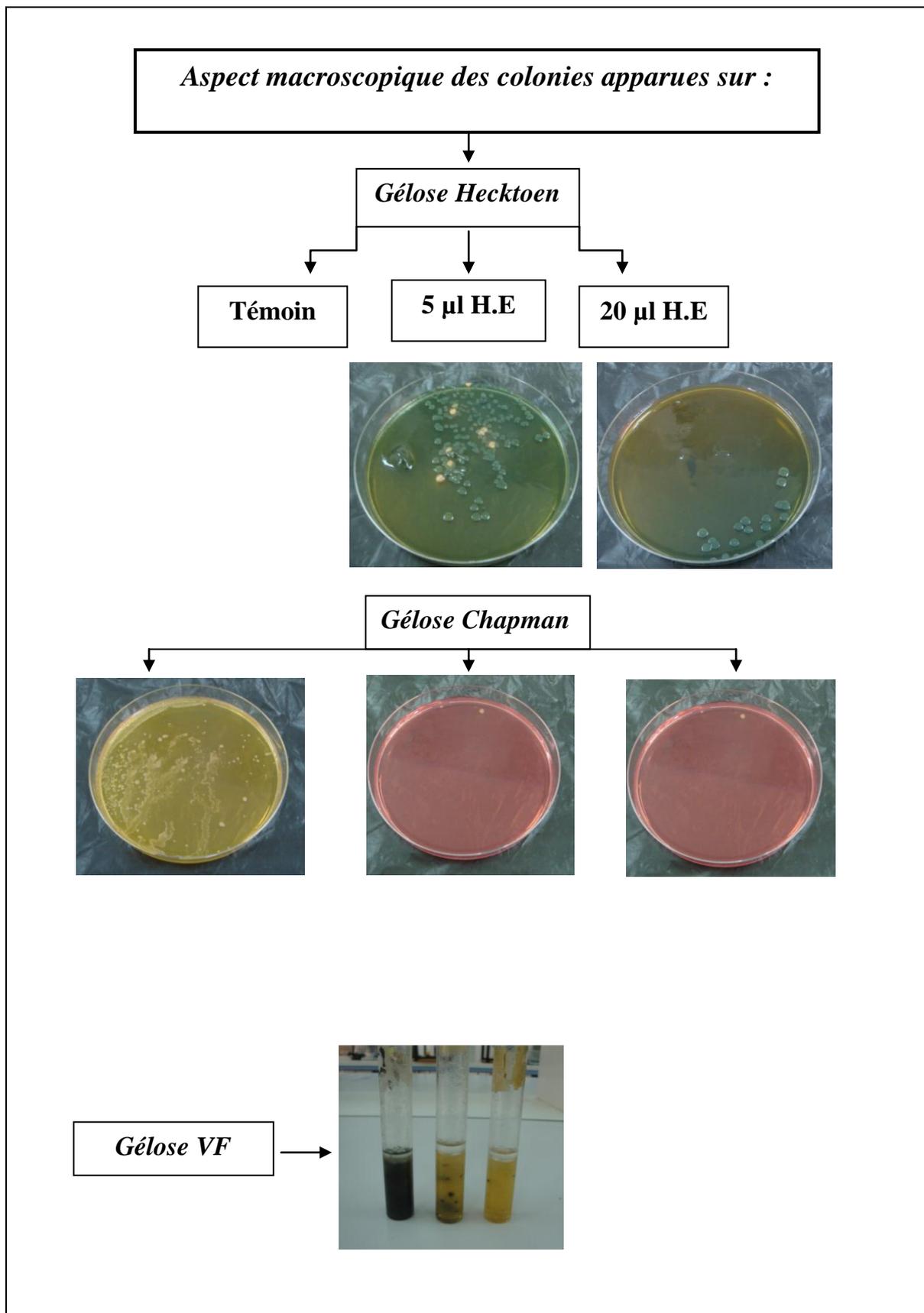


Planche 7: Aspect macroscopique des colonies apparues sur les milieux sélectifs.

Résultats des analyses statistiques

Tableau 13: Effet des doses sur la croissance mycéliennes de la croissance mycélienne de *F. solani*

Somme des					
Source	DL	carrés	CM	F	P
Dose	3	5385,32	1795,11	44,70	0,000
Journées	5	3519,47	703,89	17,53	0,000
Erreur	15	602,33	40,16		
Total	23	9507,12			

S = 6,337 R carré = 93,66 % R carré (ajust) = 90,29 %
 Limites de confiance = 95 % distinctes pour la
 moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Dose	Moyenne	-----+-----+-----+-----+
0 ppm	48,5000	(--*---)
1000ppm	6,9433	(---*--)
250 ppm	24,2783	(--*---)
500ppm	20,6667	(---*--)
		-----+-----+-----+-----+
		15 30 45 60

Tableau 14: Effet des doses sur la croissance mycéliennes de *F. oxysporum*

Somme des					
Source	DL	carrés	CM	F	P
Dose	3	1120,37	373,458	43,44	0,000
Journées	5	3369,81	673,962	78,40	0,000
Erreur	15	128,95	8,597		
Total	23	4619,13			

S = 2,932 R carré = 97,21 % R carré (ajust) = 95,72 %

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la
 moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Dose	Moyenne	-----+-----+-----+-----+--
0 ppm	34,5000	(----*---)
1000ppm	16,3883	(---*----)
250 ppm	31,2783	(---*---)
500ppm	27,5567	(---*---)
		-----+-----+-----+-----+--
		18,0 24,0 30,0 36,0

Tableau 17: Effet des doses sur la sporulation de *F. solani*

ANOVA à un facteur contrôlé : Sporulation Fs en fonction de doseSp

	Somme des				
Source	DL	carrés	CM	F	P
Dose Sp	3	9128	3043	12,66	0,000
Erreur	16	3847	240		
Total	19	12975			

S = 15,51 R carré = 70,35 % R carré (ajust) = 64,79 %

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Niveau	N	Moyenne	EcTyp	
0 ppm	5	64,00	20,84	(-----*-----)
1000ppm	5	8,80	10,33	(-----*-----)
250 ppm	5	34,60	19,63	(-----*-----)
500ppm	5	15,80	5,93	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----

0 25 50 75

Ecart type regroupé = 15,51

Informations de groupement avec la méthode de Tukey

Dose Sp	N	Moyenne	Groupement
0 ppm	5	64,00	A
250 ppm	5	34,60	B
500ppm	5	15,80	B
1000ppm	5	8,80	B

Tableau 18: Effet des doses sur la sporulation de *F. oxysporum*

ANOVA à un facteur contrôlé : Sporulation Fox en fonction de doseSp

	Somme des				
Source	DL	carrés	CM	F	P
Dose Sp	3	22269	7423	14,26	0,000
Erreur	16	8330	521		
Total	19	30599			

S = 22,82 R carré = 72,78 % R carré (ajust) = 67,67 %

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Niveau	N	Moyenne	EcTyp	
				----+-----+-----+-----

0 ppm	5	100,80	22,95	(-----*-----)
1000ppm	5	8,20	5,50	(-----*-----)
250 ppm	5	41,80	37,52	(-----*-----)
500ppm	5	41,40	10,85	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----
0 35 70 105

Ecart type regroupé = 22,82

Informations de groupement avec la méthode de Tukey

Dose Sp	N	Moyenne	Groupement
0 ppm	5	100,80	A
250 ppm	5	41,80	B
500ppm	5	41,40	B
1000ppm	5	8,20	B

Tableau 19: Effet des doses sur la sporulation de *G. ultimum*

ANOVA à un facteur contrôlé : Sporulation *G. ultimum* en fonction de dose Sp

Source	DL	Somme des carrés	CM	F	P
Dose Sp	3	6647	2216	3,78	0,032
Erreur	16	9384	586		
Total	19	16030			

