

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ SALAH BOUBNIDER CONSTANTINE 3



FACULTÉ DE GÉNIE DES PROCÉDES

Département de Génie pharmaceutique

N° d'ordre :

Série :

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Science et technologie

Filière : Génie des procédés

Spécialité : Génie pharmaceutique

Intitulé :

Extraction des huiles essentielles et des extraits de deux plantes médicinales (*Eucalyptus globulus* et *Origanum Vulgare*) en vue d'une formulation d'un vicks dermique anti-inflammatoire

Dirigé par:

Mme. Belaib Fouzia

Grade : Professeure

Présenté par :

BOUDEMAGH Racha

KHALFAOUI Hadil

CHELLI Merouane

Session : (juin) 2024

Remerciements

Nous remercions tout d'abord Allah, tout-puissant et miséricordieux, pour nous avoir donné la force, la patience, la santé et la volonté de réaliser ce modeste travail, car l'homme propose mais Dieu dispose. Allah, veuille toujours guider nos pas.

*C'est avec une profonde gratitude que nous tenons à remercier notre encadrante, **Madame BelaiB Fouzia**, pour l'aide si efficace qu'elle nous a apportée, son caractère très compréhensif, sa patience, sa disponibilité, ses précieuses orientations et ses conseils hautement précieux, ainsi que pour tout le temps qu'elle nous a consacré pour diriger ce travail.*

Nos remerciements vont aux membres du jury d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce modeste travail.

*Nous souhaitons exprimer notre gratitude à **M. Bensouici Chaouki** et à **Mme Maghboun Ibtissem** pour leur grande gentillesse, leurs conseils précieux, leur aide et leurs suggestions tout au long de notre stage pratique au laboratoire de biochimie. Nous sommes également reconnaissants envers toute l'équipe du Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt).*

Nos remerciements vont également à tous nos enseignants de la faculté de génie des procédés et surtout aux enseignants du département de génie pharmaceutique.

*Merci à tous les ingénieurs des laboratoires de la faculté, et en particulier à **Madame Fouzia, Karima** et **Sara**, pour leur gentillesse, leur patience et toute l'aide précieuse qu'elles ont apportée tout au long de cette année.*

Enfin, nous remercions nos familles et amies et tout personnes ayant contribué et aidé de près ou de loin à la réalisation de cet humble travail.

Dédicace

Je tiens à remercier Allah de m'avoir donné la force, la santé, le courage, l'inspiration et surtout la patience pour terminer ce travail. Je dédie ce modeste travail :

À celui qui m'a appris que le succès ne peut venir que de patience et efforts et de qui j'ai hérité ma force et ma fierté, à celui qui rêvait de me voir dans ce rang, mon cher père. "رحمه الله"

Pour la grande humanité, qui m'a facilité ma destination par ses prières et sacrifices, ma chère mère, qu'Allah la garde.

À mon soutien dans la vie et ma joie, mon frère et mes chères sœurs.

À ceux qui ont été une aide et un soutien sur ce chemin, aux amis et compagnons des années, et à tous mes chers collègues, ma deuxième famille, merci beaucoup.

Merouane

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail :

À la personne la plus chère au monde, ma mère, qui m'a permis de continuer mes études dans les meilleures conditions.

À la mémoire de mon très cher papa.

Mes sœurs, qui ont toujours été mes sources d'inspiration et de soutien : Karima, Fairouze et Nassima, pour leur influence lumineuse dans ma vie.

Mes très chers frères, mes nièces et mes neveux.

Tous mes amis, en particulier mon très cher amie Rayenne.

Ainsi que pour tous mes collègues : KENZA, Chiraz, Aya...

À toutes les personnes ayant participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

Hadil

Je dédie cette mémoire à mes parents pour leur amour inconditionnel et leur soutien indéfectible, ainsi qu'à mes sœurs pour leur présence et leurs encouragements constants. J'exprime également ma gratitude envers mes amis pour leur soutien et leur amitié précieuse tout au long de ce parcours.

Enfin, je souhaite rendre hommage à la mémoire de ma grand-mère qui restera à jamais dans mon cœur.

Rachha

Liste des tableaux

Tableau I.1: Classification botanique d'Eucalyptus [32].	12
Tableau I.2: Classification botanique d'Origan [62].	20
Tableau IV.1: Description des souches bactériennes utilisées.	78
Tableau IV.2: les masses de verres de farine et l'échantillon injecté dans chaque lot.	86
Tableau IV.3: Les constituants utilisés en formulation.	87
Tableau V.1: Rendement d'extraction de différentes méthodes (Eucalyptus globulus).	91
Tableau V.2: Rendement d'extraction de différentes méthodes (Origanum vulgare).	91
Tableau V.3: Résultats des Rendements d'Extraction Hydro-Type Clevenger pour l'Origan et l'Eucalyptus.	93
Tableau V.4: Analyse organoleptiques des deux huiles essentielles.	94
Tableau V.5 : Caractéristiques physico-chimiques des deux huiles essentielles.	94
Tableau V.6: Teneurs en flavonoïdes et polyphénols totaux.	97
Tableau V.7: Valeurs des IC50 obtenus avec les extraits et HEs d'Eucalyptus et l'Origan contre les radicaux DPPH et ABTS.	100
Tableau V.8: Valeurs d'A0.5 obtenues en utilisant les extraits et les huiles essentielles des deux plantes, ainsi que des standards.	105
Tableau V.9: Valeurs des IC50 obtenues avec les extraits et HEs d'Eucalyptus et d'Origan vis-à-vis de la dénaturation thermique du BSA.	110
Tableau V.10: L'échelle de Poncé des 4 classes de diamètres.	110
Tableau V.11: Diamètres des zones d'inhibitions des deux plantes sur E.coli et S.Aureus.	111
Tableau V.12: Résultats d'activité antifongique pour la concentration à 20% après 48 h.	116
Tableau V.13: Résultats avec les dilutions de 15 % et 10 % d'HE d'eucalyptus après 48 h.	119
Tableau V.14: Pourcentages de mortalité des larves de Tenebrio Molitor après l'injection des échantillons des deux plantes et le standard.	121
Tableau V.15: Les caractéristiques organoleptiques des produits finis.	124
Tableau V.16: Propriétés physico-chimique des produits finis.	125

Liste des figures

Figure I.1: Structure de base des alcaloïdes.	9
Figure I.2: Structure de base des polyphénols.....	9
Figure I.3: Structure de base des flavonoïdes.	10
Figure I.4: Structure de base des tanins (a) hydrolysables (b) condensés.....	10
Figure I.5: Les feuilles d'Eucalyptus.	12
Figure I.6: Les fleurs d'Eucalyptus.	12
Figure I.7: Les fruits d'Eucalyptus [31].	12
Figure I.8: Structure de cinéol [35].	13
Figure I.9: Structure d'alpha-pinène [37].	13
Figure I.10: Structure de Limonène [39].	14
Figure I.11: Structure de l'aromadendrène [41].	14
Figure I.12: Structure de globulol [43].	15
Figure I.13: Structure de lédol [45].	15
Figure I.14: Structure de quercétine [47].	16
Figure I.15: Structure de myricétine [49].	16
Figure I.16: Structure de kaemférol [51].	16
Figure I.17: Structure de rutine.	17
Figure I.18: Structure d'acide gallique [54].	17
Figure I.19: Les fleurs et les feuilles d'Origanum vulgare [60, 61].	19
Figure I.20: Structure de carvacrol [64].	20
Figure I.21: Structure de Thymol [66].	21
Figure I.22: Structure de p-Cymène [68].	21
Figure I.23: Structure de γ -Terpinène [70].	22
Figure I.24: Structure de α -Terpinéol [71].	22
Figure I.25: Structure de linalol [73].	22
Figure II.1: Les méthodes conventionnelles d'extraction des HE.....	27
Figure II.2: Système d'extraction par Hydrodistillation [84].	28
Figure II.3: Système d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau [88].	29
Figure II.4: Représentation schématique d'extraction par solvant [84].	30
Figure II.5: Méthodes d'extraction non conventionnelles des HEs.	32
Figure II.6: Système d'extraction par fluide supercritique [92].	33
Figure II.7: Système d'hydrodistillation assistée par micro-ondes [92].	34
Figure II.8: Représentation schématique du système d'EAU [92].	35

Figure II.9: Représentation schématique du système d'extraction par micro-ondes sans solvant [92].	36
Figure II.10: Principaux sites d'action des huiles essentielles [118].	39
Figure III.1: Structure de la peau.	46
Figure IV.1: Plante d'origan.	57
Figure IV.2: L'arbre d'Eucalyptus.	57
Figure IV.3: Séchage de la plante d'eucalyptus.	58
Figure IV.5: L'origan broyé.	59
Figure IV.5: Broyeur électrique.	59
Figure IV.6: Tamiseur vibrant.	59
Figure IV.7: Montage d'hydrodistillation type classique.	60
Figure IV.8: Montage d'hydrodistillation type clevenger.	60
Figure IV.10: Filtration sous vide.	62
Figure IV.10: Filtration simple.	62
Figure IV.11: Extraction par micro-onde.	63
Figure IV.12: Évaporateur rotatif.	63
Figure IV.13: Refractomètre HB96801.	66
Figure IV.14: Montage chauffage à reflux.	67
Figure IV.15: Structure de l'Acide gallique.	68
Figure IV.16: Structure de la Quercétine.	69
Figure IV.17: Étapes de préparation les dilutions.	70
Figure IV.18: Le travail sur une microplaque à 96 puits.	70
Figure IV.19: Mécanisme réactionnel intervenant lors de la réduction du radical DPPH.	71
Figure IV.20: Mécanisme Réactionnel du radical ABTS•+en présence d'un antioxydant.	72
Figure IV.21: Mécanisme réactionnel du test FRAP.	74
Figure IV.22: Formation du complexe Fe ⁺² –phenanthroline.	75
Figure IV.23: Préparation des disques.	79
Figure IV.24: La gélose de Mueller-Hinton coulée dans des boîtes de Pétri.	79
Figure IV.25: Préparation des suspensions bactériennes.	80
Figure IV.26: Ensemencement sur milieu solide à l'aide d'écouvillon.	81
Figure IV.27: Préparation le milieu de culture PDA.	83
Figure IV.28: Dépôt des disques au centre de la boîte de Pétri.	84
Figure IV.29: les différentes étapes de cycle de développement de vers de farine.	85
Figure IV.30: Injection de larves à l'aide d'une seringue Hamilton de 10 µl.	86
Figure IV.31: Mesure de viscosité par un viscosimètre.	88

Figure V.1: Taux d'humidité d'eucalyptus.	90
Figure V.2: Variation des rendements d'extraction de l'eucalyptus et de l'origan selon la méthode d'extraction.	92
Figure V.3: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	96
Figure V.4: Courbe d'étalonnage de la quercétine.	97
Figure V.5: Teneurs en polyphénols totaux pour les extraits et les HEs des plantes.....	98
Figure V.6: Teneurs en flavonoïdes pour les extraits et les HEs de plantes.	99
Figure V.7: Profil de la microplaque de dosage de l'activité anti-radicalaire (DPPH).....	101
Figure V.8: Activité antiradicalaire des extraits de plantes et des huiles essentielles (A) et des standards (B) contre le radical DPPH.	102
Figure V.9: Profil de la microplaque de dosage de l'activité antiradicalaire (ABTS).	103
Figure V.10: Activité antiradicalaire des extraits de plantes et des huiles essentielles (A) et des standards (B) contre le radical d'ABTS.	104
Figure V.11: Profil de la microplaque de l'activité de pouvoir réducteur.	105
Figure V.12: Pouvoir réducteur des extraits et des huiles essentielles des deux plantes (A) et des standards Trolox et acide ascorbique (B), à différentes concentrations.	107
Figure V.13: Profil de la microplaque de test de phenanthroline.....	107
Figure V.14: Test phenanthroline des extraits et des huiles essentielles des deux plantes (A) et des standards Trolox et acide ascorbique (B), à différentes concentrations.	109
Figure V.15: L'inhibition des bactéries par antibiotique amoxicilline 30µg (Témoin +) par méthanol (Témoin -).....	111
Figure V.16: l'inhibition de l'activité des deux bactéries par l'extrait d'eucalyptus.	112
Figure V.17: l'inhibition de l'activité des deux bactéries par l'extrait d'eucalyptus.	113
Figure V.18: l'inhibition de l'activité des deux bactéries par l'extrait d'origan.....	113
Figure V.19: l'inhibition de l'activité des deux bactéries par l'HE d'origan.....	114
Figure V.20: Activité antibactérienne des huiles essentielles contre les deux bactéries.....	114
Figure V.21: Activité antibactérienne des extraits méthanoliques contre les deux bactéries.	114
Figure V.22: Résultats avec l'extrait méthanolique d'eucalyptus 20 % après 48h.	116
Figure V.23: Résultats avec l'extrait méthanolique d'origan 20 % après 48h.	117
Figure V.24: Résultats avec l'HE d'origan 20 % après 48h.	117
Figure V.25: Résultats avec l'HE d'eucalyptus 20 % après 48h.....	117
Figure V.26: Résultats avec l'HE d'eucalyptus à 20 % après 5 jours de déplacement.	118
Figure V.27: Résultats avec l'HE d'origan à 20 % après 5 jours de déplacement.....	118
Figure V.28: Effet de l'huile d'Eucalyptus sur le taux d'inhibition de la croissance de FOL à différentes concentrations.	119
Figure V.29: Résultats avec les dilutions de 15% et 10% d'HE d'eucalyptus après 48h.	119

Figure V.30: Résultats avec les dilutions de 15 % et 10 % d'HE d'eucalyptus après 5 jours d'incubation.....	120
Figure V.31 : histogrammes montre les pourcentages de mortalités, survivants et développements des extraits et standards de test de toxicité sur les vers de farine.....	121
Figure V.32: Résultats des cas de larves injectées par différents échantillons.	122
Figure V.33: Résultats de larves injectées par le témoin standard méthanol.	122
Figure V.34: le vick commerciale.	123
Figure V.36: Vick à base de deux huiles essentielles.	123
Figure V.36: Vick à base de deux extraits.	123
Figure V.37: Le produit fini après 20 jour à l'air libre.	124

Liste des abréviations

%	Pourcentage
°C	Degré Celsius
µg	Microgramme
µl	Microlitre
µm	Micromètre
A _{0.5}	Absorbance 0.5
AFNOR	Association Française de NORmalisation
Cm	Centimètre
CO ₂	Dioxyde de carbone
DL ₅₀	Dose létale 50
E/H	Eau dans l'huile
EAU	Extraction assistée par ultrasons
EFS	Extraction par fluide supercritique
EMSS	Extraction par micro-ondes sans solvant
ERO	Espèces radicalaires de l'oxygène
FOL	Fusarium oxysporum f. sp lycopersici
G	Gramme
GAE	Équivalent d'acide gallique
H	Heure
H/E	Huile dans l'eau
HD	Hydrodistillation
HDAM	Hydrodistillation assistée par micro-ondes
HE	HE
IC50	Concentration inhibitrice 50%
ICUMSA	Comité international de la méthode uniforme d'analyse du sucre tenu en 1974
IPA	ingrédients pharmaceutiques actifs
Kg	Kilogramme
méq	Milliéquivalent
Mg	Milligramme
ml	Millilitre
Mm	Millimètre
mM	Millimolaire
MO	Micro-organisme
Nm	Nanomètre
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
Pc	Pression critique
PDA	Potato Dextrose Agar
PEG	polyéthylène glycol
Ph	Potentiel d'hydrogène
QE	Équivalent de Quercetine
Tc	Température critique
VVR	Vicks VapoRub

Table des matières

Remerciements	I
Dédicace	II
Liste des tableaux	III
Liste des figures	IV
Liste des abréviations	VIII
Table des matières	IX
Introduction générale.....	1
I. Phytothérapie et plantes médicinales	5
I.1. Développement de la phytothérapie	5
I.1.1. Introduction	5
I.1.2. Définition.....	5
I.1.3. Différents types de phytothérapie.....	6
I.1.4. Différents types de phytothérapie.....	6
I.1.5. Avantages et utilisation de la phytothérapie.....	7
I.2. Plantes médicinales	8
I.2.1. Définition.....	8
I.2.2. Principes actifs des plantes médicinales	8
I.3. Présentation des plantes étudiées	11
I.3.1. Eucalyptus	11
I.3.2. Origan	18
II. Huiles essentielles et méthodes d'extraction	24
II.1. Définition des huiles essentielles	25
II.2. Répartition et localisation des huiles essentielles	25
II.3. Paramètres influençant l'extraction	25
II.4. Méthodes d'extraction des huiles essentielles	27
II.4.1. Méthodes Conventionnels	27
II.4.2. Méthodes non Conventionnelles (Innovantes).....	32
II.5. Mode de conservation des huiles essentielles	36
II.6. Activités des huiles essentielles	37
II.6.1. Activité antioxydante	37
II.6.2. Activité antimicrobienne	38
II.6.3. Activité antifongique.....	39
II.6.4. Activité anti-inflammatoire	40
II.7. Toxicité des huiles essentielles	40

II.8. Principales utilisations des huiles essentielles	41
II.8.1. En pharmacie	41
II.8.2. En parfumerie et Cosmétiques	42
II.8.3. En industries agro-alimentaires	42
II.8.4. En diverses industries	43
III. Formulation d'une pommade vick	44
III.1. Introduction	45
III.2. Définition de la formulation	45
III.3. Généralité sur la peau	45
III.3.1. Structure et fonction de la peau.....	45
III.3.2. Absorption cutané	47
III.4. Inflammations et anti-inflammatoire	47
III.4.1. Inflammation.....	47
III.5. Caractéristiques des principales formes galéniques dermiques.....	48
III.5.1. Crème dermique.....	48
III.5.2. Pate dermique.....	48
III.5.3. Pommade.....	48
III.5.4. Solution et lotion à usage externe	49
III.6. Préparations semi-solides pour application cutanée	49
III.6.1. Pommades	49
III.6.2. Classifications des pommades	49
III.7. Généralité sur les vicks.....	50
III.7.1. Introduction.....	50
III.7.2. Définition de Vicks	51
IV. Matériels et méthodes	54
IV.1. Matériels et produits chimiques	54
IV.1.1. Équipements	54
IV.1.2. Verreries et outils.....	54
IV.1.3. Consommables utilisés	55
IV.1.4. Produits chimiques.....	55
IV.2. Matériel végétal	57
IV.2.1. Récolte	57
IV.2.2. Séchage	58
IV.2.3. Broyage et Tamisage	58
IV.3. Méthodes d'extraction.....	59

IV.3.1. Extraction des HEs par hydrodistillation	60
IV.3.2. Extraction solide-liquide par macération	61
IV.3.3. Extraction par micro-onde	62
IV.4. Caractérisations des huiles essentielles	64
IV.4.1. Caractéristiques organoleptiques	64
IV.4.2. Analyses physiques.....	65
IV.4.3. Analyses chimiques	66
IV.5. Dosage colorimétrique des polyphénols et flavonoïdes	68
IV.5.1. Dosage des composés phénoliques totaux (TPC).....	68
IV.5.2. Dosage des flavonoïdes	69
IV.6. Évaluation de l'activité antioxydante des HE et des extraits	70
IV.6.1. Activité de piégeage du radical DPPH* (2-2-Diphenyl-1- picrylhydrazyl)	71
IV.6.2. Inhibition du radical positif ABTS ⁺ ou 2,2-Azino-bis (3- ethylbenzthiazoline-6- sulphonic Acid).....	72
IV.6.3. Mesure du pouvoir réducteur ou FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter).....	74
IV.6.4. Activité de réduction par la formation du complexe Fe ⁺² –phenanthroline	75
IV.7. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro	76
IV.7.1. Principe	76
IV.7.2. Mode opératoire.....	76
IV.8. Évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles et les extraits méthanolique.....	77
IV.8.1. Activité antibactérienne	77
IV.8.2. Activité antifongique	82
IV.9. Test de toxicité des extraits et des HEs	85
IV.9.1. Test de toxicité su ver de farine	85
IV.10. Formulation et contrôle de la qualité de la pommade Vick	86
IV.10.1. Mode opératoire (à base des huiles essentielles)	87
IV.10.1. Mode opératoire (à base des extraits)	87
IV.10.2. Contrôle de qualité.....	87
V. Résultats et discussions	89
V.1. Matériel végétale	90
V.1.1. Taux d'humidité (Eucalyptus globulux)	90
V.1.2. Rendements d'extraction.....	90
V.2. Caractérisation des huiles essentielles	93
V.2.1. Caractéristiques organoleptiques	93

V.2.2. Caractéristiques physico-chimiques.....	94
V.3. Estimation de la teneur totale en polyphénols et flavonoïdes.....	95
V.4. Effet anti-radicalaire	100
V.5. Réduction des ions métalliques	105
V.6. Effet anti-inflammatoire (in vitro)	109
V.7. Activité antibactérienne	110
V.8. Effet antifongique	115
V.9. Test de toxicité sur les vers de farine Tenebrio Molitor.....	121
V.10. Formulation et contrôle de la qualité de la pommade Vick.....	123
V.10.1. Caractéristiques macroscopiques (organoleptiques).....	123
V.10.2. Propriétés physico-chimique.....	125
Conclusion générale	126
Résumé.....	128
Abstract	129
ملخص.....	130
Références bibliographique.....	132

Introduction générale

Depuis longtemps, la médecine traditionnelle utilise les plantes médicinales comme une drogue végétale qui peuvent être utilisées entières ou sous forme d'une partie, à des fins thérapeutiques. Il est actuellement reconnu qu'elles constituent une source importante de molécules bioactives.

L'Algérie ne fait pas exception, c'est un pays riche en flore, et cela est dû à sa position géographique, présente une large gamme d'étages bioclimatiques, induisant une biodiversité de plantes

Les plantes médicinales contiennent une multitude de composés bioactifs tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les terpènes et les tanins, qui leur confèrent leurs propriétés thérapeutiques spécifiques. Ces composés agissent souvent de manière synergique pour offrir des effets pharmacologiques variés, tels que anti-inflammatoires, antiseptiques, antioxydants, analgésiques et immun modulateurs [1][2].

L'Eucalyptus est une plante médicinale de la famille de Myrtaceae, Chimiquement cette famille est riche en composé phénoliques et en tannins et elle est aussi reconnue comme une des principales familles qui produit des flavonoïdes.

Pour l'origan, il appartient à la famille des Lamiacées utilisées comme source d'épices et d'extraits à forts pouvoir antibactérien et antioxydant.

D'un autre coté Les huiles essentielles sont des extraits naturels concentrés obtenus à partir de plantes aromatiques, contenant une complexité de composés volatils aux propriétés thérapeutiques diversifiées.

Ces substances aromatiques ont été utilisées dans diverses cultures pour leurs vertus médicinales, cosmétiques et aromatiques. Chaque huile essentielle est unique en raison de sa composition chimique complexe, principalement constituée de terpènes, phénols, alcools, esters et autres composés. Ces substances confèrent à chaque huile ses propriétés spécifiques, telles que les propriétés antiseptiques, anti-inflammatoires, analgésiques, stimulantes, calmantes ou cicatrisantes [3].

Elles sont obtenues par différents procédés d'extraction qui préservent leurs propriétés bioactives et aromatiques. Ces méthodes varient en fonction des caractéristiques des plantes, des composés recherchés et des applications finales des huiles essentielles [4].

L'intégration des huiles essentielles dans les formulations médicamenteuses nécessite une compréhension approfondie de leur chimie complexe et de leurs interactions avec d'autres excipients. Elles sont souvent incorporées dans diverses formes galéniques telles que des crèmes, des pommades des gels, des lotions, des capsules ou des comprimés [3].

L'objectif de ce travail est de formuler un Vick anti-inflammatoire en utilisant des huiles essentielles et des extraits de deux plantes médicinales, *Eucalyptus globulus* et *Origanum vulgare*. Le choix de ces deux plantes est motivé par leur efficacité reconnue contre les problèmes inflammatoires. Des analyses approfondies ont été menées sur les huiles essentielles et les extraits des deux plantes, incluant des évaluations de leurs activités antioxydants, anti-inflammatoires, antifongiques et antibactériennes. Des tests de conformité des produits finis ont également été réalisés dans le but de valoriser la flore algérienne et d'améliorer la culture de formulations médicamenteuses à base de principes actifs issus de plantes médicinales.

Dans le cadre de cette étude, ce mémoire est composé de cinq chapitres répartis comme suit :

Le chapitre I concerne une revue bibliographique approfondie sur la phytothérapie et les plantes médicinales, en mettant en valeur les propriétés curatives d'*Eucalyptus globulus* et l'*Origanum vulgare*.

Le chapitre II du manuscrit explore en détail les huiles essentielles, en examinant les différentes méthodes extractives utilisées pour l'obtention de ces précieux extraits aromatiques issus de plantes, mettant ainsi que les processus variés et les technologies innovantes impliquées.

Le chapitre III est consacré à la formulation d'un Vick anti-inflammatoire, en explorant diverses formes semi-solides adaptées à cette application spécifique.

Le chapitre IV présentera le matériel et les méthodes utilisées notamment l'extraction des huiles essentielles et l'analyse de leur composition chimique ainsi que l'évaluation de toutes les activités appliquées et on termine avec la formulation du vick.

Le chapitre V abordera les résultats obtenus et leurs discussions.

Le manuscrit sera achevé par une conclusion générale qui synthétisera l'ensemble des résultats.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

La phytothérapie et les plantes
médicinales



I. Phytothérapie et Plantes médicinales

I.1. Développement de la phytothérapie

I.1.1. Introduction

Depuis des milliers d'années, l'homme a toujours compté sur les propriétés curatives des plantes médicinales pour se soigner. Une grande partie de ces plantes n'a pas encore dépassé le stade de la croyance (on parle ici de médecine populaire), mais l'efficacité de certaines plantes médicinales a été scientifiquement prouvée. C'est le cas par exemple du thym (un antiseptique puissant) ou du millepertuis (un antidépresseur utilisé pour traiter la dépression légère à modérée). De nombreuses recherches sont actuellement menées dans le monde (notamment dans les instituts de phytothérapie et les écoles de pharmacie) [1].

La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme. Les plantes utilisées en médecine comme une source naturelle et renouvelable de métabolites secondaires, et utilisées pour la production des médicaments et le traitement de diverses maladies [2].

L'Organisation Mondiale de la Santé estime que la médecine traditionnelle couvre les besoins en soins de santé primaires de 80% de la population des pays en voie de développement [3].

I.1.2. Définition

D'un point de vue étymologique, « La phytothérapie est un nom grec qui signifie traitement avec les plantes (*Phyton* = Plante et *Therapeia* = traitement) » [4].

C'est le domaine de la médecine qui utilise les plantes médicinales pour traiter des maladies fines thérapeutiques. Il utilise les connaissances traditionnelles pour prévenir ou utiliser des plantes et des parties de plantes pour traiter des maladies mineurs ou préparations à base de plantes, que ce soit par ingestion ou application topique [5].

Au fait, elle est employée dans le cadre de la médecine traditionnelle où elle est pratiquée sous différentes formes. Cette discipline représente une alternative très reconnue par la médecine et dénuée de tout effet toxique pour le patient, en revanche, certaines maladies

exigent des traitements lourds comme les antibiotiques (un principe actif efficace) ou d'autres molécules synthétiques. La phytothérapie est utilisée par les populations pour se soigner et traiter quelques maladies chroniques comme : le diabète, l'hypertension et les infections des voies urinaires [6].

I.1.3. Différents types de la phytothérapie

I.1.3.1. Phytothérapie traditionnelle

Repose sur un ensemble d'idées, de croyances, idées philosophiques, connaissances sans preuves scientifiques l'expérience a été menée en raison du manque d'outils scientifiques à l'époque [7]. Cependant, la phytothérapie moderne est apparue après l'avènement de la chimie moderne. Il est logique qu'elle ait joué un rôle important dans le développement de la phytothérapie, Expliquer la phytothérapie traditionnelle après avoir étudié les plantes médicinales, ce qui aide découvrez comment fonctionnent les ingrédients thérapeutiques de ces plantes, et aussi l'utilisation de produits extraits ou de synthèse est encouragée. On peut dire rendre les choses claires [8].

I.1.3.2. Phytothérapie clinique ou moderne

La pharmacognosie, l'ethnopharmacologie et, plus récemment, la phytothérapie clinique ont permis de réaliser la transition vers une phytothérapie « moderne » et de maximiser l'usage des plantes médicinales. La phytothérapie moderne combine les connaissances traditionnelles sur les plantes médicinales avec les dernières découvertes scientifiques. Elle utilise des méthodes d'extraction et d'analyse avancées pour identifier les composés actifs présents dans les plantes, et confirme leurs effets bénéfiques sur la santé grâce à des études biochimiques, pharmacologiques et des essais cliniques [9].

I.1.4. Différents types de phytothérapie

Il existe plusieurs genres de phytothérapie :

A. Aromathérapie

Est une thérapeutique qui utilise les essences des plantes, ou les huiles essentielles, substances aromatiques secrétées par de nombreuses familles de plantes ; ces huiles sont des produits complexes à utiliser souvent à travers la peau [10].

B. Gemmothérapie

C'est une méthode de traitement tout à fait originale ; en utilisant des tissus végétaux embryonnaires en croissance, tels que des pousses, pousses fraîches, racines, préparées par macération dans un mélange eau-alcool-glycérine se procurer une préparation appelée « macérât glycéiné » [11].

C. Homéopathie

A recours aux plantes d'une façon prépondérante, mais non exclusive ; les trois quarts des souches sont d'origine végétale, le reste étant d'origine animale et minérale [12].

D. Phyto-balnéothérapie

La balnéothérapie désigne tout soin, qu'il soit général ou local, apporté par les bains. Les principaux supports de cette technique sont les bains liquides, qu'ils soient à base d'eau douce ou d'eau de mer, ainsi que les bains de boue [13]. La phyto-balnéothérapie, également appelée thérapie de KNEIPP, a été mise au point il y a environ cent ans. Elle consiste à ajouter des extraits de plantes dans les bains chauds [14].

E. Phytothérapie pharmaceutique

La phytothérapie pharmaceutique est un traitement médical qui utilise des plantes médicinales pour prévenir et traiter les maladies. Ce type de traitement implique l'extraction des principes actifs des plantes, qui sont ensuite transformés en produits pharmaceutiques contrôlés, tels que des médicaments, des suppléments alimentaires, des cosmétiques et des dispositifs médicaux. Ces produits doivent être autorisés par les autorités sanitaires et fabriqués de manière reproductible et contrôlée afin d'assurer leur qualité, leur sécurité et leur efficacité [15].

I.1.5. Avantages et utilisation de la phytothérapie

Les plantes employées en phytothérapie peuvent posséder des propriétés anti-inflammatoires, antioxydants, analgésiques (antidouleur), antispasmodiques et bien d'autres effets positifs sur la santé. La phytothérapie est efficace pour traiter divers problèmes de santé tels que les douleurs musculaires, les problèmes digestifs, les troubles du sommeil, les problèmes hormonaux, les infections, les allergies, et bien d'autres encore, Elle peut également être utilisée pour renforcer le système immunitaire et prévenir les maladies [16].

I.2. Plantes médicinales

I.2.1. Définition

Il existe plusieurs définitions pour parler d'une plante médicinale mais, pour faire simple, ce terme désigne

Une plante utilisée pour ses propriétés thérapeutiques, c'est-à-dire qu'au moins une de ses parties (feuille, tige, racine, etc...) peut être employée dans le but de se soigner [17].

Une plante médicinale est une plante ou une partie de plante qui est utilisée pour ses propriétés médicinales. Elle peut être utilisée pour prévenir, soulager ou traiter des problèmes de santé. Les plantes médicinales n'ont pas d'utilisation en tant que condiment, produit d'hygiène ou alimentaire [18, 19].

I.2.2. Principes actifs des plantes médicinales

Les plantes médicinales contiennent une grande diversité de principes actifs aux propriétés thérapeutiques variées, qui agissent seuls ou en synergie pour soigner et prévenir les problèmes de santé. Actuellement plus de 100000 métabolites secondaires ont été identifiées. Ils appartiennent à trois classes principales qui sont : les terpènes (un groupe des lipides), les alcaloïdes (dérivés d'acides aminés), et les composés phénoliques (dérivés de glucides) [10].

I.2.2.1. Alcaloïdes

Sont des substances azotées qui possèdent différentes propriétés thérapeutiques telles que des effets analgésiques, antispasmodiques et stimulants [20]. Les alcaloïdes sont un ensemble varié de molécules organiques naturelles, qui peuvent représenter des structures complexes. Ces produits sont fréquemment toxiques ou risqués pour l'organisme, en particulier à une dose importante. Il sera donc nécessaire de les utiliser sous contrôle médical rigoureux et à un dosage très limité. Puisqu'ils sont souvent extrêmement actifs, même à de petites quantités [21].

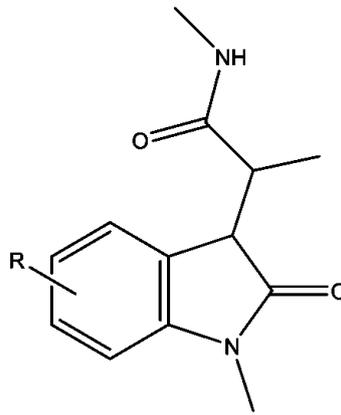


Figure I.1: Structure de base des alcaloïdes.

I.2.2.2. Polyphénols

Les polyphénols forment une catégorie de molécules hydrosolubles qui se retrouve fréquemment dans les plantes. Ils se distinguent par la présence de diverses associations de groupements phénoliques dans des structures plus ou moins complexes, généralement de poids moléculaire élevé. Les phyto-nutriments jouent un rôle essentiel dans la défense de la plante contre les agressions de l'environnement [22].

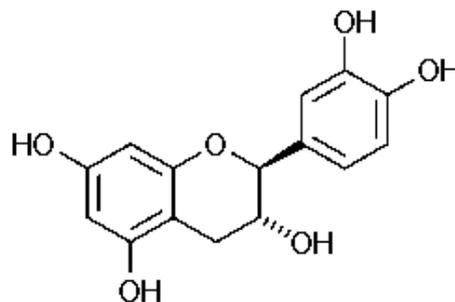


Figure I.2: Structure de base des polyphénols.

I.2.2.3. Flavonoïdes

Constituent des composés naturels de la vaste famille des polyphénols. Elles sont présentes dans diverses régions de la plante. Les fruits, les fleurs et les feuilles sont présents. Il y en a plus de 8 000, selon les chercheurs, sans compter celles qui n'ont pas encore été repérées. Cette molécule est en train de devenir votre meilleur allié santé, car elle se dissimule dans de nombreuses plantes. C'est une véritable arme contre les radicaux

libres [23].

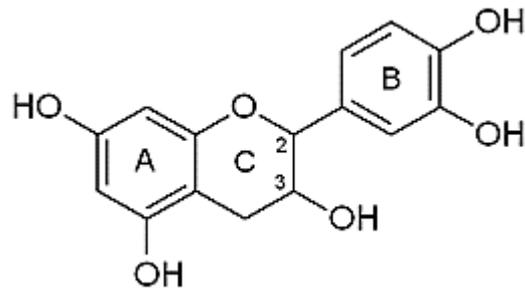


Figure I.3: Structure de base des flavonoïdes.

I.2.2.4. Tanins

Il s'agit de composés phénoliques présents dans de nombreuses parties des plantes, telles que les écorces, les feuilles, les fruits et les graines. Ils jouent un rôle crucial dans l'écologie et la biochimie des plantes, en les préservant des agressions extérieures. Ils contribuent également à la couleur et à la saveur de nombreux organes végétaux tels que les fleurs, les fruits et les floraisons [24].

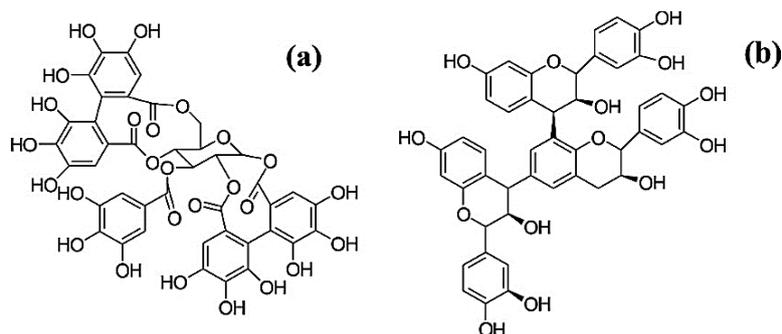


Figure I.4: Structure de base des tanins (a) hydrolysables (b) condensés.

I.2.2.5. Saponines

Sont des éléments de la famille des glucosides qui se trouvent dans de nombreuses plantes. Elles se distinguent par leur composition en glucides et en molécule aromatique. Les saponines possèdent diverses caractéristiques, telles que des effets expectorants et sécrétolytiques, qui sont bénéfiques dans le traitement des maladies des voies respiratoires supérieures [25].

I.2.2.6. Huiles Essentielles

Sont des extraits naturels provenant de plantes, qui renferment des composés aromatiques riches et avantageux pour la santé et le moral. Elles sont employées dans le domaine de

l'aromathérapie en raison de leurs vertus thérapeutiques, cosmétiques et sensorielles ils sont obtenues par distillation à la vapeur d'eau ou par pression à froid des parties odorantes des plantes [26].

I.2.2.7. Vitamines

Les vitamines sont des substances organiques essentielles pour le bon fonctionnement du métabolisme des êtres vivants. Elles sont classées en deux catégories : les vitamines liposolubles (A, D, E, et K) et les vitamines hydrosolubles (B et C) [27].

I.2.2.8. Minéraux

Sont des substances naturelles solides, inorganiques et homogènes, caractérisées par une composition chimique définie et une structure cristalline ordonnée. Ils sont formés par des processus géologiques sur de longues périodes de temps et se trouvent dans la croûte terrestre [28].

I.3. Présentation des plantes étudiées

I.3.1. Eucalyptus

I.3.1.1. Description de la plante

L'eucalyptus, originaire d'Australie, appartient au genre *Eucalyptus* de la famille des Myrtaceae [29]. Cette plante se caractérise par son feuillage persistant et aromatique, ainsi que par son écorce décorative. Les eucalyptus sont réputés pour leur croissance rapide et leur capacité à s'adapter à divers environnements. Ils varient en taille, allant de petits buissons à de très grands arbres pouvant atteindre jusqu'à 90 mètres de hauteur. Parmi les espèces les plus populaires, on trouve l'*Eucalyptus globulus*, également connu sous le nom de gommier bleu, et l'*Eucalyptus gunnii*, reconnaissable à ses feuilles rondes. Ces plantes nécessitent un sol bien drainé, un emplacement ensoleillé et protégé des vents froids. La taille des eucalyptus est généralement recommandée au printemps pour maintenir leur forme, bien que pour les spécimens adultes en pleine terre, elle ne soit pas indispensable [30].



Figure I.5: Les feuilles d'Eucalyptus.



Figure I.6: Les fleurs d'Eucalyptus.



Figure I.7: Les fruits d'Eucalyptus [31].

I.3.1.2. Classification botanique d'Eucalyptus

Le tableau présente la classification botanique d'Eucalyptus :

Tableau I.1: Classification botanique d'Eucalyptus [32].

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Sous-règne	Tracheobionta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Myrtales
Famille	Myrtaceae
Espèce	Eucalyptus globulus (Labill.)

I.3.1.3. Principes actifs d'Eucalyptus

Chaque espèce végétale contient un certain nombre de substances, lesquelles sont tirées du métabolisme de la plante et s'élaborent comme produits secondaires. Les principes actifs de *Eucalyptus globulus* comprennent principalement :

❖ HE

1. Oxydes Terpéniques

Cinéol (Eucalyptol) : est un composé naturel organique incolore. C'est un monoterpène qui appartient à la famille des éthers cycliques. Il est nommé cinéol ou 1,8-cinéol [33]. L'eucalyptol est trouvé dans l'HE de certains eucalyptus... [34]. Le cinéol est l'un des principaux constituants de *Eucalyptus globulus*, responsable de la plupart des propriétés médicinales de la plante. On l'emploie pour soigner les maladies respiratoires telles que la bronchite, la toux et les rhinites [34].

