

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

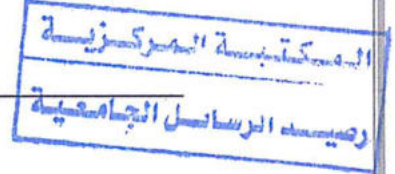
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار عناية

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE EN VUE DE L'OBTENTION D'UN DIPLOME DE DOCTORAT En Science

Spécialité : BIOLOGIE ANIMALE

181358
2017

Effets des huiles essentielles de plantes collectées de la région de Tébessa sur la croissance, mobilité, paramétrés biochimiques et le métabolisme respiratoire d un protozoaire d'eau douce *Paramecium sp*

Par : BOUCHIHA Hanéne

DEVANT LE JURY

PRESIDENT :	DJEBAR M.R.	Pr.	Université d'Annaba
DIRECTEUR DE THESE :	ROUABHI R.	Pr.	Université de Tébessa
CO-DIRECTEUR DE THESE :	BERREBBAH H.	Pr.	Université d'Annaba
EXAMINATEURS :	TADJINE A.	Pr.	Université d'El Taref
	DJEDDI S.	Pr.	Université d'Annaba
	SOUIKI L.	Pr.	Université de Guelma

Année – 2015-2016

DEDICACES

A mes parents :

*Pour vos mains qui ont tant travaillées,
Pour votre cœur qui m'a tant donné,
Pour votre sourire qui m'a tant réchauffé,
Pour vos yeux qui furent parfois mouillés,
Pour vous qui m'avez tant aimé,
Je t'aime **maman**, je t'aime **papa**.*

A mes sœurs et frères :

*Vous m'avez beaucoup soutenu à travers vos encouragements et vos bénédictions. Trouvez mes chers à travers ce travail, l'expression de ma profonde reconnaissance et le témoignage de mon profond respect. **Karima, Amel, Marouen, Khaled et Mahdi** Je vous aime.*

A ma belle sœur : Sara, pour le soutien indispensable.

A mes neveux et nièces :

Ahmad, Hind, Badis, Islem, Aya, Ritej, zeinab, Mramam. Votre tata qui vous aime beaucoup.

A Aziz :

Pour l'encouragement et l'aide d'une manière ou d'une autre.

Remerciements

*Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé au sein du laboratoire de Toxicologie Cellulaire (LTC) de l'Université d'Annaba. Je profite de l'occasion qui m'est offerte pour adresser mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur **DJEBAR Mohamed Réda** pour son accueil, sa disponibilité et son souci constant de manière à ce que cette thèse se passe dans les meilleures conditions possibles.*

*C'est aussi avec une profonde sincérité, que j'adresse toute ma reconnaissance au Professeur **BERREBAH-DJEBAR Houria**, pour m'avoir confié cette étude. Ses qualités humaines, sa disponibilité à toute épreuve et ses remarquables compétences en la matière ont été le garant de ce travail particulièrement enrichissant. Je voudrais aussi la remercier pour la confiance qu'elle m'a accordée tout au long de ces années et pour m'avoir communiqué la passion pour la recherche, que ce soit en terme de résultats théoriques ou de leur mise en œuvre concrète.*

*Je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur **ROUABHI Rachid**, de l'Université de Tébessa, non seulement pour son encadrement de très haut niveau, ses précieux conseils et orientations, mais également pour sa disponibilité et son dévouement.*

*Je remercie encore une fois le Professeur **DJEBAR Mohamed Réda**, non seulement pour avoir pleinement investi à la réalisation de ce travail et sacrifié de son temps, mais aussi et surtout, pour avoir accepté de présider ce jury.*

*J'exprime aussi toute ma gratitude a madame **TADJINE Aicha**, Professeur à l'Université d'El Taref, madame **SOUIKI Lynda**, Professeur à l'Université de Guelma et madame **DJEDDI Samah**, Professeur à l'Université de ANNABA pour l'intérêt et l'attention qu'ils ont accordés à ce travail de thèse et d'avoir accepté d'en être les examinatrices.*

*Et enfin, il y a les compagnons de route, ceux avec qui l'on partage les joies du quotidien, les doutes, je suis heureuse de vous avoir rencontré. Un grand merci à **Anisa**,*

Samira, Ibtissem, Wafa. Et à tous les étudiants du laboratoire de Toxicologie Cellulaire (LTC) de l'Université d'Annaba.

Que tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce modeste travail, trouvent ici mes sentiments de profonde gratitude et de reconnaissance infinie.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
APX	Ascorbate -peroxydases
ASS	Acide sulfosalicylique
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	SerumAlbumin Bovin
CAT	Catalase
CDNB	1-Chloro,2,4-Dinitrobenzène
CI₅₀	Concentration inhibitrice moyenne
CL₅₀	Concentration inhibitrice de 50% de la population
DO	Densité optique
DTNB	Acide 5,5'Dithiodis-2-Nitrobenzoïque
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétique
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
GPx	Glutathion peroxydase
GPX	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion disulfure
GST	Glutathion S-transférase
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HCl	Chlorure d'hydrogène (Acide chlorhydrique)
HE	huile essentielle
HES	huiles essentielles
MDA	Malondialdéhyde
pKa	Constante de dissociation d'une molécule.

ROS Reactiveoxygenespecies

SOD Superoxidedismutase

TBA Acide Thiobarbiturique

TBARS Substances réagissant avec l'acide Thio-barbiturique

TCA Acide Trichloracétique

Tris Trishydroxyméthylaminométhane, (2-Amino-2-Hydroxyméthyl-1,3-Propanediol)

RESUME

Certaines huiles essentielles et leurs constituants chimiques sont largement utilisés comme agents aromatisants dans les aliments et les boissons, les industries de parfums et sont même exemptés de l'homologation des pesticides. Ce statut, combiné avec la grande disponibilité des huiles essentielles, a permis à la commercialisation rapide de la piste de produit à la base d'huiles essentielles.

Notre objectif à travers cette étude est de tester la cytotoxicité de deux plantes utilisées dans une grande variété de consommation tels que les détergents, les savons, produits de toilette, de cosmétiques, de produits pharmaceutiques, des parfums, de la nourriture, les boissons.....etc, à savoir *Mentha piperita* et *Artemisia herba-alba*.

Le modèle biologique étudié est un micro-organisme (*Paramecium sp*). Trois doses ont été choisies. Nous avons suivi l'évolution des paramètres physiologiques (croissance, métabolisme respiratoire), biochimiques (protéines totales, lipides totaux), ainsi que les variations des marqueurs biologiques du GSH, MDA, CAT, APX. Nos résultats ont mis en évidence une inhibition de la croissance des protozoaires, ainsi qu'une perturbation du contenu de protéines totales, lipides et les différents marqueurs étudiés.

L'étude polarographique a révélé une stimulation de la consommation d'O₂ et ce, à des cellules traitées.

Mots clés : huiles essentielles, *Mentha piperita*, *Artemisia herba-alba*, *Paramecium sp* et marqueurs biologiques.

ABSTRACT

Some essential oils and their chemical constituents are widely used as flavoring agents in foods, beverages, for the flavor, fragrance industries and also are even exempt from pesticide. This special status combined with the wide availability of essential oils, has made it possible to commercialize products based on essential oils.

Our goal through the present study is to test the cytotoxicity of two plants used tremendously in our folk medicine, namely *Mentha piperita* and *Artemisia herba-alba* which are used in a wide variety of consumer goods such as detergents, soaps, toilet products, cosmetics, pharmaceuticals, perfumes, confectionery food products, soft drinks.....etc. to know *Mentha piperita* et *Artemisia herba-alba*.

Biological model used in the present study is the microorganism (*Paramecium sp.*). Three doses were chosen. We followed the evolution of physiological parameters (growth, respiratory metabolism), biochemical (total proteins and lipids), as well as the variations of a bio marker (GSH, MDA, CAT, APX).

Our results highlighted an inhibition of the growth of the protozoa as well as a disturbance of the contents of total proteins, lipids and a different bio marker studied.

The polarography study revealed a stimulation of the consumption of O₂ and this at the treated cells.

Keywords: Essential oils, *Mentha piperita*, *Artemisia herba-alba*, *Paramecium sp.*, bio marker.

ملخص

بعض الزيوت الطيارة ومكوناتها تستعمل كعامل معطر في المواد الغذائية و المشروبات وصناعة العطور و كذلك المبيدات. هذه الحالة الخاصة وبالاتحاد مع التوفر الكبير للزيوت الاساسية ادى الى التجارة السريعة للمواد المصنوعة منها. هدفنا من هذه الدراسة هو اختبار السمية الخلوية لنباتين يستعملان في مجموعة كبيرة من الاستهلاكات مثل : المنظفات الصابون مواد التجميل المواد الصيدلانية العطور الغذاء و المشروبات..... الخ وهي:

Mentha piperita et Artemisia herba-alba

- النموذج البيولوجي المدروس كائن دقيق *Paramecium sp* حيث تم استعمال ثلاثراكيز وتبعنا تطور العناصر الفيزيولوجية (النمو، التنفس) والبيوكيميائية (البروتينات والليبيدات) وكذلك التغيرات في المؤشرات الحيوية (GSH, MDA, CAT, APX)
- نتائجا اظهرت الحد من النمو للأوليات و كذلك اختلال في محتوى البروتينات والليبيدات ومختلف المؤشرات الحيوية لهذه الخلايا.
- الدراسة البولوغرافيا اظهرت تحفيز في استهلاك O_2 عند الخلايا المعالجة.

الكلمات المفتاحية: الزيوت الاساسية, *Paramecium sp*, *Artemia herba-alba*, *Mentha piperita*,

و المؤشرات البيولوجية.

SOMMAIRE

Liste des tableaux.....	VIII
Liste des Figures.....	XII
Liste des abréviations.....	XIII
Introduction Générale.....	1

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I- Substances naturelles et huiles essentielles.....	4
1- Les huiles essentielles (HEs).....	4
1-1 Répartition.....	6
1-2 Rôle.....	6
1-3 Synthèse	7
1-4 Organes sécréteurs.....	8
1-5 Composition chimique.....	9
1-5-1 Composés terpéniques.....	9
1-5-2 Composés d'origines diverses.....	10
1-6 Propriétés physiques.....	12
1-7 Facteurs de variabilité.....	13

1-7-1 Facteurs de variabilité extrinsèque.....	13
1-7-2 Facteurs de variabilité intrinsèques (Chémotype).....	14
1-8 Conservation	15
II- Actions et activités des huiles essentielles.....	16
1- Activité liée a la composition chimique.....	18
2- Activité liée a la combinaison entre les HEs.....	18
3- Les activités pharmacologiques et biologiques des HEs.....	19
4- Stress oxydatif et ROS.....	20
4-1 Sources et cibles des ROS.....	20
4-2 Antioxydants endogènes.....	23
4-3 Antioxydants exogènes.....	24
4-4 Propriétés anti-oxydante des HEs.....	25
5- Activités antimicrobiennes.....	26
5-1 Activités antibacteriennes.....	26
5-2 Activité antifongique.....	27
5-3 Activité antivirale.....	29
6- Toxicité des huiles essentielles.....	29
III-Plantes étudiées.....	32
1-La Menthe (<i>Menthapipéríta</i>).....	32
1-1 Position systématique.....	32

1-2 Description et propriétés.....	32
1-3 Utilisations.....	33
1-4 Composition chimique.....	34
1-4-1 Le menthol.....	35
2- Armoise blanche (<i>Atémisia herba-alba</i>).....	40
2-1 Position systématique.....	40
2-2 Description et propriétés.....	40
2-3 Utilisations.....	42
2-4 Composition chimique.....	43
IV- Généralité sur les paramécies.....	46
1- <i>Reproduction</i>	47
2- <i>Nutrition</i>	47
3- <i>Déplacements</i>	61
4- <i>Respiration</i>	62

CHAPITRE II : EXTRACTION ET ETUDES DES HES

Introduction.....	49
I- Matériel et méthodes.....	49
1- <i>Extraction des HEs</i>	49

1-2 Séparation des HEs du distillat.....	50
1-3 Détermination du rendement d'extraction.....	50
1-4 Conservation des HEs obtenue.....	50
<i>2 Etude physico-chimique des HES extraites.....</i>	<i>51</i>
2-1 Indice de réfraction.....	51
2-2 Densité.....	51
2-3 Miscibilité à l'éthanol.....	51
2-4 L'analyse chromatographique.....	52
II- Résultats et discussion.....	53
<i>1- Etude organoleptique.....</i>	<i>53</i>
<i>2- Rendement des HEs extraites.....</i>	<i>54</i>
<i>3- Etude physico-chimique des HEs.....</i>	<i>54</i>
3-1 Facteur de pH.....	55
3-2 Indice de réfraction.....	55
3-3 Densité.....	55
3-4 Spectres chromatographiques) des HEs (CPG	55

CHAPITRE III : PHYSIOLOGIE ET MORPHOLOGIE

Introduction.....	59
--------------------------	-----------

I- Matériel et méthodes	59
1- Culture des paramécies.....	59
1-1 Préparation du milieu de repiquage.....	60
1-2- Ensemencement.....	60
2- Détermination de la concentration inhibitrice (CI 50).....	60
3- Cinétique de croissance cellulaire.....	61
3-1 Dénombrement des cellules.....	61
3-2 Calcul du pourcentage de réponse.....	62
3-3 Calcul du nombre et du temps de génération.....	62
4- Vitesse de déplacement.....	63
5- Trajectoire.....	63
II- Résultats et discussion	64
1-Effets des huiles essentielles sur la croissance cellulaire.....	64
2- Pourcentage de réponse (P.R.).....	68
3- Détermination du temps et du nombre de génération cellulaire.....	69
4- Détermination du taux de croissance des paramécies.....	70
5- Effets des huiles essentielles sur la taille des paramécies.....	71
6- Effets des huiles essentielles sur la vitesse de déplacement.....	73
7- Effets des huiles essentielles sur la trajectoire des paramécies.....	74

CHAPITRE IV : BIOCHIMIE ET POLAROGRAPHIE

Introduction	78
<i>1-Matériel et méthodes</i>	78
1-1 Dosage des protéines totales.....	78
1-2 Dosage des lipides.....	78
1-3 Mesure de la respiration (polarographique).....	79
<i>2- Resultats et discussion</i>	80
2-1 Variation du taux de lipides totaux.....	80
2-2 Variation du taux de protéines totales.....	82
2-3 Effet des HEs sur le métabolisme respiratoire des paramécies.....	85

CHAPITRE V : ETUDE DU STRESS OXYDANT

Introduction	88
<i>1-Matériel et méthodes</i>	88
1-1 Dosage du glutathion (GSH).....	88
1-2 Mesure de l'activité du Gluthation S-transférase (GST).....	89
1-3 Mesure de l'activité Ascorbate-peroxydases (APX).....	90
1-4 Mesure de l'activité Catalase (CAT).....	90
1-5 Dosage du malondialdéhyde (MDA).....	90

1-6 Analyse statistique.....	91
2- Résultats et discussion.....	91
2-1 Effets des HES sur l'activité du Gluthation S- transférase (GST).....	91
2-2 Effets des HES sur l'activité glutathion S-transférase.....	93
2-3 Effets des HES sur l'activité APX.....	96
2-4 Effets des HES sur l'activité Catalase (CAT).....	98
2-3 Effets des HES sur l'activité (MDA).....	101
Conclusion générale et Perspectives.....	104
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	107

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Interactions des plantes avec leur environnement via les composés organiques	7
Figure 2: Glande sécrétrice avec cuticule dans la face inférieure de la feuille et poil sécréteur	8
Figure 3: Structures des trichomes glandulaires	9
Figure 4: Structure de la molécule d'isoprène	10
Figure 5 : Structure de quelques composés des HEs.....	11
Figure 6 : Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation de l'huile	17
Figure 7 : Chambre de développement à cuve verticale et plaque de CCM.....	22
Figure 8 : Mécanisme d'action de carvacrol sur la membrane cellulaire.....	27
Figure 9 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants.....	33
Figure 10: Action des HEs et de leurs constituants sur la cellule bactérienne	35
Figure 11 : Structure de la paroi bactérienne Gram+.....	37
Figure 12: Structure de la paroi bactérienne Gram-.....	39
Figure 13 : <i>Mentha pipérta</i> (Menthe poivrée «Nanaa»)	41
Figure 14 : Structure du (-)- Menthol.....	46
Figure 15 : Structure des canaux TRPM8 et modulation par des cascades intracellulaires.....	49

Figure 16 : Résumé des interactions biochimiques du menthol.....	50
Figure 17: <i>Artémisia herba alba</i> (L'Armoise blanche «Chih»).....	51
Figure 18 : Vue d'une paramécie.	53
Figure 19 : Mécanisme de la conjugaison chez une paramécie.....	56
Figure 20 : Montage d hydrodistillation (hydrodistillateur).....	57
Figure 21 : Méthode de Séparation des HES du distillat.....	64
Figure 22 : Réfractomètre pour mesurer les indices de réfraction.....	65
Figure 23 : HES extraites A: <i>M. pipéríta</i>, B : <i>A. herba-alba</i>	66
Figure 24 : Représente la CPG des HES du <i>M. pipéríta</i>.....	66
Figure 25 : Chromatogramme de l'HE d'<i>A.herba alba</i>.....	68
Figure 26 : Méthode de dénombrement a la cellule de Malassez.....	68
Figure 27: Cinétique de croissance des paramécies traitées (24h) aux HES (<i>M. pipéríta</i>).....	71
Figure 28 : Cinétique de croissance des paramécies traitées (Jours) aux HES (<i>M.pipéríta</i>).....	72
Figure 29 : Cinétique de croissance des paramécies traitées(24h) aux HES (<i>A. herba-alba</i>).....	73
Figure 30 : Cinétique de croissance des paramécies traitées (Jours) aux HES (<i>A. herba-alba</i>).....	73
Figure 31 : Pourcentage de Réponse des Paramécies traitées aux HES du <i>M. pipéríta</i>.....	74

Figure 32: Pourcentage de Réponse des Paramécies traitées aux HES d' <i>A. herba alba</i>	75
Figure 33: Effet des HES du <i>M. pipéríta</i> sur la taille des paramécies.....	79
Figure 34: Effet des HES d' <i>A. herba-alba</i> sur la taille des paramécies.....	80
Figure 35 : Effet des HES du <i>M. pipéríta</i> sur la vitesse de déplacement des paramécies	81
Figure 36 : Effet des HES d' <i>A. herba-alba</i> sur la vitesse de déplacement des paramécies.....	82
Figure 37 : Trajectoires des paramécies témoin et traitées par les HES du <i>M. pipéríta</i>	83
Figure 38 : Trajectoires des paramécies témoin et traitées par les HES d' <i>A. herba alba</i>	85
Figure 39: Electrode à Oxygène (Hansatech Instruments).....	86
Figure 40 : Effet des HES du <i>M. pipéríta</i> sur le taux de lipides totaux.....	93
Figure 41 : Effet des HES d <i>A. herba alba</i> sur le taux de lipides totaux.....	94
Figure 42 : Effet des HES du <i>M. pipéríta</i> sur le taux de protéines totales.....	96
Figure 43 : Effet des HES d <i>A. herba alba</i> sur le taux de protéines totales.....	97
Figure 44 : Effet des HES de <i>M.pipéríta</i> sur le métabolisme respiratoire de la paramécie... ..	98
Figure 45 : Effet des HES d <i>A. herba alba</i> sur le métabolisme respiratoire.....	99
Figure 46: Effet des HES HES du <i>M.pipéríta</i> sur le taux de GSH.....	104
Figure 47 : Effet des HES d <i>A. herba alba</i> sur le taux de GSH.....	105

Figure 48: Effet des HES du <i>M. pipéríta</i> sur l'activité GST.....	107
Figure 49 : Effet des HES d' <i>A. herba-alba</i> sur l'activité GST.....	107
Figure 50 : Effet des HES du <i>M. pipéríta</i> sur l'activité APX	110
Figure 51: Effet des HES d' <i>A. herba-alba</i> sur la variation de l'activité APX	111
Figure 52 : Effet des HES du <i>M. pipéríta</i> sur la variation de l'activité catalase	112
Figure 53 : Effet des HES d' <i>A. herba-alba</i> sur l'activité catalase	113
Figure 54 : Effet des HES du <i>M. pipéríta</i> sur l'activité MDA	114
Figure 55 : Effet des HES d' <i>A. herba-alba</i> sur la variation de l'activité MDA	115

LISTE DES STABLEAUX

Tableau 1 : Rôle des Antioxydants et contre les maladies.....	34
Tableau 2: Composants majoritaires des HES de l'espèce <i>Mentha pipérta</i>	45
Tableau 3 : Composition majoritaires d'HES d'espèces <i>Artémisia herba-alba</i>	54
Tableau 4 : Composition des HES extraites d' <i>Artémisia herba-alba</i>	55
Tableau 5 : Les caractéristiques de nos HES extraites para port a la norme <i>AFNOR</i>	67
Tableau 6: Rendements des HES extraites.....	67
Tableau 7: Caractéristiques physiquo-chimique des HES étudiées..... ;.....	68
Tableau 8 : Valeurs du nombre de génération après 24h d'exposition au HES.....	82
Tableau 9 : Détermination du taux de croissance des paramécies après 24h d'exposition.....	83

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
APX	Ascorbate -peroxydases
ASS	Acide sulfosalicylique
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Serum Albumin Bovin
CAT	Catalase
CDNB	1-Chloro,2,4-Dinitrobenzène
CI50	Concentration inhibitrice moyenne
CL50	Concentration inhibitrice de 50% de la population
DO	Densité optique
DTNB	Acide 5,5'Dithiodis-2-Nitrobenzoïque
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétique
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
GPx	Glutathion peroxydase
GPX	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion disulfure
GST	Glutathion S-transférase
H2O2	Peroxyde d'hydrogène
HCl	Chlorure d'hydrogène (Acide chlorhydrique)
HE	huile essentielle
HES	huiles essentielles
MDA	Malondialdéhyde
pKa	Constante de dissociation d'une molécule.

ROS Reactive oxygene species

SOD Superoxide dismutase

TBA Acide Thiobarbiturique

TBARS Substances réagissant avec l'acide Thio-barbiturique

TCA Acide Trichloracétique

Tris Trishydroxyméthylaminométhane, (2-Amino-2-Hydroxyméthyl-1,3-Propanediol)

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

L'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base tel que, nourriture, abris, vêtements et aussi pour ses besoins médicaux. Les plantes possèdent d'extraordinaires vertus thérapeutiques. Leurs utilisations pour le traitement de plusieurs maladies chez les êtres vivants et en particulier l'homme est très ancienne et a toujours été faites d'une façon empirique (Svoboda et Svoboda, 2000).

Aujourd'hui, on estime que les principes actifs provenant des végétaux représentent environ 25% des médicaments prescrits. Soit un total de 120 composés d'origine naturelle provenant de 90 plantes différentes. En Afrique, près de 6377 espèces de plantes sont utilisées, dont plus de 400 sont des plantes médicinales qui contribuent pour 90% aux traitements médicaux. On a estimé que près de 75% de la population africaine a toujours recours aux plantes pour se soigner. De plus ce type de soin est considéré souvent comme faisant partie de la médecine douce (Kar, 2007).

En plus la disparition de nombreuses substances actives de synthèse en protection des cultures a entraîné un regain d'intérêt pour les substances d'origine naturelle. En parallèle à ces disparitions, le contexte réglementaire incite fortement à développer l'utilisation des méthodes alternatives à la lutte chimique ou la mise en marché des produits phytosanitaires, (Plan Ecophyto 2018). De ce fait un autre secteur a vu la lumière ces dernières années c'est les bio- pesticides.

Les principes actifs des plantes médicinales sont souvent liés aux produits des métabolites secondaires (Bourgaud et *al*, 2001 ; Kar, 2007). Parmi ces métabolites secondaires on peut citer les huiles essentielles (HEs), qui sont largement utilisées en industries (parfumerie, cosmétique, alimentation et médecine) (Grysole, 2004).

De ce fait les HEs ne sont pas forcément des produits finaux dans la mesure où, une fois produites, elles peuvent servir d'intrants à la fabrication de plusieurs produits : Elles entrent dans la composition de parfums, de cosmétiques (shampooings, gel-douches, crèmes, laits, déodorants corporels), de produits d'entretien (savons, détergents, lessives, assouplissants de textile) et de tout autre produit, comme par exemple insecticides, désodorisants d'ambiance, diffuseurs, bougies, ou comme arômes pour ajouter l'agroalimentaire.

Bien qu'accessibles à tous, les HEs peuvent représenter certains dangers et malgré leur image de produits naturels elles ne sont pas dépourvues de toxicité. En effet, les chercheurs signalent chaque année des problèmes de santé dus à l'utilisation des HEs.

Alors que de nombreux ouvrages font référence à la toxicité de nombreux produits sur le marché, la toxicité des huiles essentielles est moins investiguée. La plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi. Les interactions de ces produits avec les médicaments sont aussi peu mentionnées (Pibiri, 2006). Cependant quelques informations sur certaines toxicités sont décrites par la littérature : Ainsi, chez l'homme des intoxications aiguës sont possibles. Les accidents graves, les plus souvent observés chez les petits enfants, sont provoqués par l'ingestion en quantité importante d'huiles essentielles.

Il en est de même concernant les problèmes posés par la dispersion de polluants dans l'environnement ont suscité l'intérêt de la communauté scientifique depuis maintenant de nombreuses décennies. La prise de conscience de la nécessité de préserver les écosystèmes terrestres et aquatiques a ainsi fait émerger certaines questions, notamment celles du devenir de ces xénobiotiques dans l'environnement ainsi que de leurs effets sur les communautés animales et végétales.

Ainsi, devant cette dualité effet toxique/ Effet bénéfique, nous nous sommes proposés dans le travail, d'étudier l'évaluation de la toxicité des HES sur un modèle cellulaire alternatif.

L'Algérie abrite recèle une richesse floristique incontestable. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à deux plantes (l'armoise blanche et la menthe), poussant à l'état spontané dans la région de Tébessa.