S = 24,22 R carré = 41,46 % R carré (ajust) = 30,49 %

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Niveau	N	Moyenne	EcTyp	-----+-----+-----+-----+-----+-----
0 ppm	5	54,20	46,77	(-----*-----)
1000ppm	5	5,20	5,54	(-----*-----)
250 ppm	5	35,60	10,57	(-----*-----)
500ppm	5	19,80	3,96	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----+-----
0 25 50 75

Ecart type regroupé = 24,22

Informations de groupement avec la méthode de Tukey

Dose Sp	N	Moyenne	Groupement
0 ppm	5	54,20	A
250 ppm	5	35,60	A B
500ppm	5	19,80	A B
1000ppm	5	5,20	B

Tableau 20 : Résultats de la sporulation de *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* et de *Globisporangium ultimum*

	FS					Les moyen s	Fox					Les moyen s	Gu					Les moyen s
	39	66	49	92	74		135	87	74	106	102		34	129	5	39	64	
Témoin						64						100.8						54.2
C1 : 1000	27	03	02	06	06	8.8	12	04	10	01	14	8.2	0	3	2	7	14	5.2
C2 : 500	08	22	16	21	12	15.8	46	46	22	46	47	41.4	15	20	19	26	19	19.8
C3 : 250	54	17	40	11	51	34.6	53	51	94	00	11	41.8	33	37	29	53	26	35.6

Tableau 21: Résultats de la germination de *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* et de *Globisporangium ultimum* « le nombre des spores est 80 »

Concentration/ Espèce	Témoin		1000ppm		500ppm		250ppm	
	Spore germé	Spore non germé	Spore germé	Spore non germé	Spore germé	Spore non germé	Spore germé	Spore non germé
Pu	14	66	0	80	0	80	5	75
Fs	27	53	3	77	12	68	15	65
Fox	73	7	16	64	28	53	35	45

Tableau 22: Résultats de la Croissance mycelienne de *F. solani*, *F. oxysporum* et de *G. ultimum*

	1 ^{er} jour	2 ^{ème} jour	3 ^{ème} jour	4 ^{ème} jour	5 ^{ème} jour	6 ^{ème} jour	7 ^{ème} jour
Témoin	0	20	32	45	52	62	80
C1: 250 ppm	0	11	15	21	26	32.67	40
C2: 500ppm	0	0	12	19.5	23.5	30	39
C3: 1000ppm	0	0	0	0	11	13.33	17.33
<i>Fusarium oxysporum</i>							
Témoin	0	15	22	31	38	47	54
C1: 250 ppm	0	12	19	26.67	36.00	43.33	50.67
C2: 500ppm	0	10	17.67	23.67	30.33	40.00	43.67
C3: 1000ppm	0	0	12	15.33	20	24.33	26.67
<i>Globisporangium ultimum</i>							
Témoin	0	90	90	90	90	90	90
C1: 250 ppm	0	49	72	90	90	90	90
C2: 500ppm	0	0	0	21.33	28.33	32.67	40.67
C3: 1000ppm	0	0	0	19	24	32.5	37

Tableau 23: Pourcentage d'inhibition de H.E. d'*A. herba alba* Asso de la croissance mycélienne, la germination conidienne et la sporulation de *F. solani*, *F. oxysporum* et de *G. ultimum*

		F. solani	F. oxysporum	G. ultimum
Germination conidienne	Control	0	0	0
	250ppm	44.44 ± 9.36	52.05 ± 9.77	64.28 ± 6.68
	500ppm	55.55 ± 17.54	61.64 ± 6.51	100 ± 0
	1000ppm	88.88 ± 8.93	78.08 ± 1.82	100 ± 0
Croissance mycélienne	Control	0	0	0
	250ppm	50 ± 13.75	6.1 ± 2.13	0
	500ppm	51.25 ± 1.25	19.12 ± 5.65	54.81 ± 9.7
	1000ppm	78.33 ± 1.44	50.61 ± 9.5	58.88 ± 8.88
sporulation	Control	0	0	0
	250ppm	45.39 ± 29.18	58.53 ± 24.07	34.31 ± 7.38
	500ppm	75.51 ± 10.97	58.92 ± 13.74	63.46 ± 4.88
	1000ppm	86.25 ± 22.11	91.86 ± 4.13	90.46 2.81

Tableau 24: Analyse statistique des résultats du test au DPPH

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	F 5%	F 1%
Lignes	1035,46341	1	1035,46341	22,5262987	0,00512183	6,60789097	16,258177
Colonnes	10316,9243	5	2063,38487	44,8885239	0,00037198	5,05032906	10,9670207
Erreur	229,834342	5	45,9668683				
Total	11582,2221	11					

Tableau 25: Analyse statistique des résultats de l'évolution de l'indice de peroxyde (en meq d'O₂/Kg) dans l'huile de tournesol chauffée en présence de différentes doses de l'huile essentielle.

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	F 5%	F 1%
Lignes	844,688653	2	422,344327	46,7861737	3,8482E-05	4,45897011	8,64911064
Colonnes	290,244973	4	72,5612433	8,03814026	0,00662324	3,83785335	7,00607662
Erreur	72,2169467	8	9,02711833				
Total	1207,15057	14					

Tableau 26: Analyse statistiques des résultats de l'évolution de l'indice de peroxyde (en meq d'O₂/Kg) dans l'huile de tournesol chauffée en présence de différentes doses de tocophérol

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	F 5 %	F 1%
Lignes	675,72372	2	337,86186	44,6479936	4,5707E-05	4,45897011	8,64911064
Colonnes	467,88004	4	116,97001	15,4574306	0,00078239	3,83785335	7,00607662
Erreur	60,53788	8	7,567235				
Total	1204,14164	14					

Tableau 27: Analyse statistique des résultats de l'évolution des diènes conjugués dans les échantillons de l'huile de tournesol additionnés de différentes doses de l'huile essentielle et de l' α tocophérol

ANALYSE DE VARIANCE							
Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	F 5%	F 1%
Lignes	1,12232585	2	0,56116293	43,7819614	3,2456E-07	3,63372347	6,22623528
Colonnes	0,09851763	8	0,0123147	0,96079384	0,49797001	2,59109618	3,88957214
Erreur	0,20507548	16	0,01281722				
Total	1,42591896	26					

Tableau 28: Analyse statistique des résultats de l'évolution des triènes conjugués dans les échantillons de l'huile de tournesol additionnés de différentes doses de l'huile essentielle et de l' α tocophérol

ANALYSE DE VARIANCE							
Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F	
Lignes	0,25613963	8	0,03201745	2,18128205	0,08770346	2,59109618	
Colonnes	0,1176743	2	0,05883715	4,00845165	0,03879929	3,63372347	
Erreur	0,23485237	16	0,01467827				
Total	0,6086663	26					

Antioxidant Activity of Essential Oil of *Artemisia herba alba*

Nebia Bouzidi^{*1}, Khalladi Mederbal² and Bachir Raho G³

^{*1}University of Mascara. Faculty of Nature and life. Laboratory of research on Geo-environment and Development. Mascara 29000. Algeria. Tel 0791182816

²University of Tiaret. Algeria

³University of Mascara. Algeria

Received: January 13, 2016

Accepted: March 14, 2016

ABSTRACT

Synthetic antioxidants are widely used in the food industry because of their ability to prevent deterioration of foods and prolong their shelf life, but a good number of them will be considered harmful to health and have carcinogenic risks. Particular interest was manifested in recent years to essential oils that are an effective alternative to chemical preservatives. *Artemisia herba alba* is characterized by its wealth in essential oil of different composition which led to the definition of several chemotypes; its high feed value and a very important ecological role against erosion and desertification.