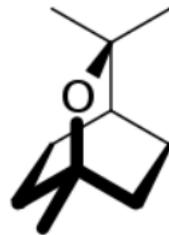


Figure I.8: Structure de cinéol [35].

2. Mono-terpènes

L'**Alpha-pinène** est l'un des composés terpéniques les plus présents dans les HES de nombreuses plantes aromatiques telles que l'eucalyptus, le romarin et le pin. Il est réputé pour ses propriétés antiseptiques, anti-inflammatoires, bronchodilatatrices et antioxydantes [36].

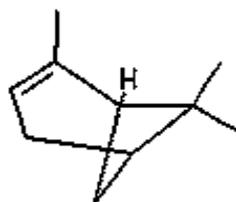


Figure I.9: Structure d'alpha-pinène [37].

Le **limonène** est un composant présent dans de nombreuses HEs de plantes telles que l'eucalyptus, les pins et les menthes. Il possède des propriétés antiseptiques, anti-inflammatoires, bronchodilatatrices et antioxydantes. Par exemple, l'eucalyptus contient environ 0,5 à 11 % de limonène [38].

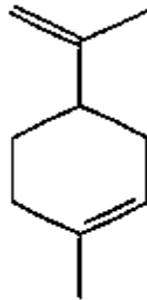


Figure I.10: Structure de Limonène [39].

3. Sesquiterpènes

L'**Aromadendrène** est un composé chimique naturellement présent dans certaines espèces d'Eucalyptus. Il possède plusieurs applications industrielles, notamment dans la pharmacie, la parfumerie, la cosmétologie, l'agriculture et l'industrie alimentaire. Ces applications sont basées sur les propriétés chimiques et biologiques de l'aromadendrène, telles que son potentiel antimicrobien et antioxydant [40].

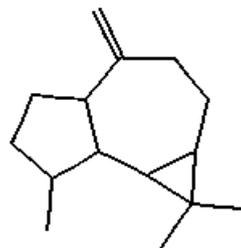


Figure I.11: Structure de l'aromadendrène [41].

4. Sesquiterpénols

Le **globulol** est un composant majeur des HEs extraites des feuilles et des branches d'Eucalyptus globulus. Il est renommé pour ses propriétés antiseptiques, anti-inflammatoires et antioxydantes [42].

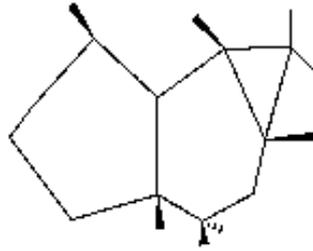


Figure I.12: Structure de globulol [43].

Le **lédol** est un sesquiterpène présent dans les HES de certaines plantes, notamment dans les espèces du genre *Eucalyptus*. Il possède des propriétés biologiques antimicrobiennes, anti-inflammatoires et antioxydantes [44].

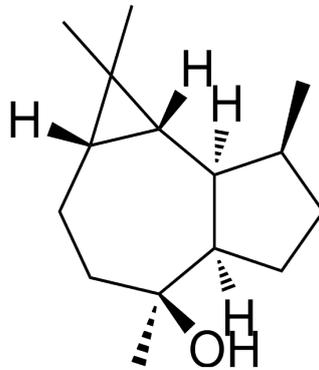


Figure I.13: Structure de lédol [45].

❖ Flavonoïdes

Les flavonoïdes présents dans l'*Eucalyptus globulus* contribuent à ses propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Les principaux flavonoïdes sont :

1. Quercétine

La quercétine est un puissant antioxydant et un composé organique qui protège les plantes de l'oxydation causée par le rayonnement solaire. Elle est connue pour ses effets antioxydants et anti-inflammatoires [46].

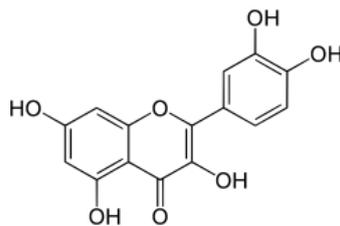


Figure I.14: Structure de quercétine [47].

2. Myricétine

Le **myrcène** est un mono-terpène présent naturellement dans de nombreuses plantes. Il est connu pour ses propriétés médicinales et aromatiques, notamment ses effets sédatifs, anti-inflammatoires, antioxydants et antimicrobiens [48].

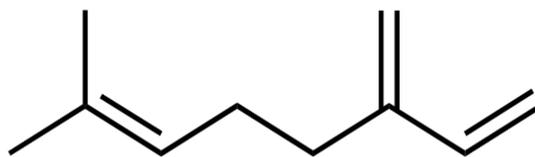


Figure I.15: Structure de myricétine [49].

3. Kaempférol

Le **kaempférol** est un flavonoïde qui se trouve naturellement dans de nombreuses plantes. Il est également utilisé dans l'industrie du parfum et de la cosmétique en raison de ses propriétés aromatiques et antioxydantes, ainsi que de ses bienfaits anti-cancéreux, anti-inflammatoires et antiviraux [50].

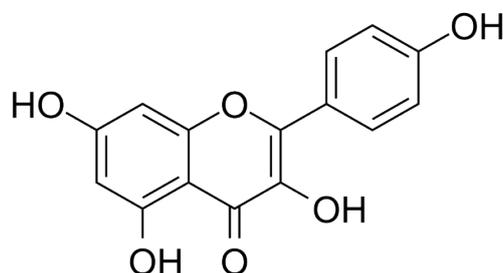


Figure I.16: Structure de kaempférol [51].

4. Rutine

La rutine est un flavonoïde naturellement présent dans l'*Eucalyptus globulus* qui possède des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Elle est connue pour ses effets bénéfiques sur la santé en améliorant la perméabilité et la résistance des vaisseaux sanguins [52].

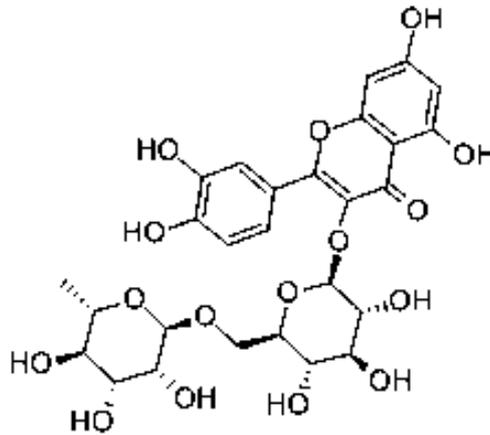


Figure I.17: Structure de rutine.

❖ Tanins

Sont des composés phénoliques naturels trouvés dans les plantes, qui ont des propriétés anti-inflammatoires et antiseptiques.

1. Acide gallique

L'acide gallique est un composé phénolique essentiellement présent dans les feuilles de l'*Eucalyptus globulus*. Il joue un rôle crucial dans les propriétés médicinales de cette plante, en agissant comme un antioxydant puissant, un agent antimicrobien efficace et un inhibiteur enzymatique [53].

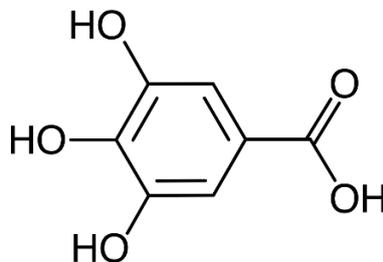


Figure I.18: Structure d'acide gallique [54].

2. Ellagitanins

Les ellagitanins sont des composés phytochimiques précieux qui se trouvent dans *Eucalyptus globulus* et d'autres espèces d'Eucalyptus. Ils jouent un rôle crucial dans les propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes et anticancéreuses de cette plante, ce qui contribue à ses nombreuses applications médicinales et thérapeutiques [55].

I.3.1.4. Intérêts thérapeutiques d'Eucalyptus globulus

Les feuilles d'Eucalyptus, particulièrement celles de *Eucalyptus globulus*, ont été rapidement intégrées dans les pharmacopées de nombreux pays comme la Chine, l'Inde, le Sri Lanka, l'Afrique du Sud, l'île de la Réunion et divers pays européens. La production commerciale d'HE d'Eucalyptus a commencé en 1860 dans la région de Victoria, en Australie. Aujourd'hui, l'Australie, le Maroc, l'Espagne et certains pays de l'ex-URSS figurent parmi les principaux producteurs mondiaux [34].

Au XIXe siècle, l'HE d'Eucalyptus était utilisée pour aseptiser les cathéters urinaires dans les hôpitaux anglais. De nombreuses préparations pharmaceutiques destinées aux affections respiratoires, comme le Vicks Vaporub, en contiennent. Actuellement, elle est également utilisée dans la fabrication de bains de bouche tels que Listerine et dans les dentifrices [33]. En dentisterie, les produits et solvants endodontiques intègrent souvent des huiles de plantes, y compris l'huile de clou de girofle et l'huile d'Eucalyptus. De plus, cette huile sert également de dégraissant industriel. L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) reconnaît l'usage traditionnel des feuilles et de l'HE d'Eucalyptus (*E. globulus*) pour soulager la fièvre, les symptômes de l'asthme, ainsi que pour traiter l'inflammation des voies respiratoires, de la gorge ou des muqueuses de la bouche (par voie interne), et pour apaiser les douleurs rhumatismales (par voie externe) [34].

I.3.2. Origan

I.3.2.1. Généralités

L'Origan est l'une des plantes les plus importantes de l'Antiquité. Pline (Ier siècle ap. J.C.) lui accorde une place de choix dans le livre XX de son Histoire naturelle, en décrivant en détail ses différentes formes et utilisations [56]. L'Origan était considéré comme une panacée [57]. Il était largement utilisé comme anti-infectieux, bactéricide, antitussif, expectorant, carminatif et emménagogue. Il a été employé depuis longtemps pour traiter les infections

respiratoires (par inhalation), ainsi que diverses maladies de peau (qu'elles soient infectieuses ou non). Les tisanes, inhalations, compresses, huile et décoctions étaient utilisées tant en applications externes qu'internes [58].

I.3.2.2. Description de la plante

L'origan (*Origanum vulgare*) est une plante herbacée originaire d'Europe et d'Asie occidentale. Cette plante appartient à la famille des Lamiacées et se distingue par ses petites feuilles ovales vert foncé qui dégagent un arôme intense lorsqu'elles sont froissées. Les fleurs de l'origan sont petites et peuvent être blanches ou roses, regroupées en épis ou en cymes, selon la variété. L'origan est apprécié pour son goût piquant et légèrement amer. En plus de son utilisation culinaire, l'origan est également utilisé en herboristerie pour ses propriétés médicinales, notamment ses effets antiseptiques, digestifs et stimulants [59].



Figure I.19: Les fleurs et les feuilles d'*Origanum vulgare* [60, 61].

I.3.2.3. Classification botanique d'Origan

Le tableau présente la classification botanique d'*Origanum vulgare* :

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Sous-règne	Tracheobionta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Espèce	<i>Origanum vulgare</i> L., 1753

Tableau I.2: Classification botanique d'Origan [62].

I.3.2.4. Principes actifs d'*origanum vulgare*

Les principes actifs d'Origan comprennent principalement :

❖ HE

1. Carvacrol

Le carvacrol est un phénol mono-terpénique naturellement présent dans certaines plantes, en particulier dans l'*Origanum vulgare*, où il est le principe actif le plus abondant. Il possède de nombreuses propriétés bénéfiques pour la santé, telles que son activité antimicrobienne. Le carvacrol est efficace contre les bactéries, les champignons et les virus, ce qui en fait un ingrédient efficace pour lutter contre les infections et renforcer le système immunitaire. De plus, il possède des propriétés antioxydantes qui aident à protéger les cellules du corps contre les dommages causés par les radicaux libres. Enfin, le carvacrol présente également des propriétés anti-inflammatoires, ce qui en fait un ingrédient utile pour soulager les douleurs articulaires et musculaires, ainsi que les affections cutanées telles que les brûlures et les infections cutanées [63].

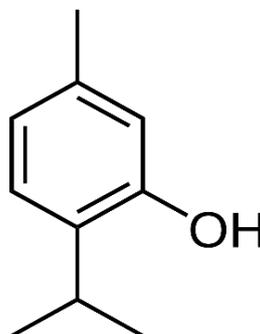


Figure I.20: Structure de carvacrol [64].

2. Thymol

Le thymol est un phénol mono-terpénique qui possède des propriétés antiseptiques, antifongiques et antioxydantes. La teneur en thymol dans l'HE d'*Origanum vulgare* varie généralement entre 3 et 8 % [65].

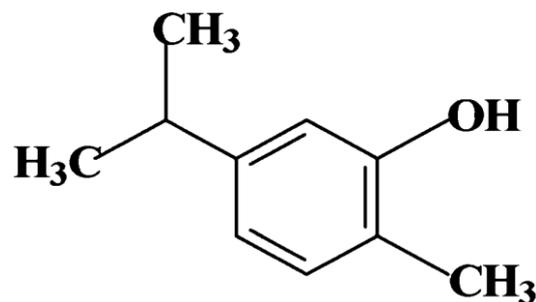


Figure I.21: Structure de Thymol [66].

3. p-Cymène

Un mono-terpène avec des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes. La teneur en p-cymène dans l'HE d'*Origanum vulgare* varie généralement entre 4 et 15 % [67].

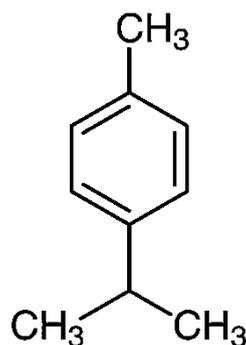


Figure I.22: Structure de p-Cymène [68].

4. γ -Terpinène

Un mono-terpène avec des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes. La teneur de γ -Terpinène dans l'HE d'*Origanum vulgare* varie généralement entre 3 et 7 % [69].

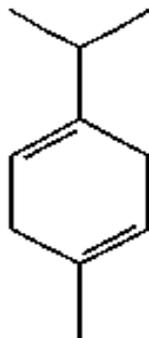


Figure I.23: Structure de γ -Terpinène [70].

5. α -Terpinéol

Est un mono-terpénique qui est connu pour ses propriétés anti-infectieuses, anti-inflammatoires, antibactériennes et antivirales. En général, la teneur en α -terpinéol dans l'HE d'*Origanum Vulgare* varie entre 3 et 10 % [71].

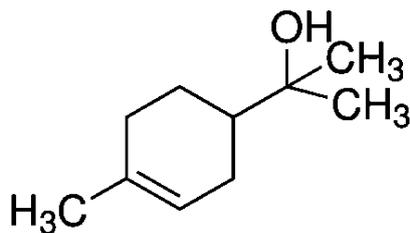


Figure I.24: Structure de α -Terpinéol [71].

6. Linalol

Le linalol est un alcool mono-terpénique présent naturellement dans de nombreuses HES végétales. Il est également connu pour ses vertus apaisantes, anti-inflammatoires et antibactériennes. En général, la teneur en linalol dans l'HE d'*Origanum vulgare* varie entre 3 et 10 % [72].

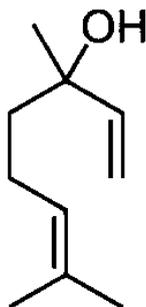


Figure I.25: Structure de linalol [73].

❖ Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques qui se trouvent dans la plante *Origanum vulgare*. Les types de flavonoïdes les plus courants dans cette plante sont les hétérosides de lutéoline, d'apigénine et de naringénine. Les flavonoïdes présents dans l'*Origanum vulgare* possèdent des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antibactériennes [74].

❖ Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés organiques qui possèdent à la fois une fonction phénolique et une fonction carboxylique. Ils se trouvent largement dans les plantes, notamment dans l'*Origanum vulgare*. Les acides phénoliques présents dans l'*Origanum vulgare* comprennent l'acide férulique, l'acide caféïque et leurs esters [75].

❖ Tanins

Les tanins sont des composés phénoliques qui se trouvent dans la plante *Origanum vulgare*. Les tanins extraits de l'*Origanum vulgare* sont appelés tanins catéchiques. Ils jouent un rôle crucial dans la réparation des tissus endommagés suite à une attaque de ravageurs, en favorisant la lignification de la plante [67].

I.3.2.5. Intérêts thérapeutiques de l'*Origanum vulgare*

Les intérêts thérapeutiques de l'*Origanum vulgare* sont nombreux et variés. Grâce à ses composés phénoliques tels que le thymol et le carvacrol, il possède des propriétés antiseptiques et antibactériennes qui sont utiles pour traiter les infections cutanées et respiratoires. De plus, ses flavonoïdes et tanins lui confèrent des propriétés antioxydantes qui aident à protéger les cellules contre les dommages oxydatifs. L'origan est également utilisé comme digestif et carminatif, ce qui soulage les problèmes digestifs et intestinaux. Il a également des propriétés antalgiques qui sont efficaces contre les douleurs telles que les migraines et les rhumatismes. De plus, ses propriétés immunostimulantes renforcent les défenses immunitaires et ses vertus antitussives soulagent les toux chroniques et les bronchites. Enfin, l'origan possède des effets tonicardiaques bénéfiques contre la fatigue et l'asthénie. Toutes ces qualités font de l'*Origanum vulgare* une plante médicinale précieuse en phytothérapie [76].

CHAPITRE II

Les huiles essentielles et les
méthodes d'extraction



II. Huiles essentielles et méthodes d'extraction

II.1. Définition des huiles essentielles

Les HEs (*essences* = huiles volatiles) sont des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation [77].

Les HEs sont des liquides huileux aromatiques très concentrés renfermant des mélanges complexes des substances volatils constitués de plusieurs dizaines de composés, se retrouvent dans toutes les parties de la plante (écorces, racines, feuilles, fleurs et fruits) et dans toutes les régions climatiques du globe. Les facteurs environnementaux comme la température, l'irradiante et la photopériode peuvent jouer un rôle primordial sur la qualité et la quantité de l'HE [77].

II.2. Répartition et localisation des huiles essentielles

Les HEs peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : feuilles, fleurs, écorces, bois, racines, rhizomes, fruits et graines. La synthèse et l'accumulation sont souvent associées à la présence de structures histologiques spécialisées, généralement sur ou près de la surface des plantes : cellules d'huiles essentielles, cheveux de Lauracées ou Zingibéracées sécrétrices de Lamiacées, sac sécrétoire de Myrtacées ou Rutacées, canal sécrétoire des Apiacées ou Astéracées [78].

Les trichomes glandulaires sont les sites primaires de la biosynthèse d'HE, et les plantes qui manquent de telles structures spécialisées synthétisent et amassent seulement des traces de monoterpènes. En conséquence, la dynamique du développement de ces structures ainsi que le processus sécrétoire d'huile et le mécanisme ont une incidence directe avec la production de l'huile/ le potentiel du système producteur [79].

II.3. Paramètres influençant l'extraction

II.3.1.1. Matière végétale

- Choix des plantes
- Mode de cueillette

- Provenance (région d'origine)
- Stade végétatif
- Période de la journée
- Partie de la plante distillée [80].

II.3.1.2. Nature et état du solide et du soluté

La nature et l'état physique du soluté jouent un rôle essentiel dans le transfert de matière. Le soluté peut être soit un solide, soit un liquide, et sa stabilité face à la chaleur et à l'atmosphère est déterminante. Dans le solide, il est réparti de manière uniforme à des concentrations variables [80].

II.3.1.3. Nature, concentration et volume du solvant

Le choix du ou des solvants est crucial. Il doit être très pur et avoir un faible point d'ébullition pour être facilement éliminé sans perte de composés volatils. Il ne doit pas interférer avec la méthode d'analyse utilisée, être capable d'extraire les composés polaires et apolaires ou être sélectif [81, 82].

II.3.1.4. Méthode, durée, température et pression

La baisse de pression en marchant entraîne une diminution des températures d'ébullition et de condensation. À l'inverse, toute augmentation de pression entraîne une augmentation de ces températures [81].

II.4. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

II.4.1. Méthodes Conventionnels

Les HEs sont extraites des plantes en utilisant des méthodes traditionnelles choisies pour leur simplicité, leur rentabilité et leur utilité dans différents secteurs industriels tels que la pharmacie, la cosmétique et la préservation des aliments.

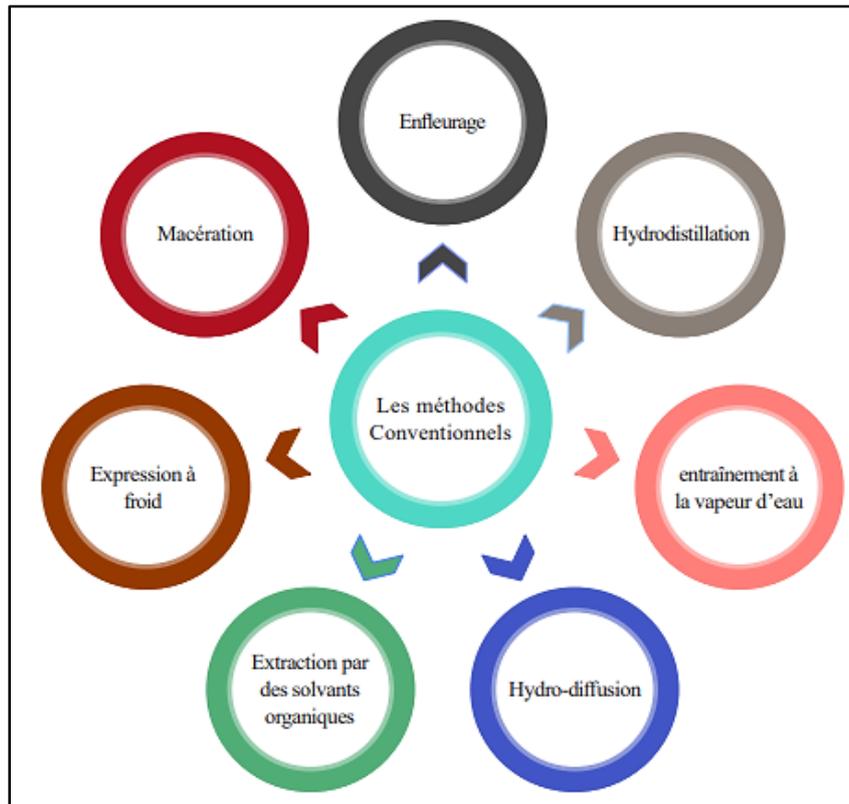


Figure II.1: Les méthodes conventionnelles d'extraction des HE.

II.4.1.1. Extraction par Hydrodistillation

L'hydrodistillation (HD) est la méthode d'extraction d'huiles la plus ancienne et la plus élémentaire qui a été découverte par Avicenne [83]. Elle est couramment utilisée pour les matières végétales hydrophobes à point d'ébullition élevée, telles que le bois ou les fleurs. Le processus commence par l'immersion des matières végétales dans l'eau à l'intérieur d'un récipient, suivi de l'ébullition de l'ensemble. Les appareils se composent d'une source de chauffage, d'un récipient (Alambic), d'un condenseur pour convertir la vapeur en liquide et d'un décanteur pour collecter le condensat et séparer les HEs de l'eau [84].

Ce processus permet l'extraction des HEs à une température contrôlée, sans surchauffe. Le principe d'extraction repose sur la distillation isotrope. L'eau ou d'autres solvants, ainsi que les molécules d'huile, sont maintenus sous pression atmosphérique pendant le processus d'extraction (chauffage). L'avantage fondamental de cette méthode d'extraction est sa capacité à isoler les composants végétaux en dessous de 100°C [83].

Cette technique présente des inconvénients dus principalement à l'action de la vapeur d'eau ou de l'eau à l'ébullition, notamment le risque de surchauffe de l'alambic, brûlant les aromates et donnant une HE à l'odeur de brûlé. L'HD semble mieux fonctionner pour les poudres (c'est-à-dire les poudres d'épices, le bois broyé, etc.) et les matériaux très durs comme les racines, le bois ou les noix [85].

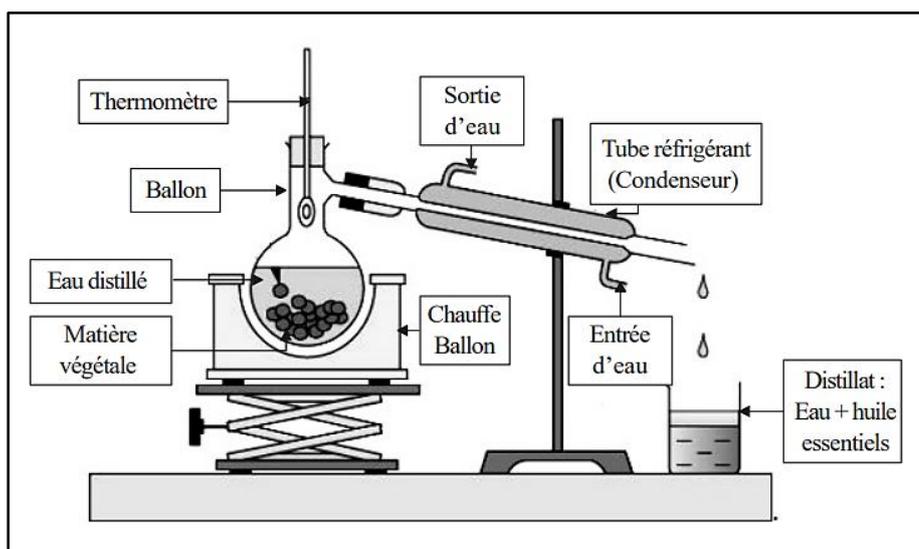


Figure II.2: Système d'extraction par Hydrodistillation [84].

II.4.1.2. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau.

La distillation à la vapeur d'eau est une méthode approuvée pour l'extraction des huiles essentielles, spécialement adaptée aux plantes sensibles à la température pour extraire des composés aromatiques naturels. Les matières végétales sont chargées dans l'alambic sans macération dans l'eau. [86].

Le principe de base de cette méthode est qu'elle permet de distiller un mélange de composés à une température nettement inférieure au point d'ébullition du constituant individuel. Ces composés, quant à eux, sont volatilisés à une température proche de 100°C sous pression atmosphérique en présence de vapeur ou d'eau bouillante, en chauffant les matériaux de l'usine avec de la vapeur générée par un générateur de vapeur. La chaleur est le principal déterminant de la façon dont les structures des matières végétales se dégradent et se rompent, libérant des composants aromatiques ou des HEs sous forme de vapeur. La vapeur se condense en eau lorsqu'elle refroidit. Le film à la surface de l'eau (distillat/hydrolat) est ensuite décanté par le haut pour en séparer l'HE. À son niveau le plus élémentaire, la distillation à la vapeur d'eau à l'avantage d'être un procédé raisonnablement peu coûteux à exploiter, et les qualités des huiles produites par cette approche sont bien connues [83].

Cet entraînement dépend de plusieurs facteurs : le coefficient de partage des composés entre la vapeur d'eau et la plante, la vitesse de diffusion des composés, leur solubilité dans l'eau, la pression partielle de vapeur, la durée et la vitesse de transfert de chaleur [87].

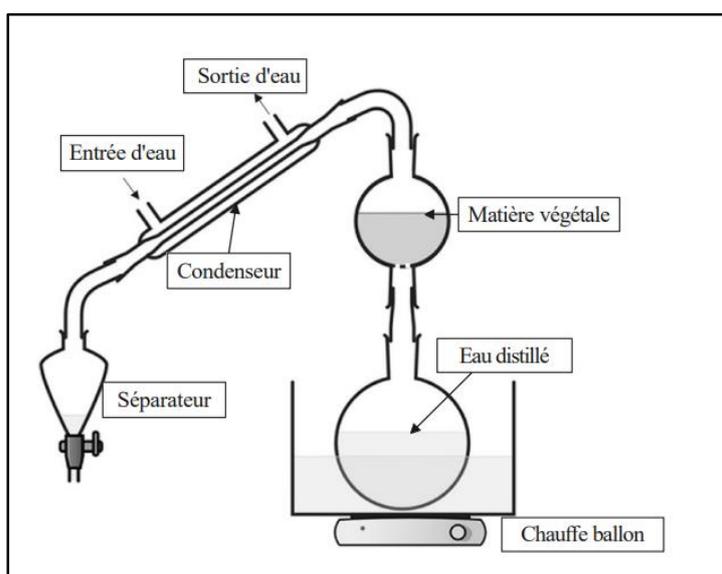


Figure II.3: Système d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau [88].

II.4.1.3. Extraction par des solvants organiques

Les HEs ont la propriété de se solubiliser dans la plupart des solvants organiques en particulier les hydrocarbures aliphatiques (n-pentane, n-hexane). Les solvants, purs ou en mélange sont choisis en fonction de leurs propriétés, entre autre, la polarité, la température d'ébullition, la réactivité, la possibilité d'être recyclés. L'extraction des HEs à partir des plantes par des solvants organiques donne lieu à un extrait appelé concrète, il contient des pigments, des matières grasses et d'autres composés. Le traitement à froid de la concrète par l'alcool absolu, et la distillation fractionnée, permettent d'obtenir, la phase dite « absolue » qui contient la majeure partie des composés volatils [87].

Cette méthode, également connue sous le nom de partitionnement ou de séparation liquide-liquide, Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, cyclohexane, l'éthanol, moins fréquemment le dichlorométhane et l'acétone. Le solvant choisi, en plus d'être autorisé, devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène. Sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait. En fonction de la technique et du solvant utilisé, on obtient des hydrolysats (eau comme solvant), des alcoolats (éthanol dilué), des teintures (éthanol/eau), des résinoïdes (extraits éthanoliques concentrés) et des concrètes (extraits à froid et à chaud au moyen de solvants divers) [86, 89].

L'extraction par solvant est utilisée dans la production de parfums et de biodiesel. Cette méthode permet d'extraire une plus grande quantité d'HEs à moindre coût [86]. Bien que cette méthode offre des rendements plus élevés que la distillation, elle présente des limitations en termes de coût, de sécurité et de respect des réglementations environnementales [89]. Cette méthode n'est pas considérée comme la meilleure pour l'extraction car les solvants peuvent laisser une petite quantité de résidu qui pourrait provoquer des allergies et affecter le système immunitaire [85].

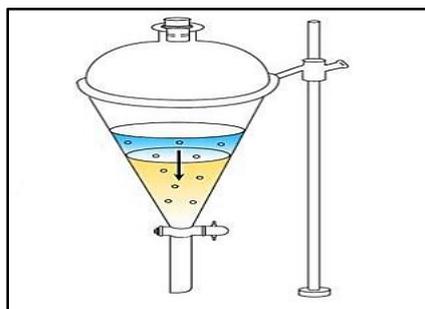


Figure II.4: Représentation schématique d'extraction par solvant [84].

II.4.1.4. Macération

La macération crée en fait plus d'une « huile infusée » plutôt que d'une « HE ». La matière végétale est trempée dans de l'huile végétale, chauffée et filtrée, ce qui permet de l'utiliser pour le massage [85].

Il est principalement utilisé pour les fleurs très délicates dont les activités physiologiques sont rapidement perdues après leur récolte, comme le muguet [90].

II.4.1.5. Enfleurage

Une façon intensive et traditionnelle d'extraire l'huile des fleurs. Le processus consiste à superposer de la graisse sur les pétales de fleurs. Une fois que la graisse a absorbé les huiles essentielles, l'alcool est utilisé pour séparer et extraire les huiles de la graisse. L'alcool est ensuite évaporé et l'HE collectée [85], c'est pourquoi la méthode d'enfleurage est la meilleure méthode lorsque la source de l'huile doit être extraite de la fleur ou des pétales.

Ce processus est applicable aux fleurs telles que le jasmin ou la tubéreuse, qui ont une faible teneur en HE et si délicates que le chauffage détruirait les fleurs avant de libérer les HEs[91].

II.4.2. Méthodes non Conventionnelles (Innovantes)

L'extraction des HEs est une science et un art qui évoluent constamment, avec l'émergence de méthodes non conventionnelles qui promettent une efficacité accrue et une meilleure préservation des propriétés aromatiques et thérapeutiques. Ces techniques innovantes ouvrent de nouvelles perspectives pour l'industrie des arômes et des parfums.

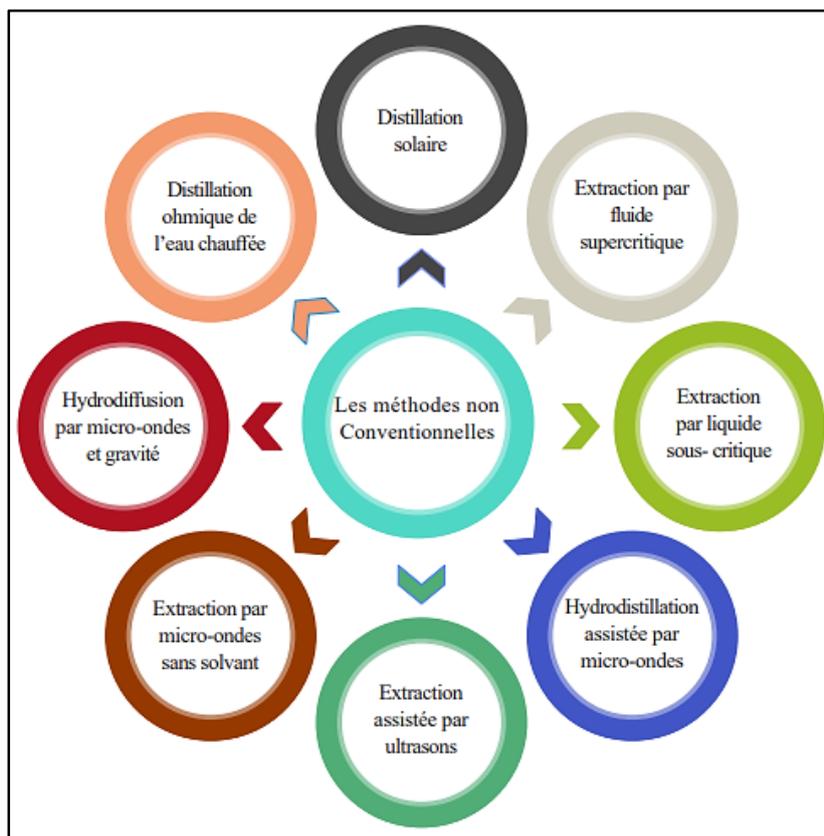


Figure II.5: Méthodes d'extraction non conventionnelles des HEs.

II.4.2.1. Extraction par fluide supercritique

L'extraction supercritique (EFS) est une technique qui permet de séparer un élément (l'extracteur) d'un autre (la matrice) grâce à un fluide supercritique, utilisé comme solvant, dont la pouvoir dissolvant est ajustable via la température et la pression. Cette méthode est privilégiée pour obtenir des huiles volatiles sans recourir à la distillation à la vapeur [84, 92].

Le dioxyde de carbone est le solvant prédominant pour l'extraction analytique par fluide supercritique [84, 92], dépassant 90% d'utilisation [93]. Ses avantages incluent un point critique accessible (basse pression critique, P_c : **72,9** atm, et température, T_c : **31,2°C**), peu agressif pour les molécules thermolabiles de l'essence végétale [94], une inertie chimique, une non-toxicité, une non-inflammabilité, une haute pureté à coût modéré, et une élimination

aisée après extraction par simple dépression [95], le rendant idéal pour isoler des substances lipophiles [96]. Le dioxyde de carbone, peut voir son efficacité améliorée par l'ajout de co-solvants comme l'éthanol ou le méthanol, le propane, l'éthylène, etc [84, 92], qui modifient le pouvoir de solvation, facilitant la solubilité et la désorption de l'analyte [97].

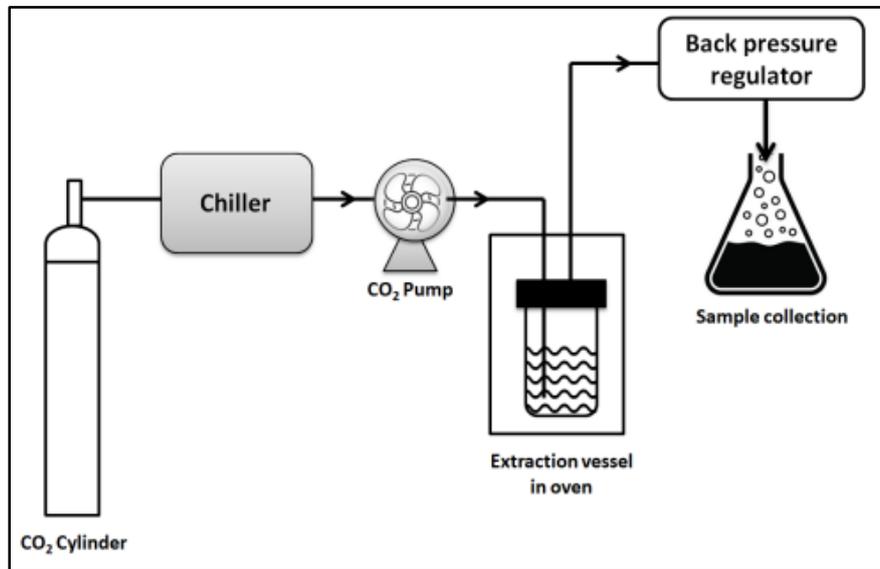


Figure II.6: Système d'extraction par fluide supercritique [92].

II.4.2.2. Hydrodistillation assistée par micro-ondes

L'hydrodistillation assistée par micro-ondes (HDAM) est une méthode avancée qui intègre un four à micro-ondes dans le processus d'extraction. Cette méthode utilise les micro-ondes pour chauffer le solvant au lieu de recourir au chauffage électrique conventionnel. Elle implique de modifier la polarité de l'eau, puis de la chauffer à l'aide de micro-ondes. L'énergie électromagnétique se transforme en énergie thermique grâce aux micro-ondes générées par l'interaction moléculaire entre les plantes aromatiques (matériaux) et le champ électromagnétique [98-100]. Ces ondes ont le potentiel de provoquer des changements structurels dans les cellules végétales. Le transfert de chaleur et de masse se produit dans la même direction, c'est-à-dire des cellules internes vers l'extérieur des cellules. L'efficacité de l'hydrodistillation assistée par micro-ondes dépend de la constante diélectrique de l'eau et de l'échantillon [101], du temps, de la température, des propriétés physico-chimiques des composés extraits et du type de solvant [84].

Cette technique permet une extraction rapide avec une faible consommation de solvant. Elle est respectueuse de l'environnement car elle réduit les émissions de CO₂ dans

l'atmosphère [102, 103]. De plus, elle offre une protection aux composés thermolabiles en utilisant la constante diélectrique de la matière végétale et de l'eau [101], et elle consomme seulement une fraction de l'énergie utilisée dans les méthodes d'extraction conventionnelles [103]. Cependant, il y a un inconvénient : la technique des micro-ondes peut entraîner des changements dans la stéréochimie des composés, les convertissant d'un isomère à un autre [92].

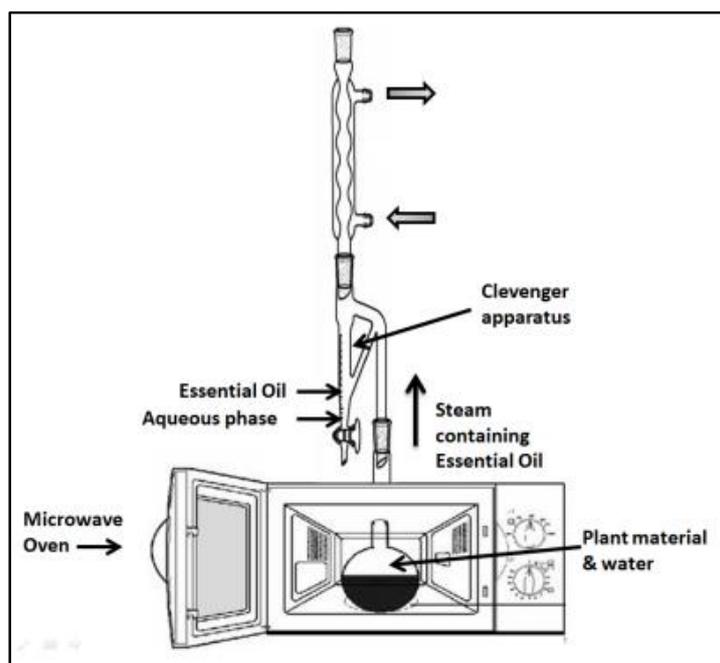


Figure II.7: Système d'hydrodistillation assistée par micro-ondes [92].

