



Université de Tunis El Manar



Université du Pays Basque



## Thèse de Doctorat en Cotutelle

Présentée pour l'obtention du

## Diplôme de Docteur en Chimie

Réalisée par

**Ghada BEN SALHA**

# Déterpénation de l'huile essentielle d'*Origanum Majorana* L. et évaluation des activités biologiques

Soutenue le **28 Février 2020** devant le jury composé de :

<b>M. Béchir HAMROUNI</b>	Pr. Faculté des Sciences de Tunis	Président
<b>M. Taeib BEN DHIA</b>	Pr. Faculté des Sciences de Tunis	Examinateur
<b>M. Manef ABDERRABBA</b>	Pr. Institut Préparatoire aux Etudes Scientifiques et Techniques de la Marsa	Directeur de thèse
<b>M. Jalel LABIDI</b>	Pr. Université du Pays Basque	Directeur de thèse
<b>M<sup>me</sup>. Nebiha BOUZOUITA</b>	Pr. Ecole Supérieure des Industries Alimentaires de Tunis	Rapporteur
<b>M. Néji BESBES</b>	Pr. Centre National des Recherches en des Sciences de Matériaux	Rapporteur

**Année Universitaire 2019-2020**

# اللهم

انفعني بما علمتني  
وعلمني ما ينفعني  
وزدني علما.

## **Dédicaces**

Je dédie spécialement cette thèse à :

### **Mes chers parents**

Avec toute ma reconnaissance et mon amour.

Je les remercie d'avoir cru en moi jusqu'au bout.

J'espère qu'ils tireront la plus grande fierté du fruit de mes peines et mes efforts.

### **Mes frères et ma sœur**

Pour leur amour inconditionnel.

### **Jamel et Idoia**

Qui étaient toujours à mes côtés à l'étranger, qui m'ont donné courage, confiance et sécurité.

Who were always by my side: they give me courage, confidence and security.

### **Mes chers amis : Marwa, Ferdaous, Amal et Hamdi**

Pour leur encouragement, leur soutien et leur affection

### **A mon cher mari Yassine**

Pour sa patience et son soutien ; je lui dédie cette thèse.

### **A ma belle famille**

### **A ma grande famille**

### **A tous ceux qui m'aiment**

## Remerciements

Cette thèse s'est effectuée dans le cadre d'une convention de cotutelle entre le Laboratoire Matériaux Molécules et Applications (LMMA) situé à l'institut Préparatoire aux Etudes Scientifiques et Techniques (IPEST), la Marsa, Tunisie et le Laboratoire du Groupe de Recherche et Procédés de Bioraffinerie (BioRP), Département d'Ingénierie Chimie et Environnement, situé à l'Université du Pays Basque (UPV), San Sébastian, Espagne.

Je tiens à exprimer ma vive reconnaissance et mes sincères remerciements à Monsieur **Manef ABDERRABBA**, Professeur à l'institut Préparatoire aux Etudes Scientifiques et Techniques et Directeur du Laboratoire Matériaux Molécules et Applications. Je le remercie pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ce travail, pour sa disponibilité, ses qualités pédagogiques et ses orientations durant ces années de thèse.

Egalement, mes remerciements les plus sincères s'adressent à Monsieur **Jalel LABIDI**, Professeur à l'Université du Pays Basque, Espagne, pour m'avoir accueillie chaleureusement au sein de son Laboratoire BioRP, pour le soutien qu'il m'a apporté, pour sa disponibilité et son encouragement qui m'ont permis d'effectuer la thèse dans les meilleures conditions.

Mes plus vifs remerciements s'adressent à Monsieur **Béchir HAMROUNI**, Professeur à la Faculté des Sciences de Tunis, de m'avoir fait l'honneur de présider le Jury de cette thèse.

Je remercie sincèrement Monsieur **Taeib BEN DHIA**, Professeur à la Faculté des Sciences de Tunis pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'examiner ce modeste travail.

Je remercie vivement Monsieur **Neji BESBES**, Professeur au Centre National de Recherche des Sciences des Matériaux et Madame **Nabiha BOUZOUTA**, Professeur à l'Ecole Supérieure des Industries Alimentaires de Tunis d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Je les remercie du temps qu'ils y ont consacré.

Ma profonde gratitude s'adresse à Monsieur **Mohamed Lotfi EFRIT**, Professeur à la Faculté des Sciences de Tunis, pour l'aide considérable qu'il m'a apporté au sein de son Laboratoire Synthèse Organique Sélective et Hétérocyclique-Evaluation de l'activité biologique.

Je veux également exprimer toute ma gratitude à Monsieur **René HERRERA DIAZ**, Post-Docteur à l'université du Pays Basque et Monsieur **Chokri JERIBI**, Docteur et sous directeur à l'IPEST, pour leur gentillesse, leur serviabilité et leur aide permanente tout au long de ce travail.

Une pensée chaleureuse accompagne toutes les personnes de l'équipe du laboratoire à Tunis : **Nesrine, Imen Dali, Imen Zribi, Nedja, Ines, Olfa, Manel, Youssef, Marwa** et en Espagne : **Oihana, Asier, Edwardo, Pedro, Selvia** avec qui j'ai eu le plaisir de travailler dans une ambiance amicale de joie et du travail fertile en discussion et en conseil.

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## Publications

Les travaux présentés dans cette thèse ont donné lieu aux publications suivantes :

- ✚ BEN SALHA, Ghada, HERRERA DÍAZ, René, LABIDI, Jalel, ABDERRABBA, Manef. **Deterpenation of *Origanum majorana L.* essential oil by reduced pressure steam distillation.** *Industrial Crops and Products*, **2017**, vol. 109, p. 116-122.
  
- ✚ BEN SALHA, Ghada, ABDERRABBA, Manef, LABIDI, Jalel. **A status review on terpenes and their separation methods.** *Chemical Engineering*, **2019**, vol. 35, iss. 8.
  
- ✚ BEN SALHA, Ghada, HERRERA DÍAZ, René, LENGELIZ, Olfa, ABDERRABBA, Manef, LABIDI, Jalel. **Effect of the Chemical Composition of Free-Terpene Hydrocarbons Essential Oils on Antifungal Activity.** *Molecules*, **2019**, vol. 24, no 19, p. 3532.

## Résumé

Le but de ce travail est l'étude de la technique de déterpénation de l'huile essentielle d'*origanum majorana*, une plante aromatique médicinale qui appartient à la famille des *Lamiaceae* et communément appelée « marjolaine douce », et l'évaluation de l'effet de ce traitement innovant en Tunisie sur l'efficacité biologique de cette essence volatile.

La partie aérienne de cette plante a été extraite en 120 min par hydrodistillation donnant un rendement de 1,7%. La déterpénation est réalisée par une distillation sous pression réduite égale à 10 mmHg. Les analyses qualitatives et quantitatives sont réalisées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) et confirmées par l'infrarouge à transformation de Fourier.

99,93% de la quantité totale de l'huile essentielle brute (HEB) sont identifiés, représentant 38 composés. Le terpinène-4-ol (27,32%),  $\gamma$ -terpinène (15,67%) et  $\alpha$ -terpinène (11,08%) sont les constituants majoritaires. L'HEB contient un mélange complexe de monoterpènes oxygénés (46,97%), d'hydrocarbures de monoterpènes (49,12%) et d'une petite quantité d'hydrocarbures sesquiterpéniques (1,96%). Une variation qualitative et quantitative du profil chimique après fractionnement par distillation sous pression réduite a été constatée.

La première fraction (F1) comporte 16 composés dont  $\gamma$ -terpinène (27,53%),  $\alpha$ -terpinène (21,15%) et sabinène (11,17%) sont les constituants principaux. La deuxième fraction (F2) est caractérisée par 17 composés constitués essentiellement de terpinène-4-ol (54,39%), hydrate de cis-sabinène (10,00%) et alcool bêta-fenchylique (9,63%). Enfin, 22 composés ont été identifiés dans la troisième fraction (F3) tels que : terpinène-4-ol (48,60%), hydrate de cis-sabinène (5,79%) et  $\alpha$ -terpinolène (3,43%) qui sont les composants principaux.

L'augmentation de la quantité des terpènes oxygénés et la diminution intéressante de la concentration des hydrocarbures de terpène en F2 et F3 permettent de les classer comme des fractions déterpénées des huiles essentielles. Les résultats de l'infrarouge à transformation de Fourier sont en concordance avec les résultats de GC-MS. En effet, la présence des bandes clés des groupements O-H et C-O dans les spectres de la F2 et F3 a confirmé la prédominance des terpènes oxygénés tels que l'alcool, la cétone et les esters. Cependant, les bandes caractéristiques des vibrations C=C d'alcènes et des cycles aromatiques sont visibles dans les spectres des huiles essentielles analysées mais légèrement intenses dans les spectres des fractions déterpénées.

Les activités biologiques de l'huile essentielle et ses fractions ont été évaluées. L'activité antioxydante a été réalisée en utilisant le test au DPPH (le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl). L'HEB, la F1, F2 et F3 ont des effets antioxydants faibles. Les résultats enregistrés de dosage des polyphénols totaux montrent que les échantillons de l'HEB, la F1, F2 et F3 sont pauvres en polyphénols avec des valeurs qui varient de 4,72 à 8,22 µg EAG/mL HE.

Le test antibactérien révèle que les huiles essentielles de la marjolaine sont actives de la même manière sur la croissance des bactéries Gram + (*Staph 2*), les bactéries Gram – (*AH2*, *E.coli*, *S.typhi*, *P.aeru*, *V.algi*, *V.angui*) et la levure (*C.albi*). L'HEB (11,7 à 15,0 mm) et la F3 (11,3 à 13,7 mm) sont classées des agents antibactériens sensibles. La F1 (8,0 à 10,0 mm) montre le plus faible pouvoir inhibiteur contre le développement des bactéries. La F2 est la plus active vis-à-vis toutes les souches testées avec des diamètres des zones d'inhibition qui varient entre 15,7 et 21 mm. Cette fraction peut être classée comme une substance antibactérienne très sensible ou extrêmement sensible.

L'étude de l'activité antifongique contre l'*A. niger* montre que l'HEB (36,56%) et la F1 (8,76%) présentent des pourcentages d'inhibition de la croissance fongique très faible par rapport à la F2 (100%) et F3 (85,09%). Les résultats de l'activité antifongique obtenus contre *R.oryzae*, *R.stolonifier* et *A. penicillioides* corroborent avec ceux précédemment observés contre l'*A. niger* sauf pour l' HEB qui suit l'ordre d'inhibition suivant : *R.oryzae* (85,84%) > *R.stolonifier* (53,40%) > *A. penicillioides* (29,95%). La suite des testes de dilution en agar et en bouillon indique que la F2 est une huile essentielle fongicide qui tue les champignons d'*A. niger* à une concentration massique égale à 15 mg/mL.

## Abstract

The purpose of this work is the study of the technique of deterrpenation of the *Origanum Majorana* essential oil, a medicinal aromatic plant belonging to the family of *Lamiaceae* and commonly called «sweet marjoram», and the evaluation of the effect of this innovative treatment on the biological efficiency of this volatile component.

The aerial part of this plant was extracted in 120 min by hydrodistillation giving a yield of 1.7%. Deterpenation was achieved by distillation under reduced pressure (10 mmHg). Qualitative and quantitative analyses were performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and by Fourier transform infrared (FT-IR).

99.93% of the total quantity of raw essential oil (REO) are identified, representing 38 compounds. Terpinène-4-ol (27.32%),  $\gamma$ -terpinene (15.67%) and  $\alpha$ -terpinene (11.08%) are the majority constituents. REO contains a complex mixture of oxygenated monoterpenes (47.36%), hydrocarbon monoterpenes (50.70%) and a small amount of hydrocarbon sesquiterpenes (4.94%). A qualitative and quantitative change in the chemical profile after fractionation by reduced pressure distillation was observed.

The first fraction (F1) consists of 16 compounds, of which  $\gamma$ -terpinene (27.53%),  $\alpha$ -terpinene (21.15%) and sabinene (11.17%) are the main constituents. The second fraction (F2) is characterized by 17 compounds consisting mainly of terpinene-4-ol (54.39%), cis-sabine hydrate (10.00%) and beta-fenchylic alcohol (9.63%). Finally, 22 compounds were identified in the third fraction (F3) such as: terpinen-4-ol (48.60%), cis-sabine hydrate (5.79%) and  $\alpha$ -terpinolene (3.43%) are the main components. The increase in the quantity of oxygenated terpenes and the interesting decrease in the concentration of hydrocarbon terpenes in F2 and F3 make it possible to classify them as deterpened fractions of essential oils.

FT-IR results are in concordance with GC-MS results. Indeed, the presence of the key bands of the O-H and C-O groups in the F2 and F3 spectra confirmed the predominance of oxygenated terpenes such as alcohol, ketone and esters. However, the characteristic bands of alkene C=C vibrations and aromatic rings are visible in the spectra of the essential oils analysed but slightly intense in the spectra of the deterpened fractions.

The biological activities of the essential oil and its fractions were evaluated. The antioxidant activity was performed using the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) test. REO, F1, F2 and F3 have weak antioxidant effects. The recorded total polyphenol assay results show that

samples from REO, F1, F2 and F3 are low in polyphenols with values ranging from 4.72 to 8.22 µg EAG/mL EO.

The antibacterial test reveals that marjoram essential oils are similarly active in the growth of Gram + bacteria (*Staph 2*), Gram – bacteria (*AH2*, *E.coli*, *S.typhi*, *P.aeru*, *V.algi*, *V.angui*) and yeast (*C.albi*). REO and F3 are classified as sensitive antibacterial agent with inhibition diameters of (11.7 to 15.0 mm) and (11.3 to 13.7 mm) respectively. F1 (8.0 to 10.0 mm) shows the lowest inhibitory power against the development of bacteria. F2 is the most active fraction with respect to all strains tested with diameters of the inhibition zones between 15.7 and 21 mm, it can be classified as a highly sensitive or extremely sensitive antibacterial substance.

The study of antifungal activity against *A. niger* shows that REO (36.56%) and F1 (8.76%) have very low levels of inhibition of fungal growth compared to F2 (100%) and F3 (85.09%). The results of the antifungal activity obtained against *R.oryzae*, *R.stolonifier* and *A. penicillioides* corroborate those previously observed against *A. niger* except for REO which follows the following inhibition order: *R.oryzae* (85.84%) > *R.stolonifier* (53.40%) > *A. penicillioides* (29.95%). Agar and broth dilution tests indicate that F2 is a fungicidal essential oil that kills *A. niger* fungi at a concentration equal to 15 mg/mL.

## Resumen

De todos los tiempos, en todos los lugares, especialmente en los países mediterráneos, los aceites esenciales (AEs) despiertan cada vez más el interés de los químicos, biólogos, en razón de su riqueza en terpenos activos que presentan una amplia gama de aplicación terapéutica e industrial tan variada en dominios como la química, la alimentación, la cosmética, la electrónica, el plástico y la farmacia.

Estas sustancias naturales se ofrecen en diferentes puntos de venta: mercados, cadenas de grandes distribuciones, farmacias y tiendas de productos orgánicos. Sin embargo, existe una gran disparidad entre los precios de los aceites esenciales debido a su calidad y eficacia.

En efecto, los terpenos generalmente oxigenados son moléculas contenidas en pequeñas cantidades en AEs y tienen un alto valor añadido debido a su perfil sensorial particularmente buscado y su efecto biológico variado y pronunciado. Para enriquecer estas especies en terpenos oxigenados y también para reducir su concentración en terpenos hidrocarburos para problemas de solubilidad, alegría y eficacia, es necesario reprocesarlos. Este paso indispensable se llama desterpenación.

En Túnez, los aceites esenciales se extraen de las plantas aromáticas medicinales y, a continuación, se aplican directamente al estado bruto a la vez en el ámbito de la investigación, de la industria y la terapia. La desterpenación de las AEs permite aumentar su estabilidad, así como que su perfil comercial y biológico. En nuestro país, es una primicia del trabajo de esta tesis.

El objetivo de este trabajo es el estudio de la técnica de desterpenación del aceite esencial de *Origanum majorana*, una planta aromática medicinal que pertenece a la familia de *Lamiaceae* y comúnmente llamado «mejorana dulce», y la evaluación del efecto de este tratamiento sobre la eficacia biológica de esta esencia volátil.

En este contexto, este documento consta de tres capítulos principales.

En el primer capítulo presenta una síntesis bibliográfica del estado del arte de técnicas de obtención sin cambio significativo en la naturaleza de los aceites esenciales: la extracción en frío, la destilación, la extracción con disolventes orgánicos, la extracción con microondas al vacío y la extracción por CO<sub>2</sub> supercrítico y los principales métodos de análisis de los AEs que son la cromatografía de gases asociada a la espectrometría de masas (GC-MS) y la espectrometría infrarroja transformada de Fourier (FT-IR).

Una visión general de los terpenos, en particular su estructura general que procede de la unidad isoprena (2- metilbutano —  $C_5$ ) : monoterpenos  $C_{10}$ , esquiterpenos  $C_{15}$ , diterpenos  $C_{20}$ , sesterpenos  $C_{25}$  y otras estructuras raras de los terpenos. Estos terpenos tienen funciones metabólicas primarias y secundarias, citando principalmente su importante papel en el proceso de base en casi todas las especies vegetales, incluido el crecimiento, el desarrollo y el metabolismo general y su papel clave como medios de comunicación entre las especies vivas en el contexto de la reproducción, la defensa o la simbiosis.

Su principal uso en el ámbito de los productos cosméticos (perfumes, aromatizantes..), en la alimentación (mejora de la calidad gustativas de los alimentos) y en la biotecnología (los procesos de depósito de las películas dieléctricas (porógeno) o el revestimiento terpénico de superficie de los polímeros orgánicos). También se menciona en la bibliografía sus potenciales biológicos (antimicrobianos, antiparasitarios, antioxidantes, antialérgicos, antiespasmódicos, antihiperlipidémicos, antiinflamatorios, antineoplásicos e inmunomoduladores) que se aplican ampliamente en la aromaterapia.

A continuación, se presenta una revisión bibliográfica de los métodos de separación de los terpenos más comúnmente utilizados, su principio y algunos ejemplos. Estos procesos son: las técnicas cromatográficas, la extracción por disolvente, la separación por membrana, el fraccionamiento por  $CO_2$  supercrítico y las técnicas de destilación.

Esta síntesis termina con la descripción botánica y farmacológica de la planta de *Origanum majorana* L., especialmente sus actividades antioxidantes y antimicrobianas.

A continuación, los capítulos materiales y métodos presentan los instrumentos, conceptos y equipos utilizados en este trabajo. Se describe la hidrositolación como la técnica de extracción de aceite esencial de la mejorana suave y ponemos el acento sobre el desarrollo del módulo que permite obtener fracciones desintegradas de esta esencia (La destilación a presión reducida). Esta técnica se utiliza por primera vez en Túnez para la destilación de los aceites esenciales.

Describimos los métodos de análisis cualitativos y cuantitativos (GC-MS y FT-IR) del aceite esencial bruto y sus fracciones, los dispositivos utilizados y las condiciones de trabajo y de análisis.

Nos referimos a los métodos de evaluación de las actividades biológicas (descripción, modalidad procedimiento y modo de expresión de los resultados) comenzando con la prueba antioxidante basada en el método del radical orgánico 1,1- difenil -1- picrilhidrazil (DPPH) y que termina con la actividad antimicrobiana que se subdivide en dos subpartes:

- La prueba antibacteriana de difusión en discos estériles (aromatogramas) contra ocho cepas bacterianas de referencia conocidas por su patogenicidad, a saber: *Staphylococcus aureus* (staph 25), *Pseudomonas fluorescens* (AH2), *Escherchia coli* (*E.coli*), *Salmonella typhimurium* (*S.typhy*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeru*), *Cándida albicans* (*C.albi*), *Vibrio alginolyticus* (*V.algi*) y *Vibrio anguillarum* (*V.angui*).
- La prueba antifónica contra *aspergillus niger* (*A. niger*), *aspergillus penicillioides* (*A. penicilioides*), *Rizopus oryzae* (*R.oryzae*) y *Rizopus stolonifier* (*R.stolonifier*) es hecho según tres métodos: microatmósferas, dilución en caldo y dilución en agar.

Por último, el capítulo resultados se divide en tres partes. La primera se dedicada al estudio de la cinética de extracción. La parte aérea de la planta de *Origanum majorana* fue extraída en 120 minutos por hidrositilación dando un rendimiento de 1,7%. La segundo se dedica al estudio de la desterpenación que ha sido realizada por una destilación bajo presión reducida (10 mmHg).

La evaluación de la variabilidad cuantitativa y cualitativa de los aceites esenciales en función del tiempo de extracción revela que:

- se identifica el 99,93% de la cantidad total de aceite esencial bruto (HEB), que representan 38 compuestos. Terpineno-4-ol (27,32%),  $\gamma$ -terpineno (15,67%) y  $\alpha$ -terpineno (11,08%) son los componentes mayoritarios. La HEB contiene una mezcla complejo de monoterpenos oxigenados (46,97%), de hidrocarbures sesquiterpeno (49,12%) y una pequeña cantidad de hidrocarbures sesquiterpénicos (1,96%). Una variación cualitativa y cuantitativa del perfil químico tras el fraccionamiento por destilación a presión reducida se encontró.
- La primera fracción (F1) consta de 16 compuestos, de los cuales  $\gamma$ -terpinène (27,53%),  $\alpha$ -terpineno (21,15%) y sabineno (11,17%) son los componentes principales.
- La segunda fracción (F2) se caracteriza por 17 compuestos constituidos esencialmente por terpineno-4-ol (54,39%), hidrato de cis-sabineno (10,00%) y alcool bêta-fenchylique (9,63%).

- Por último, se han identificado 22 compuestos en la tercera fracción (F3), como; terpineno-4-ol (48,60%), hidrato de cis-sabineno (5,79%) y  $\alpha$ -terpinoleno (3,43%) que son los componentes principales.
- El aumento de la cantidad de terpenos oxigenados y la interesante disminución de la concentración de los hidrocarburos de terpeno en F2 y F3 permite clasificarlos como fracciones desenterradas de los aceites esenciales.

Los resultados del FT-IR son coherentes con los resultados de GC-MS. En efecto, la presencia de las bandas clave de las agrupaciones O-H y C-O en los espectros F2 y F3 ha confirmado el predominio de los terpenos oxigenados como el alcohol, la cetona y los ésteres. Sin embargo, las bandas características de vibraciones C=C de alquenos y ciclos aromáticos son visibles en los espectros de aceites esenciales analizados pero ligeramente intensos en los espectros de las fracciones destripadas.

La última parte se refiere al estudio de las actividades biológicas (antioxidante, antibacteriana y antifúngica) de la HE de *Origanum majorana* L. y sus fracciones en relación con sus principales componentes fitoquímicos activos.

La actividad antioxidante se realizó utilizando la prueba DPPH. La HEB, la F1, F2 y F3 tienen efectos antioxidantes bajos. Los resultados de la determinación de polifenoles totales registrada muestra que las muestras de la HEB, la F1, F2 y F3 son pobres en polifenoles con valores que varían entre 4,72 y 8,22  $\mu\text{g}$  EAG/ml.

La prueba antibacteriana revela que los aceites esenciales de la mejorana son activos de la misma manera el crecimiento de las bacterias Gram + (*staph 2*), las bacterias Gram – (*AH2*, *E.coli*, *S.typhi*, *P.aeru*, *V.algi*, *V.angui*) y la levadura (*C.albi*). HEB (11,7 a 15,0 mm) y F3 (11,3 a 13,7 mm) se clasifican como agentes antibacterianos sensibles. F1 (8,0 a 10,0 mm) muestra el menor poder inhibidor contra el desarrollo de las bacterias. F2 es la fracción más activa frente a todas las cepas probadas con diámetros de las zonas inhibición entre 15,7 y 21 mm, puede clasificarse como sustancia antibacteriana muy sensible o extremadamente sensible.

El estudio de la actividad antifúngica contra *A. niger* muestra que la HEB (36,56%) y la F1 (8,76%) presentan porcentajes de inhibición del crecimiento fúngico muy bajos en comparación con F2 (100%) y F3 (85,09%). Los resultados de la actividad antifúngica obtenidos de *R.oryzae*, *R.stolonifier* y *A. penicilioides* corroboran con los que se observaron anteriormente contra *A. niger* excepto para l. HEB que sigue el siguiente orden de inhibición: *R. oryzae* (85,84%) > *R. estolonifier* (53,40%) > *A. penicilioides* (29,95%). Las pruebas de

dilución posteriores de agar y caldo indican que la F2 es un aceite fungicida esencial que mata a los hongos de *A.níger* a una concentración igual a 15 mg/mL.

Como conclusión de esta tesis, enumeraremos los principales resultados obtenidos durante el estudio fitoquímico y biológico de la mejorana desterpenada y las perspectivas que servirán de objetivo para estudios ulteriores.

## Liste des abréviations

<b>ADC</b>	: Acide 3 $\alpha$ , 12 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholanique
<b>AUC</b>	: Acide ursodésoxycholique
<b>BHT</b>	: Hydroxytoluène butylé
<b>CMB</b>	: Concentration minimale bactéricide
<b>CMI</b>	: Concentration minimale inhibitrice
<b>CF</b>	: Croissance fongique
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Dioxyde de carbone
<b>DMSO</b>	: Diméthylsulfoxyde
<b>DPPH</b>	: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
<b>DFV</b>	: Distillation fractionnée sous vide
<b>ERO</b>	: Espèces réactives oxygénées
<b>EFS</b>	: Extraction par fluide supercritique
<b>ELL</b>	: Extraction liquide-liquide
<b>ES</b>	: Extraction par solvant
<b>EE</b>	: Extraits éthanoïques
<b>F1</b>	: Fraction 1
<b>F2</b>	: Fraction 2
<b>F3</b>	: Fraction 3
<b>FC</b>	: Folin-Ciocalteu
<b>FS</b>	: Fluide supercritique
<b>FT-IR</b>	: Infrarouge à Transformation de Fourier
<b>GC-MS</b>	: Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
<b>HE</b>	: Huile essentielle
<b>HEB</b>	: Huile essentielle brute
<b>HEs</b>	: Huiles essentielles
<b>ICF</b>	: Inhibition de la croissance fongique
<b>MH</b>	: Monoterpènes hydrocarbonés
<b>MO</b>	: Monoterpènes oxygénés
<b>PAM</b>	: Plantes aromatiques médicinales

**PDA** : Potato Dextrose Agar  
**PDB** : Potato Dextrose Broth  
**Rt** : Rendement  
**RC** : Rendement cumulé  
**SM** : Séparation membranaire  
**SH** : Sesquiterpènes hydrocarbonés  
**SO** : Sesquiterpènes oxygénés  
**THD** : Temps de l'hydrodistillation  
**TR** : Temps de rétention  
**TC** : Technique chromatographique  
**TDM** : Technique de distillation moléculaire  
**TO** : Terpènes oxygénés  
**TSA** : Tryptone Soya Agar  
**TSB** : Trypto-caséine de Soja

## Liste des figures

<b>Figure I-1 :</b>	Les hydrocarbures terpéniques (isoprénoïdes).....	12
<b>Figure I-2 :</b>	Les parties aériennes d' <i>Origanum majorana</i> L.....	28
<b>Figure I-3 :</b>	Aire de distribution du genre <i>Origanum</i> (Ietswaart, 1980).....	29
<b>Figure I-4 :</b>	Action des HES sur la cellule bactérienne (Burt, 2004).....	39
<b>Figure II-1 :</b>	Dispositif utilisé de l'hydrodistillation .....	59
<b>Figure II-2 :</b>	Dispositif de la distillation sous vide .....	61
<b>Figure II-3 :</b>	Dispositif de CPG-MS.....	62
<b>Figure II-4 :</b>	Dispositif de l'Infrarouge à Transformation de Fourier.....	64
<b>Figure II-5 :</b>	Mécanisme réactionnel intervenant entre le radical DPPH et un antioxydant (AH) .....	65
<b>Figure II-6 :</b>	Cellometer® Mini (Nexcelom Bioscience LLC).....	70
<b>Figure II-7 :</b>	Microscope Electronique (Nikon Eclipse E600).....	71
<b>Figure II-8 :</b>	Incubateur agitateur Heidolph Unimax 1010 .....	72
<b>Figure III-1:</b>	Rendement (Rt) et rendement cumulé (RC) d' <i>O. majorana</i> en fonction du temps d'extraction.....	78
<b>Figure III-2:</b>	Rendement des familles des terpènes d' <i>O. majorana</i> en fonction du temps d'extraction.....	87
<b>Figure III-3 :</b>	Variation du rendement des familles de terpènes de l'HE de la marjolaine en fonction de l'HEB, F1, F2 et F3.....	84
<b>Figure III-4 :</b>	Les spectres FT-IR de l'HEB, la F1, F2 et F3 d'HE d' <i>O. majorana</i> dans la région (4000-600 cm <sup>-1</sup> ) .....	88
<b>Figure III-5 :</b>	La région du spectre assigné comme empreinte digitale des échantillons étudiés de l'HE de marjolaine .....	88
<b>Figure III-6 :</b>	Ordre de la lecture des disques.....	93
<b>Figure III-7 :</b>	Effet de l'HEB, la F1, F2 et F3 sur la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> ( <i>Staph</i> 25).....	93
<b>Figure III-8:</b>	Effet de l'HEB, la F1, F2 et F3 sur la croissance de <i>Pseudomonas Fluorescens</i> (AH2).....	93
<b>Figure III-9 :</b>	Effet de l'HEB, la F1, F2 et F3 sur la croissance de <i>Escherchia coli</i> ( <i>E.coli</i> ).....	93
<b>Figure III-10 :</b>	Effet de l'HEB, la F1, F2 et F3 sur la croissance de <i>Salmonella typhimurium</i> ( <i>S.typhy</i> ).....	94

<b>Figure III-11 :</b>	Effet de l'HEB, la F1, F2 et F3 sur la croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ( <i>P.aeru</i> ).....	94
<b>Figure III-12 :</b>	Effet de l'HEB, la F1, F2 et F3 sur la croissance de <i>Candida albicans</i> ( <i>C.albi</i> ).....	94
<b>Figure III-13 :</b>	Effet de l'HEB, la F1, F2 et F3 sur la croissance de <i>Vibrio alginolyticus</i> ( <i>V.algi</i> ).....	94
<b>Figure III-14:</b>	Effet de l'HEB, la F1, F2 et F3 sur la croissance de <i>Vibrio anguillarum</i> ( <i>V.angui</i> ).....	94
<b>Figure III-15 :</b>	L'observation visuelle de la CF d' <i>A. niger</i> dans le blanc, l'HEB, la F1, F2 et F3 à $25 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ après 7 jours d'incubation.....	97
<b>Figure III-16 :</b>	Les pourcentages d'inhibition de la croissance fongique d' <i>A. niger</i> en fonction de la concentration de F2 et F3.....	99
<b>Figure III-17 :</b>	Trois répétitions de l'effet fongicide de la F2 sur l' <i>A. niger</i> (dilution en bouillon).....	100
<b>Figure III-18 :</b>	Les champignons: <i>R.oryzae</i> isolé de citrouille, <i>R.stolonifier</i> isolé de pêche et <i>A. penicillioides</i> isolé de prune.....	101
<b>Figure III-19 :</b>	La croissance fongique de <i>R. oryzae</i> dans le blanc, l'HEB, la F1, F2 et F3.....	102
<b>Figure III-20 :</b>	La croissance fongique de <i>R. stolonifier</i> dans le blanc, l'HEB, la F1, F2 et F3.....	102
<b>Figure III-21 :</b>	La croissance fongique de l' <i>A. penicillioides</i> dans le blanc, l'HEB, la F1, F2 et F3.....	102

## Liste des tableaux

<b>Tableau I-1 :</b>	Classification du genre <i>Origanum</i> selon Ietswaart (Ietswaart, 1980).....	30
<b>Tableau I-2 :</b>	Répartition géographique de la marjolaine en Tunisie depuis 1999.....	31
<b>Tableau I-3 :</b>	Le rendement et les composés majoritaires de l'HE de la marjolaine dans quelques régions en Tunisie cités dans la bibliographie .....	32
<b>Tableau I-4 :</b>	Nom, formule brute et semi-développée de quelques molécules qui caractérisent l'HE de la marjolaine .....	33
<b>Tableau I-5 :</b>	Quelques activités biologiques des extraits et des huiles essentielles de la marjolaine .....	36
<b>Tableau II-1 :</b>	Les souches bactériennes utilisées, références, caractéristiques et effets.....	68
<b>Tableau III-1:</b>	Le rendement et le rendement cumulé en fonction du temps d'extraction	78
<b>Tableau III-2:</b>	La variation de THD et de RC de l'HE de la marjolaine dans quelques régions en Tunisie .....	79
<b>Tableau III-3:</b>	Variation du rendement des familles de terpènes de l'HE de la marjolaine en fonction du temps d'extraction .....	80
<b>Tableau III-4 :</b>	Composition chimique de l'huiles essentielle d' <i>O. majorana</i> à différents temps d'extraction (T0 à T120) .....	81
<b>Tableau III-5 :</b>	Masses et températures d'ébullition des fractions obtenues par distillation sous pression réduite.....	84
<b>Tableau III-6:</b>	La composition chimique d'huile essentielle de marjolaine identifiée par GC-MS, le temps de rétention (TR), la surface (%) et la famille générique	85
<b>Tableau III-7 :</b>	Les teneurs des composés majoritaires dans l'HEB, la F1, F2 et F3.....	86
<b>Tableau III-8 :</b>	La composition chimique d'HEB, F1, F2 et F3 en monoterpènes hydrocarbonés, monoterpènes oxygénés, sesquiterpènes hydrocarbonés et sesquiterpènes oxygénés .....	87
<b>Tableau III-9 :</b>	Les bandes caractéristiques des échantillons examinés, leur intensité, leur type de liaison, leur assignement du groupe fonctionnel et leur fréquence du groupe.....	89
<b>Tableau III-10 :</b>	Pouvoir réducteur de l'HEB, la F1, F2 et F3 de la marjolaine et de trolox mesuré selon la méthode de DPPH.....	91
<b>Tableau III-11 :</b>	Teneurs en polyphénols totaux dans l'HEB, la F1, F2 et F3.....	91
<b>Tableau III-12 :</b>	Les diamètres des zones d'inhibition induites par l'HEB, la F1, F2 et F3	

	(5µL/mL) contre les huit souches de bactéries.....	95
<b>Tableau III-13 :</b>	Le pourcentage d'inhibition de la croissance fongique (%ICF) de l'HEB, la F1, F2 et F3 incubées pendant 7 jours à 25 ± 1,5°C.....	97
<b>Tableau III-14 :</b>	L'effet de la variation de la concentration de F2 et F3 sur l'inhibition de la croissance fongique de l' <i>A. niger</i> .....	99
<b>Tableau III-15 :</b>	Le pourcentage d'inhibition de la croissance fongique (%ICF) de l'HEB, la F1, F2 et F3 incubées pendant 7 jours à 25 ± 1,5°C contre <i>R. oryzae</i> , <i>R. stolonifer</i> et l' <i>A. penicillioides</i> .....	101

## Sommaire

<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	1
<b>CHAPITRE I</b> .....	4
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	4
<b>I-1 Les huiles essentielles (HEs)</b> .....	5
I-1-1 Généralités .....	5
I-1-2 Définition .....	5
I-1-3 Techniques d'extraction .....	6
I-1-3-1 Techniques d'obtention sans changement significatif de la nature des essences	7
a- L'expression à froid .....	7
b- La distillation .....	7
c- Extraction aux solvants organiques .....	8
d- Extraction par micro-ondes sous vide .....	8
e- Extraction par CO <sub>2</sub> supercritique .....	8
I-1-3-2 Les techniques d'obtention avec changement significatif de la nature des essences .....	8
I-1-4 Domaine d'utilisation .....	9
I-1-5 Contexte réglementaire .....	9
I-1-6 Méthodes de caractérisation .....	9
I-1-7 Composition chimique des HEs .....	10
<b>I-2 Les terpènes</b> .....	11
I-2-1 Terme et signification.....	11
I-2-2 Structure générale.....	12
I-2-2-1 Hemiterpènes .....	13
I-2-2-2 Monoterpènes .....	13
a- Monoterpènes hydrocarbonés .....	13
b- Monoterpènes oxygénés .....	13
I-2-2-3 Sesquiterpènes .....	13
a- Sesquiterpènes hydrocarbonés .....	13
b- Sesquiterpènes oxygénés .....	14