The objectives of this study were to evaluate the antioxidant activity of essential oils of the aerial part of *Artemisia herba alba*. The essential oil was isolated by hydrodistillation using a Clevenger apparatus, and the identification and quantification of constituents, through GC/MS analysis. Antioxidant effectiveness was examined by the radical scavenging method (DPPH) and determination of ferric reducing antioxidant power (FRAP). The yield obtained of essential oil is 0.932%. This oil has a density and a refractive index of the order of 0.912 and 1.4811 respectively. In chromatographic analysis, the majority constituents found in the essential oil of *Artemisia herba alba* were camphor (29.8%), 1,2,5,5-tetramethyl-1,3-Cyclopentadiene (15.6 %), Chrysanthenone (8.2%), eucalyptol (6.5%), Arthole (4.5%). The results of the antioxidant activity obtained in vitro with both methods showed that essential oil from *A. herba alba* possess an interesting antioxidant effect. The results suggest that *A. herba alba* oil has promising use as a natural source of antioxidants that can be a valid alternative to replace chemicals.

KEYWORDS: Antioxidant, chemical composition, Camphor, CG/SM, white wormwood

INTRODUCTION

Given the risks related to chemical additives in terms of public health and dizzying demand for foods with less synthetic chemicals, increased search for substitutes natural agents such additives to improve food safety is one priorities researchers.

Aromatic plants have been used since ancient times as well as in therapy in preserving and flavoring food, but only in the last decade scientific research has focused its interest on their essential oils and natural extracts as sources of antimicrobial compounds and antioxidants ^[1, 2, 3, 4].

A large number of medicinal plants have been reported to exhibit antioxidant activity, including *Ocimum sanctum*, *Piper cubeba* Linn., *Allium sativum* Linn., *Terminalia bellerica*, *Camellia sinensis* Linn., *Zingiber officinale* Roscoe and several Indian and Chinese plants ^[5]. Many studies report the results of using plant-derived compounds as natural antioxidants in food products. These results led the researchers to conclude that some plant compounds could be considered as proper alternatives to synthetic antioxidants ^[6]. Steppe zones occupied a large area of Algeria, which is characterized by its appreciable biodiversity ^[7]. Nowadays, many researchers from different fields namely pharmacology and nutrition are interested in the flora of the high Algerian steppe plains, to develop, expand and valorize this floristic heritage which is dominated by three plant species namely alfa (*Stipa tenacissima*) Esparto (*Lygeum spartum* L.) and sagebrush (*Artemisia herba alba*. Asso)^[8, 9]. *Artemisia herba-alba* is a greenish-silver perennial dwarf shrub growing in arid and semi-arid climates. It is characteristic of the steppes and deserts of the Middle East (Egypt, desert of Israel and Sinai), North Africa (Tunisia, Morocco and Algeria), Spain, extending into Northwestern Himalayas ^[10]. *Artemisia herba alba*, or the white wormwood designated Arabic as the "Chih" of the Asteraceae family, usually grows in small clumps sizes. It is a plant for different uses. *A. herba-alba* has traditionally been used in the treatment of diabetes, bronchitis, diarrhea, neuralgias and hypertension ^[11]. The plant is reported to possess hypoglycemic ^[12], anticancer ^[13, 14], anti-angiogenic ^[15], insecticidal ^[16], hypotensive and diuretic ^[17], anti-inflammatory ^[14, 18], antimicrobial activity ^[19, 20], and many other biological activities. Thus, the aims of the present study are to investigate the chemical composition and to determine the antioxidant activity of the essential oil of *A. herba-alba*.

MATERIEL AND METHODS

Plant Material and essential oil extraction

The aerial part of the plant was collected in Sidi Ahmed station (Saida province), situated in the Tell steppe interface area in North West of Algeria. The samples were submitted to hydrodistillation for 3 h. The essential oil was dried over anhydrous sodium sulphate and stored in a sealed vial in the dark at +4 °C before analysis tests.

Qualitative analysis of the essential oil of *A. herba alba*

Physical analysis of essential oil

Determination of the relative density ^[21]

Determination of the refractive index ^[21]

Gas chromatography/Mass spectrometry (GC/MS) analysis of Essential oil

The compounds of essential oil of *A. herba alba* were analysed by GC/MS, using a Hewlett- Packard (HP) chromatograph (Agilent Technologies) MDS 5973 coupled to a 6890 plus mass spectrometer, equipped with fused-silica capillary column HP-5MS (30m; 0.25mm i.d.; film thickness 0.25µm). The oven temperature was programmed from 60°C for 1 min, to 280°C at the rate of 2°C/min, and then left at 280°C for 10 min. The injector port temperature was held at 250°C, split: 1/20, the temperature of the detector was set at 280°C. The carrier gas was helium with a flow rate of 0.5 ml/min and the analysed sample volume was 2 µl. The mass spectrometer (MS) conditions were as follow: scan, Interface temperature: 280°C, Ionization type: electronic, Intensity of the filament: 70ev, Type of mass analyzer: Quadrupole, Source temperature: 230°C, Empty: 65m torr.

Determination of Antioxidant Activity

Measure of the Antioxidant activity by DPPH free radical scavenging test ^[22]

The antioxidant capacity of the essential oil of *Artemisia herba alba* was tested by the method which uses the DPPH• like a relatively stable free radical. In this test, the DPPH• of purple color is reduced in a yellow compound, the diphenylpicrylhydrazine, whose intensity of the color is inversely proportional to the reducing capacity of antioxidants present in the medium. The reaction is carried out in a total volume of 2 ml containing 0,4 ml of DPPH• (0,5 mM) solubilized in ethanol.

For the test, the sample was prepared by dissolution in absolute methanol. We prepare a solution in absolute methanol (500µg/ml). From this solution, different dilutions are made to have various concentrations about microgram per ml (31.25, 62.5, 125, 250 and 500 µg/ml). These same concentrations were prepared with the BHT to be useful as a positive control. a white control is also carries out with absolute ethanol only. For each concentration, the test is repeated three times. The samples are then left in dark for 30 minutes, and discoloration compared to the negative witness containing only the solution of DPPH• is measured at 517 nm. The antioxidant activity is estimated according to the following equation:

$$AA \% = ([Abs\ control - Abs\ test] / Abs\ control) \times 100$$

AA : antioxidant activity, Abs : absorbance at 517 nm.

Determination of Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP Assay)

The antioxidant capacity was determined following the procedure described by Oyaisu ^[23]. one millilitre of sample solution was added to 2,5ml of phosphate buffer (0,2 M, pH 6,6) and 2.5 ml of hexacyanoferrate of potassium [K₃Fe(CN)₆] (10 g/l), and warmed in water bath at 50°C for 20 min. Then 2.5ml of trichloroacetic acid (100 g/l) was added to the mixture and centrifuged at 3000 turns/min. during 10 minutes. Finally, 2,5ml of the supernatant were mixed with distilled water (2,5 ml) and 0.5 ml of ferric chloride [FeCl₃] (1g/l). The absorbance was measured in a spectrophotometer at 700 nm. A control without sample is prepared under the same conditions and ascorbic acid was used as positive control.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Evaluation of the quality of the essential oil of *Artemisia herba alba*

Artemisia herba-alba dried aerial part were subjected to hydrodistillation and the yellow-colored essential oil obtained was analyzed by GC/MS techniques.

The yield of essential oil is of the order of 0.932%. Comparable yields are obtained in samples of white wormwood different regions in Algeria ^[24, 25]. The yield and quality of essential oils of species of *Artemisia* genus are influenced by soil pH ^[26]. The soils of the study area are characterized by a sandy-loam texture, alkaline pH and low chemical quality ^[27]. The refractive index and density are 1.4811 and 0.912 respectively. Chemical composition of the essential oils of the aerial parts from *A. herba-alba* are reported in table1. 31 components were identified, in which camphor (29.8%), 1, 2, 5, 5-tetramethyl- 1, 3-Cyclopentadiene (15.6 %), Chrysanthenone (8.2%), eucalyptol (6.5%), Arthole (4.5%) were the most abundant components. The minor

compounds detected in *A. herba-alba* oils were thujone (1,08% - 1, 40%), camphene (0.67%), eugenol (0.47%),....

Camphor has been found as major compounds in the present study which is in agreement with several research [28, 29, 30]. In other studies different dominated compounds were found like thujone, Chrysanthenone and Cis-chrysanthenyl acetate.