La sélection de ces deux espèces est basée essentiellement sur leurs grandes utilisations en médecine traditionnelle, dans notre alimentation et celle du bétail (en ce qui concerne l'armoise blanche). Donc ce travail a pour objectifs d'une part :

-l'extraction des HEs de l'armoise blanche (*Artemisia herba alba*) et de la menthe poivrées (*Mentha piperita*), d'en étudier les caractéristiques physico-chimiques, et enfin de tester ces huiles vis a vis des cellules en cultures, à savoir *Paramecium sp.* Ces organismes alternatifs sont parfaitement adaptés aux tests de cytotoxicité que nous voulons entreprendre.

En effet les paramètres tels que la croissance, le métabolisme respiratoire ou encore certains bio-marqueurs de la toxicité et/ou du stress radicalaire, sont des éléments déterminants dans la mise en évidence d'une quelconque activité biologique d'un xénobiotique.

ACTION ET ACTIVITES DES HES

I-Substances naturelles et huiles essentielles (HEs)

Les plantes sont une source immense de molécules chimiques complexes exploitées par l'homme dans l'industrie agro-alimentaire et l'industrie pharmaceutique.

Aujourd'hui, les deux tiers de la pharmacopée ont recours à leurs propriétés curatives. Toutes ont pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes (Schiller et Schiller, 1994).

Ces substances naturelles dérivent du métabolisme secondaire en opposition aux molécules indispensables à la vie issues des métabolites primaires. Aujourd'hui, il est clairement établi que ces métabolites secondaires sont étroitement impliqués dans les interactions entre la plante et son environnement (Harbon, 2001).

La diversité chimique de ces substances naturelles représente le résultat d'un processus d'évolution biochimique souvent imposé par les phénomènes de co-évolution entre la plante et les autres organismes qui interagissent avec elle. Les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes constituent les trois familles chimiques majeures représentatives de ces produits et comprennent chacune une dizaine de milliers de structures chimiques différentes (Croteau et *al.*, 2000).

1-Les huiles essentielles (HEs)

Une huile essentielle (HE) peut être un ensemble de molécules pour un chimiste, un arôme pour un parfumeur ou encore la quintessence ou l'esprit d'un végétal pour un alchimiste (Moroet buronza, 2008).

En réalité, une HE est l'ensemble de tout cela, car il s'agit d'un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'HE est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition (Clarke, 2008).

Contrairement à ce que le terme pourrait laisser penser, les HEs ne contiennent pas de corps gras (lipides), et ne sont pas « essentiel » dans le sens qu'elles sont nécessaires à la

croissance ou au métabolisme (Wichtel et Anton, 1999). Les composés des HEs ont une masse moléculaire relativement faible, ce qui leur confère un caractère volatil et est à la base de leurs propriétés olfactives.

Une HE contient souvent de 50 à 100 molécules différentes et peut à l'extrême en comprendre jusqu' à 300 travaillant en synergie pour donner à l'HE ses propriétés (Lahlou, 2004). Sa composition biochimique n'est pas rigoureusement identique. Il est impossible de reproduire en laboratoire cette complexité présente à l'état naturel.

Pour être de qualité optimale, une HE doit être 100% naturelle (c'est-à-dire non dénaturée par des molécules de synthèse chimique), 100% pure (c'est-à-dire non mélangée avec d'autres HEs ayant des caractéristiques proches) et 100% intégrale (c'est-à-dire que le distillateur aura recueilli la totalité des molécules contenues dans la matière végétale distillée). (Chassaing, 2006).

Une seule huile peut avoir plusieurs utilisations à la fois (Bakkali et *al.*, 2000). L'activité des HEs est souvent réduite à l'activité de ses composés majoritaires, ou à ceux susceptibles d'être actifs. Evalués séparément sous la forme de composés synthétiques, ils confirment ou infirment l'activité de l'HE de composition semblable. Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent de manière synergique.

De cette manière, la valeur d'une HE tient à son « totum », c'est à dire dans l'intégralité de ses composants et pas uniquement à ses composés majoritaires (Lahlou, 2004). C'est ce qui explique notamment la grande efficacité des HEs dans le cadre de la lutte contre les bactéries, les champignons ou les virus (Chassaing, 2006).

Certains auteurs indiquent, que la teneur des plantes en HEs est faible, souvent inférieure à 1%. Il existe, cependant, des exceptions telles que le clou de girofle qui renferme plus de 15%(Ghestem et *al.*,2001).

1-1- Répartition des HEs

Les HEs sont largement répandues dans le règne végétal et sont particulièrement abondantes dans certaines familles comme les rutacées, les labiées, les conifères, les myrtacées, les ombellifères et les lamiacées pour ne citer que les plus importantes.

Selon les espèces, les organes sécréteurs d'essences peuvent se trouver dans les sommités fleuries, les graines, les fruits, les feuilles, les rhizomes, les racines, le bois, l'écorce ou encore l'oléorésine (Chassaing, 2006).

1-2- Rôle des HEs

Beaucoup de plantes produisent les HEs en tant que métabolites secondaires, mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante est inconnu (Rai et *al.*, 2003). Elles sont en général considérées comme des déchets du métabolisme ou des sous produits de l'activité métabolique d'une plante (Amiot, 2005).

Cependant, plusieurs effets utiles ont été décrits telles que la réduction de la compétition des autres espèces de plantes (allélopathie) par inhibition chimique de la germination des graines, par exemple le cinéole et le camphre, libérés dans l'atmosphère par *Salvia leucophylla*, sont absorbés par le sol sec, inhibant la germination des espèces prairiales, la protection contre la flore microbienne infectieuse grâce aux propriétés fongicides et bactéricides et contre les herbivores par goût et effets défavorables sur le système nerveux (Porter, 2001; Guignard et Dupont., 2004).

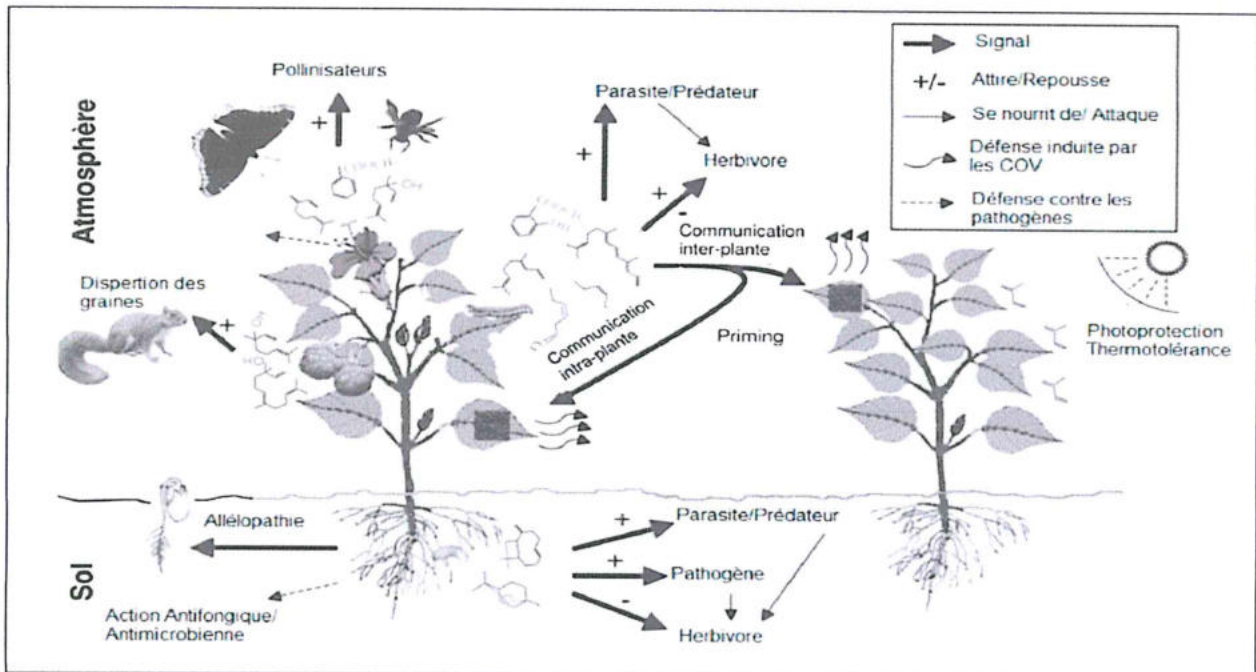


Figure 1: Interactions des plantes avec leur environnement via les composés organiques (Dudareva *et al.*, 2006).

Certains auteurs pensent que les HES pourraient avoir un rôle attractif vis-à-vis des insectes pollinisateurs et favoriseraient ainsi la pollinisation (Bruneton, 1999; Guignard, 2000) (Figure 1). D'autres affirment que les HES jouent un rôle hormonal, régulateur et catalyseur dans le métabolisme végétal et semblent aider la plante à s'adapter à son environnement. Tandis que Guignard *et al.* (1985) considèrent l'huile comme une source énergétique: «mises en réserve pendant le jour, elles seraient dégradées durant la nuit en acétylCoA».

1-3 Synthèse des HES

Les HES sont synthétisées dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent dans des cellules glandulaires recouvertes d'une cuticule. Les cellules endodermiales se situent toujours à l'abri de ces substances, grâce à la présence d'un autre type de cellules appelées les cellules de gardes (Karray-Bouraoui *et al.*, 2009).

1-4 Organes sécréteurs des HEs

Les HEs peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : feuilles, fleurs, écorces, rhizomes, fruits et graines. La synthèse et l'accumulation d'une HE dans les végétaux sont généralement liées à l'existence de structures histologiques spécialisées, localisées en certains points des tissus.

En effet, les cellules sécrétrices sont soit superficielles, appartenant à l'épiderme soit sous cutanées, comprises dans des assises définies (Bagchi et Srivastava, 2003 ; Svoboda, 2003).(Figure 2).

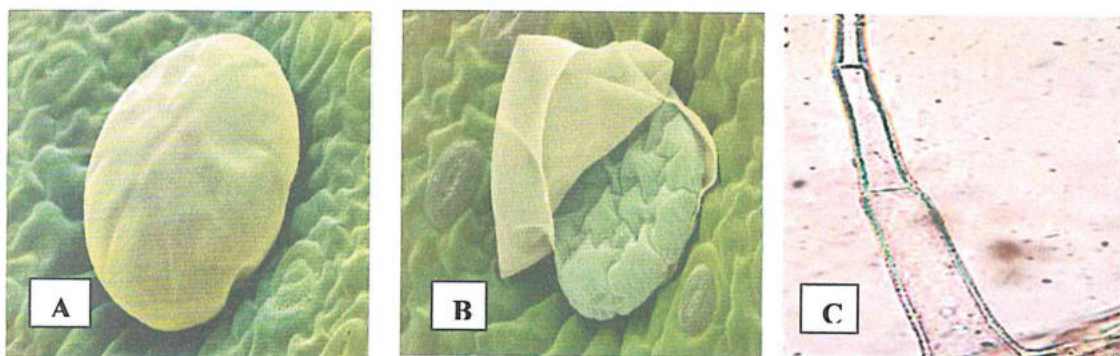


Figure 2:(A),(B) : Glande sécrétrice avec cuticule dans la face inférieure de la feuille d'*Origanum vulgare* (Svoboda et al., 2003), (C) : poil sécréteur de *Mentha pulegium* (Karray-Bouraoui et al., 2009 ; Combrinck et al., 2007).

La forme et le nombre des structures histologiques sécrétrices varient d'une famille botanique à l'autre et même d'une espèce à une autre. Néanmoins, plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une même espèce (Karray-Bouraoui et al., 2009).

Les trichomes glandulaires sont les formes les plus répandues, ils représentent à la fois le site de biosynthèse et de stockage des HEs (Combrinck et al., 2007).(Figure 3).

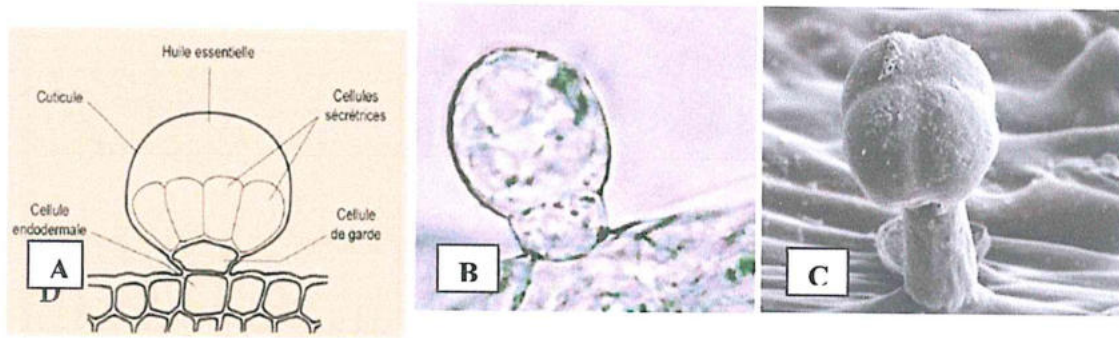


Figure 3:(A) : structure de trichome glandulaire de *Thymus vulgaris*,(B) : trichome glandulaire de *Mentha pulegium* et (C) : trichome glandulaire de *Lippia scaberrima* (Karray-Bouraoui et al., 2009 ; Combrinck et al., 2007).

1-5- Composition chimique des HEs

Les HEs sont des mélanges complexes pouvant contenir plus de 300 composés différents (Sell, 2006). La plupart des composants des HEs sont inclus dans deux groupes : les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes, les deux sont synthétisés à travers deux voies métaboliques séparées (Amlan et Patra, 2010; Calsamiglia et al., 2007).

Rappelons ici que les terpènes sont des composés issus du couplage de plusieurs unités « isopréniques » (C_5H_8), soit deux unités pour les monoterpènes ($C_{10}H_{16}$) et trois pour les sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$). Exceptionnellement, quelques diterpènes ($C_{20}H_{32}$) peuvent se retrouver dans les HEs (Vila et al., 2002). Plusieurs milliers de composés appartenant à la famille des terpènes ont, à ce jour, été identifiés dans les HEs (Modzelewska et al., 2005). Seuls les terpènes les plus volatils, c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée, y sont rencontrés soit les monoterpènes (myrcène, β -pinène, γ -terpinène, etc.) et les sesquiterpènes (β -caryophyllène, α -humulène, β -bisabolène, etc.).

1-5-1 Composés terpéniques

Les monoterpènes représentent le groupe le plus diversifié des métabolites secondaires des végétaux, plus de 15.000 composés différents sont décrits dans la littérature. Ils dérivent d'une structure de base à cinq carbones (C_5H_8), communément appelée isoprène (Figure 4).

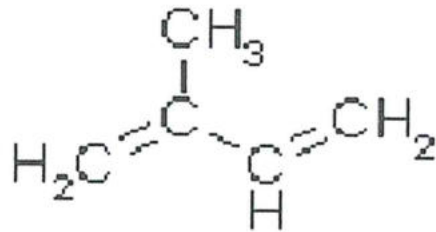


Figure 4: Structure de la molécule d'isoprène (Calsamiglia et *al.*, 2007).

Selon le nombre répétitif de cette unité, les terpénoïdes sont classés en : monoterpénoïdes (C10), sesquiterpénoïdes (C15) et diterpénoïdes (C20).

Dans la composition de la plupart des HEs les monoterpénoïdes et les sesquiterpénoïdes forment la majeure partie (Benchaar et *al.*, 2008; Calsamiglia et *al.*, 2007).

La réactivité des cations intermédiaires obtenus lors du processus biosynthétique des mono- et sesquiterpènes explique l'existence d'un grand nombre de molécules dérivées fonctionnalisées telles que des alcools (géraniol, α -bisabolol), des cétones (menthone, p-vétivone), des aldéhydes (citronellal, sinensal), des esters (acétate d'ot-terpinyle, acétate de cédryle), desphénols (thymol), etc. (Figure 5)

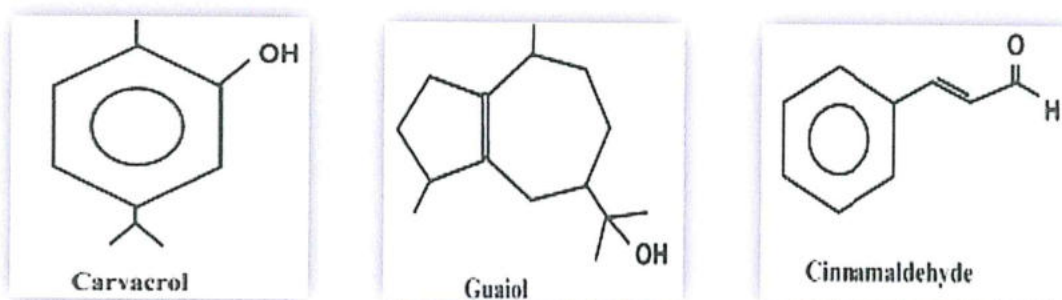


Figure 5 : Structure de quelques composés des HEs (Calsamiglia et *al.*, 2007).

1-5-2 Composés d'origines diverses

Ce sont des produits résultant de la transformation de molécules non volatiles entraînaibles par la vapeur d'eau. Il s'agit de composés issus de la dégradation d'acides gras, de terpènes. D'autres composés azotés ou soufrés peuvent subsister mais sont rares.

Enfin, il n'est pas rare de trouver des produits de masses moléculaires plus importantes non entraînaibles à la vapeur d'eau, mais extractibles par les solvants : homologues des phénylpropanes, diterpènes, etc... (Bruneton, 1999).

Abou Zeid (1988) signale que le composé soufré le plus rencontré est l'allyl-isothiocyanate issu de la dégradation d'un glucoside sinigroside qui se trouve dans les graines de moutarde noire. Ce composé est incolore, fluide et de saveur piquante.

Certaines plantes aromatiques produisent des huiles essentielles dont les composés terpéniques renfermant l'élément nitrogène. Parmi ces composés on cite l'indole, qui se trouve dans l'huile essentielle de citron et des fleurs de jasmin.

1-6-Propriétés physiques des HEs

Les HEs sont des liquides à température ambiante, d'odeur aromatique très prononcée, généralement incolores ou jaune pâle à l'exception de quelques HEs telles que l'huile de l'Achillée et l'huile de la Matricaire. Ces dernières se caractérisent par une coloration bleu à bleu verdâtre, due à la présence de l'azulène et du chamazulène

La plupart des HEs ont une densité inférieure à celle de l'eau et sont entraînable à la vapeur d'eau ; il existe, cependant, des exceptions telles que les HEs de Sassafras, de Girofle et de Cannelle dont la densité est supérieure à celle de l'eau.

Elles possèdent un indice de réfraction souvent élevé et sont douées de pouvoir rotatoire (Paris et Hurabeille, 1981 ; Duraffourd et *al.*, 1990 ; Salle et Pelletier, 1991).

La densité nous renseigne selon Garnerio (1996) sur la composition chimique : ainsi une densité inférieure à 0.9 indique la présence, dans cette huile, de composés terpéniques et aliphatiques à des taux élevés, alors qu'une densité supérieure à 1 indique une composition très variée en composés terpéniques polycycliques.

Les HEs s'évaporent et se volatilisent à température ambiante. Très peu solubles dans l'eau à laquelle elles communiquent leurs odeurs, cette eau est dite «eau distillée florale».

Les HEs sont solubles dans les alcools, dans les huiles fixes et dans la plupart des solvants organiques (Paris et Hurabielle, 1981 ; Bruneton, 1999; Ghuem et *al.*, 2001).

Leur point d'ébullition est toujours supérieur à 100°C et dépend de leurs poids moléculaires par exemple les points d'ébullition du caryophyllène, du géraniol, du citral et du α -pinène sont 260°, 230°, 228° et 156°C respectivement, mais d'après Valnet (1984), ce point varie de 160°C à 240°C.

1-7- Facteurs de variabilité des HEs

1-7-1 Facteurs de variabilité extrinsèque

Il existe beaucoup de facteurs externes pouvant influencer la composition chimique de l'HE. Il en est ainsi de la température, l'humidité (Boira et Blanquer, 1998 ; Palà-paul et al., 2001), l'altitude et la latitude (Azevedo et al., 2001 ; Oliveira et al., 2005) la nature du sol (Oliveira et al., 2005 ; Peng et Yang, 2005 ; Zheljaskov et al., 2005). Ces facteurs influencent la composition chimique et le rendement des HEs.

Certains auteurs évoquent également le cycle végétatif (Jordan et al., 2006 ; Sefidkon et al., 2007), l'âge et l'organe végétatif (Laouer, 2004), la période de récolte (Maderia et al., 2005 ; Randrianalijaona et al., 2005) les parasites, les virus et les mauvaises herbes (Svoboda et Hampson, 1999 ; Smallfield, 2001).

Chez *Mentha piperita* par exemple, les nuits froides favorisent la formation de menthol alors que les nuits tempérées favorisent celle du mentho-furanne (Bruneton, 1999). Les études portant sur la variation de la composition chimique des huiles en fonction du cycle circadien et des saisons sont nombreuses (Assad et al., 1997; Lopes et al., 1997). L'heure de la récolte du matériel végétal ainsi que le moment dans l'année sont en effet des facteurs importants. À titre d'exemple, il a été démontré que, la composition de l'HE de feuilles d'*Ocimum gratissimum*, varie considérablement en fonction de l'heure de la récolte (Vasconcelos et al., 1999).

Outre la composition, ces facteurs peuvent également avoir un impact sur la teneur en HEs. Les Citrus par exemple ont une teneur plus importante en HEs lorsque la température est élevée (Bruneton, 1999). Alors que *Chrysanthemum coronarium* sont plus riches en HEs sous l'effet de fertilisants (Alvarez-Castellanos et al., 2003).

Selon Djibo et al. (2004) la présence ou l'absence de certains constituants dans la plante dépend de l'un ou de la combinaison de trois facteurs (le patrimoine génétique, l'âge et l'environnement de la plante).

C'est ainsi que l'action des HEs est le résultat de l'effet combiné de leurs composés actifs et inactifs, ces composés inactifs pourraient influencer la disponibilité biologique des composés actifs et plusieurs composants actifs pourraient avoir un effet synergique (Svoboda et Hampson, 1999).

Le rendement et la composition chimique des HEs varient également en fonction de la méthode d'extraction (khajeh et *al.*, 2004 et 2005 ; Viljoen et *al.*, 2006 ; Sefidkon et *al.*, 2007). La durée de séchage affecte aussi bien le rendement que la composition (Yayi et *al.*, 2004).

Les conditions principales requises pour une production rentable en HE sont : un bon matériel végétal, la variété de la plante, le sol, l'équipement de distillation et le climat (Smallfield, 2001).

1-7- 2Facteurs de variabilité intrinsèques (Chémotype)

La composition chimique de l'HE de certaines plantes peut varier à l'intérieur d'une même espèce. En effet une même plante aromatique, botaniquement définie, synthétise une essence qui sera biochimiquement différente en fonction du biotope dans lequel elle se développera, ces variétés chimiques sont communément appelées chémotypes, types biogénétiques, races chimiques ou races biologiques. Deux chémotypes présenteront non seulement des activités thérapeutiques différentes (Lydie, 2002) mais aussi des toxicités très variables (Baudoux, 1997). L'exemple le plus marquant est celui de l'espèce sauvage *Thymus vulgaris*. Il existe en effet six chémotypes différents pour cette seule espèce. Ces différences sont au niveau de la nature du monoterpène majoritaire de l'HEs qui peut être soit le géraniol, l'exterpinéol, le thuyanol-4, le inalool, le carvacrol ou le thymol (Thompson et *al.*, 2003).

Ce polymorphisme chimique existe aussi pour bien d'autres espèces: *Origanum vulgare* (Mockute et *al.*, 2001), *Mentha spicata* (Edris et *al.*, 2003) en sont des exemples. Il est important de noter que des HEs à chémotypes différents présenteront non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables.

Ainsi, la méconnaissance des chémotypes peut parfois être à l'origine d'accidents graves. L'absinthisme (intoxication à l'absinthe) en est un exemple frappant: Y *Artemisia absinthium* qui était récolté dans la région parisienne dans le but de confectionner le fameux apéritif contenait l' α -thujone, molécule fortement neurotoxique, comme composé majoritaire à 45%, alors que celle présente dans les régions alpines (d'où, d'ailleurs, la boisson est originaire) ne présentait qu'un taux de 3% en α -thujone. L'alcool préparé avec cette dernière était sans danger pour l'organisme (Franchomme et pénoël., 1990),

La non-connaissance de cette notion capitale et le manque de précision laissent la porte ouverte aux échecs thérapeutiques et à la toxicité de certaines d'entre elles (Laouer, 2004).

1-8-Conservation des HEs

Les HEs s'oxydent facilement à la lumière et se résinifient en absorbant de l'oxygène, en même temps, leurs odeurs se modifient, leurs points d'ébullition augmentent et leurs solubilités diminuent. Elles absorbent le chlore, le brome et l'iode en dégageant de la chaleur (Duraffourd et *al.*, 1990). A cause de leur évaporation rapide, leur sensibilité à l'air et à la lumière, les HEs doivent être conservées dans des flacons opaques et fermés hermétiquement (Valnet, 1984 ; Salle et Pelletier, 1991).

ACTION ET ACTIVITES DES HES

II-Mécanismes d'action des HEs

La composition complexe des HEs tend à prouver que cette activité serait due à plusieurs mécanismes d'action différents, liés à la nature chimique de ces composés (Burt, 2004 ; Carson et *al.*, 2002). Plusieurs théories sont proposées pour expliquer le mécanisme par lequel les HEs exercent leur activité sur les micro-organismes.

Les mécanismes d'action des HEs et leur sélectivité envers certaines bactéries restent jusqu'à présent mal élucidés (Hammer et *al.*,1999; Dorman et *al.*,2000; Bagamboula et *al.*,2004). Selon ces auteurs, cette sélectivité est le résultat de la composition variée des fractions actives des huiles, qui présentent souvent des actions synergiques. Il semble que le mécanisme d'action de ces huiles est lié essentiellement à la structure de la paroi et à la perméabilité membranaire des bactéries à Gram+ et Gram-.

Les HEs sont constituées de molécules lipophiles capables de pénétrer la double couche phospholipidique, leur accumulation entre les phospholipides entraîne alors un changement de conformation et un mauvais fonctionnement de la membrane cellulaire, perturbant ainsi le transport membranaires des substances nutritives (Ultee et *al.*,1999).

Un mécanisme d'action proposé implique le groupement hydroxyle des phénols, comme le carvacrol, qui agirait comme un transporteur transmembranaire des cations et des protons monovalents, cet effet perturbe le gradient ionique et le fonctionnement membranaire des cellules microbiennes (Ultee et *al.*,1999).