I-2-2-4 Diterpènes .....	14
I-2-2-5 Sesterpenes .....	14
I-2-2-6 Autres terpènes .....	14
a- Triterpènes .....	14
b- Tetraterpènes .....	14
c- Polyterpènes .....	15
I-2-3 Fonctions et utilisations .....	15
I-2-3-1 Fonctions métabolites primaires .....	15
I-2-3-2 Fonctions métabolites secondaires .....	15
I-2-3-3 Utilisations .....	16
<b>I-3 Les méthodes de séparation .....</b>	<b>18</b>
I-3-1 Les techniques chromatographiques .....	18
I-3-2 Extraction par solvant .....	19
I-3-3 Séparation membranaire .....	21
I-3-4 Fractionnement par CO <sub>2</sub> supercritique .....	22
I-3-5 Les techniques de distillation .....	24
I-3-6 Comparaison entre les méthodes de séparation citées .....	25
<b>I-4 Etude bibliographique de la plante d'<i>Origanum majorana</i> L. ....</b>	<b>27</b>
I-4-1 Habitat et description.....	27
I-4-2 Identité botanique .....	28
I-4-3 Répartition géographique.....	28
I-4-3-1 Dans le monde.....	28
I-4-3-2 Dans la Tunisie.....	31
I-4-4 Principaux constituants chimiques .....	31
I-4-5 Activités pharmacologiques et utilisations .....	34
I-4-5-1 Activité antioxydante .....	34
I-4-5-2 Activité antibactérienne .....	35
I-4-5-3 Activité antifongique .....	35
I-4-5-4 Divers .....	36
<b>I-5 Les activités antioxydante et antimicrobienne .....</b>	<b>36</b>

I-5-1	Activité antioxydante .....	37
I-5-1-1	Le stress oxydatif .....	37
I-5-1-2	Oxydation des lipides (peroxydation lipidique) .....	37
I-5-1-3	Les antioxydants .....	38
a-	Les antioxydants enzymatiques .....	38
b-	Les antioxydants non enzymatiques .....	39
I-5-2	Activité antimicrobienne .....	39
I-5-2-1	Les antibiotiques .....	39
I-5-2-2	Mode d'action des huiles essentielles .....	40
I-5-2-3	La détermination de la CMI .....	40
a-	Test de dilution .....	41
b-	La méthode de disque .....	41
I-5-2-4	La détermination de la CMB .....	41
	Conclusion.....	42
	<b>CHAPITRE II</b> .....	58
	<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	58
	<b>II-1 Extraction et déterpénation des huiles essentielles</b> .....	59
II-1-1	Matériel végétal .....	59
II-1-2	Extraction par hydrodistillation.....	59
II-1-3	Déterpénation par distillation sous pression réduite .....	60
	<b>II-2 Analyses des huiles essentielles</b> .....	61
II-2-1	GC-MS .....	61
II-2-1-1	Principe .....	61
II-2-1-2	Mode opératoire .....	62
II-2-2	FT-IR .....	63
II-2-2-1	Principe .....	63
II-2-2-2	Mode opératoire .....	64
	<b>II-3 Evaluation des activités biologiques</b> .....	65

II-3-1 Évaluation de l'activité antioxydante.....	65
II-3-1-1 La méthode de DPPH .....	65
a- Description .....	65
b- Mode opératoire .....	65
II-3-1-2 Dosage des polyphénols totaux .....	66
a- Description .....	66
b- Mode opératoire .....	66
II-3-2 Évaluation de l'activité antimicrobienne .....	67
II-3-2-1 Activité antibactérienne .....	67
a- Les conditions du travail .....	67
b- La méthode de diffusion sur les disques stériles (aromatogrammes).....	68
II-3-2-2 Evaluation de l'activité antifongique .....	69
a- Souches fongiques.....	69
b- Méthode des micros-atmosphères.....	69
c- Dilution en Bouillon.....	70
d- Dilution en Agar.....	72
Conclusion.....	74
<b>CHAPITRE III</b> .....	77
<b>RESULTATS ET DISCUSSIONS</b> .....	77
<b>III-1 Hydrodistillation; cinétique et variabilité quantitative et qualitative des huiles essentielles d'<i>O. majorana</i></b> .....	78
III-1-1 Etude de la cinétique d'extraction de l'HE.....	76
III-1-2 Variation de la composition chimique à différents temps d'extraction.....	80
<b>III-2 Déterpénation de l'HE d'<i>O. majorana</i> par distillation sous pression réduite..</b>	83
III-2-1 Fractionnement.....	83
III-2-2 Etude de la composition chimique (GC-MS et FT-IR).....	84
III-2-2-1 GC-MS.....	84
III-2-2-2 FT-IR.....	87
<b>III-3 Etude des activités biologiques de l'HE d'<i>O. majorana</i></b> .....	90
III-3-1 Evaluation de l'activité antioxydante.....	90

III-3-1-1	Mesure du pouvoir antioxydant par piégeage du radical DPPH•.....	90
III-3-1-2	Dosage des polyphénols totaux.....	91
III-3-2	Etude de l'activité antibactérienne.....	92
III-3-3	Etude de l'activité antifongique.....	96
III-3-3-1	L'activité antifongique contre l' <i>A. niger</i> .....	97
III-3-3-2	L'activité antifongique contre <i>R. oryzae</i> , <i>R. stolonifera</i> et de l' <i>A. penicillioides</i> .....	101
	Conclusion.....	104
	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	111

## Introduction

De tous temps, en tous lieux, notamment dans les pays méditerranéens, les plantes aromatiques médicinales (PAM) représentent une source inépuisable des huiles essentielles (HEs). Celles-ci connues par leurs rôles considérables dans la culture économique de nombreux peuples à travers les âges, que ce soit sur le plan industriel ou médical.

De nos jours, les HEs suscitent de plus en plus l'intérêt des chimistes, biologistes et médecins en raison de leur richesse en composés terpéniques actifs qui représentent un large éventail d'application thérapeutique et industriel aussi varié que le domaine de la chimie, l'agroalimentaire, la cosmétique, l'électronique, le plastique et la pharmacie.

Ces substances naturelles sont proposées dans différents points de vente : marchés, grandes distributions, pharmacies et « magasins bio ». Cependant, une grande disparité existe entre les prix des huiles essentielles en raison de leur qualité et leur efficacité.

En effet, généralement les terpènes oxygénés sont des molécules contenues en faible quantité dans les HEs et qui présentent une haute valeur ajoutée à cause de leur profil sensoriel particulièrement recherché et de leur effet biologique varié et prononcé. Dans le but d'enrichir ces essences en terpènes oxygénés et de réduire également leur concentration en terpènes hydrocarbonés pour des questions de solubilité, d'allergie et d'efficacité, il est nécessaire de les retraiter. Cette étape indispensable s'appelle la déterpénation.

En Tunisie, les huiles essentielles sont extraites des PAM, puis, elles sont directement appliquées à l'état brut à la fois dans le domaine de la recherche, de l'industrie et de la thérapie. La déterpénation des HEs permet d'accroître leur stabilité, ainsi que leur profil commercial et biologique. Dans notre pays, c'est une première qui fait l'objet de ce travail de thèse.

Ce document est composé de trois grandes parties.

Tout d'abord, il y a une **Synthèse bibliographique** de l'état de l'art des techniques d'obtention et d'analyse des huiles essentielles ainsi qu'un aperçu général sur les terpènes : leur structure générale, leur fonction et leur utilisation. Une revue bibliographique des différentes méthodes de séparation des terpènes y est. Cette synthèse finit par la description botanique, géographique et pharmacologique de la plante d'*Origanum majorana* L., surtout ses activités antioxydante et antimicrobienne.

Ensuite, une partie **Matériel et Méthodes** fait le bilan précis des outils, concepts et équipements utilisés au cours de ce travail. On peut notamment mettre l'accent sur la mise au point d'une technique qui a permis d'obtenir des fractions déterpénées de l'huile essentielle de la marjolaine.

Enfin, la partie **Résultats et Discussion** est divisée en trois sous-parties. La première est consacrée à l'étude de la cinétique d'hydrodistillation, ainsi qu'à l'évaluation de la variabilité quantitative et qualitative des huiles essentielles en fonction du temps d'extraction. La seconde explicite la technique utilisée pour déterpéner l'huile essentielle de la marjolaine et prendre en compte la variabilité de la composition chimique de ces fractions volatiles. La dernière porte sur l'étude des activités antioxydante, antibactérienne et antifongique de l'HE d'*Origanum majorana* L. et ses fractions en relation avec leurs principaux constituants phytochimiques actifs.

En conclusion de cette thèse, nous énumérerons les principaux résultats obtenus au cours de l'étude phytochimique et biologique de la marjolaine déterpénée et les perspectives qui feront l'objectif des études ultérieures.

## Objectifs

### Objectif principal

Cette thèse a comme objectif général d'étudier et de comparer la phytochimie et les activités biologiques de l'huile essentielle d'*Origanum majorana* à l'état brut et à l'état déterpéné.

### Objectifs spécifiques

- ✓ Identification des principales méthodes de séparation des terpènes.
- ✓ Extraction de l'huile essentielle de la partie aérienne d'*Origanum majorana* par hydrodistillation.
- ✓ Déterpénation de l'huile essentielle d'*O. majorana* par distillation sous pression réduite.
- ✓ Identification des différents composés chimiques présents dans l'huile essentielle brute (HEB) et les fractions obtenues.
- ✓ Etude de l'activité antioxydante de l'HEB de la marjolaine et ses fractions (F1, F2 et F3).
- ✓ Etude de l'activité antibactérienne de l'HEB, la F1, F2 et F3.
- ✓ Etude de l'activité antifongique de l'HEB, la F1, F2 et F3.

# CHAPITRE I

## REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Ce chapitre introduit et explicite les différents termes abordés dans ce mémoire. Il se compose de cinq parties :

1. Une première partie, dans laquelle nous présenterons les techniques d'extraction et d'analyses des huiles essentielles et leurs domaines d'utilisation.
2. La seconde partie portera sur les terpènes : structure générale, fonctions et utilisations.
3. La troisième partie est une revue bibliographique des différentes méthodes de séparation des terpènes.
4. Une quatrième partie où nous ferons une description botanique, géographique et pharmacologique de la plante d'*Origanum majorana* L.
5. La dernière partie contient un bref aperçu des activités antioxydante et antimicrobienne.

## **I-1 Les huiles essentielles**

### **I-1-1 Généralités**

Les huiles essentielles (HEs) sont couramment utilisées comme aromatisants dans les produits alimentaires, les boissons, les parfums, les cosmétiques et comme un produit pharmaceutique à base des plantes dans la phytothérapie (Lahlou, 2004; Said et al., 2015).

Environ 3000 HEs ont été produites en utilisant au moins 2 000 espèces de plantes, dont 300 sont importantes du point de vue commercial. 40 000 à 60 000 tonnes de production annuelle avec une valeur marchande estimée à 700 millions de dollars US, indiquent que la production et la consommation des huiles essentielles est en augmentation dans le monde entier (Raut and Karuppaiyl, 2014). Ces essences végétales extraites des plantes aromatiques médicinales (PAM) sauvages ou cultivées se trouvent principalement dans les pays méditerranéens, présentant ainsi la plus importante source d'exportation pour les pays d'Afrique : le Maroc, la Tunisie, l'Égypte, l'Algérie et la Côte d'Ivoire (Lawrence, 2009).

Ces produits huileux, connus également sous le nom d'huiles volatiles, se trouvent dans de nombreuses parties de la plante : le bois, les feuilles, les fruits, les écorces, les graines et les racines. Elles sont des mélanges complexes des composés de faible poids moléculaire (celui-ci est généralement inférieurs à 500 daltons) et sont extraites principalement par distillation à la vapeur, hydrodistillation ou extraction par solvant (Nakatsu et al., 2000). Elles sont constituées de 20-100 différents métabolites secondaires appartenant à diverses classes de chimie, principalement les terpénoïdes, les propylènes phénylés et les composés aromatiques (El Haib, 2011). Les hydrocarbures de monoterpène et sesquiterpène et leurs dérivés oxygénés sont les deux plus grandes familles chimiques dans les HEs (Nakatsu et al., 2000, Tegen et al., 2019).

### **I-1-2 Définition**

Plusieurs définitions ont été attribuées au terme d'huile essentielle, la plupart d'elles qui viennent de la Pharmacopée française (édition 1965 et édition 1979) ou de l'AFNOR (Association Française de la Normalisation) semblent restrictives car elles excluent de nombreuses techniques d'extraction utilisées dans les différents secteurs de l'industrie et de la pharmacie (Couderc, 2001).

Une définition, qui semble la plus large, a été proposée :

Nom générique pour tous les produits lipophiles, volatils, préexistant dans une plante ou une drogue végétale. Une huile essentielle est constituée de nombreuses substances chimiques peu solubles dans l'eau. Dans la plante, celles-ci résultent pour la plupart du métabolisme des terpènes et de composés en  $C_6 - C_3$  et sont localisées dans des organes où elles sont biosynthétisées (papilles, cellules et poils, poches, canaux). Les huiles essentielles sont obtenues par hydrodistillation (ou entraînement à la vapeur d'eau) ou encore dans des cas particuliers, par pression mécanique (ex : agrumes) par dissolution dans des lipides (enfleurage pour des organes délicats telle que la fleur de Jasmin) et plus fréquemment maintenant dans des gaz supercritiques (ex : dioxyde de carbone). L'extraction par dissolution dans des solvants fournit une fraction chargée de divers constituants liposolubles (cires, hydrocarbures..); après élimination du solvant ou du dioxyde de carbone, on obtient une « concrète » que l'on prive des constituants indésirables par refroidissement, suivi de décantation et de filtration (Duval, 2012).

Les HEs sont très odorantes, plus ou moins solubles dans l'alcool et dans l'éther et inflammables qui s'altèrent facilement à l'air (Ghazouani et al., 2009). Ces substances sont généralement incolores ou légèrement teintées, sauf quelques-unes comme les huiles de cannelle (rougeâtre), de camomille (bleue) et de l'absinthe (verte) (Fulzele and Satdive, 2005), elles possèdent une densité souvent inférieure à celle de l'eau (0,85 à 0,95) à l'exception de trois huiles dites lourdes à savoir l'huile de cannelle, de girofle et de saffras.

Une huile essentielle peut subir des traitements ultérieurs appropriés, soient (*La Charte sociale européenne*, 2013) :

- Une déterpénation : quand l'huile essentielle est privée, partiellement ou totalement, des hydrocarbures monoterpéniques.
- Une désesquiterpénation : l'huile essentielle est privée des hydrocarbures sesquiterpéniques.
- Une rectification : une huile essentielle qui a subi une distillation fractionnée dans le but de supprimer certains constituants ou d'en modifier la teneur.
- Une élimination partielle ou complète d'un ou de plusieurs constituants.

### **I-1-3 Techniques d'extraction**

Les HEs sont des principes actifs aromatiques obtenus à partir des plantes, botaniquement définies, par le principe d'extraction solide-liquide. Cette extraction consiste

en un transfert ou échange de matière entre deux phases hétérogènes : l'une solide contenant la matière à extraire « solution riche » et l'autre liquide correspondant au « solvant d'extraction » (Poirot, 2007).

Le rendement d'extraction des HEs varie généralement de 0,1 à 3% du poids sec du matériel végétal, à l'exception du clou de girofle et de la noix de muscade qui présentent une teneur en huile essentielle de l'ordre de 8 à 19% (Chiasson et al., 2001; Lang and Wai, 2001; Zabarar et al., 2001). Plusieurs méthodes d'extraction peuvent être utilisées en fonction de la nature de la plante, on distingue deux types :

### **I-1-3-1 Techniques d'obtention sans changement significatif de la nature des essences**

#### **a- L'expression à froid**

Cette procédure d'extraction, également appelée « pression à froid », est assurément la plus simple mais aussi la plus limitée étant donné qu'elle est réservée à l'extraction des composés volatils dans les péricarpes des agrumes. Ce traitement consiste à briser mécaniquement les parois des sacs oléifères renfermant l'huile essentielle (HE) sans aucune source de chaleur. Le liquide libéré est recueilli par un courant d'eau et il présente une odeur très proche de la plante fraîche, d'où son appellation « essence » (Fulzele and Satdive, 2005).

#### **b- La distillation**

C'est la méthode la plus importante à l'échelle commerciale et la plus anciennement utilisée. Deux techniques en dérivent. Premièrement, l'hydrodistillation qui s'appuie sur la théorie des liquides mélangés mais non miscibles, ainsi, la matière végétale est immergée dans l'eau et le tout est ensuite porté à l'ébullition. Les molécules aromatiques, libérées suite à l'éclatement des cellules végétales, forment avec la vapeur un milieu azéotropique. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'eau par différence de densité.

Deuxièmement, l'entraînement à la vapeur d'eau, est fondé sur l'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques de façon à éviter les phénomènes des altérations ou de dégradation. Ce procédé qui consiste au passage de la vapeur d'eau par le végétal ne nuit pas à la qualité des essences obtenues. Une autre variante de l'entraînement à la vapeur mais sans eau dans le fond de l'alambic s'appelle l'hydrodiffusion (la percolation). Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale (sans inclure de l'eau). Le mélange

de vapeur (vapeurs d'eau et vapeurs d'huile) est ensuite condensé et recueilli (Huie, 2002; Jiang et al., 2016).

#### **c- Extraction aux solvants organiques**

Cette technique consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter pendant une durée déterminée. Après décantation et concentration, le solvant est ensuite éliminé par distillation partielle. L'extraction est utilisée pour l'obtention de « concrète », mélange des substances odorantes volatiles avec des cires et des acides gras à partir des organes de végétaux trop fragiles et qui ne supportent pas la chaleur (thermolabiles) (Ziemons, 2006).

#### **d- Extraction par micro-ondes sous vide**

Cette technique consiste à irradier par micro-ondes de la matière végétale placée dans un réacteur micro-ondes sans ajout de solvant. Le chauffage intrinsèque du végétal permet la libération des métabolites secondaires et la formation d'un mélange avec la vapeur d'eau propre de la plante. Les HEs sont recueillies suite à des étapes de condensation, refroidissement et décantation. L'avantage de ce procédé réside dans le fait de réduire considérablement les dépenses énergétiques et d'augmenter le rendement avec amélioration des qualités olfactives des HEs obtenues (Farhat et al., 2017).

#### **e- Extraction par CO<sub>2</sub> supercritique**

La méthode est basée sur la solubilité des constituants dans le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) à l'état supercritique. Ce fluide est acheminé vers l'extracteur ; là, il sera chargé des principes aromatiques de la plante préalablement broyée. A la sortie de l'extracteur le CO<sub>2</sub> est détendu, redevient gazeux et se sépare des actifs végétaux extraits. Ce procédé innovant, conçu pour le traitement des essences aromatiques thermosensibles, présente l'avantage majeur de la possibilité de recyclage et de la réutilisation de solvant (de Melo et al., 2017).

### **I-1-3-2 Les techniques d'obtention avec changement significatif de la nature des essences :**

La majorité de ces techniques est détaillée dans la partie I-3 dans le reste du chapitre I du manuscrit.

Selon l'Afnor, ce sont les méthodes d'extraction qui en résultent (AFNOR N., 1996):

- Huile essentielle détéropénée.
- Huile essentielle desesquitéropénée.
- Huile essentielle rectifiée.

- Huile essentielle concentrée (traitée par une technique physique qui augmente la concentration d'un ou plusieurs composés particuliers).
- Huile essentielle privée d'un composé en particulier.

#### **I-1-4 Domaine d'utilisation**

D'abord utilisées à l'état brut, puis infusées, digérées, sous forme d'onguent, de parfum, d'extraits alcooliques, les essences végétales ont toujours eu une place prépondérante dans la culture de nombreux peuples à travers les âges, que ce soit sur le plan médical ou industriel. Leur utilisation s'accroît considérablement en cosmétologie et en parfumerie en raison de leurs propriétés odoriférantes pour parfumer les shampoings, les savons, les dentifrices et tout produit cosmétique. Ces essences sont également employées en agro-alimentaire comme des ingrédients pour aromatiser les aliments ou pour les conserver en évitant les moisissures (Huie, 2002). Appliquées dans l'aromathérapie, elles présentent diverses activités pharmaceutiques et biologiques, telles que les propriétés antibactériennes, antifongiques, anticancéreuses, antimutagènes, antidiabétiques, antivirales, anti-inflammatoires, antioxydantes, antiseptiques et antiprotozoaires (Bhat et al., 2011; Raut and Karuppayil, 2014).

Les huiles essentielles riches en principes actifs sont commercialisées dans les pharmacies dans le monde entier. Leur délivrance doit être contrôlée car trop d'accidents sont apparus lors d'utilisations inconsidérées (Mangambu et al., 2014).

#### **1-1-5 Contexte réglementaire**

Une huile essentielle est très efficace si elle est utilisée dans les limites strictes. Sa teneur ne doit pas dépasser 3 à 4% lorsqu'elle est intégrée aux huiles de massage, alors qu'elle varie entre 3% à 10% dans la plupart des produits cosmétiques, ce qui apparaît suffisant pour un effet thérapeutique (Lis-Balchin, 1999; Sailer et al., 1998). Malheureusement, hors médicament, le commerce des HEs est libre et il n'existe pas encore des études complètes et rigoureuses, de type « partie toxicologique » d'un dossier d'une autorisation de mise sur le marché (Wichtl and Anton, 1999).

#### **I-1-6 Méthodes de caractérisation**

L'identification qualitative et quantitative des différents composés d'une HE demeure une étape délicate nécessitant la mise en oeuvre de diverses techniques.

La chromatographie en phase gazeuse reste la technique incontournable pour la caractérisation des HEs. C'est une méthode d'analyse par séparation des constituants gazeux

ou susceptibles d'être volatilisés par élévation de température sans décomposition. Le couplage de la GC à un Détecteur à Ionisation de Flamme (FID ou DIF) permet la quantification des composés et le calcul de leurs indices de rétention à partir d'une série d'alcane de référence (Cai et al., 2006; Rodriguez-Solana et al., 2014).

Une méthode analytique singulière donne peu d'informations. D'où la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) s'est révélée être un outil puissant et approprié pour la détermination des composés volatils en raison de son efficacité de séparation élevée et de sa détection sensible (Li et al., 2013). Cependant, les huiles essentielles sont des systèmes complexes avec des compositions variables et les pics se chevauchent souvent ou sont imbriqués, même lorsque les conditions chromatographiques / spectrales sont optimisées (Li et al., 2013; Zhang and Li, 2010).

Récemment, la spectroscopie infrarouge fournit une méthode utile pour l'élucidation des structures des composés des plantes ainsi que pour l'analyse quantitative des huiles essentielles. En fait, la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) est une technique analytique physico-chimique très utilisée pour identifier la structure d'une composition inconnue ou de son groupe chimique et pour déterminer l'intensité des spectres d'absorption associés à la composition moléculaire (Imad et al., 2015).

De nos jours, les spectres de GC-MS et FTIR ont été combinés pour identifier les différents composants de l'huile volatile de matières aromatiques provenant de différentes espèces et différents habitats. Ces techniques permettent aux chercheurs d'identifier et d'évaluer de manière complète et précise la composition et la qualité des herbes aromatiques (Li et al., 2013).

### **I-1-7 Composition chimique des huiles essentielles**

La composition chimique des huiles essentielles dépend largement de l'influence des conditions avant, pendant et/ou après l'extraction de l'essence, notamment : le stress climatique pendant la croissance ou la maturité, la nutrition, la période de récolte, le séchage, le stockage post-récolte et le procédé d'obtention. En outre, elle dépend de l'organe végétal, l'écotype ou la variété chimiques ou "chénotypes" (Baranauskaitė et al., 2016; Rodriguez-Solana et al., 2014).

D'après Abad et al., (2012), les HEs sont des mélanges naturels très complexes qui peuvent contenir environ 20 à 60 composants à des concentrations très différentes. Elles sont caractérisées par 2-3 composants majeurs à des concentrations assez élevées (20-70%),

comparés aux autres présents en faibles quantités. Généralement, ce mélange comporte deux groupes d'origines biosynthétiques différents: le groupe principal est composé de terpènes (C<sub>5</sub>)<sub>n</sub> et l'autre contient des constituants aromatiques et aliphatiques dérivés du phénylpropane (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), tous ces composés sont caractérisés par leur faible poids moléculaires.

## **I-2 Les terpènes**

### **I-2-1 Terme et signification**

Les termes terpénoïdes, terpènes et isoprénoïdes sont souvent utilisés de façon interchangeable et proviennent de térébenthine (*lat. balsamum terebinthinae*). La térébenthine est le baume visqueux et agréablement odorant qui coule lorsqu'on coupe l'écorce et le bois neuf de plusieurs espèces de pins (*Pinaceae*) (Breitmaier, 2006).

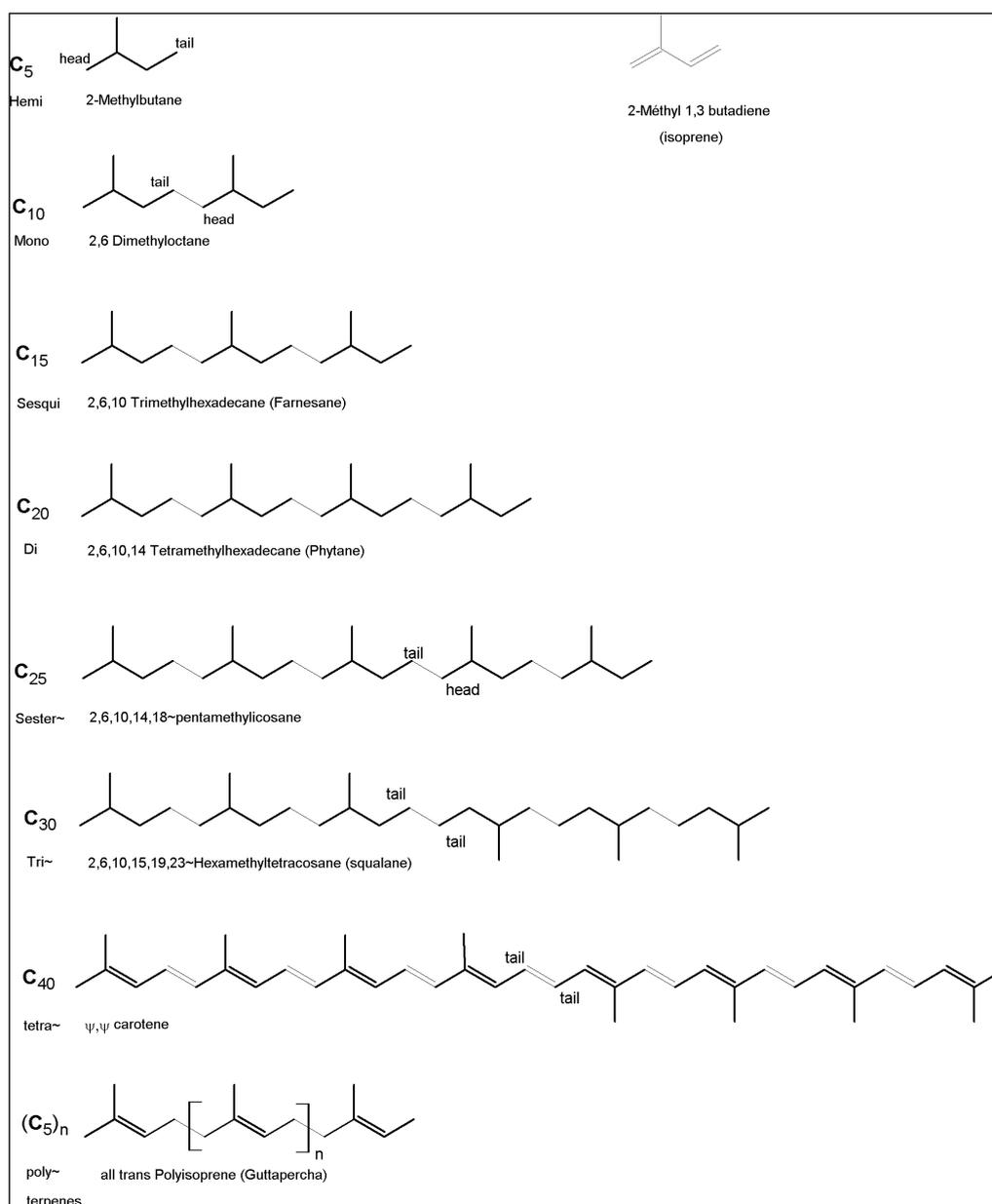
Dans la nature, les terpènes se présentent sous forme d'hydrocarbures, d'alcools, d'éthers, d'aldéhydes, de cétones, d'acides carboxyliques et d'esters (Qiu et al., 2017a). Toutefois, l'utilisation du terme « terpène hydrocarboné » désigne au sens strict des hydrocarbures insaturés dérivant de l'isoprène (suffixe : ène) tandis que, le terme « terpène oxygéné » est utilisé pour indiquer qu'une substance possède le squelette carboné des terpènes, mais non pas nécessairement leur degré d'insaturation, tout en ayant éventuellement un, ou plusieurs, groupes fonctionnels contenant de l'oxygène (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone etc). Dans la suite de la thèse nous nous référerons à la première famille de ces composés par le terme « terpènes hydrocarbonés » et la deuxième famille par « terpènes oxygénés ».

Parmi les terpènes, les monoterpènes, les sesquiterpènes et leurs dérivés oxygénés constituent le plus grand groupe d'entités chimiques dans l'huile essentielle. La majorité de ces composés naturels ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais ils sont le résultat des réactions chimiques ultérieures, d'où le nom de métabolites secondaires. Alors que certaines exercent des fonctions métaboliques primaires essentielles pour la croissance et la reproduction chez de nombreux organismes.

Les terpénoïdes constituent la famille de produits naturels la plus diverse structurellement, stéréochimiquement et fonctionnellement avec plus de 55 000 molécules identifiées dans toutes les formes de vie (Maimone and Baran, 2007). Des centaines de nouvelles structures sont reportées chaque année (Peñuelas and Munné-Bosch, 2005; Sacchetti, 1997).

## I-2-2 Structure générale

Les structures des terpènes varient d'une simple chaîne linéaire des hydrocarbones jusqu'à des agencements complexes des cycles carbonés mais tous proviennent de l'unité isoprène (2-méthylbuta-1,3-diène :  $C_5$ ) (Connolly and Hill, 1991; Ruzicka, 1994). La combinaison séquentielle d'unités basiques à cinq atomes de carbone nous permet de reconnaître les catégories familiares de  $C_5$  (hémi-),  $C_{10}$  (mono-),  $C_{15}$  (sesqui-),  $C_{20}$  (di-),  $C_{25}$  (ses-),  $C_{30}$  (tri -),  $C_{40}$  (tétra-) et  $C_{5(n)}$  avec  $n > 8$  (poly-) terpènes comme illustré par la figure I-1.



**Figure I-1 :** Les hydrocarbures terpéniques (isoprénoïdes).

### **I-2-2-1 Hemiterpènes**

Parmi les composés naturels trouvés dans les plantes, environ 50 composés peuvent être considérés comme hémiterpènes. Seul l'isoprène possède toutes les caractéristiques biogénétiques des terpènes (Breitmaier, 2006).

### **I-2-2-2 Monoterpènes**

Environ 1500 hydrocarbures en  $C_{10}$  sont documentés. Ils sont les plus simples constituants des terpènes dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles (90%) (Oyen and Dung, 1999). Cette catégorie se divise en deux groupes principaux :

#### **a- Monoterpènes hydrocarbonés**

Le précurseur de cette catégorie de monoterpènes est le géranyl pyrophosphate. La plupart de ces composés sont le résultat d'une manière typique de tête-à-queue des unités d'isoprène et ils peuvent être acycliques, monocycliques et bicycliques.

Ces hydrocarbures comportent des composés en  $C_{10}H_{16}$  (myrcène,  $\alpha$ -pinène, d-limonène etc..) ou en  $C_{10}H_{18}$  (carane, thujane, le pinane etc..). Le camphane, le fenchane, l' $\alpha$ -pinène, le  $\beta$ -pinène, le camphre, et la famille de fenchone sont largement répandus dans cette catégorie (Qiu et al., 2017a).

#### **b- Monoterpènes oxygénés**

Quand une unité hydroxyle se rattache à un monoterpène, il en résulte un monoterpène oxygéné ou monoterpéol (Jouault, 2012). Ils peuvent être en  $C_{10}H_{18}$  comme l'eucalyptol, le linalool et les dérivés de terpinéol (4-terpinéol et  $\alpha$ -terpinol) ou en  $C_{10}H_{20}$  : les dérivés du méthane (menthol et menthone). Dans ce groupe, le géraniol est le plus répandu dans le règne végétal (Richard and Multon, 1992).

### **I-2-2-3 Sesquiterpènes**

Environ 10000 sesquiterpènes naturellement sont présents dans l'ardoise de l'huile essentielle (Breitmaier, 2006; Jiang et al., 2016). Cette classe de terpènes, dérivés de 2,6,10-Triméthyl dodécane ou farnésane, est divisée en :

#### **a- Sesquiterpènes hydrocarbonés (SH)**

Cette famille comporte les :

- SH acycliques principalement dérivés du trans-farnésyl pyrophosphate.
- SH monocycliques appartiennent principalement aux 4 familles de bisabolène, germacrène, elemène et humulène.

- SH polycycliques dont le caryophyllène est le plus important ( Richard and Multon, 1992).

#### **b- Sesquiterpènes oxygénés (SO)**

Un sesquiterpène oxygéné est formé d'un hydroxyle fixé à un SH, nommé également sesquiterpénol (Jouault, 2012). Exemple de SO : caryophellene oxide et -(+) spathulenol.

#### **I-2-2-4 Diterpènes**

Les diterpènes se sont formés par l'assemblage de quatre unités d'isoprènes, leur masse moléculaire importante limite leur présence dans les HEs obtenues par distillation à la vapeur d'eau (Jouault, 2012; Mangambu et al., 2014). Le phytane est le composé parent d'environ 5000 diterpènes hydrocarbonés acycliques et environ 2700 sous forme cyclique. Le diterpène oxygéné est le résultat de la fixation d'un groupement hydroxyle sur un diterpène hydrocarboné.

Parmi cette famille, on trouve le phytol qui est le représentant le plus connu en chlorophylle ou dans les vitamines K et E, le sclaréol et le rétinol (Briemann et al., 2006; Malecky, 2008).

#### **I-2-2-5 Sesterpenes**

Les sesterpènes sont composés de 25 atomes de carbone ( $C_{25}$ ), c'est l'assemblage de 5 unités d'isoprène, exemple : 2,6,10,15,19-pentamethylcosane. L'acide mévalonique est le précurseur de cette classe. Les sesterterpènes sont rares dans la nature, ils sont présentés sous forme linéaire ou bien cyclique, avec un, deux, trois ou quatre cycles et ils peuvent être isolés à partir des plantes, de champignons ou des insectes (Breitmaier, 2006; Qiu et al., 2017a).

#### **I-2-2-6 Autres terpènes**

##### **a- Triterpènes**

Environ 5000 triterpènes naturellement abondants sont documentés dans la littérature et dont la plupart sont dérivés du squalène acyclique. La majorité de ces composés sont des tétracycles ou des pentacycles, la forme acyclique est très rare. La plupart des triterpènes qui portent une unité hydroxyle sont des alcools sous forme libre, des glycosides (saponines) ou des esters (Malecky, 2008).

##### **b- Tetraterpènes**

Les tetraterpènes dénommés caroténoïdes, sont des pigments jaunes très répandus chez les animaux et les végétaux. Ils possèdent des propriétés particulières et des variantes

structurales qui dérivent de dégradation de "bêta-carotène" (Breitmaier, 2006; Messai, 2011).

### **c- Polyterpènes**

Ce sont des macromolécules contenant plus de huit unités d'isoprène. Ces composés sont souvent trouvés sous deux formes isomères cis et trans dont (Messai, 2011) :

- Le cis polyisoprène est le constituant principal de caoutchouc naturel.
- Le trans-polyisoprène est celui de gutta-percha.

#### **I-2-3 Fonctions et utilisations**

A partir des informations fragmentaires disponibles, nous allons décrire brièvement les fonctions des terpènes et leur utilisation dans les différents secteurs de la vie de l'homme.