Differences in chemical composition of essential oils extracted from a species often occur, since the production of secondary metabolites, including essential oils, is strongly influenced by the environment in which the producing organism is inserted, and the factors responsible for such variations are, seasonality, age and plant development, as well as the different plant organs, temperature, nutrients, altitude, and attack of pathogens and herbivores [31, 32, 33]. According Rota et al. [34], the biological activity of essential oils depends on their chemical composition.

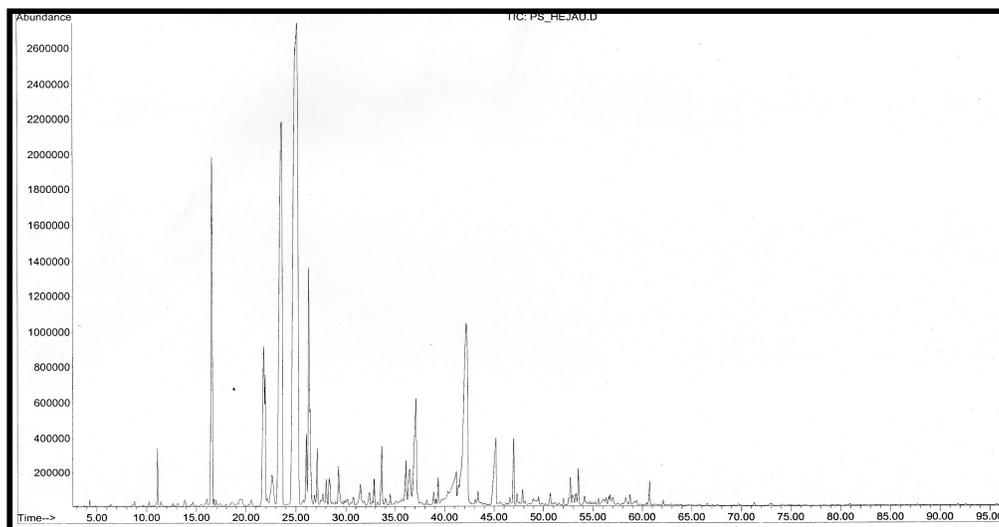


FIGURE 1: GC-MS Chromatogram of essential oil of *Artemisia herba alba*

TABLE 1. Essential oil of *Artemisia herba alba*

N°	Compounds	R.T (min)	%
1	Camphene	11.102	0.663
2	Eucalyptol	16.595	6.513
3	Bicyclo [3.2.0] hept-2-ene, 2-methyl	21.806	4.311
4	Thujone (alpha)-	21.942	1.409
5	Thujone (beta)-	22.623	1.089
6	1,3-Cyclopentadiene, 1,2,5,5- tetramethyl-	23.634	15.582
7	1,6-Dimethylhepta-1,3,5-triene	23.672	2.333
8	Bicyclo [2.2.1] heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl-, (1R)-	25.218	29.816
9	Bicyclo [2.2.1] heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl-, (1S)-	25.245	4.184
10	2(10)-Pinen-3-one-	26.066	1.097
11	Arthole	26.315	4.526
12	Borneol	26.439	1.105
13	Terpinen-4-ol	27.148	0.812
14	3-Carene	28.050	0.360
15	Bicyclo [3.1.1] hept-2-ene-2-carboxaldehyde,6,6- dimethyl-	28.342	0.578

16	Verbenone	29.256	0.755
17	Octadiyne	31.467	0.450
18	Bicyclo [3.1.1] hept-2-en-4-ol, 2,6,6-trimethyl-, acetate	32.873	0.327
19	2-Cyclohexen-1-one, 3,5,5-trimethyl-	33.657	1.074
20	1,5-Hexadiene, 2,5-dimethyl-3-methylene-	36.106	0.765
21	1,3-Cyclopentadiene, 5,5-dimethyl-2-ethyl-	36.462	1.093
22	1,3-Cyclopentadiene, 5,5-dimethyl-1-ethyl	37.138	3.803
23	Eugenol	39.355	0.377
24	Pipéritenone	41.204	1.063
25	Chrysanthenone	42.198	8.216
26	2,4-Cycloheptadien-1-one, 2,6,6-trimethyl-	42.247	2.659
27	1-Penten-3-one, 2-methyl-	45.193	2.381
28	Germacrène D	46.988	1.032
29	(-)-Spathulenol	47.875	0.221
30	g-Gurjunene	52.724	0.517
31	Hepatic acid, phenyl ester	53.524	0.507
Total			99.61

Antioxidant activity Antioxidant activity

The antioxidant activity of essential oil of *A. herba alba* was examined by comparing it to the activity of known antioxidants such as BHT and ascorbic acid by the following two in vitro assays; inhibition of DPPH radical and the ferric reducing antioxidant power (FRAP). All results are reported in Figure 2, 3. These results showed that *A. herba alba* essential oil was able to reduce the stable free radical DPPH with an IC₅₀ of 2.66 µg/ml, whereas that of the synthetic antioxidant BHA was 1.66 µg/ml. *A. herba alba* essential oil was found to be less active than BHA since their IC₅₀ values were found to be higher. But with careful and cautious consideration, it is interesting that BHT is a pure chemical substance, while the essential oil of *A. herba alba* used consists of several natural active substances or a few of them must have this antioxidant capacity. If we consider that it is the camphor which has antioxidant power in our essential oil (because of its ketone structure), and it is the majority compound with 29%, we can recalculate the IC₅₀ should be 29% of the value of 2.66 g / ml, and therefore clutched 0.77 mcg / ml, so this is a value that attributes to our essential oil, which is organic and natural, anti-radical power stronger than BHT itself. This result still encourages us to give more importance to natural substances in the field of additives.

Khelifi et al. [14] reported that the extract of *Artemisia herba alba* showed strong antioxidant activity but with an IC₅₀ much higher than ours which is 20.64 mg / l (equivalent to 20.64 µg / ml).

The anti-radical activity of the essential oil of sagebrush could be attributed to its high content of oxygenated monoterpenes [35, 36, 37, 38]. However, camphor, predominant in the essential oil of *Artemisia herba alba* in the region of Sidi Ahmed (29%), has a considerable antioxidant power [39, 40].

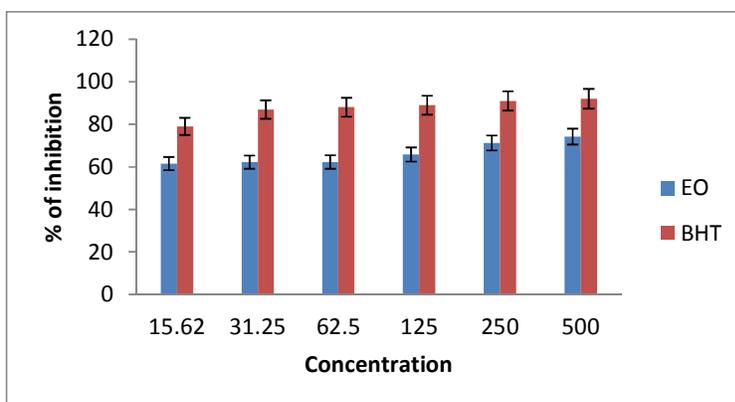


Figure 2: Test DPPH* histogram, expressed as a percentage inhibition, illustrating the antioxidant activity of BHT and essential oil according to their concentrations.