Mais certaines bactéries sont capables de contrebalancer cet effet par l'utilisation de la pompe ionique, dans ce cas la croissance ralentit grâce à l'épuisement de l'énergie de la pompe (Cox et *al.*,2001 ; Griffin et *al.*, 1999).

D'autres mécanismes d'action sont liés à la coagulation des constituants cellulaires par la dénaturation des protéines (Gustafson et *al.*, 1997). Les HEs extraites de cannelle et de l'ail peuvent inhiber l'activité enzymatique des bactéries du rumen telle l'espèce *Enterobacter aerogenes*. D'autres HEs inhibent la croissance microbienne par l'inactivation des acides nucléiques (Calsamiglia et *al.*, 2007).

L'action des HEs dépend aussi de la nature des microorganismes ciblés. Les bactéries à Gram positif sont plus sensibles à l'action des HEs, par rapport aux bactéries à Gram

négatif. Cela peut être expliqué par la présence de la membrane externe chez les bactéries à Gram négatif, elle représente en effet une barrière capable de diminuer la perméabilité des composés hydrophobes (Calsamiglia et *al.*, 2007). Cependant, les molécules à faible poids moléculaire comme le thymol et le carvacrol peuvent traverser cette barrière (Dorman et *al.*, 2000., Ultee et *al.*, 1999). (Figure 6).

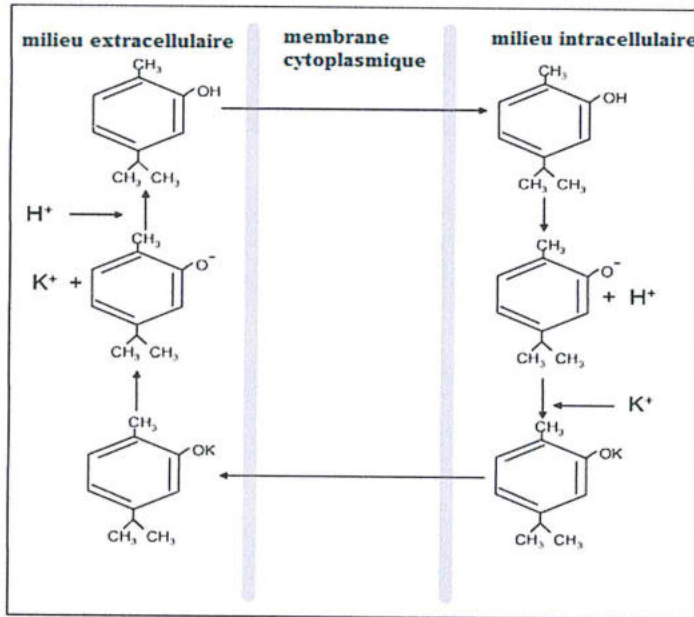


Figure 6 : Mécanisme d'action du carvacrol sur la membrane cellulaire (Ultee et *al.*, 1999).

1-Activité liée à la composition chimique

De récentes études (Caillet et Lacroix, 2007) montrent qu'une HES contient souvent de 50 à 100 molécules différentes et peut à l'extrême en comprendre jusqu'à 500. Sa composition biochimique n'est pas ailleurs identique. Il est impossible de reproduire en laboratoire cette complexité présente à l'état naturel. C'est ce qui explique notamment la grande efficacité des HES dans le cadre de la lutte contre les bactéries, les champignons ou les virus.

Selon Bouaoun et ses collaborateurs (2007), la plupart des composés chimiques des HES sont dotés de propriétés antimicrobiennes, mais ce sont les composés volatils majeurs qui présentent les propriétés antimicrobiennes les plus importantes, et en particulier les phénols, les alcools et les aldéhydes: carvacrol (origan, sarriette), eugénol (feuille de cannelle de Ceylan, clou de girofle), linalool (coriandre), cinnamaldéhyde (cannelle de Chine), thymol (thym).

L'activité des HES est souvent réduite à l'activité de ses composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. Évalués séparément sous la forme de composés synthétiques, ils confirment ou infirment l'activité de l'HE de composition semblable. Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent de manière synergique. De cette manière, la valeur d'une HES tient à son "totum", c'est à dire dans l'intégralité de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires (Lahlou, 2004).

Les phénols sont responsables des altérations irréversibles au niveau de la membrane bactérienne. Le thymol et l'eugénol sont responsables de l'activité fongicide (Bennis et al., 2004) et bactéricide des HES qui en contiennent (Coxet al., 2000). La molécule de thymol a un effet inhibiteur et létal sur diverses souches, dont *E. coli* et *S. aureus*, sur lesquelles elle provoque des fuites d'ions potassium (K^+). En revanche elle n'est pas active sur *P. aeruginosa* (Walsh et al., 2003). Plus les teneurs en phénols sont élevées, plus les HES sont efficaces (Cosentino et al., 1999).

2- Activité liée à la combinaison entre les HES

Certaines études ont montré que l'activité biologique des HES est supérieure à celle de ses composés majoritaires testés séparément. Les composés purs, le thymol et le carvacrol ont un net effet synergique, ce qui expliquerait les différentes activités des chémotypes de *Thymus*. L'aldéhyde cinnamique est généralement indifférent aux deux phénols (Lahlou, 2004).

Les effets antimicrobiens des associations des HES, comme pour les associations d'antibiotiques, sont définis selon quatre interactions possibles:

- **Indifférence:** l'activité d'une HES n'est pas affectée par l'autre: $(A + B) = \text{effet A ou effet B}$.
- **Addition:** l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque HE étudiée isolément, à la même concentration que dans l'association: $(A + B) = \text{effet A} + \text{effet B}$.
- **Synergie:** l'effet est significativement supérieur à la somme de chaque HES étudiée isolément, à la même concentration: $(A + B) > \text{effet A} + \text{effet B}$.

- **Antagonisme:** l'association diminue l'activité de l'une ou l'autre des HES Elle est inférieure à la somme des effets de chaque HES prise séparément: $(A + B) < \text{effet A ou effet B}$.

Cependant, une étude réalisée par Skandamis et ses collaborateurs (2001) ne corrobore pas les effets de synergie mentionnés. Une combinaison de concentrations comparables en thymol et en carvacrol reproduit bien l'inhibition de l'HES mais les autres composés minoritaires ont pour effet de diminuer l'effet des principaux composés actifs phénolés.

Dans une étude réalisée par Pibiri (2006), il a été observé que les associations des HES de cannelle et de thym sont synergiques vis-à-vis de *S. aureus*. En revanche, elles sont indifférentes sur le genre *Bacillus*; par contre sur *P.aeruginosa* et *E. coli*(Gram-) de telles associations ne sont pas plus efficaces et sont souvent indifférentes. En revanche la cannelle testée individuellement est plus efficace que celle de thym, contrairement aux cas de présence de bactéries à Gram+.

3- L'activité pharmacologique et biologique des HEs

Les effets bénéfiques des composés volatils des huiles essentielles sont utilisés depuis fort longtemps par les anciennes civilisations pour soigner les pathologies courantes. Aujourd'hui, le potentiel thérapeutique des huiles essentielles et de leurs constituants volatils est reconsidéré et les études qui leurs sont consacrées abondent dans la littérature scientifique.

Les HEs sont utilisées en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite (Maruyama et al., 2004).

Plusieurs études ont mis en évidence l'activité anti-inflammatoire de l'HES de *Melaleuca alternifolia* (Caldefie-Chézet et al., 2006) et de son composé principal, l' α -terpinéol (Hart et al., 2000). Les composés actifs agissent en empêchant la libération d'histamine ou en réduisant la production de médiateurs de l'inflammation.

Un autre exemple, l'HES de géranium (Maruyama et al., 2005) ainsi que le linalol et son acétate (Paena et al., 2002) ont montré une activité anti-inflammatoire sur des oedèmes de pattes de souris induit par le carraghénane. Les HEs représentent donc une nouvelle option dans le traitement des maladies inflammatoires.

Le potentiel thérapeutique très varié des HEs a attiré, ces dernières années, l'attention de chercheurs quant à leur possible activité contre le cancer. De ce fait, les HEs et leurs constituants volatils font dorénavant l'objet d'études dans la recherche de nouveaux produits naturels anticancéreux (Edris, 2007).

Les HEs agissent au niveau de la prévention du cancer ainsi qu'au niveau de sa suppression. Il est bien connu que certains aliments, comme l'ail ou le curcuma, sont de bonnes sources d'agents anticancéreux utiles pour prévenir l'apparition de cancer (Béliveau et Gingra., 2005). Certains de ces aliments contiennent des composés volatils dont l'activité chimio-préventive a été mise en évidence. L'HEs d'ail, par exemple, est une bonne source de composés sulfurés (Pyun et Shin., 2006) reconnus pour leur effet préventif contre le cancer (Milner, 2001).

4-Stresse oxydatif et ROS

Le stress oxydatif, qui survient lors de déséquilibres entre la production de radicaux libres et d'enzymes antioxydants, est en relation avec l'apparition de maladies telles que : l'alzheimer (Butterfield, 2002), l'artériosclérose et le cancer (Gardner, 1997). Et les inflammations gastro-intestinales et l'ulcère les œdèmes et vieillissement prématuré de la peau (Georgetti et al., 2003 ; Atawodi, 2005). Selon Favier (2003) est la cause initiale de plusieurs maladies: cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré, le diabète, et les rhumatismes.

4-1 Sources et cibles des ROS

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Extrêmement instable, donc très réactifs et, par conséquent, leur durée de vie est généralement très courte, de l'ordre de 10^{-4} secondes, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron (André, 1998).

L'oxygène (O_2) est une molécule biradicalaire formée de deux atomes présentant sur leurs orbitaux externes deux électrons non appariés. Il est donc susceptible de capter facilement 1 puis de 2 électrons pour être partiellement réduit en anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), puis en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Il est ainsi à l'origine de la formation d'espèces réactives oxygénées (ROS) (De Leiris, 2003).

Cette appellation « dérivés réactifs de l'oxygène » n'est pas restrictive, elle inclut les (ROS), proprement dit, mais aussi certains dérivés non radicalaires dont la toxicité est importante tel que le (H_2O_2), et les espèces réactives de l'azote (ERN) à savoir le peroxy-nitrite ($ONOO^-$) (Fontaine et *al.*, 2002).

La chaîne respiratoire est une source permanente de production des ROS. Selon certains auteurs, environ 1 à 3% de l'oxygène utilisé par la mitochondrie sont incomplètement réduits et produisent des anions superoxyde, de l'eau oxygénée et éventuellement des radicaux hydroxyles (Pincemail et *al.*, 2002 ; Favier, 2003 ; De Moffarts et *al.*, 2005).

L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement via les cellules phagocytaires. L'activation de ces cellules immunitaires par des stimuli exogènes ou endogènes s'accompagne d'une accélération de leur consommation d'oxygène avec activation d'une enzyme membranaire, la NADPH oxydase qui catalyse la réduction de cet oxygène en anion superoxyde (O_2^-).

A côté de ces sources majeures des ROS, il existe des sources cytosoliques, essentiellement le peroxysome qui constitue une source importante de la production cellulaire de H_2O_2 (Sevanian et *al.*, 1990; Valko et *al.*, 2007), la xanthine oxydase qui produit de O_2^- et H_2O_2 (Groussard, 2006), les enzymes de réticulum endoplasmique lisse (cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques) (Massion et *al.*, 2002).

A cela, s'ajoute d'autres facteurs qui peuvent contribuer dans la formation des radicaux libres dont les rayonnements UV capables de générer des anions superoxyde ou de l'oxygène singulet, les rayons X ou γ sont aussi capables de couper la molécule d'eau en deux radicaux par l'intermédiaire d'agents photo-sensibilisants (Tamer, 2003) les poussières d'amiante et de silice sont des sources des ROS (Favier, 2003 ; Wang et *al.*, 2008).

Les fumées de combustion (de cigarettes, de bois, etc.), la consommation de l'alcool et l'effort physique intense sont aussi des paramètres à ne pas écarter (Lee et *al.*, 2006 ; Pincemail et Defraigne, 2004). Des infections bactériennes ou virales provoquent, elles aussi selon Aurousseau (2002), des phénomènes radicalaires à caractère exponentiel après augmentation de la population des macrophages impliqués dans leur élimination.

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiées de l'attaque par le radical OH, réaction appelée la peroxydation lipidique (Lee et al., 2006 ; Ré et al., 2005). (Figure 7)

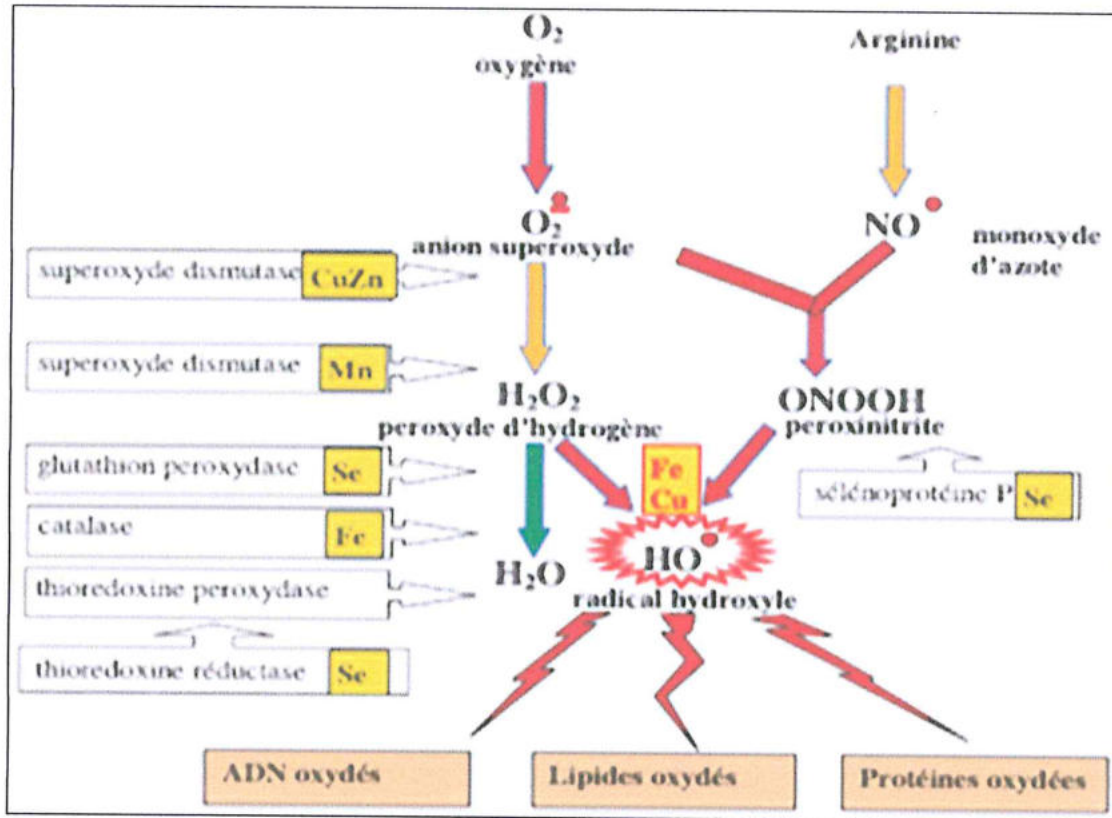


Figure 7: Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (Favier, 2003).

Les conséquences seront différentes : l'attaque des lipides circulants aboutit à la formation de LDL oxydées qui, captés par des macrophages, forment le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires ; l'attaque des phospholipides membranaires modifient la fluidité la perméabilité de la membrane, aboutissant à la désorganisation complète de la membrane, et altérant de ce fait le dysfonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Les ROS peuvent provoquer des lésions des acides nucléiques susceptibles d'entraîner des mutations ou d'altérer l'expression des gènes. Certains affectent les bases, d'autres induisant des cassures dans les brins (Ré et al., 2005). Ils conduisent à la dénaturation oxydante des acides aminés et par conséquent modifient les structures primaires, secondaires et tertiaires des protéines (Pincemail et al., 1999).

Par ailleurs, le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques, en présence de traces métalliques (Figure 10), en libérant des cétoaldehydes, H₂O₂ et OH⁻, qui entraînent la coupure de protéines et leur glycation par attachement du cétoaldéhyde. Ce phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine (Favier, 2003).

Le stress oxydant serait également impliqué dans les maladies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer où la mort neuronale pourrait être liée à un phénomène d'apoptose impliquant les radicaux libres. Enfin, les radicaux libres semblent également jouer un rôle non négligeable dans la cancérogenèse, puisque ces espèces peuvent être responsables de mutations dans l'ADN, ce qui constitue un facteur de risque dans l'initiation et le développement du cancer (Desport et Couratier, 2002).

4-2 Systèmes antioxydants endogènes

Un antioxydant est toute substance capable de retarder ou d'inhiber l'oxydation des substrats biologiques (Al-Mamary et al., 2002 ; Karou et al., 2005). Ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs (Vansant, 2004).

Pour faire face à ces produits oxydants délétères, l'organisme possède tout un arsenal de défense qualifié d'antioxydants. De plus, de nombreuses molécules d'origine naturelle (composés phénoliques, alcaloïdes, HEs,...) qui sont étudiées pour leur propriétés antioxydantes et leur contribution dans la lutte contre les espèces oxydantes de l'organisme (Benalia, 2008).

Ces antioxydants ont deux origines, l'une apportée par l'alimentation sous forme de fruits et de légumes, tandis que l'autre est endogène représentée par des enzymes, (Curtay et Robin, 2000). Pincemail et Defraigne (2004) ajoutent aussi quelques oligo-éléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs importants pour l'activité de certains enzymes antioxydants.

Ce sont des enzymes ou protéines antioxydantes (Superoxyde dismutase, Catalase et Glutathion peroxydase) élaborés par notre organisme avec l'aide de certains minéraux. Elles sont présentes en permanence dans l'organisme mais leur quantité diminue avec l'âge (Mika et al., 2004). D'après (Arora et al., 2002) Les antioxydants endogènes sont :

- Les superoxydes dismutases (SOD) : sont des métallo-enzymes se retrouvant dans l'ensemble du monde du vivant. Elles catalysent la dismutation de deux anions superoxydes en dioxygène et peroxyde d'hydrogène
- Les catalases (CAT) : Sont des enzymes majoritairement peroxysomales catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène
- Les peroxydases (POX): Sont une large famille multigénique d'enzymes hémiques catalysant la réduction d'un substrat oxydé en utilisant de nombreux co-substrats comme donneurs d'électrons.
- Les peroxyredoxines (PRX), aussi appelées thiorédoxines peroxydases, sont des peroxydases non hémiques contenant un résidu cystéine au niveau de leur site catalytique. Les PRX sont des éléments essentiels du système de détoxification des espèces réactives de l'oxygène.
- Glutathion peroxydase (GPX) : Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H₂O₂ en H₂O et O₂.

4-3 Systèmes antioxydants exogènes

Ils sont présents dans l'alimentation tels que les vitamines A, C, E et les polyphénols en particulier les flavonoïdes, ainsi que les cofacteurs des enzymes impliquées dans les systèmes antioxydants endogènes comme le sélénium, le zinc et le manganèse (tableau). Ces antioxydants nutritionnels (Tableau 1) sont indispensables mais leur action est limitée jusqu'à ce qu'ils soient régénérés.

Tableau 1 : rôle des antioxydants contre les maladies (Halliwell., 1994)

Antioxydant	Protège contre
Vitamine C	Les maladies cardiovasculaires, les cataractes, et certains types de cancer
Vitamine E	Les maladies cardiaques et cancer de la prostate, ralentit la maladie d'Alzheimer
Caroténoïdes	Les cancers, en particulier le cancer du poumon, et les maladies cardiovasculaires
Flavonoïdes	Cancer
Sélénium	Réduction de l'incidence des cancers de la prostate, du côlon et du poumon

D'après Halliwell (1994), les mécanismes de l'action d'un antioxydant peuvent comprendre :

- (i) le piégeage direct des ROS ;
- (ii) l'inhibition des enzymes et la chélation des traces métalliques responsables de la production de ROS ;
- (iii) la protection des systèmes de défense antioxydants.

4-4 Propriétés anti-oxydante des HEs

Une façon de prévenir ce stress oxydatif qui endommage et détruit les cellules est de rechercher, dans l'alimentation, un apport supplémentaire de composés antioxydants (vitamine C, α -tocophérol, BHT, etc.) (Béliveau, 2005).

L'utilisation des molécules antioxydantes de synthèse étant actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels. Ainsi, de nouvelles sources végétales d'antioxydants naturels (carvacrol, eugénol, tocophérol, thymol...) sont recherchées par les industriels (Belhadj *et al.*, 2006).

Les propriétés antioxydantes des HEs sont depuis peu massivement étudiées. Est également attribuables à certains alcools, éthers, cétones, et aldéhydes monoterpéniques: le tinalool, le 1,8-cinéole, le géraniol/nérol, le citronellal, l'isomenthone, la menthone et quelques monoterpènes: α -terpinène, γ -terpinène et α -terpinolène (Butterfield, 2002).

Djenane et ses collaborateurs (2002), ont rapporté que les viandes traitées avec des antioxydants naturels d'origine végétale, emballées sous atmosphère modifiée (en présence de O_2 , CO_2 , N_2) et postérieurement exposées dans des vitrines frigorifiques illuminées par des tubes fluorescents standards ont montré une stabilité chimique et microbiologique durant une longue période d'exposition par rapport aux viandes non traitées. Les travaux de HELME et ses collaborateurs (2004) ont confirmé la nature antioxydante des HES extraites d'épices et d'herbes: thym, carvi, cumin, clou de girofle, romarin, sauge. Selon Faragf et ses collaborateurs (1989), le pouvoir antioxydant, déterminé par oxydation en émulsion aqueuse du p-carotène par l'acide linoléique, de ces extraits serait par ordre décroissant: carvi > sauge > cumin > romarin > thym > clou de girofle.

Pour ces extraits naturels, certains travaux (Faragf *et al.*, 1989; Chevolleau, 1990) font état de pouvoir antioxydant supérieur à celui du BHT (butylhydroxytoluène ou E 321). D'après Ghedira (2006), la thymoquinone (composé majoritaire dans l'HES de *Nigella arvensis*) inhibe la lipoperoxydation lipidique non enzymatique dans les liposomes.

La thymoquinone, le carvacrol, le t-anéthole et le 4-terpinéol (composés de cette même huile) exercent un important effet piègeur des radicaux libres.

Une étude de Schwammle (2001) a exploré que le carvacrol est un des composants principaux des HES de certaines Lamiaceae, comme l'origan, thym dont la teneur peut atteindre jusqu'à 86%. L'activité antioxydante de ces herbes est due au carvacrol, thymol et autres phénols.

Les HES de cannelle, muscade, clou de girofle, basilic, persil, origan et thym possèdent de puissants composés antioxydants (Edris, 2007). Le thymol et le carvacrol sont encore une fois les composés les plus actifs. Leur activité est en relation avec leur structure phénolique car les composés de ce type ont des propriétés oxydo-réductrices et jouent ainsi un rôle important en neutralisant les radicaux libres et en décomposant les peroxydes (Braga et al., 2006).

5-Activités antimicrobiennes

5-1Activités antibactériennes

Les plantes aromatiques et épices sont utilisées depuis des siècles dans les préparations alimentaires non seulement pour la saveur qu'elles apportent mais également pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques. Origan, thym, sauge, romarin, clou de girofle sont autant de plantes aromatiques fréquemment utilisés comme ingrédients alimentaires.

Les HES de ces plantes ont toutes une particularité commune: elles sont riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés possèdent une forte activité antibactérienne. Le carvacrol est le plus actif de tous. Reconnu pour être non toxique, il est utilisé comme agent de conservation et arôme alimentaire dans les boissons, friandises et autres préparations.

Le thymol est l'ingrédient actif des rince-bouches et l'eugénol est utilisé dans les produits cosmétiques, alimentaires, et dentaires. Ces trois composés ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries: *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Clostridium jejuni*, *Lactobacillus sake*, *Staphylococcus aureus* et *helicobacter pylori* (Pauli, 2001; Fabian et al., 2006). D'autres familles de composés présentent aussi des propriétés antibactériennes intéressantes: certains alcools, aldéhydes et cétones monoterpéniques (géraniol, linalol, menthol, terpinéol, thujanol, myrcénol, citronellal,

néral, thujone, camphre, carvone, etc.), des phénylpropanes (cinnamaldéhyde) et des monoterpènes (γ -terpinène, *p*-cymène). Les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques sont très intéressées par les propriétés de ces composés d'autant plus qu'il s'agit d'aromatants naturels (Figure 8).

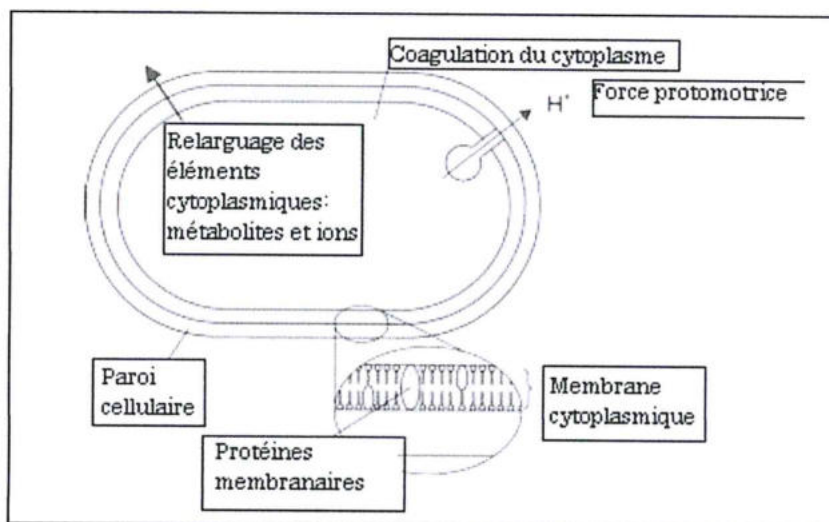


Figure 8: Action des HEs et de leurs constituants sur la cellule bactérienne (Burt, 2004).

De ce fait, beaucoup de chercheurs à travers le monde étudient leur potentiel en tant qu'agent de conservation (Burt, 2004).