##### **I-2-3-1 Fonctions métabolites primaires**

Certains terpènes jouent un rôle important dans le processus de base chez presque toutes les espèces végétales, y compris la croissance, le développement et le métabolisme général (Davis and Croteau, 2000). Leurs rôles se distribuent, entre autres, au niveau des pigments photosynthétiques (ex : le phytol forme la chaîne latérale de la chlorophylle et les caroténoïdes participent à la fixation de la lumière), de plusieurs phytohormones (ex : l'acide abscissique, les brassinostéroïdes, les cytokinines et les gibbérellines), des composants structuraux membranaires (ex : les phytostérols qui maintiennent l'intégrité des membranes comme le campesterol, sitostérol et stigmastérol) et des dolichols qui facilitent l'assemblage glycoprotéine-polysaccharide (Breitmaier, 2006; Davis and Croteau, 2000).

##### **I-2-3-2 Fonctions métabolites secondaires**

La majorité des terpènes présentés principalement par des hémiterpènes, monoterpènes, sesquiterpènes et diterpènes sont présumés avoir des fonctions écologiques critiques d'une large gamme d'organismes. Ces métabolites secondaires sont présumés avoir un rôle clé en servant de moyens de communication entre les espèces vivantes (interactions) dans le contexte de la reproduction, la défense ou la symbiose (Dudareva et al., 2006; Gershenzon and Dudareva, 2007; Langenheim, 1994). Ils peuvent servir à attirer des insectes spécifiques pour la pollinisation ou encore comme une défense contre les herbivores, les pathogènes et les stress abiotiques (Huang et al., 2010; Sharkey et al., 2007). Ils sont de bons vecteurs d'informations à longue distance pour assurer les interactions multitrophiques de type plantes-plantes (Ens et al., 2009; O'Reilly-Wapstra et al., 2011), plantes-microbes/champignons (Bednarek and Osbourn, 2009; O'Reilly-Wapstra et al., 2011) et

pucerons-ennemis naturels (Qiu et al., 2017b; Vandermoten et al., 2012). Les principaux précurseurs biogéniques cités dans les littératures sont: myrcène, ocimène, linalol, terpinène-4-ol,  $\beta$ -caryophyllène,  $\alpha$ -pinène, limonène, etc (Pye and Pouliot, 2012) .Ces terpènes jouent également un rôle important en tant que communications chimiques des algues dans les écosystèmes marins (Girola et al., 2015; Pye and Pouliot, 2012).

D'autre part, ces composés organiques volatils peuvent traverser la membrane cellulaire de certaines plantes et être libérés dans l'atmosphère, jouant ainsi un rôle majeur dans les processus troposphériques en influençant la qualité de l'air et le forçage climatique (la production d'ozone et la formation d'aérosols organiques secondaires) (Jones et al., 2014) .

Ces divers effets précédemment cités ont le potentiel d'affecter la biodiversité et l'évolution des écosystèmes atmosphérique, marines et terrestres.

### **I-2-3-3 Utilisations**

Les terpènes, des ressources renouvelables qui existent en quantités relativement importantes, sont issus principalement de l'extraction d'huile essentielle d'une telle plante aromatique. Au cours des dernières décennies, les consommateurs ont développé un intérêt croissant pour ces distillats à la vapeur, car la plupart d'eux ont été identifiés comme des produits naturels de grande valeur ajoutée dans les industries alimentaires, cosmétiques, biotechnologiques et pharmaceutiques (Bakkali et al., 2008a; Breitmaier, 2006; Cruz-Vega et al., 2009; Wilks, 2019).

La nature volatile, lipophile, odorante, voir agréable de ces composés organiques naturels de faible poids moléculaire sont exploités comme matière première dans les parfums floraux et les produits cosmétiques, ainsi que pour l'amélioration du plaisir des aliments. Par exemple, les terpènes alcooliques acycliques dont les plus importants sont: géraniol, linalol et citronellol (Qiu et al., 2017a) et utilisés comme substances odorantes et aromatiques. Le limonène est considéré comme le contribuant principal à tous les arômes issus des cultivars des agrumes (Brielmann et al., 2006).

En biotechnologie, certains monoterpènes sont utiles comme des porogènes dans les procédés de dépôt des films diélectriques formés d'oxyde de silicium poreux, tel que le méthyl-diéthoxysilane qui est utilisé pour fabriquer des circuits intégrés et des dispositifs électroniques. Les deux autres porogènes les plus communément utilisés sont l' $\alpha$ -terpinène et le d-limonène (Bowen, 2010).

D'autre part, le revêtement terpénique de surface des polymères organiques a diminué les tendances d'adhérence et de prolifération d'une large gamme de bactéries. Prenons le cas de terpinène-4-ol qui réduit considérablement la quantité d'attachement, la production de substance polymérique extracellulaire et la prolifération cellulaire de *Staphylococcus aureus* sur la surface de biofilm revêtue par rapport à la surface non modifiée (Bazaka et al., 2011). En plus de ses propriétés antibactériennes, ce monoterpène oxygéné est un ingrédient actif d'huile essentielle de marjolaine qui a montré une corrélation directe avec les performances antifongiques de cette huile contre l'*Aspergillus niger* (Ben Salha et al., 2017). Il est également mentionné dans la littérature que certains monoterpènes oxygénés tels que le citronellal, le citronellol, le nérol, le géraniol, le bornéol et le genranial, et plusieurs composés phénoliques, tels que le thymol, l'eugénol, le carvacrol, etc., apportent une contribution significative à l'activité antifongique (Morcia et al., 2012).

A part leurs propriétés antibactérienne et antifongique, les monoterpènes, les sesquiterpènes et les phénylpropanoïdes possèdent des activités antivirales remarquables (Astani et al., 2011; Raut and Karuppayil, 2014). Tel est le cas de l'isoborneol et de l'eugénol extraits d'huile de girofle qui inhibent la glycosylation des protéines virales de virus Herpes simplex type 1 (Raut and Karuppayil, 2014). En outre, ces familles des terpènes ont été marquées dans plusieurs recherches et applications scientifiques par leurs propriétés antimicrobiennes, antiparasitaires, antioxydantes, antiallergiques, antispasmodiques, antihyperglycémiques, antiinflammatoires, antinéoplastiques et immunomodulatrices (Said et al., 2015 ; O'Reilly-Wapstra et al., 2011 ; Bakkali et al., 2008 ; Bazaka et al., 2011).

Les potentiels biologiques et thérapeutiques divers des terpènes ont attiré l'attention des chercheurs pour tester leur activité anticancéreuse, profitant du fait que leur mécanisme d'action est dissemblable de celui des agents chimiothérapeutiques cytotoxiques classiques (Edris, 2007; Rajesh and Howard, 2003). Certaines recherches ont montré l'activité antitumorale in vivo de quelques terpènes tels que le camphène isolé de *Piper cernuum* (Piperaceae) et le perillyl alcool (Edris, 2007; Girola et al., 2015; Rajesh and Howard, 2003).

Malgré l'importance des composés terpéniques individuels ou en mélange dans la médecine et les industries de commerce, voir leur grand intérêt à l'échelle économique mondiale, on connaît encore relativement peu le rôle réel de la plupart des terpènes dans la nature (Gershenzon and Dudareva, 2007). Par conséquent, il est nécessaire de mener plus de recherche sur les composés actifs des terpènes extraits des plantes par plusieurs processus d'extraction ou de séparation.

## I-3 Les méthodes de séparation

### I-3-1 Les techniques chromatographiques

L'utilisation de la technique chromatographique (TC) sur couche mince connue sous le nom de « chromatoplaque » a trouvé ses origines dans les années 1930 (Barker et al., 2016). Le principe de cette méthode de séparation est basé sur les différences d'affinité des composés du mélange avec la phase stationnaire et la phase mobile. Le chromatogramme traduit la variation du soluté dans l'éluant en fonction du temps (Kirchner and Miller, 1952).

L'analyse des dérivés terpéniques par la TC, utilisant des bandes de verre recouvertes d'une fine couche d'adsorbant, a commencé au début des années 1950 (Kirchner et al., 1951). Plus tard, le principe d'adsorption a été appliqué à la production d'huiles pliées (huiles privées des terpènes hydrocarbonés).

Une huile essentielle sans terpène hydrocarboné est obtenue par la TC consistant à :

- Adsorber les composants volatils sur de l'alumine neutre préalablement traitée à l'acétate d'éthyle.
- Assurer la séparation essentiellement complète des terpènes des constituants oxygénés souhaités par élution successive de l'alumine avec (i) un solvant terpénophile (par exemple l'hexane, le dichlorométhane ou le pentane) pour éliminer les terpènes, et (ii) un solvant oxygéné (par exemple l'éthanol, le méthanol) ou un mélange de solvants (hexane éthyle acétate) pour éliminer les constituants oxygénés qui composent l'huile essentielle sans terpène (Girola et al., 2015; Gressler et al., 2011).

L'élimination de l'éluant permet de donner une fraction de l'HE déterpénée privée des terpènes hydrocarbonés indésirables et riche en terpènes oxygénés qui possèdent des propriétés largement demandés à l'échelle commerciale (Rockland and Debenedict, 1975). L'application de TC pour l'huile essentielle de l'algue rouge *Laurencia dendroidea* récoltée sur la côte brésilienne permet d'isoler deux dérivés purs de sesquiterpènes « undecan-2-ol » qui possèdent des activités antioxydantes très intéressantes (Gressler et al., 2011).

D'autre part, l'application d'une pression supérieure à la pression atmosphérique d'une source de gaz sans l'utilisation d'un solvant permet de récupérer des monoterpènes hydrocarbonés de pureté élevée. Prenons l'exemple de :  $\alpha$ -pinène, camphène, limonène, myrcène et p-cymène extraits d'huile essentielle brute de *Piper cernuum* avec une pureté supérieure à 98% (Girola et al., 2015). Plus loin, Ce procédé de purification est appliqué aux

copeaux de bois pour obtenir l' $\alpha$ -terpinène (90-95%) qui est ensuite utilisé comme porogène de haute qualité sur le marché (Bowen, 2010).

Ces techniques de TC précédemment citées pourraient être appliquées à la préparation commerciale des huiles essentielles des agrumes déterpénées ou plus généralement à la séparation des hydrocarbures et des constituants oxygénés de plusieurs HEs (Girola et al., 2015; Bowen, 2010).

De nombreux facteurs d'importance critique influencent la répétabilité et la reproductibilité de la TC qui sont : la qualité des solvants d'élution, la direction de revêtement de silice sur la plaque, le contrôle des conditions environnementales (humidité relative), la surcharge d'échantillons sur les plaques et la réutilisation des systèmes de solvants pour des analyses multiples (Barker et al., 2016; D'Souza et al., 2017). Le problème le plus important est que la séparation n'est pas suffisamment nette; certains composants aromatisants importants sont élués avec les composants terpéniques hydrocarbonés, ce qui fait que le produit final est déficient en ces composants aromatiques (Bowen, 2010).

### **I-3-2 Extraction par solvant**

L'extraction par solvant repose sur la différence de solubilité du soluté entre deux phases non miscibles. L'extraction liquide-liquide (ELL) comprend deux étapes distinctes (Arce et al., 2002; Seifi et al., 2013) :

- D'abord, passer le soluté dans un solvant (S1) dont il est difficile d'être séparé.
- Puis, ajouter un autre solvant (S2), à partir duquel il sera facilement isolé.
- Ensuite, extraire le soluté de S2 et régénérer ce dernier pour lui permettre d'effectuer un nouveau cycle d'extraction.

A la fin du XIXe siècle, l'ELL ou l'extraction par solvant (ES) a été appliquée aux industries pétrochimiques et pétrolières pour extraire les molécules d'intérêt (Abe et al., 2010; Seifi et al., 2013). Aujourd'hui, l'ELL est développée massivement dans les domaines de la pharmacologie et la toxicologie pour la purification, la séparation d'échantillons biologiques et la concentration des mélanges de terpènes (Abe et al., 2010).

Pour effectuer l'extraction par solvant, de nombreuses propriétés physico-chimiques de solvant et de soluté doivent être prises en compte. La sélection des solvants dépend de leur miscibilité dans l'eau, la proticité, la constante diélectrique, le moment dipolaire, la densité, la volatilité, la toxicité, le rapport de distribution du soluté, la sélectivité et la comparaison avec d'autres solvants de la littérature (Arce et al., 2006). De la même manière, la structure, la

constante d'acidité et la lipophilicité de soluté, ainsi que la nature et la complexité de la matrice, permettront d'optimiser le processus d'extraction (Abe et al., 2010).

Des solvants organiques tels que: le 2-butène-1,4-diol, l'éthylène glycol (Arce et al., 2006, 2002) ou un mélange d'éthanol et d'eau (Arce et al., 2008; Gonçalves et al., 2015) ont été largement utilisés. Au cours des dernières années, les liquides ioniques ont suscité un grand intérêt en tant que substitués potentiels des solvants organiques classiques dans de nombreuses applications, notamment comme milieux de réaction et agents de séparation (Arce et al., 2007, 2006; Bogdanov and Svinjarov, 2018). Ce sont des électrolytes à basse température de fusion; ils ont des propriétés physiques et chimiques intéressantes qui leur accordent une attention croissante dans la recherche et l'industrie (Bogdanov and Svinjarov, 2018). Dans une étude fondamentale, Arce (2007) et ses collègues ont rapporté une démonstration réussie de l'avantage unique de l'utilisation des liquides ioniques (le méthanesulfonate de 1-éthyl-3-méthylimidazolium et le sulfate d'éthyl 1-éthyl-3-méthylimidazolium) pour obtenir la plus haute pureté attribuée aux huiles essentielles sans hydrocarbures de terpène. Néanmoins, la procédure décrite ci-dessus pose toujours le problème des solvants organiques (substances volatiles) qui entraînent des coûts d'exploitation importants en raison des pertes par évaporation (Gonçalves et al., 2015).

Une approche nouvelle et efficace connue sous le nom de l'inclusion complexe joue un rôle important dans l'effort global visant à fournir des produits garantis à base d'huiles essentielles de haute qualité aux consommateurs du monde entier (Bertolasi et al., 2006; Huie, 2002). Cette technique comporte deux composants : hôte et invité. L'attraction entre ces derniers est basée sur des interactions intermoléculaires non covalentes, telles que les liaisons hydrogène et les forces de van der Waals. L'hôte forme une cavité, dans le cas d'un cristal contenant des espaces sous forme de longs tunnels ou de canaux dans lesquels se trouvent des entités moléculaires de l'invité, et il peut être séparé d'un mélange de solutions par simple filtration du composé d'inclusion solide. L'invité peut alors être récupéré dans des conditions douces et le matériau hôte est recyclé (Fantin et al., 2010).

L'acide ursodésoxycholique (AUC) et ses dérivés, tels que l'acide désoxycholique (ADC: acide  $3\alpha$ ,  $12\alpha$ -dihydroxy- $5\beta$ -cholanique), l'acide cholique ( $3\alpha$ ,  $7\alpha$ ,  $12\alpha$ -trihydroxy- $5\beta$ -cholanique), ont une capacité spécifique d'inclusion des molécules invitées telles que les hydrocarbures aromatiques et aliphatiques, des cétones, des esters, des alcools, des amides, des époxydes et des pigments naturels (Fantin et al., 2010; Seifi et al., 2013). Le processus d'inclusion a été récemment développé pour éliminer les monoterpènes de l'huile essentielle

de bergamote par inclusion sélective dans l'ADC (Fantin et al., 2010) et pour extraire le lycopène (tétraterpène) de la pâte de tomate par l'AUC (Seifi et al., 2013). Malgré les caractéristiques importantes de cette méthode: la simplicité, le faible coût, la chimie verte, les conditions modérées et le recyclage de l'hôte sans perte de substance, il finit dans la plupart des cas par une contamination qui rend les fractions obtenues inutilisables (Bertolasi et al., 2006; Perini et al., 2017).

### **I-3-3 Séparation membranaire**

Comme décrit précédemment, l'extraction conventionnelle liquide-liquide a été étudiée pour récupérer les composés oxygénés des matrices d'huile. Cependant, les fractions obtenues semblent impropres à cause de la contamination qu'elles subissent. Les contacteurs à membrane représentent donc une alternative intéressante pour l'extraction sélective des terpènes oxygénés (TO) des huiles essentielles (Dupuy et al., 2011a).

Dans l'extraction liquide-liquide avec contacteurs à membrane, l'interface entre les phases est stabilisée dans une membrane poreuse (Dupuy et al., 2011b). Les pores sont remplis par l'un ou l'autre des deux fluides non miscibles, en fonction de la nature hydrophile ou hydrophobe de la membrane. Le matériau poreux n'influence généralement pas la sélectivité du transfert de masse. Il ne fait que mettre les phases sans aucune dispersion au contact. Outre l'intensification du processus due à la prévention des émulsions, l'utilisation de contacteurs à membrane offre un large choix de solvants car la différence de densité entre les phases (nécessaire pour l'étape de décantation) n'a plus d'importance (Dupuy et al., 2011a).

Dupuy et al. (2011a) ont étudié le potentiel d'un contacteur à membrane en polypropylène à fibres creuses (module Liqui-Cel® 2.5 × 8 avec fibres X30) pour l'extraction sélective des TO des huiles essentielles de citron. Ils ont évalué la stabilisation de l'interface entre les liquides et ont constaté que les meilleurs résultats pour le transfert de masse de citral ( $1,08 \times 10^{-6}$  m/s) étaient obtenus pour un solvant contenant 66% v/v d'éthanol. Cependant, les membranes polymères ne sont pas efficaces pour la séparation d'émulsions du type huile dans eau en raison de leur tendance à s'encrasser facilement. Une étude a démontré que les composants des huiles essentielles pouvaient être concentrés avec le maintien d'un niveau de flux acceptable en utilisant une membrane en céramique (Dubreuil et al., 2017).

La séparation membranaire offre un potentiel considérable pour réduire la consommation d'énergie, simplifier la purification du produit et récupérer des coproduits précieux à partir des liquides complexes (Dubreuil et al., 2017). Cependant, les principaux

inconvénients de cette technologie comprennent une plage de pression limitée pour assurer une interface stable entre les fluides, une résistance supplémentaire au transfert de masse et la durée de vie de la membrane (Pabby et al., 2008). Du point de vue de l'application industrielle, les limitations les plus graves du fonctionnement de la technique membranaire sont la diminution continue du flux de perméation causée par plusieurs facteurs telles que la polarisation de concentration, la formation de la couche de gel et l'adsorption des molécules (Kim et al., 1998).

#### **I-3-4 Fractionnement par CO<sub>2</sub> supercritique**

A l'échelle industrielle, l'extraction par fluide supercritique (EFS) est utilisée depuis de nombreuses années pour extraire des composés volatils, par exemple les huiles essentielles et les arômes à partir de matières végétales (Huie, 2002). Cette technique offre des caractéristiques attrayantes qui surmontent un bon nombre des limites des extractions classiques grâce à l'utilisation d'un fluide supercritique (FS) doté de propriétés physicochimiques différentes (densité, diffusivité, viscosité, constante diélectrique etc) (da Silva et al., 2016).

Le principe est basé sur les propriétés de solvation de FS obtenue à une pression et une température supérieure au point critique d'un solvant, d'un mélange ou d'un élément. Également, cette méthode d'extraction dépend de certaines caractéristiques extrinsèques telles que les caractéristiques de la matrice de l'échantillon et l'interaction avec les composés cibles (Sharif et al., 2014). En contrôlant correctement les paramètres de l'EFS, avant chaque analyse, le rendement d'extraction de fluide supercritique peut être modifié. Cela signifie que le nombre des propriétés réglables est plus élevé en EFS que les méthodes conventionnelles (Lagadec et al., 2000; Kubatova et al., 2001; Sharif et al., 2014).

L'EFS est considérée comme un processus écologique car il n'utilise pas de solvants chimiques à impact environnemental dangereux (Sharif et al., 2014). Le dioxyde de carbone est le solvant le plus couramment utilisé pour trois raisons principales (da Silva et al., 2016; Sánchez-Vicente et al., 2013):

- Premièrement, il est non toxique pour la santé humaine et pour l'environnement étant donné qu'il respecte les critères de durabilité qui régissent de plus en plus l'adéquation des procédés chimiques.
- Deuxièmement, sa température critique modérée (31,2°C) est un facteur clé pour la conservation des composés bioactifs dans les extraits.

- Enfin, le CO<sub>2</sub> est facilement séparé de l'huile en réduisant la pression il reprend son état gazeux et peut ensuite être recyclé.

La technique de déterpénation par dioxyde de carbone supercritique (CO<sub>2</sub>S) augmente la qualité, la stabilité et la valeur commerciale de diverses huiles essentielles telles que *Tagetes minuta*, *Salvia officinalis* et *Mentha piperita* (Gañán and Brignole, 2013), mandarines et zestes de citrus (Danielski et al., 2008; Diaz et al., 2005) et origanum (Köse et al., 2000). En outre, le CO<sub>2</sub>S est un bon solvant de fractionnement des huiles essentielles afin d'obtenir des concentrés ou des composés d'intérêt (Gañán and Brignole, 2011; Sánchez-Vicente et al., 2013).

L'eau, en tant que fluide polaire, solvate naturellement plus les composés polaires que les composés non polaires. La sélectivité de l'extraction subcritique de l'eau (une préférence pour les matières organiques plus polaires dans des conditions plus douces) est opposée à celle du CO<sub>2</sub>S (une préférence pour les matières organiques non polaires qui précède les matières organiques polaires). Ainsi, des chercheurs ont démontré la capacité de l'eau supercritique à extraire sélectivement différentes classes de composés ; les composés organiques les plus polaires étant extraits à des températures plus basses et les composés organiques moins polaires étant extraits à des températures plus élevées. Par exemple, les phénols, les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les alcanes ont été extraits séquentiellement d'une boue de déchets pétroliers par des augmentations progressives des températures de l'eau subcritique. Une telle sélectivité serait attendue en se basant sur la solubilité des composés aromatiques dans l'eau subcritique. Citons l'exemple de carvone et d'eugénol qui ont une solubilité, à 100°C et à une pression environ 65 bar, deux fois plus grande que le d-limonène (Kubatova et al., 2001).

Ces tendances de solubilité correspondant à des études montrent des taux de récupération élevés des composants aromatisés et des parfums oxygénés (Ozel et al., 2003). En outre, le degré de liberté élevé obtenu lors de l'extraction par FS rend ce procédé unique, sensible et spécifique par rapport aux méthodes d'extraction conventionnelles.

Néanmoins, une efficacité d'extraction élevée des composés aromatisants dans certaines matrices d'huiles essentielles exige l'ajout d'un modificateur organique au CO<sub>2</sub> pur appelé co-solvant (Kubatova et al., 2001). Prenons l'exemple de l'étude de l'EFS de De Melo et al. (2017), l'ajout d'éthanol (2,5% en poids) s'avère important pour augmenter l'absorption de friedelin (un triterpénoïde bioactif) provenant du liège en chêne de Turquie (*Quercus cerris*). D'autre part, la pression de fonctionnement élevée et les débits importants de l'EFS

requièrent un équipement robuste, une construction coûteuse et une sécurité spéciale des systèmes d'exploitation (Gañán and Brignole, 2011; Perini et al., 2017).

### **I-3-5 Les techniques de distillation**

Contrairement à la séparation par extraction chimique, la distillation est un processus de séparation physique basée sur la volatilité relative des composés chimiques à différentes températures.

De nombreuses techniques de distillation ont été utilisées pour améliorer les huiles essentielles utilisées dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique et alimentaire, ainsi que dans l'agriculture et la protection des cultures (Gañán and Brignole, 2013).

Les distillations à la vapeur sont principalement utilisées pour les composés chimiques sensibles à la chaleur (ex : huiles essentielles) qui peuvent être dégradés ou transformés par exposition à haute température telle que la distillation directe et la distillation fractionnée à pression atmosphérique (Nam et al., 2016).

Plusieurs travaux dans la littérature font état de l'application de vide au système de distillation fractionnée pour réduire la température d'ébullition de l'huile essentielle brute (HEB) dans la colonne afin de réduire l'effet de la dégradation thermique (Beneti et al., 2011; Perini et al., 2017). L'application de la pression réduite augmente également la volatilité relative des composés, permettant une séparation plus efficace (Perini et al., 2017). Dans une étude récente, une distillation fractionnée sous vide (DFV) a été réalisée pour obtenir une huile essentielle de mandarine verte à des températures allant de 80 à 90°C sous une pression de 10 kPa, la température étant supposée être de 180°C à la pression atmosphérique. Les résultats obtenus montrent clairement que la DFV est capable de séparer les terpènes hydrocarbonés, qui ont été retirés du sommet / des étages de la colonne, des terpènes avec d'autres fonctions chimiques qui sont restés dans le fond (Silvestre et al., 2016). De même, le fractionnement de l'huile de zeste d'orange brésilienne par DFV entraîne une réduction des hydrocarbures monoterpéniques, qui augmentent de manière significative l'arôme du produit concentré par rapport à l'HEB (Stüker et al., 2011). La plupart des études DFV sur les agrumes ont été menées au Brésil. Leurs productions dépassent des millions de tonnes par an grâce à leur grande valeur commerciale en tant que produit «nature» et/ou matière première pour l'industrie alimentaire (Perini et al., 2017; Silvestre et al., 2016).

Des chercheurs proposent l'utilisation de la technique de distillation moléculaire (TDM) fonctionnant sous vide poussé. Cette technique est caractérisée par une faible distance

entre l'évaporateur et le condenseur (20-50 mm) et par une courte exposition du liquide distillé aux températures de fonctionnement (Morgan, 1990; Xiong et al., 2013). La TDM a été appliquée pour séparer les phtalates de l'huile d'orange *Citrus sinensis* L. utilisés pour augmenter la flexibilité et l'extensibilité des produits en plastique (Xiong et al., 2013) et pour concentrer l'huile d'orange avec les oxyterpènes largement utilisés comme des arômes dans la production industrielle de jus (Martins et al., 2013). Dans une étude fondamentale, la distillation moléculaire de l'huile essentielle d'origan modélisée avec des réseaux de neurones artificiels donne des fractions enrichies de thymol présentant ainsi une augmentation des propriétés antioxydantes et de stabilité au stockage par rapport à l'HEB (Borgarello et al., 2015).

La DFV et la TDM sont deux méthodes utiles pour la séparation et la purification des matériaux thermosensibles, ainsi que pour les composés de poids moléculaire élevé et pour éliminer les problèmes d'altération associés aux autres techniques de séparation (Martins et al., 2013; Morgan, 1990). Le principal inconvénient est le risque «d'implosion» de l'équipement en cas de pression ambiante supérieure à celle du système (Morgan, 1990; Perini et al., 2017).

### **I-3-6 Comparaison entre les méthodes de séparation citées**

L'isolement des composés bioactifs purs à partir des plantes aromatiques et médicinales à une échelle préparative ou semi-préparative est souvent nécessaire pour des investigations pharmacologiques plus poussées. Cependant, l'isolement des terpènes en tant que composés naturels est normalement un processus complexe qui exige une gamme complète de techniques de séparation présentant souvent des défis multiples, notamment une adsorption irréversible, un rendement sous attendu, un coût élevé et une pureté faible (Marques et al., 2018).

Ainsi, la technique chromatographique, l'extraction par solvant, la séparation membranaire, le fractionnement par CO<sub>2</sub> supercritique et les techniques de distillation, en tant que procédés de séparation des terpènes des HEs extraites des PAM, ont été comparés en termes des avantages, inconvénients et applications.

Fréquemment, une chromatographie à base de gel de silice est utilisée pour isoler des terpènes ou des molécules d'intérêt à haute pureté (Girola et al., 2015; Gressler et al., 2011; Bowen, 2010). Cependant, cela prend beaucoup de temps et, dans la plupart des cas, les principaux composants des huiles essentielles ne peuvent pas être retenus sur le gel de silice

(Dudareva et al., 2006). Des autres complications découlent de l'utilisation d'une phase stationnaire de silice en phase liquide (systèmes d'opération compliqués), telles que l'adsorption irréversible de soluté, la contamination, l'exclusion de la taille, les silanols résiduels et les limitations de pH qui affectent négativement le rendement et la pureté (Barker et al., 2016; D'Souza et al., 2017; Bowen, 2010). Habituellement, cette méthode est utilisée pour fournir des espèces porogènes (Bowen, 2010) et certains produits commerciaux et thérapeutiques (Girola et al., 2015; Gressler et al., 2011).

De l'autre côté, dans l'approche de l'ES, les avantages fondamentaux sont la simplicité de mise en œuvre et la possibilité de recyclage de solvant (Bertolasi et al., 2006). Cependant, cette méthode n'utilise pas toujours des solvants bénins; cela contribue parfois à la pollution de l'environnement et nécessite souvent une étape d'exploitation coûteuse d'évaporation/ concentration pour la récupération et la décontamination de solvant (Dupuy et al., 2011a; Gonçalves et al., 2015; Perini et al., 2017; Zuin and Ramin, 2018). Malgré ces limites, il est largement utilisé dans les industries pour éliminer les impuretés, pour fournir des agents antioxydants et des fractions déterpénées de valeur commerciale élevée (Fantin et al., 2010; Seifi et al., 2013). Récemment, plusieurs modèles de l'ES ont été proposés pour prédire les meilleurs solvants à utiliser dans des cas spécifiques comme les solvants ioniques et l'utilisation de la technique de complexe d'inclusion (Bertolasi et al., 2006).

La phase de séparation consécutive des fluides n'est plus nécessaire, la réduction de la consommation d'énergie et l'augmentation de la sélectivité d'extraction sont les avantages de la séparation membranaire (SM). Ces derniers résultent du fait de la stabilité de la zone interfaciale entre les fluides au niveau de la membrane quels que soient les débits de fonctionnement (Dubreuil et al., 2017; Dupuy, 2010). Cependant, les principaux inconvénients de cette technologie incluent une plage de pression limitée pour assurer une interface stable entre les fluides, une résistance supplémentaire au transfert de masse et une durée de vie limitée de la membrane (Pabby et al., 2008). Les données d'application de la SM disponibles dans la littérature sont principalement l'extraction des composés aromatiques et des sous-produits (citral, linalol, etc.) pour concentrer les jus d'agrumes à l'échelle industrielle (Dubreuil et al., 2017; Dupuy et al., 2011b; Dupuy, 2010).

À l'instar des autres processus, l'extraction par fluide supercritique est parfois critiquée pour la sécurité particulière et coûteuse de ces systèmes d'exploitation (Gañán and Brignole, 2011; Ozel et al., 2003). Pourtant, la SFE, une technique verte, offre des avantages importants en termes de séparation, tels que les propriétés de transport de masse

exceptionnelles de fluide supercritique, le rendement élevé, la sélectivité d'extraction et l'option de recyclage (Sánchez-Vicente et al., 2013; Zuin and Ramin, 2018). Ce procédé a été utilisé dans une large gamme d'application industriel des arômes et de parfums depuis la dernière décennie (Gañán and Brignole, 2013; Köse et al., 2000; Ozel et al., 2003, Auerbach et al., 2019).

L'hydrodistillation est la méthode la plus traditionnelle utilisée pour isoler les composés des HEs des matériaux végétaux. Cependant, elle est toujours accompagnée de quelques inconvénients y compris une longue durée de l'opération d'extraction, une faible efficacité d'extraction et une perte de certains composants due à la dégradation ou à l'isomérisation si le traitement est prolongé à haute température (Liu et al., 2019). Pour remédier à ces inconvénients, l'application d'un système de distillation sous vide élimine les problèmes d'altération et de dégradation thermique (Borgarello et al., 2015; da Silva et al., 2016) et offre des fractions hautement enrichies des terpènes d'intérêt (Martins et al., 2013; Sharif et al., 2014). Cependant, dans des cas rares, cette technique peut conduire à une 'implosion' de l'équipement (Perini et al., 2017). Malgré ce risque, cette technique est largement appliquée dans l'industrie alimentaire, en particulier dans la production de jus (Borgarello et al., 2015; Silvestre et al., 2016; Stüker et al., 2011). En revanche, elle ne peut pas être utilisée pour préparer des monoterpènes en tant que substances porogènes dans des dispositifs électroniques. Elle n'est pas efficace pour éliminer les impuretés (Bowen, 2010).

#### **I-4 Etude bibliographique de la plante d'*Origanum majorana* L.**

Afin de contribuer à l'exploitation des plantes de la flore tunisienne et dans le cadre de la valorisation des fractions déterpénées des HEs, nous nous sommes intéressés à l'étude de la plante *Origanum majorana* L. Au meilleur de notre connaissance, il n'existe aucune référence indiquant la déterpénération d'huile essentielle de cette plante en Tunisie.

##### **I-4-1 Habitat et description**

*Origanum majorana* L. est une herbacée vivace annuelle (Novak et al., 2000). Cette plante, connue sous le nom de marjolaine douce, appartient à la famille des Lamiaceae pouvant atteindre une hauteur de 30 à 60 cm (Bina and Rahimi, 2017). La plupart de ses espèces pousse à l'état sauvage dans des régions tempérées s'étendant à la région méditerranéenne (Bina and Rahimi, 2017; Baâtour et al., 2012a). La récolte est favorisée avant la formation des graines car la teneur en huile volatile est maximale (de juin à septembre) (Prerna and Vasudeva, 2015).

Traditionnellement, les feuilles de marjolaine sont utilisées pour ses propriétés médicinales dans le traitement de l'insomnie, de la gastrite, de l'asthme et de la nervosité. De nos jours, la marjolaine est très demandée en aromathérapie (Bina and Rahimi, 2017; Baâtour et al., 2012a). La figure I-2 illustre les parties aériennes d'*O. majorana*.



**Figure I-2** : Les parties aériennes d'*Origanum majorana* L.

#### **I-4-2 Identité botanique**

<b>Classe</b>	: Plantae
<b>Ordre</b>	: Lamiales
<b>Famille</b>	: Lamiaceae
<b>Genre</b>	: <i>Origanum</i>
<b>Espèce</b>	: <i>Origanum majorana</i> L.
<b>Nom vernaculaire</b>	: Marjolaine douce
<b>Nom binominal</b>	: <i>Origanum majorana</i> , 1753 (Prerna and Vasudeva, 2015)

#### **I-4-3 Répartition géographique**

##### **I-4-3-1 Dans le monde**

Le genre *Origanum* a été particulièrement étudié par Ietswaart en 1980. Il reconnaît 3 groupes, 10 sections, 38 espèces, 6 sous-espèces, 3 variétés et 16 hybrides (tableau I-1). Le genre *Origanum* est largement présent dans des îles Canaries et des Açores, à l'Europe du Nord et jusqu'à l'Asie de l'Est. On peut le rencontrer aussi en culture à Cuba ou dans l'île de Réunion, mais la région méditerranéenne représente son aire de distribution la plus importante (figure I-3). Certaines espèces sont endémiques à un pays. Par exemple *O. saccatum*, *O. boissieri*, *O. hypericifolium*, *O. sipyleum*, *O. acutidens*, *O. haussknechtii*, *O. brevidens*, etc

sont particulières à la Turquie, pays qui est considéré comme le centre génique du genre *Origanum* puisqu'il en possède 16 espèces (Baser, 1995).



- Limite de distribution

**Figure I-3** : Aire de distribution du genre *Origanum* (Ietswaart, 1980)

Il faut souligner que la distinction entre marjolaine et origan n'est pas toujours très claire dans la littérature et dans la pratique commerciale ; de nombreuses dénominations sont utilisées pour désigner les huiles essentielles d'origan et il y a souvent confusion entre genre et espèce. De plus, on a coutume de classer dans les origans : *Origanum vulgare* L. ainsi que les autres espèces d'*Origanum* et de réserver le terme de marjolaine à l'espèce *Origanum majorana* L. désignée marjolaine des jardins (Gilles, 2007).