II.4.2.3. Extraction assistée par ultrasons

L'extraction assistée par ultrasons (EAU) est un bon processus pour obtenir des composés de valeur élevée et pourrait être utilisée pour augmenter l'estimation de certains sous-produits alimentaires lorsqu'ils sont utilisés comme sources de composés naturels ou de matière végétale [104]. Cette technique a été développée en laboratoire en 1950 [105]. La méthode de l'EAU permet une séparation hautement sélective et une augmentation des huiles volatiles à partir de la matière végétale des feuilles, des graines et des fleurs [106, 107].

Les matières premières végétales sont plongées dans l'eau ou un autre solvant, tel que le méthanol ou l'éthanol, et soumises simultanément à l'action des ultrasons [106, 107].

La combinaison de l'utilisation des ultrasons avec des techniques telles que l'hydrodistillation et l'extraction par solvant permet une extraction sélective et intensive des HEs en accélérant leur libération à partir du matériel végétal [84, 96].

La température moyenne de la technique et sa fonctionnalité d'économie d'énergie en font un choix idéal pour les combinaisons sensibles à la chaleur. Cette méthode d'extraction est très adaptée pour obtenir des huiles volatiles précieuses [84, 92]. L'utilisation de l'EAU améliore l'efficacité de l'extraction, permet des économies d'énergie et élargit la gamme de solvants par rapport aux méthodes traditionnelles. Comparé à d'autres techniques, l'équipement est à la fois simple et abordable. De plus, l'EAU présente des avantages pour les matériaux botaniques sensibles à la température. Les ultrasons améliorent également le transfert de masse, perturbent les cellules, améliorent la pénétration des solvants et augmentent l'effet capillaire [96].

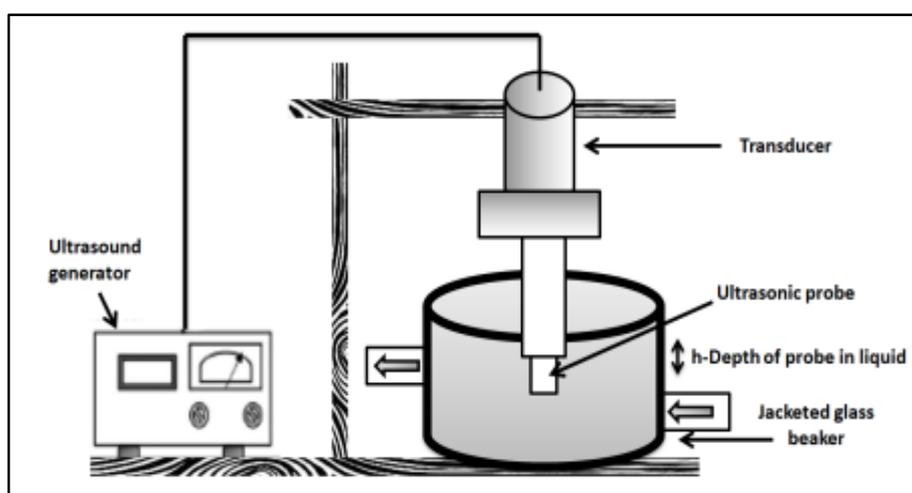


Figure II.8: Représentation schématique du système d'EAU [92].

II.4.2.4. Extraction par micro-ondes sans solvant

La méthode d'extraction par micro-ondes sans solvant (EMSS) a été développée par Chemat et ses collaborateurs, Basé sur l'intégration de la distillation sèche et de l'énergie de chauffage par micro-ondes[108]. Le procédé implique l'application d'une distillation sèche par micro-ondes, sans avoir besoin d'eau ou de solvants organiques, sur du matériel végétal à pression atmosphérique[109]. L'humidité contenue dans la matière végétale sert de solvant dans cette méthode [110].

Les matériaux trempés sont placés à l'intérieur d'un four à micro-ondes. Le chauffage sélectif de la teneur en eau in situ des matières végétales provoque un gonflement des tissus et fait éclater les glandes et les réceptacles oléifères. Par conséquent, cette procédure libère les huiles essentielles, qui sont naturellement vaporisées par distillation azéotrope en présence d'eau dans les matières végétales. Un condensateur est utilisé pour collecter les HEs[84, 111].

La puissance d'irradiation, la température et la durée d'extraction sont contrôlées par le panneau de l'instrument.

Cette méthode offre un avantage distinct avec sa capacité à isoler et à concentrer les HES en une seule étape [108], ce qui permet d'améliorer l'efficacité et la sélectivité, le tout en moins de temps (30 minutes) par rapport au processus traditionnel d'hydro-distillation qui prend 2 heures [112].

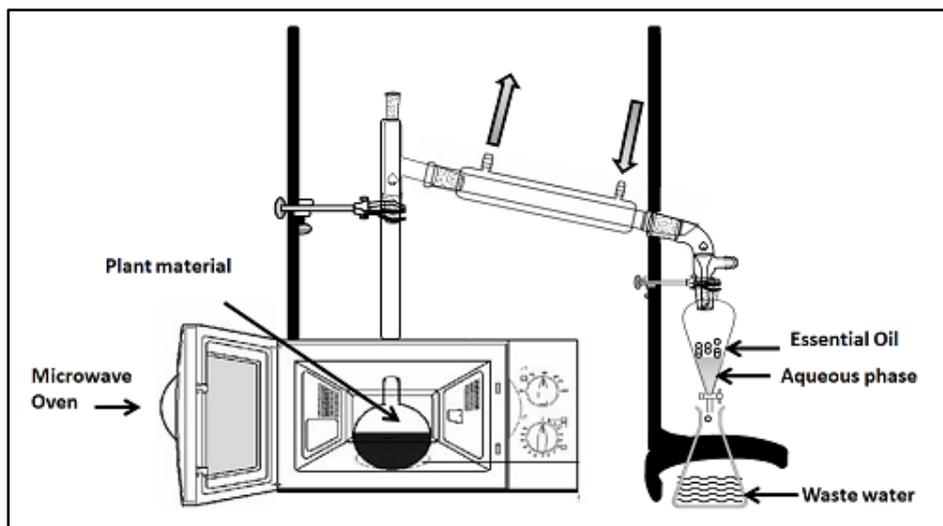


Figure II.9: Représentation schématique du système d'extraction par micro-ondes sans solvant [92].

II.5. Mode de conservation des huiles essentielles

La relative instabilité des molécules constitutives des HES rend leur conservation difficile, les possibilités de dégradation sont nombreuses, facilement objectivées par la mesure des indices (peroxyde, réfraction ...), la détermination des caractères physiques (viscosité, miscibilité à l'alcool et pouvoir rotatoire...), l'analyse en chromatographie phase gazeuse : photo isomérisation (E → Z anéthol), Photo cyclisation (citrals), coupure oxydative de propényl phénols, peroxydation des carbures et de composition en cétones et alcools (limonène), thermo isomérisation (citrals)... etc [113].

Donc, afin de maintenir leur qualité optimale, elles doivent être stockées dans certaines conditions favorables. Au fait, elles doivent être conservées à une température de 4°C et à l'abri de la lumière et la chaleur, et dans des récipients propres et secs en aluminium vernissé,

en acier inoxydable ou en verre teinté (brun, vert ou bleu) pour éviter leur oxydation. La durée de conservation varie généralement entre 6 mois et 5 ans, bien que les essences des Citrus puissent être conservées un peu moins longtemps (trois ans) [114].

II.6. Activités des huiles essentielles

Depuis les temps anciens, les substances naturelles ont été une source importante de médicaments, dont les plus importants sont les HEs qui contiennent plusieurs principes actifs utilisés dans l'industrie pharmaceutique. Elles demeurent une ressource inestimable pour la fabrication de nouvelles substances chimiques, malgré tout le développement et les progrès de l'industrie pharmaceutique [115, 116].

II.6.1. Activité antioxydante

Un antioxydant est défini comme une substance capable de retarder ou d'empêcher l'oxydation des substrats biologiques [117]. Ce sont des composés capables de minimiser efficacement les rancissements, retarder la peroxydation lipidique, sans effet sur les propriétés sensorielle et nutritionnelle du produit alimentaire. Ils contribuent à maintenir la qualité et à prolonger la durée de conservation du produit [118].

L'activité antioxydante peut être catégorisée en tant qu'activité primaire ou préventive (indirect) [119]. Les composés qui ont une activité primaire sont capables de donner des électrons à l'oxygène radicalaire afin qu'ils puissent le piéger et d'empêcher la destruction des structures biologiques. Ils peuvent agir comme agents réducteurs en transférant leurs électrons aux espèces radicalaires de l'oxygène (ERO), contribuant ainsi à leur élimination [120]. En revanche, les composés préventifs retardent l'oxydation en utilisant des mécanismes indirects tels que la complexation des ions métalliques ou la réduction de l'oxygène... etc [121].

Les effets antioxydants des HEs et des extraits de plantes sont principalement attribués à la présence de groupes hydroxyles dans leur structure chimique. Les plantes aromatiques, riches en composés phénoliques tels que la thymoquinone, le thymol et le carvacrol, présentent une activité antioxydante élevée en raison des groupes hydroxyles présents dans leurs cycles aromatiques [122, 123]. Des études ont démontré que les HEs peuvent être plus efficaces que les antioxydants synthétiques [124].

II.6.2. Activité antimicrobienne

Depuis l'Antiquité jusqu'au début du XXe siècle, les scientifiques ont porté un intérêt particulier aux propriétés antimicrobiennes des plantes médicinales et aromatiques [125]. Lorsqu'un corps humain est exposé à des micro-organismes étrangers (bactéries, champignons microscopiques, virus ou parasites), il dispose d'un système de défense immunitaire complexe et naturel qui élimine ces corps étrangers. Cependant, il arrive parfois que ces MO envahissent le corps humain et provoquent des maladies infectieuses graves, nécessitant alors un traitement antimicrobien. C'est pourquoi de nombreux chercheurs ont mené des études et des programmes afin de développer des agents antimicrobiens d'origine biologique, notamment à partir de plantes médicinales [126].

II.6.2.1. Activité antibactérienne des huiles essentielles

Les bactéries sont des microorganismes unicellulaires, procaryotes, qui vivent dans tous les environnements. Elles sont invisibles à l'œil nu et peuvent prendre de nombreuses formes, telles que des sphères (coques), des bâtonnets (bacilles) et d'autres formes plus ou moins spiralées [127]. En effet, les HEs sont largement reconnues comme étant parmi des agents antibactériens d'origine synthétique ou naturelle végétale les plus efficaces pour la destruction ou l'inhibition de la croissance de Microorganisme, Elles agissent contre un large spectre de bactéries Gram-positif et Gram-négatif, plus que celles qui développent des résistances aux antibiotiques [118, 128]. En revanche, leur mécanisme d'action antibactérien demeure méconnu en raison de leurs multiples effets et de leur composition chimique complexe [129]. Donc, l'effet antibactérien des HEs résulte de multiples modes d'action qui se combinent en affectant différentes cibles cellulaires. D'une manière générale, les Principaux mécanismes et sites d'action des HEs et de leurs constituants contre différents micro-organismes en suivant trois phases :

- L'HE attaque la paroi bactérienne, ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité, puis la perte des constituants cellulaires ;
- L'acidification de l'intérieur de la cellule bloque la production d'énergie cellulaire et la synthèse des composants structurels ;
- La destruction du matériel génétique entraîne la mort de la bactérie [118].

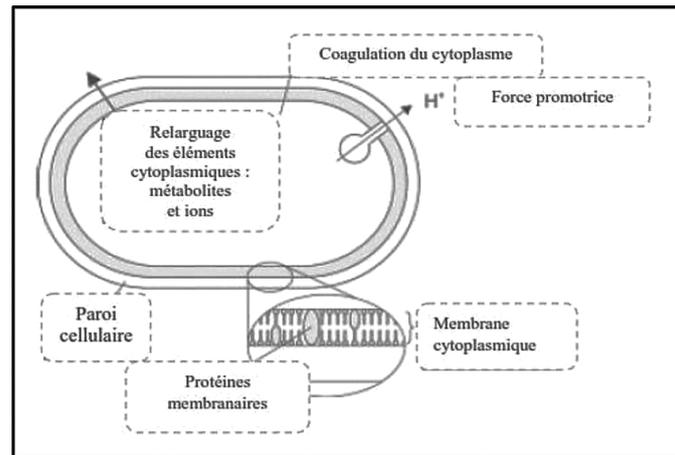


Figure II.10: Principaux sites d'action des huiles essentielles [118].

II.6.3. Activité antifongique

Le terme "*fungi*" provient du mot grec "*mykos*", qui signifie champignon. Les champignons sont des organismes eucaryotes appartenant au règne des Fungi. Ils peuvent exister sous forme unicellulaire et/ou pluricellulaire [130]. Les champignons sont des hétérotrophes qui ne possèdent pas de chlorophylle et se reproduisent par des spores mesurant de 2 à 250 μm . Ces spores peuvent se propager par l'air ambiant ou le contact humain, en particulier dans des conditions d'humidité et de température favorables [131, 132].

Les HEs ont un large spectre d'action contre les moisissures et les levures. Elles inhibent la croissance des levures, l'élongation du mycélium, la germination des spores, ainsi que la sporulation et la production de toxines chez les moisissures [118].

Les effets fongicides et fongistatiques des HEs contre les champignons pathogènes ont été abondamment étudiés dans différentes recherches [133, 134].

Comme leur activité antibactérienne, Le pouvoir antifongique des HEs est attribué à la présence de certaines fonctions chimiques dans leur composition telles que le groupe phénolique $-\text{OH}$ et la structure du cycle aromatique [135]. Ces composés augmentent la perméabilité de la membrane plasmique de la levure, entraînant sa rupture et une fuite ultérieure du contenu cytoplasmique, provoquant finalement la mort des levures [136, 137].

En effet, les composés terpéniques présents dans les HEs, et plus précisément leurs groupes fonctionnels tels que les phénols et les aldéhydes, réagissent avec les enzymes membranaires et entraînent la dégradation de la membrane plasmique des levures [138]. Les

alcools sesquiterpéniques et les lactones ont été identifiés comme possédant une activité antifongique dans différentes études [139].

II.6.4. Activité anti-inflammatoire

L'inflammation est une réponse biologique complexe déclenchée par divers stimuli tels que des agents pathogènes, des produits chimiques ou des blessures physiques, visant à réparer les tissus et à éliminer les agents nocifs [140]. Bien que l'inflammation soit essentielle au maintien de l'équilibre systémique et à l'initiation de la guérison, l'inflammation chronique présente des risques importants, pouvant entraîner des maladies graves [141]. Les HEs dérivées des plantes médicinales sont réputées pour leurs propriétés anti-inflammatoires, ce qui les rend précieuses dans diverses applications thérapeutiques [142].

Le potentiel anti-inflammatoire des HEs est principalement dû à leur composition chimique riche en substances bioactives. Parmi celles-ci, on trouve les aldéhydes monoterpéniques, les esters terpéniques, les sesquiterpènes et les monoterpènes, l'eugénol (phénol aromatique), l'eucalyptol (oxyde terpénique), alcools terpéniques (sesquiterpénols, monoterpénols), les cétones terpéniques et les phénols méthyl-éthers [143].

II.7. Toxicité des huiles essentielles

Les HEs sont des molécules biologiquement bénéfiques, mais elles peuvent également avoir des effets secondaires graves. Il est donc important de respecter la posologie de ces molécules ainsi que leur durée d'utilisation [144].

De nombreuses précautions doivent être prises lors de l'utilisation des HEs. La majorité des composés d'une HE sont lipophiles et sont donc rapidement absorbés, quelle que soit la voie d'administration. Il convient d'éviter les HEs riches en cétones et/ou en lactones, car elles sont lipolytiques et peuvent être neurotoxiques lorsqu'elles sont utilisées à des doses élevées ou de manière répétée, en particulier par voie interne. De plus, elles peuvent provoquer des étourdissements, des crises d'épilepsie, voire des avortements [145].

La DL_{50} (dose létale 50) permet d'évaluer la toxicité aiguë d'une HE administrée par voie orale. Elle se définit par la dose d'HE capable de tuer 50% d'une population donnée dans des conditions expérimentales définies. Elle s'exprime en masse de substance active (grammes)

par masse d'individu (kilogrammes). Ainsi, plus la DL_{50} est faible, plus la substance testée s'avère toxique [146, 147].

II.8. Principales utilisations des huiles essentielles

II.8.1. En pharmacie

Les HEs sont utilisées depuis très longtemps en médecine traditionnelle, aromathérapie. Cette dernière utilise les composés volatiles odorants des HEs pour prévenir, atténuer ou soigner les infections et les troubles internes par inhalation. Aussi, elles sont employées pour traiter certaines maladies externes par application sur la peau [116].

Il y a 7 HEs inscrites à la pharmacopée européenne 1999 3^{ème} édition : HE d'anis, eucalyptus, clou de girofle, oranger amer, lavande, menthe poivrée et le thym [148]. Leurs propriétés pharmacologiques leur confèrent une utilisation médicale. Les HEs ont en effet de nombreux avantages :

II.8.1.1. Pouvoir antiseptique

Les HEs possèdent un pouvoir antiseptique efficace contre diverses bactéries, champignons et levures. Citons les HEs de thym, girofle, lavande et eucalyptus [149]. Le thymol, constituant principal de l'HE de thym, est 20 fois plus antiseptique que le phénol [113]. L'HE de Mélaleuca a prouvé cliniquement son action antiseptique, antimicrobienne et antioxydante [150].

II.8.1.2. Propriétés spasmolytiques et sédatives

Certaines drogues à HEs (menthe, verveine) sont réputées efficaces pour diminuer les spasmes gastro-intestinaux. L'amélioration de certaines insomnies et de troubles psychosomatiques divers est également notée [113].

II.8.1.3. Propriétés irritantes

De nombreuses crèmes, pommades à base d'huiles essentielles, sont destinées à soulager entorses, courbatures ou claquages musculaires. En effet, par voie externe, certaines HEs (ex : oléorésine dans la térébenthine) augmentent la microcirculation, induisent une sensation de chaleur et dans certains cas une légère anesthésie locale [113].

Ces HEs constituent également le support de l'aromathérapie traitement des maladies par des essences de plantes.

II.8.2. En parfumerie et Cosmétiques

Les HEs sont utilisées depuis longtemps en cosmétologie et parfumerie, en raison de leurs propriétés odorantes [116].

C'est le principal débouché des huiles essentielles. La cosmétologie et le secteur des produits d'hygiène sont également des consommateurs, même si le coût élevé des produits naturels conduit parfois à privilégier les produits synthétiques. Elles sont utilisées dans des analgésiques pour la peau, les produits solaires ainsi que de nombreux produits d'ambiance tels que les liquides pour pots-pourris [151].

On les retrouve aussi dans des préparations pour bains (bains « calmants » ou « relaxants » avec possibilité d'absorption percutanée de ces constituants [113]. Intégrées aux huiles de massage, leur teneur ne doit pas dépasser 3 à 4%. Il y a alors possibilité d'absorption percutanée [152].

II.8.3. En industries agro-alimentaires

Les HEs sont riches en molécules antimicrobiennes et antioxydantes, ce qui les rend utilisables comme conservateurs alimentaires. Le retour au naturel est lié à une prise de conscience générale axée sur la protection de l'environnement, notamment la réduction de la consommation de produits synthétiques et le développement de l'agriculture biologique. Elles sont utilisées dans l'industrie agroalimentaire comme arômes et épices pour les boissons gazeuses ou alcoolisées, les produits laitiers, la viande, les sauces, les soupes, les snacks, les produits de boulangerie et également comme complément nutritif pour les animaux [153].

Certaines drogues sont utilisées en nature (épices et aromates), d'autres sous forme d'HEs ou de resinoides dispersés, encapsulés ou complexés. Si la réfrigération et d'autres moyens de conservation se sont substitués aux épices pour assurer la conservation des aliments, le développement de nouvelles pratiques culinaires (plats préparés, surgelés), le goût pour l'exotisme et les qualités gustatives, conduisent à une rapide augmentation de la consommation de ce type de produits [113].

II.8.4. En diverses industries

Les industries chimiques sont les principales utilisatrices d'isolats, des substances pures extraites des huiles essentielles, pour la fabrication de principes actifs pharmaceutiques, de vitamines, d'arômes, etc [113].

Citons ainsi l'utilisation des isolats linalool, D-limonène dans des shampoings et sprays insecticides pour les chats et les chiens [154].

L'huile de Mélaleuca, issue de la distillation de feuilles d'un arbre Australien, le « Australien tea-tree », a une forte utilisation dans ce pays. Elle est intégrée à des produits de lavage et utilisée comme ingrédient pour des préparations à but thérapeutique. Traitement d'allergies, piqûres d'insectes, boutons, irritations. Elle est incorporée à des désodorisants et des antiparasitaires externes. Elle a démontré des propriétés antibactériennes et antifongiques. Elle est également incorporée à des vaporisateurs pour inhalation et à des produits d'hygiène buccale [155]

CHAPITRE III

Formulation d'une pommade
vick



III. Formulation d'une pommade vick

III.1. Introduction

Le marché des médicaments à base de plantes a connu une croissance continue, en raison de l'efficacité prouvée et des résultats positifs en ce qui concerne l'observance du traitement par la population. De plus, la recherche de nouvelles molécules est l'objectif de la plupart des industries pharmaceutiques et des grands centres de recherche situés aux États-Unis et en Europe, où il est plus viable d'étudier les molécules naturelles que de concevoir de nouveaux médicaments au hasard [156].

Les plantes médicinales sont très recherchées dans le traitement des maladies dermatologiques en raison de leur capacité à arrêter les saignements, à accélérer la cicatrisation des plaies, à traiter les brûlures et à soulager d'autres maladies de la peau [156].

Les pommades, les crèmes et les gels sont des formes courantes de remèdes appliqués sur la peau, offrant des avantages thérapeutiques et servants d'agents protecteurs ou émollients [157].

III.2. Définition de la formulation

La formulation des médicaments est un aspect essentiel du développement pharmaceutique, car elle se concentre sur la composition et la méthode de fabrication d'un médicament afin d'améliorer son efficacité et sa sécurité [158].

Le développement de formulations joue un rôle crucial dans le développement de produits pharmaceutiques en combinant des ingrédients pharmaceutiques actifs (IPA) à des excipients afin de produire un médicament final dans une forme pharmaceutique optimale [158].

III.3. Généralité sur la peau

III.3.1. Structure et fonction de la peau

La peau, également appelée membrane cutanée, recouvre l'extérieur du corps. Le corps humain est composé de l'organe le plus lourd (masse) et le plus large (superficie). Elle s'étend sur environ 2 m² et pèse entre 4,5 et 5 kg, ce qui représente environ 16 % de la masse corporelle totale chez l'adulte. L'épaisseur de la peau varie de 0,5 mm sur les paupières à 4

mm sur les talons, et de 0,5 à 2 mm sur la plupart du corps. En ce qui concerne sa structure, la peau est composée de deux couches principales. La couche externe, appelée épiderme, est constituée de tissu épithélial et est plus fine. La couche la plus épaisse et la plus profonde est constituée de tissu conjonctif [159].

La couche sous-cutanée, située en-dessous du derme, ne fait pas partie de la peau elle-même ; elle est connue sous le nom de fascia superficiel ou encore hypoderme, et est constituée de tissu aréolaire et de tissu adipeux. La peau humaine possède des caractéristiques complexes en raison de son anatomie et de sa physiologie complexes [160].

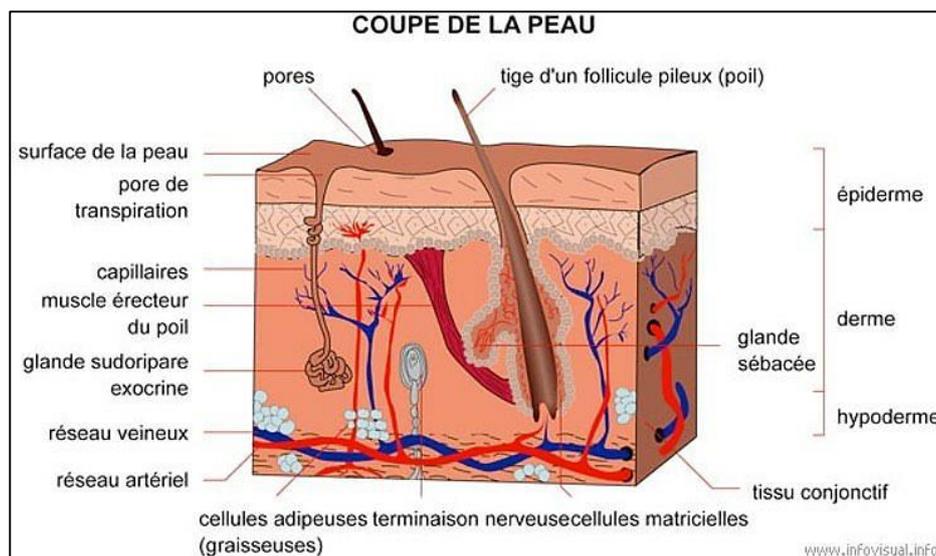


Figure III.1: Structure de la peau.

III.3.1.1. Épiderme

L'épiderme constitue la partie la plus superficielle de la peau. Ce tissu provient de l'ectoblaste embryologiquement. Il s'agit d'une couche continue d'un épithélium malpighien kératinisé, comprenant différents types de cellules qui contribuent à l'épiderme. La majorité (90 - 95%) des kératinocytes, des mélanocytes, des cellules de Langerhans et des cellules de Merkel [161]. Elle a une épaisseur variable selon le site anatomique ; la moyenne est de 40-50 μm , mais elle peut atteindre 80 μm sur le poignet et le dos de la main, et 400 μm au bout des doigts [162]. Il joue un rôle crucial en formant la couche cornée, qui est le stade final de la différenciation cellulaire, ce qui permet de créer une barrière efficace entre l'organisme et l'environnement extérieur [163].

III.3.2. Absorption cutanée

On utilise fréquemment la voie cutanée pour administrer des médicaments. Effectivement, elle permet d'atteindre les différentes couches de la peau (administration par voie percutanée) ou la voie sanguine pour une administration systémique du principe actif (voie transcutanée). Les propriétés de la peau (intégrité, âge...) influencent le devenir du principe actif, ainsi que les caractéristiques physico-chimiques du principe actif (taille, forme, structure et propriétés chimiques de la molécule), la forme galénique sélectionnée et les excipients utilisés [164].

Sur le plan cinétique, l'entrée dans la cornée se divise en deux étapes. Une phase de latence initiale qui peut être assimilée à une phase de "charge en produit" dont la durée varie en fonction des caractéristiques physico-chimiques des actifs utilisés. Une deuxième étape, appelée phase d'équilibre, où l'actif est capturé par un flux dermique constant.

La substance poursuit donc sa diffusion dans l'épiderme et le derme en trois étapes : d'abord, le transport de l'actif(s) jusqu'à la zone d'absorption (dépendant de la viscosité de ces derniers et de leur véhicule) ; ensuite, la libération de ces actifs (dépendant uniquement de l'affinité de la préparation pour la peau) ; enfin, les étapes d'absorption et de résorption (dépendant uniquement de l'actif(s) étudié(s) et dont les cinétiques seront données par la Loi de Fick). Selon eux, le ciment lipidique de la couche cornée favorise la circulation des molécules amphiphiles et entrave la diffusion des substances hydrophiles [164].

L'objectif principal du développement galénique sera de contrôler le degré de pénétration du (ou des) principe(s) actif(s) présent(s) dans la forme pharmaceutique pour une application locale. La définition préalable du niveau d'activité et de l'effet prévu de la forme envisagée est essentielle [165].

III.4. Inflammation et Anti-inflammatoire

III.4.1. Inflammation

À l'origine, on peut voir dans l'inflammation "une réponse naturelle de défense de l'organisme face à des agressions tissulaires". Il existe différentes sources d'agressions : mécaniques (traumatismes), physiques (chaleur, radiations, corps étrangers), chimiques (venins, toxines, produits), les irritants, les infections (bactéries, virus, parasites), et l'immunité (complexe antigène-anticorps) [166].

III.4.1.1. Différentes types d'inflammations

On distingue principalement deux types d'inflammations [166]:

- L'inflammation localisée ou primaire est appelée inflammation aiguë.
- L'inflammation généralisée ou secondaire est dénommée inflammation chronique.

III.4.1.2. Anti-inflammatoires

Il s'agit de médicaments qui ont la capacité de réduire ou d'éliminer les réactions inflammatoires. Ils sont utilisés pour soulager les symptômes de l'inflammation.

III.5. Caractéristiques des principales formes galéniques dermatiques

III.5.1. Crème dermatique

Une pommade douce, peu grasse et peu épaisse, composée d'une émulsion H/E ou E/H, ce qui favorise sa pénétration dans les tissus de la peau. Elle est conditionnée en pot ou en tube [167].

III.5.2. Pâte dermatique

Le terme "pâtes" désigne un concentré de l'agent thérapeutique dispersé dans un excipient pharmaceutiquement acceptable ayant une consistance épaisse, ce qui permet de former une substance semi-solide visqueuse [168].

III.5.3. Pommade

Une préparation avec une consistance molle, épaisse et onctueuse, d'aspect homogène, destinée à être appliquée sur la peau ou les muqueuses pour des effets locaux ou systémiques. Les pommades ont une teneur en eau limitée, contrairement aux crèmes [167].

Les pommades sont des préparations contenant un excipient monophasé dans lequel des substances liquides ou solides peuvent être dissoutes ou dispersées. Elles sont fabriquées à partir d'HEs ou d'autres corps gras, dans lesquels les principes actifs des plantes sont dissous [169].

III.5.4. Solution et lotion à usage externe

Formule liquide obtenue en dissolvant ou dispersant un principe actif dans un véhicule aqueux ou légèrement alcoolisé ; Destinée à l'application sur la peau sans friction [167].

III.6. Préparations semi-solides pour application cutanée

III.6.1. Pommades

Les pommades sont des préparations de consistance molle et semi-solide d'aspect homogène, destinées à être appliquées sur la peau ou certaines muqueuses. Elles contiennent plusieurs principes actifs dissous dans un excipient hydrophile ou lipophile monophasé, dans lequel des substances liquides ou solides peuvent être dispersées ou dissoutes [170]. De nos jours, cet excipient est généralement constitué de matières grasses. Cependant, à l'origine, les premières pommades étaient préparées à partir de pulpe de pomme, d'où leur nom [171].

On distingue les pommades dermiques (pour la peau), ophtalmiques (pour les yeux) et anales (pour l'anus). Elles sont utilisées pour leur effet local protecteur ou thérapeutique, ou pour un effet plus général [171].

III.6.2. Classifications des pommades

On distingue différents types de pommades :

III.6.2.1. Pommades hydrophiles

Les pommades hydrophiles sont des préparations dont les excipients sont miscibles à l'eau. Généralement, il s'agit d'un mélange de polyéthylène glycol (PEG), liquide ou solide, ayant de grandes masses moléculaires. Elles contiennent une quantité adéquate d'eau [167, 170, 171].

Les pommades hydrophiles servent de base aux médicaments topiques, facilitant l'absorption des médicaments par la peau et réduisant l'inflammation causée par des affections telles que la dermatite et l'eczéma [172].

III.6.2.2. Pommades absorbant l'eau

Ces pommades ont la capacité d'absorber des quantités d'eau plus importantes [171]. Leurs excipients sont similaires à ceux d'une pommade hydrophobe, dans lesquels sont incorporés des émulsifiants amphiphiles de type « eau dans l'huile », comme les alcools de graisse de

laine, les esters de sorbitanne, les monoglycérides et les alcools gras. On peut également y ajouter des émulsifiants de type « huile dans l'eau », tels que les alcools gras sulfatés, les polysorbates, l'éther cétostéarylique de macrogol ou les esters d'acides gras [167].

III.6.2.3. Pommades hydrophobes ou lipophiles

Les pommades hydrophobes ne peuvent normalement absorber que de petites quantités d'eau [171]. Leur caractère hydrophobe leur confère un pouvoir occlusif élevé, ce qui signifie qu'elles empêchent la peau de respirer. Elles forment une barrière à la surface de la peau, ce qui limite l'évaporation de l'eau et favorise son hydratation. Elles ont une faible capacité de pénétration, ce qui permet de réduire l'absorption de composés toxiques et de protéger contre les agressions extérieures [170]. Elles sont généralement utilisées pour traiter les affections de surface, telles que les lésions sèches et/ou squameuses. Elles ne sèchent pas et restent en surface pendant une longue période [170].

Les substances les plus couramment employées pour formuler de telles pommades comprennent la vaseline, la paraffine, la paraffine liquide, les huiles végétales ou les graisses animales, les glycérides synthétiques, les cires et les polyalkylsiloxanes liquides [167].

III.7. Généralité sur les vicks

III.7.1. Introduction

Le rhume commun (infection des voies respiratoires supérieures) est la maladie la plus fréquente chez les adultes. Selon la littérature, les adultes peuvent en avoir de deux à quatre épisodes par an, tandis que les enfants en ont cinq à sept [173].

Le rhume commun est une maladie généralement bénigne qui affecte les voies respiratoires supérieures, notamment le nez, le nasopharynx et les sinus para-nasaux. Les rhinovirus sont les agents les plus couramment responsables de cette maladie [173]. Les principaux symptômes du rhume commun comprennent la congestion nasale, les écoulements nasaux, les éternuements, les maux de tête, les maux de gorge et la toux [174].

La congestion nasale est causée par une sensation subjective de congestion et un rétrécissement objectif des voies nasales en raison de la vasodilatation, de l'augmentation du flux sanguin nasal et de la perméabilité vasculaire. L'engorgement des sinus veineux nasaux et

le gonflement des cornets réduisent la taille des voies nasales, ce qui entraîne une restriction du flux d'air et se manifeste chez le patient par une congestion nasale (nez bouché) [175].

III.7.2. Définition de Vicks

Le Vicks VapoRub (VVR) est une pommade à base de vaseline qui peut être appliquée localement sur la poitrine, la gorge et le dos, ou ajoutée à de l'eau chaude pour inhaler les vapeurs aromatiques. Lorsqu'il est utilisé localement, les actifs s'évaporent grâce à la chaleur du corps et sont inhalés. Les principaux effets thérapeutiques sont un soulagement de la congestion nasale et de la toux [176].

Le VVR est une préparation pharmaceutique contenant une combinaison de lévomenthol, d'huile d'eucalyptus, d'essence térébenthine et de camphre en tant que principes actifs, ainsi que de thymol, d'huile de cèdre et de paraffine molle blanche comme excipients [176].

Les effets thérapeutiques sont exercés par l'interaction des HEs vaporisées avec les récepteurs présents dans les voies respiratoires, y compris les membres de la famille des canaux du potentiel de récepteur transitoire (TRP) et en particulier le TRPM8 qui est responsable de la sensation de froid [177].

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Le chapitre vise à présenter les différents matériels utilisés et les méthodes expérimentales suivies. Toutes les expériences ont été menées au Laboratoire de graduation de la Faculté de Génie des Procédés de l'Université Constantine 3 et au Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine (CRBt).

Le but de notre travail consiste à formuler une pommade Vick à base d'HEs ou d'extraits de deux plantes médicinales, l'origan et l'eucalyptus, obtenue par l'extraction des plantes par différentes techniques, suivie des tests des activités chimiques des HEs ainsi que des activités biologiques et à contrôler la qualité de cette pommade Vick en la comparant avec une autre référence.

Donc les étapes essentielles de ce travail sont présentées ci-dessous :

- Extraction des HEs des deux plantes.
- Caractérisation physico-chimique des huiles essentielles.
- Extraction des extraits végétaux des deux plantes en utilisant deux solvants et méthodes différentes.
- Dosage des composés phénoliques dans les extraits et les huiles essentielles.
- Évaluation des activités antioxydantes et anti-inflammatoires.
- Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits végétaux méthanoliques et des huiles essentielles.
- Évaluation de l'activité antifongique des extraits végétaux méthanoliques et des huiles essentielles.
- Test de toxicité sur les vers de farine.
- Formulation de la pommade Vicks à base des deux HEs ou des extraits méthanoliques.
- Contrôle de qualité des produits finis.

IV. Matériels et méthodes

IV.1. Matériels et produits chimiques

IV.1.1. Équipements

- Balance analytique "KERN".
- Hydrodistillateur "Type clevenger".
- Étuve "MEMMERT EN55".
- Microonde "WHIRLPOOL".
- Évaporateur rotatif "BUCHI".
- Bain ultrason "Elmasonic S70 H".
- Tamiseur vibrant "RESTCH".
- Broyeur électrique "E8130 Waring Mélangeur".
- Plaque agitatrice multipostes "VELP SCIENTIFICA™".
- Centrifugeuse "5804 R Eppendorf et MIKRP 220R HETTICH".
- PH-mètre "METTLER TOLEDO™".
- Vortex "ZX3 VELP SCIENTIFICA".
- Agitateurs chauffants "FISCHER Scientific ISOTEMP™".
- Lecteur microplaque "PERKIN ELMER".
- Autoclave (Systec).
- Bec Benzen.
- La Haut "SHINSAENG".
- Incubateur "AVANTEC".
- Viscosimètre "SNB-1".
- Réfractomètre "HI 96801".

IV.1.2. Verreries et outils

Verreries		Activité
Becher 250 ml	Entonnoir	Hydrodistillation Extraction par macération et microonde
Éprouvette graduée 100 ml	Barreau magnétique	
Erlenmeyer 250 ml	Spatule	
Ballon 1L/2L	Boite pétrie	

Éprouvette graduée 1 L	Erlenmeyer 1 L	Activité antifongique
Cristallisoir Bécher 250 ml Éprouvette graduée 250 ml	Barreau magnétique spatule en verre	Formulation

IV.1.3. Consommables utilisés

Consommables	Activité
Eppendorf 1.5 ml Embouts stériles Microplaque 96 puits (200 µl pour chaque puit) Boîtes pétrie stériles Pipette pasteur Écouvillons stérile	Dosages Activité antioxydante Activité anti-inflammatoire Activité antifongique Activité antibactérienne

IV.1.4. Produits chimiques

Produit	Formule	Activité	
Hexane Sulfate de sodium	C_6H_{14} Na_2SO_4	Hydrodistillation	
Méthanol Dichlorométhane	CH_3OH CH_2Cl_2	Extraction par macération ou Microonde	
Hydroxyde de potassium Thiosulfate de sodium Chloroforme Acide acétique Iodure de potassium Acide hydrochlorique Phénolphtaléine Amidon	KOH $Na_2S_2O_3$ $CHCl_3$ $C_2H_4O_2$ KI HCl $C_{20}H_{14}O_4$ /	Les analyses chimiques des HEs	
Folin-Ciocalteu Carbonate de sodium	$H_3PW_{12}O_{40}/H_3PMo_{12}O_{40}$ Na_2CO_3	TPC	Dosages
Méthanol Nitrate d'aluminium Acétate de potassium	CH_3OH $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ CH_3COOK	TFC	
1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)	$C_{18}H_{12}N_5O_6$	DPPH	

2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS)	$C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$	ABTS
ferricyanide de potassium Acidetrichloroacétique (TCA) Chlorure de fer Phosphate Buffer	$K_3Fe(CN)_6$ $C_2HCl_3O_2$ $FeCl_3$ /	Pouvoir réducteur
Phenanthroline Chlorure de fer	$C_8H_{12}O_2$ $FeCl_3$	Phenanthroline
Méthanol Trolox Acide ascorbique	CH_3OH $C_{14}H_{18}O_{14}$ $C_6H_8O_8$	
Bovine serum albumin (BSA) Chlorhydrate de Tris (Tris-HCl)	BSA $C_4H_{12}ClNO_3 \cdot HCl$	Activité anti-inflammatoire
Glucose Agar agar	/	Activité antifongique
Méthanol (le plus utilisé)	CH_3OH	Toutes les dilutions, essais à blanc et contrôles négatifs des différentes activités.