Avec l'émergence de microorganismes pathogènes résistants aux antibiotiques, les HEs antimicrobiennes présentent une sérieuse alternative à la médecine des antibiotiques contre les pathologies infectieuses. Beaucoup de groupes de recherche ont étudié, par exemple, l'effet de l'HES de *Melaleuca altemifolia* contre la souche *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline («methicillin-*aureus*» ou MRSA. (Dryden *et al.*, 2004). Cette huile, dont le composé majoritaire est le terpinèn-4-ol, a montré de très bons résultats *in vitro* contre la prolifération de MRSA. (Flaxman, 2005).

5-2 Activités antifongiques

La plupart de ces composés sont également de très bons agents antifongiques. Le thymol, le carvacrol, et l'eugénol sont encore ici les composés les plus actifs. Un grand nombre de composés volatils ont été testés contre une large gamme de champignons: *Candida* (*C. albicans*), *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*), *Penicillium chrysogenum*, et bien d'autres (Kalemba *et al.*, 2003).

Freeman et Carel (2006), ont signalé que les groupes moléculaires avec les plus puissantes actions antibactériennes sont également des antifongiques efficaces, mais ils doivent être utilisés sur de plus longues périodes. Expérimentalement, les HES des plantes aromatiques et médicinales ont fait preuve de leur efficacité antifongique parfois même supérieure à celle des agents antifongiques commerciaux.

Une étude a porté sur les effets antifongiques de l'HES de thym (Rasooli et al.,2006), et plus particulièrement sur les conséquences de cette huile sur l'ultrastructure du champignon *Aspergillus niger*. Elle a tout d'abord permis de déterminer grâce à la microscopie électronique, que lorsque *A. niger* était exposé à l'HES, celle-ci provoquait des dommages irréversibles sur la membrane cellulaire ainsi que sur les organites du champignon (Barralet al.,2007). Alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures (Caillet et Lacroix, 2007).

L'action fongicide des HES des clous de girofle et d'origan a été testée sur un modèle de levure *Saccharomyces cerevisiae*. La lyse des cellules de levure a été montrée par la libération de substances absorbant à 260 nm. Des analyses au microscope électronique ont montré que la surface des cellules traitées par les HES d'origan et de clous de girofle était significativement endommagée (Chami, 2005).

L'huile de la Menthe pouliot (*Mentha pulegium*) dont le composé majoritaire est la R (+) pulégone (82%) est dotée d'un fort pouvoir antifongique contre *Penicillium* et *Mucor* (Belghazi et al., 2002).

Une étude a évalué l'activité antifongique de l'huile des clous de girofle sur toute une variété de champignons pathogènes, incluant ceux responsables d'infections urogénitales (Ahmadet al.,2005). Selon Chami (2006), l'huile des clous de girofle a démontré une puissante activité antifongique contre des champignons pathogènes opportunistes tels que *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus*.

Giordani et Kaloustian (2006) ont souligné que les composés terpéniques des HE set plus précisément leurs groupements fonctionnels tels que les phénols et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure (Cox, 2000).

5-3 Activités antivirales

Pour l'Activité antivirale : De nombreuses familles de molécules chimiques rencontrées dans les extraits végétaux ont montré "in vivo" une activité antivirale et, parmi elles, les monoterpénols et les monoterpénals (Freeman et Carel, 2006).

Selon les travaux d'Inouye et Abe, (2007), il existe des HEs de plantes exotiques très puissantes qui ont un fort pouvoir antiviral et qui sont connues pour leur efficacité.

Les HEs sont sélectivement absorbées et perturbent les fonctions des membranes biologiques de la cellule, sur la mitochondrie et autres organites vitales pour tous les organismes hormis les virus (les HEs ne sont actives que sur les virus à enveloppe comme celui de la grippe et du VIH (virus de l'immunodéficience humaine)).

6-Toxicité des HEs

Alors que de nombreux ouvrages font référence à la toxicité de nombreux produits sur le marché, la toxicité des HEs est moins investiguée. La plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi (Pibiri, 2006).

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

Certaines HEs sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leur pouvoir irritant (huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde (Smith et *al.*, 2000) ou phototoxique (huiles de citrus contenant des furocoumarines (Naganuma et *al.*, 1985). D'autres HEs ont un effet neurotoxique.

Les cétones comme l' α -thujone sont particulièrement toxiques pour les tissus nerveux (Franchomme et *al.*, 1990). Il existe aussi quelques HEs dont certains composés sont capables d'induire la formation de cancers (Homburger et *al.*, 1968). C'est le cas par exemple de dérivés d'allylbenzènes ou de propénylbenzènes comme le saffrole (Sassafras), l'estragole (*Artémisia dracunculus*), la 3-asarone (*Acorus calamus*) et le méthyl-eugénol. Des chercheurs

ont mis en évidence l'activité hepato-carcinogénique de ces composés chez les rongeurs (Wiseman *et al.*, 1987).

Le safrole et S'estragole, par exemple, sont métabolisés par les microsomes. Mais au niveau du foie des rats et des souris en dérivés hydroxylés puis en esters sulfuriques électrophiles qui eux sont capables d'interagir avec les acides nucléiques et les protéines (Kim *et al.*, 1999),

Toutefois, ces résultats sont controversés car il existe des différences chez l'homme dans le processus de métabolisation de ces composés. Le safrole, par exemple, est métabolisé chez l'humain en dihydroxysafrole et trihydroxysafrole non cancérigènes (Franchomme *et al.*, 1990). De plus, tout dépend de la dose administrée lors des expériences et bien souvent la dose absorbée par l'animal est loin de correspondre à celle qu'un homme est susceptible d'ingérer par jour (Guba, 2001).

Selon Milner(2006), Le diallylsulfide, diallyldisulfide et le diallyltrisulfide en sont des exemples. Ces composés activent, chez le rat, les enzymes intervenant dans le processus de détoxification hépatique de phase I (désagrégation des liaisons chimiques qui relient les toxines carcinogènes les unes aux autres) et de phase II (liaisons des toxines libérées à des enzymes détoxifiantes telle la glutathion S-transférase) (Wu *et al.*, 2002).

Un autre exemple est la myristicine, un allylbenzène présent dans certaines HEs, spécialement celle de noix de muscade (*Myristica fragrans*). Cette molécule est connue pour activer la glutathion S-transférase chez la souris (Ahmad *et al.*, 1997) et inhiber la carcinogénèse induite par le benzo(α)pyrène au niveau des poumons de la souris (Zheng *et al.*, 1992). Récemment, il a été découvert que la myristicine induit l'apoptose des neuroblastomes (SK-N-SH) chez l'humain (Lee *et al.*, 2005).

Il existe d'autres composés volatils qui ont montré une activité cytotoxique contre diverses lignées cellulaires cancéreuses (gliomes, cancer du côlon, du poumon, du foie, du sein, etc.) (Edris, 2007). Le géraniol, un alcool monoterpénique très fréquent dans les HEs, diminue la résistance des cellules cancéreuses du côlon (TC118) envers le 5-fluorouracil, un agent anticancéreux.

De ce fait, le géraniol potentialise l'effet inhibiteur de la croissance tumorale du 5-fluorouracil (Carnesecci *et al.*, 2004). Les HES de sapin baumier et un de ses composés, l' α -

humulène, ont montré une activité anticancéreuse significative sur plusieurs lignées cellulaires ainsi qu'une faible toxicité envers les cellules saines (Legault et *al.*, 2003). L'activité anticancéreuse du d-limonène, le composé principal des HES de Citrus a été prouvée à plusieurs reprises, en particulier au niveau du cancer de l'estomac et du foie (Uedo et *al.*, 1999).

Un dernier exemple est l' α -bisabolol. L'activité antigliomale de cet alcool sesquiterpénique présent en grande majorité dans l'HES de camomille (*Matricaria*) arécemment été mise en évidence (Cavalieri et *al.*, 2004).

Pour terminer, certaines études ont mis en évidence l'activité cytotoxique d'HES dans leur ensemble. En voici quelques exemples: l'HES de *Comptonia peregrina* (Sylvestre et *al.*, 2007), *Myrica gale* (Sylvestre et *al.*, 2005), *Melissa officinalis* (De Sousa et *al.*, 2004), *Malaleuca alemifolia* (Calcabrini et *al.*, 2004), et *Crotons flavens* (Sylvestre et *al.*, 2005). De plus, tout dépend de la dose administrée lors des expériences et bien souvent la dose absorbée par l'animal (Guba, 2001).

PLANTES ETUDIEES

(Mentha piperita et Artemisia herba-alba)

III-Plantes étudiées (*Mentha piperita* et *Artemisia herba-alba*)

Dans notre étude les HEs sont extraites à partir des espèces poussant à l'état spontané dans l'Est Algérien *Mentha piperita* (*M. piperita*) et *Artemisia herba-alba* (*A. herba-alba*).

Nous avons choisi ces plantes en raison de leur grande utilisation en médecine traditionnelle, dans l'alimentation et dans les produits cosmétiques.

Les deux plantes (parties aériennes) ont été collectées à El Kouif dans la wilaya de Tébessa au mois de mai 2012.

1- La menthe (*Mentha piperita*)

1-1 Position systématique

D'après Quezel et Santa (1963), la systématique du *M. piperita* est la suivante :

- **Embranchement** : Phanérogames ou Spermaphytes
- **Sous-embranchement** : Angiospermes
- **Classe** : Eudicots
- **Sous-classe** : Astéridées
- **Ordre** : Lamiales
- **Famille** : Lamiacées
- **Genre** : *Mentha*
- **Espèce** : *Mentha piperita*

1-2 Description et propriétés

M. piperita ou la menthe poivrée (Nanaa), est une plante de la famille des Lamiacées. Issue d'un croisement entre *M. aquatica* et *M. spicata*. Elle est constituée d'HEs, de tanins, de flavonoïdes, de principes amers (Chibani, 2012)

La menthe, du nom latin *Mentha*, est l'une des plus anciennes plantes médicinales connues : les archéologues ont découvert ses feuilles dans des pyramides d'Egypte vieilles de 3000 ans, Les menthes sont des plantes vivaces, herbacées et très odorantes (Benayad, 2008).

Les menthes conservent depuis l'antiquité une diversité d'emplois et occupent une large place dans la thérapeutique. Sur le plan des principes chimiques, la plupart des espèces

de menthe doivent leur odeur et activité à leurs HEs ou Essences de menthe (Benayad, 2008). Ces essences très odoriférantes ont un intérêt industriel important.

Les menthes sont faciles à reconnaître à leur odeur tout à fait caractéristique, autant elles sont difficiles à distinguer les unes des autres, en raison des formes intermédiaires, d'origine hybride, qui les relie. Parmi toutes les lamiacées, les menthes se reconnaissent, en plus de leur odeur spéciale, à leurs fleurs très petites, à leurs corolles presque régulières à quatre lobes presque égaux et leurs quatre étamines également presque égales (Benayad, 2008). Les principales caractéristiques de ces espèces sont :

- une tige quadrangulaire.
- des feuilles simples et opposées mesurent plus de 4cm de long, elles sont ovales, vertes foncées et se teignent rougeâtres au soleil et rouge cuivré à l'ombre.
- l'odeur caractéristique qui se dégage par simple touché. (Figure 9).



Figure 9: *Mentha piperita* (Menthe poivrée «Nanaa»)

1-3 Utilisations

M. piperita est utilisée, depuis fort longtemps (feuilles et HEs). Hippocrate et Aristote l'employaient comme aphrodisiaque (calmant, anesthésiant). Comme à toutes les menthes, la tradition lui attribue des propriétés aromatiques (toniques, fortifiantes) et des propriétés digestives (combattre les lourdeurs, les ballonnements et les gaz). (Chibani, 2012)

Actuellement, les principales indications thérapeutiques « traditionnelles » pour la feuille et la sommité fleurie de menthe poivrée sont les suivantes :

- _ Anti-inflammatoire (Arakawa *et al.*, 1992; Juergenset *al.*, 1998).
- _ Antispasmodique (Carnesecchiet *al.*, 2001 ; Forster *et al.*, 1980).

- _ Pour soulager les maux de tête (EMEA), migraines et sinusites. les démangeaisons cutanées (Bowen et Cubbin, 1992 ; Briggs, 1993).
- _ Les algies rhumatismales et musculaires (usage reconnu en Allemagne).
- _ L'HE de menthe et le menthol peuvent provoquer des troubles graves chez le jeune enfant lorsqu'ils sont appliqués sur les narines et le visage (risque de détresse respiratoire, de coma) (Bowen et Cubbin, 1992 ; Briggs, 1993).
- _ L'obstruction des voies biliaires et l'inflammation de la vésicule biliaire constituent des contre-indications (Juergens *et al.*, 1998; Shin et Kim, 1998).
- _ Le contact avec les muqueuses et les yeux peut provoquer des irritations.
- _ L'huile de *M. piperita* réduit la synthèse du cholestérol chez les lapins (White *et al.*, 1986).
- _ L'HE de *M. piperita* inhibe lentement le glucose d'anthérocyte (Beesley *et al.*, 1996).

1-4 Composition chimique

Les HEs de l'espèce *M. piperita* ont fait l'objet d'un grand nombre d'études. Nous avons recensé les composants majoritaires d'HEs provenant de différents pays ($\% \geq 5,0$) (Tableau 2)

Tableau 2: Composants majoritaires des HEs de l'espèce *M. piperita* provenant de différents pays.

	Mongolie (Karasawa <i>et al.</i> , 1995)	Turquie (Tanker <i>et al.</i> , 1976)	Maroc (Derwich <i>et al.</i> , 2011)	Cachemire (Vashist <i>et al.</i> , 1963)	Vietnam (Nguyen et Thiphuong, 2003)	Mexique, Jalisco (Pino <i>et al.</i> , 2002)	Inde (Sharma <i>et al.</i> , 2010)	Italie, Calabre (Calvarano <i>et al.</i> , 1969)	Maroc (Debbab <i>et al.</i> , 2007)
Menthol	35.07	41.07	5.58	47.5	47.60	35.4	9.94	38.0-44.98	
Menthone	32.22	35.37	29.01	11.0	24.10	15.4	28.66	20.28- 27.86	
Acétate de menthyle				8.4		12.4		3.24-6.86	
Menthofurane					6.07	18.2		1.96-5.16	
1,8-Cinéole					5.55		7.03	6.10-7.52	
Oxyde de pipéritone							16.0		
Linalool									60.72
Acétate de linalyle									20.79

Les travaux résumés dans le tableau 2 montrent que les HEs de *M. piperita* sont généralement composées de menthol et de menthone comme composants majoritaires.

1-4-1 Le menthol

Le menthol (C₁₀H₂₀O) est un monoterpénol. L'isomère présent dans l'HE de menthe des champs, qui est l'isomère actif, est le (-)- menthol, ou 5-méthyl-2-(1-méthyléthyl)-cyclohexan-1-ol ou (1R,2S,5R)-2-isopropyl-5-méthylcyclohexanol.

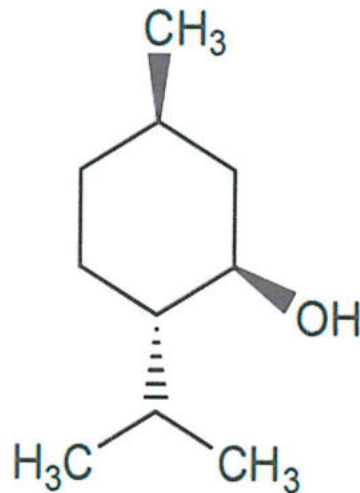


Figure 10 : Structure du (-)- Menthol

Le menthol (Figure 10) est une molécule liposoluble, qui traverse donc facilement la peau. Chez les humains, le menthol est métabolisé dans le foie par le système enzymatique des cytochromes P450 : il subit des hydroxylations et des oxydations, avant d'être conjugué avec un glucuronide, afin de circuler vers les reins et d'être excrété par voie urinaire.

Le menthol est connu depuis longtemps pour son effet « rafraichissant », expliquant son utilisation dans des chewing-gums, bonbons, dentifrices etc. Plusieurs études sont consacrées à ses propriétés biochimiques : comment provoque-t-il cet « effet froid » ? Par quel mécanisme ? A-t-il des propriétés analgésiques ? Si oui sur quelles voies de la douleur intervient-il ?

Le menthol induit le :

- Blocage des canaux à calcium, la sensation de froid et de chaud est déterminée par l'activité des thermorécepteurs. Il a été montré que la concentration de calcium autour des thermorécepteurs modifie la perception de la température (Schäfer et *al.*, 1982).

En effet, c'est la circulation des ions Ca^{2+} à travers la membrane cellulaire des thermorécepteurs qui détermine la polarisation de la cellule et la création de potentiels d'action. La sortie de cations Ca^{2+} du thermorécepteur à froid entraîne l'hyperpolarisation de celui-ci et inhibe la création de potentiels d'action, ce qui provoque la sensation de froid (Eccles, 1994). Le menthol exercerait son « effet froid » en interférant avec le mouvement des ions calcium à travers la membrane intercellulaire. Cet effet est suggéré par une étude, qui a montré qu'une injection intraveineuse de menthol en faible concentration entraînait la dépolarisation de la membrane des thermorécepteurs, en inhibant l'efflux d'ions calcium de la cellule (Schäfer et al., 1986).

Il active les canaux TRPM8, détecteurs des stimuli du froid dans les neurones sensitifs
Les canaux TRPM8 (Transient Receptor Potential Mélastatin-8) sont des canaux à cations (calcium et sodium) activés par des températures faibles (en dessous de 25°C), et qui entraînent ainsi la dépolarisation des cellules nerveuses et la création de potentiels d'action, responsables de la sensation de froid (Macpherson et al., 2006 ; Farco et al., 2013).

Ces protéines sont activées par des températures basses, mais aussi par des molécules chimiques, dont le menthol. Les canaux TRPM8 sont présents dans les thermorécepteurs et possiblement les nocicepteurs, mais aussi dans des tissus non sensoriels, comme le foie et la prostate. Leur expression est modifiée lors de blessures nerveuses et dans des états inflammatoires chroniques (Babes et al., 2011).

Ainsi, des applications cutanées de menthol sur un site douloureux produisent la même sensation que l'application cutanée de glace pilée, ainsi que le même effet sur la diminution du débit sanguin artériel (Topp et al., 2011).

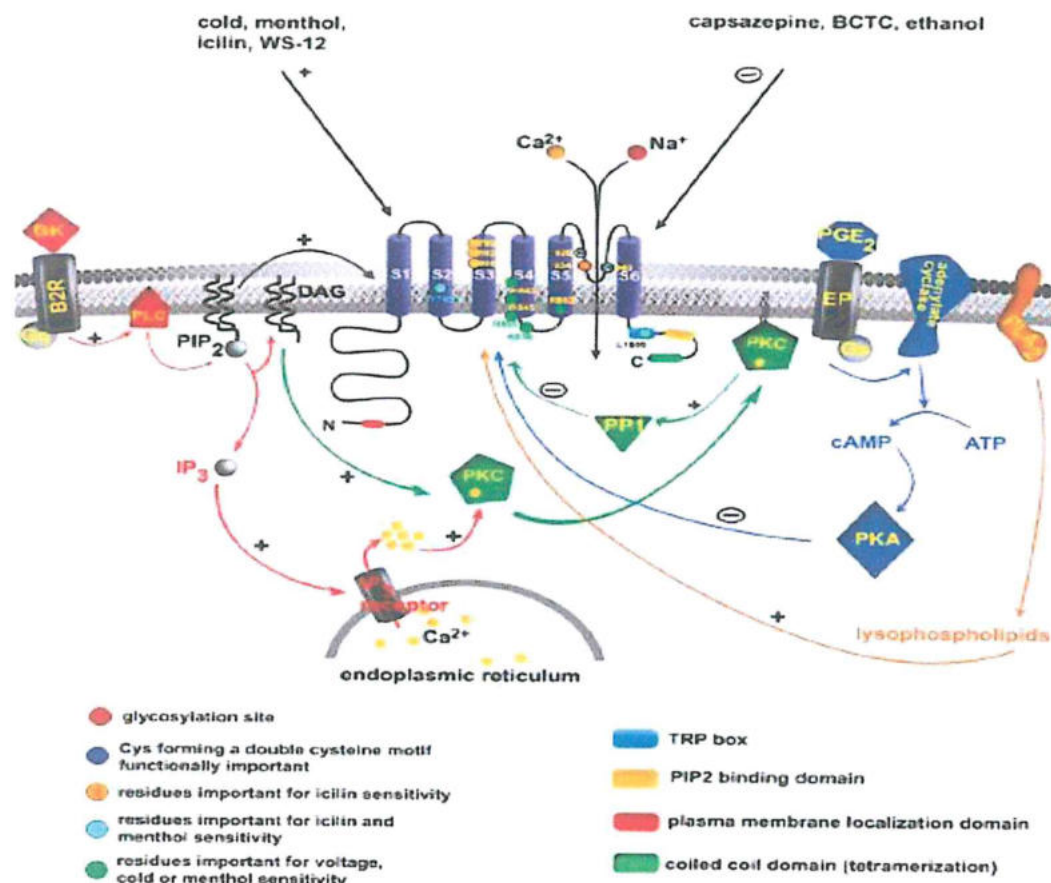


Figure 11 : Structure des canaux TRPM8 et modulation par des cascades intracellulaires (Babes et *al.*, 2011)

L'effet « rafraichissant » du menthol étant admis, et son mode d'action étant exploré, on peut se demander si cet effet « froid » suffit à produire un effet analgésique. Galeotti et *al*(2002) ont mis en évidence un effet anti-nociceptif du menthol sur des souris soumises à un stimulus douloureux thermique, et chimique (Figure 11).

La nociception est une fonction défensive, d'alarme. C'est l'ensemble des phénomènes permettant l'intégration au niveau du système nerveux central d'un stimulus douloureux via l'activation des nocicepteurs (récepteurs à la douleur) cutanés, musculaires et articulaires.

Le transport de l'information sensorielle par les nerfs se fait de la périphérie (lieu du ressenti de la douleur) jusqu'à l'encéphale. Il faut que la stimulation dépasse un certain seuil pour qu'il y ait un déclenchement d'une réponse électrique, c'est la théorie du "gate control". Dans cette étude le stimulus douloureux thermique est modélisé par le test du « plat chaud » : une dose croissante de menthol a été administrée aux souris (quantité égale, concentration

différente) par voie orale, et leur temps de réaction pour se soustraire au plat chaud a été mesuré.

Il en découle que le menthol augmente significativement le seuil de douleur (auquel les souris se soustraient lors de stimulus douloureux), d'une manière dose-dépendante. Le stimulus douloureux chimique est quant à lui modélisé par une injection intra-péritonéale d'acide acétique. De la même façon le menthol, administré dans ce cas en intracérébral, a montré un effet anti-nociceptif significatif. Cette deuxième expérience a aussi permis de montrer l'activité analgésique centrale du menthol (même efficacité après administration par voie orale ou en intracérébral).

Pour confirmer l'action analgésique du menthol au niveau central, Pan et *al* (2012) ont évalué les effets de celui-ci sur l'hyperalgie thermique provoquée par l'injection d'adjuvant incomplet de Freund dans les coussinets de souris. Les résultats révèlent que le menthol administré en intracérébral réduit significativement la douleur à la fois dans les membres latéral et controlatéral, démontrant un effet analgésique sur les douleurs inflammatoires, et une action au niveau du système nerveux central.

- Blocage des canaux à sodium

Les canaux sodium voltage-dépendants sont cruciaux pour la phase initiale du potentiel d'action des cellules excitables, et l'inactivation de ces canaux est un des premiers mécanismes impliqués dans les effets d'un analgésique local (Butterworth and Strichartz, 1990).

Gaudioso et *al* (2012) ont montré que le menthol a un effet aussi sur les canaux sodium voltage dépendant dans les cellules nerveuses, agissant dans ce cas directement sur les voies nociceptives. Le menthol agit préférentiellement sur des canaux inactivés (Gaudioso et *al.*, 2012 ; Pan et *al.*, 2012), et il agit sur ces canaux au niveau périphérique et central (neurones de la moelle épinière).

Nous avons vu précédemment que le menthol était un activateur des canaux TRPM8, canaux spécifiques des thermorécepteurs à sodium et calcium, mais certaines études ont montré que le menthol agissait aussi sur des canaux à sodium et calcium indépendamment des canaux TRPM8 (Gaudioso et *al.*, 2012 ; Kawasaki et *al.*, 2013).(Figure 12)

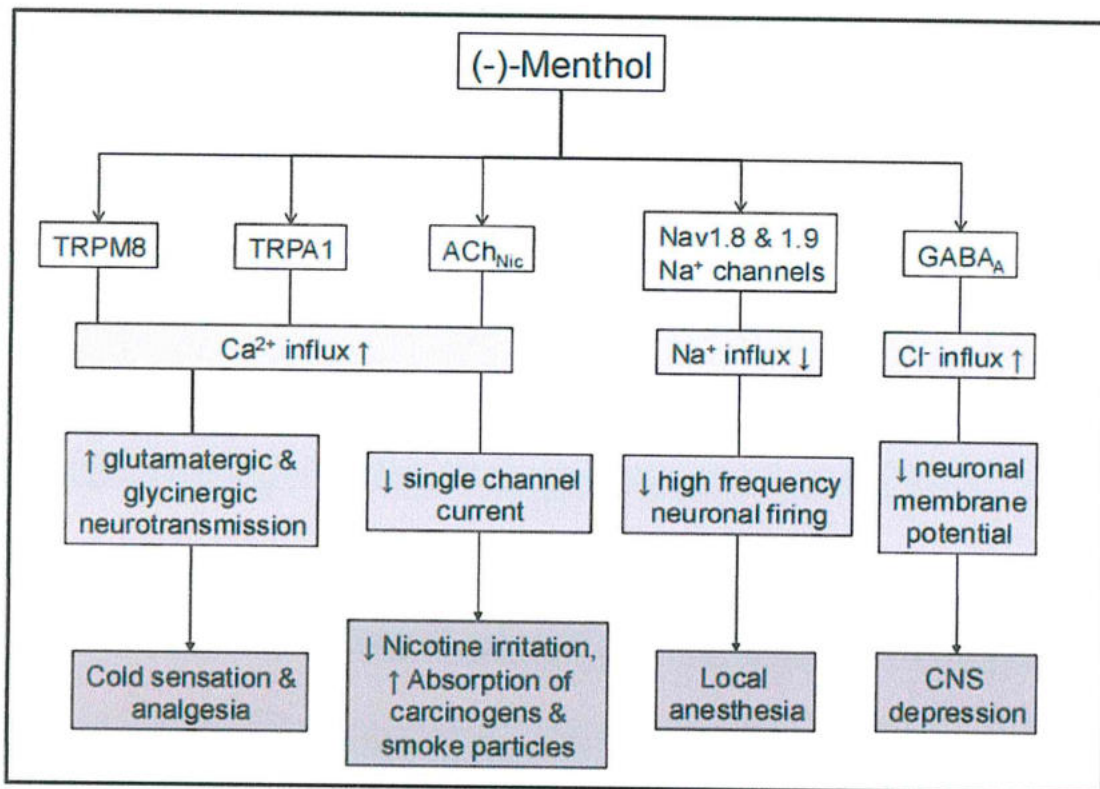


Figure 12 : Résumé des interactions biochimiques du menthol et de ses conséquences physiologiques (Farco et al, 2013).