**Tableau I-1** : Classification du genre *Origanum* selon Ietswaart (Ietswaart, 1980)

Groupe A	Groupe B	Groupe C	Hybrides
<a href="#">I Section</a> <a href="#">Amaracus</a>	<a href="#">V Section</a> <a href="#">Chilocalyx</a>	<a href="#">VII Section</a> <a href="#">Campanulaticalyx</a>	<i>O. x adonidis</i>
			<i>O. x applii</i>
<i>O. boissieri</i>	<i>O. micranthum</i>	<i>O. dayi</i>	<i>O. x barbarae</i>
<i>O. calcaratum</i>	<i>O. bilgeri</i>	<i>O. isthmicum</i>	<i>O. x dolichosiphon</i>
<i>O. cordifolium</i>	<i>O. microphyllum</i>	<i>O. ramonense</i>	<i>O. x hybridinum</i>
<i>O. dictamnus</i>	<i>O. minutiflorum</i>	<a href="#">VIII Section</a> <a href="#">Elongatispica</a>	<i>O. x intercedens</i>
<i>O. saccatum</i>	<a href="#">VI Section</a> <a href="#">Majorana</a>		<i>O. x intermedium</i>
<i>O. solymicum</i>			<i>O. x lirim</i>
<a href="#">II Section</a> <a href="#">Anatolicon</a>	<i>O. majorana</i>	<i>O. floribundum</i>	<i>O. x majoricum</i>
	<i>O. onites</i>	<i>O. grosii</i>	<i>O. x minoanum</i>
<i>O. akhdarensis</i>	<i>O. syriacum</i>	<a href="#">IX Section</a> <a href="#">Origanum</a>	<i>O. x pabotii</i>
<i>O. cyrenaicum</i>	<i>O. syriacum</i> var. <i>syriacum</i>		<i>O. x symeonis</i>
<i>O. hypericifolium</i>		<i>O. vulgare</i>	<i>O. amanum x dictamnus</i>
<i>O. libanoticum</i>	<i>O. syriacum</i> var. <i>bevanii</i>	<i>O. vulgare</i> ssp. <i>vulgare</i>	
<i>O. scabrum</i>			<i>O. calcaratum x dictamnus</i>
<i>O. sipyleum</i>	<i>O. syriacum</i> var. <i>sinaicum</i>	<i>O. vulgare</i> ssp. <i>glandulosum</i>	<i>O. micranthum x vulgare</i> ssp. <i>hirtum</i>
<i>O. vetteri</i>			
<i>O. pampaninii</i>		<i>O. vulgare</i> ssp. <i>gracile</i>	<i>O. sipyleum x vulgare</i> ssp. <i>hirtum</i>
		<i>O. vulgare</i> ssp. <i>hirtum</i>	
<a href="#">III Section</a> <a href="#">Brevifilamentum</a>			
<i>O. acutidens</i>			
<i>O. bargyli</i>		<i>O. vulgare</i> ssp. <i>virens</i>	
<i>O. brevidens</i>			
<i>O. haussknechtii</i>		<i>O. vulgare</i> ssp. <i>viride</i>	
<i>O. leptocladum</i>			
<i>O. rotundifolium</i>		<a href="#">X Section Prolaticorolla</a>	
		<i>O. compactum</i>	
<a href="#">IV Section</a> <a href="#">Longitubus</a>		<i>O. ehrenbergii</i>	
<i>O. amanum</i>		<i>O. laevigatum</i>	

### I-4-3-2 En Tunisie

La Tunisie est dominée par la flore méditerranéenne avec un élément tuniso-maghrébin (tuniso-algérien, tuniso-libyen, tuniso-italien, etc) tout en présentant une faible proportion des éléments endémiques propres au pays. L'espèce de l'origan est endémique algéro-tunisienne (Neffati et al. 1999 ; Le Floch et al. 2010).

On se basant sur les études limitées de la marjolaine en Tunisie (tableau I-2), on peut déduire que cette plante pousse spontanément dans ces régions : Sfax (Est), Zaghouan (Nord) et Nefza (Nord-est). Cependant, elle est cultivée dans les pépinières de Soliman (Nord) et Sidi Bouzid (centre).

**Tableau I-2** : Répartition géographique de la marjolaine en Tunisie depuis 1999

Région	Plante	Date de récolte	Référence
Sfax	spontanée	1999	Ezzeddine et al., 2001
Soliman	cultivée	2009	Sellami et al., 2009
Soliman	cultivée	2011	Baâtour et al., 2012b
Nefza	spontanée	2012	Taamalli et al., 2015
Zagouan	spontanée	2012	Hajlaoui et al., 2016
Sidi Bouzid	cultivée	2015	Ben Salha et al., 2017

### I-4-4 Principaux constituants chimiques

Les recherches bibliographiques à propos des études effectuées sur cette plante ont montré que la chimie de l'espèce reste insuffisamment étudiée en Tunisie. L'analyse de cette herbe a révélé la présence d'huile particulièrement volatile et de nature aromatique. Divers tests phytochimiques ont montré la présence de terpénoïdes, de flavonoïdes et de tanins dans l'extrait à l'éthanol, tandis que des extraits de saponines et de glucides étaient présents dans les extraits d'eau de tige et de racine, respectivement. Les alcaloïdes, les glycosides et les protéines étaient absents dans les deux extraits (racine et tige) (Prerna and Vasudeva, 2015).

L'essence de ce genre se caractérise par deux principaux chimotypes: le chimotype terpinène-4-ol et le chimotype thymol (ou carvacrol) (Baâtour et al., 2012b). En Tunisie, la marjolaine douce est caractérisée par le terpinène-4-ol comme composant majeur (tableau I-3).

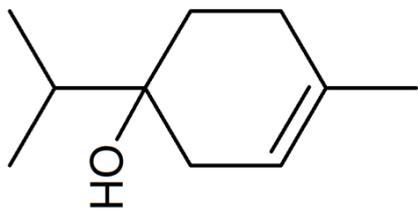
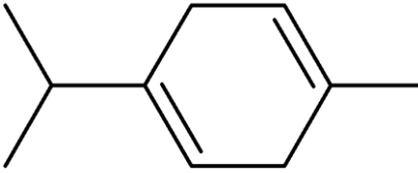
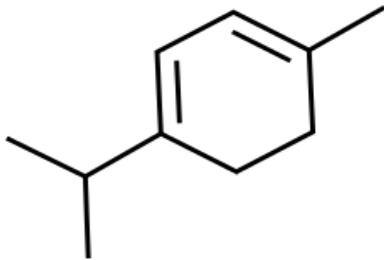
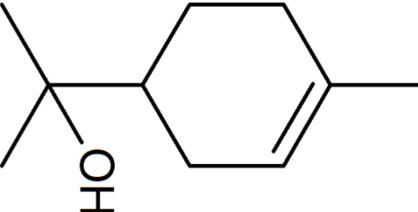
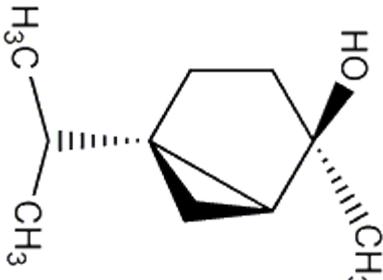
Ce chimotype de terpinène-4-ol pourrait être accompagné de l'hydrate de cis-sabinène ou d'une quantité appréciable des monoterpènes tels que les terpinènes et l' $\alpha$ -terpinéol (Hajlaoui et al., 2016; Ezzeddine et al., 2001) ou l'hydrate de trans sabinène (Baâtour et al., 2012b; Sellami et al., 2009) (tableau I-3 et I-4).

**Tableau I-3** : Le rendement et les composés majoritaires de l'HE de la marjolaine dans quelques régions en Tunisie cités dans la bibliographie

Région	Rendement	Composés majoritaires	Référence
Sfax (Est)	-	terpinène-4-ol (32,8%) $\alpha$ -terpinéol (9,9 %) hydrate de cis-sabinène (8,6 %)	Ezzeddine et al., 2001
Soliman (Nord)	0,04-0,08%	terpinène-4-ol (29-32%) hydrate de cis-sabinène (19-23 %) hydrate de trans-sabinène (3,5-11 %)	Sellami et al., 2009
Soliman (Nord)	0,8%	terpinène-4-ol (31-43%) hydrate de cis-sabinène (43,66%) ou sous forme d'hydrate de trans-sabinène (24,18%) $\alpha$ -terpinéol (7,3 %)	Baâtour et al., 2012b
Zagouan (Nord)	1,85%	terpinène-4-ol (23,2%) cis-sabinène hydrate (17,5%) $\alpha$ -terpinéol (10,5 %)	Hajlaoui et al., 2016

Jusqu'à présent, les études phytochimiques menées sur la marjolaine ont permis de conclure que les variations de la composition chimique de l'HE étaient attribuées à différents facteurs, notamment : la localisation géographique, les conditions climatiques, le moment de la récolte de la matière première (le stade de la croissance) et les conditions d'extraction de l'huile essentielle (Bejaoui et al., 2013; Sellami et al., 2009).

**Tableau I-4:** Nom, formule brute et semi-développée de quelques molécules qui caractérisent l'HE de la marjolaine

Nom de la molécule	Formule brute	Formule semi-développée
Terpinène-4-ol	$C_{10}H_{18}O$	
Gamma-terpinene	$C_{10}H_{16}$	
Alpha-terpinene	$C_{10}H_{16}$	
Alpha-terpinéol	$C_{10}H_{18}O$	
Sabinène	$C_{10}H_{16}$	
Hydrate de cis-sabinène	$C_{10}H_{18}O$	

#### **I-4-5 Activités pharmacologiques et utilisations**

Les feuilles et les sommités fleuries très aromatiques fraîches ou séchées de la marjolaine douce sont largement utilisées pour aromatiser de nombreux aliments. Ses huiles essentielles et ses extraits alcooliques sont appliqués dans les produits pharmaceutiques et cosmétiques et dans la médecine (Hajlaoui et al., 2016; Vági et al., 2005b). De nombreuses études expérimentales suggèrent que les composés phytochimiques, principalement les composés oxygénés, sont à l'origine de plusieurs activités biologiques (Ben Salha et al., 2017; Baâtour et al., 2012b).

##### **I-4-5-1 Activité antioxydante**

Les extraits aqueux, d'alcool éthylique et de n-hexane obtenus de deux herbes de marjolaine de Hongrie et d'Égypte en utilisant une méthode spectrophotométrique par 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), un piégeage des radicaux libres  $H_2O_2$ , un dosage du pouvoir chélateur des métaux et du pouvoir de réduction ferrique ont révélé une activité antioxydante importante in vitro et des valeurs de la  $CI_{50}$  comparables à l'acide ascorbique (Prerna and Vasudeva, 2015).

En Tunisie (Soliman), l'évaluation de l'activité de piégeage des radicaux libres des extraits de marjolaine à différents stades de croissance a montré que l'*O. majorana* L. a un grand pouvoir antioxydant au niveau du stade végétatif pré-floral par rapport au stade de floraison et au début du stade végétatif (Baâtour et al., 2012a).

De nombreuses études ont montré que la plante de marjolaine est riche en composés phénoliques. De ce fait, ses extraits possèdent une capacité de chélation des radicaux libres élevée et par conséquent une activité antioxydante importante (Iratni, 2016).

En outre, les résultats de Hajlaoui et ses collègues ont montré que l'huile de la marjolaine présente une activité élevée, notamment en termes de pouvoir réducteur et de blanchiment au  $\beta$ -carotène, induisant des valeurs de  $CI_{50}$  supérieures à celles du l'hydroxytoluène butylé (BHT). Alors qu'elle présente une faible activité de piégeage des radicaux libres du DPPH, avec une valeur de  $CI_{50}$  de  $62,66 \pm 2,08 \mu\text{g/mL}$ , inférieure à celle des antioxydants synthétiques tels que le BHT ( $11,51 \pm 0,62 \mu\text{g/mL}$ ). L'activité modérée de piégeage des radicaux du DPPH pourrait être attribuée en partie à l'activité faible du composant majeur : terpinène-4-ol (Hajlaoui et al., 2016).

### **I-4-5-2 Activité antibactérienne**

L'huile essentielle de la marjolaine a montré une forte activité antibactérienne contre les intoxications alimentaires, les organismes nuisibles et les organismes d'origine fécale (Daferera et al., 2000; Vági et al., 2005b). Les extraits de marjolaine obtenus par extraction au CO<sub>2</sub> supercritique ont des potentiels prometteurs pour une incorporation dans divers produits alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques en raison de leur capacité à supprimer la croissance bactérienne dans n'importe quel environnement alimentaire ou cosmétique (Vági et al., 2005b).

En Tunisie, une étude d'huile d'*O. majorana* L. a montré une activité antibactérienne importante contre 12 souches bactériennes (6 souches bactériennes Gram positives et 6 souches Gram négatives). Il a été noté que cette HE était active contre toutes les souches testées mais à des degrés différents (Hajlaoui et al., 2016).

### **I-4-5-3 Activité antifongique**

Dans une étude expérimentale, la méthode de microdilution en bouillon a été utilisée pour étudier l'activité antifongique de l'HE de marjolaine. Cette dernière a présenté un faible pouvoir antifongique contre *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea* avec des concentrations minimales inhibitrices allant de 2,5 à 10 mg/mL (Nikkhah et al., 2017).

En revanche, Daferera et ses collègues ont prouvé que la croissance radiale, la germination des conidies et la production de *Penicillium digitatum* ont été complètement inhibées par l'huile essentielle de marjolaine à des concentrations relativement faibles (250 à 400 mg/mL) (Daferera et al., 2000) et l'inhibition de celles des *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* et *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* est effectué à des concentrations allant de 85 à 300 mg/mL. Cette activité antifongique est due à la présence de thymol (14%) et de carvacrol (45%) (Daferera et al., 2003, 2000) respectivement.

Les propriétés antimicrobiennes des extraits par fluide supercritique et des extraits éthanoliques (EE) de la marjolaine ont été révélées et comparées. Les extraits supercritiques ont totalement inhibé la croissance des champignons filamenteux aux concentrations de 4–5 mg/mL, tandis que les EE, même à la concentration de 25 mg/mL, n'ont pas (ou légèrement) inhibé les souches testées de l'*A. niger* et du *T. viride* (Vági et al., 2005b).

#### I-4-5-4 Divers

L'Hippocrate a initialement utilisé la marjolaine comme agent antiseptique. C'est un remède à la maison très apprécié contre les infections à la poitrine, la toux, les maux de gorge, les douleurs rhumatismales, les troubles nerveux, les maladies cardiovasculaires, l'épilepsie, l'insomnie, les soins de la peau, les flatulences et les troubles gastriques. De nos jours, il est très recommandé en aromathérapie étant donné que ses extraits et ses huiles essentielles possèdent plusieurs propriétés biologiques (Prerna and Vasudeva, 2015). Le tableau I-5 représente quelques activités biologiques de la marjolaine.

**Tableau I-5** : Quelques activités biologiques des extraits et des huiles essentielles de la marjolaine

Activités biologiques	Extraits	Huiles essentielles	Références
Anti-anxiété	*		Rezaie et al. (2011)
Anti-mutagénique	*		Vägi et al. (2005a)
Antidiabétique	*		Perez Gutierrez (2012)
Antiulcéreux	*	*	Vägi et al. (2005a)
Anti-protozoaire	*	*	Kozłowska et al. (2010)
Insecticide	*		Sharma et al. (2011)
Antimicrobienne		*	Hajlaoui et al. (2016)

#### I-5 Les activités antioxydante et antimicrobienne

Les huiles essentielles des PAM peuvent réduire d'une manière considérable les risques d'un grand nombre des maladies chroniques (maladies cardiovasculaires, hypertension, diabète et cancer) grâce à ses propriétés biologiques (Stangl et al., 2007).

Il est évident que l'activité biologique des HEs dépend principalement de sa composition chimique majoritaire ou encore des effets synergiques possibles entre ses composants (Lahlou, 2004).

L'étude des activités biologiques d'une HE de certaines PAM est donc d'une importance primordiale étant donné qu'elle nous permet de valoriser leurs propriétés curatives en fonction de leurs principes bioactifs naturels.

## **I-5-1 Activité antioxydante**

### **1-5-1-1 Le stress oxydatif**

L'oxygène est indispensable à la vie des mitochondries qui en utilisent la majeure partie comme substrat de la chaîne respiratoire pour la production de l'énergie. Ce métabolisme induit la production d'espèces réactives oxygénées (ERO) en équilibre avec les systèmes antioxydants (Roede and Jones, 2010). En effet, le stress oxydatif est défini comme étant le résultat d'un déséquilibre entre la charge pro-oxydante et les défenses antioxydantes au profit de la première (Bina and Rahimi, 2017).

Les substances médiatrices du stress oxydatif sont les ERO qui sont classées en deux groupes à savoir les radicaux libres et les espèces réactives non radicalaires (Pandey and Rizvi, 2009; Serteyn et al., 2002) :

- Un radical libre est une entité chimique (atome ou molécule) possédant au moins un électron non apparié sur sa couche périphérique. Cette particularité, lui confère une grande instabilité énergétique et cinétique et une très forte réactivité avec les molécules constitutives voisines. Les radicaux libres les plus courants sont le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroxyl ( $\cdot OH$ ) et le monoxyde d'azote ( $NO\cdot$ ).
- La classe des espèces réactives oxygénées est formée de l'ion peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) et du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) qui sont des espèces non radicalaires, dérivant des radicaux libres mais également connues pour leur capacité à promouvoir des changements oxydatifs dans les cellules.

Ces ERO dénaturent les protéines (oxydation protéique), l'ADN (dommages de l'ADN) et les substrats biologiques (macromolécules dans les cellules) tels que les lipides (peroxydation lipidique) (Baâtour et al., 2012a). Ces derniers représentent la cible principale des espèces réactives oxygénées grâce à leur degré élevé d'insaturation.

### **1-5-1-2 Oxydation des lipides (peroxydation lipidique)**

L'oxydation des acides gras génère des peroxydes lipidiques très réactifs tels que l'isoprostane et le malondialdéhyde (MDA). La réaction radicalaire en chaîne se déroule en trois phases (Ahn et al., 2005) :

- Réaction d'initiation



Cette phase consiste à éliminer un radical hydrogène d'un groupement méthylène (-CH<sub>2</sub>-) voisin d'une double liaison du corps gras et une formation d'un radical lipidique très réactif R• (1).

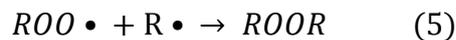
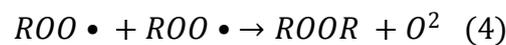
- Phase de propagations des radicaux

Ces radicaux ainsi générés (R•), réagissent avec l'oxygène pour donner naissance à des radicaux libres peroxyés (ROO•) (2). Ces radicaux instables forment des hydroperoxydes (3) en arrachant un radical proton à partir d'une nouvelle molécule lipidique (RH) selon le schéma suivant :



- Phase de terminaison

Les produits radicalaires formés sont capables à leur tour de réagir entre eux pour donner des molécules stables comme le montre la réaction suivante :



### **1-5-1-3 Les antioxydants**

Par définition, un antioxydant est une molécule qui, ajoutée à petites doses à un substrat oxydable à l'air, est capable d'empêcher ou de retarder l'oxydation de ce dernier et de maintenir aussi l'équilibre redox cellulaire. Son rôle principal est d'éviter la phase de propagation et de freiner les espèces responsables du processus d'oxydation afin qu'elles ne puissent agir (Ahn et al., 2005).

Ces outils de protection, appelés antioxydants, existent sous deux types :

#### **a- Les antioxydants enzymatiques**

Les principaux enzymes qui constituent les systèmes de défense enzymatiques naturels sont : la superoxyde dismutase (SoD), la catalase (CAT), la thiorédoxine (TRx), la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion réductase (GR) (Arora et al., 2002) .

## **b- Les antioxydants non enzymatiques**

Le deuxième type d'antioxydants non enzymatiques comprend des (Arora et al., 2002) :

- Antioxydants moléculaires endogènes : principalement, on trouve le glutathion (GSH), un thiol produit naturellement par les cellules de l'organisme, qui est considéré comme un puissant antioxydant intracellulaire (Lobo et al., 2010). En outre, l'acide urique : est un antioxydant majeur qui piège les ERO et en particulier les radicaux  $\bullet\text{OH}$ ,  $\text{ROO}\bullet$  et  $\text{NOO}\bullet$  ce qui génère des radicaux relativement stables.
- Antioxydants moléculaires exogènes : Les vitamines E (l' $\alpha$ -tocophérol) et C (acide ascorbique) et les polyphénols.

Ce type des antioxydants inactive les radicaux libres par inhibition de la propagation des réactions radicalaires en fournissant des hydrogènes aux radicaux libres.



(AH est un antioxydant et  $\text{A}\bullet$  radical de l'antioxydant)

Les radicaux  $\text{A}\bullet$  sont stables et ne possèdent pas l'énergie suffisante pour arracher un hydrogène aux lipides, d'où l'arrêt de mécanisme de propagation.

Cette famille regroupe les acides phénoliques, les stilbènoïdes, les lignines et les lignanes, les flavonoïdes, les tannins, les coumarines, représentant ainsi une activité antioxydante, ainsi que les terpénoïdes des HE qui possèdent des groupements O-H (King and Young, 1999; Pandey and Rizvi, 2009; Sánchez-Vioque et al., 2013).

### **I-5-2 Activité antimicrobienne**

#### **I-5-2-1 Les antibiotiques**

Les antibiotiques sont des substances antibactériennes qui, à faible dose, peuvent tuer les microbes ou empêcher leur croissance sans nuire aux cellules eucaryotes. Ils varient considérablement dans leur spectre d'action. Ils sont classés sur la base de micro-organisme pathogène qu'elle inhibe: antibactérien, antifongique, antiviral. Le contact d'un agent antimicrobien avec un microbe se traduit par deux actions (Prescott et al., 2018) :

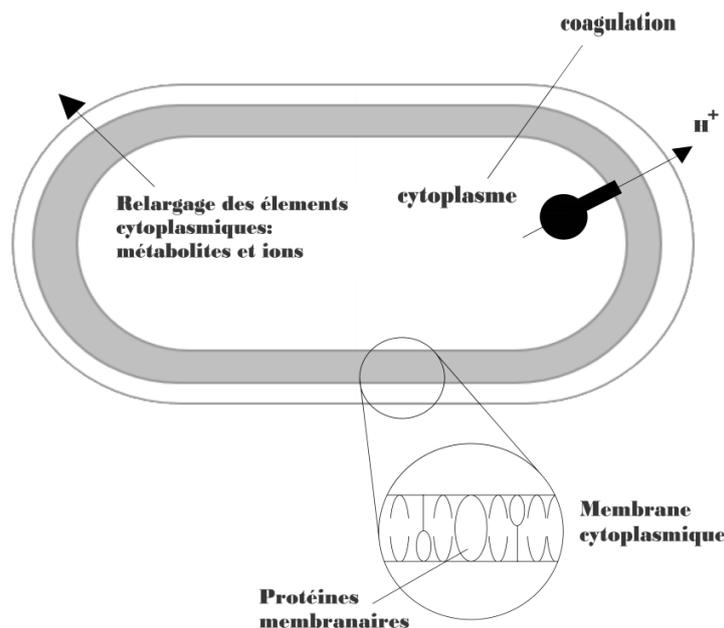
- Une action létale ou effet bactéricide, fongicide et viricide.
- Une action bactériostatique : inhibition de la croissance microbienne.

Aujourd'hui, le développement des nouvelles substances antimicrobiennes de synthèse est mis en cause en raison des risques de la résistance des agents pathogènes (virus, bactéries et champignons). Ainsi, la recherche des nouveaux produits chimiques à base des plantes peut constituer une alternative thérapeutique efficace.

### I-5-2-2 Mode d'action des huiles essentielles

Compte tenu de la variabilité quantitative et qualitative des composants des HEs, leur activité antimicrobienne n'est pas attribuée à un mécanisme unique mais résulte d'une combinaison de plusieurs modes d'actions, impliquant différentes cibles cellulaires (l'ADN, l'ARN, la paroi, les ribosomes, la membrane cytoplasmique) (Burt, 2004) (Figure I-3). Une interruption de processus métabolique ou/et une perturbation de la structure ou de la fluidité d'une cellule bactérienne est à l'origine de blocage de ses fonctions ou/et de la mort cellulaire. Cette action se manifeste, à une dose bien déterminée, par un pouvoir antibactérien (Jawetz et al., 1973; Prescott et al., 2018).

La quantification de l'efficacité d'une huile essentielle à l'égard d'un agent pathogène est représentée par la concentration minimale inhibitrice (CMI) et/ou la concentration minimale bactéricide (CMB).



**Figure I-4 :** Action des HEs sur la cellule bactérienne (Burt, 2004)

### I-5-2-3 La détermination de la CMI

La CMI est une valeur utilisée pour déterminer, *in vitro*, le pouvoir bactériostatique. Elle désigne la plus petite concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ) de l'antibiotique utilisé qui permet

d'interdire toute multiplication bactérienne visible après 18-24 heures d'incubation (Prescott et al., 2018).

Les deux méthodes les plus utilisées pour mesurer l'activité antimicrobienne d'un antibiotique sont : la méthode de dilution et la méthode de diffusion (méthode de disque).

#### **a- Test de dilution**

Ces tests peuvent être évalués en milieu liquide ou solide (gélose). Il s'agit d'exposer un inoculum bactérien calibré à une gamme de concentration de l'antibiotique.

En milieu liquide, l'inoculum des souches à étudier est réparti dans une série de tubes à hémolyses ou de cupules contenant l'antibiotique. La CMI correspond au premier tube ou cupule ne montrant pas de troubles apparents.

En milieu solide, l'incorporation de l'antibiotique se fait sur la gélose coulée en boîtes de Pétri. Ensuite, la surface de la gélose est ensemencée par l'inoculum bactérien. Après incubation, la CMI se traduit par la plus faible concentration d'antibiotique inhibant la croissance des souches bactériennes testées (Jawetz et al., 1973; Prescott et al., 2018).

#### **b- La méthode de disque**

C'est une approche qui consiste à placer des disques imprégnés d'antibiotique sur une surface solide (gélose) préalablement inoculée avec l'organisme de test. Le médicament diffuse à partir de disques dans la gélose. Après incubation, la mesure du diamètre de la zone d'inhibition sert à déduire la puissance d'inhibition de l'agent antimicrobien contre les germes (Hajlaoui et al., 2016).

#### **I-5-2-4 La détermination de la CMB**

Après la recherche de la CMI, l'activité bactéricide d'agents antimicrobiens a la possibilité d'être mesurée par dilution en milieu liquide. La méthode consiste à inoculer sur un milieu solide (gélose) et sans l'agent antimicrobien, une quantité définie des tubes sans croissance visible et à dénombrer les germes survivants. Le nombre des survivants est comparé à l'inoculum initial (Jawetz et al., 1973; Prescott et al., 2018).

## Conclusion

Dans ce chapitre nous avons présenté en premier lieu les techniques d'extraction des huiles essentielles sans changement significatif de leur nature : expression à froid, distillation, extraction aux solvants organiques, extraction par micro-ondes et extraction par CO<sub>2</sub> supercritique. En second lieu, nous avons décrit brièvement les techniques d'analyse (GC-MS et FTIR) des huiles volatiles et leurs domaines d'utilisation.

Ensuite, une partie a porté sur les terpènes : structure générale (C<sub>5</sub>)<sub>n</sub> et fonctions qui sont résumées en deux rôles principaux : l'un comme métabolite primaire en s'intégrant dans le processus de base chez presque toutes les espèces végétales, l'autre comme un métabolite secondaire ayant des fonctions écologiques critiques chez une large gamme d'organismes. Les utilisations les plus connues à l'échelle de l'industrie alimentaires, cosmétiques, biotechnologiques et pharmaceutiques ont été énumérées.

La partie suivante est une revue bibliographique détaillée des différentes méthodes de séparation des terpènes qui peuvent être considérés comme des techniques d'obtention des huiles essentielles avec changement significatif de la nature des essences tels que: les techniques chromatographiques, l'extraction par solvant, la séparation membranaire, le fractionnement par CO<sub>2</sub> supercritique et les techniques de distillation.

Dans une autre partie, nous avons évoqué l'identification botanique, la description géographique et pharmacologique (les activités antioxydante, antibactérienne, antifongique et divers) de l'herbacée *Origanum majorana* L. avec quelques exemples d'utilisations.

Finalement, un aperçu de l'activité antioxyante, antibactérienne et antifongique des essences volatiles extraites des plantes aromatiques médicinales et leur mode d'action ont été présentés.

## Les références

- Abad, M.J., Bedoya, L.M., Apaza, L., Bermejo, P., Abad, M.J., Bedoya, L.M., Apaza, L., Bermejo, P., 2012. The Artemisia L. Genus: A Review of Bioactive Essential Oils. *Molecules* 17, 2542–2566.
- Abe, E., Delye, S.G., Alvarez, J.C., 2010. Extraction liquide-liquide : théorie, applications, difficultés. *Ann. Toxicol. Anal.* 22, 51-59.
- AFNOR, N., 1996. Huiles essentielles. NFT75-001. Paris.
- Ahn, D.U., Min, B., Ahn, D.U., 2005. Mechanism of lipid peroxidation in meat and meat products-A review, *Food Sci. Biotechnol.* 14 (1), 152-163.
- Aiche-Iratni, G., 2016. Activités biologiques, d'intérêt médical, d'extraits de feuilles de pistacia lentiscus et d'origanum majorana. Doctoral dissertation. Université Mouloud MAMMERI.
- Anil Kumar Pabby, Syed S.H. Rizvi, Ana Maria Sastre Requena, 2008. Handbook of Membrane Separations: Chemical, Pharmaceutical, Food, and Biotechnological Applications. CRC Press.
- Arce, A., Marchiaro, A., Martínez-Ageitos, J.M., Soto, A., 2008. Citrus Essential Oil Deterpenation by Liquid-Liquid Extraction. *Can. J. Chem. Eng.* 83, 366–370.
- Arce, A., Marchiaro, A., Rodríguez, O., Soto, A., 2006. Essential oil terpenless by extraction using organic solvents or ionic liquids. *AIChE J.* 52, 2089–2097.
- Arce, A., Marchiaro, A., Rodríguez, O., Soto, A., 2002. Liquid–liquid equilibria of limonene+linalool+diethylene glycol system at different temperatures. *Chem. Eng. J.* 89, 223–227.
- Arce, A., Pobudkowska, A., Rodríguez, O., Soto, A., 2007. Citrus essential oil terpenless by extraction using 1-ethyl-3-methylimidazolium ethylsulfate ionic liquid: Effect of the temperature. *Chem. Eng. J.* 133, 213–218.
- Auerbach, M. I., Reilly, W. L., 2019. U.S. Patent No. 10,315,129. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

- Arora, A., Sairam, R.K., Srivastava, G.C., 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr. Sci.* 82, 1227-1238.
- Astani, A., Reichling, J., Schnitzler, P., 2011. Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2011, 253643.
- Baâtour, O., Tarchoun, I., Nasri, N., Kaddour, R., Harrathi, J., Drawi, E., 2012a. Effect of growth stages on phenolics content and antioxidant activities of shoots in sweet marjoram (*Origanum majorana L.*) varieties under salt stress. *J. Biotechnol.* 11, 16486–16493.
- Baâtour, O., Tarchoune, I., Mahmoudi, H., Nassri, N., Abidi, W., Kaddour, R., Hamdaoui, G., Nasri-Ayachi, M., Lachaâl, M., Marzouk, B., 2012b. Culture conditions and salt effects on essential oil composition of sweet marjoram (*Origanum majorana*) from Tunisia. *Acta Pharm.* 62, 251–261.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475.
- Baranauskaitė, J., Jakštas, V., Ivanauskas, L., Kopustinskienė, D.M., Drakšienė, G., Masteikova, R., Bernatoniene, J., 2016. Optimization of carvacrol, rosmarinic, oleanolic and ursolic acid extraction from oregano herbs (*Origanum onites L.*, *Origanum vulgare* spp. *hirtum* and *Origanum vulgare L.*). *Nat. Prod. Res.* 30, 672–674.
- Barker, J., Ramotowski, R., Nwokoye, J., 2016. The effect of solvent grade on thin layer chromatographic analysis of writing inks. *Forensic Sci. Int.* 266, 139–147.
- Baser K.H.C., 1995. Essential oils from aromatic plants which are used as herbal tea in Turkey. *Actes de la 13ème Conférence internationale sur les saveurs, les parfums et les huiles essentielles tenue à Istanbul, Turquie.* 200-201.
- Baser K.H.C. 1993. Essentials oils of Anatolian Labiateae : A profile. *Acta Horticulture*, 333, 217-238.
- Bazaka, K., Jacob, M., Truong, V.K., Crawford, R.J., Ivanova, E.P., Bazaka, K., Jacob, M. V., Truong, V.K., Crawford, R.J., Ivanova, E.P., 2011. The Effect of Polyterpenol Thin Film Surfaces on Bacterial Viability and Adhesion. *Polymers (Basel)*. 3, 388–404.
- Bednarek, P., Osbourn, A., 2009. Plant-microbe interactions: chemical diversity in plant defense. *Science* 324, 746–8.

- Bejaoui, A., Boulila, A., Boussaid, M., 2013. Chemical composition and biological activities of essential oils and solvent extracts of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. from Tunisia. *J. Med. Plants Res.* 7, 2429–2435.
- Ben Salha, G., Herrera Díaz, R., Labidi, J., Abderrabba, M., 2017. Deterpenation of *Origanum majorana* L. essential oil by reduced pressure steam distillation. *Ind. Crops Prod.* 109.
- Beneti, S.C., Rosset, E., Corazza, M.L., Frizzo, C.D., Di Luccio, M., Oliveira, J.V., 2011. Fractionation of citronella (*Cymbopogon winterianus*) essential oil and concentrated orange oil phase by batch vacuum distillation. *J. Food Eng.* 102, 348–354.
- Bertolasi, V., Bortolini, O., Fantin, G., Fogagnolo, M., Pretto, L., 2006. Inclusion of cyclic carbonates by a cholic acid host: structure and enantioselection. *Tetrahedron: Asymmetry* 17, 308–312.
- Bhat, M., Zinjarde, S.S., Bhargava, S.Y., Kumar, A.R., Joshi, B.N., 2011. Antidiabetic Indian plants: a good source of potent amylase inhibitors. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2011, 810207.
- Bina, F., Rahimi, R., 2017. Sweet Marjoram: A Review of Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Biological Activities. *J. Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 22, 175–185.
- Bogdanov, M.G., Svinjarov, I., 2018. Efficient purification of halide-based ionic liquids by means of improved apparatus for continuous liquid-liquid extraction. *Sep. Purif. Technol.* 196, 57–60.
- Borgarello, A. V., Mezza, G.N., Pramparo, M.C., Gayol, M.F., 2015. Thymol enrichment from oregano essential oil by molecular distillation. *Sep. Purif. Technol.* 153, 60–66.
- Bowen, H. R., 2010. Selective purification of monoterpenes for removal of oxygen containing species. Washington, DC U.S. Pat. Trademark Off. U.S. Pat. No. 7,727,401.
- Breitmaier, E., 2006. Terpenes : flavors, fragrances, pharmaca, pheromones. WILEY-VCH.
- Briellmann, H., Kaufman, P., Duke, J., Cseke, L., Warber, S., Kirakosyan, A., 2006. *Natural Products from Plants, Second Edition.* CRC Press.

- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–53.
- Cai, J., Lin, P., Zhu, X., Su, Q., 2006. Comparative analysis of clary sage (*S. sclarea* L.) oil volatiles by GC–FTIR and GC–MS. *Food Chem.* 99, 401–407.
- Chiasson, H., Bélanger, A., Bostanian, N., Vincent, C., Poliquin, A., 2001. Acaricidal Properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) Essential Oils Obtained by Three Methods of Extraction. *J. Econ. Entomol.* 94, 167–171.
- Connolly, J. D. and Hill, R.A., 1991. *Dictionnaire of terpenoids*. London, Chapman and Hall, Int. Res. J. Pharm.
- Couderc, V., 2001. Toxicité des huiles essentielles. Thèse Dr. Vétérinaire. Université de Toulouse.
- Cruz-Vega, D., Verde-Star, M.J., Salinas-Gonzalez, N.R., Rosales-Hernandez, B., Estrada-Garcia, I., Mendez-Aragon, P., Carranza-Rosales, P., Gonzalez-Garza, M., Castro-Garza, J., 2009. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza radix* and its bioactive compounds. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 22, 557–559.
- D’Souza, R.N., Kakarla, P.B., Yelemane, V., Meyer, R., den Boer, P., Fernández-Lahore, M., 2017. Controlling cell adhesion in antibody purification by expanded bed adsorption chromatography. *Sep. Purif. Technol.* 183, 270–278.
- da Silva, R.P.F.F., Rocha-Santos, T.A.P., Duarte, A.C., 2016. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *TrAC Trends Anal. Chem.* 76, 40–51.
- Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G., 2003. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Prot.*, 22 (1), 39-44.
- Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G., 2000. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2576–2581.
- Danielski, L., Brunner, G., Schwänke, C., Zetzel, C., Hense, H., Donoso, J.P.M., 2008. Deterpenation of mandarin (*Citrus reticulata*) peel oils by means of countercurrent multistage extraction and adsorption/desorption with supercritical CO<sub>2</sub>. *J. Supercrit. Fluids* 44, 315–324.

Davis, E.M., Croteau, R., 2000. Cyclization Enzymes in the Biosynthesis of Monoterpenes, Sesquiterpenes, and Diterpenes. Springer, Berlin, Heidelberg, 53–95.

de Melo, M.M.R., Şen, A., Silvestre, A.J.D., Pereira, H., Silva, C.M., 2017. Experimental and modeling study of supercritical CO<sub>2</sub> extraction of *Quercus cerris* cork: Influence of ethanol and particle size on extraction kinetics and selectivity to friedelin. *Sep. Purif. Technol.* 187, 34–45.