IV.2. Matériel végétal

➤ *Origanum vulgare*

La plante d'origan propre et séchée a été achetée dans un magasin spécialisé dans la vente d'herbes médicinales naturelles, situé dans l'UV17 de Nouvelle ville Constantine.



Figure IV.1: Plante d'origan.

➤ *Eucalyptus globuleux*

IV.2.1. Récolte

La plante d'Eucalyptus a été récoltée pendant les mois de mars et avril 2024 au niveau de la commune de Boudraa Salah, wilaya de Constantine (est de l'Algérie), où nous avons utilisé la partie aérienne de la plante.

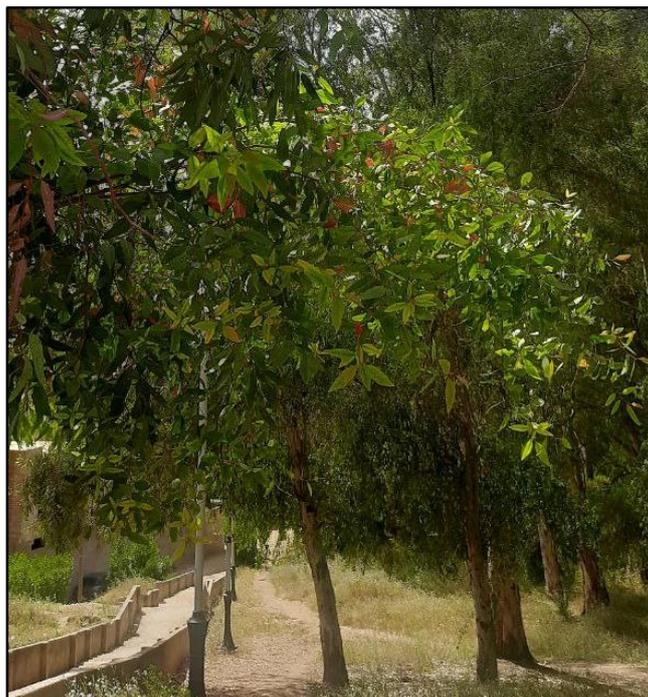


Figure IV.2: L'arbre d'Eucalyptus.

IV.2.2. Séchage

Les feuilles d'eucalyptus ont été nettoyées avec de l'eau distillée afin d'éliminer les poussières et autres particules polluantes. Ensuite, elles ont été séchées à l'air libre, à l'abri de la lumière et de l'humidité, à température ambiante pendant une semaine.



Figure IV.3: Séchage de la plante d'eucalyptus.

IV.2.2.1. Taux d'humidité

Les feuilles sont pesées initialement lorsqu'elles sont fraîches, puis elles sont laissées à sécher à l'air libre pendant trois jours jusqu'à ce que leur poids reste constant. Le taux d'humidité (%) de la matière végétale est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Taux d'humidité}(\%) = \frac{M_h - M_s}{M_s} \times 100$$

M_h : la masse humide des feuilles vertes d'Eucalyptus (g).

M_s : la masse sèche des feuilles vertes d'Eucalyptus (g).

IV.2.3. Broyage et Tamisage

Après avoir séché les feuilles d'eucalyptus et d'origan, elles ont été broyées en une fine poudre à l'aide d'un broyeur électrique. Ensuite, elles ont été tamisées à travers une tamiseuse électrique afin d'obtenir des particules homogènes, ayant un diamètre égal à 125 micromètres. Enfin, la poudre obtenue a été stockée dans de petits bocaux sombres, hermétiques et en verre.



Figure IV.5: Broyeur électrique.



Figure IV.5: L'origan broyé.



Figure IV.6: Tamiseur vibrant.

IV.3. Méthodes d'extraction

Nous avons réalisé des extractions des HEs et des extraits à partir de deux plantes médicinales connues pour leurs propriétés thérapeutiques : l'origan (*Origanum vulgare*) et l'eucalyptus (*Eucalyptus globulus*). Nous avons suivi trois méthodes d'extraction largement répandues : l'hydrodistillation (type Clevenger), la macération traditionnelle par solvant et la macération innovante assistée par micro-ondes.

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'efficacité de ces techniques en termes de rendement et de pureté des extraits.

IV.3.1. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

IV.3.1.1. Principe

Après avoir pesé la matière végétale, constituée des parties aériennes (feuilles et sommités fleuries) des espèces étudiées, nous les avons introduites dans un ballon de 1 litre rempli d'eau aux 2/3 de son volume. Le ballon est porté à ébullition par un chauffe-ballon pour générer une vapeur d'eau saturée en composés volatils. Le réfrigérant sert à condenser la vapeur en distillat (hydrolat), et l'extraction débute lorsque les premières gouttes tombent dans le collecteur et se poursuit pendant 3 heures. Le distillat s'écoule goutte à goutte et est recueilli dans une ampoule à décanter, où l'on sépare par différence de densité la phase aqueuse (l'eau aromatique) de la phase organique (phase supérieure), qui constitue l'HE qui sera séchée avec du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) afin d'éliminer toutes traces d'eau. L'HE séchée est séparé du sulfate de sodium par pipette Pasteur et conservée à une température de 4°C dans un flacon en verre brun fermé hermétiquement en vue de son analyse.



Figure IV.8: Montage d'hydrodistillation type cleverger.



Figure IV.7: Montage d'hydrodistillation type classique.

IV.3.1.2. Mode opératoire

Dans un ballon de 1 L, 50 g de feuilles de plantes, Eucalyptus ou origan, ont été pesées à l'aide d'une balance et ont été bien immergées dans de l'eau distillée. Le ballon a été placé dans un chauffe-ballon et mis en marche, avec vérification que l'eau circulait correctement

dans le réfrigérant. Une fois l'extraction achevée après une durée de 4 heures, un mélange biphasé composé d'eau aromatique (phase inférieure) et d'HE (phase supérieure) a été récupéré dans une éprouvette où elles doivent être séparées. Une petite quantité de sulfate de sodium a été ajoutée à l'HE séparée afin d'éliminer toutes traces d'eau, ensuite l'HE pure a été récupérée et conservée dans un eppendorf à 4°C.

Le rendement en HE est donné par la relation suivante :

$$R(\%) = \frac{V_{HE}}{m_s} \times 100$$

R : Rendement globale d'extraction en %.

V_{HE} : Volume de l'HE (ml).

m_s : masse de la matière sèche (g).

IV.3.2. Extraction solide-liquide par macération

IV.3.2.1. Principe

La macération est une technique d'extraction solide-liquide. Elle consiste à mettre en contact une matière première solide avec un solvant, qu'il soit froid ou chaud. Ensuite, on laisse reposer à température ambiante pendant une durée déterminée afin d'extraire les espèces solubles dans le liquide utilisé. Cette méthode est largement utilisée pour l'extraction des composés phénoliques [178].

IV.3.2.2. Mode opératoire

50 g de poudre de plantes, Eucalyptus ou origan, sont mélangés avec 150 mL de différents solvants, méthanol ou dichlorométhane, sous agitation mécanique pendant deux heures à température ambiante. Une filtration simple ou sous vide est effectuée afin de récupérer le filtrat méthanolique ou dichlorométhanique respectivement pour chaque plantes.



Figure IV.10: Filtration sous vide.



Figure IV.10: Filtration simple.

On a procédé ensuite à l'évaporation sous vide de l'extrait dichlorométhanique et méthanolique dans un évaporateur rotatif à une température de 38°C jusqu'à l'évaporation de dichlorométhane et méthanol, après le mélange a été dissous dans un bain ultrason.

Les contenus récupérés par les deux solvants sont mis dans des boîtes de pétri, et enfin séchés dans l'étuve afin d'obtenir l'extrait brut.

IV.3.3. Extraction par micro-onde

IV.3.3.1. Mode opératoire

Dans un erlenmeyer, versez 150 ml de méthanol (100 %) sont additionnés à 50 g de poudre de plantes (origan ou eucalyptus). Ensuite, le dispositif de test est placé dans une micro-onde (de marque Whirlpool) pendant 70 secondes, à une pression de 350 mbar et une température de 40 °C. Le mélange récupéré est filtré sous vide.

L'extrait méthanolique a été évaporé sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif à une température de 38 °C jusqu'à l'évaporation complète du méthanol. Le mélange a été dissous dans un bain ultrasons, l'extrait brut a été recueilli dans une boîte de Pétri, puis séché dans une étuve.

Le calcul du rendement des extraits de plantes obtenu par ces deux méthodes est le suivant :

$$T(\%) = \frac{m_E}{m_s} \times 100$$

T : Le taux de la matière extraite en %.

m_E : masse d'extrait brut après évaporation du solvant (g).

m_s: masse de l'échantillon (poudre) (g).



Figure IV.11: Extraction par micro-onde.



Figure IV.12: Évaporateur rotatif.

IV.4. Caractérisations des huiles essentielles

Pour l'évaluation commerciale des huiles essentielles, il est important de prendre en compte leurs caractéristiques organoleptiques ainsi que leurs propriétés physico-chimiques (densité, pH, indice d'acide, de peroxyde...).

IV.4.1. Caractéristiques organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) fournissent des indications initiales pour évaluer la qualité d'une HE.

➤ Couleur

La couleur d'une HE varie en fonction des éléments qui la composent. Certains solvants peuvent extraire une quantité importante de pigments, ce qui accentue la teinte d'une HE spécifique [179].

Les huiles volatiles donnent leur coloration à une substance particulière qui est l'azulène $C_{15}H_{18}$ de couleur bleu, elles sont divisées en quatre classes [113]:

- Huile incolore : sans azulène ni résine.
- Huile jaune : avec résine seulement.
- Huile bleu : avec azulène.
- Huile verte brune ou jaune verte : contenant de l'azulène en proportion variable.

➤ Odeur

Petites que dix. Plusieurs milliers de grammes par litre d'air, la sensibilité olfactive est un sens chimique très sensible, et les parfumeurs ont la capacité de classer et de caractériser des substances chimiques en utilisant des produits naturels. Ils ont la capacité de percevoir des quantités aussi [179].

➤ Aspect

L'aspect d'un extrait dépend des produits qui le constituent, qui peuvent nous apparaître sous forme solide, liquide ou bien solide-liquide [179].

IV.4.2. Analyses physiques

❖ La densité

La densité est une constante physique intrinsèque des liquides, des gaz et des solides. Pour les huiles essentielles, sa mesure est un paramètre clé qui permet de mieux les caractériser.

↳ Protocole expérimental

- Une balance sensible est utilisée pour peser une seringue vide de 5 ml (propre et sèche).
- La seringue est remplie avec 0,5 ml d'huile, ensuite on pèse à nouveau l'ensemble (huile + seringue).
- Cette étape est refaite avec le même volume d'eau distillée.

La densité de l'HE a été calculée en utilisant la formule suivante :

$$d = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

m_0 : la masse en gramme de la seringue vide (g).

m_1 : la masse en gramme de la seringue remplie d'eau distillée (g).

m_2 : la masse en gramme de la seringue remplie d'huile (g).

❖ Mesure du pH

Elle est utilisée pour déterminer si une solution est acide, basique ou neutre. Une solution est considérée comme acide si son pH est inférieur à 7, neutre s'il est égal à 7, basique s'il est supérieur à 7. On l'effectue par le biais d'un pH-mètre.

❖ Indice de réfraction

Il s'agit du rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux d'une longueur d'onde spécifique lorsqu'il passe de l'air à l'HE maintenue à une température constante [180].

L'indice de réfraction (I_R) est mesuré à l'aide d'un réfractomètre "HI 96801 ". Pour ce faire, on ajoute quelques gouttes d'eau distillée, qui servent de référence, sur un prisme. Après avoir essuyé ces gouttes, on les remplace par quelques gouttes de l'HE. Ensuite, on effectue la lecture à température ambiante et en unités % Brix.

Les résultats sont convertis en utilisant le tableau déterminé par l'ICUMSA [181], qui fournit la relation entre le taux Brix (%) et I_R^{20} .



Figure IV.13: Refractomètre HB96801.

IV.4.3. Analyses chimiques

❖ Indice de saponification

C'est une mesure utilisée pour déterminer la quantité de base nécessaire lors du processus de saponification des huiles ou des graisses. Il fournit des informations précieuses sur la qualité des huiles et leur aptitude à la production de savon [182].

Il permet de mesurer la quantité en milligrammes d'hydroxyde de potassium requise pour neutraliser les acides gras libres, et aussi pour saponifier les triglycérides contenus dans 1 gramme de substance [183].

↳ Protocole expérimental

0.2g d'HE est introduite dans un ballon à fond plat. Ensuite, on y ajoute 25mL de KOH (0.5N). Le mélange est chauffé à reflux pendant une heure tout en le maintenant sous agitation. Une fois l'expérience est terminée, on refroidit le mélange contenant la solution savonneuse. Enfin, il est titré avec une solution d'HCl (0.5N) en présence de la phénolphaléine comme indicateur coloré. De même, un test témoin a été effectué.

Cet indice est calculé par la relation :

$$I_s = \frac{(V_0 - V_1)(M \times V)}{m} \text{ mgKOH/1g}$$

V_0 : Volume d'HCl utilisé pour l'essai à blanc (ml).

V_1 : Volume d'HCl utilisé pour l'échantillon d'huile (ml).

N : Normalité de la solution de HCl (0.5N).

m : Masse de la prise d'essai (g).



Figure IV.14: Montage chauffage à reflux.

❖ Indice de peroxyde

L'indice de peroxyde (I_p) est le nombre de milliéquivalent d'oxygène par kilogramme de corps gras qui oxydent l'iodure de potassium avec libération d'iode. En présence de l'oxygène de l'air, les acides gras insaturés entrant dans la composition des essences s'oxydent en donnant des peroxydes [184].

↳ Protocole expérimental

Dans un Erlenmeyer, 0,2 g d'HE ont été pesées, on y ajoute 2,5 ml de chloroforme (CHCl_3), et l'échantillon de test a été rapidement dissous en remuant. Ensuite, 3,75 ml d'acide acétique (CH_3COOH) et 0,25 ml de solution d'iodure de potassium (KI) ont été ajoutés. Le flacon a été scellé, agité pendant 1 minute, après laissé pendant 5 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante. 50 ml d'eau distillée et quelques gouttes d'indicateur d'empois d'amidon ont été ajoutés (une couleur violette apparaîtra), ensuite la solution a été titrée avec une solution de thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,01 N, en remuant vigoureusement jusqu'à ce que la couleur violette disparaisse. L'essai est répété sans les HEs(essai à blanc).

Cet indice est calculé par la relation :

$$I_p = \frac{(V_0 - V_1) \cdot N \cdot 1000}{m} \text{ meq d'O}_2/\text{Kg}$$

Avec : V_0 : volume de la solution de thiosulfate de sodium utilisé pour l'essai à blanc (ml).

V_1 : volume de la solution de thiosulfate de sodium utilisé pour le test (ml).

N : normalité de la solution de thiosulfate de sodium utilisé (éq/L).

m : masse de la pris d'essai (g).

IV.5. Dosage colorimétrique des polyphénols et flavonoïdes

IV.5.1. Dosage des composés phénoliques totaux (TPC)

IV.5.1.1. Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune composé d'un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$). Lorsque les phénols sont oxydés, ce réactif est réduit en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, qui a une absorption maximale à 765 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux. Le phénol standard utilisé dans cette méthode est l'acide gallique (Acide 3, 4,5-trihydroxybenzoïque), dont la formule chimique est la suivante :

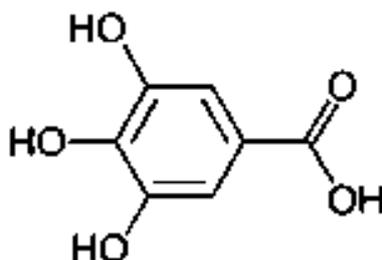


Figure IV.15: Structure de l'Acide gallique.

IV.5.1.2. Mode opératoire

Un volume de 20 μL de chaque extrait (1 mg/ml) a été mélangé dans une microplaque avec 100 μL du réactif Folin-Ciocalteu (dilué dans l'eau distillée 1:9, v/v) et 75 μL de carbonate de sodium Na_2CO_3 (7,5 %), le test est répété trois fois pour chaque puits. La réaction a été laissée

pendant 2h à l'obscurité et à température ambiante, après l'absorbance de la couleur bleue a été lue à l'aide d'un lecteur microplaque à 765 nm.

Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par du méthanol. La concentration en composés phénoliques totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique et sera exprimée en μg équivalent d'acide gallique par ml d'extrait (μg GAE/ml).

IV.5.2. Dosage des flavonoïdes

IV.5.2.1. Principe

Le dosage des flavonoïdes repose sur la formation d'un complexe jaune stable entre l'aluminium (Al^{3+}) du nitrate d'aluminium et les atomes d'oxygène présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes. Cela permet de les quantifier par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance à 415 nm, dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présents dans l'échantillon. Le flavonoïde standard utilisé dans cette méthode a la formule chimique suivante [178]:

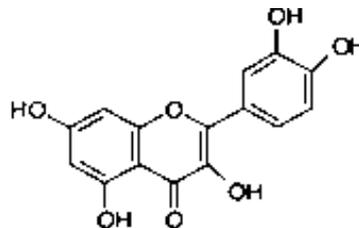


Figure IV.16: Structure de la Quercétine.

IV.5.2.2. Mode opératoire

Une plaque à 96 puits a été remplie avec 50 μl de différents extraits de plante. Ensuite, 130 μl de méthanol (CH_3OH) ont été ajoutés, suivis de l'ajout de 10 μl de solution d'acétate de potassium 1M (CH_3COOK) et de 10 μl de solution de nitrate d'aluminium 10 % ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$). L'essai est répété trois fois pour chaque puits. Après 40 minutes d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, une lecture a été effectuée à 415 nm. Un échantillon blanc est préparé en remplaçant l'extrait par du méthanol.

La teneur en flavonoïdes est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage de la quercétine et sera exprimée en μg équivalent par ml d'extrait (μg QE/ml).

IV.6. Évaluation de l'activité antioxydante des HE et des extraits

L'activité antioxydante a été évaluée in vitro par quatre méthodes de référence citées dans la littérature : **l'activité d'inhibition du radical DPPH•** ou (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) ; **l'activité de réduction du radical cation ABTS•+** ou (2,2'-azino-bis (3-éthylbenzthiazoline-6- sulphonic acide) ; **le pouvoir réducteur** du fer ferrique en fer ferreux et **le test de phenanthroline**.

Les activités biologiques ont été évaluées en utilisant des microplaques à 96 puits avec différentes concentrations d'échantillons. À cette fin, une série de 6 dilutions a été réalisée à partir d'une concentration initiale de 4 mg/mL dans le méthanol. Des dilutions à 1/2 ont ensuite été préparées dans des tubes Eppendorf en transférant 500 µL de chaque concentration dans des eppendorfs contenant 500 µL de méthanol, pour chaque concentration 3 répétitions ont été effectuées.

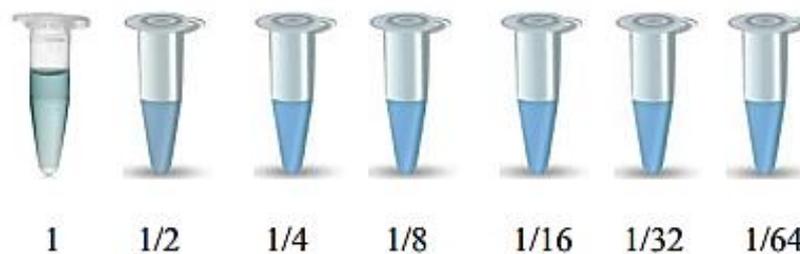


Figure IV.17: Étapes de préparation les dilutions.

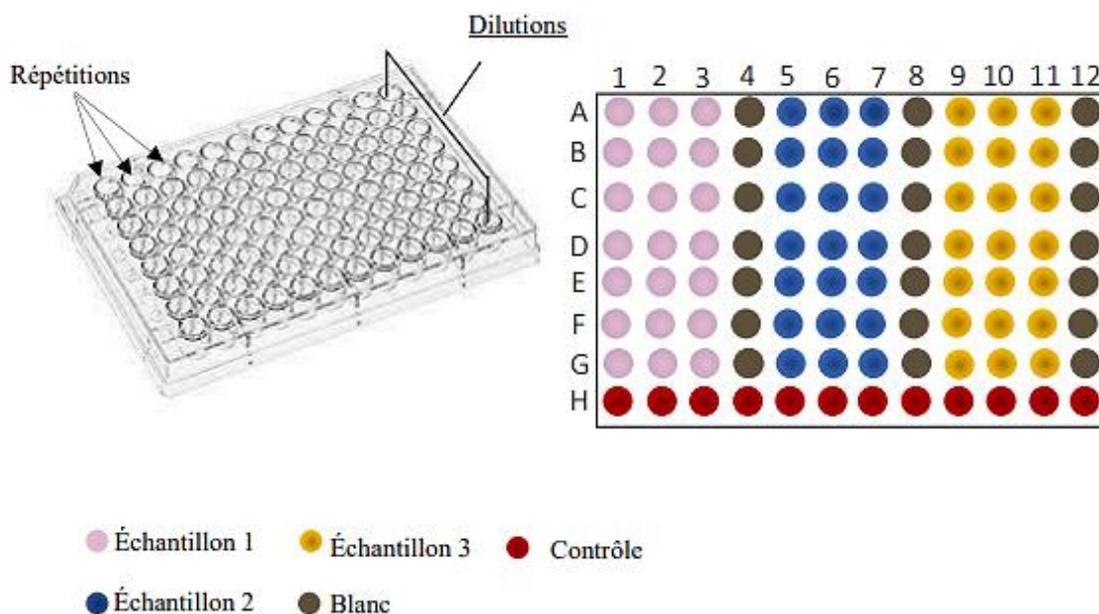


Figure IV.18: Le travail sur une microplaque à 96 puits.

IV.6.1. Activité de piégeage du radical DPPH^{*} (2-2-Diphényl-1-picrylhydrazyl)

IV.6.1.1. Principe

Le test du radical DPPH est effectué en suivant la méthode décrite par **Blois MS** [185]. La capacité de céder des hydrogènes par les huiles essentielles, extraits ou par certains composés purs, est mise en évidence par une méthode spectrophotométrique en suivant la disparition de la couleur violette d'une solution alcoolique (méthanol ou éthanol) contenant le radical libre DPPH^{*} comme l'illustre la figure suivante où AH est un antioxydant.

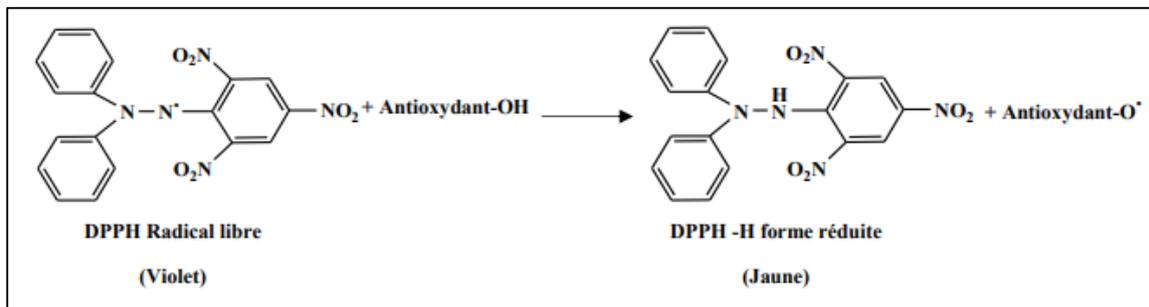


Figure IV.19: Mécanisme réactionnel intervenant lors de la réduction du radical DPPH.

IV.6.1.2. Réaction



IV.6.1.3. Mode opératoire

La solution de DPPH est préparée par solubilisation de dissoudre 4 mg de DPPH dans un volume de 100 ml de méthanol, le radical DPPH est dissous dans le méthanol et gardé à -20°C à l'abri de la lumière. L'absorbance est 0.5 nm (517 nm) dans le spectrophotomètre.

La méthode consiste à ajouter 160 µL de solution DPPH à un volume de 40 µL de chaque concentration des échantillons préalablement distribuées dans une microplaque à 96 puits. En parallèle, un contrôle négatif a été préparé en mélangeant 40 µL du méthanol avec 160 µL de solution DPPH. La mesure de l'absorbance à 517 nm après une demi-heure d'incubation dans l'obscurité et à température ambiante a été réalisée avec un lecteur microplaque.

- Le blanc est obtenu en ajoutant 160 µl de méthanol au même volume d'extrait.
- Le contrôle positif est représenté par l'acide ascorbique et Trolox (standard).

Le pouvoir antioxydant de nos échantillons a été exprimé en pourcentage d'inhibition du radical DPPH calculé par l'équation suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \left(\frac{\text{A contrôle} - \text{A échantillon}}{\text{A contrôle}} \right) * 100$$

Où : A échantillon : Absorbance de l'échantillon.

A contrôle : Absorbance moyenne du contrôle négatif.

La concentration inhibitrice à 50 % (IC50) est définie comme la quantité ou la concentration d'antioxydants (HE, extraits ou toute autre substance antioxydante) nécessaire pour inhiber ou faire disparaître 50% des radicaux. Elle est déterminée à partir de l'équation de la courbe de régression obtenue par les pourcentages d'inhibition à différentes concentrations.

IV.6.2. Inhibition du radical positif ABTS^{•+} ou 2,2-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic Acid)

IV.6.2.1. Principe

L'inhibition du radical ABTS^{•+} est effectuée selon la méthode décrite par **Re et al** [186]. Elle repose sur l'évaluation du degré de réduction du radical cation de l'ABTS (vert) obtenu par oxydation avec du persulfate de potassium pendant 12 à 16 heures à 4 °C, à l'abri de la lumière.

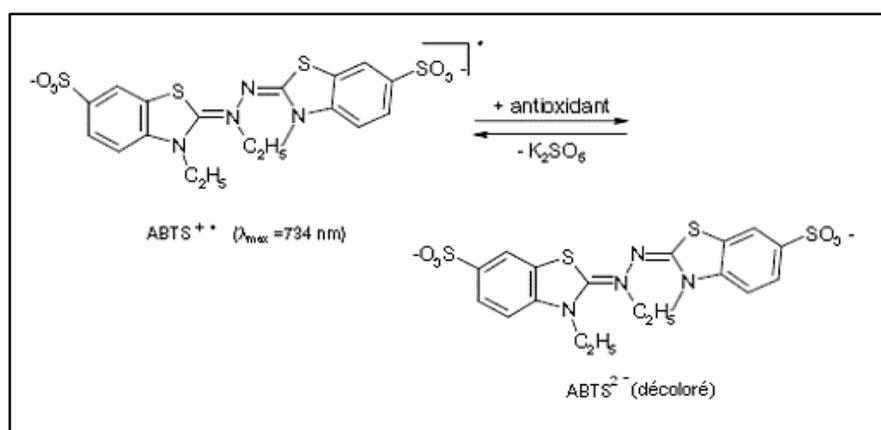


Figure IV.20: Mécanisme Réactionnel du radical ABTS^{•+} en présence d'un antioxydant.

IV.6.2.2. Réaction



IV.6.2.3. Mode opératoire

Les solutions préparées sont constituées de 12,2 mg (7 mM) d'ABTS et de 3,3 mg (2,45 mM) de persulfate de potassium dans 5 ml d'H₂O. Les deux produits en solution aqueuse sont mélangés et laissés réagir pendant 12-16 heures à température ambiante, à l'abri de la lumière. La solution sera ensuite diluée dans l'éthanol ou de l'eau afin d'obtenir une absorbance de $0,7 \pm 0,02$ unités au spectrophotomètre à 734 nm avant l'usage.

Dans une microplaque à 96 puits, 40 µl de chaque extrait a diverses concentrations ont été déposés auxquels on ajoute 160 µl de la solution de ABTS•. Une incubation de 10min à l'obscurité et à la température ambiante est réalisée suivie par la lecture de l'absorbance à 734 nm. Utilisant l'équation précédente, les pourcentages d'inhibition ont été calculés.

- le Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique) qui est l'équivalent synthétique de la vitamine E a été utilisé comme témoin positif.
- Le contrôle négatif (sans extrait) est constitué de 40 µl de méthanol avec 160 µl de la solution d'ABTS.

IV.6.3. Mesure du pouvoir réducteur ou FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter)

IV.6.3.1. Principe

Le pouvoir réducteur des HEs et des extraits représente leur capacité à réduire le fer ferrique ($\text{Fe}^{3+}(\text{CN})_6$) en fer ferreux ($\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6$) par les antioxydants, qui se colore en vert avec une intensité proportionnelle au potentiel réducteur. Cette activité est évaluée selon la méthode décrite par **Oyaizu (1986)** avec une légère modifications [187].

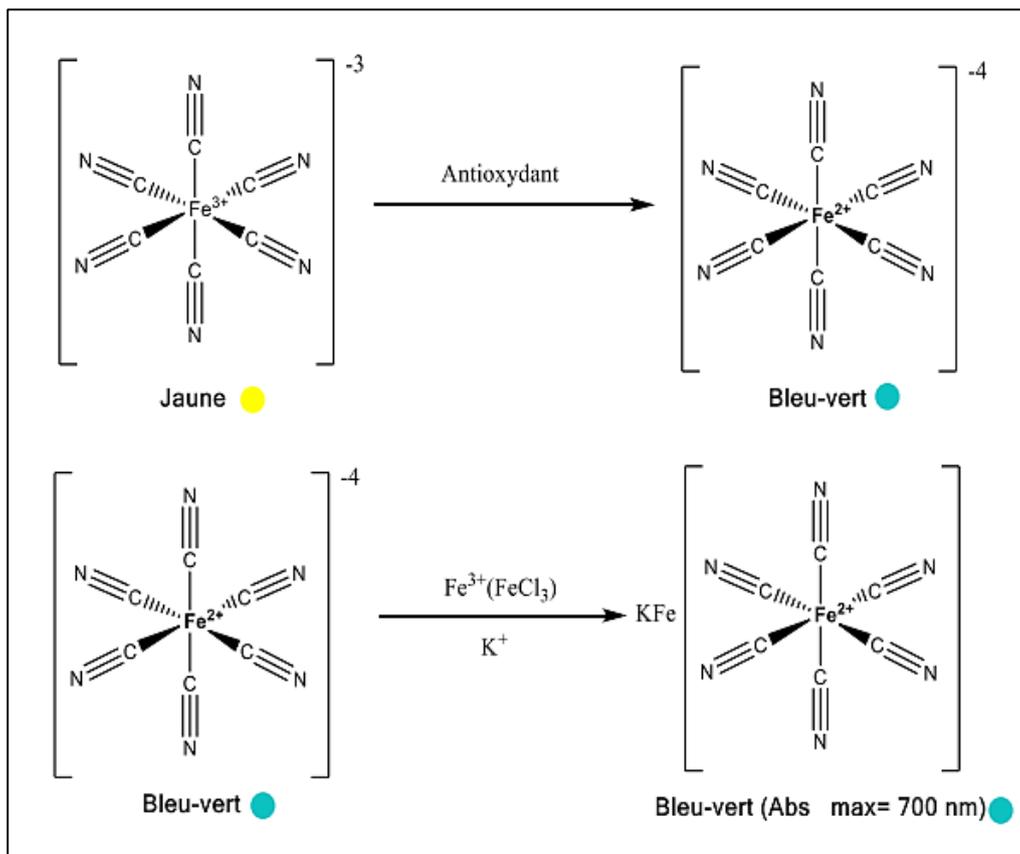


Figure IV.21: Mécanisme réactionnel du test FRAP.

IV.6.3.2. Mode opératoire

Sur une microplaque à 96 puits, un volume de 10 μl de l'échantillon à différentes concentrations est ajouté à 40 μl d'une solution tampon phosphate buffer (pH 6,6) et à 50 μl d'une solution de ferricyanide de potassium (1%). L'ensemble est incubé dans une étuve à 50°C pendant 20 min. Ensuite, 50 μl de TCA (10%) sont ajoutés, suivi de 40 μl d'eau distillée et de 10 μl de solution de FeCl_3 (0,1%). Enfin, l'absorbance a été mesurée à 700 nm.

- Le contrôle négatif a été préparé en parallèle en suivant le même protocole, en remplaçant l'extrait par du méthanol.
- Le contrôle positif est représenté par l'acide ascorbique et Trolox (standard).

La capacité réductrice des ions du fer des échantillons est exprimée en termes d'absorbances. La courbe de régression tracée par les absorbances des différentes concentrations nous a permis à déterminer la concentration donnant une absorbance 0,5 ($A_{0.5}$).

IV.6.4. Activité de réduction par la formation du complexe Fe^{+2} -phenanthroline

IV.6.4.1. Principe

Le fer aqueux, sous sa forme ferreuse réduite (Fe^{+2}), peut être déterminé par spectrophotométrie UV à partir de son complexe intensément coloré avec la 1,10-phenanthroline en solution acide (pH 3-4), par la réaction suivante :

Seul le fer ferreux $Fe(II)$ ou Fe^{2+} forme un complexe stable avec l'orthophénantroline et donne une couleur orangée. Ce complexe est appelé ferroïne et peut être quantifié par photométrie à une longueur d'onde de 510 nm [188]. L'activité de réduction par la formation du complexe Fe^{+2} -phenanthroline des extraits a été mesurée selon la méthode décrite par **Szydłowska-Czerniaka (2008)** [189].

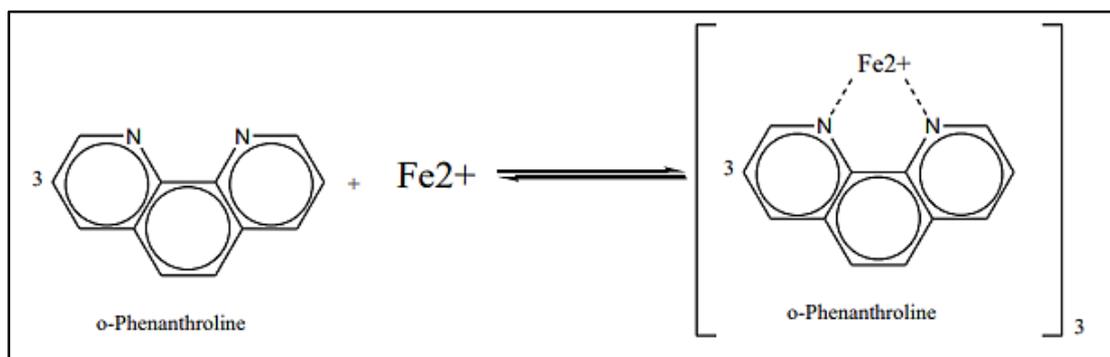


Figure IV.22: Formation du complexe Fe^{+2} -phenanthroline.

IV.6.4.2. Mode opératoire

Dans une microplaque à 96 puits : 10 μ l des extraits à différentes concentrations, 50 μ l de chlorure de fer ($FeCl_3$), 30 μ l de phenanthroline et 110 μ l de méthanol ont été déposés successivement. Une incubation est réalisée à l'obscurité à une température de 30°C pendant 20 min, suivie d'une lecture d'absorbance à 510 nm. Les résultats ont été calculés à titre d' $A_{0.5}$ (μ g/ml) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

- Le contrôle négatif a été préparé en parallèle en suivant le même protocole, en remplaçant l'extrait par du méthanol.
- Le contrôle positif est représenté par l'acide ascorbique et Trolox (standard).

IV.7. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro

IV.7.1. Principe

La dénaturation des protéines est une cause bien documentée de l'inflammation, qui peut entraîner diverses maladies inflammatoires. Ainsi, la capacité d'une substance à inhiber la dénaturation des protéines indique un potentiel apparent d'activité anti-inflammatoire [190].

Dans le but d'évaluer l'activité anti-inflammatoire des extraits de plantes, cela se fait selon la méthode d'inhibition de la dénaturation du BSA provoquée par la chaleur (72°C) par l'extrait décrit par **Kandikattu K (2013)** avec de légères modifications [191].

IV.7.2. Mode opératoire

À partir des solutions mères d'extraits ou d'HEs (16 mg/ml), six concentrations différentes ont été préparées pour chaque solution en les diluants à demi avec de l'eau distillée comme solvant.

Une solution de BSA à 0,5 % (p/v) a été préparée en dissolvant 0,5 g de BSA dans 100 ml de solution tampon Tris-HCl (1,2144 g de Tris-HCl a été dissous dans 200 ml d'eau distillée, puis le pH a été ajusté à 6,6 avec HCl).

Dans une microplaque à 96 puits, 100 µl de chaque échantillon à différentes concentrations ont été transférés. Ensuite, 100 µl de BSA à 0,5 % ont été ajoutés, répétées trois fois. Parallèlement, pour chaque concentration d'extrait, un blanc est préparé dans lequel 100 µl d'extrait est ajouté à 100 µl de Tris-HCl. De cette façon, nous avons préparé un contrôle négatif contenant 100 µl de BSA et 100 µl d'eau. Ensuite, une double incubation est réalisée, la première à 37 °C pendant 15 min, suivie d'une deuxième dans un bain-marie à 72 °C pendant 5 min. Après refroidissement, la turbidité est mesurée à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les résultats sont comparés à un standard qui est le diclofénac.

➤ **Test de standard de diclofénac**

Différentes concentrations (14 dilutions) de diclofénac sodique (forme injectable) sont préparées dans de l'eau distillée à partir d'une solution mère (1 ml de diclofénac sodique avec 9 ml d'eau distillée). Dans une microplaque, nous ajoutons 100 µl de BSA à 100 µl de diclofénac, en répétant l'opération 3 fois. Un contrôle négatif est préparé dans lequel 100 µl de BSA est ajouté à 100 µl d'eau, puis incubé à 72°C pendant 20 minutes.

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation de la BSA est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Protection (\%)} = \frac{(\text{Acontrol} - \text{Ablanc}) - (\text{Aéchantillon} - \text{Ablanc})}{(\text{Acontrol} - \text{Ablanc})}$$

Blanc : L'absorbance de l'extrait dans le tris-HCl (sans BSA).

Échantillon : L'absorbance de l'échantillon ou du standard (avec BSA).

Contrôle : L'absorbance du solvant et du BSA.

IV.8. Évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles et les extraits méthanolique.

IV.8.1. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des espèces d'eucalyptus et d'origan a été réalisée au laboratoire de bactériologie et de virologie du Centre de recherche en biotechnologie de Constantine (CRBt).

➤ **Souches microbiennes étudiées**

Les souches microbiennes utilisées dans notre étude ont été sélectionnées en raison de leur fréquence élevée dans les contaminations humaines. Ces bactéries appartiennent à deux groupes de microorganismes : les pathogènes et les contaminants. Leurs caractéristiques sont fournies dans le tableau IV.

Tableau IV.1: Description des souches bactériennes utilisées.

Escherichia coli (E. coli) est une bactérie intestinale présente dans les organismes à sang chaud [34]. Elle est une bactérie Gram négative du genre *Escherichia*, connue sous le nom de colibacille, et appartient à la famille des Enterobacteriaceae. La bactérie *E. coli* est aéro-anaérobie avec d'autres bactéries, cette dernière représente 0,1% du microbiote intestinal [192].

Staphylococcus aureus (S.aureus) est une bactérie sphérique de la famille des Staphylococcaceae qui présente un Gram positif. Il s'agit de la souche de staphylocoque la plus courante dans les maladies humaines et vétérinaires [193].

Nom	Famille	Forme	Gram	Référence	Lieu de récupération
<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae	Bacille	Négatif	ATCC25922	Centre de recherche en biotechnologie de Constantine (CRBt)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphylococcaceae	Coque	Positif	ATCC25923	

➤ **Antibiotique utilisé**

L'amoxicilline est un antibiotique β -lactamine bactéricide de la famille des aminopénicillines, utilisé pour traiter des infections bactériennes causées par des germes sensibles [194].