2- Armoise blanche (*Artemisia herba-alba*).

2-1 Position systématique

D'après Quezel et Santa (1963), la systématique d'*A. herba-alba* est la suivante :

- **Embranchement** : Phanérogames ou Spermaphytes
- **Sous-embranchement** : Angiospermes
- **Classe** : Eudicots
- **Sous-classe** : Astéridées
- **Ordre** : Asterales
- **Famille** : Asteracées
- **Genre** : *Artemisia*
- **Espèce** : *Artemisia herba-alba*

2-2 Description et propriétés

Le genre *Artemisia* (Asteraceae), comprenant près de 400 espèces (Sunset, 1995), regroupe des herbacées, des arbrisseaux et des arbustes, généralement aromatiques. Leur feuilles sont pennées (rarement palmées) (Figure 13).

Les espèces *Artemisia* grandissent dans des climats modérés des deux hémisphères, habituellement dans l'habitat sec ou semi-aride. Les espèces notables incluent *A. vulgaris*, *A. tridentata*, *A. annua*, *A. absinthum*, *A. dracunculus*.

La plupart des espèces ont des arômes forts et des goûts amers à cause des terpenoïdes et des sesquiterpène lactones qui leur servent pour se défendre contre les herbivores (Lopes-Lutz *et al.*, 2008).

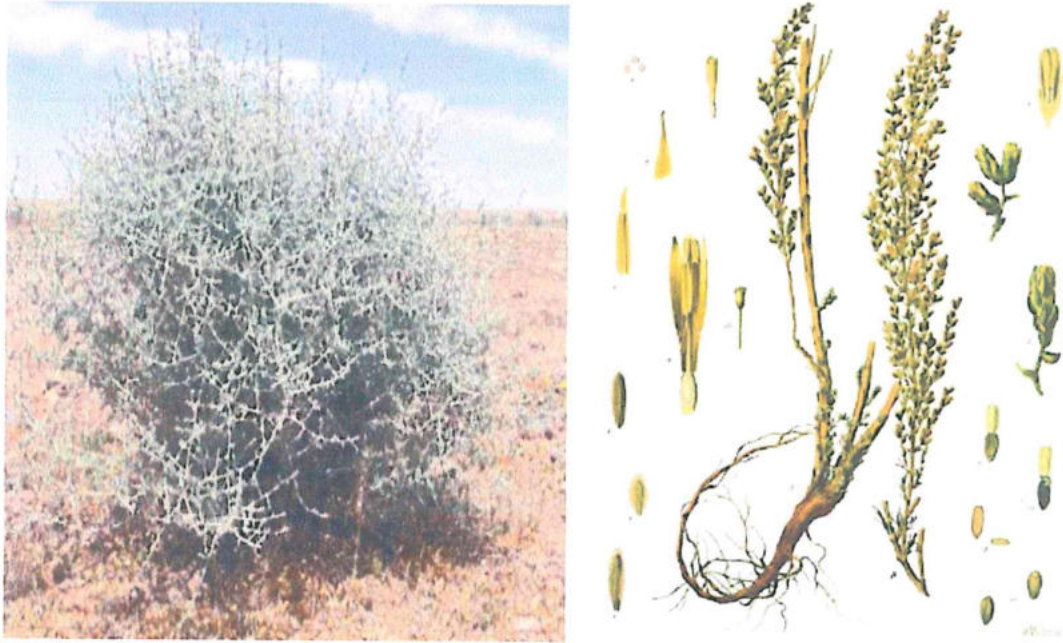


Figure 13 : *A. herba-alba* (L'Armoise blanche «Chih»).

A herba-alba (Armoise blanche, "Chih") est une espèce d'Afrique du Nord, dont la croissance végétative à lieu à l'automne (feuilles de grande taille) puis dès la fin de l'hiver et au printemps (feuilles plus petites).

En Algérie, elle pousse dans les steppes. Elle se caractérise par une bonne valeur fourragère et par une composition en HEs ayant des propriétés antiseptiques, vermifuges et antispasmodiques. Ces propriétés expliquent son utilisation dans la médecine traditionnelle et dans l'alimentation animale. (Acta Bot et Gallica., 2004).

Plus d'une dizaine d'armoises sont répertoriées en Algérie. Certaines sont très rares. En revanche, d'autres sont très répandues et abondantes. Sa détermination est très connue des populations car elle est vivace et d'une odeur aromatique très caractéristique. On distingue 4 principales espèces :

- * L'armoise blanche *A. herba alba*, chih.
- * L'armoise rouge, *A. campestris*, dgouft.
- * L'armoise commune, *A. comunis*, echiba.
- * L'absinthe, *A. absinthium*, chadjretMeriem.

2-3 Utilisations

Les feuilles aromatiques de beaucoup d'espèces *Artemisia* sont médicinales, et quelques-unes sont utilisées en parfumerie.

A. absinthium a été utilisée pour repousser les puces et des papillons de nuit. L'artémisine, isolée d'*A. annua*, possède une activité anti-malaria très puissante (Lopes-Lutz *et al.*, 2008).

Les huiles d'*Artemisia* avaient des effets inhibiteurs sur la croissance des bactéries (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*), les levures (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*), et dermatophytes (*Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, et *Microsporum gypseum*), *Fonsecaea pedrosoi* et *Aspergillus niger* (Lopes-Lutz *et al.*, 2008).

2-4 Composition chimique

Les HES de l'espèce *A. herba-alba* ont fait l'objet d'un grand nombre d'études. Nous avons recensé les composants majoritaires d'HES ($\% \geq 5,0$). (Tableaux 3, 4)

Tableau 3 : Composition majoritaires d'HES d'espèces *A herba-alba* (dans les pays Magrébins).

Composé (%)	Dejelfa (Dahm ani- Hamza oui et Baaliou amer, 2005)	Tunis ie (semi- aride) (Kadr i et al., 2011)	Tuni sie (Zou ari et al., 2010)	Maroc (Boutkhal et al., 2009)		Nord- est du Maroc (Aziz et al., 2012)	Machr aa Maroc (Paoli ni et al., 2010)
				Ouj da	Errac hidia		
Camphène							5.50
1.8-Cinéole	5.80	8.91			4.98		
α -Thujone		24.88	8.73	21.17	17.27		
β -Thujone		8.32		46.75	9.91		
Chrysanthénone					6.37	30.60	25.80
Camphre	5.60	10.81		8.41	17.79	24.40	31.90
(E)-Pinocarvéol							
Pinocarvone							
Bornéol							
Verbenone							
Acétate de Chrysanthényle			10.60		10.90		
Acétate de sabinyle			9.13				
Acétate de myrtenyle							
Davana ether	8.80						
Germaçène D		14.48					
Davanone	36.10				6.65		

Tableau 4 : Composition des HES extraites d'*A. herba-alba* (en %, dans différents pays).

Composé (%)	Ouest d'Azerbaïdjan (Aghaei <i>et al.</i> , 2011)	Jordanie (Hudaib <i>et al.</i> , 2006)	Egypte (Abou El-Hamd <i>et al.</i> , 2010)	Valentina Sud de l'Espagne (Salido <i>et al.</i> , 2001)
Myrcène				5.10
<i>p</i> -cymène				13.50
1,8-cinéole	7.42		50.00	10.20
Santolinol		13.00		
γ -Terpinène				5.50
Artemisylcétone		12.40		
α -thujone		24.70	27.00	
β -thujone	35.66			
Chrysanthenone				6.70
Camphre	34.94			
Acétate de chrysanthenyle				5.60
Acétate de sabinyle		5.40		
Acétate de caryophyllène		5.70		
Davanone				18.10

D'après les tableaux (3 et 4), représentant les composants majoritaires ($\% \geq 5.0$) d'HEs rapportées de l'espèce *A. herba-alba*, incluant le 1,8-cinéole, α , β -thujone et le camphre on distingue plusieurs cas :

Les pourcentages les plus élevés en 1,8-cinéole ont été observés uniquement pour l'espèce *A. herba-alba* récoltée en Egypte (Mohamed *et al.*, 2010) (chénotype). l'espèce *A. herba-alba* trouvée dans les régions de Tunisie (semi-aride) (Kadri *et al.*, 2011), d'Errachidia et d'Oujda (Maroc) (Boutkhil *et al.*, 2009), de l'Ouest d'Azerbaïdjan (Aghaei *et al.*, 2011), Méchria (Bouchikhi *et al.*, 2010)(l'ouest d'Algérie), Jordanie (Hudaib *et al.*, 2006).

Ceux de l'Egypte (Abou El-Hamd *et al.*, 2010) sont caractérisées par la présence majoritaire de α , et/ou β -thujone. Le davanone correspond au pourcentage le plus élevé dans

l'huile de cette espèce distribuée dans la région de Djelfa (Dahmani-Hamzaoui et Baaliouamer, 2010).

RAPPEL SUR LES PROTISTES
CILIES ET PARAMECIES

IV Généralités sur les paramécies

Ce sont des microorganismes très abondants dans les eaux contenant des débris végétaux ou dans les infusions de foin (infusoires) car les bactéries dont ils se nourrissent pullulent à la surface des végétaux en décomposition. De ce fait ce genre se cultive facilement en laboratoire ce qui rendant son étude aisée (Figure 14).

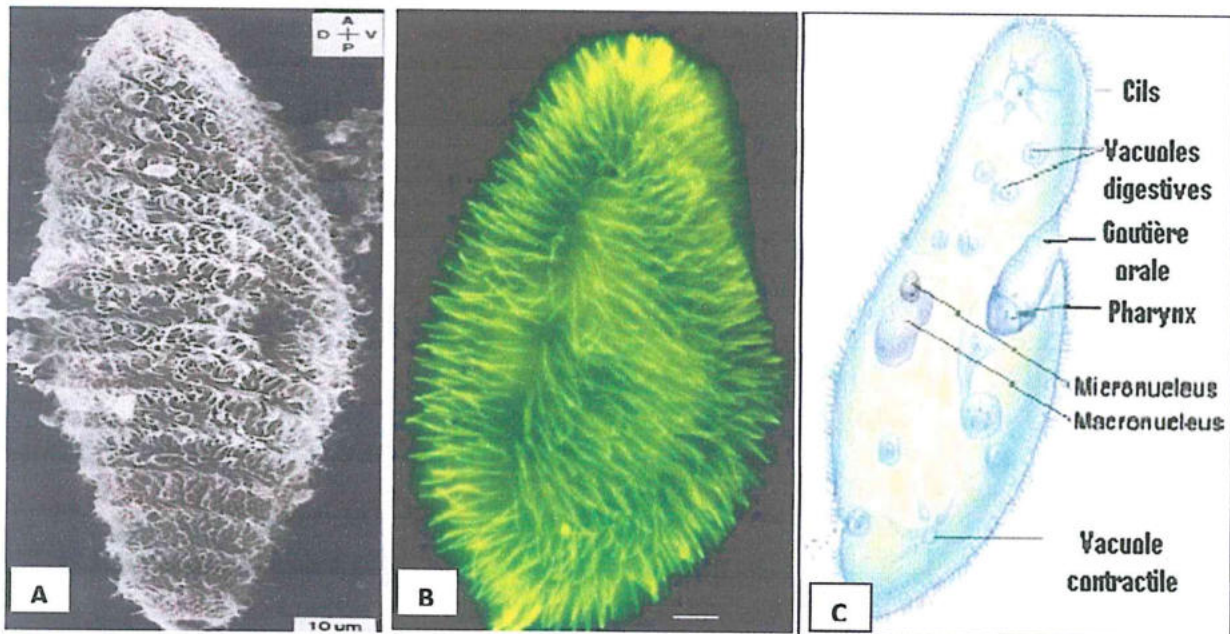


Figure 14 : Vue d'une paramécie, **A :** en microscope électronique à balayage. **B :** en immunofluorescence des ciliatures (Gogendeau, 2005) et **C :** sous microscope optique (Génoscope, 2007).

Ce groupe est très hétérogène, tant du point de vue anatomique que physiologique. Vivant dans un milieu hypotonique par rapport à son cytoplasme, la cellule absorbe constamment l'eau de son environnement par osmose. L'excès d'eau dans le cytoplasme est alors évacué grâce à des vacuoles pulsatiles, où le cytoplasme se contracte périodiquement pour expulser l'eau à travers la membrane plasmique (Beaumont et Cassier, 1998).

Leurs corps sont uniformément recouverts de cils, ils sont en générale fusiforme quatre fois plus longs que large. Les deux extrémités d'une Paramécie sont morphologiquement distinctes, l'extrémité antérieure est émoussée, arrondie alors que l'extrémité postérieure est de forme d'un cône.

La paramécie présente de nombreux organites différenciés ayant des fonctions très spécialisées. Leur cytoplasme limité par une mince cuticule, résistante, souple, et élastique, limite l'amplitude des déformations du corps de la paramécie. Après toute déformation, grâce à la présence de cette différenciation superficielle le corps de la paramécie reprend sa forme initiale (Beaumont et Cassier, 1998).

1- Reproduction des paramécies

La reproduction des ciliés se distinguent de tous les autres eucaryotes par la façon dont ils utilisent et transmettent l'information génétique contenue dans leurs gènes. Elle est généralement asexuée (durée 6 heures), mais en condition défavorables (culture appauvrie en oxygène et enrichie en déchets de toutes sortes...etc.) elle cède la place à la reproduction sexuée (Perrier et *al.*, 1997) avec échange de matériel génétique (par le biais des micronucleus) entre deux cellules : c'est la conjugaison (Beaumont et Cassier, 1998). Qui peut être de deux types: la conjugaison (fécondation entre deux partenaires) et l'autogamie (autofécondation) (Sonneborn, 1975). Suite à l'autogamie, on a une conservation du patrimoine génétique, perte de l'histoire évolutive des macronoyaux et perte de la transgénèse injectée dans le macronoyau.

Beaucoup d'espèces d'Infusoires possèdent la curieuse propriété de se conserver pendant plusieurs années à l'état de vie ralentie, enfermées dans une membrane résistante. Pendant la mauvaise saison ou quand les conditions de nutrition deviennent défavorables, les cils disparaissent, la bouche s'oblitére et le corps s'entoure d'une membrane protectrice rappelant la chitine des Insectes. Ainsi enkysté, l'Infusoire peut rester à l'état de vie ralentie pendant plusieurs années à la double condition d'être au sec et d'être humecté de temps en temps. Si levent l'entraîne quelque jour dans une eau lui offrant des conditions favorable, il se gonfle, fait éclater son kyste et reprend sa vie normale (André et Grassé, 1994).

2-Nutrition des paramécies

Une des plus grandes caractéristiques de la paramécie est la présence de milliers de cils vibratoires sur sa surface, permettant la locomotion et la nutrition. Ce sont des prédateurs qui se nourrissent d'autres micro-organismes (Beaumont et Cassier, 1998).

Selon Samworth et Morgan (2000) les battements de leurs cils assurent le transport des particules alimentaires jusqu'au cytopharynx (la bouche). Elle se nourrit essentiellement de bactéries par phagocytose.

La paramécie possède un mécanisme d'alimentation permanent constitué par une cavité buccale (péristome) prolongée vers l'arrière : le vestibule; c'est une cavité tubulaire invaginée dans l'endoplasme (l'endoplasme contient les organites de la nutrition: le péristome et les vacuoles digestives). Le cytoprocte (ou anus cellulaire) est nécessaire à l'expulsion des déchets, et les vacuoles pulsatiles servent à réguler l'osmolarité.

3-Déplacements des paramécies

Au cours de leurs déplacements (les paramécies), dont la vitesse est de l'ordre de 1 à 3 millimètres. Les cils sont le mode de locomotion des paramécies. Ces dernières peuvent diriger les battements de leurs cils pour se déplacer en avant ou en arrière dans un mouvement spiralé, une paramécie peut effectuer un brusque retrait au contact d'un obstacle. (Cohen, 2007)

4-Respiration des paramécies

Les paramécies sont avides d'oxygène, leur respiration se fait par des échanges gazeux avec l'environnement exclusivement par la surface corporelle car présentant un rapport surface / volume donc surface / masse corporelle élevé (Wehner et Gehring, 1995).

CHAPITRE II

**ETUDE PHYSIQUO-CHIMIQUE
DES HES**

Introduction

Connaissant mieux les constituants des huiles, des techniques se sont développées visant à optimiser la qualité de l'huile tout en maintenant un rendement intéressant.

En parallèle, l'instrumentation moderne est progressivement confrontée à des analyses de plus en plus complexes, liées au nombre important de constituant présents et aux quantités extrêmement faibles à détecter. En effet l'analyse d'une huile est complexe, de par son très grand nombre de constituants chimiques volatils mais aussi, souvent, de par l'importance des composés à l'état de traces qui font le caractère spécifique de l'huile.

1-Matériel et méthodes

1-Extraction des HEs

L'extraction est effectuée par un système d'hydrodistillation (Figure15) à Constantine, elle est réalisée par ébullition d'un mélange de 100 g de matériel végétal et 700 ml d'eau distillée pendant 3 heures.

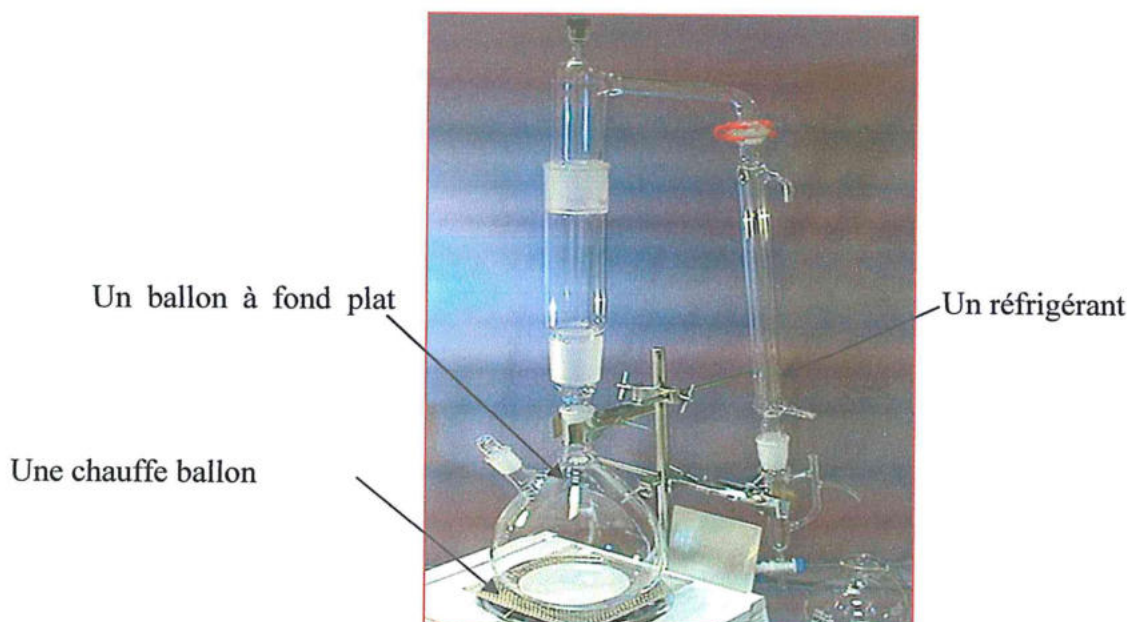


Figure 15: Système d'extraction des huiles essentielles (hydrodistillateur).

1-2 Séparation des HEs du distillat :

Les HEs sont ensuite séparées de la phase aqueuse par des procédés physiques (Figure 16).

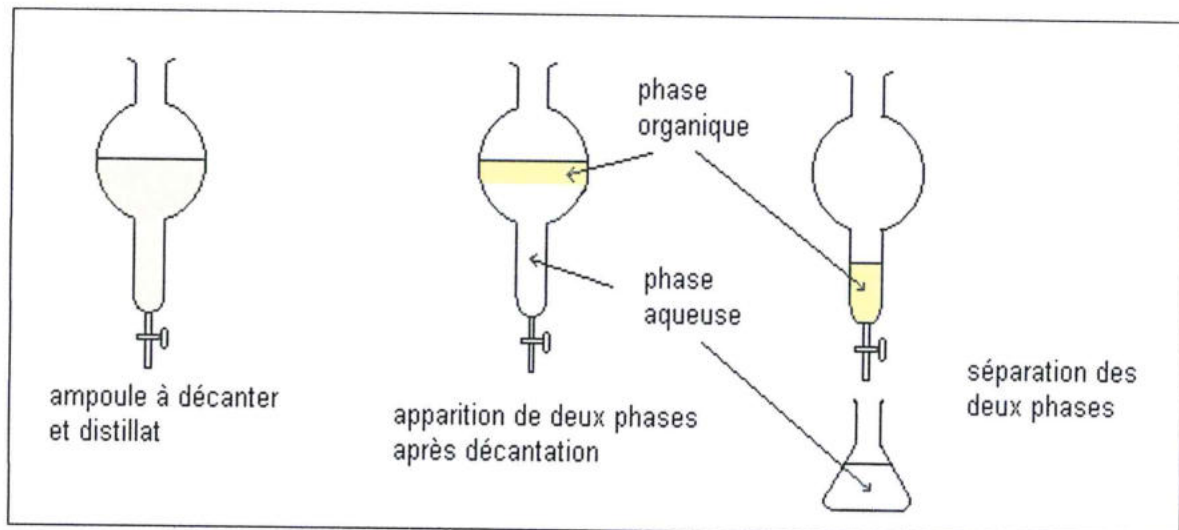


Figure 16: Méthode de séparation des HEs du distillat.

1-3 Détermination du rendement

Selon la norme AFNOR (2000), le rendement en HE (RHE) est défini comme étant le rapport entre la masse d'HE obtenue après l'extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). Il est exprimé en pourcentage, et il est donné par la formule suivante :

$$\text{RHE (\%)} = \frac{M'}{M} \times 100$$

RHE : rendement en HE de la plante étudiée ;

M' : masse d'HE;

M : masse de la matière végétale utilisée.

1-4 Conservation des HEs obtenues

La conservation des HEs exige certaines précautions indispensables. C'est pour cela que nous les avons conservées à une température voisine de 4 °C, dans un flacon en verre brun fermé hermétiquement à l'abri de l'air et la lumière.

2- Etude physico-chimique des HEs extraites

Les propriétés physiques des HEs se résument généralement en leurs indices de réfraction, viscosité, densité, Miscibilité à l'éthanol, point d'ébullition et point de congélation.

2-1 Indice de réfraction

Les indices de réfraction des HEs d'armoise et la menthe poivrée, on été calculés et déterminés a l'aide d'un réfractomètre du laboratoire de chimie (Constantine) (Figure 17).



Figure 17: Réfractomètre pour mesurer les indices de réfraction.

2-2 La densité

La densité (la masse volumique), est représentée par P_{20} , qui est le rapport de la masse d'un volume de liquide à 20°C par le volume de ce même liquide à 20°C (Kaloustian, Hadji-Minaglou, 2012).

2-3 Miscibilité à l'éthanol

C'est un test de solubilité avec des volumes croissants d'alcool par rapport à la même quantité d'HE. Il suffit de déterminer la limite de solubilité de l'HE à analyser par rapport à l'éthanol (Kaloustian, Hadji-Minaglou, 2012).

Le test de miscibilité est réalisé par le mélange des volumes équitants des deux liquides (HE et éthanol) dans une éprouvette (50%/50%), puis agitation.

2-4Analyse chromatographique

● Les analyses chromatographiques des HEs *M. piperita* ont été effectuées grâce a un chromatographe en phase gazeuse, l'appareil utilisé est de type VARIANCHROMPACK-CP 3800. 0,2µl d'HE sont injectés à l'aide d'une micro-seringue. Le gaz vecteur est l'hélium He d'un débit de 0,3ml/min ; la colonne utilisée est une colonne capillaire de type CP-Chirasil-Dex CB fusedsilica WCOT (25m x 0,25mm x 0,25µm) ; la programmation de la température de la colonne est comme suit : la température initiale d'injection est de70°C pendant 2,50 min, puis s'élève par palier de15°C/min à 240°C pendant 20 min ; le détecteur utilisé pour cette analyse est de type FID, température 250° C.

●Les analyses chromatographiques des HEs d'A. herba-alba ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse, équipé d'une colonne capillaire (30 m x 0,32 mm) avec une épaisseur du film Polyéthylène glycol de 0,25 µm, d'un détecteur FID réglé à 260 °C et alimenté par un mélange de gaz H2/Air et un injecteur split réglé à 275 °C. Le volume injecté est de 1 µl. Le gaz utilisé est l'azote avec un débit de 1,7 ml/min. La température de la colonne est programmée de 50 à 250 °C à raison d'une montée de 4 °C/min et un palier de 5 minutes à la température finale. L'appareille est de type AGC serie 600 piloté manuellement.

II- Résultats et discussion

1-Etude organoléptique :

La figure (18) nous montre une photo prise au cours de l'extraction des HEs du *M.pipérity* et *A. herba-alba*.