The same remark was showed by FRAP test which has indicated a little antioxidant activity in comparison the *A. herba alba* essential oil to ascorbic acid. In this test, the result (Figure 3) revealed that a good linearity to the essential oil ($R^2 = 0.956$) than the positive control ($R^2 = 0.752$). This may indicate that the reducing effect of the oil of *A. herba alba* is more correlated with its concentration, its effect is direct and does not exhibit phase affected by the mass effect

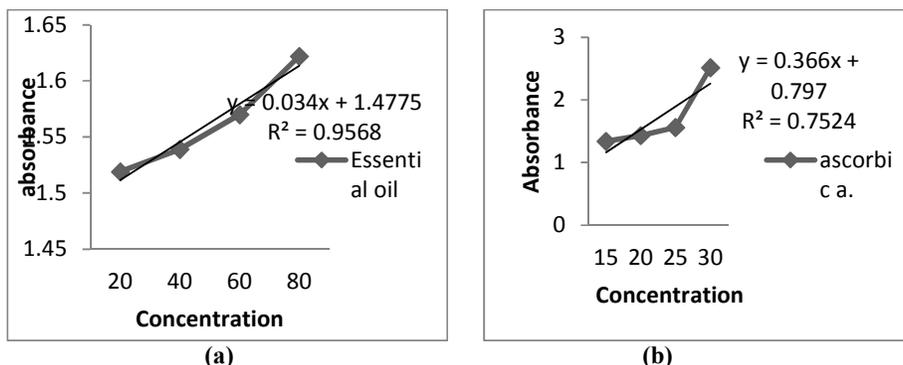


Figure 3: reducing power of essential oil (a) and of the ascorbic acid (b) by the method of FRAP

The finding that the results of the DPPH and FRAP assays for plant extracts were highly correlated agrees with the work of others, and is consistent with the view that the two assays share a similar mechanistic basis, viz. transfer of electrons from the antioxidant to reduce an oxidant [41]. In the present study, the antioxidant activity of essential oil could be attributed to the presence of camphor, eugenol, α -thujene, pinen. [35, 42, 43, 44]. Many previous studies reported that the antioxidant capacity of plant extracts could be attributed to the total phenolic content [45, 46, 47].

To conclude, we can say that our results show a significant antioxidant capacity of the essential oil of sagebrush Algerian Northwest.

Conclusion

In the present study, results from antioxidant activities reflected by the DPPH and FRAP assay have demonstrated that the *Artemisia herba-alba* essential oil possesses a important antioxidant activity. Thus, *Artemisia herba-alba* may therefore be a good candidate for functional foods as well as plant-based pharmaceutical products.

REFERENCES

- [1]. Hirasu, K. & M. Takemasa, 1998. Spice science and technology. Marcel Dekker, Inc. New York, pp: 3-5.
- [2]. Tenore, G.C., R. Ciampaglia, N.A. Arnold, F. Piozzi, F. Napolitano, D. Rigano and F. Senatore, 2011. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil of *Salvia lanigera* from Cyprus. Food Chem Toxicol., 49: 238-243
- [3]. Marangoni, C. and N.F. Moura, 2011. Antioxidant activity of essential oil from *Coriandrum Sativum* L. in Italian salami. Food Sci Technol (Campinas), 31(1): 124-128.

- [4]. **Özcan, M.M. and F. AL Juhaimi, 2015.** Effect of date (*Phoenix dactylifera* L.) seed extract on stability of olive oil. *J Food Sci Technolo.*, 52 (2): 1218-1222.
- [5]. **Khalaf, N.A., A.K. Shakya, A. AL-Othman, Z. EL-Agbar, H. Farah, 2008.** Antioxidant Activity of Some Common Plants. *Turk J Biol.*, 32: 51-55.
- [6]. **İnanç, T. and M. Maskan, 2012.** The Potential Application of Plant Essential Oils/Extracts as Natural Preservatives in Oils during Processing: A Review. *J Food Sci Eng.*, 2: 1-9.
- [7]. **Nedjimi, B. and B. Guit, 2012.** Les steppes algériennes: causes de déséquilibre. *AJAE.*, 2 (2): 50-61.
- [8]. **Djebaili, S., Y. Djellouli & P. Daget, 1989.** Les steppes pâturées des Hauts Plateaux algériens. *Fourrages.*, 120 : 393-400.
- [9]. **Ayad, N., B. Hellal, T. Hellal, A. Rahmani & Z. Bensmira, 2014.** Qualités nutritionnelles de l'armoise blanche des parcours steppiques du sud de la préfecture de Tlemcen. *Ecologie-Environnement.*, 10: 71-74
- [10]. **Mighri, H. H. Hajlaoui, A. Akrouf, H. Najjaa, M. Neffati, 2010.** Antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia herba-alba* essential oil cultivated in Tunisian arid zone. *C R Chim.*, 13: 380-386.
- [11]. **Zouari, S., N. Zouari, N. Fakhfakh, A. Bougatef, M.A. Ayadi and M. Neffati, 2010.** Chemical composition and biological activities of a new essential oil chemotype of Tunisian *Artemisia herba alba* Asso. *J. Med. Plant. Res.*, 4 (10) : 871-880.
- [12]. **Awad N.E., A.A. Seida, Z. Nermeen Shaffie and A.M. Abd El-Aziz, 2012.** Hypoglycemic Activity of *Artemisia herba-alba* (Asso.) used in Egyptian Traditional Medicine as Hypoglycemic Remedy. *JAPS.*, 2 (03): 30-39.
- [13]. **Tilaoui, M, H. Ait Mouse, A. Jaafari, R. Aboufatima, A. Chait and A. Zyad, 2011.** Chemical composition and antiproliferative activity of essential oil from aerial parts of a medicinal herb *Artemisia herba-alba*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 21(4): 781-785.
- [14]. **Khlifi, D., R.M. Sghaier, S. Amouri, D. Laouini, M. Hamdi and J. Bouajila, 2013.** Composition and antioxidant, anticancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba alba*, *Ruta chalpensis* L. and *Peganum harmala* L. *Food Chem Toxicol.*, 55: 202-208.
- [15]. **Jaouadi, I., A.T. Koparal, R.B. Bostancioğlu, M.T. Yakoubiand M. El Gazzah, 2014.** The anti-angiogenic activity of *Artemisia herba-alba*'s essential oil and its relation with the harvest period *Aust. J. Crop Sci.*, 8(10):1395-1401
- [16]. **Nia, B., N. Frah and I. Azoui, 2015.** Insecticidal activity of three plants extracts against *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) and their phytochemical screening. *Acta agriculturae Slovenica.*, 2 : 261 - 267.
- [17]. **Zeggwagh, N.A., J.B. Michel and M. Eddouks, 2014.** Acute hypotensive and diuretic activities of *Artemisia herba alba* aqueous extract in normal rats. *Asian Pac J Trop Biomed.*, 4(2): S644-S648.
- [18]. **Abu-Darwish, M.S., C. Cabral, M.J. Gonçalves, C. Cavaleiro, M.T. Cruz, T. Efferth and L. Salgueiro, 2015.** *Artemisia herba-alba* essential oil from Buseirah (South Jordan): Chemical characterization and assessment of safe antifungal and anti-inflammatory doses. *J Ethnopharmacol.*, 174:153-60.
- [19]. **Fedhila, S., W. Ben Lazhar, J. Taoufik, V. Sanchis, M. Gohar, D. Lereclus and J. Ben Hamida, 2015.** Peptides extracted from *Artemisia herba alba* have antimicrobial activity against foodborne pathogenic gram-positive bacteria. *Afr J Tradit Complement Altern Med.*, 12(1):68-75.
- [20]. **Janačković, P., J. Novaković, M. Soković, L. Vujisić, A.A. Giweli, Z.D. Stevanović and P.D. Marin, 2015.** Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Artemisia judaica*, *A. herba-alba* and *A. arborescens* from Libya. *Arch. Biol. Sci., Belgrade.*, 67(2): 455-466.
- [21]. **AFNOR, 1986.** Huiles essentielles. Recueil de normes françaises. Edition Tec&Doc Lavoisier. 2^e édition.
- [22]. **Amarti, F., M. El Ajjouri, M. Ghanmi, B. Satrani, A. Aafi, A. Farah, A. Khia, A. Guedira, M. Rahouti & A. Chaouch, 2011.** Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc. *Phytothérapie*. DOI 10.1007/s10298-011-0625-6.
- [23]. **Boukhatem, M., M. Hamaidi, F. Saidi & Y. Hakim, 2010.** Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du géranium rosat «*Pelargonium graveolens*» cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). *Nature et technologie*. Vol n°3.p.41.
- [24]. **Bezza, L., A. Mannarino, K. Fattarsi, C. Mikail, L. Abou, F. HadjMinaglon & J. Kaloustian, 2010.** Chemical composition of the essential oil of *Artemisia herba alba* from the region of Biskra (Algeria). *Phytotherapy.*, 8: 277-281.
- [25]. **Belhattab, R., L. Amor, J.G. Barroso, L.G. Pedro & A.C. Figueiredo, 2012.** Essential oil from *Artemisia herba-alba* Asso grown wild in Algeria: Variability assessment and comparison with an updated literature survey. *Arabian J Chem.*
- [26]. **Abad, M.J., L.M. Bedoya, L. Apaza and P. Bermejo, 2012.** The *Artemisia* L. Genus: A review of bioactive essential oil. *Molecule.*, 17: 2542-2566.