Diaz, S., Espinosa, S., Brignole, E.A., 2005. Citrus peel oil deterpenation with supercritical fluids: Optimal process and solvent cycle design. *J. Supercrit. Fluids* 35, 49–61.

Dubreuil, M.F.S., Servaes, K., Ormerod, D., Van Houtven, D., Porto-Carrero, W., Vandezande, P., Vanermen, G., Buekenhoudt, A., 2017. Selective membrane separation technology for biomass valorization towards bio-aromatics. *Sep. Purif. Technol.* 178, 56–65.

Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D.A., Orlova, I., 2006. Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 25, 417–440.

Dupuy, A., Athes, V., Schenk, J., Jenelten, U., Souchon, I., 2011a. Solvent extraction of highly valuable oxygenated terpenes from lemon essential oil using a polypropylene membrane contactor: potential and limitations. *Flavour Fragr. J.* 26, 192–203.

Dupuy, A., Athes, V., Schenk, J., Jenelten, U., Souchon, I., 2011b. Experimental and theoretical considerations on breakthrough pressure in membrane-based solvent extraction: Focus on citrus essential oil/hydro-alcoholic solvent systems with low interfacial tension. *J. Memb. Sci.* 378, 203–213.

Dupuy, A., 2010. Stabilisation de l'interface liquide-liquide dans un contacteur membranaire: Application à l'extraction sélective de terpènes oxygénés d'huile essentielle d'agrumes. Thèse de doctorat. AgroParisTech.

Duval, L., 2012. Les huiles essentielles à l'officine. UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen.

Edris, A.E., 2007. Pharmaceutical and therapeutic Potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phyther. Res.* 21, 308–323.

El Haib A., 2011. Valorisation des terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques. Université de Toulouse.

- Ens, E.J., Bremner, J.B., French, K., Korth, J., 2009. Identification of volatile compounds released by roots of an invasive plant, bitou bush (*Chrysanthemoides monilifera* spp. rotundata), and their inhibition of native seedling growth. *Biol. Invasions* 11, 275–287.
- Fantin, G., Fogagnolo, M., Maietti, S., Rossetti, S., 2010. Selective Removal of Monoterpenes from Bergamot Oil by Inclusion in Deoxycholic Acid. *J. Agric. Food Chem.* 58, 5438–5443.
- Ezzeddine, N. B. H. B., Abdelkefi, M. M., Aissa, R. B., Chaabouni, M. M., 2001. Antibacterial screening of *Origanum majorana* L. oil from Tunisia. *Journal of Essential Oil Research*, 13, 295-297.
- Farhat, A., Benmoussa, H., Bachoual, R., Nasfi, Z., Elfalleh, W., Romdhane, M., Bouajila, J., 2017. Efficiency of the optimized microwave assisted extractions on the yield, chemical composition and biological activities of Tunisian *Rosmarinus officinalis* L. essential oil. *Food Bioprod. Process.* 105, 224–233.
- Fulzele, D.P., Satdive, R.K., 2005. Comparison of techniques for the extraction of the anti-cancer drug camptothecin from *Nothapodytes foetida*. *J. Chromatogr. A* 1063, 9–13.
- Gañán, N., Brignole, E.A., 2013. Supercritical carbon dioxide fractionation of *T. minuta* and *S. officinalis* essential oils: Experiments and process analysis. *J. Supercrit. Fluids* 78, 12–20.
- Gañán, N., Brignole, E.A., 2011. Fractionation of essential oils with biocidal activity using supercritical CO<sub>2</sub>—Experiments and modeling. *J. Supercrit. Fluids.* 58, 58–67.
- Gershenson, J., Dudareva, N., 2007. The function of terpene natural products in the natural world. *Nat. Chem. Biol.* 3, 408–414.
- Ghazouani, N., Abderrabba, M., Bouajila, J., 2009. *Teucrium Ramosissimum* (Lamiaceae): Volatile Composition, Seasonal Variation, and Pharmaceutical Activity. Thèse de doctorat. Tunisie.
- Gilles Figueredo, 2007. Etude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne. Thèse de doctorat. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II.
- Girola, N., Figueiredo, C.R., Farias, C.F., Azevedo, R.A., Ferreira, A.K., Teixeira, S.F., Capello, T.M., Martins, E.G.A., Matsuo, A.L., Travassos, L.R., Lago, J.H.G., 2015. Camphene isolated from essential oil of *Piper cernuum* (Piperaceae) induces intrinsic

apoptosis in melanoma cells and displays antitumor activity in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 467, 928–934.

Gonçalves, D., Teschke, M.E.E., Koshima, C.C., Gonçalves, C.B., Oliveira, A.L., Rodrigues, C.E.C., 2015. Fractionation of orange essential oil using liquid–liquid extraction: Equilibrium data for model and real systems at 298.2 K. *Fluid Phase Equilib.* 399, 87–97.

Gressler, V., Stein, É.M., Dörr, F., Fujii, M.T., Colepicolo, P., Pinto, E., 2011. Sesquiterpenes from the essential oil of *Laurencia dendroidea* (Ceramiales, Rhodophyta): isolation, biological activities and distribution among seaweeds. *Rev. Bras. Farmacogn.* 21, 248–254.

Greuter W., Burdet H. M. and Long G., 1986. *Med Checklist*. In Editions du Conservatoire de Jardin Botaniques de la ville de Genève, (Vol 3).

Hajlaoui, H., Mighri, H., Aouni, M., Gharsallah, N., Kadri, A., 2016. Chemical composition and in vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity and anti-acetylcholinesterase properties of Tunisian *Origanum majorana* L. essential oil. *Microb. Pathog.* 95, 86–94.

Hossain, M.A., Shah, M.D., Gnanaraj, C., Iqbal, M., 2011. In vitro total phenolics, flavonoids contents and antioxidant activity of essential oil, various organic extracts from the leaves of tropical medicinal plant *Tetrastigma* from Sabah. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 4, 717–721.

Huang, M., Abel, C., Sohrabi, R., Petri, J., Haupt, I., Cosimano, J., Gershenzon, J., Tholl, D., 2010. Variation of herbivore-induced volatile terpenes among *Arabidopsis* ecotypes depends on allelic differences and subcellular targeting of two terpene synthases, TPS02 and TPS03. *Plant Physiol.* 153, 1293–310.

Huie, C.W., 2002. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Anal. Bioanal. Chem.* 373, 23–30.

Ietswaart, J. H., 1980. A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae). The Hague: Leiden University Press. Vol. 4, p. 158.

Imad, H.H., Israa, A.I., Hawraa, J.K., 2015. Gas chromatography mass spectrum and fourier-transform infrared spectroscopy analysis of methanolic extract of *Rosmarinus officinalis* leaves. *J. Pharmacogn. Phyther.* 7, 90–106.

Jawetz, E., Melnick, J.L., Adelberg, E.A., 1973. *Microbiologie médicale*. Presses de l'Université Laval.

Jiang, Z., Kempinski, C., Chappell, J., 2016. Extraction and Analysis of Terpenes/Terpenoids, in: *Current Protocols in Plant Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 345–358.

Jones, C.E., Kato, S., Nakashima, Y., Kajii, Y., 2014. A novel fast gas chromatography method for higher time resolution measurements of speciated monoterpenes in air. *Atmos. Meas. Tech.* 7, 1259–1275.

Jouault, S., 2012. La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité. Thèse de doctorat. Université de Lorraine.

Kim, C., Kim, S., Kim, D., Lim, J., Kim, J., 1998. Removal of aromatic compounds in the aqueous solution via micellar enhanced ultrafiltration: Part 1. Behavior of nonionic surfactants. *J. Memb. Sci.* 147, 13–22.

King, A., Young, G., 1999. Characteristics and Occurrence of Phenolic Phytochemicals. *J. Am. Diet. Assoc.* 99, 213–218.

Kirchner, J.G., Miller, J.M., 1952. Preparation of terpeneless essential oils. A chromatographic process. *Ind. Eng. Chem.* 44, 318–321.

Kirchner, J.G., Miller, J.M., Keller, G.J., 1951. Separation and Identification of Some Terpenes by New Chromatographic Technique. *Anal. Chem.* 23, 420–425.

Köse, O., Akman, U., Hortaçsu, Ö., 2000. Semi-batch deterpenation of origanum oil by dense carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids* 18, 49–63.

Kozłowska, M., Laudy, A., B.J. Starościa, Napiórkowski, A., Chomicz, L., Kazimierczuk, Z., 2010. Antimicrobial and antiprotozoal effect of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.). *Acta Sci. Pol. Cultus* 9, 133–141.

Kubatova, A., Lagadec, A.J.M., Miller, D.J., Hawthorne, S.B., 2001. Selective extraction of oxygenates from savory and peppermint using subcritical water. *Flavour Fragr. J.* 16, 64–73.

La Charte sociale européenne - Conseil de l'Europe, 2013.

Lagadec, A. J., Miller, D. J., Lilke, A. V., Hawthorne, S. B., 2000. Pilot-scale subcritical water remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon and pesticide contaminated soil. *Environmental. Sci. Tech.* 34(8), 1542-1548.

- Lahlou, M., 2004. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phyther. Res.* 18, 435–448.
- Lang, Q., Wai, C.M., 2001. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies - a practical review. *Talanta* 53, 771–782.
- Langenheim, J.H., 1994. Higher plant terpenoids: A phyto-centric overview of their ecological roles. *J. Chem. Ecol.* 20, 1223–1280.
- Lawrence, B. M., 2009. A preliminary report on the world production of some selected essential oils and countries. *Perfumer & flavorist.* 34 (1) 38-44.
- Le Floch, É., Boulos, L., Vela, E., 2010. Catalogue synonymique commenté de la flore de Tunisie. *Simpact.*
- Li, Y.Q., Kong, D.X., Wu, H., 2013. Analysis and evaluation of essential oil components of cinnamon barks using GC-MS and FTIR spectroscopy. *Ind. Crops Prod.* 41, 269–278.
- Lis-Balchin, M., 1999. Possible health and safety problems in the use of novel plant essential oils and extracts in aromatherapy. *J. R. Soc. Promot. Health* 119, 240–243.
- Liu, X., Jing, X., Li, G., 2019. A process to acquire essential oil by distillation concatenated liquid-liquid extraction and flavonoids by solid-liquid extraction simultaneously from *Helichrysum arenarium* (L.) Moench inflorescences under ionic liquid-microwave mediated. *Sep. Purif. Technol.* 209, 164–174.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* 4, 118–26.
- Maimone, T.J., Baran, P.S., 2007. Modern synthetic efforts toward biologically active terpenes. *Nat. Chem. Biol.* 3, 396–407.
- Malecky, M., 2008. Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins. <http://www.theses.fr>. Paris, AgroParisTech.
- Mangambu, M., Mushagalusa, K., Kadima, N., 2014. Contribution à l'étude photochimique de quelques plantes médicinales antidiabétiques de la ville de Bukavu et ses environs (Sud-Kivu, R.D.Congo). *J. Appl. Biosci.* 75, 6211.

- Marques, A., Peixoto, A., Provance, D., Kaplan, M., Marques, A.M., Peixoto, A.C.C., Provance, D.W., Kaplan, M.A.C., 2018. Separation of Volatile Metabolites from the Leaf Derived Essential Oil of *Piper mollicomum Kunth* (Piperaceae) by High-Speed Countercurrent Chromatography. *Molecules* 23, 3064.
- Martins, P.F., Medeiros, H.H.R., Sbaite, P., Wolf Maciel, M.R., 2013. Enrichment of oxyterpenes from orange oil by short path evaporation. *Sep. Purif. Technol.* 116, 385–390.
- Messai L., 2011. Etude phytochimique d'une plante medicinale de l'est algerien (*Artemisia herba alba*). Thèse de doctorat. Université Mentouri Constantine.
- Morcia, C., Malnati, M., Terzi, V., 2012. In vitro antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 29, 415–422.
- Morgan, E., 1990. Vogel's textbook of practical organic chemistry. 5th edn. Endeavour 14, 148.
- Nakatsu. T., Lupo, A.T., Chinn, J.W., Kang, R.K.L., 2000. Biological activity of essential oils and their constituents. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 21, 571–631.
- Nam, H., Choi, J., Capareda, S.C., 2016. Comparative study of vacuum and fractional distillation using pyrolytic microalgae (*Nannochloropsis oculata*) bio-oil. *Algal Res.* 17, 87–96.
- Neffati, M., Ghrabi-Gammar, Z., Akrimi, N., Henchi, B., 1999. Les plantes endémiques de la Tunisie. *Flora Mediterranea.* 9, 163-174.
- Nikkhah, M., Hashemi, M., Habibi Najafi, M.B., Farhoosh, R., 2017. Synergistic effects of some essential oils against fungal spoilage on pear fruit. *Int. J. Food Microbiol.* 257, 285–294.
- Novak, J., Bitsch, C., Langbehn, J., Pank, F., Skoula, M., Gotsiou, Y., M. Franz, C., 2000. Ratios of cis- and trans-Sabinene Hydrate in *Origanum majorana* L. and *Origanum microphyllum* (Benth) Vogel. *Biochem. Syst. Ecol.* 28, 697–704.
- O'Reilly-Wapstra, J.M., Freeman, J.S., Davies, N.W., Vaillancourt, R.E., Fitzgerald, H., Potts, B.M., 2011. Quantitative trait loci for foliar terpenes in a global eucalypt species. *Tree Genet. Genomes* 7, 485–498.

- Oyen L.P.A., Dung, N.X., 1999. *Plant Resources of South-East Asia (Essential-oil plants)*, Backhuys Publishers, Leiden.
- Ozel, M.Z., Gogus, F., Lewis, A.C., 2003. Subcritical water extraction of essential oils from *Thymbra spicata*. *Food Chem.* 82, 381–386.
- Pandey, K.B., Rizvi, S.I., 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2 (5), 270-8.
- Peñuelas, J., Munné-Bosch, S., 2005. Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection. *Trends Plant Sci.* 10, 166–169.
- Perez Gutierrez, R.M., 2012. Inhibition of Advanced Glycation End-Product Formation by *Origanum majorana* L. In Vitro and in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats . Evidence-Based Complement. *Altern. Med.* 2012, 1–8.
- Perini, J.F., Silvestre, W.P., Agostini, F., Toss, D., Pauletti, G.F., 2017. Fractioning of orange (*Citrus sinensis* L.) essential oil using vacuum fractional distillation. *Sep. Sci. Technol.* 52, 1397–1403.
- Poirot, R., 2007. *Méthodologie pour le passage en continu d'extraction de soluté à partir de matière végétale*. Thèse de doctorat. Université de Toulouse.
- Prerna and Neeru Vasudeva, 2015. *Origanum majorana* L.-Phyto-pharmacological review, *Indian Journal of Natural Products and Resources.* 6 (4) 261-267.
- Prescott, L. M., Willey, J. M., Sherwood, L. M., Woolverton, C.J., 2018. *Microbiologie*. De Boeck Supérieur.
- Pye, H.O.T., Pouliot, G.A., 2012. Modeling the Role of Alkanes, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, and Their Oligomers in Secondary Organic Aerosol Formation. *Environ. Sci. Technol.* 46, 6041–6047.
- Qiu, C., Smuts, J., Schug, K.A., 2017. Analysis of terpenes and turpentines using gas chromatography with vacuum ultraviolet detection. *J. Sep. Sci.* 40, 869–877.
- Rajesh, D., Howard, S.P., 2003. Perillyl alcohol mediated radiosensitization via augmentation of the Fas pathway in prostate cancer cells. *Prostate* 57, 14–23.

- Raut, J.S., Karuppayil, S.M., 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind. Crops Prod.* 62, 250–264.
- Rezaie, A., Jafari, B., Mousavi, G., Nazeri, M., Ebadi, A., Ahmadedh, C., Habibi, E., 2011. Comparative study of sedative, pre-anesthetic and anti-anxiety effect of *Origanum majorana* extract with diazepam on rats. *Research Journal of Biological Sciences*, 6, 611-614.
- Richard, H., Multon, J. L., 1992. *Les arômes alimentaires*. Paris: Tec & Doc-Lavoisier.
- Rockland, L. B., Debenedict, C.R., 1975. Production of terpeneless essential oils.
- Rodriguez-Solana, R., Daferera, D.J., Mitsi, C., Trigas, P., Polissiou, M., Tarantilis, P.A., 2014. Comparative chemotype determination of lamiaceae plants by means of GC-MS, FT-IR, and dispersive-Raman spectroscopic techniques and GC-FID quantification. *Ind. Crops Prod.* 62, 22–33.
- Roede, J.R., Jones, D.P., 2010. Reactive species and mitochondrial dysfunction: Mechanistic significance of 4-hydroxynonenal. *Environ. Mol. Mutagen.* 51.
- Ruzicka, L., 1994. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. 1953. *Experientia* 50, 395–405.
- Sacchettini, J.C., 1997. Creating Isoprenoid Diversity. *Science* (80) 277, 1788–1789.
- Said, H. S. O., Satrani, B., Ghanmi, M., Mansouri, N., Mohamed, H., Chaouch, A., 2011. Activité antimicrobienne et composition chimique de l'huile essentielle de *Plectranthus aromaticus* Roxb. de l'île de la Grande Comore. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15, 251–258.
- Said, Z., Laglaoui, A., Hassani, M., Zantar, S., Garrouj, D. El, Pagán, R., Chabi, M., Bakkali, M., Zerrouk, M.H., 2015. Effect of Harvest Time on Yield, Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Thymus vulgaris* and *Mentha pulegium* Essential Oils. *European J. Med. Plants* 8.
- Sailer, R., Berger, T., Reichling, J., Harkenthal, M., 1998. Pharmaceutical and medicinal aspects of Australian tea tree oil. *Phytomedicine* 5, 489–495.

Sánchez-Vicente, Y., Cabañas, A., Renuncio, J.A.R., Pando, C., 2013. Supercritical CO<sub>2</sub> as a green solvent for eucalyptus and citrus essential oils processing: role of thermal effects upon mixing. RSC Adv. 3, 6065.

Sánchez-Vioque, R., Polissiou, M., Astraka, K., Mozos-Pascual, M. de los, Tarantilis, P., Herraiz-Peñalver, D., Santana-Méridas, O., 2013. Polyphenol composition and antioxidant and metal chelating activities of the solid residues from the essential oil industry. Ind. Crops Prod. 49, 150–159.

Seifi, M., Seifi, P., Hadizadeh, F., Mohajeri, S.A., 2013. Extraction of Lycopene from Tomato Paste by Ursodeoxycholic Acid Using the Selective Inclusion Complex Method. J. Food Sci. 78, C1680–C1685.

Sellami, I.H., Maamouri, E., Chahed, T., Wannas, W.A., Kchouk, M.E., Marzouk, B., 2009. Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.). Ind. Crops Prod. 30, 395–402.

Serteyn D., Mouithys-Mickalad A., Franck T., Grulke S., Lamy M, D.C. and D.-D.G., 2002. La nature chimique et la réactivité de l'oxygène, Annale de Médecine Vétérinaire. Annale de Médecine Vétérinaire.

Sharif, K.M., Rahman, M.M., Azmir, J., Mohamed, A., Jahurul, M.H.A., Sahena, F., Zaidul, I.S.M., 2014. Experimental design of supercritical fluid extraction – A review. J. Food Eng. 124, 105–116.

Sharkey, T.D., Wiberley, A.E., Donohue, A.R., 2007. Isoprene Emission from Plants: Why and How. Ann. Bot. 101, 5–18.

Sharma N, Dubey N K, and Sharma K, 2011. Screening of insecticidal and antifungal activity of *Origanum majorana* oil against *Callosobruchus chinensis* L. and *Aspergillus* spp. Res. J. Agric. Biol. Sci. 7(2), 223–227.

Silvestre, W.P., Agostini, F., Muniz, L.A.R., Pauletti, G.F., 2016. Fractionating of green mandarin (*Citrus deliciosa* Tenore) essential oil by vacuum fractional distillation. J. Food Eng. 178, 90–94.

Stangl, V., Dreger, H., Stangl, K., Lorenz, M., 2007. Molecular targets of tea polyphenols in the cardiovascular system. Cardiovasc. Res. 73, 348–358.

Stüker, C.Z., Melo Costa, I., Placeres, A., Gallucci, S., Kato, V., Net, C., 2011. Uso de destilação fracionada (DF) para obtenção de produtos diferenciados em perfumaria a partir de óleos essenciais de cítricos.

Taamalli, A., Arráez-Román, D., Abaza, L., Iswaldi, I., Fernández-Gutiérrez, A., Zarrouk, M., Segura-Carretero, A., 2015. LC-MS-based metabolite profiling of methanolic extracts from the medicinal and aromatic species *Mentha pulegium* and *Origanum majorana*. *Phytochem. anal.* 26, 320-330.

Tegen, M. G., Joon, C. H. O., Sutterlin, W. R., 2019. U.S. Patent No. 10,414,709. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Vági, E., Rapavi, E., Hadolin, M., Vászárhelyiné Perédi, K., Balázs, A., Blázovics, A., Simándi, B., 2005a. Phenolic and Triterpenoid Antioxidants from *Origanum majorana* L. Herb and Extracts Obtained with Different Solvents. *J. Agric. Food Chem.* 53, 17–21.

Vági, E., Simándi, B., Suhajda, Á., Héthelyi, É., 2005b. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *Food Res. Int.* 38, 51–57.

Vandermoten, S., Mescher, M.C., Francis, F., Haubruge, E., Verheggen, F.J., 2012. Aphid alarm pheromone: An overview of current knowledge on biosynthesis and functions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42, 155–163.

Wichtl, M., Anton, R., 1999. *Plantes thérapeutiques : tradition, pratique officinale, science et thérapeutique*, 3e éd. allemande. ed. Tech & Doc.

Wilks, D. E., 2019. U.S. Patent Application No. 16/415,338.

Xiong, Y., Zhao, Z., Zhu, L., Chen, Y., Ji, H., Yang, D., 2013. Removal of three kinds of phthalates from sweet orange oil by molecular distillation. *LWT - Food Sci. Technol.* 53, 487–491.

Zabaras, D., Wyllie, S., Zabaras, D., Wyllie, S.G., 2001. The Effect of Mechanical Wounding on the Composition of Essential Oil from *Ocimum Minimum* L. Leaves. *Molecules* 6, 79–86.

Zhang, Z., Li, G., 2010. A review of advances and new developments in the analysis of biological volatile organic compounds. *Microchem. J.* 95, 127–139.

Ziemons, E., 2006. Etude en temps réel du processus d'extraction de la tagitinine C en fonction des caractéristiques physico-chimiques du CO<sub>2</sub> supercritique à l'aide de fibres optiques couplant un spectrophotomètre IRTF à un extracteur à fluide supercritique. Université de Liège.

Zuin, V.G., Ramin, L.Z., 2018. Green and Sustainable Separation of Natural Products from Agro-Industrial Waste: Challenges, Potentialities, and Perspectives on Emerging Approaches. *Top. Curr. Chem.* 376, 3.

# CHAPITRE II

## MATERIELS ET METHODES

Ce chapitre détaille les méthodes et le matériel utilisés pour extraire et déterpéner l'huile essentielle d'*Origanum majorana* L., analyser sa composition chimique et tester ses activités biologiques. Il est subdivisé en trois sous-parties :

1. Une première partie dans laquelle nous présenterons les différentes techniques mises en œuvre pour extraire et déterpéner l'huile volatile de la marjolaine.
2. La seconde explicitera les méthodes d'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle brute et celui déterpénée.
3. La dernière portera sur l'évaluation des activités antioxydantes, antibactériennes et antifongiques des échantillons des huiles essentielles étudiées.

## II-1 Extraction et déterpénération des huiles essentielles

### II-1-1 Matériel végétal

Le matériel végétal, préalablement identifié, est constitué de la partie aérienne de la plante d'*Origanum majorana* L. (*O. majorana*) récoltée dans la région de Sidi Bouzid (Centre Tunisie-Juillet 2015). Cette plante a été identifiée par Dr. Ridha El Mokni (Laboratoire de Botanique et Ecologie Végétale (SNA-214), Département des Sciences de la Vie, Faculté des Sciences de Bizerte, Université de Carthage). La matière végétale, cueillie, a été séchée dans un endroit aéré à l'ombre jusqu'à stabilisation de son poids (environ 15 jours).

### II-1-2 Extraction par hydrodistillation

Le choix de la technique d'extraction influe directement sur le rendement d'extraction et sur la qualité des substances obtenues. Ces substances correspondent généralement à des composés rares et à forte valeur ajoutée, mais elles sont présentes à des teneurs centésimales (0,1 à 0,3 %).

Dans le présent travail, les HE ont été extraites par hydrodistillation à l'aide d'un appareil du type « Clevenger ». Le schéma suivant représente le dispositif d'extraction utilisé.



**Figure II-1** : Dispositif utilisé de l'hydrodistillation

Le principe consiste à immerger la matière première sèche dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à l'ébullition et l'opération est conduite à la pression atmosphérique. Les molécules odorantes volatiles et semi-volatiles sont alors entraînées par la vapeur d'eau. Ces vapeurs hétérogènes, au contact du froid, se condensent et deviennent liquides. Le liquide en question est formé d'un mélange d'eau et d'huile essentielle aromatisée. La séparation est ensuite effectuée par simple différence de densité. Cette essence ainsi obtenue est collectée dans un flacon hermétique à 4°C.

Pour chaque expérience, 300 g de la matière végétale sèche est introduite dans un ballon de 5 L contenant 3 L d'eau distillée. L'ensemble a été soumis à l'hydrodistillation pendant 3 heures. La durée d'extraction optimale a été fixée suite à l'étude de la cinétique du rendement d'extraction en fonction du temps. Les HEs ainsi obtenues sont collectées puis séchées sur le sulfate de sodium anhydre  $Na_2SO_4$  et stockées à 4°C. Le rendement en HE est exprimé en pourcentage et il est défini par l'équation suivante :

$$HE (\%) = \frac{M'}{M} * 100$$

Avec :

$M'$  : La masse de l'HE obtenue après l'extraction.

$M$  : La masse de la matière végétale utilisée.

### **II-1-3 Déterpénération par distillation sous pression réduite**

La déterpénération des huiles essentielles d'*O. majorana* a été effectuée par distillation sous pression réduite. Le système de distillation sous vide est composé d'une colonne de distillation en verre vigreux de 200 mm reliée à un condensateur en Verre Liebig (150 mm). À la base de la colonne, il y avait un ballon de 50 ml, dans lequel 20 à 30 g d'huile brute a été ajoutée sans addition de solvant. Le chauffage a été assuré par un décapeur thermique manuel comme montre la figure II-2. La pression a été fixée à 10 mmHg jusqu'à la fin du fractionnement. Les fractions ont été recueillies en fonction de la température d'ébullition indiquée par le thermomètre rodé fixé en haut de la colonne et indépendamment du temps. Enfin, le processus de distillation sous vide a été poursuivi jusqu'à ce que le volume d'huile soit réduit à 2 ml afin d'éviter de brûler le ballon.



**Figure II-2 :** Dispositif de la distillation sous vide

Les fractions des HEs ont été collectées, mesurées et stockées dans des flacons hermétiques étanches à l'air à 4 °.

Remarque : Le chauffage par le décapeur manuel peut être remplacé par un chauffe-ballon d'une puissance maximale de 150 W.

## **II-2 Analyses des huiles essentielles**

Les analyses qualitatives et quantitatives d'huile essentielle d'*O. majorana* et ses fractions obtenues par distillation sous vide ont été effectuées par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse CPG-SM ou GC-MS et par la spectroscopie InfraRouge à Transformée de Fourier IRTF ou FT-IR.

### **II-2-1 GC-MS**

#### **II-2-1-1 Principe**

La chromatographie en phase gazeuse est l'une des branches de la chromatographie. Cette technique séparative est appliquée pour des composés volatils ou susceptibles de l'être sans décomposition. La séparation est fondée sur la différence de distribution ou de partage des solutés entre deux phases, l'une stationnaire (liquide ou solide) et l'autre mobile (un gaz vecteur).

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec une technique d'identification spectrale comme la spectrométrie de masse permet l'identification des

composés sur la base d'une analyse comparative des spectres de masse obtenus avec ceux de la bibliothèque spectrale NIST 2.0 (National Institute of Standards and Technology).



**Figure II-3 :** Dispositif de CPG-MS

### **II-2-1-2 Mode opératoire**

Afin d'identifier et de quantifier la composition chimique de l'huile essentielle obtenue, 10  $\mu$ L ont été dissous dans 1mL de l'acétate d'éthyle dans un flacon métrique.

Ensuite, l'analyse des HEs a été effectuée à l'aide d'un chromatographe couplé à un détecteur de spectrométrie de masse Agilent à trois axes. Le couplage GC-MS a été réalisé sur un appareil type GC (7890A) -MS (MSD inerte 5975C).

Les spectres de masses ont été enregistrés en mode impact électronique (IE) avec une énergie d'ionisation de 70 eV.

Les conditions analytiques sont les suivantes :

- Une colonne capillaire HB-5MS ((5% phényl) methylpolysiloxane ; 30m  $\times$  0,25mm) ; épaisseur du film =0,25  $\mu$ m) ;
- Température de l'injecteur 250°C ;
- Température du détecteur 270°C ;
- La programmation de la température consiste en :  
Une élévation de 50 à 120°C, à 5°C/mn ;  
Une élévation de 120 à 280°C, à 8°C/mn ;

Un palier de 40 mn à 280°C ;

Une élévation de 280°C à 300°C, à 45°C/min ;

- Gaz vecteur : Hélium (pureté 99,99%) avec un débit de 0,7 ml / min ;
- Injecteur mode split : 1/10 ; volume d'injection 1µl ;
- Durée totale de l'analyse : 50 min.

Les identifications des constituants sont réalisées sur la base d'une analyse comparative des spectres de masse obtenus avec ceux emmagasinés dans la bibliothèque spectrale NIST 2.0 (Agilent Techn.), par le calcul de leurs indices de rétention linéaires et à l'aide du logiciel mass finder 3 ([www.massfinder.com](http://www.massfinder.com)) et d'autres spectres de masse publiés (Adams and Sparkman, 2007).

## II-2-2 FT-IR

### II-2-2-1 Principe

L'Infrarouge à Transformation de Fourier IRTF ou FT-IR est une méthode d'analyse structurale et mathématique qui permet de révéler les liaisons chimiques (fonctions alcool, acides, méthyles, méthylène etc..) de tous les composants présents dans les produits analysés et de mesurer leurs absorbances d'énergie selon la loi de Beer-Lambert suivante (Smith, 2011):

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} * l * C$$

Avec :

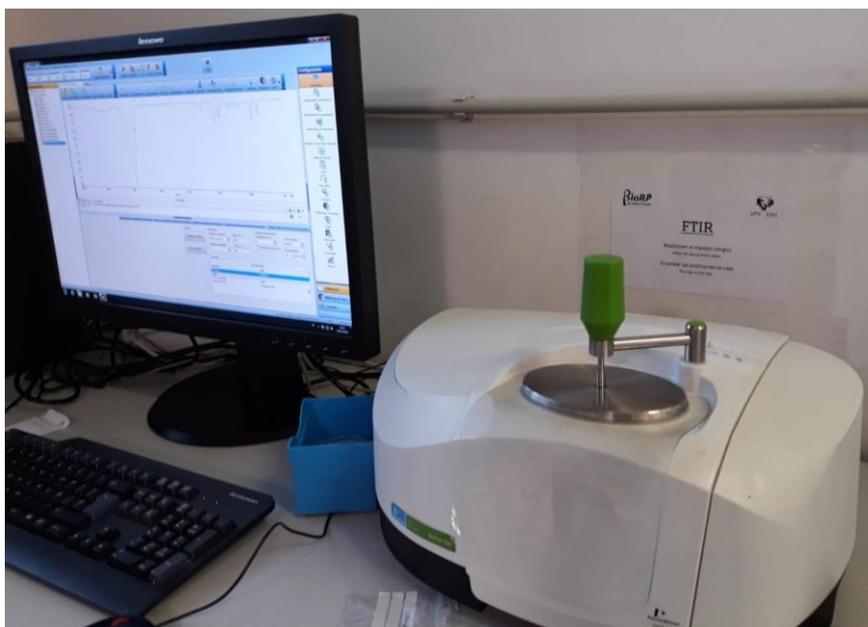
$A_{\lambda}$  : L'absorbance ou la densité optique du vibreur à la longueur d'onde  $\lambda$ .

$\varepsilon_{\lambda}$  : Le coefficient d'absorption molaire du vibreur à la longueur d'onde  $\lambda$  ( $\text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

$l$  : La longueur du trajet optique (cm).

$C$  : La concentration de la substance absorbante ( $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$ ).

Le principe d'IRTTF se base sur le fait que chaque fonction peut être décomposée en une somme des fonctions sinusoïdales, chaque fonction sinusoïdale étant définie par deux valeurs: sa fréquence (longueur d'ondes) et son amplitude (intensité) qui sont calculées à partir des données de l'interférogramme. En quelques secondes, l'interférogramme est recueilli par le spectromètre, traité par le calcul de transformation de Fourier et converti pour donner le spectre entier de l'échantillon.



**Figure II-4** : Dispositif de l’Infrarouge à Transformation de Fourier

### **II-2-2-2 Mode opératoire**

Les spectres infrarouges à transformée de Fourier ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Perkin Elmer équipé d'un accessoire Universal Attenuated Total Reflectance (UATR) avec une lentille en cristal de diamant de réflexion interne.

La première étape consistait à collecter un spectre de fond afin de le soustraire du spectre de l'échantillon. Ensuite, quelques microlitres d'huile essentielle de l'échantillon étudié ont été analysées dans les conditions analytiques suivantes :

- Un module de 8 balayages.
- Une plage d'onde allant de 750 à 4000  $\text{cm}^{-1}$ .
- Une résolution de 8  $\text{cm}^{-1}$ .

Après le balayage, la ligne de base a été corrigée et les bandes du profil IRTF ont été utilisées pour obtenir les informations qualitatives des groupes fonctionnels présents dans les échantillons. Les bandes FT-IR ont été identifiées en faisant correspondre le nombre d'onde ( $\text{cm}^{-1}$ ) au groupe de fréquence de la base des données de spectroscopie infrarouge et en comparant les résultats avec les données des études antérieures.

## II-3 Evaluation des activités biologiques

### II-3-1 Évaluation de l'activité antioxydante

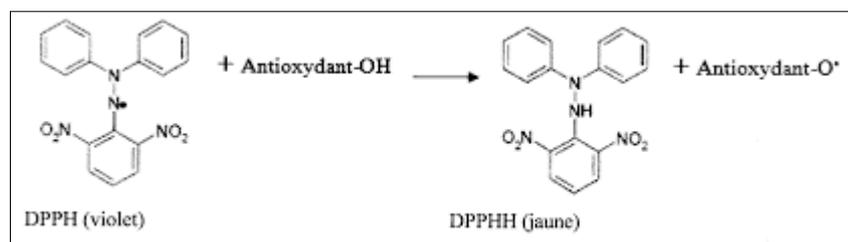
De nos jours, il existe un intérêt croissant vis-à-vis du stress oxydatif pour son implication dans différentes pathologies telles que les maladies cardiovasculaires et les inflammatoires (Aiche-Iratni, 2016). Ce stress peut être atténué par des agents antioxydants contenus dans les essences des plantes aromatiques médicinales.

Dans le cas de l'effet antioxydant, les composés bioactifs antioxydants interviennent à travers des réactions d'oxydoréductions, qui sont mises en évidence dans notre étude par le test de neutralisation du radical DPPH• et par la méthode de Folin-Ciocalteu.

#### II-3-1-1 La méthode de DPPH

##### a-Description

Le radical organique, 1,1-diphényl-1-picrylhydrazyle, est stable, de coloration violette présentant un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Il présente un maximum d'adsorption à  $\lambda = 517$  nm dans le méthanol ou l'éthanol. Les antioxydants agissent comme agents de terminaison en bloquant la phase de propagation. Ils réduisent ce radical, par transfert d'un atome d'hydrogène, en un composé jaune : le DPPH-H ou encore la 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine (Figure II-5).



**Figure II-5** : Mécanisme réactionnel intervenant entre le radical DPPH et un antioxydant (AH)

L'activité antioxydante des échantillons des HEs d'*O. majorana* L. a été déterminée par la méthode des radicaux libres de DPPH.