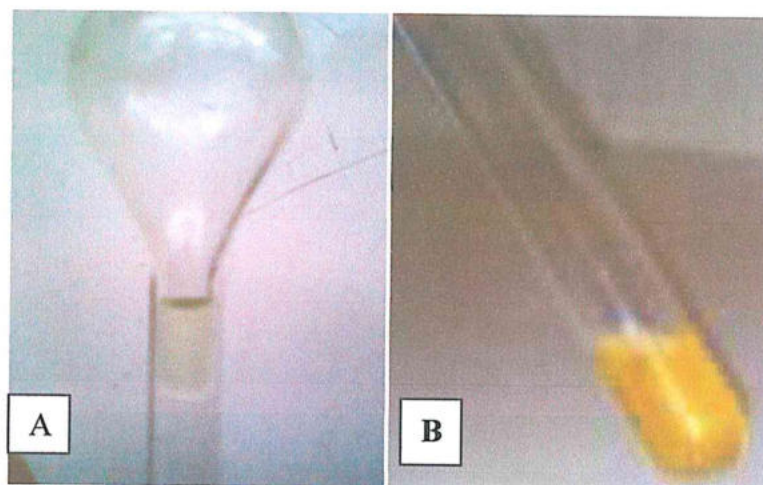


Figure 18: HEs extraites A: *M.pipérity*, B : *A. herba-alba*

Le tableau 5 nous représente une comparaison entre Les caractéristiques organoleptiques des deux HEs extraites avec ceux de la norme *AFNOR* (2000).

Tableau 5 : les caractéristiques des HEs extraites par rapport a la norme *AFNOR*.

Caractères des HEs	ASPECT	COULEUR	ODEUR
<i>Norme AFNOR</i>	Mobile, limpide	Presque incolore à jaune pâle	Fraîche, plus ou moins mentholée
<i>M.pipérity</i>	Mobile	Presque incolore	Fraîche, mentholé
<i>Norme AFNOR</i>	Mobile, huileux	Jaune	Forte odeur
<i>A.herba-alba</i>	Huileux	Jaune foncé	Forte rappelant l'odeur des feuilles

2- Rendement des HEs extraites :

Le rendement moyen en HE est calculé en fonction de la matière végétale fraîche de la partie aérienne des plantes étudiées.

Il faut noter que le rendement des HEs dépend de plusieurs facteurs à savoir l'espèce, la technique d'extraction, le milieu et la période de récolte (tableau 6).

Tableau 6: rendements des HEs extraites.

PLANTE	<i>M.pipéríta</i>	<i>A. herba-alba</i>
Rendement	0.64%	0.48%.

Pour *M.pipéríta*: notre rendement est : 0.64% (tableau 06) qui est en accord avec les résultats de Ayaydia (2008), qui a enregistré en plusieurs sites (Constantine), les rendements suivants : 0.81%, 0.45%, et 0.72%.

Le rendement en HE d'*A. herba-alba* est de 0.48%. Ce rendement peut être considéré plus au moins faible comparativement à celui de (0,68 %-1,93 %) (Houari, 2009) (Tunisie). Ou encore de (0.41 %-2.30 %) (Salido, 2004) (Espagne).

Cette différence entre les mêmes espèces peut être attribuée à de nombreux facteurs : stade de croissance, technique d'extraction, conditions climatiques et édaphiques de la région (Fellah, 2002).

3-Etude physico-chimique des HEs extraites

Tableau 7: caractéristiques physico-chimique des HEs étudiées.

Caractères HEs	pH	IR	DE	MEth
<i>A. herba-alba</i>	6	1.657	0.819 g/ml	4/5
<i>M.pipéríta</i>	6.92	1.4800	0.8870 g/ml	4/5

3-1 Facteur pH :

Dans la mesure du pH des HEs du *M.pipérítaet A. herba-alba* on a trouvé les valeurs (6.92,6) respectivement d'où on peut dire que *M.pipérítaétudiée* a un pH presque neutre tandis que l'*A. herba-alba* a un pH plus au moins acide. (tableau 07)

3-2 Indice de réfraction (IR)

Généralement l'indice de réfraction est utilisé comme critère de pureté des HEs. Est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air à l'HE maintenue à une température constante.

Pour *M.pipéríta* notre IR mesuré est défini dans l'intervalle des normes AFNOR (1.4600-1.5000), et sont similaires à ceux de Ayaydia (2008) (1.4807, 1.4847 et 1.4877).

Pour *A. herba-alba* l'IR est 1.4800. Chaque substance a son indice de réfraction spécifique. Plus que l'IR d'un produit est près de la valeur attendue, plus sa pureté est grande. Dans ce cas on peut considérer que nos HEs sont pures.

Selon Kanko, 2004, les indices de réfraction varient essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé.

3-3 La densité (DE)

La densité des HEs est en général inférieure à celle de l'eau à l'exception des HEs de sassafras, de girofle ou de cannelle. Qui ont un indice de réfraction élevé (Baser et Buchbauer, 2010).

Pour *M.pipérítaet A. herba-alba* la densité se situe dans l'intervalle des normes AFNOR (0.820-0.9900).

3-4 Spectre chromatographique (CPG) des HEs

La détermination des propriétés physico-chimiques est une étape nécessaire mais demeure non suffisante pour caractériser les HEs. Il sera donc primordial de déterminer le profil chromatographique.

*Spectre chromatographique (CPG) des HEs du *M.pipéríta*

L'HE est un mélange de nombreuses molécules chimique, dont chaque composant est représenté par un pic dans le Figure (19). Nous avons mis en évidence 85 composants dont certains de forte concentration, et d'autres sous forme de traces.

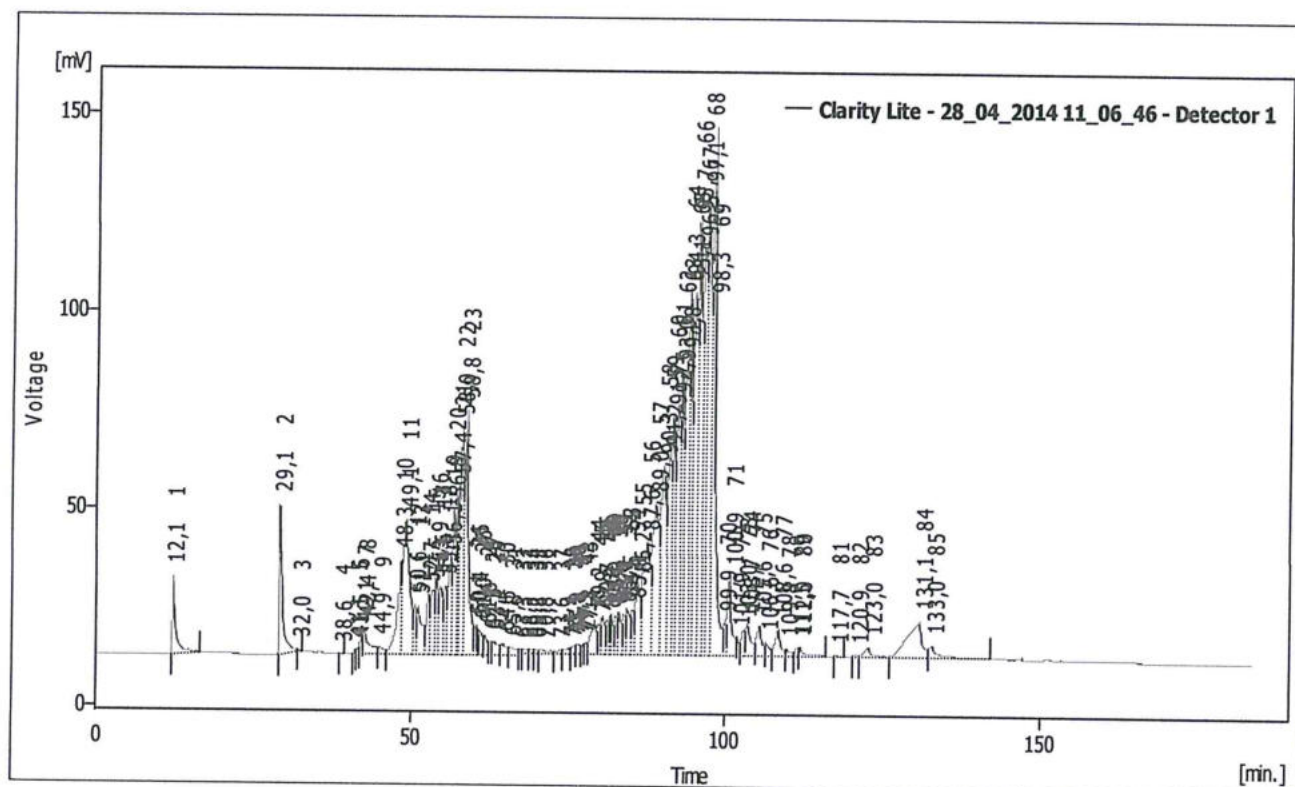


Figure 19 : représente la CPG des HEs du *M.pipéríta*.

Beaucoup de facteurs externes peuvent influencer la composition chimique de l'huile essentielle. La température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la composition du sol sont autant de facteurs d'ordre environnemental susceptibles d'exercer des modifications chimiques. Chez *M. pipéríta* par exemple, les nuits froides favorisent la formation de menthol alors que les nuits tempérées favorisent celle du menthofuranne (Bruneton, 1999).

Les études portant sur la variation de la composition chimique des huiles en fonction du cycle circadien et des saisons sont nombreuses (Assad et al., 1997; Lopes et al., 1997).

L'heure de la récolte du matériel végétal ainsi que le moment dans l'année sont en effet des facteurs importants. À titre d'exemple, il a été démontré que, la composition de l'huile essentielle de feuilles d'*Ocimum gratissimum*, varie considérablement en fonction de l'heure de la récolte (Vasconcelos et al., 1999).

Outre la composition, ces facteurs peuvent également avoir un impact sur la teneur en huile essentielle. Les Citrus par exemple ont une teneur plus importante en huile essentielle lorsque la température est élevée (Bruneton, 1999).

Les fleurs de *Chrysanthemum coronarium* sont plus riches en huile essentielle sous l'effet de fertilisants (Alvarez-Castellanos et al., 2003).

*Spectre chromatographique (CPG) des HEs d'*A. herba-alba*:

Les analyses chromatographiques des HEs d'*A. herba alba* ont révélé la présence de soixante-quatre composés volatils. La plante présente une grande variabilité chimique, ceci est en accord avec les travaux de (Salido et al., 2004)(Figure 20).

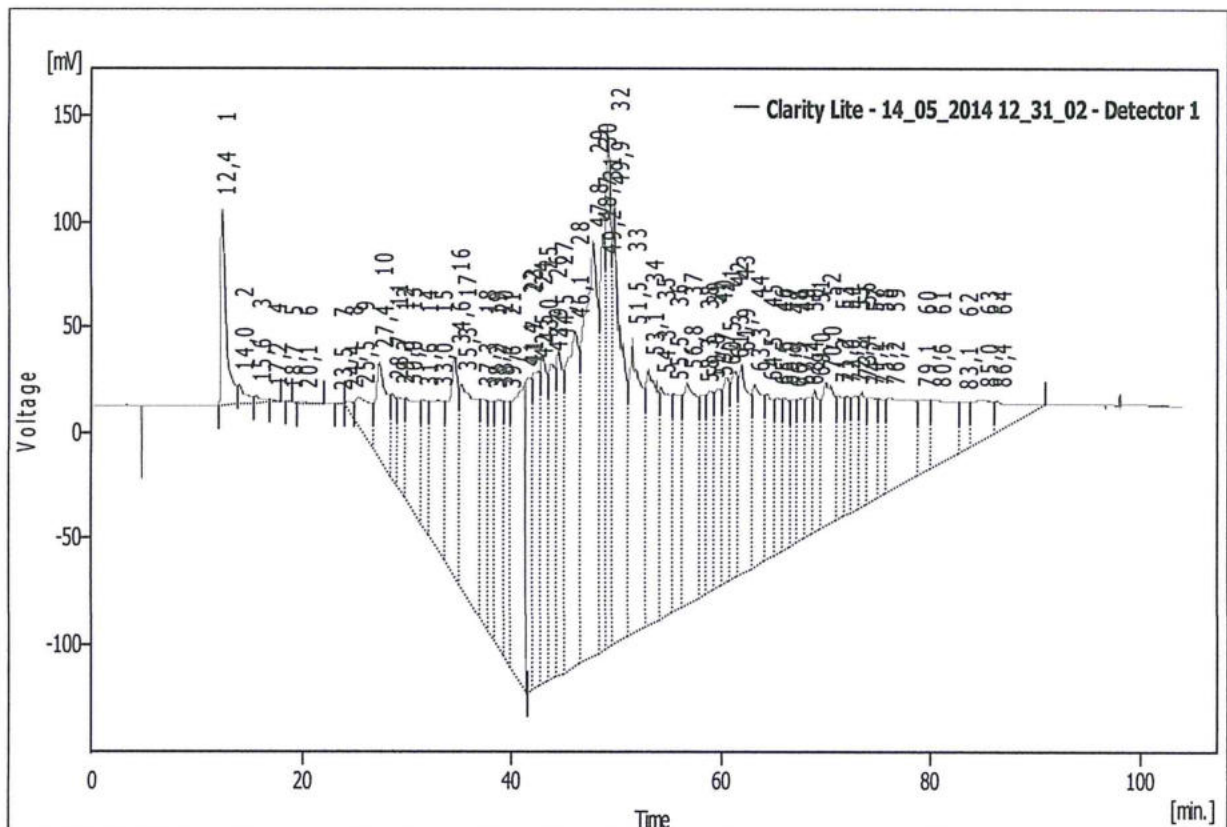


Figure 20: chromatogramme de l'HE d'*A. herba alba*.

La figure (20), reflète la composition chimique d'*A.herba albaetla* grande variabilité des spectres, reflétant ainsi sa variabilité chimique, lui conférant ainsi un large intervalle d'activités biologiques.

CHAPITRE III

PHYSIOLOGIE ET MORPHOLOGIE

Introduction

Notre travail a été effectué au laboratoire de Toxicologie Cellulaire de l'Université de Badji Mokhtar de Annaba.

Généralement, les facteurs écologiques sont utilisés pour décrire, analyser ou modéliser une fonction physiologique d'un organisme biologique. Parmi ces derniers on peut citer les facteurs abiotiques (physico-chimiques et pollutions) qui ont des effets directs et rapides sur le développement des organismes vivants (Branger et *al.*, 2007). Cependant, La compréhension des effets produits par les paramètres conditionnant la croissance d'une espèce donnée semble être primordiale pour son utilisation expérimentale en écotoxicologie (Ershov et *al.*, 1999).

Nous essaierons à travers ce chapitre d'étudier les effets des huiles essentielles sur la croissance (qualitative et quantitative), la trajectoire et la vitesse de déplacement pour un micro-organisme unicellulaire d'eau douce: *Paramecium sp.* Les paramécies ont été choisies en tant que modèle biologique alternatif pour notre étude du fait de:

-Leur facilité à être cultivées en laboratoire, leur manipulation rapide (cycle de vie court) ainsi que leur moindre coût (Kamola, 1995).

-Leur mobilité grâce à des cils possédant la même structure que ceux des cellules épithéliales des mammifères (Gräf et *al.*, 1999), de plus des études de micro-cinématographie à haute vitesse ont révélé que les battements ciliaires chez les mammifères sont parfaitement comparables à ceux de la paramécie, *Tetrahymena*.....etc.(Berrebbah, 1990).

I- Matériel et méthodes

1-Culture des paramécies

La culture des paramécies est effectuée selon la méthode de Beaumont et Cassier (1998). Puis nous avons procédé à l'homogénéisation (élimination des prédateurs) de la culture selon la méthode de Bouaricha (2013).

1-1 Préparation du milieu de repiquage:

- La méthode consiste à réduire en poudre quelques feuilles de laitue sécher au préalable dans une étuve (100°C) jusqu'à ce qu'elles soient brunes et fripées. Cette poudre peut être conservée indéfiniment dans un récipient hermétiquement clos.

- Rajouter 1.5 g de cette poudre à 1 litre d'eau distillée, et porter à ébullition pendant 5 min.

- Filtrer le liquide chaud et le répartir dans des flacons de 250 ml avant de le stériliser.

- Laisser reposer au moins une nuit avant l'ensemencement (en utilisant quelques gouttes de lait).

1-2 L'ensemencement

Les cellules sont repiquées au fur et à mesure des besoins, pour maintenir une bonne culture et pouvoir utiliser donc la phase exponentielle de croissance. L'adjonction de CaCO_3 en excès permet de maintenir le pH autour de 7.2 (Beaumont et Cassier, 1998).

2-Détermination de la concentration inhibitrice (CI 50)

Les HEs sont testés sur des aliquotes de 100 ml de culture des paramécies, trois concentrations sont choisies: $0.2\ \mu\text{L}/\text{ml}$; $0.5\ \mu\text{L}/\text{ml}$ et $0.7\ \mu\text{L}/\text{ml}$ (les tests sont répétés trois fois).

Nous avons utilisé un logiciel (TOXICALC) pour caractériser la toxicité de nos HEs et déterminer la concentration inhibitrice (CI 50). Par définition la CI 50 est la concentration qui, dans des conditions standard, inhibe 50% de l'accroissement d'une population (Bonnet, 2005).

3-Cinétique de croissance cellulaire

La cinétique de croissance des paramécies est un paramètre physiologique qui s'effectue par la mesure de la densité optique DO à la longueur d'onde $\lambda = 600$ nm en fonction du temps (Sauvant et *al.*, 1999). Aussi bien pour les témoins que pour les traitées selon le protocole suivant :

* Pour les temps courts

- T1 : après 1 heure; observation microscopique + DO.
- T2 : après 2 heures; observation microscopique + DO.
- T3 : après 3 heures; observation microscopique + DO.
- T4 : après 4 heures; observation microscopique + DO.

* Pour les temps longs

- T1 : après 1 jour; observation microscopique + DO.
- T2 : après 2 jours; observation microscopique + DO.
- T3 : après 3 jours; observation microscopique + DO.
- T4 : après 4 jours; observation microscopique + DO.
- .
- .
- T11 : après 7 jours; observation microscopique + DO.

3-1Dénombrement des cellules

Le dénombrement est réalisé sur une cellule de Malassez, à l'aide d'un microscope (Leica) à l'objectif $\times 40$. Le nombre des protozoaires par ml est exprimé selon l'équation suivante:

$$N = n1 * v * n2 * f * 1000$$

N : nombre de cellules par ml.

n1 : nombre de cellules comptées.

v : volume d'un rectangle = 0.01 μ l.

n2: nombre de rectangles comptés = 25.

f: facteur de dilution.

3-2 Calcul du pourcentage de réponse

C'est un calcul qui évalue la réponse du protiste vis-à-vis du xénobiotique, il est basé sur l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage de réponse} = [(\text{NC} - \text{NE}) / \text{NC}] \times 100$$

NC : nombre des cellules témoins.

NE : nombre final des cellules traitées.

Les valeurs positives du pourcentage de réponse indiquent une inhibition de la croissance tandis que les valeurs négatives indiquent une stimulation de la croissance (Wong et *al.*, 1999).

3-3 Calcul du nombre et du temps de génération

Le nombre ainsi que le temps de génération sont des paramètres qui permettent de confirmer la toxicité des xénobiotiques testés vis-à-vis des cellules étudiées. Le principe du calcul retenu dans le cadre de ce travail est celui détaillé par Dias et *al.* (2003) et ce après 24h de traitement.

La détermination du nombre de génération (n), et le temps requis pour chaque génération (g) est calculé suivant les équations (1) et (2) :

$$n = \frac{\log N_1 - \log N_0}{\log 2} \quad (1)$$

$$g = \frac{T_{24H}}{n} \quad (2)$$

Où :

N1 : Nombre de cellule à 24h ;

N0 : Nombre de cellule à T0.

T24h : Temps de croissance = 24h

4-Vitesse de déplacement

Les paramécies se déplacent d'une manière active et rapide. Dans un état de stress physique ou chimique, le rythme des mouvements change en fonction du temps. De ce fait on a pensé que des expériences sur les vitesses de déplacement doivent être réalisées.

On a suivi la distance parcourue (nous avons utilisé un micromètre afin de calculer les distances) par *paramecium sp* et le temps de déplacement sous microscope et puis on a calculé la vitesse de déplacement suivant l'équation:

$$V = M * T$$

V : vitesse de déplacement du *paramecium sp*.

M: distance parcourue par *paramecium sp*.

T : temps de déplacement.

5-Trajectoires

Pour faire suivre la trajectoire de déplacements des paramécies nous avons enregistré le déplacement des paramécies par une séquence vidéo. Pour suivre la trajectoire avant et après les traitements par les différentes doses des HEs étudiées, nous avons procédé à un suivi image par image.

II Résultats et Discussion

1-Effets des HEs sur la croissance cellulaire

Les courbes de croissances nous permettent d'avoir des données quantitatives et une analyse fiable de l'effet toxique d'une substance donnée.

1-1 Effet des HEs du *M. piperita*

*A court terme

La figure (21) illustre l'effet des HEs du *M. piperita* sur l'évolution de la croissance des paramécies (en fonction des temps courts).

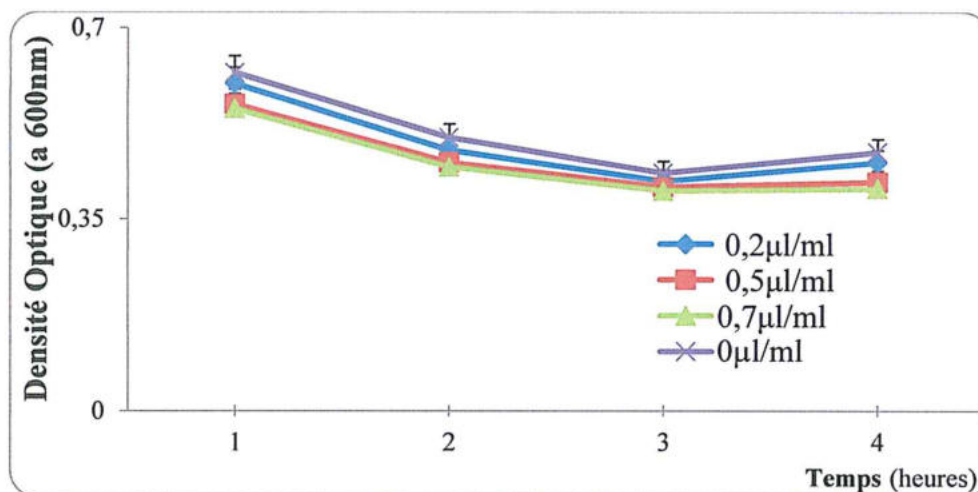


Figure 21: Cinétique de croissance des paramécies traitées aux HEs (*M. piperita*).

Nous observons une inhibition dose dépendante et non significative de la croissance ($p > 0.05$) et ce dès la mise en contact des HEs du *M. piperita* avec les paramécies.

En effet, si la DO chez le témoin est de 0.472 nm à 4h, chez les traitées, elle affiche 0.453, 0.417 et 0.405 nm pour les doses testées (0.2 µL/ml, 0.5 µL/ml, et 0.7 µL/ml) respectivement.

* A long terme

Les résultats relatifs aux effets des traitements avec les HEs du *M. piperita* a long terme sont regroupés dans la figure (22).

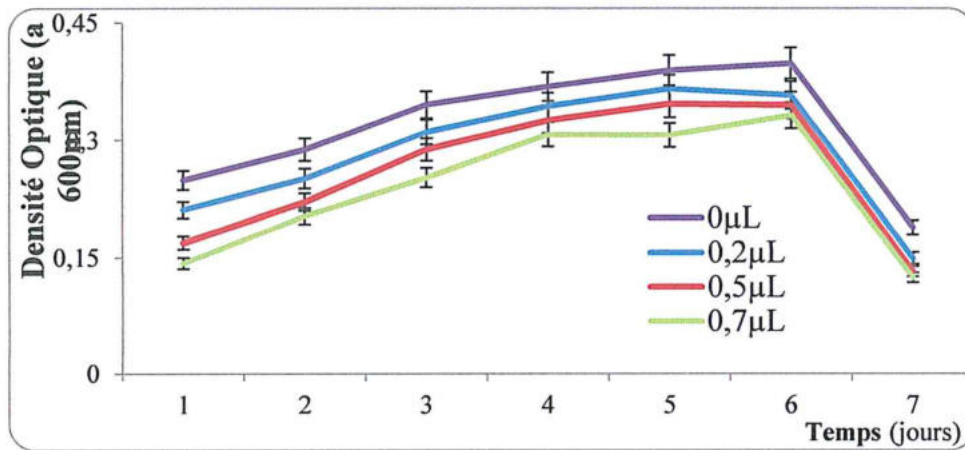


Figure 22: Cinétique de croissance des paramécies traitées aux HEs (*M. piperita*).

A partir de 24h, nous constatons une augmentation progressive des différentes DO jusqu'au 6^{ème} jours ou la DO est de l'ordre de 0.249 chez le témoin et d'environ 0.143 chez les traités par la dose 0.2 µL/ml.

1-2 Effet des HEs d'*A. herba-alba*

*A court terme

La figure (23) représente l'évolution de la croissance des paramécies chez le témoin et les traitées par *A. herba-alba*.

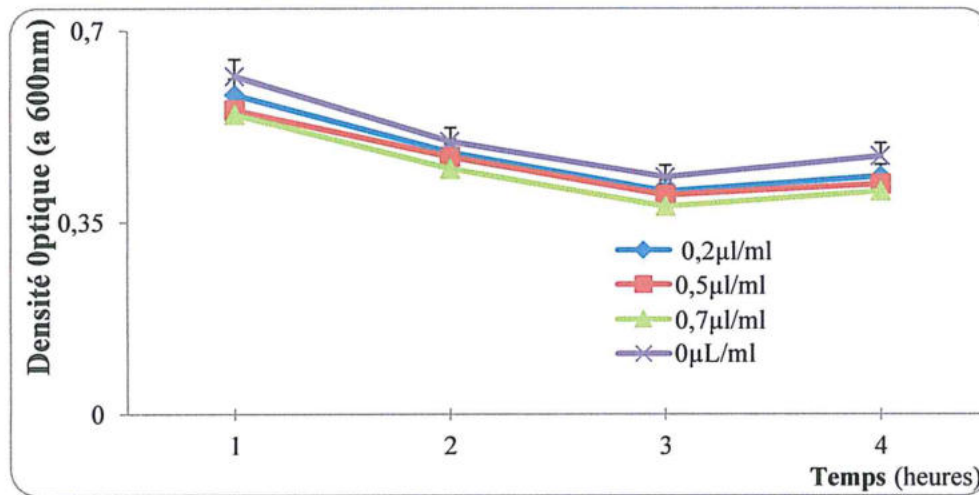


Figure 23: Cinétique de croissance des paramécies traitées aux HEs(*A. herba-alba*).