Les aminopénicillines sont des médicaments antibactériens qui empêchent la production de peptidoglycane, constituant la paroi bactérienne, en entravant la réaction de transpeptidation. Les bactéries sensibles à la pénicilline G sont efficaces, de même que certaines bactéries Gram négatives telles que les entérocoques et les bacilles Gram négatifs [195].

IV.8.1.1. Méthode de diffusion sur milieu gélosé (Aromatogramme)

IV.8.1.1.1. Principe

L'aromatogramme est une technique *in vitro* utilisée pour évaluer l'efficacité et la sensibilité d'une HE et d'un extrait en tant qu'antibactériens sur une bactérie spécifique.

Il s'agit de disques en papier remplis d'extrait de plante qui sont placés à la surface d'une gélose ensemencée de manière homogène avec une suspension bactérienne. Après une

incubation de 24 heures, les colonies se développent à la surface de la gélose, créant des zones vierges autour des disques, appelées zones d'inhibition. L'activité antimicrobienne peut être mesurée en millimètres en indiquant directement le diamètre de la zone d'inhibition. On observe une corrélation positive entre la sensibilité des souches testées et le diamètre d'inhibition.

IV.8.1.1.2. Mode opératoire

➤ Préparation des disques

Le papier Whatman n°5 est utilisé pour préparer nos disques de 6 mm de diamètre (figure IV.23). Une fois préparés, les disques sont placés dans un flacon en verre et autoclavés à une température de 120°C pendant 20 minutes pour éviter toute contamination.



Figure IV.23: Préparation des disques.

➤ Préparation des boîtes de pétri

La gélose Mueller Hinton a été liquéfiée à l'aide d'une micro-onde à une pression de 100 à 180 pendant 20 minutes. Ensuite, une quantité égale de gélose a été versée dans des boîtes de Pétri stérilisées, en obtenant une épaisseur uniforme de 4 mm sur toute la surface de chaque boîte. Les boîtes ont ensuite été laissées à sécher soigneusement dans la hotte. Cette méthode



Figure IV.24: La gélose de Mueller-Hinton coulée dans des boîtes de Pétri.

permet de créer un environnement idéal pour la croissance des bactéries et d'obtenir des résultats fiables lors de l'aromatogramme.

➤ **Préparation des différentes concentrations des échantillons**

Afin de réaliser ce test sur les extraits méthanoliques obtenus par macération et les HES de deux plantes, une série de 3 dilutions a été effectuée à partir d'une concentration initiale de 100 mg/mL dans le méthanol. Des dilutions à demi ont été préparées dans des tubes Eppendorf en transférant 500 μ L de chaque concentration dans des eppendorfs contenant 500 μ L de méthanol.

➤ **Préparation Suspension bactérienne (l'inoculum)**

À partir d'une culture jeune (18 à 24 h) et pure sur milieu d'isolement, on a prélevé à l'aide d'une pipette pasteur stérile 3 à 5 colonies bien isolées et parfaitement identiques. Ensuite, on a déposé la pipette pasteur dans 5 ml d'eau physiologique. Veillez à les rendre parfaitement homogènes. Cette suspension est ajustée à une densité optique de 0,08 - 0,1 Mc Farland et cet inoculum a servi àensemencer de manière homogène les géloses (Muller Hinton liquide) stériles coulées dans des boîtes de Pétri à l'aide d'un écouvillon imbibé dans la suspension en réalisant des stries serrées.



Figure IV.25: Préparation des suspensions bactériennes.

➤ **Ensemencement**

À l'aide d'un écouvillon stérile, trempez-le dans la suspension bactérienne. Ensuite, ensemencez la surface sèche de la gélose Mueller-Hinton en réalisant des stries serrées sur toute la surface de la boîte. Pour couvrir toute la gélose, le processus a été répété trois fois, en tournant la boîte de Pétri d'un angle de 60° à chaque fois. Laissez ensuite la gélose inoculée sécher pendant 3 à 5 minutes, tout en maintenant le couvercle en place.

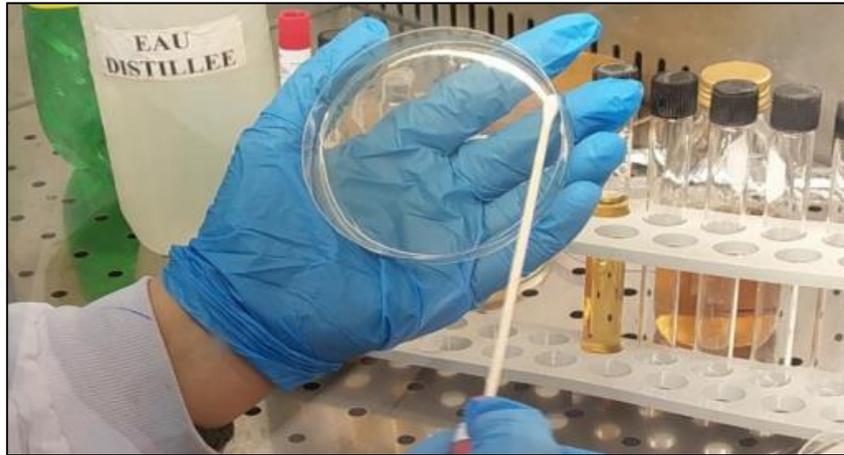


Figure IV.26: Ensemencement sur milieu solide à l'aide d'écouvillon.

➤ **Dépôt des disques**

On a numéroté la base de chaque boîte de Pétri avec des numérotations convenant au nombre de dilution et à la souche bactérienne. Ensuite, on a trempé des disques de papier Whatman de 6 mm de diamètre à l'aide d'une pince stérilisée au bec Bunsen dans les échantillons des extraits et des HEs de différentes concentrations.

Les disques ont été placés sur la surface des boîtes de pétri. On a répété l'opération trois fois dans chaque boîte et pour chaque dilution. Les boîtes ensemencées contenant les disques avec différents échantillons ont été laissées diffuser. Enfin, après 24 heures d'incubation à 37 °C, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés.

Des témoins positifs et négatifs sont inclus pour chaque bactérie, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, dans le but de confirmer l'efficacité de l'antibiotique amoxicilline et de vérifier la fiabilité des résultats obtenus lors des tests avec les extraits ou HE de plantes.

		Le But
Témoin positif	Un disque imprégné d'amoxicilline à une concentration de 30 microgrammes, associé à de l'acide clavulanique.	Déterminer si l'antibiotique est capable d'inhiber la croissance microbienne.
Témoin négatif	Un disque imprégné de méthanol	Vérifier l'absence d'effet inhibiteur en l'absence d'antibiotique et la présence du méthanol.

IV.8.2. Activité antifongique

IV.8.2.1. Principe

Il s'agit d'une interaction entre l'HE ou l'extrait méthanolique de chaque plante et le champignon (*Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*) (FOL). L'objectif est d'estimer l'effet inhibiteur de l'échantillon sur le champignon. La méthode utilisée est celle de la diffusion directe dans un milieu nutritif, également appelée contact direct.

- **Généralité sur le champignon FOL :**

F.oxysporum est l'une des deux espèces de *Fusarium* qui sont considérées parmi les dix principaux agents pathogènes des plantes ; elle est responsable des maladies les plus importantes touchant plus de 100 espèces végétales hôtes. Cela en fait une espèce cible à contrôler dans les terrains agricoles [196].

Les champignons responsables du flétrissement vasculaire des tomates (*Solanum lycopersicum*) sont appelés *F. oxysporum f. sp. lycopersici* (FOL). Ils entravent le transport de l'eau et de ses nutriments en colonisant le faisceau vasculaire, ce qui entraîne le flétrissement et la mort de la plante [196].

L'activité antifongique a été réalisée au laboratoire de microbiologie du CRBT en trois étapes.

A. Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar) est composé de pommes de terre, de glucose et d'Agar-agar.

Le protocole expérimental pour la préparation du milieu de culture est le suivant :

200 g de pommes de terre épluchées sont découpées puis mises à ébullition sur une plaque chauffante dans un récipient contenant 600 ml d'eau distillée pendant 30 minutes. Ensuite, les

morceaux de pommes de terre sont retirés par filtration simple pour récupérer le jus. On ajoute ensuite 20 g de glucose et 20 g d'agar avec une agitation jusqu'à obtention d'un milieu homogène. La solution est ensuite complétée à 1 L avec de l'eau distillée. On place le milieu sur une plaque chauffante jusqu'à ce début d'ébullition, distribue ce milieu dans des flacons et on les met dans un autoclave (systec) à 121 °C pendant 20 minutes.

B. Préparation de l'extrait méthanolique

L'extrait méthanolique est préparé en dissolvant progressivement une quantité d'extrait ou d'HE dans 400 μ l de méthanol jusqu'à ce que la solution atteigne le point de saturation, c'est-à-dire jusqu'à l'apparition du premier précipité. Ensuite, le volume est complété jusqu'à 500 μ l. La solution mère obtenue pour tous les échantillons a une concentration maximale de 20%.

C. Ensemencement et incubation des boîtes de pétrie

Nous avons effectué trois répétitions pour chaque extrait d'HE, ainsi que pour le témoin positif et le témoin négatif.

IV.8.2.2. Mode opératoire

Dans des boîtes de Pétrie stériles, on verse 25 ml de milieu PDA et on le laisse refroidir. Après, on prélève un disque de 5 mm de diamètre à partir d'une culture fongique jeune du champignon FOL, qui est déposé aseptiquement au centre de la boîte de Pétrie. Ensuite, 25 μ l de

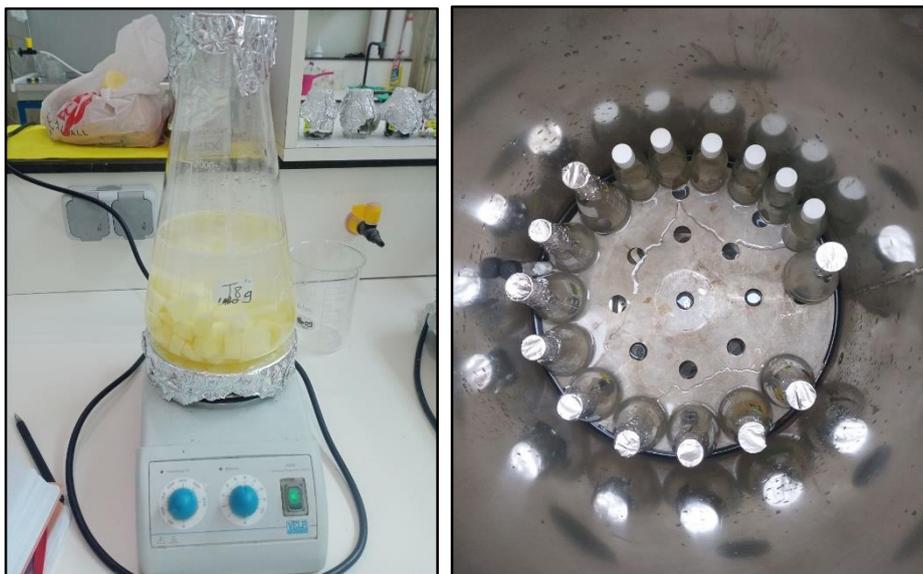


Figure IV.27: Préparation le milieu de culture PDA.

l'échantillon méthanolique sont diffusés sur le disque. 25 µl de méthanol sont utilisés comme témoin positif et uniquement le milieu PDA comme témoin négatif sur le disque. L'expérience doit être répétée 3 fois pour chaque traitement.

La notation des résultats se fait après 48 heures d'incubation à 25 °C. La croissance mycélienne de l'agent phytopathogène est mesurée à l'échelle centimétrique en mesurant le diamètre des colonies du champignon afin de calculer le taux d'inhibition.

L'activité inhibitrice est exprimée en pourcentage et calculée selon la formule :

$$I (\%) = \frac{C - T}{C}$$

Avec :

- I : taux d'inhibition en %.
- C : la croissance radiale de l'agent phytopathogène en mm sur le milieu PDA avec du méthanol (moyenne des diamètres du témoin positif).
- T : la croissance radiale de l'agent phytopathogène en mm sur le milieu PDA contenant le complexe à tester (moyenne des diamètres des colonies contenant l'extrait à tester).

Dans le cas où le taux d'inhibition est de 100% comme pour les HEstestées, on déplace le disque imprégné de champignons du centre de la boîte de Pétri. Ensuite, on observe après 5 jours si cela a le même effet sur les colonies, afin de déterminer s'il a un effet fongicide ou fongistatique sur les champignons.

Si le taux d'inhibition reste à 100 % même après le déplacement du disque de champignon, cela signifie que l'échantillon testé a un effet fongicide sur le champignon FOL à une concentration maximale de 20 %. Nous allons donc diluer cet échantillon pour vérifier s'il a le même effet sur les champignons à des concentrations plus faibles 15 % et 10 %.



Figure IV.28: Dépôt des disques au centre de la

IV.9. Test de toxicité des extraits et des huiles essentielles

IV.9.1. Test de toxicité su ver de farine

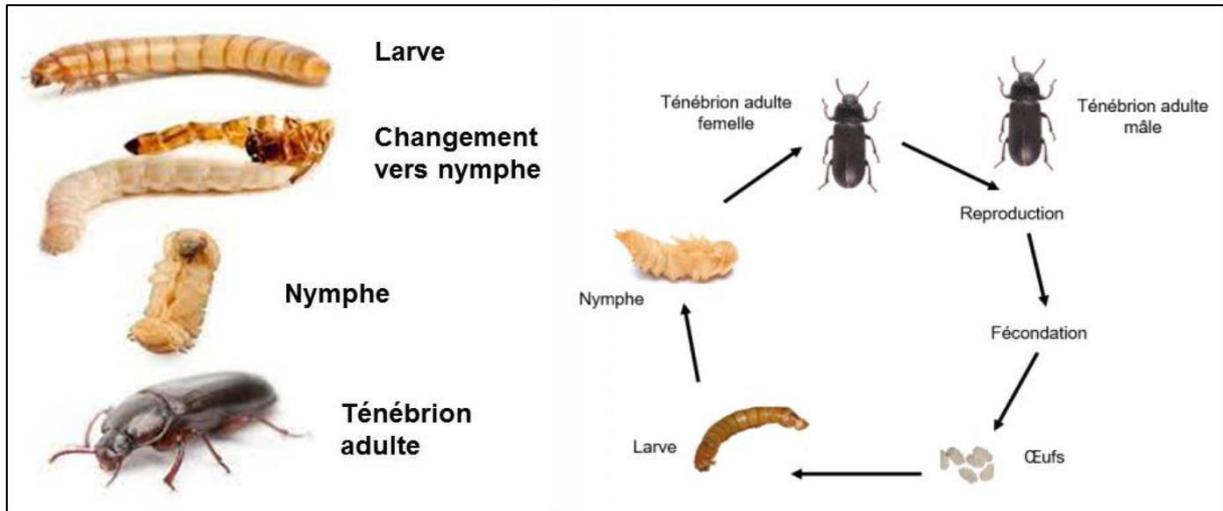


Figure IV.29: les différentes étapes de cycle de développement de vers de farine.

IV.9.1.1. Principe

Après une expérimentation préliminaire avec plusieurs modèles d'arthropodes, les larves de vers de farine ont été sélectionnées car elles sont facilement disponibles, résistantes et relativement petites. *Tenebrio Molitor* (aussi appelé le ver de farine) est le premier choix pour l'élevage d'insectes grâce à sa nature élevée en protéines, à son profil équilibré en acides aminés [197], à des avantages potentiels pour la santé et à sa capacité à vivre de sous-produits organiques et à sa production de masse disponible [198].

L'objectif de cette étude était d'examiner si les extraits des plantes d'eucalyptus et d'origan, en tant que source d'antioxydants, sont toxiques ou peuvent améliorer la performance de croissance, la composition des nutriments et l'activité antioxydante des larves de vers de farine.

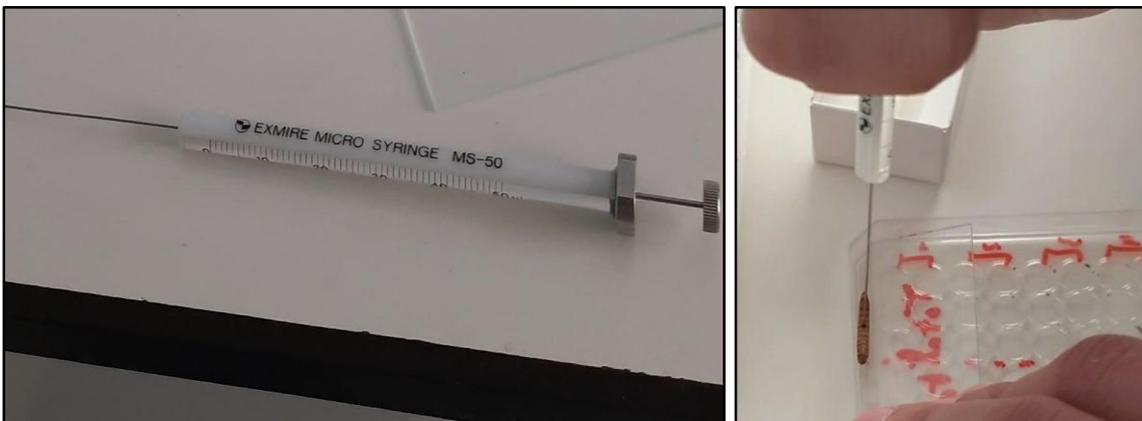
IV.9.1.2. Mode opératoire

Le test de toxicité est réalisé selon la méthode décrite par **Tom et Arie** avec une légère modification [199]. Neuf lots ont été préparés. Chacun de ces lots contient cinq verres de farine, ayant des poids proches (en mg), comme indiqué dans le tableau suivant :

Tableau IV.2: les masses de verres de farine et l'échantillon injecté dans chaque lot.

	Échantillon injecté	Masse (1)	Masse (2)	Masse (3)	Masse (4)	Masse (5)
Lot 1	OR Dichlo	37.2	38.6	39.7	36.0	37.9
Lot 2	EUC Dichlo	63.2	64.5	67.1	62.0	60.7
Lot 3	OR Microonde	102.6	107.7	100.1	100.2	104.4
Lot 4	EUC Microonde	31.5	32.9	31.1	34.1	32.4
Lot 5	OR Méthanol	44.3	42.5	40.2	45.7	40.1
Lot 6	EUC Méthanol	55.0	53.5	51.5	50.1	53.9
Lot 7	HE d'OR	43.9	45.1	47.3	41.3	46.7
Lot 8	HE d'EUC	64.3	66.7	68.4	61.4	69.1
Lot 9	Méthanol (Test -)	78.4	72.0	76.2	74.9	76.1

Des solutions de chaque échantillon méthanolique (Concentration : 4 mg/1 ml) d'un volume allant jusqu'à 3 μ l ont été injectés à l'aide d'une seringue Hamilton de 10 μ l. Les injections ont été faites caudalement dans la face ventrale des larves, latéralement à la ligne médiane, parce que cela permet d'éviter les organes les plus essentiels. Ensuite, les larves ont été incubées à température ambiante pendant 5-7 jours et des observations ont été consignées. La mortalité a été jugée par la décoloration des larves.

Figure IV.30: Injection de larves à l'aide d'une seringue Hamilton de 10 μ l.

IV.10. Formulation et contrôle de la qualité de la pommade Vick

Les médicaments administrés par voie cutanée posent moins de problèmes que ceux des autres voies, c'est pourquoi nous avons choisi la formulation du Vicks. Dans cette partie, nous nous intéressons en premier lieu à la formulation du Vicks anti-inflammatoire à base de deux HEs (eucalyptus, organ) ou à base d'extraits méthanoliques obtenus par macération, utilisés pour les rhumes et les inflammations pulmonaires de moindre degré.

Les réactifs utilisés sont indiqués dans le tableau ci-dessous :

Tableau IV.3: Les constituants utilisés en formulation.

	Les constituants	Le rôle
Les excipients communs	Huile d'amande	Base de vick
	Cire d'abeille	Agent épaississant
	Vitamine E	Conservateur
Formulation à base des HEs	HE d'eucalyptus	Principe actif
	HE d'origan	Principe actif
Formulation à base des extraits	Extrait d'eucalyptus	Principe actif
	Extrait d'origan	Principe actif

IV.10.1. Mode opératoire (à base des huiles essentielles)

La préparation du Vick se fait dans un bécher stérile placé dans un bain-marie sur un agitateur chauffant à 45°C. On verse 25 ml d'huile d'amande et on introduit une quantité d'excipient égale à 8 g de cire d'abeille avec une agitation manuelle prolongée jusqu'à obtenir un mélange homogène. Après refroidissement, on continue l'agitation en ajoutant 10 gouttes de chaque principe actif d'huiles essentielles, puis on incorpore une capsule molle de conservateur (vitamine E). On récupère tout le produit fini du Vick en utilisant une spatule et on le conserve dans une boîte en verre stérile.

IV.10.1. Mode opératoire (à base des extraits)

Pour préparer le Vicks, placez dans un bécher 13 ml d'huile d'amande et 0,5 g de chaque extrait méthanolique. Ensuite, ajoutez la quantité de cire d'abeille nécessaire pour assurer une bonne texture homogène du mélange, en la faisant fondre à une température de 45°C sur une plaque chauffante tout en agitant manuellement. Après refroidissement, incorporez le conservateur (vitamine E) et remuez pendant 10 minutes jusqu'à ce qu'il soit parfaitement homogène. Enfin, transférez le vick obtenue dans un pot en verre opaque pour la protéger de la lumière.

IV.10.2. Contrôle de qualité

Pour assurer la qualité de notre pommade vick, nous avons effectué une observation des caractéristiques macroscopiques telles que la couleur, la consistance et l'odeur. Nous avons également vérifié la stabilité, mesuré le potentiel d'hydrogène (pH) et évalué la viscosité.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

V. Résultats et discussions

V.1. Matériel végétale

V.1.1. Taux d'humidité (*Eucalyptus globulus*)

Le calcul du taux d'humidité est réalisé dans le but d'estimer la teneur en eau de la plante étudiée. Cette mesure est essentielle pour comprendre la physiologie de la plante, ses besoins en eau et son état de santé général. En déterminant la teneur en eau, on peut ajuster les pratiques de culture, d'irrigation et de conservation pour optimiser la croissance et le développement de la plante.

Le taux d'humidité est de 77,09 % : Cela indique que 77,09 % de la masse initiale de la plante était constituée d'eau. C'est un indicateur clé de l'état hydrique de notre plante.

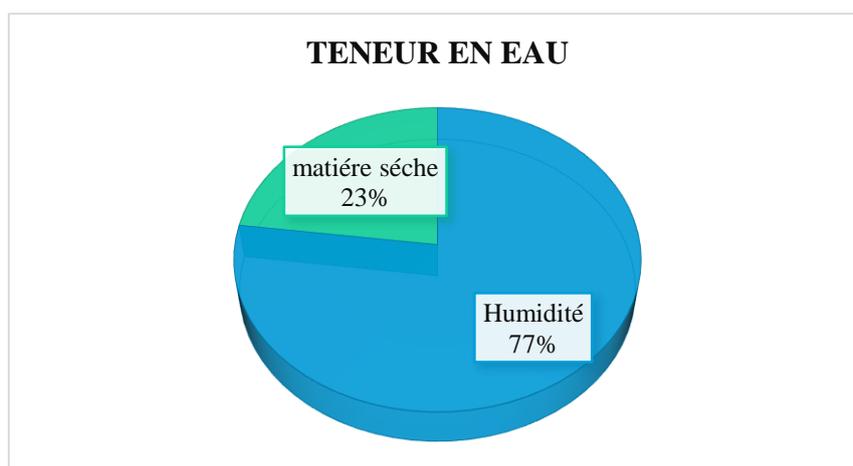


Figure V.1: Taux d'humidité d'eucalyptus.

V.1.2. Les rendements d'extraction

L'extraction des HESet extraits de différentes plantes d'*Eucalyptus globulus* et d'*Origanum vulgare*, réalisée par différentes méthodes et divers solvants, montre des rendements différents. Ces résultats sont présentés dans les tableaux V.1 et V.2.

Méthode d'extraction	Solvant d'extraction	Masse de matière sèche (g)	Masse d'extrait obtenu (g)	Durée d'extraction	Rendement (%)
Extraction solide-liquide (macération)	Méthanol	50	2,15	1heure30min	4,3
	Dichlorométhane	50	2,167	1heure30min	4,334
Microonde	Méthanol	50	8,11	70s	16,22

Tableau V.1: Rendement d'extraction de différentes méthodes (Eucalyptus globulus).

Méthode d'extraction	Solvant d'extraction	Masse de matière sèche (g)	Masse d'extrait obtenu (g)	Durée d'extraction	Rendement (%)
Extraction solide-liquide (macération)	Méthanol	50	2,08	1heure30min	4,16
	Dichlorométhane	50	2,209	1heure30min	4,418
Microonde	Méthanol	50	6,207	70s	12,414

Tableau V.2: Rendement d'extraction de différentes méthodes (Origanum vulgare).

D'après les tableaux ci-dessus, les valeurs des rendements obtenus par différentes méthodes, on constate que l'extraction par micro-ondes présente les rendements les plus élevés pour les deux plantes, atteignant 16,22 % pour l'Eucalyptus et 12,414 % pour l'Origan. Cette méthode est particulièrement rentable car elle permet d'obtenir des valeurs élevées en un temps limité. L'efficacité des micro-ondes pour perturber les parois cellulaires et libérer les composés actifs est claire à travers ces résultats. Les micro-ondes créent des conditions spéciales de transfert de matière et d'énergie qui accélèrent la cinétique d'extraction et réduisent le ratio solvant/charge. Cette méthode permet d'obtenir des rendements comparables à ceux des procédés traditionnels d'extraction, mais avec des durées de traitement beaucoup plus courtes [200].

Concernant la méthode d'extraction solide-liquide, en utilisant le méthanol comme solvant, les rendements obtenus atteignent 4,3 % pour l'Eucalyptus et 4,16 % pour l'Origan. le méthanol est un solvant polaire, efficace pour extraire des composés polaires et légèrement polaires comme les phénols, les flavonoïdes, et d'autres métabolites secondaires des plantes [201].

Bien que cette méthode nous ait permis d'obtenir une extraction efficace de certains composés polaires, les valeurs des rendements sont inférieures à celles obtenues par micro-ondes, et la durée de l'extraction est souvent plus longue.

L'extraction avec dichlorométhane donne des rendements légèrement supérieurs à ceux avec le méthanol, atteignant 4,334 % pour l'eucalyptus et 4,418 % pour l'origan. Le dichlorométhane, étant un solvant non polaire, est plus efficace pour extraire des composés lipophiles. Cependant, le gain en rendement par rapport au méthanol est minime, ce qui indique une efficacité similaire dans l'extraction des composés présents dans l'eucalyptus et l'origan [202].

Selon les résultats obtenus, la méthode d'extraction par micro-ondes est la plus efficace pour l'eucalyptus et l'origan, car elle permet d'obtenir des rendements élevés pour une courte durée. Cette méthode innovante précède les méthodes classiques d'extraction solide-liquide en termes de rapidité et d'efficacité, ce qui permet d'optimiser l'extraction des molécules actives de ces deux plantes.

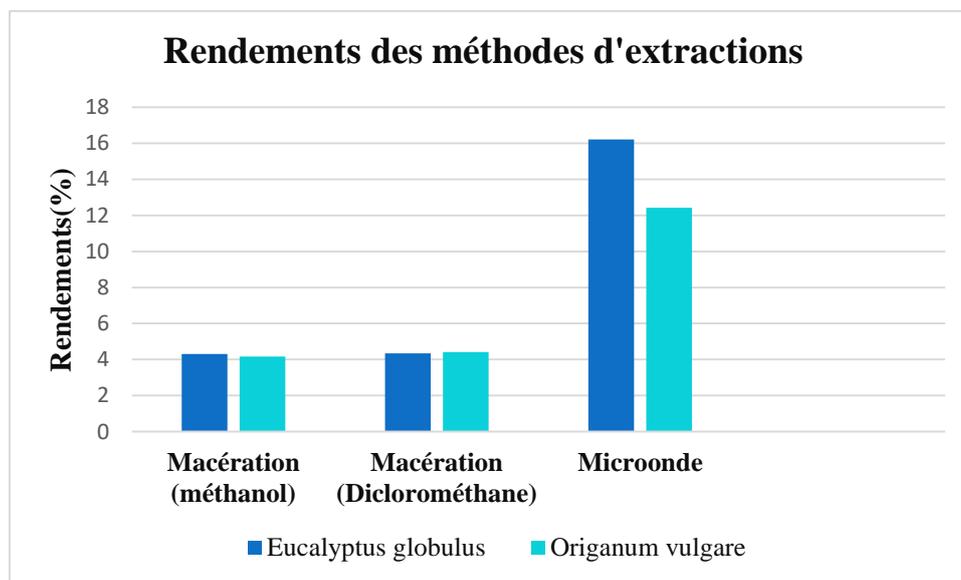


Figure V.2: Variation des rendements d'extraction de l'eucalyptus et de l'origan selon la méthode d'extraction.

Les extractions hydro-type Clevenger ont été réalisées pour évaluer les rendements d'HE des plantes d'origan et d'eucalyptus :

Tableau V.3: Résultats des Rendements d'Extraction Hydro-Type Clevenger pour l'Origan et l'Eucalyptus.

Méthode d'extraction	Plante	Masse matière sèche (g)	Masse de l'HE (g)	Durée	Rendement (%)
Hydrodistillation (Clevenger)	Eucalyptus globulus	50g	0,3	4 heures	0,6
	Origanum vulgare	50g	0,1	4 heures	0,142

La valeur de 0,6 % pour l'eucalyptus est proche de celle obtenue dans les travaux similaires [9], dont la valeur atteinte est de 1,057 % pour une masse de 50g de feuilles sèches.

Quant à l'origan, on a pu obtenir un rendement de 0,142 %. Cette valeur est meilleure que celle obtenue par les travaux réalisés par Boukhelfa et al [15], avec un rendement de 0,07 % seulement pour une masse de 100g de feuilles sèches.

Nous retenons que la variation du rendement d'extraction de l'HE d'Eucalyptus dépend de plusieurs facteurs : la zone géographique de récolte, la composition du sol, la période de récolte, le stade végétatif de la plante, la méthode d'extraction de l'essence végétale. (Toure et al, 2015) et pour la présente étude, l'hydrodistillation dépend de facteurs tels que : le temps d'extraction, le ratio matière/solvant, le début de condensation, etc [203].

V.2. Caractérisation des huiles essentielles

V.2.1. Caractéristiques organoleptiques

Selon (AFNOR, 2000), les HES sont habituellement liquides à température ambiante et volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes (huiles végétales).

Les paramètres organoleptiques de nos HES (Eucalyptus, Origan) aspect, couleur, odeur sont résumés dans le tableau V.4.

Tableau V.4: Analyse organoleptiques des deux huiles essentielles.

La

	Eucalyptus globulus	Origanum vulgare
Aspect	Limpide	Mobile limpide
Couleur	Presque incolore à jaune claire	Jaunâtre à brun foncé
Odeur	Caractéristique, fraîche, camphrée	Caractéristique, forte, épicée
Norme	AFNOR NFT7	

caractérisation organoleptique (aspect, couleur et odeur) de nos huiles nous a conduit à des valeurs conformes à la norme AFNOR NFT7 et ces valeurs sont en accord avec celles retrouvées dans la littérature [203].

V.2.2. Caractéristiques physico-chimiques

L'objectif de la présente étude est de déterminer d'abord les caractéristiques physiques (indice de réfraction et densité) et les caractéristiques chimiques (indice de saponification, indice peroxyde) des différentes HEs qui sont présentées dans le tableau ci-dessous.

		Eucalyptus globulus		Origanum vulgare	
		Valeur pratique	Référence (AFNOR) [204]	Valeur pratique	Référence (AFNOR) [205] [206]
Analyse physiques	pH	5.3	4-6	5.8	4-6
	Densité	0.83	0.906-0.921	0.65	0.93-0.95
	Indice de réfraction	1.463	1.495-1.467	1.482	1.5-1.51
Analyse Chimique	Indice de saponification (mg KOH/g)	56.1	--	42.075	--
	Indice de peroxyde (méq d'O ₂ /Kg)	10	--	30	--

Tableau V.5 : Caractéristiques physico-chimiques des deux huiles essentielles.

A. Caractéristiques physiques

D'après les résultats mentionnés dans le tableau ci-dessus, les indices de réfraction mesurés sont conformes aux normes FCC (*Food Chemical Codex*). Ce qui indique que les HEs que nous avons obtenus, liquide de couleur jaune très pâle, sont bien pures.

Les résultats mentionnés dans le tableau V.5 montrent que toutes les densités mesurées sont conformes aux normes AFNOR.

D'après les résultats mentionnés dans le tableau V.5, on constate que le pH des HEs est acide ($\text{pH} < 7$). Il convient de souligner que le pH joue un rôle déterminant au cours des réactions chimiques et peut influencer les propriétés stabilisatrices d'une HE (effets antioxydants et antimicrobiens). Par conséquent, ce résultat peut amener à un bon caractère stabilisateur.

B. Caractéristiques chimiques

L'indice de saponification des HEs d'Eucalyptus égale à (56,1) et celui de l'origan (42,075) impliquent que ces huiles contiennent une grande quantité d'acides gras avec un poids moléculaire important. L'indice de saponification rend compte de la longueur des hydrocarbures des acides gras. Plus le poids moléculaire est élevé, plus l'indice de saponification est faible [207].

L'indice de peroxyde estime l'état d'oxydation de la matière grasse ; c'est un mécanisme lent mais inéluctable. En effet, les corps gras peuvent s'oxyder en présence d'oxygène et de certains facteurs favorisant ce processus (température élevée, eau, enzymes, traces de métaux Cu, Fe...). Les valeurs présentées dans le tableau ci-dessus, 10 et 30 respectivement pour les deux huiles, peuvent s'expliquer par leur teneur élevée en acides gras libres insaturés qui s'oxydent en contact avec l'oxygène et la température [207].

V.3. Estimation de la teneur totale en polyphénols et flavonoïdes

La quantification des composés phénoliques est considérée comme importante, car ils jouent un rôle crucial dans l'activité des extraits. Il est donc nécessaire d'estimer leur quantité précisément dans ces extraits.

➤ Après l'addition du réactif de Folin-Ciocalteu et du carbonate de sodium, une couleur bleue a été constatée dans le milieu réactionnel, dont l'intensité varie en fonction de la concentration en polyphénols totaux de l'extrait.

La teneur en polyphénols a été déterminée en utilisant une courbe d'étalonnage établie avec de l'acide gallique dans une plage de concentrations allant de 25 à 200 µg/ml (Fournie par le centre de recherche en biotechnologie CRBt).

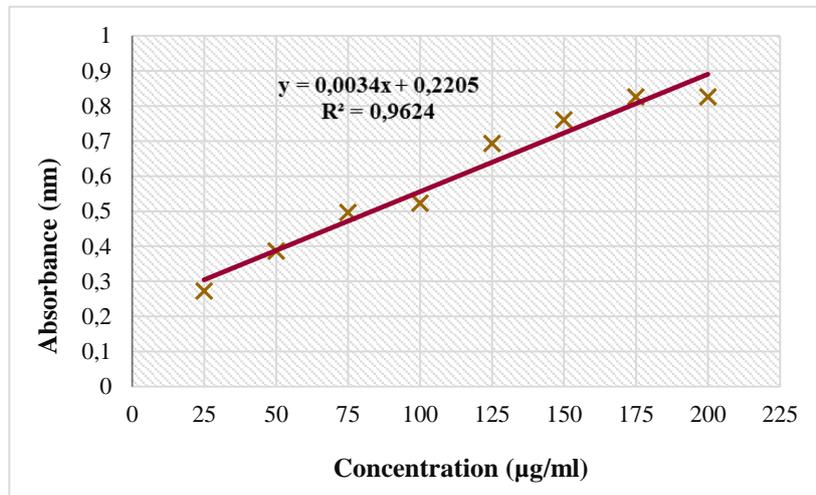


Figure V.3: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

La quantité correspondante, déterminée par l'équation de la courbe de type « $y = a(x)+b$ », a été rapportée en µg équivalents d'acide gallique utilisés par ml d'extrait de plante (µg GAE/ml).

$$A = 0.0034C + 0.1044 \leftrightarrow C = \frac{A-0.1044}{0.0034}$$

A : L'absorbance de chaque puits dans la microplaque.

➤ La méthode de dosage des flavonoïdes dans les extraits et les HEs des deux plantes est basée sur l'utilisation du nitrate d'aluminium et de l'acétate de potassium. Après l'ajout de ces réactifs, une coloration jaune verdâtre se forme, dont l'intensité varie en fonction de la concentration en flavonoïdes présents dans l'extrait testé.

La teneur en flavonoïdes a été évaluée en utilisant une courbe d'étalonnage établie avec de la quercétine, dont les concentrations variaient de 25 à 200 µg/ml (fournie par le Centre de recherche en biotechnologie CRBt).

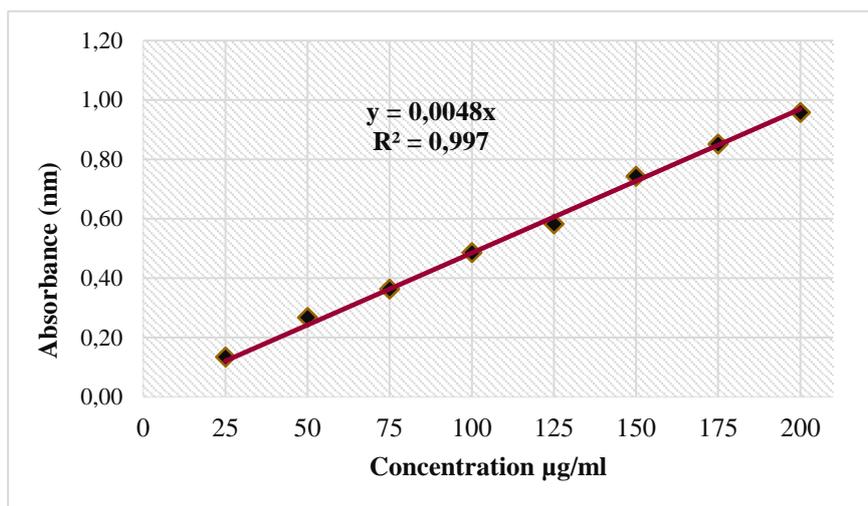


Figure V.4: Courbe d'étalonnage de la quercétine.

La quantité correspondante, déterminée par l'équation de la courbe de type « $y = a(x)+b$ », a été rapportée en µg équivalents de quercétine utilisés par ml d'extrait de plante (µg QE/ml).

$$A = 0.0048C \leftrightarrow C = \frac{A}{0.0048}$$

Avec A : L'absorbance de chaque puits dans la microplaque.

Les résultats obtenus pour le dosage des polyphénols et des flavonoïdes sont les moyennes de trois répétitions, avec l'écart-type inclus.

Tableau V.6: Teneurs en flavonoïdes et polyphénols totaux.