##### b- Mode opératoire

Selon Bouyahya et al. (2017), à 180  $\mu$ L d'une solution méthanolique de 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle fraîchement préparée (0,11 mM), 20  $\mu$ l de chaque échantillon de l'HE et du standard ont été ajoutés. Les mélanges sont agités au vortex et incubés dans l'obscurité à température ambiante pendant 1h à 25°C. L'activité d'élimination des radicaux libres a été

suivie par spectrophotométrie à 517 nm contre un blanc (solution méthanol) à l'aide d'un spectrophotomètre à ultraviolets visible (instrument Jasco V-630). Le pourcentage d'inhibition (I %) du radical libre DPPH a été calculé avec la formule suivante :

$$I(\%) = \frac{A_{blanc} - A_{\text{échantillon}}}{A_{blanc}} * 100$$

Avec:

$A_{blanc}$  : Absorbance de la réaction de contrôle contenant tous les réactifs sauf l'HE.

$A_{\text{échantillon}}$  : Absorption de l'échantillon contenant une dose d'HE testée.

La valeur de la concentration inhibitrice  $IC_{50}$  représente la dose de l'HE qui cause la neutralisation de 50 % des radicaux de DPPH. L' $IC_{50}$ , utilisée comme une estimation de l'activité antioxydante par DPPH, est estimée par extrapolation en traçant la courbe des pourcentages d'inhibition (I%) en fonction des concentrations (C). La méthode est standardisée par rapport au Trolox et tous les tests ont été effectués en triplicata.

### **II-3-1-2 Dosage des polyphénols totaux**

#### **a- Description**

Le contenu phénolique total des HE d'*O. majorana* L. est estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu (FC), décrite par Gullon et al., (2016). Ce réactif est un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ). Il est réduit, en milieu alcalin, par les phénols en un complexe d'oxydes bleu de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ).

#### **b- Mode opératoire**

300  $\mu$ L d'un échantillon d'HE dilué dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) est mélangé avec 2,5 mL de réactif FC (2N, dilué 10 fois dans l'eau). Ensuite, une solution de carbonate de sodium (7,5%, 2 mL) a été ajoutée. Le mélange est agité pendant quelques minutes. Enfin, L'ensemble est incubé 30 min à l'ombre et à température ambiante. L'absorbance a été lue à 760 nm contre un blanc (DMSO) à l'aide d'un spectrophotomètre à ultraviolets visible (instrument Jasco V-630).

Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent d'acide gallique ( $\mu\text{g}$  EAG) par millilitre d'huile essentielle et ils sont calculés selon l'équation suivante :

$$C_{EAG} = \frac{A_{760}}{K_{cal}}$$

Avec :

$A_{760}$  : Absorbance à 760 nm.

$K_{cal}$  : Pente de la courbe d'étalonnage.

## II-3-2 Évaluation de l'activité antimicrobienne

### II-3-2-1 Activité antibactérienne

Les HEs d'*O. majorana* ont été évaluées pour leurs activités antibactériennes contre huit souches bactériennes de références connues pour leur pathogénicité à savoir : *Staphylococcus aureus* (Staph 25), *Pseudomonas Fluorescens* (AH2), *Escherchia coli* (*E.coli*), *Salmonella typhimurium* (*S.typhy*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeru*), *Candida albicans* (*C.albi*), *Vibrio alginolyticus* (*V.algi*) et *Vibrio anguillarum* (*V.angui*). Ces souches bactériennes, leurs références et leurs caractéristiques sont présentés dans le tableau II.1.

#### a- Les conditions du travail

- **Culture bactérienne:** le milieu de culture, Trypto-caséine de soja (TSB), est coulé en boîte de Pétri etensemencé par une suspension bactérienne fraîche par une strie longitudinale. Les boîtes sont incubées pendant 24h à 37°C.
- **Congélation:** dans le but de garder la disponibilité en souches, quelques colonies sont prélevées à partir de cette culture bactérienne, et reprises dans un bouillon nutritif. Après une incubation de 24h à 37°C, la suspension obtenue est conservée dans des cryotubes à la température -20°C.
- **Décongélation:** la veille de la manipulation, un cryotube est décongelé rapidement dans un bain marie à 37°C. Quelques gouttes sont reprises dans du bouillon nutritif puis incubées à 37°C pendant 24h.
- **Milieux de culture :** dans cette étude, le milieu TSB a été utilisé pour les pré-cultures des micro-organismes (annexe 1).
- **Préparation de l'inoculum :** l'inoculum bactérien est préparé à partir d'une pré-culture bactérienne jeune de 18h (des cellules en phase exponentielle de croissance) et doit être rigoureusement ajusté à  $10^6$  UFC/mL (Unité Formant Colonie).

**Tableau II-1:** Les souches bactériennes utilisées, références, caractéristiques et effets

<b>Espèce indicatrice</b>	<b>Références</b>	<b>Caractéristiques</b>	<b>Effets</b>
<i>Staph 25</i>	ATCC 25923	Bactérie à gram positif, sphérique, immobile, facultativement anaérobique, sensible à l'acidité, résistante aux antibiotiques.	Intoxications alimentaires
<i>AH2</i>	AH2	Gram négatif, mobile, en forme de bâtonnet, fluorescent, oxydase positive, bénéfique pour certaines plantes.	Intoxications alimentaires
<i>E.coli</i>	ATCC 14948	Bacilles à gram négatif, pouvant être mobiles, immobiles ou capsulés	Infections alimentaires
<i>S.typhy</i>	C52	Entérobactéries bacilles à Gram négatifs, mobiles, mais certaines sont immobiles, à forte contagiosité.	Toxi-infections alimentaires et gastro-entérites
<i>P.aeru</i>	ATCC 27853	gram-négative, fins, droits et très mobiles, pathogène dans certaines conditions, très résistante, difficiles à traiter cliniquement.	Infections graves (œil, plaies, urines, gastro-intestinales, poumons, méningites d'inoculation, septicémies)
<i>C.albi</i>	ATCC 10231	Levure possède des colonies qui sont grandes, rondes, de couleur blanchâtre.	Infections fongiques (muqueuses digestive et gynécologique)
<i>V.algi</i>	ATCC 17749T	Bactérie gram négative marine	Infections cutanées
<i>V.angui</i>	ATCC 12964T	Bactéries à Gram négatif avec une forme de tige incurvée et un flagelle polaire.	Infection aquaculturelle

#### **b- La méthode de diffusion sur les disques stériles (aromatogrammes)**

L'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*O. majorana* a été réalisée par la méthode de diffusion sur les disques stériles d'après la méthode décrite par Appal Sammy et al. (2014) avec quelques modifications. C'est une approche qualitative qui mesure la sensibilité d'un agent pathogène à l'égard d'une substance à pouvoir antimicrobien. Elle repose sur le pouvoir migratoire de cette substance sur des boîtes de milieu de culture Tryptone Soya Agar (TSA).

Une suspension bactérienne standardisée de concentration  $10^6$  UFC/mL, est ensemencée à la surface des boîtes de Pétri contenant le milieu TSA.

A la surface des milieux de culture préalablement ensemencés, on dépose des disques de papier filtre stérile de 3mm de diamètre, imprégnés 3 $\mu$ L d'huile essentielle de concentration égale à 3  $\mu$ L/mL. Un disque non chargé est utilisé en tant que témoin négatif.

Les boîtes de Pétri sont incubées pendant 24h à 20°C. L'activité antibactérienne est déterminée par l'apparition d'une zone d'inhibition autour des disques. Les résultats sont exprimés en millimètres et représentent la moyenne de trois essais indépendants. La mesure de la zone d'inhibition est souvent transcrite en différents symboles proportionnels à l'activité (Moreira et al., 2005; Ponce et al., 2003):

- Non sensible (-) pour des diamètres ( $\Phi$ ) compris entre 6-9 mm;
- Sensible (+) pour  $\Phi$  compris entre 10-14 mm;
- Très sensible (++) pour  $\Phi$  compris entre 15-19 mm;
- Extrêmement sensible (+++) pour  $\Phi >20$  mm.

### **II-3-2-2 Évaluation de l'activité antifongique**

#### **a- Souches fongiques**

Les souches fongiques sont choisies dans cette étude sur la base pour leur implication fréquente dans la contamination et l'altération des denrées alimentaires. Les souches testées sont : *Aspergillus niger* (*A. niger*), *Aspergillus penicillioides* (*A. penicillioides*), *Rizopus oryzae* (*R. oryzae*) et *Rizopus stolonifera* (*R. stolonifera*).

Le genre *A. niger* (Tiegh MB284309, CBS-KNAW, Holland) a été fourni par le laboratoire du Groupe de Recherche et Procédés de Bioraffinerie, Département d'Ingénierie Chimie et Environnement, Université de Pays Basque Plaza Europa 1.

Les autres souches *A. penicillioides*, *R. oryzae* et *R. stolonifera* ont été isolées à partir de citrouille, pêche et prune respectivement.

- Isolement : La méthode d'isolement des champignons est décrite par Toma et Abdulla (2013) et Romero et al. (2005) avec quelques modifications. La sous-culture de colonies fongiques pures a été réalisée en utilisant un milieu frais stérile de Potato Dextrose Agar et incubée à 27 ° C jusqu'à la prolifération complète sur la

surface. L'isolement dans le milieu de culture a été réalisé en utilisant trois répliques.

- Identification : L'identification a été basée sur des clés taxonomiques des «caractères d'habitude» (Pitt and Hocking, 2009). Les champignons isolés ont été soumis à des études morphologiques et optiques à l'aide d'un Microscope Electronique (Nikon Eclipse E600, figure II-7) et d'un système de traitement et de quantification d'imagerie (Cellometer® Mini, Nexcelom Bioscience LLC, figure II-6) et à l'aide d'un compteur de cellules automatique. Le taux de croissance, le diamètre des colonies, la texture, la couleur, les structures de reproduction, la pigmentation inversée ainsi que les structures de chaque espèce ont été pris en compte (Barnett and Hunter, 2013; Pitt and Hocking, 2009).

#### **b- Méthode des micro-atmosphères**

La technique des micro-atmosphères, une version modifiée de Siripornvisal et al. (2009) et Robles et al. (2016), a été utilisée pour tester l'activité antifongique.

Dépôt des disques : Des boîtes de Pétri contenant 20 mL de Potato Dextrose Agar (PDA) ont été préparées. Des disques en papier Wattman №40 ont été imbibés par 5 µL d'huile essentielle et placés au centre de ces boîtes.

Inoculation : Ensuite, une prise de solution fongique (40 µL de concentration  $10^6$  spores/mL) a été inoculée au centre de manière aseptique. Les boîtes ont été fermées par le parafilm et incubées pendant 7 jours à  $25 \pm 1,5^\circ\text{C}$ .

Lecture des résultats :

- Pour compter la concentration de spores sur le disque, ce dernier a été extrait, lavé avec de l'eau distillée, vortexé et coloré avec une solution de bleu de Lactophénol.
- 20 µL de chaque solution obtenue sont passés par un compteur de cellules automatisé Cellometer® Mini (Nexcelom Bioscience LLC, figure II-6) et par un microscope électronique (Nikon Eclipse E600, figure II-7).



**Figure II-6 :** Cellometer® Mini (Nexcelom Bioscience LLC)



**Figure II-7 :** Microscope Electronique (Nikon Eclipse E600)

Expression des résultats : L'inhibition de la croissance fongique (ICF) a été calculée en tant que concentration de spores par millilitre selon l'équation suivante (Robles et al., 2016):

$$ICF (\%) = \frac{C_g - T_g}{C_g} \times 100$$

Avec :

$C_g$  : La concentration moyenne dans l'échantillon de contrôle

$T_g$  : La concentration moyenne dans l'échantillon étudié.

### c- Dilution en Bouillon

La méthode de dilution en bouillon décrite par Bajpai and Kang (2010):

- Les échantillons étudiés sont constitués de Potato Dextrose Broth (PDB), de la suspension fongique choisie et de la solution d'HE testée.
- Le blanc contient le milieu PDB avec uniquement la suspension fongique.
- Le contrôle négatif contient le milieu PDB avec le DMSO (5%) et le Tween 80 (0,5%).
- Les mélanges ont été homogénéisés et incubés à 30 ° C dans un incubateur agitateur Heidolph Unimax 1010 (figure II-8).



**Figure II-8** : Incubateur agitateur Heidolph Unimax 1010

Après 7 jours d'incubation, les premiers tubes présentant une inhibition totale (par rapport aux témoins) ont été réensemencés dans des boîtes contenant un nouveau milieu de culture PDA. La croissance a été surveillée pendant 1 à 4 jours, à une température de 30 °C. S'il y a une reprise de la croissance du mycélium, l'HE testée possède une activité fongistatique, sinon fongicide (Bajpai and Kang, 2010; Mohammedi, 2013).

#### **d- Dilution en Agar**

C'est une méthode de dilution utilisée afin de déterminer la valeur de la concentration qui inhibe 50% de la croissance mycélienne (IC<sub>50</sub>) (Robles et al., 2016; Su et al., 2006) selon les étapes suivantes :

- Introduire 10 mL de PDA fondu avec 0,25 mL de DMSO contenant diverses concentrations d'huile essentielle de marjolaine douce (15 à 0,6 mg/mL dans des tubes à essais).
- Homogénéiser et porter les mélanges à 45°C.
- Couler les contenus des tubes dans des boîtes de Pétri.
- Placer les disques de papier (Whatman N ° 40) au centre.
- Inoculer 40 µL de la solution fongique (10<sup>6</sup> spores/ml) de manière aseptique sur le disque.
- Incuber les boîtes de Pétri à 30 °C jusqu'à ce que le blanc atteigne le maximum de croissance.

La valeur de l'IC<sub>50</sub> (%) a été calculée graphiquement à partir de la courbe : les abscisses représentent la concentration de l'huile essentielle et l'ordonnée le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du champignon.

## Conclusion

Ce chapitre détaille les méthodes et le matériel utilisés pour analyser la composition chimique de la plante étudiée et tester les activités biologiques de l'huile essentielle d'*Origanum majorana* L.

Une première partie dans laquelle nous avons présenté tout d'abord le dispositif d'extraction par hydrodistillation mis en œuvre pour obtenir les huiles volatiles d'*Origanum majorana* L. Ensuite, nous avons décrit la technique de déterpénation par distillation sous pression réduite.

La seconde a exposé le principe et le mode opératoire des méthodes d'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle brute et déterpénée :

- ✓ La Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC-MS).
- ✓ L'Infrarouge à Transformation de Fourier (FT-IR).

La dernière partie a porté sur les conditions de travail et les techniques utilisées pour évaluer:

- ✓ L'effet antioxydant par la méthode du DPPH et la quantification des polyphénols totaux.
- ✓ L'activité antibactérienne contre huit souches de bactéries : *Staphylococcus aureus* (Staph 25), *Pseudomonas Fluorescens* (AH2), *Escherchia coli* (E.coli), *Salmonella typhymurium* (S.typhy), *Pseudomonas aeruginosa* (P.aeru), *Candida albicans* (C.albi), *Vibrio alginolyticus* (V.algi) et *Vibrio anguillarum* (V.angui).
- ✓ L'effet antifongique contre l'*Aspergillus niger* (A. niger), *Aspergillus penicillioides* (A. penicillioides), *Rizopus oryzae* (R.oryzae) et *Rizopus stolonifier* (R.stolonifier).

## Les références

- Adams, R.P., Sparkman, O.D., 2007. Review of Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom* 16, 803-06.
- Aiche-Iratni, G., 2016. Activités biologiques, d'intérêt médical, d'extraits de feuilles de pistacia lentiscus et d'origanum majorana. Doctoral dissertation, Université Mouloud MAMMARI.
- Appalasaamy, S., Lo, K.Y., Ch'ng, S.J., Nornadia, K., Othman, A.S., Chan, L.-K., 2014. Antimicrobial activity of artemisinin and precursor derived from in vitro plantlets of *Artemisia annua* L. *Biomed Res. Int.* 2014, 215872.
- Bajpai, V.K., Kang, S.C., 2010. Antifungal Activity of Leaf Essential Oil and Extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 87, 327–336.
- Barnett, H.L., Hunter, B.B., 2013. *Illustrated genera of imperfect fungi*, 4th ed. ed. APS Press.
- Bouyahya, A., Abrini, J., Bakri, Y., Dakka, N., 2017. Screening phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'*Origanum compactum*. *Phytothérapie* 15, 379–383.
- Gullon, B., Pintado, M.E., Pérez-Álvarez, J.A., Viuda-Martos, M., 2016. Assessment of polyphenolic profile and antibacterial activity of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-product of juice extraction. *Food Control* 59, 94–98.
- Mohammedi, Z., 2013. Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie. Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat en Biologie, Faculté des Sciences, Algérie.
- Moreira, M.R., Ponce, A., del Valle, C.E., Roura, S.I., 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborns pathogen. *LWT - Food Sci. Technol.* 38, 565–570.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. Ailsa D., 2009. *Fungi and food spoilage*. Springer-Verlag.
- Ponce, A.G., Fritz, R., del Valle, C., Roura, S.I., 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT - Food Sci. Technol.* 36, 679–684.

- Robles, E., Salaberria, A.M., Herrera, R., Fernandes, S.C.M., Labidi, J., 2016. Self-bonded composite films based on cellulose nanofibers and chitin nanocrystals as antifungal materials. *Carbohydr. Polym.* 144, 41–49.
- Romero, S.M., Comerio, R.M., Larumbe, G., Ritieni, A., Vaamonde, G., Fernández Pinto, V., 2005. Toxigenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 104, 43–49. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2005.04.001>
- Siripornvisal, S., Rungprom, W., Sawatdikarn, S., 2009. Asian Journal of Food and Agro-Industry Antifungal activity of essential oils derived from some medicinal plants against grey mould (*Botrytis cinerea*). *As. J. Food Ag-Ind* 229–233.
- Smith, B., 2011. *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Second Edition.* CRC Press.
- Su, Y.-C., Ho, C.-L., Wang, E.I.-C., Chang, S.-T., 2006. Antifungal Activities and Chemical Compositions of Essential Oils from Leaves of Four Eucalypts, *Taiwan J For Sci.* 1 (1), 49-61
- Toma, F.M., Abdulla, N.Q.F., 2013. Isolation and identification of fungi from spices and medicinal plants. *Res. J. Environ. Earth Sci.* 5, 131–138.

# CHAPITRE III

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

Ce chapitre explicite les résultats expérimentaux obtenus lors des travaux de recherche qui font l'objet de cette thèse. Il se compose de trois parties :

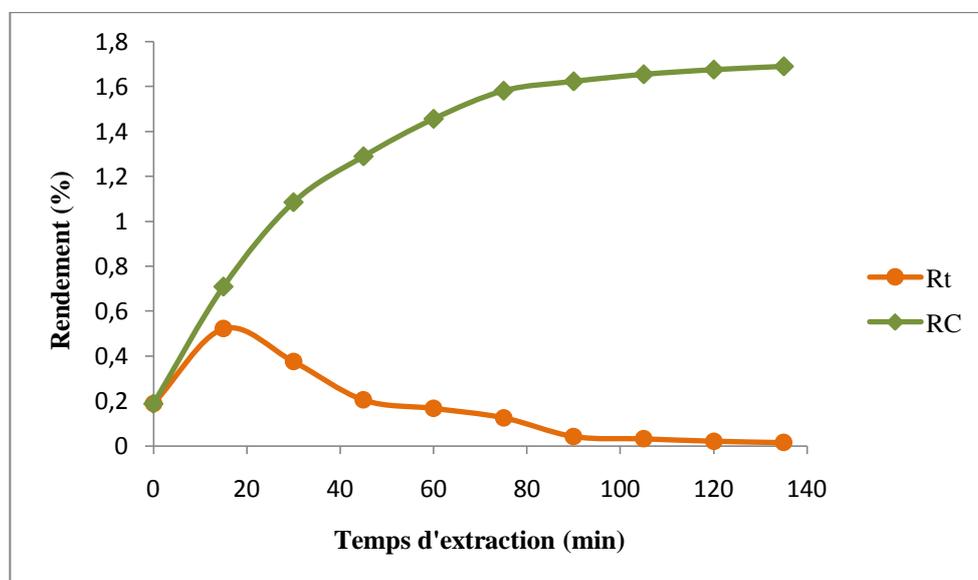
1. Une première partie est consacrée à l'étude de la cinétique d'extraction par hydrodistillation, ainsi qu'à l'évaluation de la variabilité quantitative et qualitative des huiles essentielles d'*O. majorana* en fonction du temps d'extraction.
2. La seconde élucidera la technique de distillation sous pression réduite utilisée pour déterpéner l'huile essentielle (HE) de la marjolaine. Puis, la composition chimique des fractions obtenues est évaluée par deux techniques : GC-MS et FT-IR.
3. La troisième portera sur l'étude des activités biologiques (antioxydante, antibactérienne et antifongique) de l'HE d'*Origanum majorana* L. et ses fractions. Une comparaison des effets biologiques de l'HE brute par rapport aux fractions obtenues par distillation sous pression réduite est réalisée.

### III-1 Hydrodistillation; cinétique et variabilité quantitative et qualitative des huiles essentielles d'*O. majorana*

#### III-1-1 Etude de la cinétique d'extraction d'HE

La durée d'extraction est un facteur très significatif dans le processus d'extraction. Les chercheurs et les industriels de divers pays ont signalé différents temps de l'hydrodistillation (THD) pour les espèces de la marjolaine. Cependant, il n'y a aucun rapport sur le THD optimal (Valtcho et al., 2012).

Afin de fixer la durée d'extraction optimale et d'éviter les pertes du temps et d'énergie, le suivi de la cinétique d'extraction par hydrodistillation de l'huile essentielle d'*O. majorana* est réalisé en fonction du temps et les résultats du rendement (Rt) et du rendement cumulé (RC) sont représentés dans la figure III-1.



**Figure III-1:** Rendement (Rt) et rendement cumulé (RC) d'*O. majorana* en fonction du temps d'extraction

**Tableau III-1 :** Le rendement et le rendement cumulé en fonction du temps d'extraction

Temps d'extraction (min)	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135
<b>Rendement (Rt)</b>	0,19	0,52	0,37	0,20	0,17	0,12	0,05	0,04	0,03	-
<b>Rendement cumulé (RC)</b>	0,19	0,71	1,08	1,29	1,46	1,58	1,63	1,67	1,70	1,70

Le rendement d'extraction en HE est exprimé en pourcentage massique (%), il est le rapport entre la masse d'huile obtenue et la masse de la matière végétale sèche (Akrouit, 2004).

Les résultats montrent que l'extraction passe par trois étapes :

- Une première étape d'extraction (00-15 min), correspondant à l'épuisement rapide de la matrice végétale et un maximum de rendement d'extraction atteint à 15 min.
- Une deuxième étape (15-120 min) qui se traduit par un ralentissement et une diminution de Rt.
- Au-delà de 120 min, il n'y a aucun rendement d'extraction noté.

D'où, on peut déduire que le RC d'extraction en huile essentielle de la partie aérienne d'*O. majorana* hydrodistillée atteint un maximum de l'ordre de 1,7 % à un temps optimal correspond à 120 min. Les études de l'HE d'*O. majorana* de la Tunisie a révélé des THD et des RC varient selon la région et qui sont présentés dans le tableau III-2 (Sellami et al., 2009, Baâtour et al., 2012b, Ezzeddine et al., 2001, Hajlaoui et al., 2016). D'autre part, l'étude de l'huile essentielle de la marjolaine canadienne de Kahouli (2010) a abouti à un RC de 0,66 % et celle d'Olfa et al. (2009) a donné un très faible rendement de 0,12 % dans un THD égale à 105min.

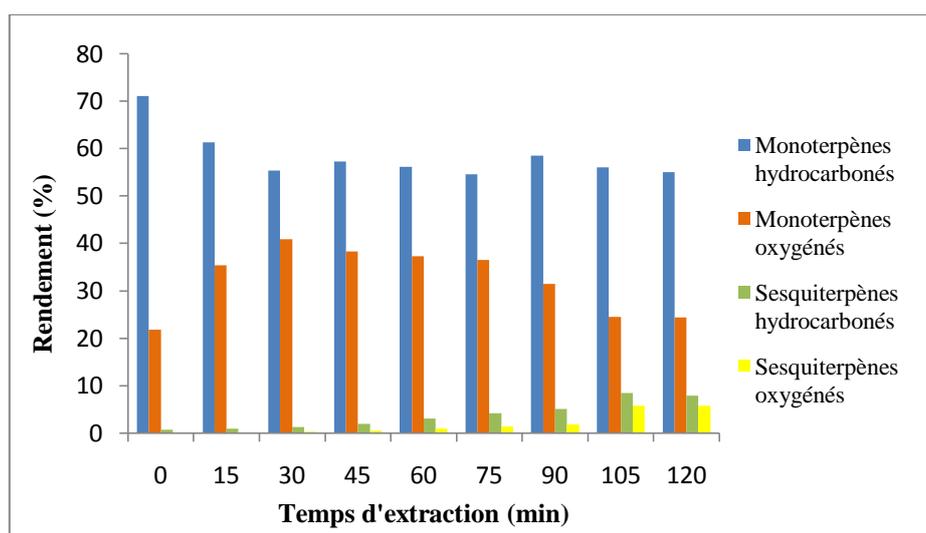
Par conclusion, il existe, parfois, des similarités ou des différences des rendements cumulés d'extraction et des temps de l'hydrodistillation qui varient principalement en fonction de la région de la matière végétale, mais dépendent également du stade de la récolte, de sous espèce de la famille de la plante, etc (Lagunez Rivera, 2006; Zeković et al., 2009).

**Tableau III-2** : La variation de THD et de RC de l'HE de la marjolaine dans quelques régions en Tunisie

Région	THD	RC	Référence
Sfax	240 min	1,4%	Ezzeddine et al., 2001
Soliman	105 min	0,04-0,09%	Sellami et al., 2009
Soliman	90 min	0,8%	Baâtour et al., 2012b
Zagouan	180 min	1,85%	Hajlaoui et al., 2016

### III-1-2 Variation de la composition chimique à différents temps d'extraction

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) a été utilisée pour évaluer l'effet du temps d'extraction par hydrodistillation (de 0 à 120 min) sur la composition d'huile essentielle de la marjolaine. La concentration de la famille des monoterpènes hydrocarbonés d'HE à bas point d'ébullition était la plus élevée (71,08-61,36%) au plus court THD (00-15 min), réduite (55,43%) à 30 min, puis elle s'était basculée entre 54 et 58% avec l'augmentation de THD jusqu'à la fin de l'extraction. Cependant, la concentration des monoterpènes oxygénés était la plus élevée entre 30 et 75 min mais elle n'a pas dépassé 41% dans toutes les fractions d'huile (figure III-2, tableau III-3).



**Figure III-2:** Rendement des familles des terpènes d'*O. majorana* en fonction du temps d'extraction

**Tableau III-3 :** Variation du rendement des familles de terpènes de l'HE de la marjolaine en fonction du temps d'extraction.

Temps d'extraction	Monoterpènes hydrocarbonés	Sesquiterpènes hydrocarbonés	Monoterpènes oxygénés	Sesquiterpènes oxygénés
<b>T0</b>	71,076%	0,641%	21,799%	0,000%
<b>T15</b>	61,362%	0,862%	35,439%	0,096%
<b>T30</b>	55,433%	1,291%	40,925%	0,281%
<b>T45</b>	57,297%	1,947%	38,357%	0,471%
<b>T60</b>	56,149%	3,062%	37,292%	0,968%
<b>T75</b>	54,616%	4,162%	36,568%	1,378%
<b>T90</b>	58,538%	5,082%	31,459%	1,799%
<b>T105</b>	56,070%	8,435%	24,513%	5,751%
<b>T120</b>	55,098%	7,835%	24,339%	5,717%

La concentration de la famille des sesquiterpènes (hydrocarbonés et oxygénés), les plus lourds terpènes à haute point d'ébullition (Malecky, 2008), a augmenté régulièrement avec l'augmentation de THD jusqu'à la fin de l'extraction.

La variation de la composition chimique et du rendement des constituants en fonction du temps d'extraction a été présentée dans le tableau III-4.

**Tableau III-4:** Composition chimique de l'huile essentielle d'*O. majorana* à différents temps d'extraction (T0 à T120)

TR	Composés	T0 (%)*	T15 (%)	T30 (%)	T45 (%)	T60 (%)	T75 (%)	T90 (%)	T105 (%)	T120 (%)
6,23	thujene	3,96	2,16	2,59	2,84	2,81	2,37	2,31	1,83	1,72
6,40	$\alpha$ - pinene	1,58	0,81	1,02	1,16	1,23	1,06	1,07	0,93	0,84
6,79	camphene	0,15	0,082	0,10	0,11	0,11	-	0,10	-	-
7,57	sabinene	9,41	6,45	5,51	4,94	3,95	3,36	3,24	2,09	2,17
7,63	$\beta$ - pinene	0,69	0,46	0,52	0,55	0,55	0,49	0,50	0,44	0,40
8,07	$\beta$ - myrcene	2,18	1,49	1,67	1,76	1,75	1,60	1,72	1,71	1,57
8,45	$\alpha$ -phellandrene	0,48	0,42	0,61	0,75	0,81	0,75	0,9	0,84	0,98
8,90	$\alpha$ -terpinene	11,06	10,33	11,51	12,35	11,74	10,95	12,65	9,58	9,86
9,12	p-cymene	3,61	2,71	2,96	3,54	4,44	5,31	3,37	9,05	9,41
9,27	$\beta$ - phellandrene	4,79	4,13	4,52	5,02	5,17	5,09	5,49	5,37	5,47
9,88	$\beta$ - ocimene	-	-	-	-	-	-	0,07	-	-
10,31	$\gamma$ -terpinene	13,49	14,13	16,22	18,18	18,25	18,30	21,17	18,44	19,62
10,55	trans-sabinene hydrate	4,70	3,57	1,06	0,54	0,32	0,30	0,28	0,15	-
11,22	$\alpha$ -terpinolene	3,04	3,21	3,79	4,13	4,36	4,4	5,12	5,47	5,82
11,66	cis-sabinene hydrate	12,04	11,39	3,34	1,42	0,68	0,62	0,55	0,18	0,18
11,60	linalool	-	-	-	1,04	0,90	0,78	0,74	0,49	0,56
12,33	trans-p-menth-2-en-1-ol	1,35	1,93	1,19	1,72	1,61	1,5	1,35	1,06	1,11
12,94	1-terpineol	0,71	1,16	2,03	1,2	1,11	1,12	0,91	0,82	0,73
13,22	(3E)-2,3-Dimethyl-1,3-heptadiene	-	-	1,36	-	-	0,20	-	-	-
13,25	1,4-dimethyl- $\delta$ -3-tetrahydroacetophenone	-	-	-	-	-	-	-	0,24	-
13,84	endo-borneol	-	0,19	0,21	0,19	0,21	0,21	0,20	-	-
14,35	terpinène-4-ol	15,55	25,273	27,61	25,86	24,21	23,44	19,92	13,77	13,97
14,70	$\alpha$ -terpinol	3,50	5,58	6,83	6,75	7,37	7,39	6,40	5,14	5,14
14,82	trans-piperitol	0,41	0,62	0,65	0,57	0,58	0,59	0,55	0,48	0,48

15,06	dihydrocarvone	-	0,08	0,08	0,07	-	-	0,64	-	-
15,18	cis-piperitol	0,32	0,59	-	0,66	0,69	0,71	-	0,62	0,62
15,68	iso-ascaridole	-	-	-	-	-	0,16	-	0,15	0,15
16,26	carvone	-	-	0,73	0,10	0,12	0,13	0,14	0,19	0,19
16,52	fenchyl acetate	0,21	-	0,10	0,35	-	-	-	-	-
16,61	linalyl acetate	0,72	0,83	0,58	0,10	0,36	0,41	0,34	0,58	0,58
16,95	cyclonol	-	-	-	-	0,11	0,22	-	-	-
17,42	bornyl acetate	-	0,08	0,10	0,10	0,19	0,28	0,16	0,56	0,57
17,70	2-undecanone	3,97	0,28	0,14	1,26	0,19	-	0,28	0,54	0,54
17,83	4-terpenyl acetate	0,69	1,04	1,25	0,19	1,51	1,8	1,84	2,50	2,50
17,91	carvacrol	-	-	-	0,11	0,37	0,51	0,6	1,24	1,24
18,78	bicycloelemene	-	-	-	-	-	0,09	-	-	-
19,07	alpha-terpinéol acetate	-	-	-	-	-	-	0,07	0,11	0,11
19,45	neryl acetate	-	-	-	-	0,09	0,14	0,13	0,26	0,27
19,92	geranyl acetate	-	-	0,13	-	0,18	0,23	0,30	0,65	0,64
20,17	2-dodecanone	0,17	-	-	-	-	-	-	-	-
20,79	caryophyllene	0,3	0,44	0,71	1,04	1,61	2,18	2,61	4,87	4,87
21,23	aromandendrene	-	-	-	0,06	0,11	0,15	0,18	0,47	0,47
21,56	$\alpha$ -humulene	-	-	-	-	0,09	0,12	0,15	0,28	0,28
22,43	2-tridecanone	0,27	0,43	0,58	0,84	-	-	-	-	-
22,50	bicyclogermacrene	0,34	0,064	0,17	0,28	1,25	1,62	2,14	2,81	2,81
24,19	(+) spathulenol	-	0,033	0,11	0,19	0,50	0,77	0,88	2,65	2,65
24,30	caryophyllene oxide	-	-	-	-	0,33	0,45	0,56	1,44	1,44
24,48	veridiflorol	-	-	-	-	-	-	0,09	0,30	0,29
24,68	3-carène-2,5-dione	-	-	-	-	-	-	-	0,21	0,20
24,82	(-)-allospathulenol	-	-	-	-	-	-	-	0,23	0,23
25,08	1,6,6-trimethylbicyclo (3.3.0)oct-8-en-2-one	-	-	-	-	-	-	-	0,12	0,19
25,37	isospathulenol	-	-	-	-	0,14	0,15	0,26	0,96	0,99
25,98	7-phenylheptanol-3	0,29	-	-	-	-	-	-	-	-
25,99	valerenol	-	-	-	-	-	-	-	0,18	-

Les fragments obtenus de l'HE à différents temps d'extraction (T0-T120) ont été analysés par GC-MS. La détermination de la composition chimique (%) a été basée sur la normalisation de la surface de pic sans utiliser des facteurs de correction. 54 composés ont été

identifiés et présentés dans le tableau III-2. Les composés présents dans les fragments d'HE de marjolaine sont principalement : terpinène-4-ol,  $\gamma$ -terpinène,  $\alpha$ -terpinène, cis-sabinène hydrate et sabinène et varient entre (27,61-13,77%), (21,17-13,49%), (12,65-9,58%), (12,04-0,18%) et (9,41-2,09%) respectivement.

L'étude de la variation de la composition chimique des fragments de l'HE de la marjolaine a montré que :

- Le temps d'hydrodistillation peut être utilisé pour obtenir une huile essentielle de marjolaine de composition différentielle.
- Malgré la différence de la composition terpénique des fragments de l'HE de la marjolaine à différents THD, on ne peut pas obtenir une huile essentielle déterpénée.

## **III-2 Déterpénation de l'HE d'*O. majorana* par distillation sous pression réduite**

### **III-2-1 Fractionnement**

Le choix de la méthode de distillation sous pression réduite ou distillation sous vide a été basé sur les raisons suivantes :

- Originalité de la technique étant donné qu'elle est utilisée pour la première fois dans le monde pour déterpéner l'huile essentielle d'*O. majorana* L. (Ben Salha et al., 2017).
- Une technique verte, disponible et simple.
- Cette méthode a prouvé son efficacité pour déterpéner les huiles essentielles de citrus (Perini et al., 2017; Silvestre et al., 2016).

La distillation sous vide d'*O. majorana* a été effectuée à une pression constante égale à 10 mmHg au laboratoire « Synthèse Organique Sélective et Hétérocyclique-Evaluation de l'activité biologique-SOHES » sous la direction du professeur Mohamed Lotfi Efrat à la faculté des sciences de Tunis que nous le remercions profondément. Les résultats sont représentés dans le tableau III-5.

**Tableau III-5** : Masses et températures d'ébullition des fractions obtenues par distillation sous pression réduite

Echantillons	HE brute	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3
Masse (g)	22,00	8,88	10,13	0,99
T. d'ébullition (°C)	-	52-54	70-72	84-86

L'HE brute et les trois fractions (F1, F2 et F3) obtenues ayant des colorations variables allant du jaune clair au jaune relativement foncé, mais ayant toujours une forte et persistante odeur caractéristique d'*O. majorana*.