Nous constatons une inhibition de la croissance des paramécies traitées avec une dose dépendante par rapport aux témoins. Cette diminution est non significative ($p > 0,05$)

*A long terme

La figure (24) nous montre l'effet des HEs d *A. herba-alba* sur la croissance des paramécies (en fonction du temps long).

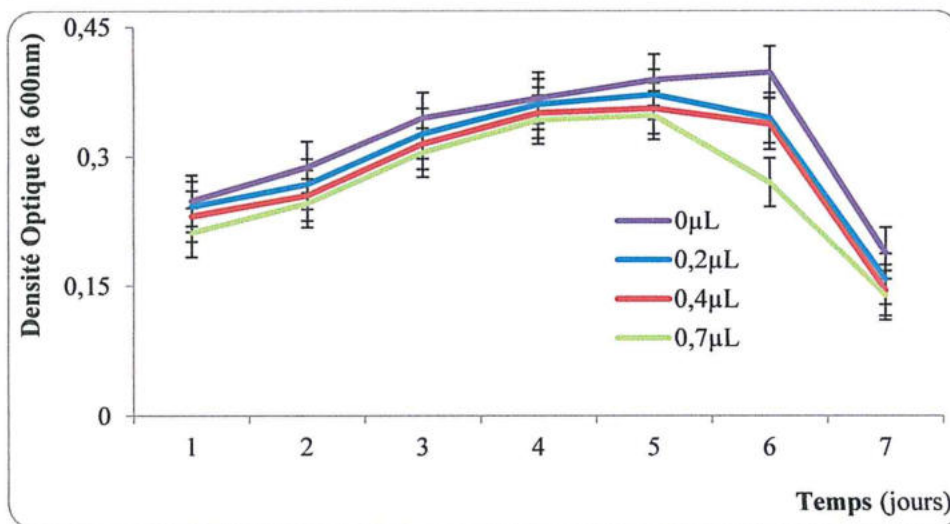


Figure 24 : Cinétique de croissance des paramécies traitées aux HEs (*A. herba-alba*).

D'après La figure (24) et au-delà de 24h de traitement, nous constatons une augmentation de la croissance de nos cultures (traités et témoin). Avec une déplétion de traitées par rapport aux témoins les valeurs observées du DO sont (0.242, 0.231 et 0.212) avec les doses (0.2µL/ml, 0.5µL/ml, et 0.7µL/ml) respectivement. Cette déplétion semble persister jusqu' à la fin du traitement.

De ce fait nous constatons une inhibition de la croissance très hautement significative et dose dépendante ($p \leq 0.001$) des paramécies traitées aux différentes doses et plantes par rapport au témoin.

Nos résultats vont dans le même sens que ceux rapportées par Liebig et *al*, (2008) qui ont étudié l'effet du Parathion-méthyl et le Prometryne sur la croissance des flagellés (*Cryptomonas sp.*) et des ciliés prédateurs (*Urotricha furcata*).

Il est clair que pour atteindre leurs cibles moléculaires, les xénobiotiques pénètrent à l'intérieur des paramécies en traversant la cuticule. Cette pénétration a lieu à une vitesse qui, pour un même toxique, varie d'une espèce à l'autre.

Aux faibles doses, on constate que les HEs ont peu d'effet sur la croissance cellulaire, ceci pourrait être dû soit à l'adsorption des HEs sur la membrane cellulaire et à la présence de cuticule chez les paramécies, qui les rendent résistantes mais qui reste néanmoins perméable (Beaumont et Cassier, 1998), soit à l'influx des HEs à l'intérieur des cellules induisant ainsi un mécanisme de détoxification (Haubruge et Amichot, 1998).

2- Pourcentage de réponse (P.R.)

Le pourcentage de réponses reflète la viabilité de nos paramécies et confirme ainsi l'évolution de notre cinétique de croissance chez la population de *Paramecium sp* pour chaque dose des deux HEs étudiées. Figure (25, 26).

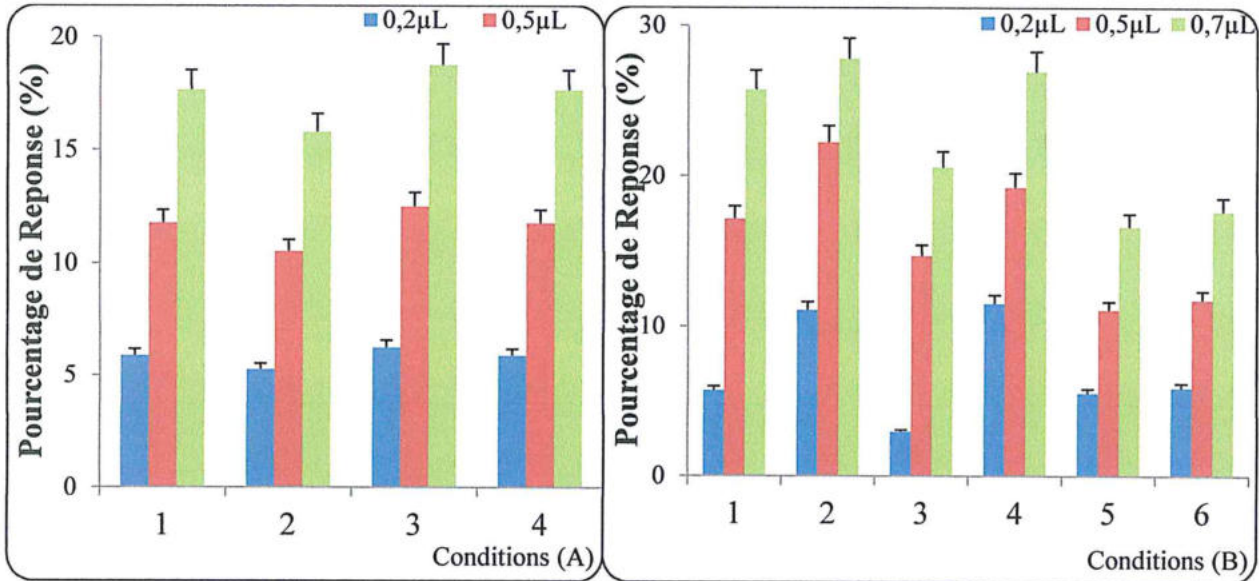


Figure 25 : Pourcentage de Réponse des paramécies traitées aux HEs du *M. piperita* en fonction du temps (Conditions (A) : heures, Conditions (B) : jours).

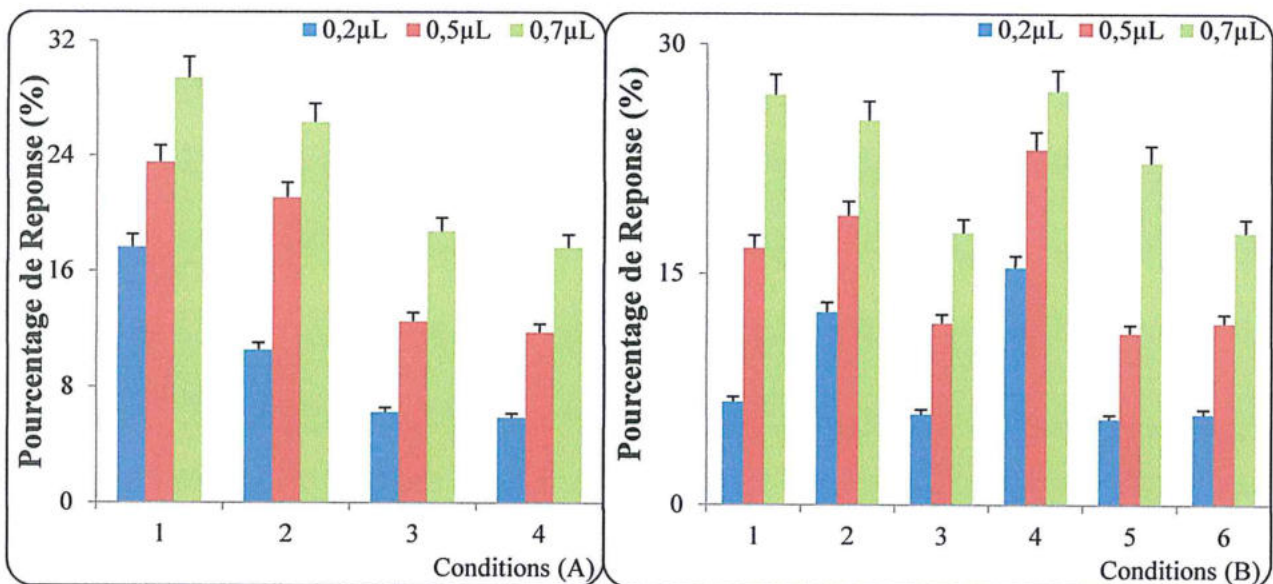


Figure 26 : Pourcentage de Réponse des paramécies traitées aux HEs d'*A. herba-alba* en fonction du temps (Conditions (A) : heures, Conditions (B) : jours).

Les effets sur la croissance sont présentés en pourcentage dans les figures (25, 26). Nous constatons que le pourcentage de réponse évolue d'une manière, dose dépendante chez les traités avec les HEs de différentes plantes étudiées.

Ces pourcentages reflètent l'inhibition de la croissance chez la population de *Paramecium sp* pour chaque HEs et dose. Pour *M. piperita*, elle est dans l'intervalle de 2.94% à 11.11 % pour la plus faible dose (0.2 µl/ml) et atteint 27.77% pour la plus forte dose (0.7 µL/ml). En revanche chez *A. herba-alba* pourcentage le plus élevé est obtenu avec la dose (0.7 µL/ml) après une heure de traitement.

L'analyse statistique met en évidence un effet significatif entre la croissance des cellules témoins et celles des traitées par les différentes doses.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par Redouen-salah (2004) qui a rapporté l'effet inhibiteur de rejets métalliques sur une algue unicellulaire (*Tetraselmis suecica*). De plus, nos résultats rejoignent ceux de Sbartai et al. (2009) qui confirment cet effet chez des paramécies traitées au Cadmium.

3-Détermination du temps et du nombre de génération cellulaire

Le tableau (8) regroupe les valeurs obtenues après calcul du nombre de génération (n) ainsi que du temps de génération (g) après 24h de traitement.

Tableau 8 : Valeurs du nombre de génération après 24h d'exposition au HEs

HEs de plantes	doses	n	g
<i>M. piperita</i>	0µL	5.21±0.19	4.60±0.16
	0.2µL	3.7±0.69	6.62±1.12
	0.5µL	3.61±0.35	6.68±0.64
	0.7µL	3.08±0.47	7.89±1.11
<i>A. herba-alba</i>	0µL	5.21±0.19	4.60±0.16
	0.2µL	3.87±0.48	6.01±1.08
	0.5µL	2.92±0.92	8.92±3.44
	0.7µL	2.45±0.50	10.04±1.84

Ainsi, le temps de génération des paramécies témoins est de l'ordre de 4.6 %. Ce temps, peut aller jusqu' à 7.89 et 10.04 % chez les paramécies traitées par les doses les plus élevées des HEs du *M. piperita* et *A. herba-alba* respectivement.

Nous constatons que le temps de génération augmente d'une manière dose dépendante, alors que l'évolution du nombre de génération est inversement proportionnel aux doses croissantes des HEs. Les espèces croissent d'autant plus rapidement que leur temps de génération est court.

En microbiologie, le temps de génération se définit par le temps nécessaire à une population de micro-organismes pour doubler son nombre. Ce temps varie en fonction de l'espèce étudiée et des conditions environnementales (Prescott et al., 2003), c'est ainsi que des agents physicochimiques et la pollution en général peuvent affecter la croissance en prolongeant le temps des divisions cellulaires (Azouz et al., 2012).

Nos résultats vont dans le même sens que ceux de Rao et al. (2006) qui ont rapporté l'effet inhibiteur de l'acéphate (organophosphoré) à des doses élevées sur le nombre de génération (n) ainsi que le temps de génération (g) de *Paramecium caudatum*, ainsi que ceux de Guelfi et al (2003) qui ont mis en évidence un effet stimulant de la multiplication du cadmium sur des champignons filamenteux (*Aspergillus nidulans*), laissant suggérer ainsi un effet carcinogène du xénobiotique. Nos résultats sont en accord avec ceux cités et confirment cet effet des HEs

4 Détermination du taux de croissance des paramécies

Les valeurs obtenues après calcul du taux de croissance (μ), suite à un traitement de 24h sont regroupées dans le tableau (9).

Tableau 9 : Détermination du taux de croissance des paramécies après 24h d'exposition aux HEs.

dose μ	0 μ L/ml	0.2 μ L/ml	0.5 μ L/ml	0.7 μ L/ml
HEs <i>M. piperita</i>	0.996 \pm 0.52	0.71 \pm 0.13	0.666 \pm 0.11	0.466 \pm 0.13
HEs <i>A. herba-alba</i>	0.996 \pm 0.52	0.76 \pm 0.12	0.723 \pm 0.31	0.58 \pm 0.06

Nous constatons que le taux de croissance des paramécies témoins qui est de 0.996, il demeure plus élevé que celui obtenu avec les différentes doses des HEs étudiées. Le taux de croissance est inversement proportionnel aux doses des HEs et ceux pour les deux plantes testées. L'étude statistique montre que les HEs ont un effet inhibiteur significatif ($p < 0.05$), et ce pour toutes les doses étudiées.

En effet, les espèces appartenant au genre *Paramecium* sont des organismes sensibles aux changements physico-chimique de leurs milieu (Mortuza et al., 2010). Plusieurs études ont montré que différents types de biocides ont des effets inhibiteurs et toxiques sur les ciliés d'eau douce, ces effets sont perceptibles au niveau de la population en réduisant le nombre de cellules et au niveau cellulaire par des modifications structurelles, physiologiques et comportementales (Rouabhi et al., 2009 ; Sbartai et al., 2009). Ce qui est en accord avec nos résultats puisque nous avons mis en évidence une diminution du taux de croissance des traitées.

5- Effets des HEs sur la taille des paramécies

En générale la taille des paramécies varie considérablement selon l'approvisionnement alimentaire, le stade du cycle de vie et les conditions du milieu. (Figure 27, 28)

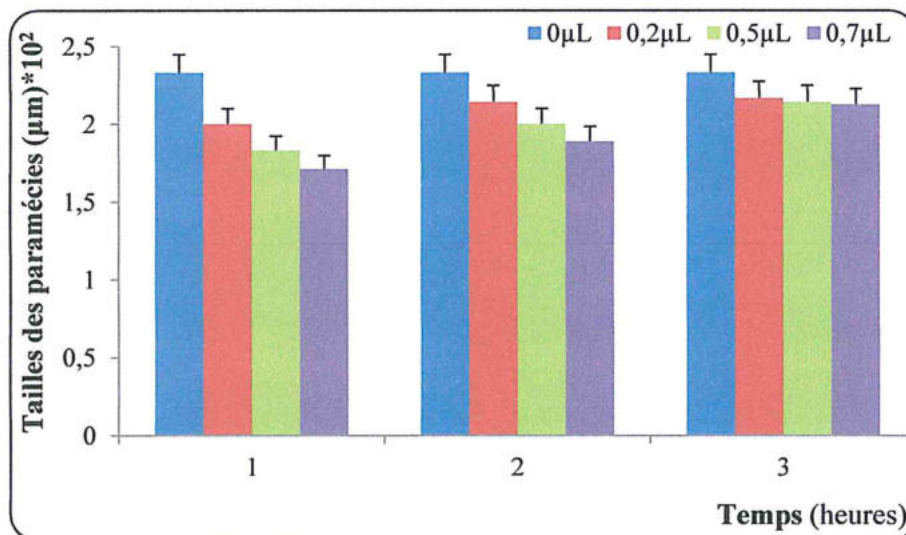


Figure 27: Effet des HEs du *M. piperita* sur la taille des paramécies en fonction du temps.

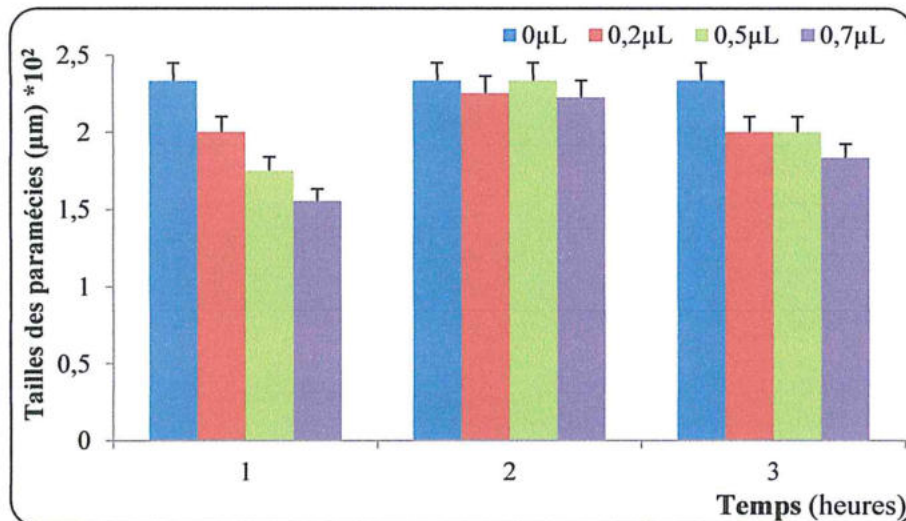


Figure 28 : Effet des HEs d'*A. herba-alba* sur la taille des paramécies en fonction du temps.

La taille des paramécies témoins est de l'ordre de 233 μm . En revanche, chez les paramécies traitées la taille varie de manière dose-dépendante en fonction du traitement (Figure 27, 28). De ce fait la taille de nos paramécies diminue de manière inversement proportionnelle aux doses des xénobiotiques.

Pour *M. piperita*, la taille des paramécies traitées par la forte dose peut mesurer entre 171 μm et 212 μm pour la 1^{ère} et la 3^{ème} heure de traitement respectivement. Tandis que pour la plus faible dose elle est entre 200 μm et 216 μm pour les mêmes heures respectivement.

Pour les paramécies traitées par les différentes doses des HEs d'*A. herba-alba*, la taille des paramécies diminue d'une manière inversement proportionnelle aux doses croissantes.

Cooley et al (2000) ont observé des altérations significatives de paramètres morphométriques au niveau des hépatocytes chez des corégones *Coregonus clupeaformis* exposés à l'uranium par voie alimentaire.

D'après Azouz (2012), au moment de la conjugaison, la bouche devient complètement fermée. Par conséquent, les organismes ne se nourrissent pas pendant la conjugaison et pour cette raison, la taille des cellules devient plus réduite. Pendant ce temps, le contenu intérieur subit une réorganisation radicale. Selon Hertwig (1889), des nouvelles bouches sont formées cependant, les vacuoles contractiles continuent à fonctionner normalement pendant la conjugaison (Wichterman, 1953).

6- Effets des HEs sur la vitesse de déplacement

Dans une culture jeune, les paramécies se déplacent d'une manière active et rapide. Dans un état d'excitation physique ou chimique, les mouvements deviennent plus rapides et véloces.

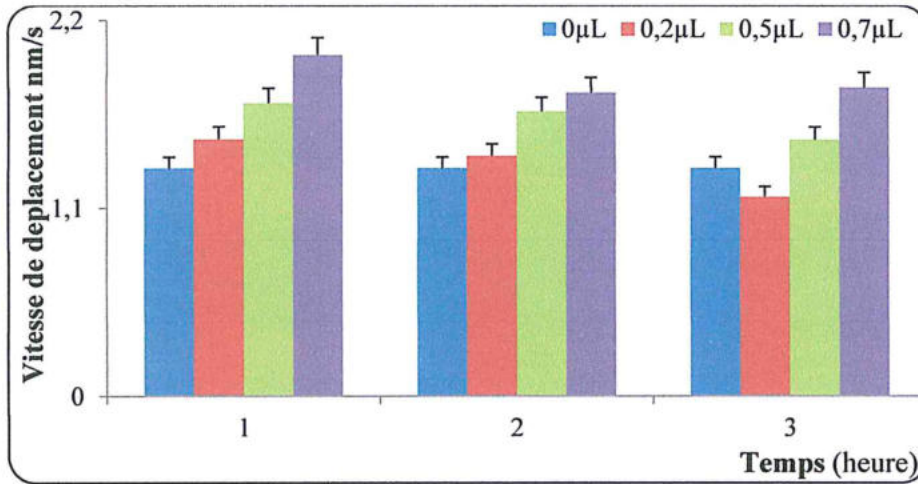


Figure 29 : Effet des HEs du *M. piperita* sur la vitesse de déplacement des paramécies en fonction du temps.

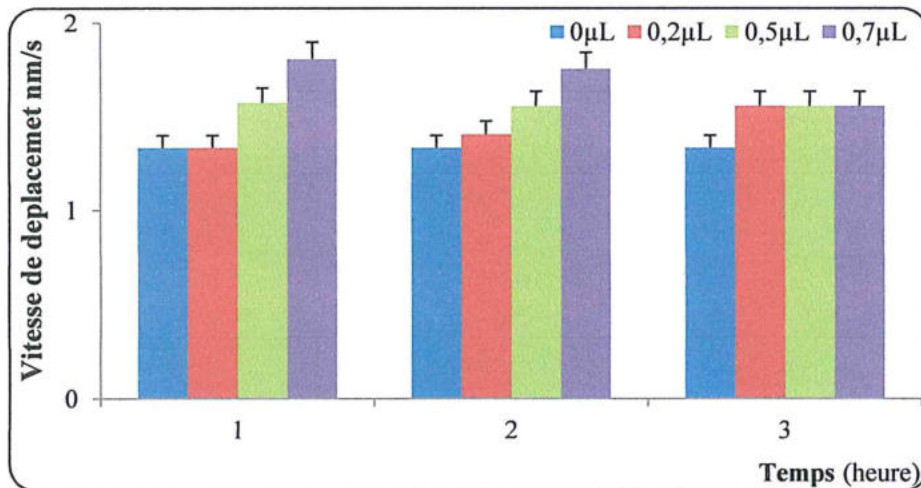


Figure 30: Effet des HEs d'*Artemisia herba-alba* sur la vitesse de déplacement des paramécies en fonction du temps.

D'après les figures (29, 30) on constate que nos HEs augmentent la vitesse de déplacement de manière probablement proportionnelle aux doses étudiées.

L'évitement est le comportement le plus visible chez les espèces de paramécies. Au contact d'un obstacle (physique ou chimique), La paramécie nage à l'arrière par un mouvement rapide pendant un certain temps, puis repart en avant avec un angle de déviation, jusqu'à l'évitement total de l'obstacle.

Tandis que Azouz (2012), a signalé que la vitesse diminue de manière inversement proportionnelle aux doses des xénobiotiques.

7-Effets des HEs sur la trajectoire des paramécies :

Le suivi de la trajectoire constitue une méthode simple et efficace pour l'évaluation du comportement des paramécies vis-à-vis des xénobiotiques.

Afin de caractériser l'impact des HEs sur la trajectoire des paramécies, nous avons étudié leurs trajectoires en présence et en absence des molécules à tester en effectuant un enregistrement vidéo des déplacements. (Figure 31, 32).

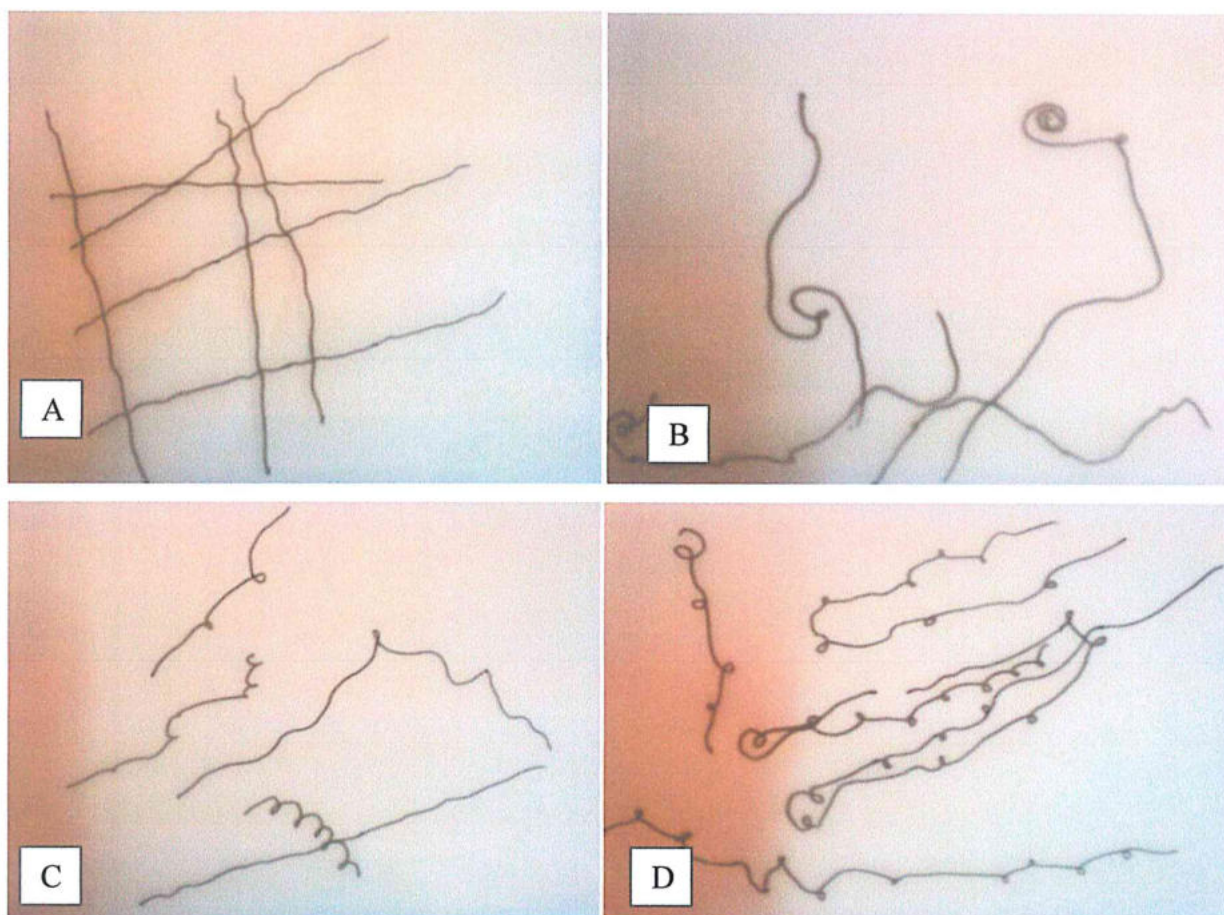


Figure 31: Trajectoires des paramécies témoin et traitées par les HEs du *M. piperita* (A) : 0 μ L/ml, (B) : 0.2 μ L/ml, (C) : 0.5 μ L/ml et (D) : 0.7 μ L/ml.