			Teneur en flavonoïdes (µg QE/ml)	Teneur en polyphénols totaux (µg GAE/ml)
Eucalyptus	Macération	Méthanol	75,20±0,29	236,05±25,72
		Dichlorométhane	146,80±3,97	35,56±4,57
	Extraction par Microondes	Méthanol	168,95±3,38	526,25±52,14
	Hydrodistillation	HE d'eucalyptus	74,51±0,44	29,39±5,13
Origan	Macération	Méthanol	103,05±11,93	285,76±17,04
		Dichlorométhane	232,91±4,27	100,76±2,89
	Extraction par Microondes	Méthanol	135,06±3,53	299±52,06
	Hydrodistillation	HE d'Origan	53,47±2,06	76,25±13,63

➤ TPC

D'après ces résultats, il est indiqué que les extraits obtenus en utilisant l'extraction par Microondes présentent des teneurs plus élevées en polyphénols totaux par rapport à l'extraction par macération, quelle que soit l'utilisation du solvant (méthanol ou dichlorométhane). Dans le même contexte, le méthanol est le meilleur solvant pour extraire les polyphénols des deux plantes, l'eucalyptus et l'origan, par rapport au dichlorométhane. Ces observations mettent en évidence l'effet du solvant utilisé et de la méthode d'extraction sur les teneurs en polyphénols. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études qui ont démontré l'influence des paramètres d'extraction tels que le solvant, la méthode, le temps, le rapport poudre/solvant, la température, etc., sur le rendement et la teneur en polyphénols totaux [208].

La concentration en polyphénols totaux est la plus basse dans les HEs des deux plantes comparée à celle des extraits obtenus par macération ou micro-ondes. En outre, la teneur en polyphénols totaux dans l'HE d'origan ($76,25 \pm 13,63 \mu\text{g GAE/ml}$) est plus élevée que dans celle de l'eucalyptus ($29,39 \pm 5,13 \mu\text{g GAE/ml}$).

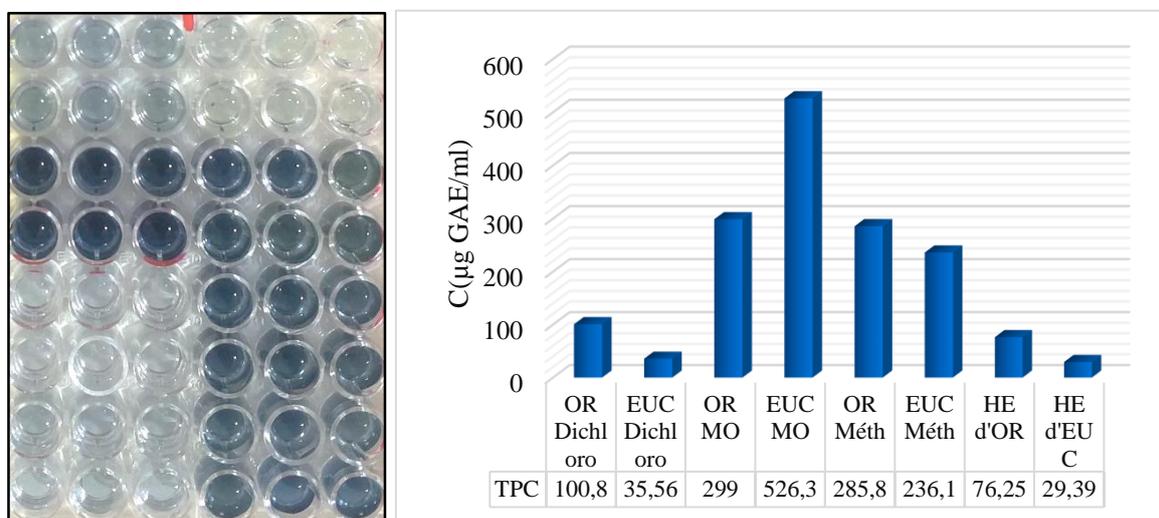


Figure V.5: Teneurs en polyphénols totaux pour les extraits et les HEs des plantes.

➤ TFC

Les flavonoïdes sont une vaste classe de polyphénols qui possèdent une grande variété de propriétés pharmacologiques. Leur présence dans les extraits peut expliquer certaines activités. Les résultats indiquent que les teneurs en ces composés sont significativement influencées par le solvant d'extraction ainsi que par la méthode d'extraction utilisée. En

comparant les solvants, on observe que l'utilisation de dichlorométhane conduit à des teneurs plus élevées en flavonoïdes que le méthanol. D'autre part, en utilisant différentes méthodes d'extraction, on constate que l'extrait obtenu par macération au dichlorométhane présente des teneurs plus élevées de flavonoïdes ($232,91 \pm 4,27 \mu\text{g EQ/ml}$) que ceux obtenus par micro-ondes, qui ont la valeur la plus faible ($135,06 \pm 3,53 \mu\text{g EQ/ml}$) pour la plante d'origan. Cependant, nous observons le contraire avec l'eucalyptus, où l'extrait obtenu par micro-ondes présente une teneur plus élevée ($168,95 \pm 3,38 \mu\text{g QE/ml}$) que ceux obtenus par macération au dichlorométhane ($146,80 \pm 3,97 \mu\text{g QE/ml}$).

Les HEs des deux plantes présentent une teneur en flavonoïdes inférieure comparée à celle des extraits par macération ou micro-ondes. Il y a une similitude notable entre la concentration en flavonoïdes de l'HE d'eucalyptus ($74,51 \pm 0,44 \mu\text{g QE/ml}$) et celle de l'extrait méthanolique obtenu par macération ($75,20 \pm 0,29 \mu\text{g QE/ml}$). De plus, l'HE d'eucalyptus affiche une teneur en flavonoïdes ($74,51 \pm 0,44 \mu\text{g QE/ml}$) supérieure à celle de l'HE d'origan ($53,47 \pm 2,06 \mu\text{g QE/ml}$).

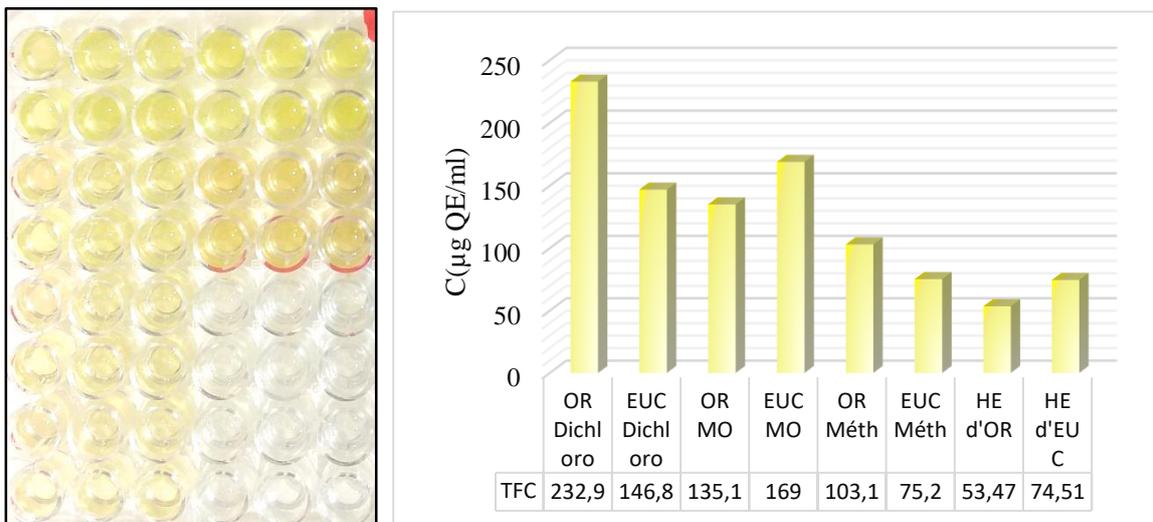


Figure V.6: Teneurs en flavonoïdes pour les extraits et les HEs de plantes.

V.4. Effet anti-radicalaire

Pour évaluer le pouvoir antiradicalaire, les radicaux synthétiques DPPH et l'ABTS ont été choisis. Les extraits ont démontré un effet antiradicalaire croissant en fonction de leur concentration, comme illustré dans les figures ci-dessous (effet dose-dépendant). Les valeurs IC50 ont également été déterminées et sont reportées dans le Tableau V.7.

Tableau V.7: Valeurs des IC50 obtenus avec les extraits et HEs d'Eucalyptus et l'Origan

			DPPH IC50 ($\mu\text{g/mL}$)	ABTS IC50 ($\mu\text{g/mL}$)
Eucalyptus	Macération	Méthanol	>800	8,68 \pm 2,30
		Dichlorométhane	362,34 \pm 20,45	214,75 \pm 2,33
	Extraction par Microondes	Méthanol	22,03 \pm 2,05	36,23 \pm 1,37
	Hydrodistillation	HE d'eucalyptus	>800	228,44 \pm 5,63
Origan	Macération	Méthanol	23,89 \pm 1,67	45,18 \pm 2,90
		Dichlorométhane	139,30 \pm 6,46	31,22 \pm 0,20
	Extraction par Microondes	Méthanol	27,18 \pm 0,82	<12.5
	Hydrodistillation	HE d'Origan	743,18 \pm 29,07	93,38 \pm 2,32
Standards		Acide Ascorbique	4,39 \pm 0,01	3.04 \pm 0.05
		Trolox	5,12 \pm 0,21	3.21 \pm 0.06

contre les radicaux DPPH et ABTS.

Valeurs représentent la moyenne \pm écart type de trois essais.



Figure V.7: Profil de la microplaque de dosage de l'activité anti-radicalaire (DPPH).

➤ DPPH

L'effet des extraits sur la réduction du DPPH dépend fortement du solvant utilisé ainsi que de la méthode utilisée. Tout d'abord, selon le solvant, l'extrait méthanolique réduit le radical DPPH plus rapidement que l'extrait dichlorométhanique obtenu par macération dans l'origan et inversement avec l'eucalyptus. Ainsi, selon la méthode d'extraction, l'extraction par micro-onde donne l'effet le plus prononcé avec une valeur IC_{50} de $22,03 \pm 2,05 \mu\text{g/mL}$, tandis que l'extraction par macération pour la plante d'eucalyptus donne une valeur supérieure à $800 \mu\text{g/mL}$. En revanche, pour l'origan, c'est l'extrait méthanolique obtenu par macération qui montre l'effet le plus significatif avec une valeur IC_{50} de $23,89 \pm 1,67 \mu\text{g/mL}$, comparée à une valeur de $27,18 \pm 0,82 \mu\text{g/mL}$ obtenue avec micro-onde.

En ce qui concerne les HEs des deux plantes, elles montrent l'effet le plus faible en termes de réduction du radical DPPH par rapport à tous les autres extraits. À noter que l'huile d'origan a un effet plus marqué que celui d'eucalyptus, avec des valeurs d' IC_{50} de $743,18 \pm 29,07 \mu\text{g/mL}$ et supérieure à $800 \mu\text{g/mL}$ respectivement.

L'activité antioxydante en termes de réduction du radical DPPH de tous les extraits, réalisée avec différents solvants et méthodes, ainsi que des HEs des deux plantes, était inférieure à celle des standards d'acide ascorbique $4,39 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ et de Trolox $5,12 \pm 0,21 \mu\text{g/mL}$.

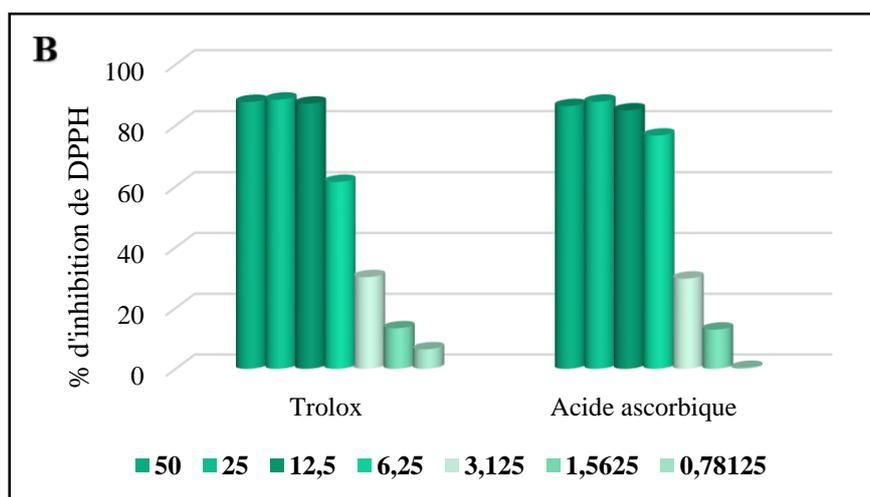
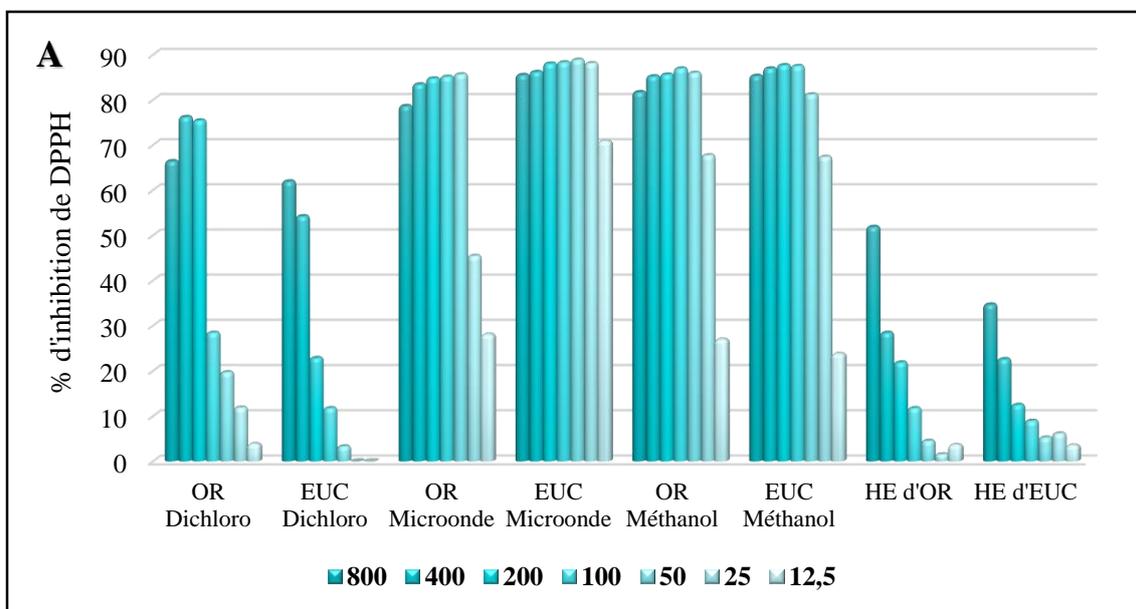


Figure V.8: Activité antiradicalaire des extraits de plantes et des huiles essentielles (A) et des standards (B) contre le radical DPPH.

➤ ABTS

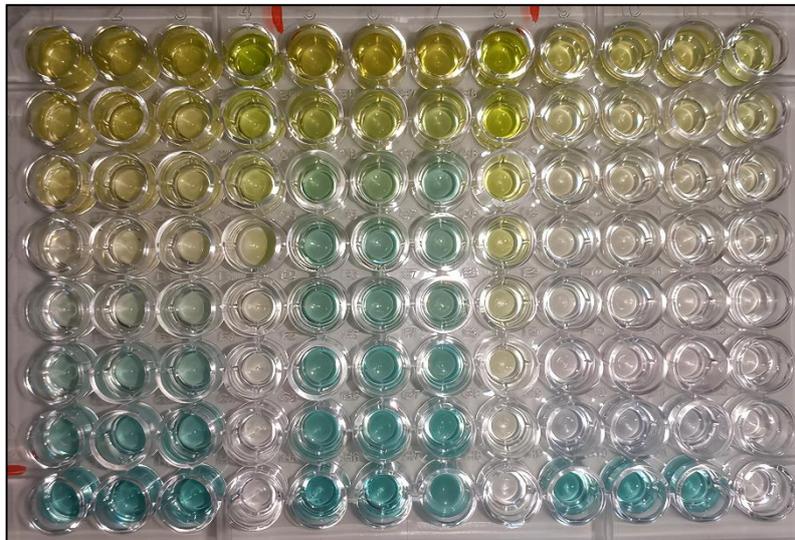
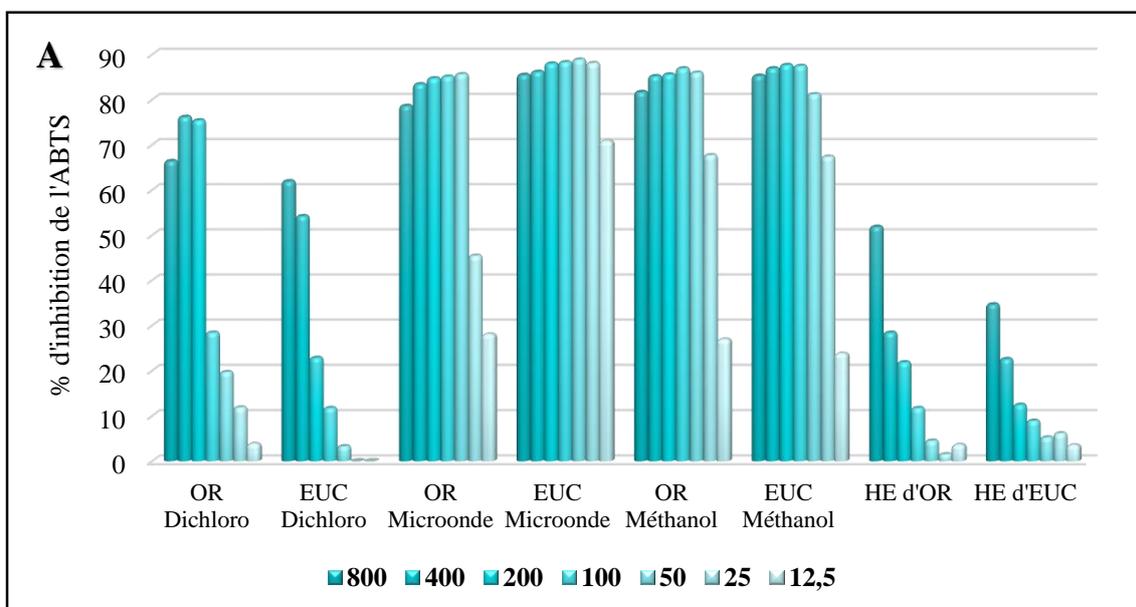


Figure V.9: Profil de la microplaque de dosage de l'activité antiradicalaire (ABTS).

La capacité des extraits à réduire le radical ABTS dépend également du solvant utilisé et de la méthode d'extraction. Pour l'eucalyptus, les extraits méthanoliques montrent l'effet le plus important, avec des valeurs IC₅₀ de $8,68 \pm 2,30$ et $36,23 \pm 1,37$ $\mu\text{g/mL}$ obtenues respectivement par macération et micro-ondes. L'extrait dichlorométhanique, quant à lui, présente une activité faible avec une valeur de $214,75 \pm 2,33$ $\mu\text{g/mL}$. En ce qui concerne l'origan, l'extraction méthanolique par micro-ondes montre un effet plus prononcé avec une valeur inférieure à 12 $\mu\text{g/mL}$, comparée à celle de l'extrait dichlorométhanique et méthanolique qui présentent des effets moins importants avec des valeurs de $31,22 \pm 0,20$ et $45,18 \pm 2,90$ $\mu\text{g/mL}$ respectivement.

Concernant les HEs des deux plantes, elles présentent l'effet le plus faible de réduction du radical ABTS parmi tous les extraits testés. Il est important de noter que l'huile d'origan a un effet plus prononcé que l'huile d'eucalyptus, avec des valeurs d'IC₅₀ respectives de



93,38±2,32 µg/mL et 228,44±5,63 µg/mL.

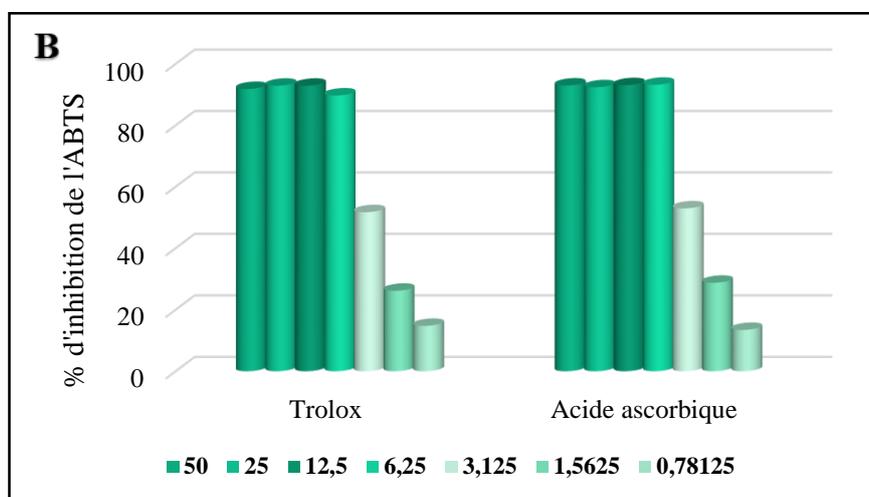


Figure V.10: Activité antiradicalaire des extraits de plantes et des huiles essentielles (A) et des standards (B) contre le radical d'ABTS.

L'activité antiradicalaire plus importante des extraits méthanoliques par rapport aux extraits dichlorométhaniques pourrait être attribuée aux teneurs élevées en polyphénols totaux, qui sont mieux extraites par le méthanol que par le dichlorométhane. En effet, les polyphénols sont considérés comme les antioxydants d'origine naturelle les plus importants en raison de leur structure qui comporte des groupes hydroxyle, leur permettant de neutraliser les radicaux libres en donnant ces électrons ou des atomes d'hydrogène. Ainsi, plusieurs études ont établi une relation très étroite entre les teneurs en polyphénols des extraits et leur effet antioxydant [209, 210].

Des études sur le pouvoir antioxydant de l'*Eucalyptus globulus* ont révélé que les extraits et les HEs de cette plante présentaient une capacité d'inhibition importante du DPPH [211], en raison des composés phénoliques [212]. Ce résultat est probablement dû aussi à la présence d'eucalyptol autrement dit 1,8-cinéole [213].

Les résultats d'études ont montré une inhibition très importante des radicaux libres DPPH et ABTS par les différents extraits alcooliques des feuilles d'*Eucalyptus globulus* [214], ainsi que par les extraits d'HEs d'origan [215], avec des valeurs significatives très proches de celles des standards.

V.5. Réduction des ions métalliques

La capacité réductrice des extraits et des HES a été évaluée en utilisant le test FRAP et phenanthroline. Les valeurs d' $A_{0.5}$ ($\mu\text{g/mL}$) obtenues sont présentées dans le tableau V.8. Une valeur $A_{0.5}$ ($\mu\text{g/mL}$) plus faible correspond à une activité réductrice plus importante.

Tableau V.8: Valeurs d' $A_{0.5}$ obtenues en utilisant les extraits et les HES des deux plantes, ainsi que des standards.

			Pouvoir réducteur $A_{0.5}$ ($\mu\text{g/mL}$)	Phenanthroline $A_{0.5}$ ($\mu\text{g/mL}$)
Eucalyptus	Macération	Méthanol	23,40±0,49	190,62±3,17
		Dichlorométhane	>200	23,99±1,64
	Extraction par Microondes	Méthanol	34,00±1,19	4,04±0,69
	Hydrodistillation	HE d'eucalyptus	192,83±1,30	>200
Origan	Macération	Méthanol	>200	187,17±1,45
		Dichlorométhane	78,05±5,11	16,22±1,73
	Extraction par Microondes	Méthanol	25,54±1,94	5,90±0,20
	Hydrodistillation	HE d'Origan	75,61±1,62	42,73±7,77
Standards		Acide Ascorbique	3.62±0.29	3,08±0,02
		Trolox	5.25±0.20	5,21±0,27



Figure V.11: Profil de la microplaque de l'activité de pouvoir réducteur.

Valeurs représentent la moyenne \pm écart type de trois essais

➤ **Pouvoir réducteur**

Le changement de couleur, du jaune au vert, observé dans la microplaque indique la présence de substances qui ont la capacité de transférer un électron ou de donner un atome d'hydrogène.

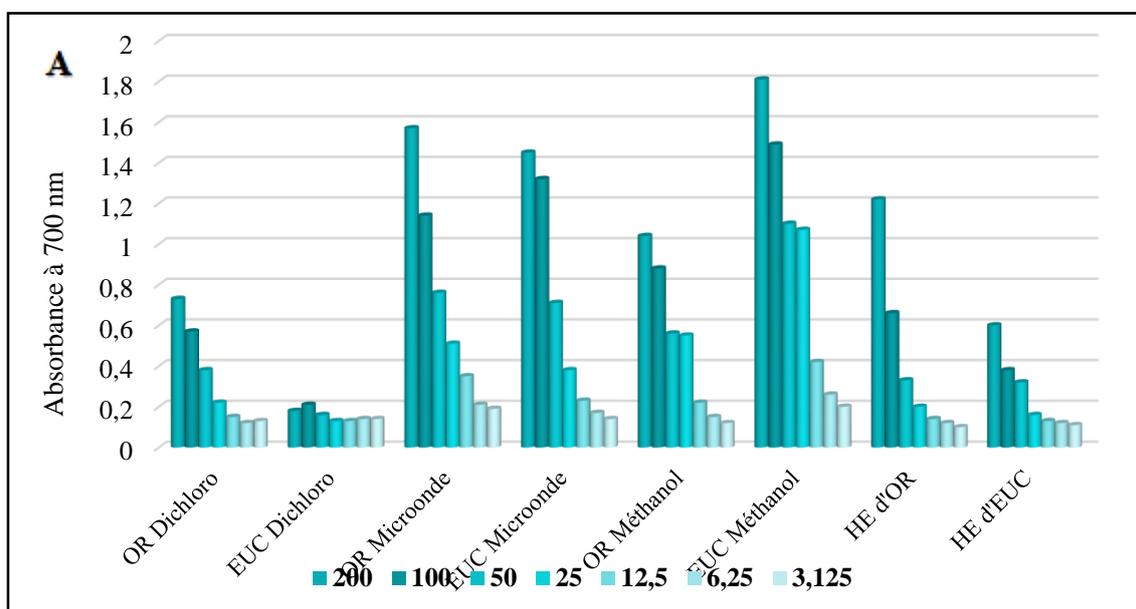
Comme constaté, l'absorbance à 700 nm augmente en fonction de la concentration indiquant un effet dose-dépendant. Les résultats calculés dévoilent que l'extrait méthanolique de l'Eucalyptus, obtenu par macération, présente un pouvoir réducteur considérable avec une valeur de $A_{0.5}$ égale à $23,40 \pm 0,49 \mu\text{g/ml}$, supérieure à celle de l'extrait obtenu par la technique micro-onde qui atteint une valeur égale à $34,00 \pm 1,19 \mu\text{g/ml}$, et à celle de l'extrait dichlorométhanique qui dépasse 200 $\mu\text{g/ml}$.

Concernant la plante d'origan, l'extrait obtenu par micro-onde présente une valeur de $A_{0.5}=25,54 \pm 1,94 \mu\text{g/ml}$, suivi par l'extrait dichlorométhanique avec une valeur de $78,05 \pm 5,11 \mu\text{g/ml}$, supérieure à celle de l'extrait méthanolique obtenu par macération ($>200 \mu\text{g/ml}$).

De plus, il convient de noter que les HEs des deux plantes présentent un potentiel réducteur ($A_{0.5}$) inférieur à celui de tous les extraits obtenus par différentes méthodes.

À titre comparatif, il est à noter que l'HE d'Origan montre un pouvoir réducteur supérieur à celui de l'Eucalyptus, avec des valeurs d' $A_{0.5}$ de $75,61 \pm 1,62 \mu\text{g/ml}$ et $192,83 \pm 1,30 \mu\text{g/ml}$ respectivement.

Les extraits et les HEs des deux plantes sont presque six fois plus faibles (ou plus) par rapport aux standards de l'acide ascorbique ($A_{0.5} = 3,62 \pm 0,29 \mu\text{g/ml}$) et du trolox ($A_{0.5} = 5,25 \pm 0,20 \mu\text{g/ml}$).



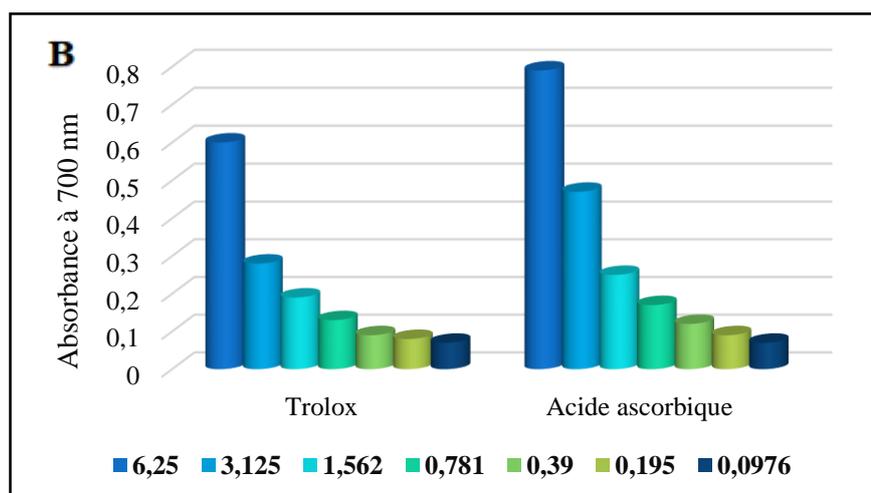


Figure V.12: Pouvoir réducteur des extraits et des huiles essentielles des deux plantes (A) et des standards Trolox et acide ascorbique (B), à différentes concentrations.

➤ Phenanthroline

C'est une activité simple basée sur la formation d'un complexe sous le nom de ferroïne = Fe^{+2} -phenanthroline à partir du fer aqueux sous sa forme ferreuse réduite (Fe^{+2}), il est de couleur rouge-orangée foncé. Son absorbance à 510 nm.

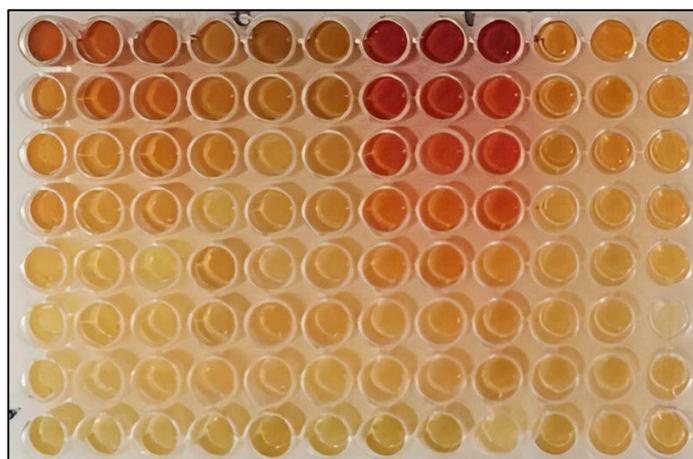
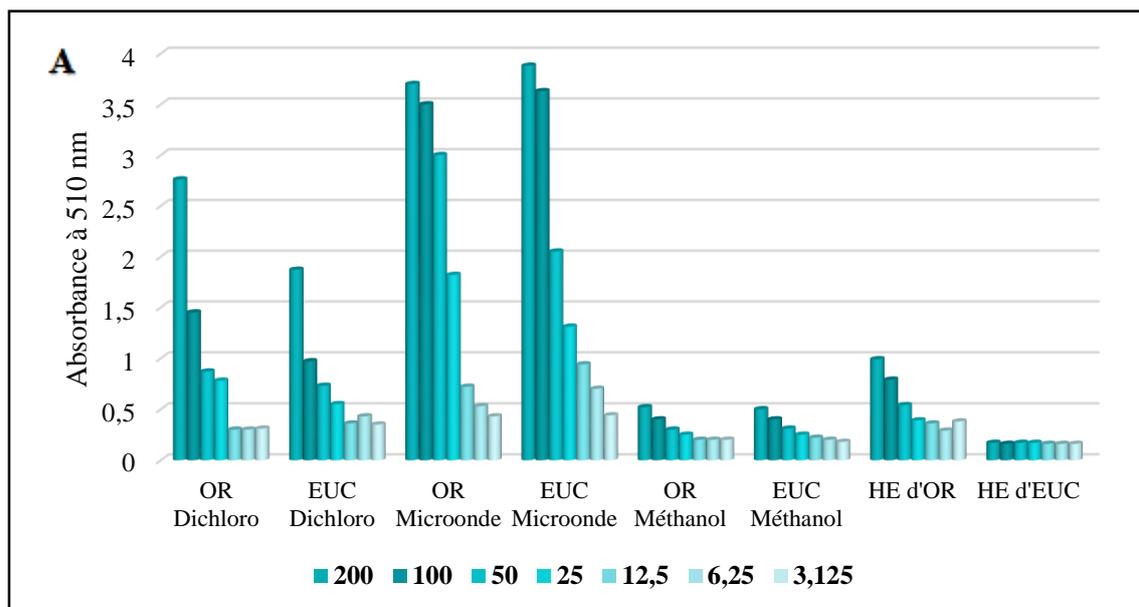


Figure V.13: Profil de la microplaque de test de phenanthroline.

Les valeurs $A_{0,5}$ obtenues pour l'origan et l'eucalyptus indiquent que les extraits méthanoliques des plantes obtenus par microonde présentent le pouvoir réducteur le plus élevé. L'origan affiche une valeur de $(5,90 \pm 0,20 \mu\text{g/mL})$ tandis que l'eucalyptus présente une valeur de $(4,04 \pm 0,69 \mu\text{g/mL})$. Les extraits dichlorométhaniques d'origan $(16,22 \pm 1,73 \mu\text{g/mL})$ et d'eucalyptus $(23,99 \pm 1,64 \mu\text{g/mL})$ montrent des activités plus faibles par rapport à ceux-ci. Les extraits méthanoliques obtenus par macération sont les moins efficaces, avec des valeurs de $(187,17 \pm 1,45 \mu\text{g/mL})$ pour l'origan et $(190,62 \pm 3,17 \mu\text{g/mL})$ pour l'eucalyptus. De plus, l'extrait d'origan présente une activité antioxydante plus remarquable que celui de l'eucalyptus.

En ce qui concerne les HES des deux plantes, elles ont le potentiel réducteur le plus faible parmi tous les extraits examinés. Il convient de noter que l'huile d'origan démontre une action plus prononcée que celle de l'huile d'Eucalyptus, avec des valeurs $A_{0,5}$ respectives de $(42,73 \pm 7,77 \mu\text{g/mL})$ et $(>200 \mu\text{g/mL})$.

En comparaison avec les standards, les extraits méthanoliques obtenus par microondes enregistrent des valeurs très proches de celles de l'acide ascorbique $(3,08 \pm 0,02 \mu\text{g/mL})$ et du trolox $(5,21 \pm 0,27 \mu\text{g/mL})$. Les extraits dichlorométhaniques sont inférieurs de 3 fois ou plus par rapport aux standards. Les autres extraits et HES sont très inférieurs à ceux-ci.



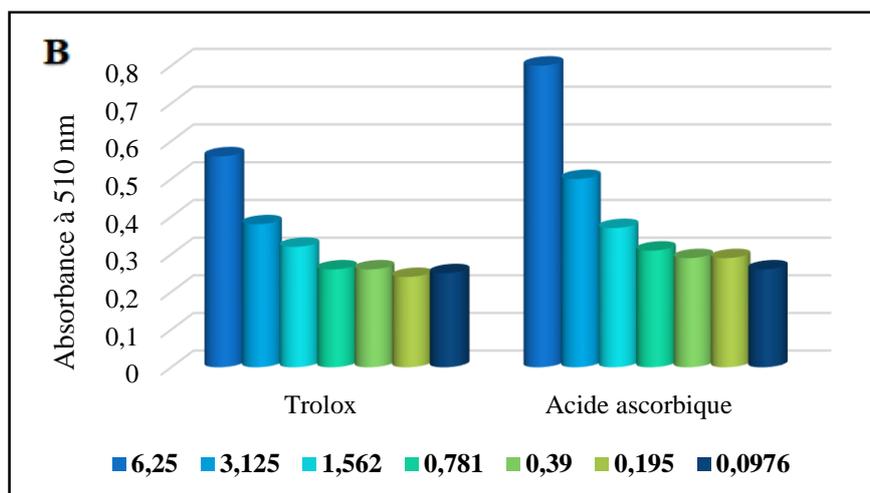


Figure V.14: Test phenanthroline des extraits et des huiles essentielles des deux plantes (A) et des standards Trolox et acide ascorbique (B), à différentes concentrations.

V.6. Effet anti-inflammatoire (in vitro)

L'étude de l'activité anti-inflammatoire in vitro des extraits et des HESa été réalisée par la méthode de l'inhibition de la dénaturation thermique de l'albumine sérique bovine (BSA).

Le mécanisme possible de la dénaturation consiste à l'altération de la structure tridimensionnelle des protéines par la détérioration des liaisons électrostatiques, hydrogènes, hydrophobes et disulfures qui maintiennent cette dernière [216]. Cela signifie qu'il s'agit d'un processus pathologique par lequel ces molécules perdent leur structure et, par conséquent, leur fonctionnalité [217].

La capacité anti-inflammatoire des différents extraits et HES a été déterminée à partir de l'IC50, qui est la concentration nécessaire pour réduire 50 % du BSA.

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire montrent des valeurs d'IC50 négligeables pour la plupart des extraits à différentes concentrations testées.

Ceci peut être dû à la mauvaise qualité du produit chimique BSA disponible au CRBT, surtout que la pluparts des stagiaires ont obtenu des valeurs semblables à nos essais.

Tableau V.9: Valeurs des IC50 obtenues avec les extraits et HEs d'Eucalyptus et d'Origan vis-à-vis de la dénaturation thermique du BSA.

	Méthode d'extraction		IC50 (µg/mL)
Eucalyptus	Macération	Méthanol	NA
		Dichlorométhane	NA
	Extraction par Microondes	Méthanol	NA
	Hydrodistillation	HE d'eucalyptus	>8000
Origan	Macération	Méthanol	190,76±5,32
		Dichlorométhane	NA
	Extraction par Microondes	Méthanol	NA
	Hydrodistillation	HE d'Origan	>8000
Standard		Diclofenac	24,01±0,41

V.7. Activité antibactérienne

Afin d'estimer l'activité antibactérienne de nos plantes, nous mesurons précisément le diamètre (D) de la zone d'inhibition à l'aide d'une règle. Nous avons suivi l'échelle de **Poncé 2003 [218]**, qui a classifié ces diamètres en 4 classes :

Tableau V.10: L'échelle de Poncé des 4 classes de diamètres.

Extrêmement sensible	+++	Diamètre plus de 20 mm
Très sensibles	++	Diamètre de 15 mm à 19 mm
Sensibles	+	Diamètre de 8 mm à 14 mm
Non sensibles	-	Diamètre moins de 8 mm

Les valeurs des zones d'inhibition calculées sont exprimées en moyenne de trois essais ± écart type et les diamètres obtenus lors de cette étude varient de 6 mm à 11 mm (Tableau V.11).

Tableau V.11: Diamètres des zones d'inhibitions des deux plantes sur E.coli et S.Aureus.

Les souches testées	Dilutions (mg/ml)	Plantes				Témoin	
		Extrait méthanolique		HE		+	-
		Eucalyptus	Origan	Eucalyptus	Origan		
	100	8.33±0.05	6±0	10.33±0.25	8±0.26	21	6
	50	10.67±0.20	7.67±0.11	9±0.1	9.33±0.05		
	25	7±0.1	7±0.1	10.67±0.05	9.67±0.25		
	12.5	8±0.1	7.67±0.15	8.33±0.05	9.67±0.05		
	100	8.33±0.05	7±0.1	9±0.26	7.67±0.11	22	6
	50	8.67±0.05	6±0	6.67±0.05	11±0.17		
	25	10.67±0.05	7±0.1	6.67±0.05	7.67±0.15		
	12.5	9±0.1	7±0	8.33±0.15	7.33±0.05		

▶ Diamètres moins de 8 mm (-)

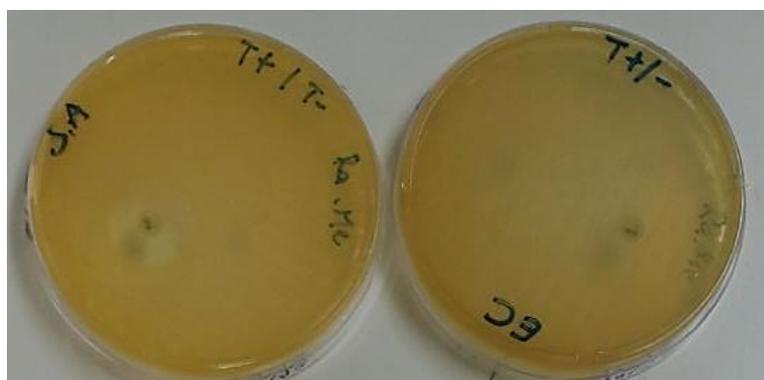


Figure V.15: L'inhibition des bactéries par antibiotique amoxicilline 30µg (Témoin +) par méthanol (Témoin -).