- [27]. **Bouzi, N, 2001.** Essai d'intégration des données de l'inventaire écologique et pastoral dans une base de données en zone semi-aride du Nord-Ouest de l'Algérie. Cas de la région de Saïda. Mémoire de Magister. Universitaire de Mascara.
- [28]. **Amri, I., L. De Martino, A. Marandino, H. Lamia, H. Mohsen, E. Scandolera, V. De Feo and E. Mancini, 2013.** Chemical composition and biological activities of the essential oil from *Artemisia herba-alba* growing wild in Tunisia. Nat Prod Commun., 8(3):407-10.
- [29]. **Imelouane, B, A. El Bachiri, M. Ankit, K. Khedid, J.P. Wathelet and H. Amhamdi, 2010.** Essential Oil composition and antimicrobial activity of *Artemisia herba-alba* asso grown in Morocco. Banat's. J Biotechnol., 1(2) : 48-55.
- [30]. **Dob, T. and T. Benabdelkader, 2006.** Chemical Composition of the Essential Oil of *Artemisia herba-alba* Asso Grown in Algeria. J. Essent. Oil Res., 18(6): 685-690.
- [31]. **Andrade, M.A., M.G. Cardoso, J. Andrade, L.F Silva, M.L. Teixeira, J.M.V. Resende, A. CS. Figueiredo and J.G. Barroso, 2013.** Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils from *Cinnamodendron dinisii* Schwacke and *Siparuna guianensis* Aublet , Antioxid. Redox signaling., 2(4): 384-397.
- [32]. **Amaral, LP, J.S.M. Tondolo, B. Schindler, D.T. Silva, C.G. Pinheiro and S.J. Longhi, 2015 .** Seasonal influence on the essential oil production of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Braz. arch. biol. technol., 58(1): 12-21.
- [33]. **Hussain, A.I., F. Anwar, S.A. Shahid Chatha, A. Jabbar, S. Mahboob and P.S. Nigam, 2010.** *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. Brazilian J Microbiol., 41: 1070-1078
- [34]. **Rota, M.C., A. Herrera, R.M. Martinez, J.A. Sotomayor & M.J. Jordan, 2008.** Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. Food Control., 19: 681-687.
- [35]. **El-Massry, K.F., A.H. El-Ghorab & A. Farouk, 2002.** Antioxidant activity and volatile components of Egyptian *Artemisia judaica* L. Food Chem., 79:331-336
- [36]. **Akrout, A., H. El-Janil, S. Amouri & M. Neffati, 2010.** Screening of antiradical and antibacterial activities of essential oils of *Artemisia campestris* L., *Artemisia herba alba* Asso, & *thymus capitatus* Hoff. and *Link* Growing wild in the southern of Tunisia. Rec Res Sci Tech., 2: 29-39.
- [37]. **Rahili, G., 2002.** Les huiles essentielles et leurs intérêt. La forêt algérienne n°4. Institut national de la recherche forestière. Bainem Alger.
- [38]. **Zaouali, Y., T. Bouzaine & M. Boussaid, 2010.** Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. Food Chem Toxicol., 48: 3144-3152.
- [39]. **Teixeirada Silva, J.A., 2004.** Mining the essential oils of the Anthemideae. African J Biotechnol., 3 (2): 706-720.
- [40]. **Bourkhiss, M., M. Hnach, J. Paolini, J. Costa, A. Farah & B. Satrani, 2010.** Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles des différentes parties de *tetraclinis articulata* (vahl) masters du Maroc. Bul Soc Roy Sci de Liège., 79 : 141 – 154.
- [41]. **Clarke, G., K.N. Ting, C. Wiart and J. Fry, 2013.** High Correlation of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging, Ferric Reducing Activity Potential and Total Phenolics Content Indicates Redundancy in Use of All Three Assays to Screen for Antioxidant Activity of Extracts of Plants from the Malaysian Rainforest . Antioxidants., 2, 1-10.
- [42]. **Degryse, A.C., I. Delpha & M.A. Voinier, 2008.** Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. E.H.E.S.P.
- [43]. **Burt, S., 2004.**Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. Int J Food Microbiol., 94(3): 223-253
- [44]. **Bruneton, J., 2005.** Plantes toxiques. Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. Edition Tec&Doc Lavoisier. 3^e édition. pp. 83-85.
- [45]. **Xu, B.J., S.H. Yuan, S.K. Chang, 2007.** Comparative analyses of phenolic composition, antioxidant capacity, and color of cool season legumes and other selected food legumes. J Food Sci., 72(2): S167-77.
- [46]. **Dudonné, S., X. Vitrac, P. Coutière, M. Woillez and J.M. Mérillon, 2009.** Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. J Agric Food Chem., 57(5):1768-74
- [47]. **Burt, S., 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. Int. J. Food Microbiol., 94(3): 223-253.



Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Artemisia herbaalba* Asso growing in the north west of Algeria

Nebia Bouzidi Maghraoui^{1*}, Khalladi Mederbal², Kada Ibri², Lakhdar Beladid²
and Nair Samira¹

¹Laboratory of Research on Geo-environment and Development, Department of Biology, Faculty of Science at Nature and Life (SNV), University of Mascara, Mascara, Algeria

²Laboratory of Research on Biological Systems and Geomatics (L. R. S. B. G.), Department of Agronomy, University of Mascara (SNV), Mascara, Algeria

ABSTRACT

The study was carried out on essential oil of *Artemisia herbaalba*. CG/SM qualitative analysis of white wormwood essential oil allowed us to identify 99.61% of the total peak areas. The main one is Bicyclo [2.2.1] heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl-, (1R)- (29.82%). Other main components are determined as 1,3-Cyclopentadiene, 1,2,5,5-tetramethyl- (15.58), Eucalyptol (6,51%) in the oil. On a biological level, evaluation of the essential oil revealed an interesting antimicrobial activity towards *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Chickpea Fusarium Wilt), *Fusarium solani* (Chickpea root-rot) and *Globisporangium ultimum* (Aleppo pine damping off and root-rot diseases). Results are also interesting for the pharmaceutical and agro-food industry fields using essential oil and this oil can be used in disease management against these soil-borne pathogens.

Key words: Antimicrobial activity, Essential oil, CG/SM, White wormwood.

INTRODUCTION

Genetic diversity of many steppe plants species is decreasing, and for some of them in a frightening way. Therefore, as a contribution to promote steppe plants genetic inheritance, we have focused our attention on *Artemisia herbaalba* (from the Asteraceae family), a medicinal steppe plant well known by the Algerian population as “white worm wood”. *Artemisia herbaalba* Asso is interesting for many fields: it is a unique source of feeding for nomad herd rearing and its essential oil is mainly used in perfumery industry. Medicinal and aromatic plants as well as their essences have several biological activities. They are used in phytotherapy for their antiseptic properties towards bacteria infectious diseases. In the phytosanitary and agro-alimentary fields, essential oils or their active substances could be employed like agents of protection against fungi and micro-organisms who invade the foodstuffs. Chickpea *Fusarium* wilt and Chickpea root-rot caused, respectively, by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (FOC) and *Fusarium solani*(FS), represented the most widespread and destructive diseases of this legume crop. *Globisporangium ultimum* (Trow) Uzuhashi, Tojo& Kakish. (syn. *Pythium ultimum* Trow, syn. *P. ultimum* Trow var. *ultimum*) (GU) is a known oomycetal species from Pythiums. l. causing damping-off and/or root rot on Aleppo pine (*Pinushalepensis* Mill). Our purpose is to study chemical composition of *Artemisia herbaalba* essential oil obtained through hydro-distillation as well as to evaluate its antimicrobial effect.