### III-2-2 Etude de la composition chimique (GC-MS et FT-IR)

#### III-2-2-1 GC-MS

Dans 99,93% de l'huile essentielle brute (HEB), 38 composés ont été identifiés et présentés dans le tableau III-6. L'HEB contient un mélange complexe de monoterpènes oxygénés (47,36%), d'hydrocarbures de monoterpènes (50,70%) et d'une petite quantité d'hydrocarbures sesquiterpéniques (4,94%). Elle est composée majoritairement de terpinène-4-ol (27,32%) suivie par  $\gamma$ -terpinène (15,67%) et  $\alpha$ -terpinène (11,08%).

Dans le monde, les résultats obtenus sont en accord avec la plupart des travaux antérieurs qui ont indiqué que l'HE de la marjolaine est caractérisée par la présence de terpinène-4-ol en tant que composant majeur (Banchio et al., 2008; Sellami et al., 2009). En effet, le chémotype de terpinène-4-ol de la marjolaine pourrait être présenté avec de l'hydrate de cis-sabinène ou des hydrocarbures monoterpéniques tels que le p-cymène et le  $\gamma$ -terpinène, alors que le thymol et le carvacrol existent en quantités négligeables (Banchio et al., 2008; Hajlaoui et al., 2016; Sellami et al., 2009; Vági et al., 2005).

En Tunisie, l'huile essentielle de la marjolaine est présentée également par le terpinène-4-ol toujours accompagné par l'hydrate de cis-sabinène avec soit l'hydrate de trans-sabinène, soit le  $\alpha$ -terpinéol (9,9 %) (Sellami et al., 2009, Hajlaoui et al., 2016, Ezzeddine et al., 2001, Baâtour et al., 2012b) (tableau I-3).

Généralement, les variations quantitatives et qualitatives de l'essence de l'*O. majorana* dépendent de plusieurs facteurs environnementaux et peuvent être influencées

par le type de localisation géographique, la période de récolte et les conditions d'extraction de la matière végétale (Baranauskaitė et al., 2016; Bejaoui et al., 2013; Béjaoui et al., 2013).

**Tableau III-6** : La composition chimique d'huile essentielle de la marjolaine identifiée par GC-MS, le temps de rétention (TR), la surface (%) et la famille générique

TR	Composés	HEB (%)	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)
6,21	tujene	2,24	4,12	-	-
6,39	$\alpha$ -pinene	0,87	1,61	-	-
6,79	camphene	0,08	-	-	-
7,52	sabinene	5,53	11,17	-	-
7,60	$\beta$ -pinene	0,46	0,90	-	-
8,05	$\beta$ -myrcene	1,62	2,77	-	-
8,44	$\alpha$ -phellandrene	0,58	0,95	-	-
8,87	$\alpha$ -terpinene	11,08	21,15	1,48	0,18
8,88	o- cymene	-	5,20	0,64	0,15
9,08	p-cymene	2,76	-	-	-
9,23	$\beta$ -phellandrene	4,36	7,81	0,87	0,51
9,88	$\beta$ -ocimene	0,06	-	-	-
10,27	$\gamma$ -terpinene	15,67	27,53	7,08	-
11,20	$\alpha$ -Terpinolene	3,82	-	2,03	3,43
10,47	hydrate de trans-sabinene	1,58	1,30	2,84	0,44
11,53	hydrate de cis-sabinene	4,52	1,88	10,00	5,79
11,60	linalool	1,16	0,39	1,82	0,67
12,30	trans-p-menth-2-enol	2,05	-	3,13	1,90
12,92	1-terpineol	1,36	0,52	1,86	2,76
13,85	endo-borneol	0,23	-	-	0,46
14,35	terpinène-4-ol	27,32	7,30	54,39	48,60
14,40	$\beta$ -fenchyl alcohol	-	-	9,63	23,84
14,50	p-cymen-8-ol	0,08	-	-	-
14,70	$\alpha$ -terpinol	6,90	0,66	-	-
14,81	trans-piperitol	0,64	-	0,57	2,61
15,05	dihydrocarvone	0,08	-	-	-
15,17	cis-piperitol	0,73	-	0,82	1,79
16,24	carvone	0,12	-	-	-

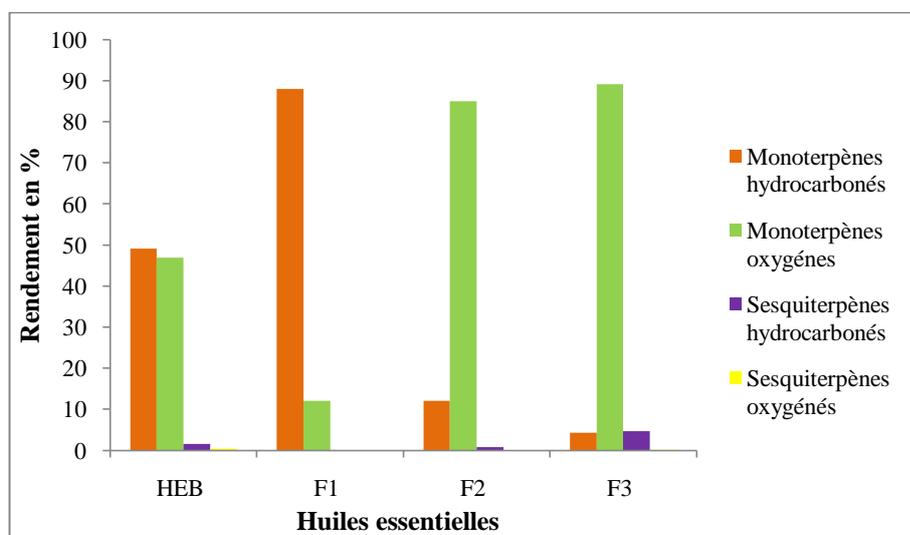
17,89	carvacrol	0,21	-	-	-
14,23	thymol	-	-	-	0,30
20,78	caryophyllene	0,83	-	0,80	2,70
21,23	aromandendrene	0,05	-	-	0,33
21,55	$\alpha$ -humulene	0,05	-	-	-
22,50	bicyclo-germacrene	0,65	-	-	1,68
24,18	spathulenol	0,24	-	-	0,20
24,30	caryophylleneoxide	0,15	-	-	-
16,60	linalylacetate	0,56	-	0,65	1,23
17,41	bornylacetate	0,09	-	-	0,26
17,61	$\alpha$ -terpenylpropionate	-	-	1,39	-
17,81	$\alpha$ -terpenylacetate	1,03	-	-	-
19,45	nerylacetate	0,05	-	-	-
19,91	geranylacetate	0,12	-	-	0,18
Terpènes hydrocarbonés (%)		50,70	87,92	12,90	8,98
Terpènes oxygenés (%)		47,36	12,05	85,06	88,86

La composition chimique de l'HE d'*O. majorana* varie de manière significative avec les différentes fractions. La première fraction (F1) comporte 16 composés dont  $\gamma$ -terpinène (27,53%),  $\alpha$ -terpinène (21,15%) et sabinène (11,17%) sont les constituants principaux. La deuxième fraction (F2) est caractérisée par 17 composés constitués essentiellement de terpinène-4-ol (54,39%), hydrate de cis-sabinène (10,00%) et alcool bêta-fenchylique (9,63%). Enfin, 22 composés ont été identifiés dans la troisième fraction (F3) tels que : terpinène-4-ol (48,60%), hydrate de cis-sabinène (5,79%) et  $\alpha$ -terpinolène (3,43%) sont les composants principaux.

**Tableau III-7** : Les teneurs des composés majoritaires dans l'HEB, la F1, F2 et F3

Les composés majoritaires	Terpinène-4-ol	$\gamma$ -terpinene	$\alpha$ -terpinene	$\alpha$ -terpinol	Sabinène	Hydrate de cis-sabinène
<b>HEB</b>	27,32%	15,67%	11,08%	6,90%	5,53%	4,52%
<b>F1</b>	7,30%	27,53%	21,15%	0,66%	11,17%	1,88%
<b>F2</b>	54,39%	7,08%	1,48%	-	-	10,00%
<b>F3</b>	48,60%	-	0,18%	-	-	5,79%

Selon la figure III-3 et le tableau III-8, l'augmentation de la quantité des monoterpènes oxygénés et la diminution intéressante de la concentration des hydrocarbures de monoterpènes en F2 et F3 par rapport à l'HEB, permettent de les classer comme des fractions déterpénées de l'huile essentielle de la marjolaine.



**Figure III-3 :** Variation du rendement des familles de terpènes de l'HE de la marjolaine en fonction de l'HEB, F1, F2 et F3

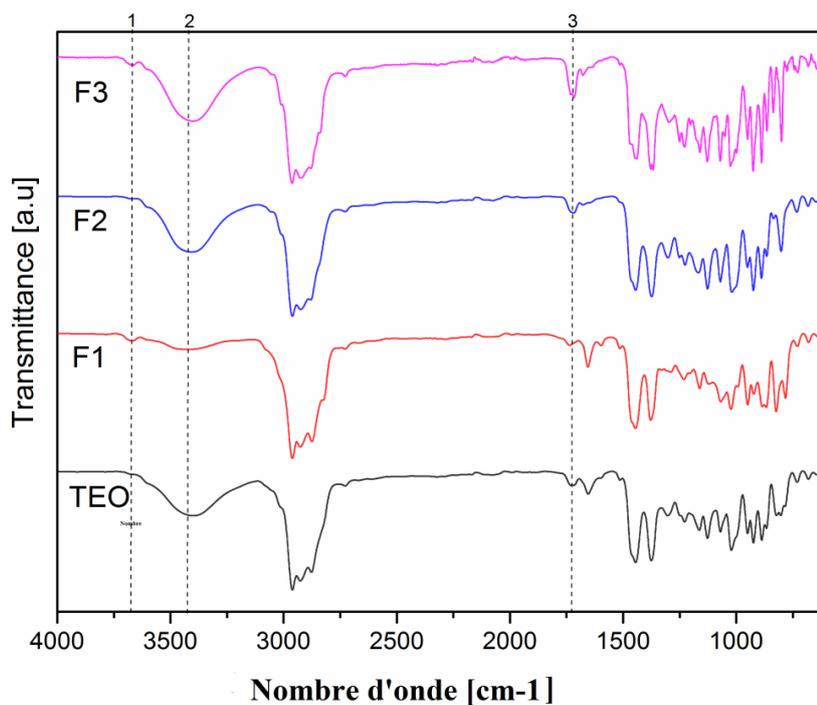
**Tableau III-8 :** La composition chimique d'HEB, F1, F2 et F3 en monoterpènes hydrocarbonés, monoterpènes oxygénés, sesquiterpènes hydrocarbonés et sesquiterpènes oxygénés

Huile essentielle	HEB	F1	F2	F3
<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>	49,12 %	87,92 %	12,10 %	4,27 %
<b>Monoterpènes oxygénés</b>	46,97 %	12,05 %	85,06 %	89,16 %
<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>	1,58 %	-	0,80 %	4,71 %
<b>Sesquiterpènes oxygénés</b>	0,38 %	-	-	0,20 %

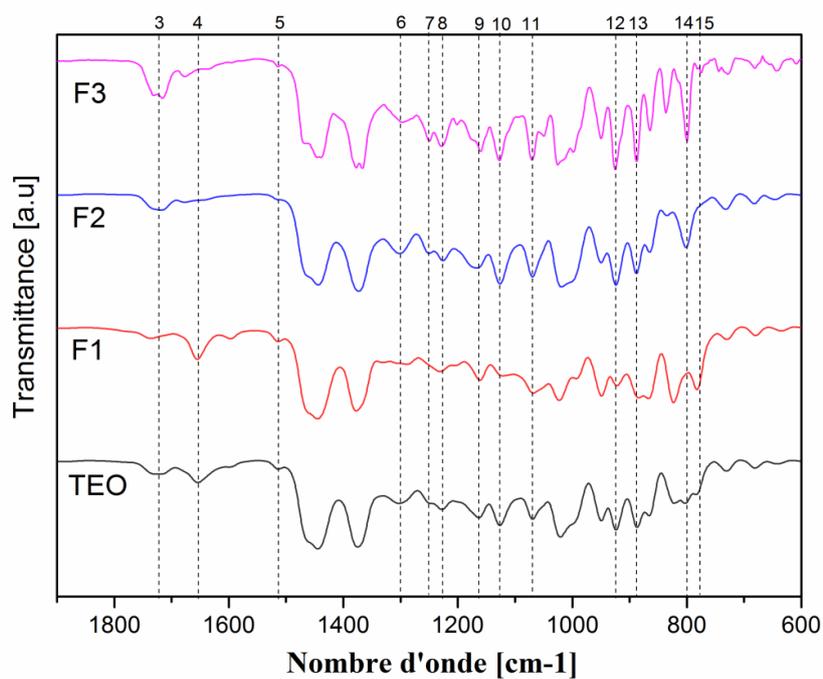
### III-2-2-2 FT-IR

L'objectif de l'analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) était de valider les résultats de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Selon des études antérieures menées sur diverses huiles essentielles de marjolaine, les spectres FT-IR sont dominés par des harmoniques et par plusieurs combinaisons de vibrations d'étirement C-H ( $1600$  et  $1800\text{ cm}^{-1}$ ) (Schulz et al., 2004). La gamme spectrale de l'HEB, la F1, F2 et F3 note une différence significative des bandes

caractéristiques. Par conséquent, la distinction qualitative des différentes fractions est aussi possible par jugement visuel (Figures III-4 et III-5).



**Figure III-4 :** Les spectres FT-IR de l'HEB, la F1, F2 et F3 d'HE d'*O. majorana* dans la région (4000-600  $\text{cm}^{-1}$ )



**Figure III-5 :** La région du spectre assigné comme empreinte digitale des échantillons étudiés de l'HE de la marjolaine

Les bandes les plus caractéristiques sont présentées dans le tableau III-9. Les principales différences ont été observées en F1 par rapport aux autres échantillons, ainsi son spectre est marqué par :

- Les plus faibles intensités des bandes O-H, en particulier celles N° 2 et 7 et les bandes C-O N° 1, 3, 7, 8 et 9.
- La plus intense bande C-H N° 15 ( $780\text{ cm}^{-1}$ ) qui confirme la richesse de cette fraction en hydrocarbures terpéniques.

D'autre part, les bandes N° 4 et 5, qui apparaissent respectivement à  $1654$  et  $1513\text{ cm}^{-1}$ , caractérisent la présence des vibrations C=C d'alcènes et des cycles aromatiques. Ces bandes sont visibles dans tous les échantillons analysés de l'HE mais légèrement intenses aux spectres de deuxième et troisième fractions dans lesquelles prévalent les bandes caractéristiques des composés oxygénés. En effet, la présence des bandes clés des groupements O-H et C-O dans les spectres des fractions déterpénées F2 et F3 a confirmé la prédominance des terpènes oxygénés tels que l'alcool, la cétone et les esters. Ces résultats sont en concordance avec les résultats de GC-MS.

**Tableau III-9 :** Les bandes caractéristiques des échantillons examinés, leur intensité, leur type de liaison, leur assignement du groupe fonctionnel et leur fréquence du groupe

P <sup>1</sup>	NV <sup>2</sup> (cm <sup>-1</sup> )	Intensité				TL <sup>3</sup>	AGF <sup>4</sup>	FG <sup>5</sup>
		HEB	F1	F2	F3			
1	3667	-	98,07	98,06	98,54	$\nu_{\text{O-H}}$	Alcool libre	3500-3670
2	3400	70,14	91,74	61,29	57,39	$\nu_{\text{O-H}}$	Alcool associé	3200-3500
3	1720	90,43	-	87,94	75,93	$\nu_{\text{C=O}}$	Ester/Cétone	1720±15
4	1654	86,09	77,97	98,34	96,61	$\nu_{\text{C=C}}$	Alcène	1600-1650
5	1513	95,22	90,31	99,82	99,85	$\nu_{\text{C=C}}$	Cycle aromatique	1500-1600
6	1300	70,43	79,21	58,01	56,65	$\delta_{\text{O-H}}$	Alcool	1200-1400
7	1249	70,41	77,55	58,25	42,39	$\nu_{\text{C-O}}$	Alcool	1050-1300
8	1226	65,78	96,98	52,82	38,55	$\nu_{\text{C-O}}$	Alcool	1050-1300
9	1162	59,50	63,12	47,17	34,73	$\nu_{\text{C-O}}$	Ester/Alcool	1150-1300
10	1126	53,07	66,81	35,37	27,92	$\nu_{\text{C-O}}$	Ester/alcool	1050-1300
11	1069	58,31	53,41	40,06	28,98	$\nu_{\text{C-O}}$	Alcool	1050±15
12	922	50,61	59,16	34,32	21,43	$\nu_{\text{C-H}}$	Alcène	675-995
13	887	52,26	49,87	43,23	27,91	$\delta_{\text{C-H}}$	Alcène	890±5
14	801	70,49	67,95	62,72	42,60	$\nu_{\text{C-H}}$	Alcène	675-995
15	780	78,21	55,94	94,00	94,31	$\nu_{\text{C-H}}$	Alcène	675-995

<sup>1</sup> Numéro de la bande; <sup>2</sup> Numéro de la vague; <sup>3</sup>Type de liaison; <sup>4</sup>Assignement du groupe fonctionnel; <sup>5</sup>Fréquence du groupe

### **III-3 Etude des activités biologiques de l'HE d'*O. majorana***

Pour chaque espèce végétale, chaque famille ou genre de plante, la nature des métabolites secondaires est à l'origine de leurs activités biologiques. Ces activités sont aussi apparentées à la teneur du composant terpénique ou l'ensemble des composants biologiquement actifs qui constituent leur essence. Parmi ces composants volatils, les terpènes oxygénés sont les principaux responsables de l'augmentation de la stabilité des huiles essentielles, ainsi que de la valeur commerciale dans les différents secteurs industriels pharmaceutiques et agro-alimentaires en fonction de leur arôme, leur qualité et leur bio-utilisation (Perini et al., 2017; Silvestre et al., 2016). Ainsi l'évaluation et la comparaison des activités biologiques des fractions déterpénées riches en composés oxygénés par rapport à l'huile essentielle brute s'avèrent nécessaire.

#### **III-3-1 Evaluation de l'activité antioxydante**

##### **III-3-1-1 Mesure du pouvoir antioxydant par piégeage du radical DPPH•**

De nos jours, la recherche des nouvelles molécules antioxydantes d'origine naturelle est devenue un enjeu scientifique à cause des effets secondaires potentiels des antioxydants synthétiques (Herodež et al., 2003). Les plantes représentent un réservoir immense et renouvelable de ces molécules bioactives. Cette étude s'inscrit dans ce cadre et consiste à étudier les huiles essentielles d'*O. majorana* brutes et déterpénées en tant qu'antioxydants naturels. L'activité antioxydante est déterminée par la méthode de DPPH qui consiste à mesurer, indirectement, la capacité de l'HE à inhiber la génération des radicaux par donation d'un atome d'hydrogène. Le radical stable 1,1-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH•) possède une couleur violette foncée, qui devient jaunâtre lorsqu'il est réduit par un antioxydant (AH) selon le mécanisme suivant :



Le suivi de la variation de l'intensité est réalisé par spectrométrie à 517 nm et les résultats sont exprimés en  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/L}$ ) qui représente la concentration d'huile essentielle requise pour réduire 50% de la quantité initiale de DPPH. L'antioxydant de référence est le trolox. Les résultats obtenus de l'étude du pouvoir antioxydant des HES de la marjolaine sont illustrés dans le tableau III-10.

**Tableau III-10** : Pouvoir réducteur de l'HEB, la F1, F2 et F3 de la marjolaine et de trolox mesuré selon la méthode de DPPH

Echantillons	CI <sub>50</sub> (µg/L) *
<b>Trolox</b>	3,83 ± 0,04*
<b>HEB</b>	418,80 ± 37,65*
<b>F1</b>	1409,72 ± 136,16*
<b>F2</b>	1368,63 ± 35,45*
<b>F3</b>	1229,15 ± 120,13*

\* ANOVA à un facteur: la moyenne de la population est significativement différente au niveau 0,001.

Ces résultats révèlent que l'HEB, la F1, F2 et F3 ont des activités antioxydantes faibles étant donné que leurs valeurs de CI<sub>50</sub> sont très supérieures à celle de trolox (3,83 ± 0,04 µg/L). Ces effets pourraient être attribués à la faible activité antioxydante du composé majoritaire terpinène-4-ol (Hajlaoui et al., 2016; Salazar-Aranda et al., 2015). En outre, le pouvoir antioxydant est toujours lié au contenu d'huile en polyphénols (carvacrol et thymol) alors qu'il ne dépasse pas 0,3% dans tous les échantillons étudiés, d'où leurs faibles capacités antioxydantes (Kokkini et al., 1997). Une autre cause de la faible réduction des solutions de DPPH est probablement due à l'interaction de certains constituants de l'HE de la marjolaine par certaines réactions secondaires (Kulicic et al., 2004).

### III-3-1-2 Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols totaux sont dosés selon la méthode spectroscopique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. L'acide gallique est utilisé, à différentes concentrations, comme référence pour tracer la courbe d'étalonnage (Annexe 2). Les résultats regroupés dans le tableau III-11 sont exprimés en microgramme d'équivalent d'acide gallique par millilitre d'huile essentielle (µg EAG/mL HE).

**Tableau III-11** : Teneurs en polyphénols totaux dans l'HEB, la F1, F2 et F3

Echantillons	Polyphénols totaux (EAG)*
<b>HEB</b>	6,95 ± 0,46
<b>F1</b>	7,55 ± 0,11
<b>F2</b>	4,72 ± 0,30
<b>F3</b>	8,22 ± 2,55

\* µg/mL

Les résultats enregistrés montrent que les échantillons de l'HEB, la F1, F2 et F3 sont pauvres en polyphénols avec des valeurs qui varient de 4,72 à 8,22 µg EAG/mL HE. En effet, la teneur faible en ces métabolites est confirmée par la faible quantité qui varie entre 0 et 0,3% de carvacrol et de thymol dans tous les échantillons des HEs testées.

### III-3-2 Etude de l'activité antibactérienne

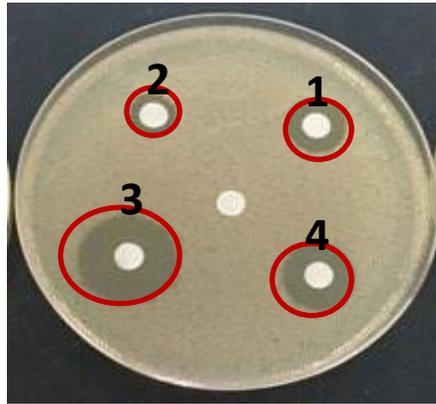
Historiquement, l'homme a utilisé son environnement et en particulier les plantes médicinales pour traiter différentes maladies. On estime que les deux tiers des médicaments actuels sont d'origine naturelle (Ismaili et al., 2014). Des études récentes ont montré que les HEs et leurs constituants ont un potentiel considérable en tant qu'agent antimicrobien et leur utilisation est liée à leur large spectre d'activités biologiques (Bakkali et al., 2008; Edris, 2007; Raut and Karuppayil, 2014; Thormar, 2010). Ces nouveaux remèdes naturels à faible coût ont contribué à diminuer l'incidence des maladies infectieuses surtout dans les pays développés (Soro et al., 2010).

Dans cette perspective, l'évaluation de l'activité antibactérienne de l'HE de la marjolaine et ses fractions obtenues par distillation sous pression réduite est faite vis-à-vis de huit souches de bactérie : *Staphylococcus aureus* (*Staph 25*), *Pseudomonas Fluorescens* (*AH2*), *Escherchia coli* (*E.coli*), *Salmonella typhymurium* (*S.typhy*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeru*), *Candida albicans* (*C.albi*), *Vibrio alginolyticus* (*V.algi*) et *Vibrio anguillarum* (*V.angui*). L'étude de cette activité a été réalisée au moyen du test simple de diffusion sur les disques stériles (aromatogrammes). L'activité antibactérienne est exprimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition qui traduit la sensibilité de la souche bactérienne testée contre l'échantillon étudié de l'huile essentielle d'*O. majorana*.

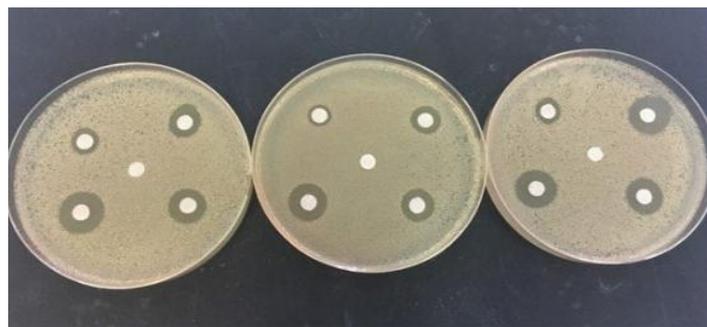
Les figures de III-7 à III-14 montrent la zone d'inhibition des échantillons des HEs contre les différentes souches de bactéries, y compris le diamètre du disque de papier (3 mm). Les expériences sont faites en triplicata comme le montrent les figures ci-contre.

La lecture des résultats se fait dans l'ordre indiqué dans la figure III-6 tels que :

- Le disque N° 1 est chargé par l'HEB.
- Le disque N° 2 est chargé par F1.
- Le disque N° 3 est chargé par F2.
- Le disque N° 4 est chargé par F3.
- Le disque au centre n'est pas chargé. Il est utilisé en tant que témoin négatif.



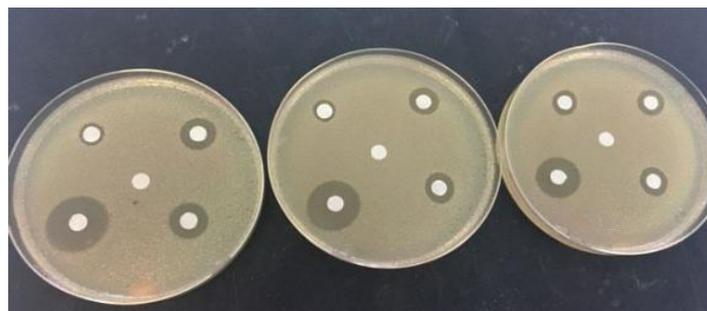
**Figure III-6 :** Ordre de la lecture des disques



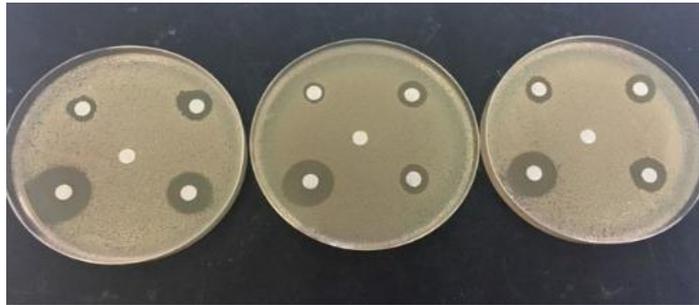
**Figure III-7 :** Effet de l'HEB, la F1, F2 et F3 sur la croissance de *Staphylococcus aureus* (Staph 25)



**Figure III-8 :** Effet de l'HEB, la F1, F2 et F3 sur la croissance de *Pseudomonas Fluorescens* (AH2)



**Figure III-9 :** Effet de l'HEB, la F1, F2 et F3 sur la croissance d'*Escherchia coli* (*E.coli*)



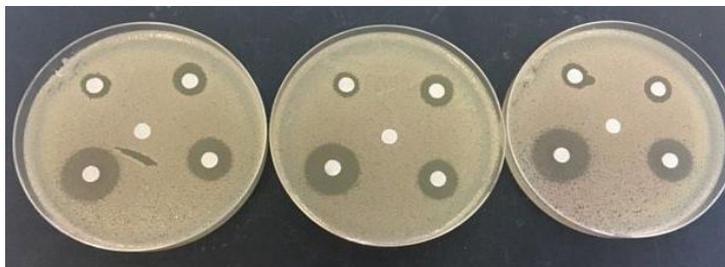
**Figure III-10 :** Effet de l'HEB, la F1, F2 et F3 sur la croissance de *Salmonella typhimurium* (*S.typhy*)



**Figure III-11 :** Effet de l'HEB, la F1, F2 et F3 sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeru*)



**Figure III-12 :** Effet de l'HEB, la F1, F2 et F3 sur la croissance de *Candida albicans* (*C.albi*)



**Figure III-13 :** Effet de l'HEB, la F1, F2 et F3 sur la croissance de *Vibrio alginolyticus* (*V.algi*)



**Figure III-14 :** Effet de l'HEB, la F1, F2 et F3 sur la croissance de *Vibrio anguillarum* (*V.angui*)

**Tableau III-12 :** Les diamètres des zones d'inhibition induites par l'HEB, la F1, F2 et F3 (3µL/mL) contre les huit souches de bactéries

Bactéries	Diamètres des zones d'inhibition (mm)			
	HEB	F1	F2	F3
<i>Staphylococcus aureus</i> ( <i>Staph 2</i> )	13,1	08,2	15,7	13,7
<i>Pseudomonas Fluorescens</i> ( <i>AH2</i> )	12,0	08,3	18,0	11,7
<i>Escherchia coli</i> ( <i>E.coli</i> )	12,1	08,0	18,0	11,7
<i>Salmonella typhimurium</i> ( <i>S.typhi</i> )	11,7	09,0	20,0	13,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ( <i>P.aeru</i> )	11,5	09,0	20,0	13,3
<i>Candida albicans</i> ( <i>C.albi</i> )	13,0	09,0	21,0	12,3
<i>Vibrio alginolyticus</i> ( <i>V.algi</i> )	11,3	10,0	20,1	15,0
<i>Vibrio anguillarum</i> ( <i>V.angui</i> )	11,3	10,0	20,0	15,0

Les résultats récapitulés dans le tableau III-12 représentent les moyennes de calcul de trois répétitions des diamètres des zones d'inhibition provoquées par l'HEB, la F1, F2 et F3. L'activité antibactérienne est décrite comme suit: extrêmement sensible (+++) pour les diamètres ( $\Phi$ ) >20 mm, très sensible (++) pour  $\Phi$  compris entre 15-19 mm ; sensible (+) pour  $\Phi$  compris entre 9-14 mm et aucune inhibition pour  $\Phi$  compris entre 6-8 mm (Moreira et al., 2005; Ponce et al., 2003).

Les résultats obtenus révèlent que les huiles essentielles de la marjolaine se comportent de la même manière contre la croissance des bactéries Gram + (*Staph 2*), les bactéries Gram – (*AH2*, *E.coli*, *S.typhi*, *P.aeru*, *V.algi*, *V.angui*) et la levure (*C.albi*). Ces résultats sont en désaccord avec plusieurs travaux antérieurs signalant que les agents antibactériens sont généralement plus actifs sur les bactéries Gram + comparativement aux bactéries Gram –. En effet, la résistance des bactéries Gram – est attribuée à la présence de la couche externe mais inexistante chez les Gram + (Aiche-Iratni, 2016). Cette observation est également rapportée vis-à-vis des huiles essentielles.

Dans cette étude, les diamètres des zones d'inhibition varient d'un échantillon d'huile à l'autre, ils dépendent essentiellement de la capacité de diffusion des différents composés contenus dans le milieu gélosé. D'où, cette variation est attribuée à la variation de la composition chimique et à la polarité des substances diffusibles (Carneiro et al., 2008).

L'HEB (11,7 à 15,0 mm) est classée un agent antibactérien sensible. Ce résultat est en concordance avec des travaux antérieurs qui ont signalé une activité antibactérienne importante de l'huile essentielle brute d'*O. majorana* L. et ses extraits (Hajlaoui et al., 2016; Vági et al., 2005). La F1 (8,0 à 10,0 mm) montre le plus faible pouvoir inhibiteur contre le développement des bactéries. F2 est la fraction la plus active vis-à-vis de toutes les souches testées avec des diamètres des zones d'inhibition entre 15,7 et 21 mm, elle peut être classée comme une substance antibactérienne très sensible ou extrêmement sensible. La F3 (11,3 à 13,7 mm) est classée un agent antibactérien sensible.

La différence des activités de l'HEB et les trois fractions est attribuée aux constituants majoritaires : terpinène-4-ol (Hajlaoui et al., 2016; Loughlin et al., 2008; Nurhayat Tabanca et al., 2001) et  $\alpha$ -terpinol (Cosentino et al., 1999). D'autres études confirment que les propriétés antibactériennes de l'HE de la marjolaine sont associées à la forte proportion des monoterpènes oxygénés et d'autres composés tels que  $\gamma$ -terpinène,  $\beta$ -caryophyllène et sabinène (Gullon et al., 2016; Loughlin et al., 2008). Cependant, comme l'HE est composée de divers constituants principaux à mineurs, les effets synergiques de certains composés doivent être pris en compte en ce qui concerne l'activité antibactérienne.

En effet, le pouvoir antibactérien élevé du terpinène-4-ol est dû à son caractère hydrophobe / hydrophile favorable. Ce composant possède un caractère hydrophile suffisant pour diffuser au travers de l'eau environnante jusqu'à la membrane cytoplasmique bactérienne et un pouvoir hydrophobe suffisant pour ensuite diffuser à travers cette membrane (Carson et al., 2002). En outre, les composants non oxygénés de l'HE, tel que le  $\gamma$ -terpinène, diminuent la solubilité dans l'eau du terpinène-4-ol, réduisant ainsi la concentration à la surface des cellules bactériennes et affaiblissant le niveau d'activité bactéricide (Cox et al., 2001; Loughlin et al., 2008).

### **III-3-3 Etude de l'activité antifongique**

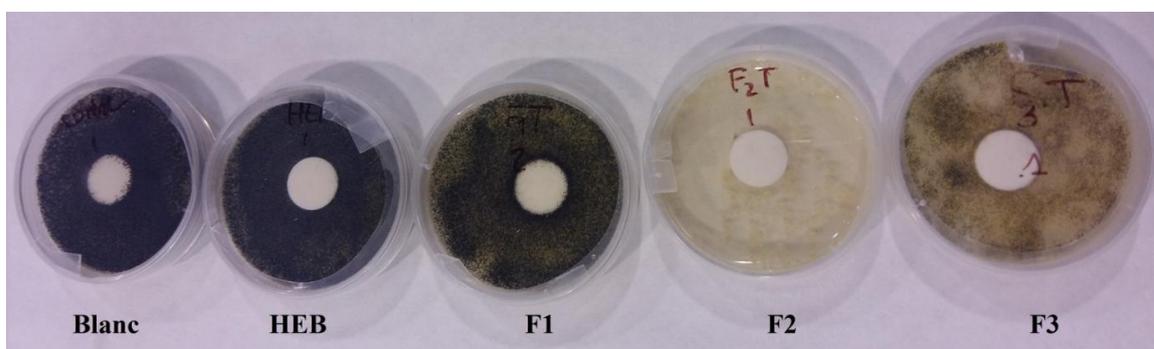
Les huiles essentielles des espèces d'origan possèdent des propriétés antifongiques contre les champignons pathogéniques et non pathogéniques. Cette activité antifongique est fortement liée à la nature de l'huile essentielle utilisée, sa composition chimique et sa concentration. De grandes différences existent également parmi les champignons, notamment en ce qui concerne leur sensibilité à l'effet antifongique des différentes huiles essentielles d'origan et leurs composés majoritaires (Kintzios, 2002).

Le présent travail s'inscrit dans ce contexte de recherche dont l'objectif est d'évaluer l'activité antifongique d'huile essentielle d'*O.majorana* et ses fractions obtenues par distillation sous pression réduite contre les champignons suivants: *Aspergillus niger* (*A. niger*), *Aspergillus penicillioides* (*A. penicillioides*), *Rizopus oryzae* (*R.oryzae*) et *Rizopus stolonifier* (*R.stolonifier*).

### III-3-3-1 L'activité antifongique contre l'*A. niger*

Le pouvoir antifongique des échantillons des huiles essentielles de la marjolaine a été testé par trois méthodes : micro-atmosphères, dilution en bouillon et dilution en agar.

En premier lieu, la lecture des résultats du test des micro-atmosphères est effectuée après 7 jours d'incubation à  $25 \pm 1,5^\circ\text{C}$ . L'observation visuelle de la croissance fongique (CF) de l'*A. niger* dans le blanc, l'HEB, la F1, F2 et F3 est présentée dans la figure III-15. Les pourcentages d'inhibition de la croissance fongique (%ICF) d'HEB, F1, F2 et F3 incubées pendant 7 jours à  $25 \pm 1,5^\circ\text{C}$  sont résumés dans le tableau III-13.