En ce qui concerne le témoin positif utilisant l'antibiotique amoxicilline 30 µg, un diamètre d'inhibition de 21 mm a été obtenu pour *Escherichia coli* et de 22 mm pour *Staphylococcus aureus*. Cela prouve donc l'effet inhibiteur des antibiotiques utilisés. Le témoin négatif, constitué de méthanol, n'a montré aucun effet inhibiteur contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, avec un diamètre d'inhibition de 6 mm pour les deux souches bactériennes.

➤ **Plante d'eucalyptus**

L'extrait méthanolique d'eucalyptus a révélé un effet moyen sensible sur la croissance de *S. aureus* à diverses concentrations, particulièrement notable à 25 mg/ml (10,67 mm), et contre *E. coli* à des concentrations plus élevées de 50 et 100 mg/ml (10,67 et 8,33 mm respectivement), tandis qu'il a montré un effet non sensible aux autres faibles concentrations de 25 et 12,5 mg/ml.

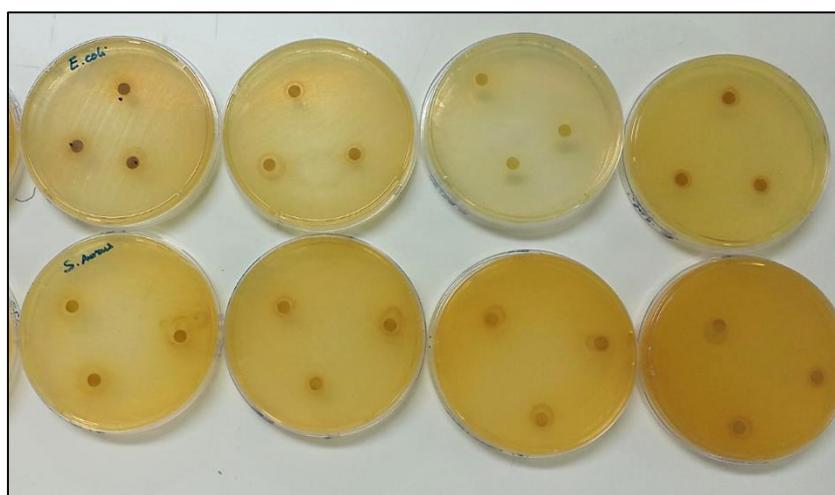


Figure V.16: l'inhibition de l'activité des deux bactéries par l'extrait d'eucalyptus.

Par ailleurs, l'HE d'eucalyptus a démontré un effet moyen sensible sur la croissance d'*E. Coli* à différentes concentrations, surtout à 25 et 100 mg/ml (10,67 et 10,33 mm respectivement), ainsi que sur la croissance de *S. aureus* à 100 mg/ml (9 mm), sachant qu'il a enregistré un effet non sensible aux autres faibles concentrations.

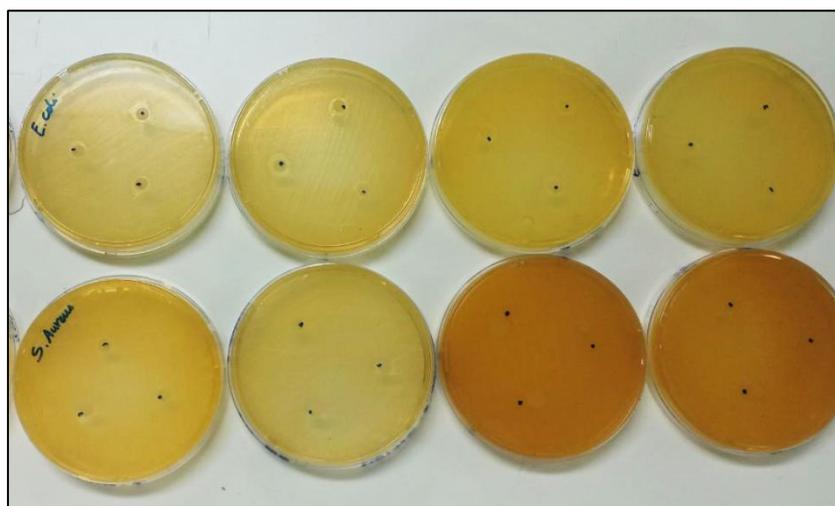


Figure V.17: l'inhibition de l'activité des deux bactéries par l'extrait d'eucalyptus.

➤ **Plante d'origan**

L'extrait méthanolique d'origan n'a pas montré un effet caractéristique sur la croissance des deux bactéries *S. aureus* et *E. coli* à différentes concentrations (effet non sensible).

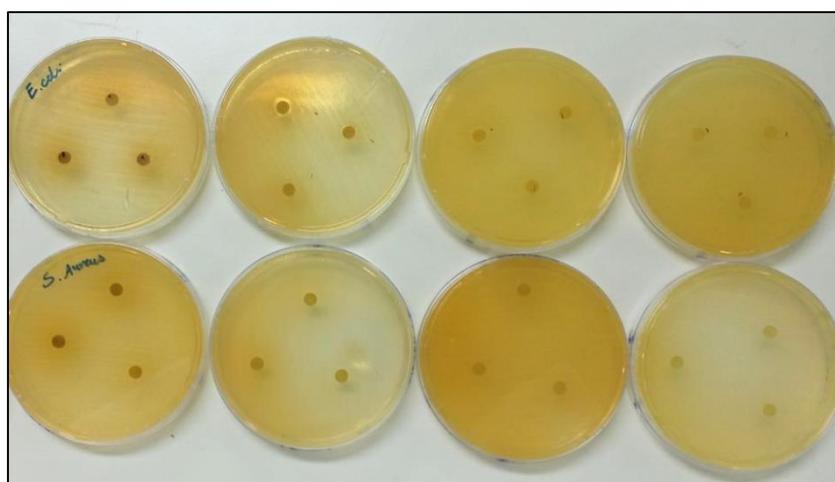


Figure V.18: l'inhibition de l'activité des deux bactéries par l'extrait d'origan.

L'HE d'origan a montré un effet moyen sensible contre la croissance d'*E. Coli* avec une zone d'inhibition de 9,37 mm à de faibles concentrations, et contre *S. aureus* à 50 mg/ml avec une zone de 11 mm, tout en ne présentant aucun effet à d'autres concentrations (effet non sensible).

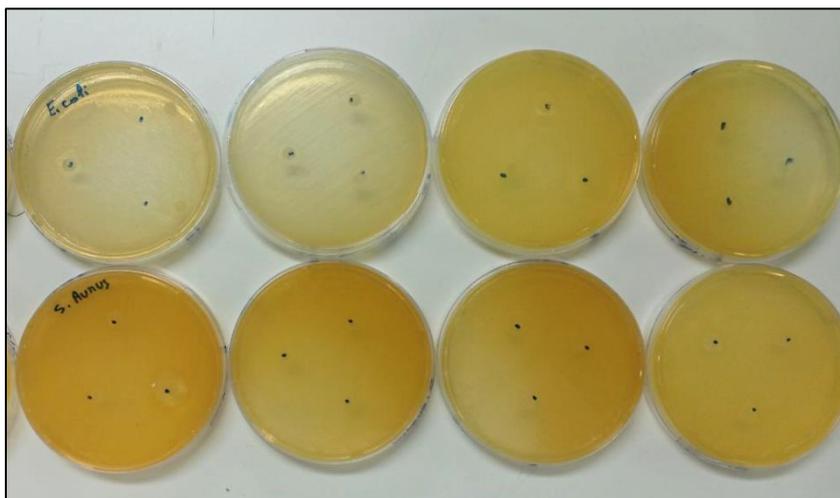


Figure V.19: l'inhibition de l'activité des deux bactéries par l'HE d'origan.

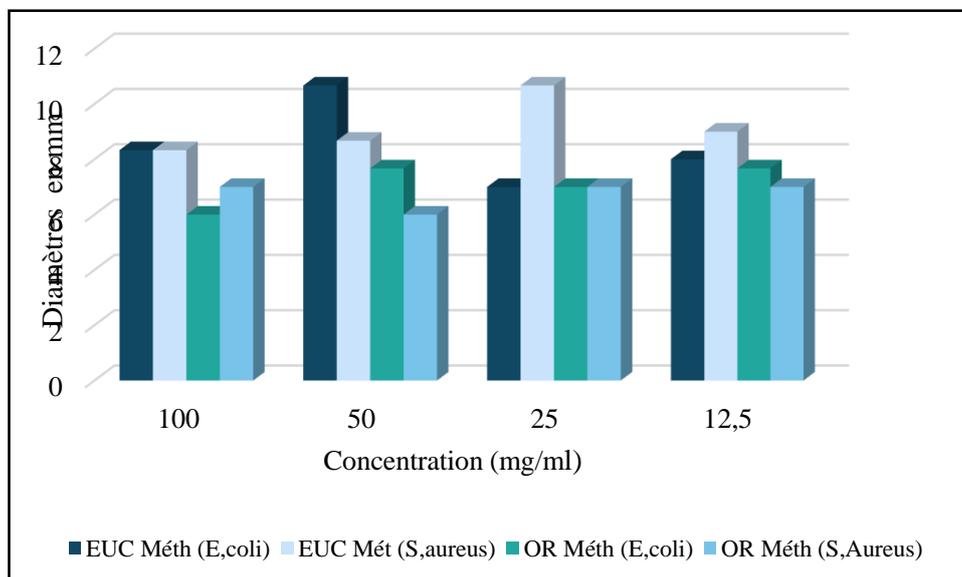
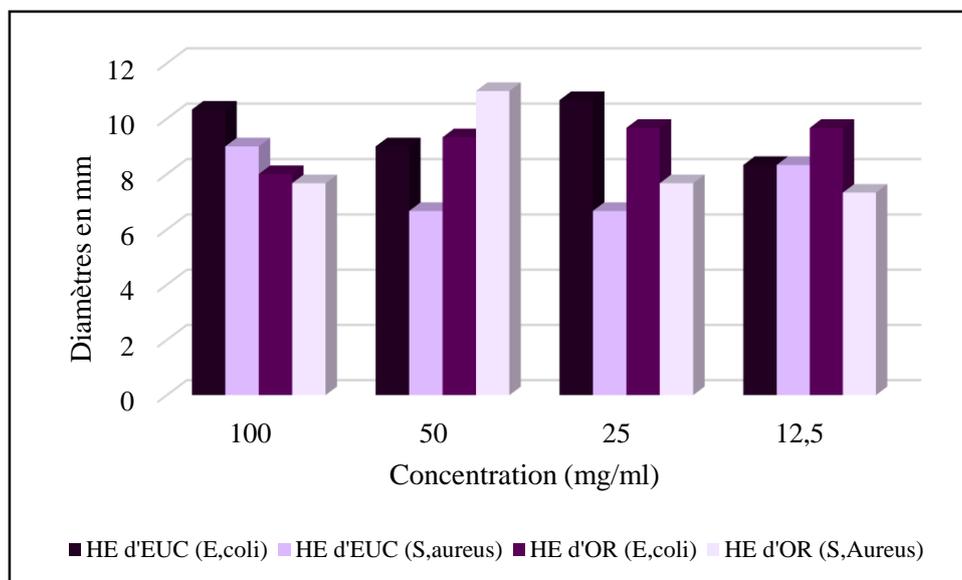


Figure V.21: Activité antibactérienne des extraits méthanoliques contre les deux bactéries.

Les résultats obtenus ont montré également que l'HE d'*Eucalyptus* étudiée est plus active contre *E. coli* (Gram -) que contre celle de *S. aureus* (Gram +).

Ce même résultat a été constaté dans plusieurs études qui ont évalué l'activité inhibitrice des HE, et elles ont confirmé que les bactéries Gram positives sont moins sensibles aux HEs que les bactéries Gram négatives [219, 220]. Cette résistance est liée à la complexité de leur enveloppe cellulaire, qui comprend une double membrane [221, 222].

L'HE d'*Eucalyptus globulus* possède une activité antibactérienne contre les bactéries Gram-négatives (*E. coli*) ainsi que les bactéries Gram-positives (*S. aureus*). Il a également été indiqué que l'HE des feuilles d'*Eucalyptus globulus* peut être utilisée comme antibiotique naturel pour traiter de nombreuses maladies infectieuses causées par ce type de bactéries.

Il est essentiel de souligner que, malgré des diamètres d'inhibition inférieurs à ceux de l'antibiotique de référence (22 mm et 21 mm contre *E. coli* et *S. aureus* respectivement), les résultats prometteurs mettent en évidence le potentiel sensible des extraits méthanoliques et des HEs des deux plantes en tant qu'agents antimicrobiens à explorer.

V.8. Effet antifongique

L'activité antifongique a été évaluée in vitro par la méthode de contact direct. Elle a été utilisée pour tester la sensibilité du champignon (*Fusarium oxysporum*) vis-à-vis des HEs et des extraits méthanoliques.

Les résultats obtenus du test d'activité antifongique des échantillons méthanoliques révèlent des observations satisfaisantes. Au début du test, les témoins positif et négatif ont un diamètre moyen égal de 1.7 cm, ce qui indique un pourcentage d'inhibition de 0 %. Ainsi, le méthanol n'a aucune activité contre le champignon "FOL".

Tableau V.12: Résultats d'activité antifongique pour la concentration à 20% après 48 h.

	Rép (1)	Rép (2)	Rép (3)	Moy \pm erreur	I (%)
Témoin (+)	1.7	1.6	1.8	1.7 \pm 0.1	0
Témoin (-)	1.6	1.7	1.8	1.7 \pm 0.1	0
OR Méth	1	1.3	0.7	1 \pm 0.3	41.17
EUC Méth	0.6	0.4	0.5	0.5 \pm 0.1	70.58
HE d'EUC	0	0	0	0	100
HE d'OR	0	0	0	0	100

➤ Pour les extraits

Les essais réalisés en utilisant des extraits méthanoliques obtenus par macération des plantes d'origan et d'eucalyptus, avec une concentration maximale de 20%, ont révélé des taux d'inhibition respectifs de 41,17% et 70,58%. Ces résultats démontrent une activité antifongique significative des extraits méthanoliques des deux plantes contre le champignon "FOL". En outre, l'extrait méthanolique d'eucalyptus présente une activité antifongique plus prononcée que celui d'origan.

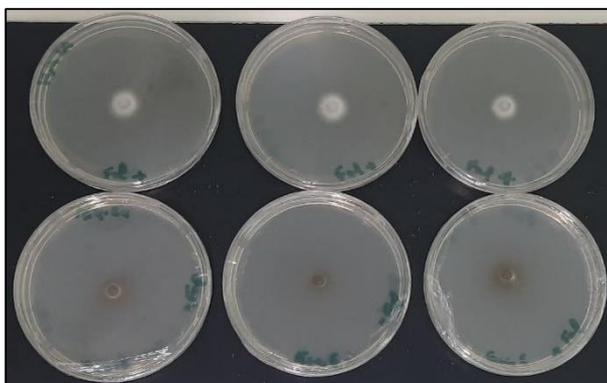


Figure V.22: Résultats avec l'extrait méthanolique d'eucalyptus 20 % après 48h.

➤ Pour les huiles essentielles

Les essais menés avec des HES d'origan et d'eucalyptus, à une concentration maximale de 20%, ont montré une inhibition totale de 100%. Ces résultats démontrent une activité antifongique plus élevée des HES des deux plantes pour inhiber le champignon "FOL", par rapport aux extraits méthanoliques.

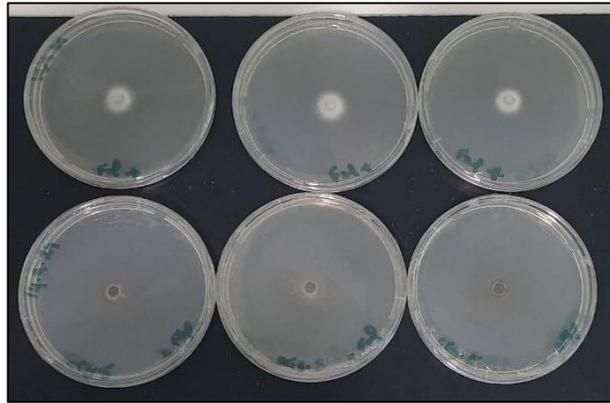


Figure V.23: Résultats avec l'extrait méthanolique d'origan 20 % après 48h.

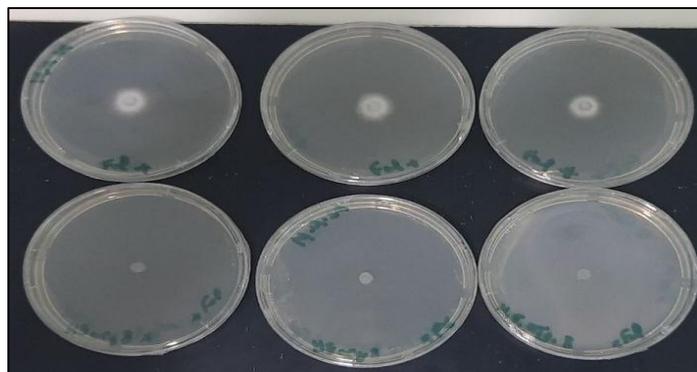


Figure V.24: Résultats avec l'HE d'origan 20 % après 48h.



Figure V.25: Résultats avec l'HE d'eucalyptus 20 % après 48h.

Pour déterminer si les HEs ont un effet fongicide ou fongistatique sur le champignon "FOL" à une concentration de 20%, voici les résultats obtenus après 5 jours de déplacement du disque dehors centre de la boîte de Pétri :

- **Pour l'HE d'eucalyptus**

Nous avons remarqué qu'aucune croissance de champignon FOL (ne poussait pas), ce qui s'explique par l'élimination permanente des HESd'eucalyptus sur le champignon à sa concentration maximale de 20%, avec un taux d'inhibition total de 100%. On peut donc affirmer qu'il a un effet fongicide.



Figure V.26: Résultats avec l'HE d'eucalyptus à 20 % après 5 jours de déplacement.

- **Pour l'HE d'origan**

Nous avons observé une croissance significative de champignons dans les trois répétitions. Cela signifie que l'HE d'origan, à sa concentration maximale de 20%, inhibe temporairement

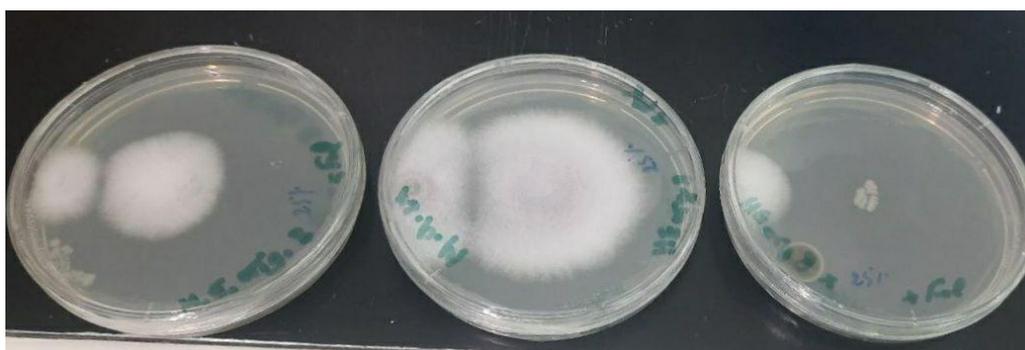


Figure V.27: Résultats avec l'HE d'origan à 20 % après 5 jours de déplacement.

l'action des champignons. Par conséquent, nous pouvons affirmer qu'il possède un effet fongistatique.

☞ Résultats avec les dilutions de 15 % et 10 % d'HE d'eucalyptus dans le méthanol après 48 heures.

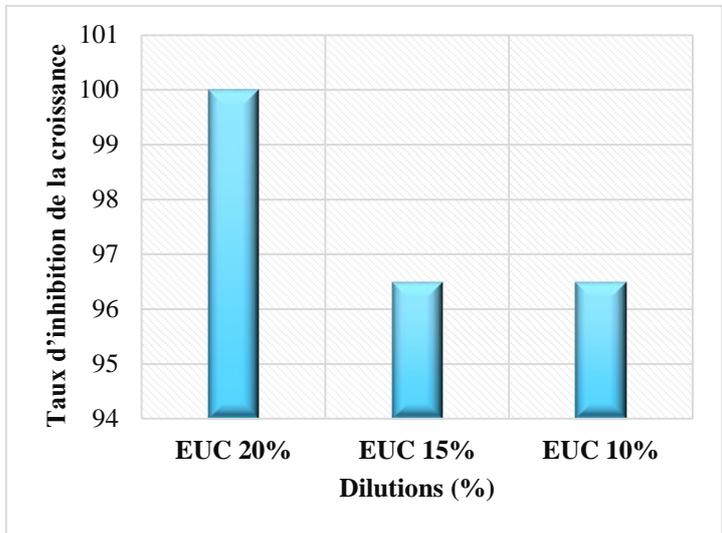


Figure V.28: Effet de l’huile d’Eucalyptus sur le taux d’inhibition de la croissance de FOL à différentes concentrations.

Tableau V.13: Résultats avec les dilutions de 15 % et 10 % d'HE d'eucalyptus après 48 h.

				Rép (1)	Rép (2)	Rép (3)	Moy ± erreur	I (%)
Témoin (+)				1.7	1.6	1.8	1.7 ± 0.1	0
Témoin (-)	1.6	1.7	1.8	1.7 ± 0.1		0		
HE d'EUC (15%)	0.2	0	0	0.067 ± 0.115		96.48		
HE d'EUC (10%)	0	0.1	0.1	0.067 ± 0.058		96.48		

D'après les résultats du tableau et les figures, une légère croissance des champignons FOL

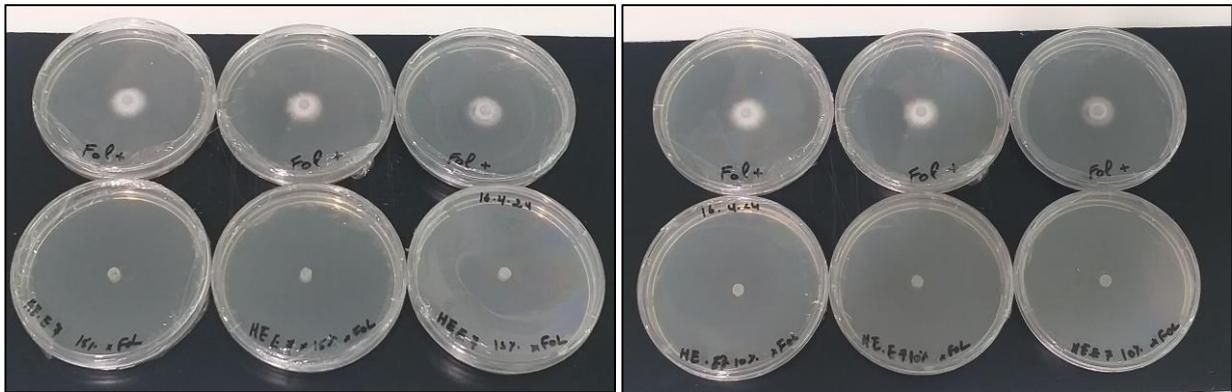


Figure V.29: Résultats avec les dilutions de 15% et 10% d’HE d’eucalyptus après 48h.

est observée au microscope après 48 heures d'exposition à une quantité d'HE d'eucalyptus diluée à 15% et 10%. Cette croissance explique la diminution du taux d'inhibition (I) à 96,48%. Ceci suggère que l'huile n'a pas d'effet sur les champignons lorsqu'elle est utilisée à des concentrations inférieures à sa concentration maximale de 20%. Par conséquent, on peut conclure que l'HE d'eucalyptus possède une propriété antifongique fongicide contre les champignons FOL, sauf à sa concentration maximale.



Figure V.30: Résultats avec les dilutions de 15 % et 10 % d'HE d'eucalyptus après 5 jours d'incubation.

Nos résultats sont en accord avec ceux des autres études qui ont trouvé une relation inverse entre la concentration de l'HE et la croissance mycélienne [223].

Finalement, l'eucalyptus et l'origan possèdent une bonne activité antifongique contre *F. oxysporum* à certaines doses. Ils pourront donc avoir un rôle inhibiteur sur différentes souches fongiques, non seulement les champignons, mais aussi les micro-organismes.

Ces résultats encourageants suggèrent que l'utilisation des HES d'eucalyptus et d'origan est préférable aux extraits méthanoliques comme remède efficace contre les champignons. Les pourcentages d'inhibition observés aux concentrations maximales des HES d'eucalyptus et d'origan indiquent qu'elles possèdent respectivement des propriétés antifongiques fongicides et fongistatiques, qui pourraient être bénéfiques dans le traitement des infections fongiques causées par le champignon "FOL".

V.9. Test de toxicité sur les vers de farine *Tenebrio Molitor*

Cette activité a pour but d'examiner la toxicité des extraits et des HEs des deux plantes sur les larves de *Tenebrio Molitor*. Cinq larves de taille identique ont été utilisées pour chaque échantillon. Un volume de 3 µl des échantillons a été injecté dans le ventre des larves à l'aide d'une seringue Hamilton. Les résultats (tableau V.14, figure V.31) ont été comparés aux standards du méthanol.

Tableau V.14: Pourcentages de mortalité des larves de *Tenebrio Molitor* après l'injection des échantillons des deux plantes et le standard.

Échantillons	Les jours de surveillance sur les larves <i>Tenebrio Molitor</i>							Mortalité (%)	Survivant (%)	Développements (%)
	1	2	3	4	5	6	7			
1 OR Dichlo	+1	0	+1	0	+1	0	0	60	40	/
2 EUC Dichlo	+3	0	0	0	0	0	0	60	40	/
3 OR MO	+1	0	+1	0	0	0	0	40	60	/
4 EUC MO	+1	0	0	0	0	0	0	20	80	20
5 OR Méth	+2	0	0	0	0	0	0	40	60	/
6 EUC Méth	+1	0	0	0	0	0	0	20	80	20
7 HE d'OR	+5	0	0	0	0	0	0	100	0	/
8 HE d'EUC	+3	0	0	0	0	0	0	60	40	/
9 Standard (Méthanol)	0	0	0	0	0	0	0	0	100	/

(+): mort : Une larve développée

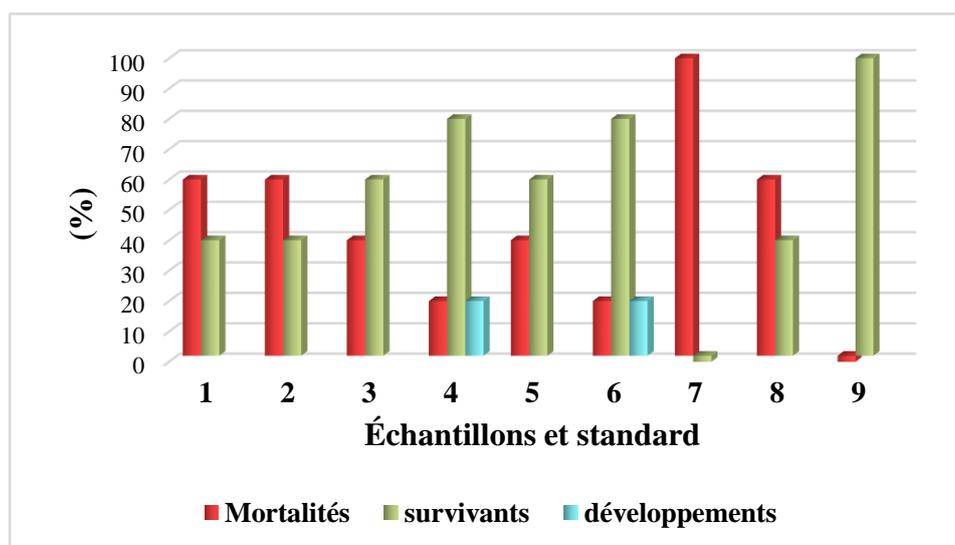


Figure V.31 : histogrammes montre les pourcentages de mortalités, survivants et développements des extraits et standards de test de toxicité sur les vers de farine.

Les résultats présentés dans le tableau et les figures, en comparaison avec le témoin solution 9 (le méthanol) qui présente un pourcentage de mortalité égal à zéro, démontrent que les larves injectées avec les extraits méthanoliques d'eucalyptus, obtenus par macération ou micro-onde, ont une mortalité d'une larve et un cas de développement jusqu'à la nymphe. Ceci indique que ces extraits méthanoliques d'eucalyptus sont un bon aliment ou contiennent des composants nutritifs.

En revanche, nous notons la mort de deux larves dès le premier jour d'injection de l'extrait méthanolique d'origan, quelle que soit la méthode d'extraction suivie, avec un pourcentage de développement nul. Ceci est dû à la présence de certains composés toxiques.

De plus, nous observons la mort de trois larves à plusieurs jours après l'injection de l'extrait dichlorométhanique de deux plantes, avec un pourcentage de développement nul, ce qui indique la présence de composés toxiques dans ces extraits.

En ce qui concerne les huiles essentielles, il est important de noter que l'huile d'Origan est extrêmement toxique, provoquant ainsi la mort de cinq larves dès la première injection. En revanche, l'HE d'eucalyptus est légèrement toxique et élimine 3/5 des larves sur une période de 7 jours. Il est suggéré que cela soit dû à la concentration élevée d'HEsou à la présence effective de composés toxiques.

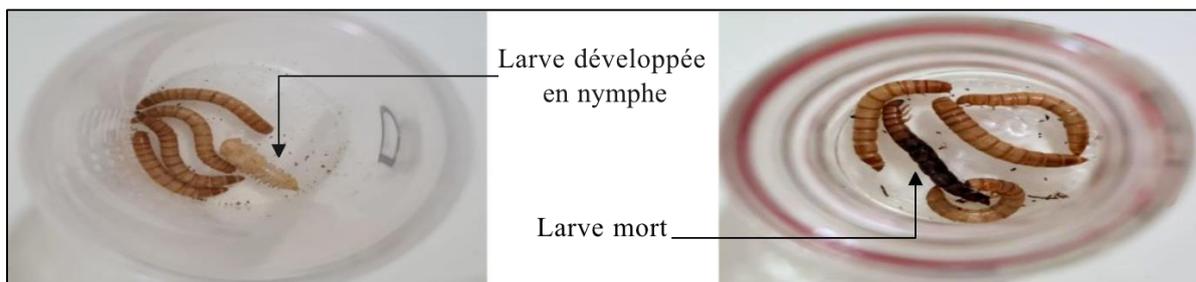


Figure V.32: Résultats des cas de larves injectées par différents échantillons.



Figure V.33: Résultats de larves injectées par le témoin standard méthanol.

V.10. Formulation et contrôle de la qualité de la pommade Vick

Tous nos résultats ont été évalués en se référant à un produit commercial comparable à notre Vick. Ce processus de comparaison nous a permis de tirer des conclusions significatives sur la performance, l'efficacité et les caractéristiques des produits étudiés, en mettant en évidence les similitudes et les différences entre eux.



Figure V.34: le vick commerciale.

V.10.1. Les caractéristiques macroscopiques (organoleptiques)



Figure V.36: Vick à base de deux huiles essentielles.



Figure V.36: Vick à base de deux extraits.

Tableau V.15: Les caractéristiques organoleptiques des produits finis.

		Vick à base de deux HEs	Vick à base de deux extraits
Caractéristiques Macroscopiques	Couleur	Blanc sale	Vert foncé
	Odeur	Saveur d'huile d'amande prédominante avec l'odeur des huiles essentielles	saveur piquant des deux extraits
	Texture (Consistance)	semi solide à une température ambiante et fond à une température élevée	semi solide à une température ambiante et fond à une température élevée
	Homogénéité	Une excellente homogénéité	Une très bonne homogénéité (une répartition périodique des extraits)
	Stabilité	Stable à une température $\leq 28^{\circ}\text{C}$ et fond à une température supérieure à 30°C . Le Vick reste stable lorsqu'il est conservé à la température ambiante en laboratoire. Ses composants restent intacts et préservent leurs propriétés d'origine, ce qui indique que les ingrédients actifs, les excipients et la base grasse ne subissent pas de changements significatifs susceptibles de compromettre son efficacité ou sa qualité.	

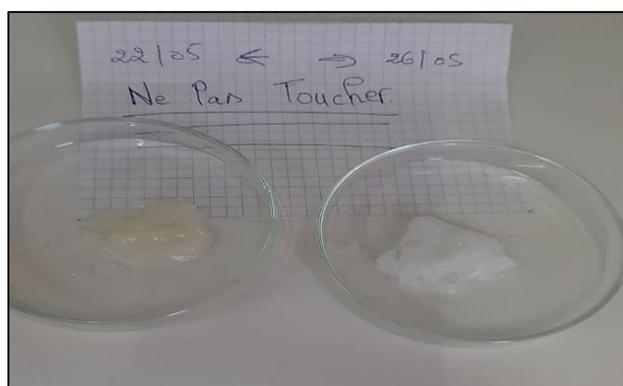


Figure V.37: Le produit fini après 20 jour à l'air libre.

Les deux lots de Vick sont semi-solides à température ambiante et fondent à des températures plus élevées, ce qui signifie qu'elles peuvent être facilement appliquées et utilisées dans des conditions normales. La principale différence entre les deux réside dans la couleur et l'odeur, ce qui peut influencer la préférence de l'utilisateur en fonction des sensations olfactives et visuelles.

En termes de stabilité et d'homogénéité, les deux formulations présentent de bonnes propriétés. La version à base de HEs a une légère supériorité en termes d'homogénéité, tandis

que la version à base de deux extraits fournit une meilleure description de sa stabilité à température ambiante, garantissant ainsi la préservation de ses propriétés sur le long terme.

Cela signifie que chaque type de Vick peut être choisi en fonction des préférences de couleur, d'odeur et des conditions d'utilisation spécifiques. Les deux versions semblent être de haute qualité et efficaces.

V.10.2. Propriétés physico-chimique

Tableau V.16: Propriétés physico-chimique des produits finis.

		Vick à base de deux HEs	Vick à base de deux extraits	Vick commercial (Référence)
Mesure de pH		7,7	6,95	6,98
Viscosité (Pa.s)	6 rpm	/	95.9	93.2
	12 rpm	/	49	49.23
	60 rpm	2.85	/	2.65
Conformité		Conforme	Conforme	/

Les mesures de pH et de viscosité montrent que les deux préparations de Vick à base d'HEset d'extraits sont proches des valeurs du Vick commercial. Ces valeurs indiquent une consistance spécifique du produit qui a un rôle important dans son application et son efficacité.

Les deux lots de Vick sont semi-solides à température ambiante et fondent à des températures plus élevées, ce qui les rend faciles à appliquer. La principale différence réside dans la couleur et l'odeur, ce qui influence les préférences des utilisateurs. En ce qui concerne la stabilité et l'homogénéité, le produit à base d'HEs(HEs) est légèrement plus homogène, tandis que la version contenant deux extraits est plus stable à température ambiante. Les deux formulations sont de haute qualité et efficaces et peuvent être choisies en fonction des préférences et des conditions d'utilisation spécifiques. Les mesures de pH et de viscosité des deux préparations sont similaires à celles du Vick commercial, garantissant une consistance et une efficacité comparables.

Conclusion générale

Le présent travail a pour objectif l'étude phytochimique de deux plantes médicinales l'*Eucalyptus globulus* de la famille Myrtaceae, et l'*Origanum vulgare* et la détection de leurs effets biologiques. Ces plantes sont choisies sur la base de leurs usages traditionnels.

Nous avons réalisé l'extraction des HEs de deux plantes médicinales pour leurs utilisations dans la synthèse des médicaments destinés au traitement des inflammations pulmonaires. Ces huiles essentielles sont précieuses en raison de leurs propriétés bénéfiques.

Pour ce faire, nous avons préalablement effectué un criblage phytochimique préliminaire de différents groupes de métabolites primaires et secondaires.

Le rendement et l'efficacité de l'extraction de ces huiles dépendent de plusieurs facteurs, notamment : l'origine et les caractéristiques des plantes ainsi que de la méthode d'extraction.

Notre étude s'est donc concentrée sur l'évaluation du processus d'hydrodistillation afin de déterminer son efficacité et ses avantages par rapport à d'autres méthodes d'extraction.

La méthode d'extraction innovante par micro-ondes se révèle être la plus efficace pour l'eucalyptus et l'origan, offrant des rendements significatifs en un temps très court. Comparée aux méthodes traditionnelles d'extraction solide-liquide, soit en rapidité et en efficacité, ce qui permet de maximiser l'extraction des molécules actives de ces deux plantes.

Les rendements obtenus par Hydrodistillation type Clevenger, soit 0,6 % pour l'eucalyptus et 0,142 % pour l'origan, révèlent des résultats significatifs dans le processus d'extraction. Bien que le rendement pour l'origan soit relativement faible, ces valeurs dévoilent une efficacité dans la méthode d'extraction utilisée.

Les propriétés organoleptiques caractéristiques (odeur, couleur et aspect), et physico-chimiques (pH, densité, indice de saponification et peroxyde) des deux huiles essentielles sont conformes aux normes prescrites.

Les analyses quantitatives révèlent une abondance de polyphénols et de flavonoïdes dans les deux plantes, mettant en évidence leur concentration significative dans les échantillons étudiés, en particulier dans les extraits végétaux par rapport aux huiles essentielles.

Les huiles essentielles et les extraits ont été évalués pour leur activité antioxydant par la méthode de piégeage du radical libre DPPH et la technique du pouvoir réducteur FRAP, l'ABTS et le phenanthroline.

Le DPPH montre l'effet le plus prononcé avec une valeur IC50 de $22,03 \pm 2,05$ µg/mL, tandis que l'extraction par macération pour la plante d'eucalyptus donne une valeur supérieure à 800 µg/mL. En revanche, pour l'origan, c'est l'extrait méthanolique obtenu par macération qui montre l'effet le plus significatif avec une valeur IC50 de $23,89 \pm 1,67$ µg/mL, comparée à une valeur de $27,18 \pm 0,82$ µg/mL obtenue avec micro-onde.

Les huiles essentielles et surtout les extraits présentent une activité antioxydante significative, mettant en évidence leur capacité à neutraliser les radicaux libres et à prévenir le stress oxydatif.

Le criblage de l'activité antibactérienne des huiles essentielles in vitro en employant la méthode de diffusion sur disque contre les souches bactériennes E. coli et S. aureus. En général, ces résultats indiquent un effet significatif des huiles essentielles d'eucalyptus et d'origan à différentes concentrations contre ces deux types de bactéries. De plus, l'extrait d'eucalyptus présente une sensibilité aux bactéries contrairement à l'origan.

Les huiles essentielles et les deux extraits méthanoliques ont une activité antifongique. Elles ont un très bon effet inhibiteur contre le champignon *FOL*, en tenant compte de l'effet fongistatique de l'HE d'origan et de l'effet fongicide des huiles essentielles d'eucalyptus à leurs concentrations maximales contre ce champignon.

Les huiles et les extraits montrent une toxicité différente sur les vers de farine, tenant compte que les extraits méthanoliques améliorent la performance de croissance.

D'un point de vue médical, l'eucalyptus et l'origan présentent de nombreuses vertus et plus riches en molécules bioactives d'où leur utilisation dans la formulation d'un vick.