EXPERIMENTAL SECTION

2.1. Plant material

Artemisia herbaalba belongs to the Asteraceae family. White wormwood is a forage, medicinal and aromatic plant. The aerial part of the plant was collected in Sidi Ahmed station (Saidaprovince) in the Tell steppe interface area North West Algeria.

2.2. Isolation of essential oil

We obtained *Artemisia herbaalba* essential oil through a hydrodistillation process from the plant material using a Clevenger –type apparatus for 3hours. Before dark stored at 4°C, essential oil was dried up using anhydrous sodium sulfate. The essential oil yield was calculated on a dry weight by gravimetric method.

2.3. Essential oil analysis

We analyzed *A. herbaalba* essential oil through chromatography coupled with mass spectrometry.

The oil was investigated using a chromatograph HP (Agilent Technologies) MDS 5973 coupled to a 6890 plus mass spectrometer, equipped with fused-silica capillary column HP-5MS (30m; 0.25mm i.d.; film thickness 0.25µm).

2.4. Antimicrobial activity

2.4.1. Microbial strains

Antimicrobial activity of *A. herbaalba* essential oil was tested against: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25213), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (Chickpea Fusarium Wilt) (FOC), *Fusarium solani* (Chickpea root-rot) (FS) and *Globisporangium ultimum*(Aleppo pine damping off and root-rot diseases) (GU)..

2.4.2. Disk Diffusion method

The agar diffusion method was used to evaluate the antimicrobial activity of essential oil as described previously[1]. The Microbial suspension - *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25213)-was spread on the MH agar medium. Then, absorbent disk (6 mm diameter) containing 5µl of essential oil were placed on the culture medium surface inoculated with different microbial strains (the bacterial suspension was adjusted to 0.5Mc Farland).

Candida albicans was first grown on Sabouraudchlorenphenical plate at 30°C for 18-24 h prior to inoculation onto the nutrient agar. The fungal suspension was adjusted to 2 Mac Farland. The inoculum was streaked on to Sabouraud chlorenphenical agar. A sterile filter disc, diameter 6 mm was placed. 5 µL of essential oil was dropped on each paper disc. The treated Petri dishes were placed at 4°C for 1-2h. After that, petri dishes were incubated at 37°C for 18-24h. Finally antimicrobial activity was evaluated by measuring inhibition zone diameter around every disk. Experiment was conducted three times for every tested strain. To determine the minimum inhibitory concentration (MIC), we used micro-dilution on liquid medium method with a 96 micro well plate.

2.4.3. Antifungal activity

2.4.3.1. Mycelia growth

Fungal isolates –*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*(FOC), *Fusarium solani*(FS) and *Globisporangium ultimum* (GU)-are cultivated on PDA medium during seven days at 25°C in darkness. The choice of the concentrations of the essential oil is carried out on the basis of preliminary test. The mycelia growth was carried out by direct contact method, which consists in adding essential oil in PDA medium at 45°C to obtain concentrations of 1000, 500 and 250 ppm. After obtaining these various dilutions and their solidification in Petri dishes (15ml/dish), mycelia discs of 1cm of diameter, issue of 7 days old culture of each isolate, was deposited in the center of each Petri plate. Control plates containing the culture medium and the mycelia disc of each isolate without essential oil were realized. Each test is repeated three times. After incubation at 25°C during 7 days, by taking account of the growth of control, the percentage of inhibition (PI) is calculated by the following formula: $PI\% = \frac{dT-dE}{dT} \times 100$; with; PI (%): percentage of inhibition, dT: Average diameter of the growth zone of the control and dE: Average diameter of the growth zone of the test[2, 3].

2.4.3.2. Evaluation of the sporulation

The evaluation of the sporulation was estimated from plates having been used to study the mycelia growth. Four discs of 5 mm in diameter were cut out with a perforating punch (cookie cutter) along the diameter of the same colony and were put in a tube containing 1 ml of distilled water. The spores suspension is then agitated using a vortex in order to release the spores of the conidiophores. These experiments are repeated three times. After counting the full number of the spores using a cell of Malassez at a rate of 10 counting by suspension, the values are

expressed of number of the spores per unit of area (mm^2). The percentage of inhibition of the sporulation (IS) is calculated by the following formula: $\text{IS}\% = [(N_0 - N_c) / N_0] \times 100$; With N_0 : The mean number of the spores estimated for the control and N_c : The mean number of the spores estimated in the presence of essential oil[3].

2.4.3.3. Evaluation of Germination

The collected suspension of the spores is adjusted at a rate of 105 spores/ml of distilled water using a cell of Malassez. We spread out 0.1 ml of this suspension on Petri dishes containing PDA medium with essential oil at the same concentrations previously mentioned. Three repetitions are carried out simultaneously for each concentration. The counting of the spores germinated or not was carried out on a total of 200 spores after 5 to 18 hours of incubation at 25°C in darkness. A spore is considered germinated if the length of the germinatif tube is higher than its smaller diameter. Percentage of inhibition of the germination of the spores Ig is given according to the following formula: $\text{Ig}\% = (N_0 - N_c) / N_0 \times 100$; with N_0 : The number of the spores having germinated in the culture medium without essential oil (control) N_c : The number of the spores germinated in the presence of essential oil[3].

RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Chemical composition of the essential oil

Chemical composition of white *Artemisia* aerial part essential oil obtained through hydrodistillation was analyzed with GC and GC-MS.31 components were identified on HP5-MS column from the essential oil representing 99.61% of the total (majority compounds are shown in table 1).The hydrodistillation yielded 0.93% of oil (yield (w/w)). This output is comparable to those obtained from 5 oils *Artemisia herbaalba* recollected from different regions in Algeria (0.2% to 0.95%)[4]. It is worth mentioning that the same variation was recorded with sagebrush in Spain (0.41% to 2.30%)[5].*A. herbaalba* extraction yield is related to plant origin: Tunisia (0.68% to 1.93%) and Morocco (0.86%). It has to be mentioned that this is an average output compared to certain plants used in industry as essential oil source: superior to rose yield (0.10% - 0.35%) and inferior to thyme yield (2.0- 2.5%)[6].The main components of essential oil of *Artemisia* from Saida region are different than those reported by several authors with *Artemisia herba alba* from other regions: α and β -thujone (7.85% to 30%)[7, 8, 9, 10], Cis-chrystanthenyl acetate (10.60% à 25.12 %)[4, 8], being the most abundant components. Essential oil chemical composition of plants collected in different regions of Algeria is characterized by presence of high thujone percentage[4, 9]. It is worth mentioning that in our study these compounds were found in small quantities (1.41%).Therefore, *A. herba alba* essential oil chemical composition variation may be due to exogenous factors such as soil types and their components, temperature, altitude and also due to endogenous factors such as plant genetic inheritance[6].