**Figure III-15** : L'observation visuelle de la CF d'*A. niger* dans le blanc, l'HEB, la F1, F2 et F3 à  $25 \pm 1,5^\circ\text{C}$  après 7 jours d'incubation

**Tableau III-13** : Le pourcentage d'inhibition de la croissance fongique (% ICF) de l'HEB, la F1, F2 et F3 incubées pendant 7 jours à  $25 \pm 1,5^\circ\text{C}$

Echantillons (22mg/ml)	ICF%	Signification Statistique au niveau de 0,001 <sup>a</sup>	Comparaisons (BSD) <sup>b</sup>	Signification
<b>HEB</b>	36,56 ± 9,56	***	HEB-F1	(1)
			HEB-F2	(1)
			HEB-F3	(1)
<b>F1</b>	8,76 ± 2,52	***	F1-F2	(1)
<b>F2</b>	100,00 ± 0,00	***	F2-F3	(0)
<b>F3</b>	85,09 ± 15,38	***	F3-F1	(1)

<sup>a</sup>One way ANOVA. <sup>b</sup>La correction de Bonferroni au niveau de 0.001 : (1) indique que la différence entre les moyennes est significative; (0) indique que la différence des moyennes n'est pas significative.

\*\*\*La moyenne de la population est significativement différente.

Les résultats du test des micro-atmosphères montrent que :

- La CF dans le blanc est similaire à celle dans l'HEB et la F1 visuellement.
- L'HEB présente un %ICF moyennement faible (36,56%).
- La F1 est distinguée par un pourcentage d'ICF (8,76%) très faible par rapport à l'HEB et les autres fractions d'huile.
- L'inhibition de la CF dans le cas de F2 et F3 est très remarquable visuellement.
- Les pourcentages d'ICF d'*A. niger* de F2 et F3 sont élevés et atteignent 100% et 85,09% respectivement.
- Les données statistiques indiquent que la différence des moyennes entre les deux fractions F2 et F3 n'est pas significative.

La puissance antifongique de F2 et F3 contre l'*A. niger* est directement liée à leurs compositions chimiques en terpènes oxygénés qui représentent 85,06% et 88,86% respectivement. Ces résultats sont en cohérence avec des données publiées qui indiquent que les alcools et les composés de terpènes polaires agissent en tant qu'agents antifongiques puissants qui retardent le processus de biodégradation (Knezevic et al., 2016). En effet, il est admis que l'activité antimicrobienne des HEs se classe dans l'ordre décroissant selon la nature de leurs composés majoritaires: phénols > alcools > aldéhydes > cétones > oxydes > esters (Inouye et al., 2001).

Inversement, les hydrocarbures monoterpéniques des huiles essentielles, tels que :  $\gamma$ -terpinène, p-cymène,  $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -pinène et le limonène ne possèdent pas un pouvoir

antimicrobien efficace (Inouye et al., 2001; Su et al., 2006). La croissance développée des microorganismes fongiques dans l'HEB et surtout dans la première fraction est expliquée par la quantité des hydrocarbures monoterpéniques 49,13% et 83,31% respectivement.

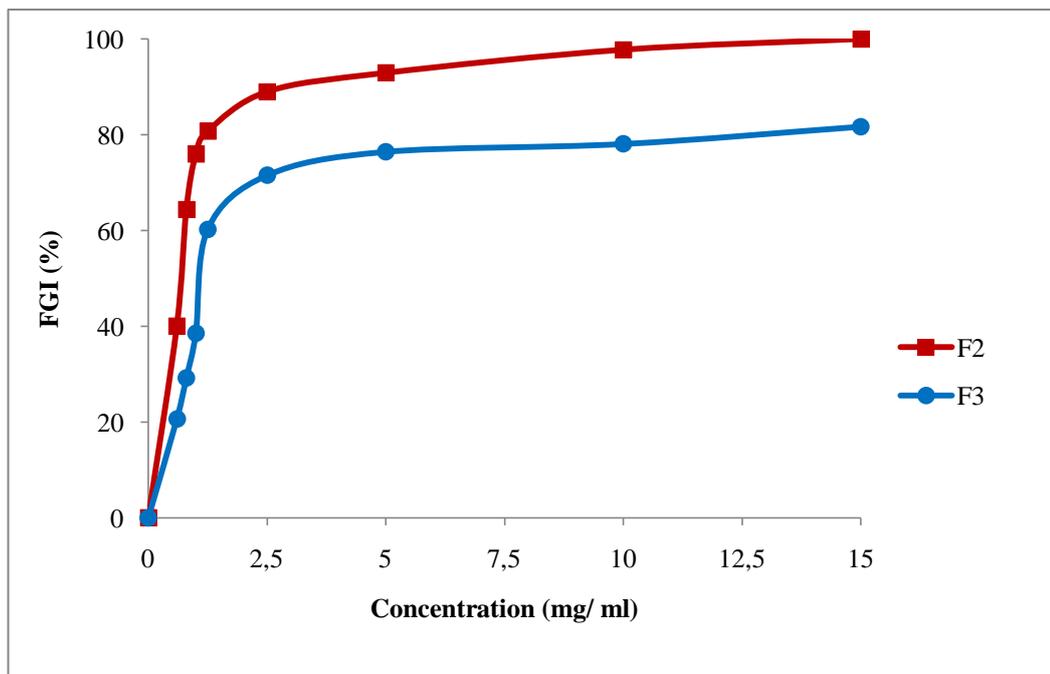
Cette méthode des micro-atmosphères a été suivie par la technique de la dilution en agar afin de déterminer la concentration qui réduit la moitié de la croissance mycélienne du champignon ( $IC_{50}$ ). Cette étude est limitée à tester les deux fractions F2 et F3 contre l'*A. niger* car l'HEB et F1 présentent des taux d'ICF faibles. La plage de concentration de F2 et F3 est située entre 15,00 et 0,06 mg/mL et les pourcentages d'inhibition de la croissance des champignons ont été calculés et résumés dans le tableau III-14.

**Tableau III-14 :** L'effet de la variation de la concentration de F2 et F3 sur l'inhibition de la croissance fongique de l'*A. niger*

Concentration (mg/mL)	15,00	10,00	5,00	2,50	1,25	1,00	0,08	0,06
% ICF de F2	100,00	97,75	92,92	88,99	80,75	75,99	64,32	40,60
	± 0,47	± 0,28	± 0,89	± 0,91	± 0,20	± 3,78	± 1,68	± 2,19
% ICF de F3	81,70	78,09	76,45	71,52	60,24	38,50	29,16	20,59
	± 0,43	± 0,20	± 1,41	± 2,20	± 0,38	± 2,75	± 0,13	± 0,94

Les variations des pourcentages d'inhibition de la croissance fongique en fonction de la concentration sont rapportées dans les courbes de la figure III-16. Ces courbes permettent de déterminer par simple projection les concentrations en F2 et F3 qui réduisent la moitié de la croissance mycélienne de l'*A. niger*. Les  $IC_{50}$  de F2 et F3 sont 0,8 mg/ml et 1,34 mg/mL respectivement.

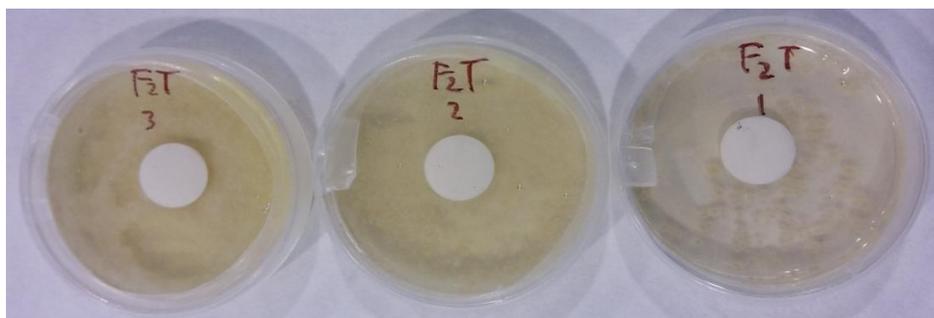
Les deux tests confirment que le pouvoir inhibiteur de F2 est supérieur à F3 bien que la composition chimique de F3 en composés oxygénés soit légèrement supérieure à F2. Contrairement à certains chercheurs qui trouvent que l'activité antifongique est directement liée à la concentration des composés oxygénés (Inouye et al., 2001), d'autres signalent que la puissance d'une huile essentielle à inhiber ou à tuer les champignons est influencée par des réactions secondaires causées par un effet synergique de ses constituants (Kulisic et al., 2004; Wang et al., 2005).



**Figure III-16 :** Les pourcentages d'inhibition de la croissance fongique d'*A. niger* en fonction de la concentration de F2 et F3

Il est également mentionné dans la littérature que certains monoterpènes oxygénés, tels que : citronellal, citronellol, nérol, géraniol, bornéol et géraniol, ainsi que plusieurs composés phénoliques, tels que le thymol, l'eugénol, le carvacrol, etc., ont une contribution significative au traitement antifongique (Morcia et al., 2012). En effet, l'activité antifongique d'une huile essentielle dépend largement de la nature et de la concentration de ses composés majoritaires (Lu et al., 2013).

Le constituant majoritaire de l'HE de la marjolaine étudiée est le terpinène-4-ol. Le pourcentage de ce composé oxygéné dans les échantillons d'huiles est de l'ordre suivant: F2 (54,39%) > F3 (48,60%) > HEB (27,31%) > F1 (7,30%) et les puissances antifongiques sont dans le même ordre. Par conséquent, les proportions de ce composant montrent une corrélation directe avec les activités antifongiques (Morcia et al., 2012). Le terpinène-4-ol s'avère le principal ingrédient responsable à la puissance antifongique. Ces résultats sont similaires aux conclusions tirées par Baydar et al., (2004) et Satrani et al., (2006).



**Figure III-17** : Trois répétitions de l'effet fongicide de F2 sur l'*A. niger* (dilution en bouillon)

Cette étude a été complétée par le test de dilution en bouillon. La première étape du test prouve que l'HEB, la F1 et F3 n'ont pas présenté une inhibition totale par rapport aux témoins donc ces HEB ne peuvent pas être considérées ni comme une huile fongistatique (inhibe totalement la propagation des champignons) ni fongicide (tue les champignons) (Bajpai and Kang, 2010; Mohammedi, 2013). Contrairement à F2 qui a été classée une huile essentielle fongicide à 15 mg/mL. La Figure III-17 illustre trois répétitions de l'effet fongicide de F2 sur l'*A. niger* par le test de dilution en bouillon.

### III-3-3-2 L'activité antifongique contre *R. oryzae*, *R. stolonifera* et *A. penicillioidea*

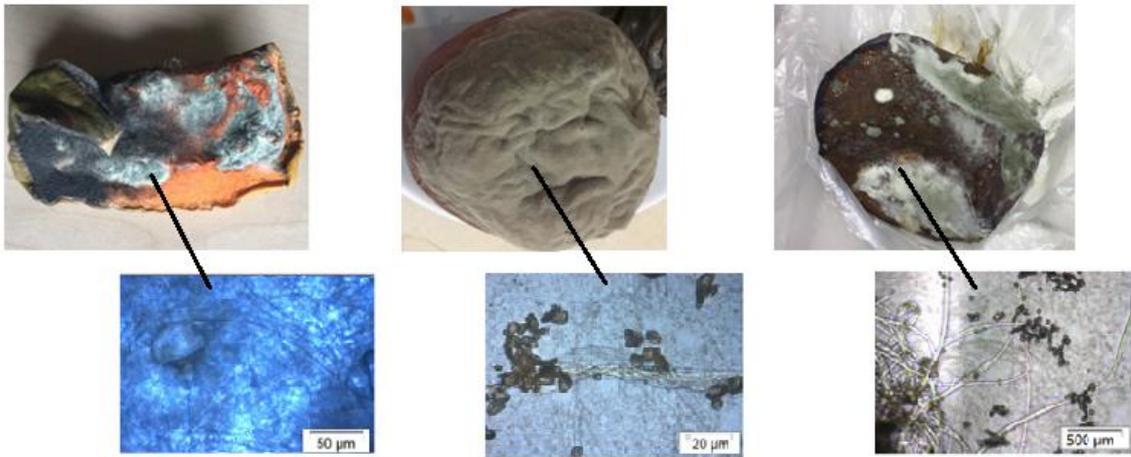
Pour étudier l'activité antifongique contre les champignons isolés par la méthode des micro-atmosphères, des milieux de PDA contenant *R. oryzae*, *R. stolonifera* et *A. penicillioidea*, ont été inoculés avec 5 µL de l'HEB, la F1, F2 et F3. Après 7 jours d'incubation, les pourcentages d'inhibition de la croissance fongique (%ICF) ont été calculés et reportés dans le tableau III-15. Le développement fongique de *R. oryzae*, *R. stolonifera* et de l'*A. penicillioidea* dans le blanc, l'HEB, la F1, F2 et F3 est exposé dans les figures III-19, III-20, III-21.

**Tableau III-15** : Le pourcentage d'inhibition de la croissance fongique (%ICF) d'HEB, la F1, F2 et F3 incubées pendant 7 jours à  $25 \pm 1,5^\circ\text{C}$  contre *R. oryzae*, *R. stolonifera* et *A. penicillioidea*

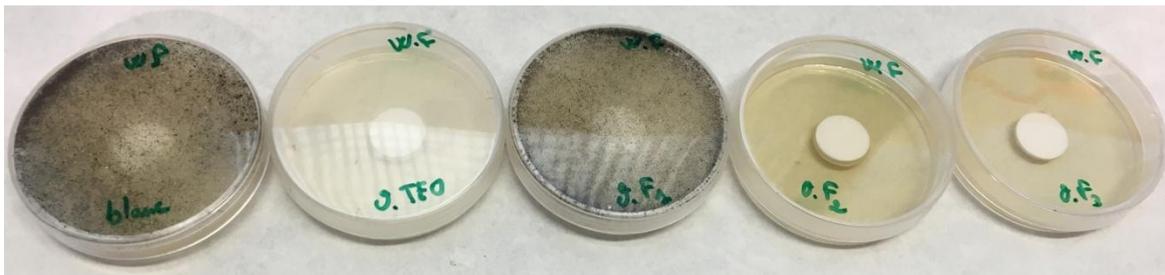
Echantillons (5µL)	HEB	F1	F2	F3
%ICF <i>R.oryzae</i>	85,84 ± 1,84	16,41 ± 1,04	99,84 ± 0,22	97,02 ± 4,21
%ICF <i>R.stolonifera</i>	53,40 ± 0,58	12,85 ± 3,58	100,00 ± 0,00	98,71 ± 1,81
%ICF <i>A.penicillioidea</i>	29,95 ± 3,79	11,53 ± 2,17	100,00 ± 0,00	98,29 ± 2,41

Les champignons : *R.oryzae* isolé de citrouille, *R.stolonifler* isolé de pêche et *A. penicillioides* isolé de prune sont illustrés dans la figure III-18.

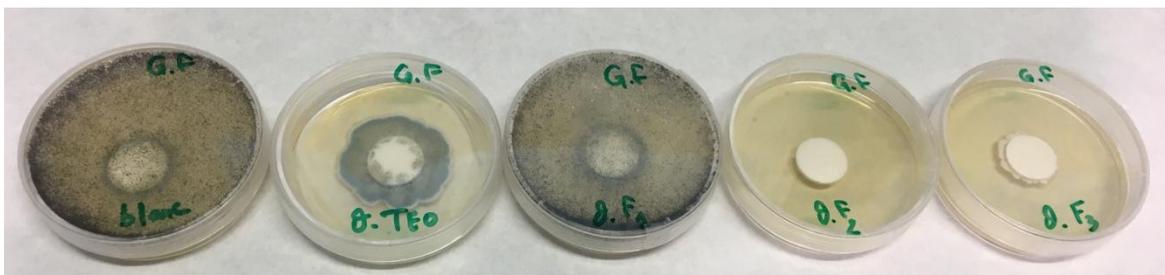
D'après le tableau III-15, l'HEB de la marjolaine montre des inhibitions variables de développement fongique variables par rapport à ses fractions, l'inhibition suit l'ordre suivant: *R.oryzae* (85.84%) > *R.stolonifler* (53.40%) > *A. penicillioides* (29.95%).



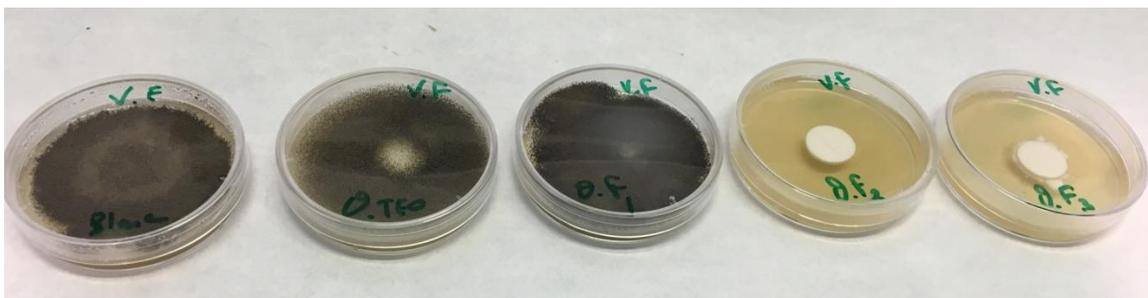
**Figure III-18** : Les champignons: *R.oryzae* isolé de citrouille, *R.stolonifler* isolé de pêche et *A. penicillioides* isolé de prune



**Figure III-19** : La croissance fongique de *R. oryzae* dans le blanc, l'HEB, la F1, F2 et F3



**Figure III-20** : La croissance fongique de *R. stolonifler* dans le blanc, l'HEB, la F1, F2 et F3



**Figure III-21 :** La croissance fongique de l'*A. penicillioides* dans le blanc, l'HEB, la F1, F2 et F3

Les résultats enregistrés de l'étude du pouvoir antifongique des fractions de l'HE de la marjolaine ont montré que l'effet inhibiteur le plus important est produit par les fractions déterpénées F2 et F3 avec des valeurs supérieures à 97% contre les trois champignons testés.

Les résultats obtenus dans cette partie corroborent avec ceux précédemment observés contre l'*A. niger*. Parmi tous les composants terpéniques des huiles essentielles, les composés oxygénés sont ceux qui présentent l'effet antifongique le plus élevé (Knezevic et al., 2016; Stević et al., 2014). Le faible poids moléculaire associé à des tendances lipophiles prononcées des huiles essentielles riches en oxygène, leur permet de pénétrer la membrane cellulaire fongique plus rapidement que d'autres substances (De Lira Mota et al., 2012; Pawar and Thaker, 2006). La capacité antifongique de la famille des composés oxygénés a été prouvée par les fractions déterpénées, inversement à la famille des hydrocarbures monoterpéniques présentée par la F1 (87,92%). Cette fraction démontre l'activité antifongique la plus modérée. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Su et al. (2006) et De Lira Mota et al. (2012). Ils ont montré que la plupart des hydrocarbures de monoterpènes possèdent un potentiel antifongique extrêmement limité.

Par conséquent, la corrélation entre l'activité antifongique et les teneurs en composés majoritaires de F2 et F3 est confirmée. Le pouvoir inhibiteur puissant est directement lié au composant principal le terpinène-4-ol. Ceci est en accord avec d'autres études qui ont montré que le terpinène-4-ol était le principal ingrédient antifongique actif parmi les composants alcooliques des huiles essentielles (Morcia et al., 2012; Stević et al., 2014). Ces résultats sont appuyés par les données de la littérature qui relie le pouvoir antimicrobien élevé de l'HE au composé majoritaire : terpinène-4-ol. Ce composant peut diffuser à travers la membrane cytoplasmique causant ainsi l'arrêt de la croissance fongique ou bien la mort cellulaire (Carson et al., 2002).

## Conclusion

Dans ce chapitre nous avons aboutit aux conclusions suivantes :

- ✓ Le rendement cumulé d'extraction en huile essentielle de la partie aérienne d'*O. majorana* hydrodistillée atteint un maximum de l'ordre de 1,7 % à un temps optimal correspondant à 120 min.
- ✓ L'analyse des fragments obtenus de l'HE à différents temps d'extraction (T0-T120) par GC-MS montre que les rapports sur le rendement et la composition chimique à différents THD présentent des compositions différentielles. Malgré cette différence terpénique, on n'a pas réussi à obtenir une huile essentielle déterpénée.
- ✓ L'évaluation de la composition chimique des fractions obtenues par la technique de distillation sous pression réduite de l'huile essentielle de la marjolaine révèle deux fractions déterpénées avec une composition en hydrocarbures de terpènes qui diminue de 50,70% dans l'HE brute à 12,90% dans la deuxième fraction et 8,98% dans la troisième.
- ✓ Les résultats de l'étude quantitative et qualitative de l'HEB, la F1, F2 et F3 par FT-IR sont en concordance avec les résultats de GC-MS.
- ✓ La grande faiblesse de l'activité antioxydante par piégeage du radical DPPH• de l'huile essentielle brute de la marjolaine et ses fractions est attribuée à la faible activité antioxydante du composé majoritaire terpinène-4-ol et à la faible quantité en polyphénols (<0,3%).
- ✓ L'étude de l'activité antibactérienne de l'HE de la marjolaine et ses fractions contre huit souches de bactéries révèle que:
  - L'HEB et la F3 sont classées comme des agents antibactériens sensibles.
  - La F1 montre le plus faible pouvoir inhibiteur contre le développement des bactéries.
  - La F2 est la fraction la plus active vis-à-vis de toutes les souches testées, elle peut être classée comme une substance antibactérienne très sensible ou extrêmement sensible. Cette activité est attribuée au constituant majoritaire : terpinène-4-ol.
- ✓ L'activité antifongique de l'HEB, la F1, F2 et F3 contre l'*A. niger*, *R.oryzae*, *R.stolonifera* et *A. penicillioides* montre que :
  - Les deux fractions déterpénées F2 (100%) et F3 (85,09%) inhibent la croissance fongique de l'*A. niger* grâce à leurs compositions chimiques en terpènes oxygénés.

- La croissance développée des microorganismes fongiques de l'*A. niger* dans l'HEB et surtout dans la première fraction est expliquée par la quantité des hydrocarbures monoterpéniques 49,13% et 83,31% dans l'HEB et la F1 respectivement.
- La F2 est une huile essentielle fongicide qui tue les champignons d'*A. niger* à 15 mg/mL.
- Les résultats obtenus contre *R.oryzae*, *R.stolonifler* et *A. penicillioides* corroborent avec ceux précédemment observés contre l'*A. niger* sauf pour l' HEB qui suit l'ordre d'inhibition suivant : *R.oryzae* (85,84%) > *R.stolonifler* (53,40%) > *A. penicillioides* (29,95%).

## Les références

- A. Akrouf, 2004. Etude des huiles essentielles de quelques plantes pastorales de la région de Matmata (Tunisie), in: Cahiers Options Méditerranéennes, 62. pp. 289–292.
- Aiche-Iratni, G., 2016. Activités biologiques, d'intérêt médical, d'extraits de feuilles de pistacia lentiscus et d'origanum majorana. Doctoral dissertation, Université Mouloud MAMMARI.
- Bajpai, V.K., Kang, S.C., 2010. Antifungal Activity of Leaf Essential Oil and Extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 87, 327–336.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475.
- Banchio, E., Bogino, P.C., Zygadlo, J., Giordano, W., 2008. Plant growth promoting rhizobacteria improve growth and essential oil yield in *Origanum majorana* L. *Biochem. Syst. Ecol.* 36, 766–771.
- Baranauskaitė, J., Jakštas, V., Ivanauskas, L., Kopustinskiene, D.M., Drakšienė, G., Masteikova, R., Bernatoniene, J., 2016. Optimization of carvacrol, rosmarinic, oleanolic and ursolic acid extraction from oregano herbs (*Origanum onites* L., *Origanum vulgare* spp. *hirtum* and *Origanum vulgare* L.). *Nat. Prod. Res.* 30, 672–674.
- Baydar, H., Sağdıç, O., Özkan, G., Karadoğan, T., 2004. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control* 15, 169–172.
- Bejaoui, A., Boulila, A., Boussaid, M., 2013. Chemical composition and biological activities of essential oils and solvent extracts of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. from Tunisia. *J. Med. Plants Res.* 7, 2429–2435.
- Béjaoui, A., Chaabane, H., Jemli, M., Boulila, A., Boussaid, M., 2013. Essential Oil Composition and Antibacterial Activity of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. at Different Phenological Stages. *J. Med. Food* 16, 1115–1120.
- Ben Salha, G., Herrera Díaz, R., Labidi, J., Abderrabba, M., 2017. Deterpenation of *Origanum majorana* L. essential oil by reduced pressure steam distillation. *Ind. Crops Prod.* 109.

Carneiro, A.L.B., Teixeira, M.F.S., Oliveira, V.M.A. de, Fernandes, O.C.C., Cauper, G.S. de B., Pohlit, A.M., 2008. Screening of Amazonian plants from the Adolpho Ducke forest reserve, Manaus, state of Amazonas, Brazil, for antimicrobial activity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103, 31–38.

Carson, C.F., Mee, B.J., Riley, T. V., 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1914–20.

Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., Palmas, F., 1999. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Lett. Appl. Microbiol.* 29, 130–135.

Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., 2001. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Appl. Microbiol.* 91, 492–497.

De Lira Mota, K.S., De Oliveira Pereira, F., De Oliveira, W.A., Lima, I.O., De Oliveira Lima, E., 2012. Antifungal activity of *thymus vulgaris* l. essential oil and its constituent phytochemicals against *rhizopus oryzae*: Interaction with ergosterol. *Molecules* 17, 14418–14433.

Edris, A.E., 2007. Pharmaceutical and therapeutic Potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phyther. Res.* 21, 308–323.

Gullon, B., Pintado, M.E., Pérez-Álvarez, J.A., Viuda-Martos, M., 2016. Assessment of polyphenolic profile and antibacterial activity of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-product of juice extraction. *Food Control* 59, 94–98.

Hajlaoui, H., Mighri, H., Aouni, M., Gharsallah, N., Kadri, A., 2016. Chemical composition and in vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity and anti-acetylcholinesterase properties of Tunisian *Origanum majorana* L. essential oil. *Microb. Pathog.* 95, 86–94.

Herodež, Š.S., Hadolin, M., Škerget, M., Knez, Ž., 2003. Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chem.* 80, 275–282.

Inouye, S., Uchida, K., Yamaguchi, H., Miyara, T., Gomi, S., Amano, M., 2001. Volatile Aroma Constituents of Three Labiatae Herbs Growing Wild in the Karakoram-Himalaya District and Their Antifungal Activity by Vapor Contact. *J. Essent. Oil Res.* 13, 68–72.

- Ismaili, R., Lamiri, A., Moustaid, K., 2014. Etude de l'activité antifongique des huiles essentielles de trois plantes aromatiques marocaines [Study of the antifungal activity of essential oils of three moroccan aromatic plants]. *Int. J. Innov. Sci. Res.* ISSN 12, 2351–8014.
- Kahouli, I., 2010. Effet antioxydant d'extraits de plantes (*Laurus nobilis* L., *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*, *Oléa Europea* L.) dans l'huile de canola chauffée. Thèse de doctorat. Université Laval.
- Kintzios, S.E., 2002. *Oregano : the genera Origanum and Lippia*. Taylor and Francis.
- Knezevic, P., Aleksic, V., Simin, N., Svircev, E., Petrovic, A., Mimica-Dukic, N., 2016. Antimicrobial activity of Eucalyptus camaldulensis essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Ethnopharmacol.* 178, 125–136.
- Kokkini, S., Karousou, R., Dardioti, A., Krigas, N., Lanaras, T., 1997. Autumn essential oils of Greek oregano. *Phytochemistry* 44, 883–886.
- Kulusic, T., Radonic, A., Katalinic, V., Milos, M., 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem.* 85, 633–640.
- Lagunez Rivera, L., 2006. Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffé par induction thermomagnétique directe. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse. France.
- Loughlin, R., Gilmore, B.F., McCarron, P.A., Tunney, M.M., 2008. Comparison of the cidal activity of tea tree oil and terpinen-4-ol against clinical bacterial skin isolates and human fibroblast cells. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 428–433.
- Lu, M., Han, Z., Xu, Y., Yao, L., 2013. Effects of essential oils from Chinese indigenous aromatic plants on mycelial growth and morphogenesis of three phytopathogens. *Flavour Fragr. J.* 28, 84–92.
- Malecky, M., 2008. Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins. <http://www.theses.fr>. Paris, AgroParisTech.
- Mohammedi, Z., 2013. Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie. Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat en Biologie, Faculté des Sciences, Algérie.

- Morcia, C., Malnati, M., Terzi, V., 2012. In vitro antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 29, 415–422.
- Moreira, M.R., Ponce, A., del Valle, C.E., Roura, S.I., 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT - Food Sci. Technol.* 38, 565–570.
- Nurhayat T., Neşe, K.B.D., Fatih, D., and Başer, K.H.C., 2001. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Micromeria cristata* subsp. *phrygia* and the Enantiomeric Distribution of Borneol. *J. of Agr and Food Chem.* 49(9), 4300-4303.
- Pawar, V.C., Thaker, V.S., 2006. In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. *Mycoses* 49, 316–323.
- Perini, J.F., Silvestre, W.P., Agostini, F., Toss, D., Pauletti, G.F., 2017. Fractioning of orange (*Citrus sinensis* L.) essential oil using vacuum fractional distillation. *Sep. Sci. Technol.* 52, 1397–1403.
- Ponce, A.G., Fritz, R., del Valle, C., Roura, S.I., 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT - Food Sci. Technol.* 36, 679–684.
- Raut, J.S., Karuppayil, S.M., 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind. Crops Prod.* 62, 250–264.
- Salazar-Aranda, R., Rivas-Galindo, V.M., Waksman De Torres, N., González, G.M., 2015. Antimicrobial and antioxidant activities and chemical characterization of essential oils of *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, and *Origanum majorana* from northeastern México. 28 (1), 363-369.
- Satrani, B., Farah, A., Talbi, M., 2006. Effet de la distillation fractionnée sur la composition chimique et l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du Myrte (*Myrtus communis* L.) du Maroc. *Acta Bot. Gall.* 153, 235–242.
- Schulz, H., Baranska, M., Belz, H.H., Rösch, P., Strehle, M.A., Popp, J., 2004. Chemotaxonomic characterisation of essential oil plants by vibrational spectroscopy measurements. *Vib. Spectrosc.* 35, 81–86.

- Sellami, I.H., Maamouri, E., Chahed, T., Wannas, W.A., Kchouk, M.E., Marzouk, B., 2009. Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.). *Ind. Crops Prod.* 30, 395–402.
- Silvestre, W.P., Agostini, F., Muniz, L.A.R., Pauletti, G.F., 2016. Fractionating of green mandarin (*Citrus deliciosa* Tenore) essential oil by vacuum fractional distillation. *J. Food Eng.* 178, 90–94.
- Soro, D., Koné, M.W., Kamanzi, A.K., 2010. Evaluation des activités antimicrobiennes et anti-radicaux libres de quelques taxons bioactifs de Côte d’Ivoire. *Eur. J. Sci. Res.* 40, 307–317.
- Stević, T., Berić, T., Šavikin, K., Soković, M., Godevac, D., Dimkić, I., Stanković, S., 2014. Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. *Ind. Crops Prod.* 55, 116–122.
- Su, Y.-C., Ho, C.-L., Wang, E.I.-C., Chang, S.-T., 2006. Antifungal activities and chemical compositions of essential oils from leaves of four eucalypts. *Taiwan J. For. Sci.* 21, 49–61.
- Thormar, H., 2010. *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*, Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents. 2011 John Wiley & Sons, Ltd.
- Vági, E., Simándi, B., Suhajda, Á., Héthelyi, É., 2005. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *Food Res. Int.* 38, 51–57.
- Valtcho D. Zheljaskov, Astatkie Tess, Schlegel Vicki, 2012. Distillation Time Changes Oregano Essential Oil Yields and Composition but Not the Antioxidant or Antimicrobial Activities. *HortScience* 47, 777–784.
- Wang, S.Y., Wu, C.L., Chu, F.H., Chien, S.C., Kuo, Y.H., Shyur, L.F., Chang, S.T., 2005. Chemical composition and antifungal activity of essential oil isolated from *Chamaecyparis formosensis* Matsum. wood. *Holzforschung* 59, 295–299.
- Zeković, Z.P., Lepojević, Ž.D., Mujić, I.O., 2009. Laurel Extracts Obtained by Steam Distillation, Supercritical Fluid and Solvent Extraction. *Journal Nat. Prod.* 2, 104–109.

## Conclusion et perspectives

Le travail que nous avons entrepris porte sur l'étude chimique et biologique de l'huile essentielle d'*origanum majorana* L. avant et après la déterpénation. L'objectif principal est de comparer les variabilités quantitatives et qualitatives de cette essence volatile brute et déterpénée et d'évaluer l'effet de ce traitement sur leur efficacité biologique.

Dans un premier temps, nous avons extraite l'huile essentielle de cette plante aromatique et médicinale connue sous le nom de la marjolaine douce par ydrodistillation. L'essence volatile obtenue est traitée par distillation sous pression réduite pour obtenir trois fractions. L'analyse de l'huile essentielle brute et des fractions obtenues par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) aboutit aux résultats suivants :

- ✓ Une grande variation qualitative et quantitative du profil chimique de l' HEB et ses fractions a été constatée surtout au niveau des familles des terpènes. La concentration des terpènes hydrocarbonés dans l'HEB est 50,70% augmente à 87,92% dans la F1 et diminue à 12,90% et 8,98% dans F2 et F3 respectivement. La diminution de teneur en hydrocarbures favorise la concentration des terpènes oxygénés.
- ✓ Suite à l'identification chimique, les deux fractions F2 et F3 ont été considérées comme deux huiles essentielles déterpénée.

De même, l'analyse de l' HEB et ses fractions (F1, F2 et F3) par infrarouge à transformation de Fourier a confirmé les résultats et les conclusions tirées par GC-MS.

L'examen de l'activité antioxydante par piégeage du radical DPPH• (le 1,1'-diphenyl-2-picrylhydrazyl) de l'huile essentielle brute et ses fractions montre que ces huiles ne possèdent pas du pouvoir antioxydant.

Le screening de l'activité antibactérienne contre huit souches de bactérie a révélé que la F2 est une huile déterpénée extrêmement sensible et elle est la plus active vis-à-vis de toutes les souches testées. Cependant, la F1 est la moins active. L'HEB et la F3 sont des agents antibactériens sensibles.

Les résultats de l'action des l' HEB, la F1, F2 et F3 contre les champignons testés indiquent que:

- ✓ La F2 est une huile essentielle fongicide qui tue les champignons d'*A. niger* à 15 mg/mL et qui montre les meilleures inhibitions de la croissance fongique contre *R.oryzae*, *R.stolonifier* et *A. penicillioides* avec 99,84%, 100%,100% respectivement.
- ✓ L'HEB a des valeurs d'inhibition variables contre les souches fongiques testés qui suit l'ordre suivant : *R.oryzae* (85.84%) > *R.stolonifier* (53.40%) > *A. niger* (36,56%) > *A. penicillioides* (29.95%).
- ✓ F1 est la fraction d'huile qui est présente l'activité antifongique la plus modérée.
- ✓ F3 étant une fraction déterpénée de l'HE, elle inhibe le développement fongique de l'*A. niger*, de *R.oryzae*, de *R.stolonifier* et de l'*A.penicillioides* par des valeurs égales à : 85,09% 97,02% 98,71% et 98,29% respectivement.

Enfin, il ressort des résultats obtenus que le pouvoir antimicrobien varie principalement selon la nature de l'huile essentielle testé ainsi que la nature de microbe. Les fractions déterpénées de l'huile essentielle s'est montrée plus active et plus puissante contre les bactéries et les champignons testés.

En perspectives, il serait intéressant de :

- ✓ Essayer des autres techniques de déterpénation (CO<sub>2</sub> supercritique) et les comparer aux résultats obtenus par distillation sous pression réduite.
- ✓ Approfondir les investigations biologiques des huiles déterpénées et de faire des applications concrètes.
- ✓ Extraire les molécules bioactives tel est le cas de terpinène-4-ol.

## Annexes

### Annexe 1

Milieu	Trypto-caseine de soja	g/L
Composition	Peptone papainique de soja	5
	Agar agar bactériologique	15
	Chlorure de sodium	5
	Eau 1000 mL	
pH	7,3 ± 0,2	
Conditions d'incubation	24h à 37°C	

### Annexe 2