La soumission du produit finis formulé (Vick) à différents tests de qualité tels que l'homogénéité, le pH, la viscosité et la stabilité, ont montré qu'il est conforme aux normes pharmaceutiques.

Résumé

Le but de ce travail vise à formuler une pommade Vicks à base des huiles essentielles de deux plantes médicinales : l'eucalyptus globulus et l'origanum vulgare qui peuvent être extraites par différentes méthodes conventionnelles ou innovantes. Notre objectif est d'obtenir une HE bio ; de ce fait, on s'est intéressé à l'extraction par hydrodistillation de type Clevenger, qui est couramment employée en pharmacologie. La deuxième formulation de ce produit est basée sur l'utilisation d'extraits végétaux obtenus par la technique de macération appliquée aux mêmes plantes. Avant cela, l'efficacité de ces différentes huiles essentielles et extraits sera évaluée en réalisant des analyses physico-chimiques et en examinant leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antibactériennes et antifongiques, ainsi qu'en effectuant des évaluations de toxicité sur les vers de farine.

La pommade Vicks est principalement utilisée pour ses effets thérapeutiques dans la réduction de la congestion nasale et des toux. Pour cela, un examen approfondi de ses caractéristiques physico-chimiques, telles que le pH, la viscosité et la stabilité, est essentiel, ainsi qu'une comparaison avec un produit Vicks de référence.

Mots Clés : Eucalyptus globulus - Origanum vulgare - Extraction – Hydrodistillation - HE - Antiinflammatoire - Vicks.

Abstract

The aim of this work is to formulate a Vicks ointment based on the essential oils of two medicinal plants: eucalyptus globulus and origanum vulgare, which can be extracted by different conventional or innovative methods. Our goal is to obtain an organic essential oil; therefore, we have been interested in extraction by hydrodistillation of the Clevenger type, which is commonly used in pharmacology. The second formulation of this product is based on the use of plant extracts obtained by the maceration technique applied to the same plants. Before that, the effectiveness of these different essential oils and extracts will be evaluated by carrying out physicochemical analyses and examining their antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial and antifungal properties, as well as by carrying out toxicity assessments on mealworms.

Vicks ointment is mainly used for its therapeutic effects in reducing nasal congestion and coughs. For this, a thorough examination of its physicochemical characteristics, such as pH, viscosity and stability, is essential, as well as a comparison with a reference Vicks product.

Keywords : Eucalyptus globulus - Origanum vulgare - Extraction-Hydrodistillation-Essential oil - Anti-inflammatory - Vicks.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو صياغة مرهم Vicks يعتمد على الزيوت الأساسية لنباتين طبيين: كاليثوس (Eucalyptus globulus) و بردقوش (Origanum Vulgare) والتي يمكن استخلاصها بطرق تقليدية ومبتكرة مختلفة.

هدفنا هو الحصول على زيت أساسي عضوي. لذلك، ركزنا على الاستخلاص بالتقطير المائي من نوع Clevenger ، والذي يستخدم عادة في علم الصيدلة. تعتمد الصيغة الثانية لهذا المنتج على استخدام المستخلصات النباتية التي تم الحصول عليها عن طريق تقنية النقع لنفس النباتات. قبل ذلك، سيتم تقييم فعالية هذه الزيوت والمستخلصات الأساسية المختلفة من خلال إجراء تحليلات فيزيائية كيميائية وفحص خصائصها المضادة للأكسدة والمضادة للالتهابات والمضادة للبكتيريا والفطريات، بالإضافة إلى إجراء تقييمات السمية على ديدان الطحين.

يستخدم مرهم Vicks بشكل رئيسي لتأثيراته العلاجية في تقليل احتقان الأنف والسعال. لذلك، فإن الفحص الدقيق لخصائصه الفيزيائية-الكيميائية، مثل الرقم الهيدروجيني، اللزوجة، والاستقرار، أمر ضروري، بالإضافة إلى مقارنة مع منتج Vicks مرجعي.

الكلمات المفتاحية : كاليثوس - بردقوش - استخلاص - التقطير المائي - زيت أساسي - مضاد للالتهابات - السمية.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographique

1. (pharmacien), X.G. 2024; Available from: <https://www.creapharma.ch/phytotherapie.htm#easy-footnote-1-4179>.
2. Salehi, B., et al., *Nepeta species: From farm to food applications and phytotherapy*. Trends in Food Science & Technology, 2018. **80**: p. 104-122.
3. Bousta, D. and A. Ennabili, *L'Institut national des plantes médicinales et aromatiques au service du développement de la phytothérapie au Maroc*. Phytothérapie, 2011. **9**(5): p. 297-303.
4. Moatti, R., ed. *LA PHYTOTHERAPIE* Librairie Maloine S.A ed. 1990: Paris
5. Moatti, R.J.R.d.D.M., *La phytothérapie*. 1990: p. 80-89.
6. Zeggwagh, A.A., Y. Lahlou, and Y. Bousliman, [*Survey of toxicological aspects of herbal medicine used by a herbalist in Fes, Morocco*]. Pan Afr Med J, 2013. **14**: p. 125.
7. Zengin, G., et al., *A comprehensive study on phytochemical characterization of Haplophyllum myrtifolium Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes*. Industrial Crops and Products, 2014. **53**: p. 244-251.
8. Jorite, S., *La Phytothérapie, une discipline entre passé et futur: de l'herboristerie aux pharmacies dédiées au naturel*. 2015.
9. RABAHI, H., S. ABDI, and K. REDJIMI, *L'étude de l'effet des huiles essentielles aromatique (Eucalyptus globulus) sur les insectes au niveau du stock les charançons des céréales (Sitophilus granarius, Sitophilus oryzae)*. 2017, université ibn khaldoun-tiaret.
10. Lardry, J.-M. and V.J.K. Haberkorn, la revue, *L'aromathérapie et les huiles essentielles*. 2007. **7**(61): p. 14-17.
11. Goetz, P.J.P., *Quelques éléments pratiques de gemmothérapie*. 2006. **4**(2): p. 83-86.
12. Sarembaud, A. and B.J.L.R.d.H. Poitevin, *Hommage à Pierre CORNILLOT (1931-2018) et présentation de son texte Introduction au Livre «Homéopathie»*. 2018. **9**(2): p. 51-57.
13. Sizun, A. and P.J.P. Goetz, *Balnéothérapie et phytobalnéothérapie*. 2022. **20**(6): p. 282.
14. Grünwald, J. and C. Jänicke, *Guide de la phytothérapie*. 2006: Marabout.
15. *Etude biologique de quelques concentrations de l'HE d'Origan (Origanum vulgare l). Sur le varroa jacobsoni*, in *Biotechnologie*. 2019, Université Blida 1: Blida.
16. SIMON, *La phytothérapie : les bienfaits des plantes*. Centre Européen de Formation 2022.
17. BARDINTZEFF, J.-M., FUTURA Les plantes médicinales
18. Artiges, A.J.B.d.l.A.n.d.m., *La pharmacopée européenne et la direction européenne de la qualité du médicament au Conseil de l'Europe*. 2006. **190**(9): p. 1903-1911.
19. Giraud-Techer, S., et al., *Plantes médicinales de La Réunion inscrites à la Pharmacopée française*. 2016(56): p. 7-33.
20. [1 MIN pour ma santé] *Quels sont les actifs d'une plante ?* 2020, Penser Santé.
21. pharmapro, C.p. 2024; Available from: https://www.creapharma.ch/#google_vignette.
22. Magrini, M.-B. *Construction de la valeur des légumineuses: point de vue d'un économiste*. in *Les Rencontres de la Fondation Louis Bonduelle*. 2016.
23. Nutri&Co, l.é., *Les flavonoïdes, qui sont ces antioxydants ?* 2024.
24. Gadenne, A., Marc-André Selosse « *Les tannins constituent l'architecture cachée du monde* ». 2020.

25. Annie Price, C., *Les plantes médicinales, les saponines*. 2024.
26. Puressentiel, L. *Les huiles essentielles*. 2024; Available from: <https://fr.puressentiel.com/>.
27. NutriandCo. *Les vitamines*. Available from: <https://nutriandco.com/fr/>.
28. Benzerara, K., *Des structures cristallines dans les organismes biologiques*. 2020.
29. FAGGIANELLI, D.N., *L'Eucalyptus - Bienfaits, Utilisation, Préparation, Indications*. 2024.
30. Planchon, J.-E.J.R.d.D.M., *L'EUCALYPTUS GLOBULUS AU POINT DE VUE BOTANIQUE, ÉCONOMIQUE ET MÉDICAL*. 1875. **7**(1): p. 149-174.
31. Cardenas, J., *Eucalyptus*. Doctissimo, 2017.
32. *ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES HUILES ESSENTIELLES DE « EUCALYPTUS GLOBULUS » .ETUDE PHYTOCHIMIQUE*, in *Biotechnonologie*. 2018, Université Blida 1: Blida. p. 100.
33. Goldstein, B.H.J.J.C.D.A., *La dentisterie non conventionnelle: Partie II. Les praticiens et les patients*. 2000. **66**(7): p. 381-3.
34. Atta, A. and A.J.J.o.e. Alkofahi, *Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of some Jordanian medicinal plant extracts*. 1998. **60**(2): p. 117-124.
35. Başer, K.H.C., et al., *In Vitro Antiviral Evaluations of Coldmix®: An Essential Oil Blend against SARS-CoV-2*. 2023. **45**(1): p. 677-684.
36. de Bourbon, V., *De WikiPhyto (Redirigé depuis Aldéhyde vanillique)*.
37. Eryılmaz, S., et al., *Isoxazole derivatives of alpha-pinene isomers: Synthesis, crystal structure, spectroscopic characterization (FT-IR/NMR/GC-MS) and DFT studies*. 2016. **1108**: p. 209-222.
38. Foudil-Cherif, Y., N. Yassaa, and B.Y.J.G.W.E.S. Meklati, *Biogenic emission and essential oils of some Eucalyptus species: a comparison study*. 2010: p. 357-365.
39. Hyatt, D.C., et al., *Structure of limonene synthase, a simple model for terpenoid cyclase catalysis*. 2007. **104**(13): p. 5360-5365.
40. Asma, B., *Potentiellles Applications de la Fraction Aromatique d'Eucalyptus globulus (Labill.) comme Conservateur Nutraceutique*, in *Biologie et Physiologie cellulaire*. 2015, Blida 1. p. 65.
41. Birch, A. and F.J.A.J.o.C. Lahey, *The structure of Aromadendrene*. 1953. **6**(4): p. 379-384.
42. Rencoret, J., et al., *Lignin composition and structure in young versus adult Eucalyptus globulus plants*. 2011. **155**(2): p. 667-682.
43. Nathan, M.K., *République démocratique du Congo Université de Lubumbashi*.
44. Djendli sabiha , b.l., *Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de la plante médicinale «Eucalyptus globulus »*. in *de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire*. 2022, Frères Mentouri Constantine 1. p. 65.
45. Graham, B., et al., *The stereochemistry of aromadendrene, globulol, and ledol*. 1960. **13**(3): p. 372-379.
46. Mullie, P., et al., *Estimation of daily human intake of food flavonoids*. 2007. **62**: p. 93-98.
47. Rossi, M., L.F. Rickles, and W.A.J.B.C. Halpin, *The crystal and molecular structure of quercetin: A biologically active and naturally occurring flavonoid*. 1986. **14**(1): p. 55-69.

48. Behr, A., et al., *Myrcene as a natural base chemical in sustainable chemistry: a critical review*. 2009. **2**(12): p. 1072-1095.
49. Calvero. *Myrcene*. 2007; Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Myrcene_beta_straight_acsv.svg?uselang=fr#Conditions%20d%E2%80%99utilisation.
50. Devi, K.P., et al., *Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine*. 2015. **99**: p. 1-10.
51. Mercader-Ros, M., et al., *Biological activities of kaempferol: Effect of cyclodextrins complexation on the properties of kaempferol*. 2013: p. 1-31.
52. GUENDOZ Wadiaa, B.R.B., *Contribution à l'étude des propriétés antipelluculaires des huiles essentielles d'Eucalyptus globulus et quelques extraits de Trigonella foenum-graeceum*, in *Biologie*. 2020, Dr. Moulay Tahar de Saida. p. 43.
53. Boukhalfoun, L., *Extraction des composés actifs chez Eucalyptus globulus*. 2012.
54. Pancrat. *Acide-gallique*. 2008; Available from: <https://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Acide-gallique.svg>.
55. Sánchez-Loredo, E., et al., *Ellagitannins from Eucalyptus camaldulensis and their potential use in the food industry*. 2024. **2**(1): p. 83-100.
56. Bruère, R.T., *Pline l'ancien: Histoire naturelle*. 1953, JSTOR.
57. Guérin, F.-E., *Dictionnaire pittoresque d'histoire naturelle et des phénomènes de la nature*. Vol. 6. 1838: Imprimerie de Cosson.
58. *Huile-essentielle*. 2013. p. 10.
59. *Origanum*. Available from: <https://www.gardenia.net/guides/genera/origanum-oregano>.
60. Dongock, D.N., et al., *Etude ethnobotanique et phytochimique des plantes médicinales utilisées dans le traitement des maladies cardiovasculaires à Moundou (Tchad)*. International Journal of Biological Chemical Sciences, 2018. **12**(1): p. 203-216.
61. Doctonat, *Origan (plante médicinale): bienfaits et utilisation*. 2020.
62. Nora, M., « *Étude de l'espèce Origanum vulgare L.* », in *Biologie*. 2017, CHADLI BENJEDID – EL TARF. p. 202.
63. Pharmacognosie, B.J., *phytochimie, plantes médicinales (4e éd.)*, Tec et Doc. 2009, Paris.
64. Edgar181. *chemical structure of carvacrol*. 2007; Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Carvacrol_structure.png.
65. Tampieri, M.P., et al., *The inhibition of Candida albicans by selected essential oils and their major components*. 2005. **159**: p. 339-345.
66. Kowalczyk, A., et al., *Thymol and thyme essential oil—new insights into selected therapeutic applications*. 2020. **25**(18): p. 4125.
67. Mahfouf, N., *Étude de l'espèce Origanum vulgare L.* 2018, Université Chadli Benjedid-El Tarf (Algérie).
68. Co., T.C.I., *Ligands*. 2024: p. 20.
69. Hilpiper, C. and Pharmacien, *HE d'origan. passeport sante*, 2014.
70. Bond, A.D. and J.E.J.A.C.S.E.S.R.O. Davies, *γ -Terpinene*. 2001. **57**(11): p. o1032-o1033.
71. Sales, A., et al., *Production, properties, and applications of α -terpineol*. 2020. **13**(8): p. 1261-1279.

72. FIGUEREDO, G., *Étude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne*, in *Sciences et technologie*. 2007, BLAISE PASCAL. p. 417.
73. Charie, T.d.l., *Se soigner par les huiles essentielles*. 2019.
74. *Origan vulgaire*. 2021; Available from: https://www.wikiphyto.org/wiki/Origan_vulgaire#Composants_principaux_de_la_plante
75. *Étude des composés phénoliques et de l'activité antioxydante de deux labiées: Origanum vulgare et Thymus vulgaris.*, in *Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire*. 2023, Frères Mentouri Constantine 1. p. 67.
76. Cardenas, J. *Origan : utilisation, posologie et bienfaits santé*. 2022; Available from: <https://www.doctissimo.fr/html/sante/phytotherapie/plante-medicinale/origan.htm>.
77. Marouane, L.C.e.M., *EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES ET HYDROLATS*. 2023.
78. Fournet, A., et al., *Les chimanines, nouvelles quinoléines substituées en 2, isolées d'une plante bolivienne antiparasitaire: Galipea Longiflora*. *Journal of natural products*, 1993. **56**(9): p. 1547-1552.
79. Sharma, S., N. Sangwan, and R.S. Sangwan, *Developmental process of essential oil glandular trichome collapsing in menthol mint*. *Current science*, 2003: p. 544-550.
80. Bousbia, N., *Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires*. 2011, Université d'Avignon.
81. CICLE, J.-C., *Distillation. Absorption. Etude pratique*. *Techniques de l'ingénieur. Génie des procédés*, 2001. **2**(J2610): p. J2610. 1-J2610. 20.
82. FERNANDEZ, X. and D. CABROL-BASS, *Analyse des arômes*. 2007.
83. Mahawer, S.K., et al., *Extractions Methods and Biological Applications of Essential Oils, in Essential Oils-Advances in Extractions and Biological Applications*. 2022, IntechOpen.
84. Rassem, H.H., A.H. Nour, and R.M. Yunus, *Techniques for extraction of essential oils from plants: a review*. *Australian Journal of Basic Applied Sciences* 2016. **10**(16): p. 117-127.
85. Rao, V.P. and D. Pandey, *Extraction of essential oil and its applications*. 2007.
86. Panda, S., et al., *Essential oils and their pharmacotherapeutics applications in human diseases*. *Adv Trad Med* 22: 1–15. 2022.
87. Mbouga, N. and M. Goletti, *Formulation d'insecticides en poudre par adsorption des huiles essentielles de Xylopiya aethiopica et de Ocimum gratissimum sur des argiles camerounaises modifiées*. 2012, Montpellier, Ecole nationale supérieure de chimie.
88. Wainer, J., et al., *Extraction of Essential Oils from Lavandula × intermedia 'Margaret Roberts' Using Steam Distillation, Hydrodistillation, and Cellulase-Assisted Hydrodistillation: Experimentation and Cost Analysis*. *Plants*, 2022. **11**: p. 3479.
89. Boukhatem, M.N., A. Ferhat, and A. Kameli, *Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles: revue de littérature*. 2019. **3**(4): p. 1653-1659.
90. *EXTRACTION METHODS OF NATURAL ESSENTIAL OILS*. 2012.
91. *ESSENTIAL OILS: ITS MEDICINAL AND PHARMACOLOGICAL USES*.

92. Murti, Y., et al., *Innovative methods for extraction of essential oils from medicinal plants*. International Journal of Secondary Metabolite, 2023. **10**(2): p. 190-230.
93. Rozzi, N., et al., *Supercritical fluid extraction of essential oil components from lemon-scented botanicals*. LWT-Food Science Technology 2002. **35**(4): p. 319-324.
94. Herrero, M., A. Cifuentes, and E. Ibañez, *Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review*. Food Chemistry, 2006. **98**(1): p. 136-148.
95. Pourmortazavi, S.M. and S.S. Hajimirsadeghi, *Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis*. Journal of chromatography A, 2007. **1163**(1-2): p. 2-24.
96. El Asbahani, A., et al., *Essential oils: From extraction to encapsulation*. International journal of pharmaceutics, 2015. **483**(1-2): p. 220-243.
97. Almeida-Couto, J.M.D., et al., *Current extraction methods and potential use of essential oils for quality and safety assurance of foods*. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 2022. **94**: p. e20191270.
98. Sparr Eskilsson, C. and E. Björklund, *Analytical-scale microwave-assisted extraction*. Journal of Chromatography A, 2000. **902**(1): p. 227-250.
99. Routray, W. and V. Orsat, *Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review*. Food Bioprocess Technology 2012. **5**: p. 409-424.
100. Thostenson, E. and T.-W. Chou, *Microwave processing: fundamentals and applications*. Composites Part A: Applied Science Manufacturing 1999. **30**(9): p. 1055-1071.
101. Brachet, A., P. Christen, and J.L. Veuthey, *Focused microwave-assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves*. Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical Biochemical Techniques 2002. **13**(3): p. 162-169.
102. Moradi, S., A. Fazlali, and H. Hamed, *Microwave-assisted hydro-distillation of essential oil from rosemary: Comparison with traditional distillation*. Avicenna journal of medical biotechnology, 2018. **10**(1): p. 22.
103. Ferhat, M.A., et al., *An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel*. journal of Chromatography A, 2006. **1112**(1-2): p. 121-126.
104. Bhaskaracharya, R.K., S. Kentish, and M. Ashokkumar, *Selected applications of ultrasonics in food processing*. Food Engineering Reviews, 2009. **1**: p. 31-49.
105. Vinatoru, M., *An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs*. Ultrasonics Sonochemistry, 2001. **8**(3): p. 303-313.
106. Sereshti, H., et al., *Bifunctional ultrasound assisted extraction and determination of *Elettaria cardamomum* Maton essential oil*. Journal of Chromatography A, 2012. **1238**: p. 46-53.
107. Assami, K., et al., *Ultrasound induced intensification and selective extraction of essential oil from *Carum carvi* L. seeds*. Chemical Engineering Processing: Process Intensification 2012. **62**: p. 99-105.

108. Lucchesi, M.E., F. Chemat, and J. Smadja, *Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation*. Journal of Chromatography A, 2004. **1043**(2): p. 323-327.
109. Filly, A., et al., *Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: From laboratory to pilot and industrial scale*. Food Chemistry, 2014. **150**: p. 193-198.
110. Lucchesi, M.E., et al., *Solvent free microwave extraction of Elletaria cardamomum L.: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil*. Journal of Food Engineering, 2007. **79**(3): p. 1079-1086.
111. Li, Y., et al., *Solvent-free microwave extraction of bioactive compounds provides a tool for green analytical chemistry*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2013. **47**: p. 1-11.
112. Lopez-Avila, V., R. Young, and W.F. Beckert, *Microwave-Assisted Extraction of Organic Compounds from Standard Reference Soils and Sediments*. Analytical Chemistry, 1994. **66**(7): p. 1097-1106.
113. J, B., *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*. 2ème édition ed. 1993.
114. Mayer, F., *Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles: Etude de cas en maison de retraite*. 2012, Université de Lorraine.
115. Kanoun, K., et al., *Étude de l'activité des extraits de feuilles de Punica granatum Linn sur Candida albicans et Rhodotorula spp*. Phytothérapie, 2016. **14**(1): p. 5-16.
116. Safa, M. and B. Meriem, *Etude de l'activité antibactérienne de l'HE d'une plante médicinale*. 2021, university center of abdalhafid boussouf-MILA.
117. Rammohan, A., et al., *Antioxidants: Structure–activity of plant polyphenolics, in Vitamins and Hormones*. 2023, Elsevier. p. 395-411.
118. GOUDJIL, M.B., *Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de trois plantes aromatiques*. 2016.
119. Ogunro, O.B., A.E. Fakayode, and G.E.-S. Batiha, *Involvement of antioxidant in the prevention of cellular damage, in Importance of Oxidative Stress and Antioxidant System in Health and Disease*. 2022, IntechOpen.
120. Kohen, R. and A. Nyska, *Invited review: oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification*. Toxicologic pathology, 2002. **30**(6): p. 620-650.
121. Madhavi, D.L., S. Deshpande, and D.K. Salunkhe, *Food antioxidants: Technological: Toxicological and health perspectives*. 1995: CRC Press.
122. Celik, H. and K. İlhan, *Antioxidant effective aromatic compounds. Life in extreme environments-diversity, adaptability valuable resources of bioactive molecules* 2023.
123. Tit, D.M. and S.G. Bungau, *Antioxidant activity of essential oils*. 2023, MDPI. p. 383.
124. Al-Refaie, D., G.F. Mehayar, and M. Shahein, *Functional Role of Essential Oils as Antimicrobial and Antioxidat Agents in Food Industry: A Review*. Jordan Journal of Agricultural Sciences 2023. **19**(1): p. 70-88.
125. Athamena, S., et al., *Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de Cuminum cyminum L*. Lebanese science journal, 2010. **11**(1): p. 69-81.
126. FEKIH, N., *Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre Pinus poussant en Algérie*. 2015.

127. Camille, D., *Pratique en microbiologie de laboratoire? Recherche de bactéries et de levures-moisissures*. 2014: Lavoisier.
128. Toure, D., *Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques medicinales de côte d'ivoire*. 2015, Université Felix Houphoeut Boigny, Côte d'Ivoire.
129. Al-Harrasi, A., et al., *Antibacterial mechanism of action of essential oils*, in *Role of Essential Oils in the Management of COVID-19*. 2022, CRC Press. p. 227-237.
130. Parija, S.C., *Introduction to Mycology*, in *Textbook of Microbiology and Immunology*. 2023, Springer. p. 947-955.
131. Haq, I.U., N.A. Khan, and M.K. Sarwar, *An Insight Into Fungal Biology*, in *Phytopathology and Molecular Biology of Plant Pathogen Interactions*. 2022, CRC Press. p. 27-50.
132. Gilbert, G.S., et al., *How to be a fungus*, in *The Evolutionary Ecology of Plant Disease*. 2023, Oxford University Press. p. 0.
133. Okorska, S.B., et al., *The fungicidal effect of essential oils of fennel and hops against Fusarium disease of pea*. Applied Sciences, 2023. **13**(10): p. 6282.
134. Harahap, R. *Fungicidal activity nanoemulsions of citronella oils (Cymbopogon nardus L.) against rice seed-borne pathogenic fungi*. in *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2023. IOP Publishing.
135. Konuk, H.B. and B. Ergüden, *Phenolic–OH group is crucial for the antifungal activity of terpenoids via disruption of cell membrane integrity*. Folia Microbiologica, 2020. **65**(4): p. 775-783.
136. Afeltra, J. and P. Verweij, *Antifungal activity of nonantifungal drugs*. European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases 2003. **22**: p. 397-407.
137. Sorlozano-Puerto, A., et al., *Antibacterial and antifungal activity of propyl-propane-thiosulfinate and propyl-propane-thiosulfonate, two organosulfur compounds from Allium cepa: In vitro antimicrobial effect via the gas phase*. Pharmaceuticals 2020. **14**(1): p. 21.
138. Knobloch, K., et al., *Antibacterial and antifungal properties of essential oil components*. Journal of essential oil research, 1989. **1**(3): p. 119-128.
139. Yang, C., et al., *Natural Sesquiterpene Lactone as Source of Discovery of Novel Fungicidal Candidates: Structural Modification and Antifungal Activity Evaluation of Xanthatin Derived from Xanthium strumarium L.* Journal of Agricultural Food Chemistry 2023. **71**(29): p. 11239-11251.
140. Serebrennikova, S.N., et al., *Inflammation as a fundamental pathological process: lecture 1 (alteration, vascular reactions)*. Baikal Medical Journal, 2023. **2**(2).
141. Oronsky, B., S. Caroen, and T.s. Reid, *What exactly is inflammation (and what is it not?)*. International journal of molecular 2022. **23**(23): p. 14905.
142. Ravichandran, S., et al., *Medicinal plants for curing human diseases*. Insight-Chinese Medicine, 2023. **6**(1): p. 570.
143. Bouzid, D., *Évaluation de l'activité biologique de l'HE d'une plante endémique Hélichrysum italicum (Roth) G. DON*. 2018, Université Ferhat Abbas.

144. ABDELLI, W., *Caractérisation chimique et étude de quelques activités biologiques des huiles essentielles de Juniperus phoenicea et de Thymus vulgaris*. 2017, Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badis.
145. Roux, D. and O. Catier, *Botanique, pharmacognosie, phytothérapie*. 2007: Wolters Kluwer France.
146. Bonnafous, C., *Traité scientifique aromathérapie: aromatologie & aromachologie*. 2013: Éditions Dangles.
147. BOUKHALFA, D., *Contribution a l'étude des plantes aromatiques et médicinales de la région de l'Ahaggar*. 2017, UNIVERSITE D'ALGER 1.
148. Véronique, C., *Toxicité des huiles essentielles*. 2001, Ecole nationale vétérinaire Toulouse.
149. Mehani, M., *Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'Eucalyptus camendulensis dans la région de Ouargla*. 2015.
150. Sailer, R., et al., *Pharmaceutical and medicinal aspects of Australian tea tree oil*. *Phytomedicine*, 1998. **5**(6): p. 489-495.
151. Richardson, J.A., *Potpourri hazards in cats*. 1999.
152. Lis-Balchin, M., *Possible health and safety problems in the use of novel plant essential oils and extracts in aromatherapy*. *The journal of the Royal Society for the Promotion of Health* 1999. **119**(4): p. 240-243.
153. Zaibet, W., *Composition chimique et activité biologique des huiles essentielles de Daucus aureus (Desf) et de Reutera lutea (Desf.) Maire, et leur application comme agents antimicrobiens dans le polyéthylène basse densité (PEBD)*. 2016, Université Ferhat Abbas.
154. Hooser, S.B.J.V.C.o.N.A.S.A.P., *D-limonene, linalool, and crude citrus oil extracts*. 1990. **20**(2): p. 383-385.
155. Villar, D., et al., *Toxicity of melaleuca oil and related essential oils applied topically on dogs and cats*. *Veterinary human toxicology* 1994. **36**(2): p. 139-142.
156. Mafra, C.A.B., et al., *Use of Herbal Medicinal Products in Skin Treatments*. *European Journal of Medicinal Plants* 2022. **33**(5): p. 40-49.
157. Kaushal, D.K. and N. Upadhyaya, *REVIEW ON OINTMENT*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Medicine* 2022.
158. Sunil, G., Richa, Singh., Deepak, kumar, Chaurasia., Dr., Tarkeshwar, P., Shukla, *Review: Formulation Development Studies*. *International Journal For Science Technology And Engineering*, 2023.
159. Degim, I.T., *Understanding skin penetration: computer aided modeling and data interpretation*. *Current Computer-Aided Drug Design*, 2005. **1**(1): p. 11-19.
160. Tran, H.-V., et al. *Propriétés mécaniques multi-couches de la peau humaine in vivo* *Modèle numérique anatomique*. in *7e colloque national en calcul des structures*. 2005.
161. Cuminet, J., *CARCINOMES ANNEXIELS CUTANES: A PROPOS DE 17 CAS (DES CHIRURGIE GENERALE)*. 1999.
162. Weisse, S., *Complexes cyclodextrines/esther de vitamine A: stabilisation, solubilisation et promotion de l'absorption cutanée*. 2002, Paris 11.

163. Descargues, P., et al., *Syndrome de Netherton: un modèle d'étude de la régulation de la desquamation*. 2005, Érudit.
164. Thiers, S. and O. Tasseau, *Les cosméceutiques: cosmétiques ou médicaments*. MiDiFABs, 2005. **3**: p. 47-56.
165. Seiller, M. and M.-C. Martini, *Formes pharmaceutiques pour application locale*. 1996: Technique & Documentation-Lavoisier.
166. Bourin, M., M. Lièvre, and H. Allain, *Cours de pharmacologie*. 1993: Ellipses.
167. Dridi, F., *Extraction et analyse de l'HE de cumin formulation d'une pommade decongestionnante*. 2005.
168. Prestreliki, S. and K. Brodbeck, *Intracutaneous paste composition*. 2014, Google Patents.
169. Henifa, A.D.K., *Evaluation de l'activité antifongique d'une pommade à base des huiles essentielles d'Origanum vulgare*, in *Biologie Physico-chimique*. 2022, Université de Bejaïa.
170. Gravlo, L., *Reformulation d'un produit historique : la Pommade MERCIER®*. Sciences pharmaceutiques, 2017.
171. KALAFAT Soumia , M.K., *Extraction d'HE application à la formulation d'une pommade anti-inflammatoire*, in *Département de Génie de Procèdes*. 2016-2017 UNIVERSITE DE BLIDA 1
172. Walters, K.A., *Dermatological and transdermal formulations*. Vol. 119. 2002: CRC Press.
173. Wat, D., *The common cold: a review of the literature*. European Journal of Internal Medicine, 2004. **15**(2): p. 79-88.
174. Eccles, R., *Understanding the symptoms of the common cold and influenza*. The Lancet infectious diseases, 2005. **5**(11): p. 718-725.
175. Naclerio, R.M., C. Bachert, and J.N. Baraniuk, *Pathophysiology of nasal congestion*. International journal of general medicine 2010: p. 47-57.
176. Eccles, R., et al., *Efficacy of a topical aromatic rub (Vicks VapoRub®)-Speed of action of subjective nasal cooling and relief from nasal congestion*. Open Journal of Respiratory Diseases, 2015. **5**(1): p. 10-18.
177. Bautista, D.M., et al., *The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold*. Nature, 2007. **448**(7150): p. 204-208.
178. BENHADDAD Nafissa Batoul, D.R., *Effet de l'extraction assistée par ultrasons sur les teneurs en composés phénoliques et la bio-activité des extraits de la plante Haloxylon articulatum*. 2022, Université Les Frères Mentouri Constantine 1.
179. Haouam, A. and C. Kirouani, *Etude de rendement et caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles de Salvia officinalis*. 2020, Université Larbi tebessi tebessa.
180. Yaacoub, R.T., I., *Caractérisation Physico-chimiques Et Analyses Biologiques De L'HE Des Grains De Cuminum Cyminum L. Et De Foeniculum Vulgare Mill. extraite Par Hydrodistillation Et Co2. Supercritique : Etude Comparative*. 2018, Université Larbi Ben M'hidi - Om-el-bouaghi.
181. *Relation entre la valeur Brix (%) et l'indice de réfraction (nD)*. Available from: https://www.atago.net/fr/databook/databook-refractometer_relationship.php.

182. Ollivier, V., D. Ollivier, and J. Artaud, *Analyse des lipides*. Techniques de l'ingénieur, 2015.
183. souhila, H.D.K., *Extraction, caractérisation et identification des composés chimiques d'une huile naturelle*. 2019, UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS - MOSTAGANEM.
184. AFFANE, R., H. REBHI, and T. BERREZOUG, *Caractérisation physico-chimiques des huiles essentielles d'Apium graveolens L. et Mentha pulegium L. de la région de Tiaret, extraites par Hydro-distillation*. 2020, université ibn khaldoun-tiaret.
185. Blois, M.S., *Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical*. Nature, 1958. **181**(4617): p. 1199-1200.
186. Re, R., et al., *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free Radical Biology and Medicine, 1999. **26**(9): p. 1231-1237.
187. Oyaizu, M., *Studies on Products of Browning Reaction Antioxidative Activities of Products of Browning Reaction Prepared from Glucosamine*. The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics, 1986. **44**(6): p. 307-315.
188. Belcher, R., *THE APPLICATION OF CHELATE COMPOUNDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY*, in *Analytical Chemistry-4*, M. Senda, Editor. 1973, Butterworth-Heinemann. p. 13-27.
189. Szydłowska-Czerniak, A., et al., *Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods*. 2008. **76**(4): p. 899-905.
190. Rahman, H., M.C. Eswaraiyah, and A. Dutta, *In-vitro anti-inflammatory and anti-arthritic activity of Oryza Sativa Var. joha rice (an aromatic indigenous rice of Assam)*. Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci, 2015. **15**(1): p. 115-121.
191. Kandikattu, K., et al., *Evaluation of anti-inflammatory activity of Canthium parviflorum by in-vitro method*. Indian Journal of Research in Pharmacy Biotechnology, 2013. **1**(5): p. 729-731.
192. Gardette, M., *Virulence des Escherichia coli entérohémorragiques: rôle central du monoxyde d'azote dans le devenir de l'infection et identification de nouveaux déterminants impliqués dans l'adaptation du pathogène à l'environnement digestif*. 2019, Université Clermont Auvergne [2017-2020].
193. Randrianirina, F., et al., *In vitro activities of 18 antimicrobial agents against Staphylococcus aureus isolates from the Institut Pasteur of Madagascar*. 2007. **6**: p. 1-5.
194. WHO, *WHO model list of essential medicines-22nd list*. 2021, World Health Organization Geneva.
195. Vallat-Azouvi, C. and A.-L.J.L.F.S. Lebrun, *Les séquelles invisibles des traumatismes crâniens*. 2022.
196. Macías Sánchez, K.L., et al., *In Vitro Evaluation of the Antifungal Effect of AgNPs on Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. 2023. **13**(7): p. 1274.
197. Rumpold, B.A. and O.K. Schlüter, *Nutritional composition and safety aspects of edible insects*. Molecular nutrition food research 2013. **57**(5): p. 802-823.

198. Seo, M., et al., *Tenebrio molitor larvae inhibit adipogenesis through AMPK and MAPKs signaling in 3T3-L1 adipocytes and obesity in high-fat diet-induced obese mice*. International Journal of Molecular Sciences 2017. **18**(3): p. 518.
199. van der Valk, T. and A. van der Meijden, *Toxicity of scorpion venom in chick embryo and mealworm assay depending on the use of the soluble fraction versus the whole venom*. Toxicon, 2014. **88**: p. 38-43.
200. Boutemak, K., *Contribution à l'étude des procedes d'extraction conventionnels et innovants appliques a la recuperation de l'HE de l'armoise blanche d'Algerie (Artemisia Herba Abta)*. 2011, blida.
201. Solvant. Wikipédia, 2024.
202. Dichlorométhane solvant. FUTURA, 2024.
203. Nathan, M.K., *Optimisation du rendement d'extraction des huiles essentielles d'eucalyptus Globulus, et caractérisation physico-chimique*. 2020, Université de Lubumbashi
204. Reghaissia, I., *Extraction et caractérisation de l'HE de l'Eucalyptus Globulus: Application comme insecticide*. Mémoire de Master en Génie Chimique. Université, 1945. **8**.
205. Ferdes Ilhem, S.N., *Etude de l'activité antifongique des huiles essentielles de Lavandula stoechas L. et d'Origanum floribundum Munby. sur des agents d'otomycoses: Cas d'Aspergillus niger*. 2019.
206. Nora, M., *Étude de l'espèce Origanum vulgare L*. THESE, 2018.
207. Razika, H.K.R., *Etude des caractéristiques physico-chimiques et sensorielles de Smen élaboré à partir de lait de chamelle*. 2021, Université Kasdi Merbah - Ouargla.
208. Turkmen, N., et al., *Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea*. Molecules, 2007. **12**(3): p. 484-496.
209. Kim, M.-H., et al., *Antioxidant activity of Salvia miltiorrhiza Bunge, a novel foodstuff*. 2010. **6**: p. 65-72.
210. Kiselova, Y., et al., *Correlation between the in vitro antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Bulgarian herbs*. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 2006. **20**(11): p. 961-965.
211. Belhadj, S., et al., *Activités antioxydantes et antibactériennes des extraits et des huiles essentielles de deux plantes médicinales: Laurus nobilis et Eucalyptus globulus*. 2020, Université de Jijel.
212. Amira, M.B. and M.Y. Amira, *Mesure des activités biologiques de certains additifs naturels (eucalyptus, curcumin et grenade) incorporés dans l'alimentation des volailles locales, effet sur la qualité de la viande*.
213. Nile, S.H. and Y.S. Keum, *Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and antitumor activities of Eucalyptus globulus Labill*. 2018.
214. Ismahane, B. and K.M.E. Amine, *Contribution à l'étude de l'activité antioxydante, antimicrobienne et anti-enzymatique des extraits foliaires de l'espèce : Eucalyptus globulus Labill*. 2019.

215. MEKIDECHE, H., D. MESBAH, and H. MOKHTAR, *LES HUILLES ESSENTIELLES*. 2021.
216. Barros, L., et al., *Antioxidant activity of Agaricus sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays*. Food chemistry, 2008. **111**(1): p. 61-66.
217. Belabbas, M., *Composition chimique et propriétés biologiques des polyphénols de l'ortie (Urtica dioica L.)*. 2020, Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem.
218. Ponce, A., et al., *Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard*. LWT-Food Science Technology 2003. **36**(7): p. 679-684.
219. Su, C.-H., et al., *Increase of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii infection in acute care hospitals in Taiwan: association with hospital antimicrobial usage*. 2012. **7**(5): p. e37788.
220. AIT CHAOUICHE, F.S., *Composition chimique et activité antioxydante, antimicrobienne et insecticide des huiles essentielles et des extraits de deux Lamiaceae*. 2018.
221. Tamboli, D.P. and D.S. Lee, *Mechanistic antimicrobial approach of extracellularly synthesized silver nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria*. Journal of hazardous materials, 2013. **260**: p. 878-884.
222. Yala, J.-F., et al., *Évaluation in vitro de l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux d'Eryngium foetidum récolté dans la ville de Franceville*. 2016. **103**: p. 9886-9893.
223. Djihad, H.H.L.I.R., *Propriétés antimicrobiennes d'un Eucalyptus Algérien et formulation d'un gel hydro alcoolique*. 2023, Université les frères mentouri constantine 1.