Table 1: Essential oil of *Artemisiaherba-alba*

N°	Majority Compounds	%
1	Camphene	0.663
2	Eucalyptol	6.513
3	Bicyclo [3.2.0] hept-2-ene, 2-methyl	4.311
4	α Thujone	1.409
5	β Thujone	1.089
6	1,3-Cyclopentadiene, 1,2,5,5- tetramethyl-	15.582
7	Bicyclo [2.2.1] heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl-, (1R)-	29.816
8	1,3-Cyclopentadiene, 5,5-dimethyl-2-ethyl-	1.093
9	1,3-Cyclopentadiene, 5,5-dimethyl-1-ethyl	3.803
10	Chrysanthenone	8.216
11	2,4-Cycloheptadien-1-one, 2,6,6-trimethyl-	2.659
12	1-Penten-3-one, 2-methyl-	2.381
Total		99.61
Yield		0.93

3.3.2. Antimicrobial activity

Experimental results show that *Artemisia herbaalba* essential oil has an antimicrobial activity on all tested strains (as presented in table 2 and 3).The antimicrobial activity varies from strain to strain and can be noticed in inhibition zones showing that certain are more sensitive than others. According to the classification made by[11], the tested essential oil showed strong activity (inhibition zone $\geq 20\text{mm}$) against *Candida albicans* and moderate activity (inhibition $< 20\text{-}12\text{mm}$) against *E. coli* and *Staphylococcus aureus*. Several compounds are cited as responsible for the antiseptic properties of essential oils: thymol, carvacrol, camphor...[8]. This activity of *A. herbaalba* essential oil would be related to its oxygenated monoterpenes compounds. Indeed, in essential oils it was shown that monoterpenes are able to destroy cellular integrity resulting in respiration inhibition and permeability alteration[12, 8].

Table 2: inhibition zone (mm) and minimal inhibitory concentration ($\mu\text{l/ml}$) for essential oil of *Artemisia herbaalba*

Microorganism	Diameter of inhibition zones (mm)	MIC ($\mu\text{l/ml}$)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	12.83 \pm 0.76	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25213)	14.33 \pm 0.57	6.25
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	30 \pm 3.60	3.12

The antifungal activity of essential oil was tested by the method of diffusion and the appreciation of the diameters of the inhibition zones *in vitro*. Obtained results of the direct contacts method show that the mycelial growth of the various strains is affected by the various concentrations of essential oil. Indeed, more the concentration of essential oil increases more the rate of inhibition increases. A maximum of effect is obtained with the amount of 1000 ppm, this oil reduced the development of *FS*, *GU* and *FOC* with a rate of 78.33, 58.88 and 50.61% respectively (as shown in Table 3). Differences of sensitivity or resistance are noted according to the concentrations and to the various strains tested since it is observed that the *GU* strain is more resistant compared to *FS* and *FOC* at a low concentration (250 ppm). Therefore, for the test of the mycelia growth, the most sensitive strain to essential oil is *FS* (1% \rightarrow 75%). The analysis of the results indicates that the three strains tested are sensitive to the essential oil. This sensitivity results in a reduction in the spores with the increase in the concentration. The rates of inhibition are higher than 50% for *FOC* (91.87), *GU* (90.40%) and *FS* (86.25%) with the concentration of 1000ppm. The three percentages of sporulation of each studied strain are higher than CI_{50} (*FOC*, 58.53%; *GU*, 63.46% and *FS*, 75.31%). For the low concentration (250 ppm), we find that the percentage of inhibition of *FOC* and *FS* is more or less equal to CI_{50} , contrary in *GU* which has a percentage lower than the value CI_{50} . Therefore, this essential oil has an inhibiting effect on the sporulation of the strains studied with concentrations of 500 and 1000 ppm. For the germination of the spores, it appears that the most important effect was observed for *GU*. An inhibiting activity of 100% was noticed by the application of the two concentrations (500ppm and 1000ppm) on the germination of *GU*, on the other hand the percentage of germination at the concentration of 250 ppm is lower than the value of CI_{50} . On the basis of percentage of germination of the conidia, essential oil appeared to be active on all strains tested and at all the concentration of essential oil used. The antifungal activity of essential oil of *A. herbaalba* can be allotted the presence of camphor (29.816%) and thujone (1.409%). Our results are in conformity with other research, who declared that there is a relation between the antifungal capacity and the presence oxygenated monoterpenes [13, 8, 6].

Table 3: Inhibition (%) of *Artemisia herba-alba* essential oil on conidia germination, mycelia growth and sporulation of *Fusariumsolani*, *Fusariumoxysporum* and *Pythiummultimum*

		<i>F. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. ultimum</i>
Conidia Germination	Control	0	0	0
	250ppm	44.44 \pm 9.36	52.05 \pm 9.77	64.28 \pm 6.68
	500ppm	55.55 \pm 17.54	61.64 \pm 6.51	100 \pm 0
	1000ppm	88.88 \pm 8.93	78.08 \pm 1.82	100 \pm 0
Croissance mycélienne	Control	0	0	0
	250ppm	50 \pm 13.75	6.1 \pm 2.13	0
	500ppm	51.25 \pm 1.25	19.12 \pm 5.65	54.81 \pm 9.7
	1000ppm	78.33 \pm 1.44	50.61 \pm 9.5	58.88 \pm 8.88
sporulation	Control	0	0	0
	250ppm	45.39 \pm 29.18	58.53 \pm 24.07	34.31 \pm 7.38
	500ppm	75.51 \pm 10.97	58.92 \pm 13.74	63.46 \pm 4.88
	1000ppm	86.25 \pm 22.11	91.86 \pm 4.13	90.46 \pm 2.81

CONCLUSION

Medicinal and aromatic plants are an important and inexhaustible source of natural bioactive substances and compounds. The study was conceived to assess antimicrobial activity of *A. herbaalba* aerial part essential oil. The main compounds of essential oil of *A. herbaalba* from Saida are different than those reported by several authors from other regions. The antimicrobial activity of the essential oil of *A. herbaalba* was determined. The results showed that examined oil has an important antimicrobial activity; it was found that it was active against all strains tested. Finally, if white wormwood is regarded as having substances for human medicine and animal feeding, it has also substances with important effects on a biological level. Whatever efforts are made in research works in this field, they will always remain insufficient to interpret, understand and take profit of all virtues and qualities embodied by steppe medicinal plants.

Acknowledgments

The authors would like to thank the director of faculty of Science at nature and life. This work was supported by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria

REFERENCES

- [1] H Mighri; H Hajlaoui; AAkrou; H Najjaa; M Neffati. *C.R. Chimie.*, **2010**, 13,380-386.
- [2] NDohou; K Yamni; A Badoc; A Douira. *Bull. Soc. Pharm, Bordeaux.*, **2004**, 143, 31-38.
- [3] AKhaladi; B Meddah; AMoussaoui; H Benmehdi; S Gouri. *EJSR.*, **2012**, 80, 311-321.
- [4] L Bezza; AMannarino; K Fattarsi; C Mikail; L Abou; F HadjMinaglon; JKaloustian. *Phytotherapy.*, **2010**, 8, 277-281.
- [5] SSalido; LR Valenzuela; J Altarejos; M Nogueras; A Sa'nchez; ECarro. *BiochimSyst Ecol.*, **2004**, 32, 265-277.
- [6] HK Benchaqroun; M Ghanami; B Satrani; AAafi; A Chaouch. *Bull Soc R Sci Liege.*, **2012**, 81, 4-21.
- [7] A Akrou ; H El-Janil; S Amouri ; M Neffati. *Rec Res Sci Tech.*, **2010**, 2, 29-39.
- [8] S Zouari; N Zouari; N Fakhfakh; A Bougatef; MA Aydi; M Neffati. *JMPR.*, **2010**, 4(10), 871-880.
- [9] LRiahi; H Chograni; M Elferchichi; Y Zaouali; N Zoghlami; A Mliki. *Ind Corp Prod.*, **2013**, 46, 290-296.
- [10] Y Zaouali; TBouzaine; M Boussaid. *Food Chem Toxicol.*, **2010**, 48, 3144-3152.
- [11] MCRota; A Herrera; RM Martinez; JA Sotomayor. *MJ. Jordan, Food Control.*, **2008**, 19, 681-687.
- [12] SD Cox; CMMann; JL Markham; HC Bell; JE Gustafson; JR Warmington; SG Wyllie. *J Appl Microbiol*, **2000**, 88,170-175.
- [13] SKordali; R Kotan; AMavi; A Cakir; A Ala; A Yildirim. *J. Agric. Food and Chem.*, **2005**, 53, 9452-9458.