Généralement et en absence d'obstacle, la paramécie nage selon une trajectoire linéaire. En cas d'obstacle la paramécie change rapidement de direction ou revient très vite en arrière. Donc on peut dire que tout changement de direction dans le mouvement indique une toxicité chez les paramécies ou un obstacle.

Lors de leur déplacement, les paramécies suivent, le plus souvent, des itinéraires directs. Le changement brutal des trajectoires et les troubles de déplacement indiquent un état comportemental anormal.

La figure (31) montre que les faibles doses affectent peu les trajectoires (B). Les changements sont marqués beaucoup plus avec la dose la plus élevée (0.7 $\mu\text{L}/\text{ml}$). Nous avons remarqué qu'après un traitement par *M. piperita* les trajectoires perdent leur linéarité et deviennent désordonnées, plus circulaires avec des rotations sur place.

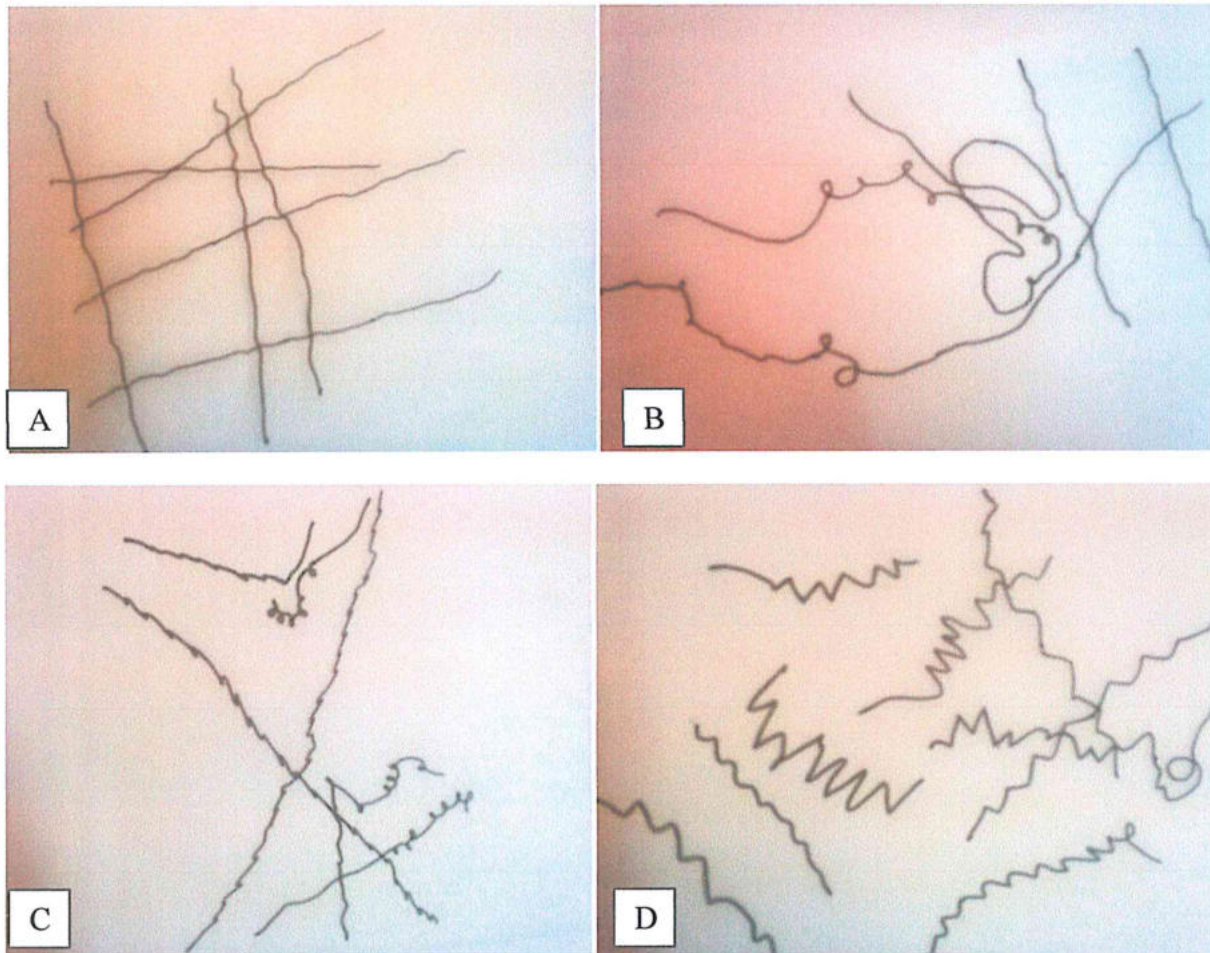


Figure 32: Trajectoires des paramécies témoin et traitées par les HESd'*A. herba-alba* (A): 0 $\mu\text{L}/\text{ml}$, (B) : 0.2 $\mu\text{L}/\text{ml}$, (C) : 0.5 $\mu\text{L}/\text{ml}$ et (D) : 0.7 $\mu\text{L}/\text{ml}$

En parallèle, l'observation microscopique montre qu'en fonction du temps et des doses que la mobilité et les mouvements cellulaires sont perturbés. Ces perturbations des mouvements se manifestent par un changement brutal de la direction suivi d'une nage en zig-zag ou retours en arrière particulièrement avec les fortes doses des HES de l'*A. herba-alba*. Figure (32).

Ces résultats viennent appuyer ceux de Rouabhi et *al.* (2006) qui ont rapporté l'effet du Diflubenzuron et du Flucyclohexuron sur la forme et la trajectoire des paramécies.

Eckert et Randall, 1999 ont signalé qu'un contact sur l'extrémité postérieure d'un spécimen isolé le conduit à nager plus rapidement vers l'avant; un contact sur son extrémité antérieure l'amène à changer la direction. Le changement de direction survient lorsque le sens des battements des cils s'inverse.

C'est connu que la paramécie avance en tournant autour de son axe longitudinal, selon un mouvement hélicoïdal (Bernal et Ruvalcaba, 1996). Tant dis que Cudmore et *al.* 1977 ont signalé qu'elles peuvent changer brusquement de direction et faire marche arrière.

Les études sur le comportement chez la paramécie sont renforcées par la génétique comportementale décrite par Plomin et *al.* (1998). Selon ces auteurs, la paramécie a au moins 20 gènes participant au comportement d'évitement. Certains mutants appelés «Pions» ne savent pas nager à reculons (par analogie avec les pions du jeu d'échec qui ne peuvent pas reculer). Certains d'autres appelés les «paranoïaques» en raison de leur déplacement à reculons prolongés, ainsi que les «paresseux» dont les déplacements sont très limités (Azouz, 2012).

Takiguchi et *al.*, (2002), ont testé les effets de l'acide 2,4-Dichloro-phynoxy-acétique (herbicide) et ces analogues sur la fuite de *Paramecium caudatum*. En plus de l'inhibition des déplacements, leurs résultats ont montré un comportement d'évitement vers l'arrière causé par l'acide phénolique. Au niveau physiologique, le comportement d'évitement peut être expliqué par la création d'un changement dans le potentiel membranaire.

La dépolarisation de la membrane peut être induite suite à une stimulation par un courant (Machemer et Eckert, 1973), par une stimulation mécanique, chimique (Naitoh et Eckert, 1969) ou spontanément (Naitoh, 1966).

Nos résultats suggèrent que ces deux HEs provoquent une dépolarisation au niveau de la membrane de notre paramécie conduisant vers un comportement d'évitement. Le pouvoir des substances chimiques d'induire une dépolarisation a été mis en évidence par plusieurs auteurs Takiguchi et *al.* (2002).

Le parallèle entre la réaction d'évitement et les processus qui se produisent dans les organismes supérieurs est frappant (Beale et Preer, 2008) ; un stimulus chez la paramécie ouvre les canaux de Ca^{2+} afin de dépolariser la membrane cellulaire, et la repolarisation se produit

après l'ouverture retardée des canaux K^+ (Schultz et *al.*, 1992) ; cependant, chez les organismes supérieurs, lorsqu'un neurone est stimulé, il ouvre les canaux Na^+ pour dépolariser la membrane cellulaire et (comme dans paramécie) le phénomène est restauré par l'ouverture des canaux K^+ (Eckert et Brehm, 1979).

Chez la paramécie, l'ouverture et la fermeture des canaux sont surveillées par un verrouillage de tension, qui est utilisé pour maintenir une tension donnée (Naitoh, 1970).

Le changement temporaire de la tension ouvre très rapidement un canal de Ca^{2+} (inactivation du flux entrant) et plus tard, l'ouverture du canal K^+ , est également stimulée par la concentration croissante de Ca^{2+} , ce qui permet l'écoulement du K^+ (flux de rectification retardée) à travers la membrane vers l'extérieur (Eckert et Brehm, 1979). Le changement de la concentration Ca^{2+} est mesurée en microsecondes, tandis que le changement de la concentration des K^+ est plus lent et mesuré en millisecondes. L'augmentation du Ca^{2+} induit également une inversion de la direction des battements ciliaires, permettant à la cellule de reculer (Jahn, 1962; Naitoh, 1968).

La stimulation de la nage en arrière par une solution riche en potassium est corrélée avec l'amplitude du flux du calcium (Haga et *al.*, 1982). Cette corrélation montre que le comportement de nage en arrière chez les paramécies peut être utilisé pour estimer l'activité des canaux Ca^{2+} dépendants. Selon Oka et *al.* (1986), les cellules de *P. caudatum* peuvent s'adapter à ces concentrations extracellulaires du potassium en l'espace de 2h environ. A la fin des ces réactions, les potentiels de repos originaux sont restaurés et la cellule nage en avant de nouveau, le plus souvent vers une nouvelle direction (Beale et Preer, 2008).

CHAPITRE IV

BIOCHIMIE ET POLAROGRAPHIE

Introduction

Un des domaines où il y a eu très peu de recherches effectuées jusqu'à présent mais où réside beaucoup de potentiel, est l'étude des effets des produits toxiques au niveau moléculaire, plus spécifiquement sur la synthèse des protéines de stress. Tous les produits toxiques causent des dommages aux cellules. À une concentration subléthale, les toxiques ne causent pas de mortalité mais permettent ainsi aux cellules de combattre ces effets toxiques en synthétisant des protéines de stress.

Afin de mieux comprendre l'effet des deux HEs sur les paramécies, nous nous sommes intéressés à l'évolution des principaux métabolites cellulaires à savoir, (protéines, et lipides), qui en plus de leur rôle comme élément constitutif de la membrane plasmique et participent dans le métabolisme global de la cellule.

Aussi, toute altération aussi minime soit-elle d'un de ces éléments aura des conséquences sur le comportement des paramécies. Le volet de ce chapitre concerne l'étude polarographique qui nous permettra de suivre les effets des deux HEs sur le métabolisme respiratoire des paramécies et par conséquent la consommation d'O₂ qui pourrait rendre compte de l'implication des monooxygénases dans le processus de biotransformation/métabolisation.

1-Matériel et méthodes

1-1 Dosage des protéines totales

La technique retenue dans le cadre de ce travail est celle décrite par Bradford (1976). Il s'agit d'une méthode de mesure de concentration protéique basée sur une réaction colorimétrique entre les protéines et un colorant : le bleu de Coomassie G250. Ce réactif, rouge/brun à l'état libre, prend une teinte bleue quand il est lié aux protéines. Il possède un coefficient d'extinction molaire élevé dans le visible (à 595 nm) qui permet un dosage protéique très sensible.

1-2 Dosage des lipides

Le taux de lipides est déterminé selon la méthode de Goldsworthy *et al.* (1972) qui utilise la vanilline comme réactif et une solution mère de lipides à 2,5 mg/ml comme standard. Le dosage est réalisé sur des prises aliquotes de 100 µL des extraits lipidiques ou de la gamme étalon auxquelles on ajoute 1 ml d'acide sulfurique (96 %). Après agitation et chauffage dans

des bains à sec à 100 °C pendant 10 mn, puis refroidissement, 200 µl sont repris auxquels sont ajoutés 2,5 ml de la réactive vanilline. Une fois agités et mis à l'obscurité pendant 30 minutes, une coloration rose se développe dont l'intensité est lue à une longueur d'onde de 530 nm.

1-3 Mesure de la respiration (polarographie)

Le suivi du métabolisme respiratoire des paramécies est effectué selon la méthode de Benbouzid et *al.* (2012).

L'appareil utilisé est une électrode à oxygène, de type HANSATECH qui permet la mesure de la production ou de la consommation d'oxygène. Cet appareil est composé d'une jaquette thermostatée contenant la suspension cellulaire, et deux électrodes, une cathode (-) de platine et une anode (+) d'argent, reliées par un pont contenant du chlorure de potassium (KCl). (Figure 33)

Les deux jaquettes sont séparées par une membrane semi-perméable, permettant la diffusion de l'oxygène dissous du milieu de culture (suspension cellulaire) vers les électrodes. Le courant généré est proportionnel à la quantité d'oxygène dissous en fonction du temps (Djebar et Djebar, 2000). L'appareil est relié à un micro-ordinateur qui permet de visualiser les différents spectres.

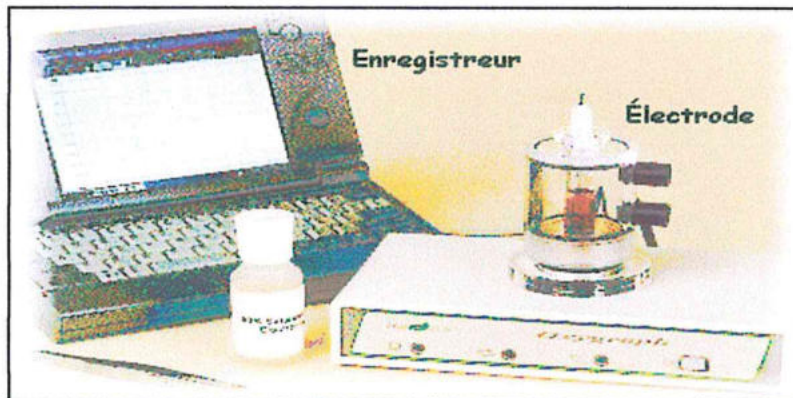


Figure 33: l'Electrode à Oxygène (Hansatech Instruments).

2- Resultats et discussion

2-1 Variation du taux de lipides totaux

* Effet des HEs du *M. pipéríta*

La figure (34) illustre les variations du taux de lipides totaux chez les paramécies témoins et les traitées avec des doses croissantes des HEs du *M. pipéríta*.

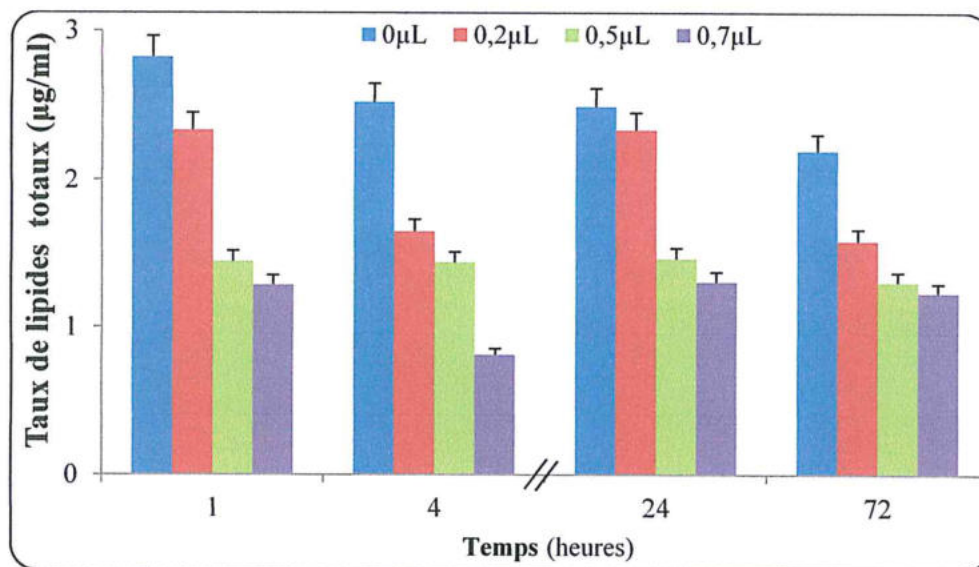


Figure 34 : Effet des HEs du *M. pipéríta* sur le taux de lipides totaux en fonction du temps.

On remarque que le taux de lipides diminue d'une manière significative ($p \leq 0.05$) et ce dès la 1^{ère} heure ou on a enregistré les valeurs (1.28, 1.44 et 2.33 µg/ml) pour les doses (0.7, 0.5 et 0.2 µL/ml) respectivement par apport aux témoins (2.82 µg/ml).

* Effet des HEs d'*A. herba-alba*

Les variations du taux de lipides chez les paramécies témoins et traitées par les HEs d'*A. herba-alba* sont représentées dans la figure (35).

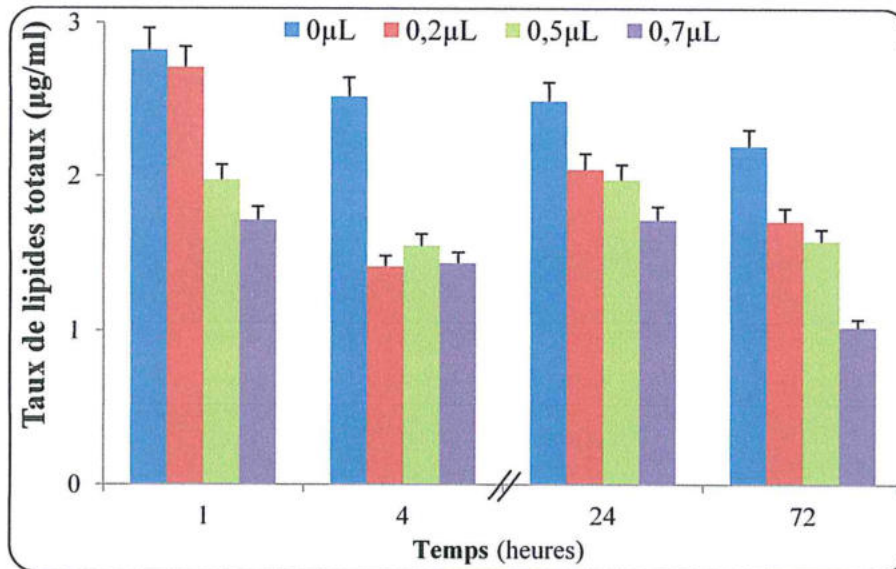


Figure 35 : Effet des HEs d'*A. herba-alba* sur le taux de lipides totaux en fonction du temps.

Les variations des taux de lipides en fonction du temps et en présence de doses croissantes des HEs d'*A. herba-alba* montrent une diminution de manière dose-dépendante et significative ($p \leq 0.05$) tout au long du traitement et pour toutes les doses étudiées. (Figure 41).

Chez les cellules eucaryotes la membrane plasmique est constituée par un assemblage de lipides et de protéines maintenues par des interactions non covalentes. Des chaînes polysaccharidiques sont liées de manière covalente à la plupart des protéines exposées à la surface de la cellule et à certaines des molécules lipidiques de la monocouche lipidique externe (Alberts et *al.*, 1986).

L'évolution du taux de lipides suggère une altération de la membrane cellulaire sachant que cette dernière est composée de 50% de lipides (phospholipides) et que nos HEs agissent sur les protistes dès la mise en contact. Ce résultat a été confirmé par celui de Grara (2011) qui a rapporté la diminution du taux de lipide en fonction des concentrations croissantes de cadmium. Selon Aourousseau (2002), les radicaux oxygénés libres sont toxiques via la dégradation des lipides dont la β oxydation, comme le suggèrent les travaux de Padjama et Rao, (1994) qui ont mis en évidence une diminution des taux de lipides dans les tissus de *Bellamyia dissimilis* exposés à des pesticides.

Gravato (2006) a signalé que le stress oxydant, et l'effet génotoxique induit par un pesticide chez l'anguille pré exposé au B-naphthoflavone, a montré l'augmentation de lipides peroxydés durant le traitement. Plus récemment Bebouzid (2012) a montré que chez les paramécies traitées par des pesticides le taux de lipides était fortement perturbé, l'auteur

explique ce phénomène la peroxydation lipidique générée par les ROS. Nos résultats sont en parfait accord avec cités ci-dessus puisque nous avons mis en évidence une perturbation du taux des lipides confirmant ainsi la toxicité des deux HEs testés particulièrement aux plus fortes concentrations.

2-2 Variation du taux de protéines totales

* Effet des HEs du *M. pipéríta*

La figure (36) illustre les résultats obtenus quant aux variations du taux de protéines totales chez les paramécies traitées par les différentes doses des HEs du *M. pipéríta*.

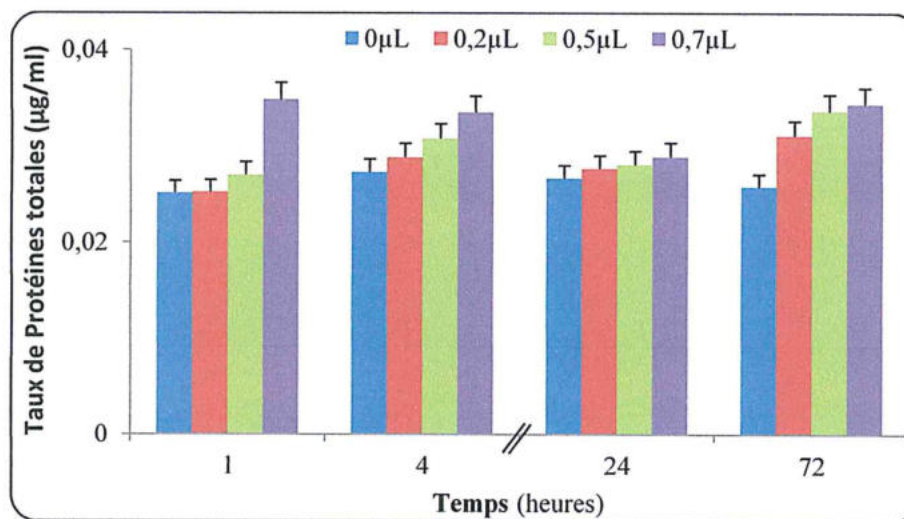


Figure 36: Effet des HEs du *M. pipéríta* sur le taux de protéines totales en fonction du temps.

Nous constatons qu'aux cours de l'exposition des paramécies aux HEs du *M. pipéríta*, le taux de protéines totales évolue de manière significative ($p \leq 0.05$) et dose dépendante par rapport au témoin. En effet après 4h de traitement le taux de protéines totales est d'environ (0,0349 µg/ml) pour 0.7µL/ml et il n'est que de (0,0272 µg/ml) pour les témoins.

* Effet des HEs d'*A. herba-alba*

Les variations du taux de protéines totales chez les paramécies témoins et traitées par les HEs d'*A. herba-alba* sont représentées dans la figure (37).

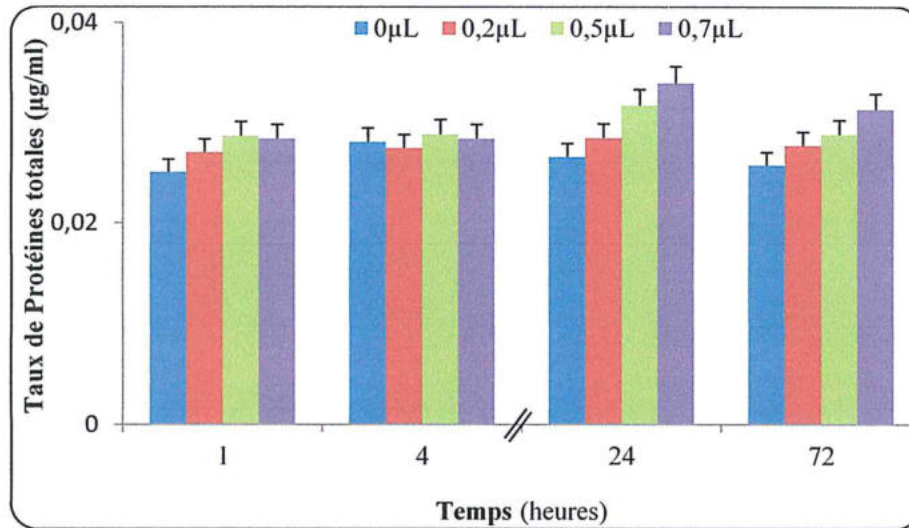


Figure 37 : Effet des HEs d'*A. herba-alba* sur le taux de protéines totales en fonction du temps.

Nous constatons que chez les traités par les HEs d'*A. herba-alba*, le taux de protéines totales augmente de manière dose dépendante et significative ($p \leq 0.05$) par rapport aux témoins. En effet après 24 heures de traitement ce taux passe de 0.026 µg/ml chez les cellules témoins à 0.033 µg/ml pour les cellules traitées avec la dose la plus élevée 0.7 µl/ml.

Partant du principe que tout type de stress chimique peut provoquer une libération de radicaux libres dans l'organisme (Aurousseau, 2002), soumis à un stress exogène, les microorganismes ont la capacité de développer toute une batterie de réponses capables d'enclencher un processus de détoxification, vis-à-vis des xénobiotiques afin de lutter, et/ou de s'adapter face au stress chimique (Perez-Rama, 2001).

Donc une altération des composants cellulaires intervient lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente anormalement. Tous les composants cellulaires peuvent être touchés : lipides, protéines, et donc les membranes dans leur ensemble (Haliwell et Chirico, 1993).

De ce fait l'augmentation du taux de protéines peut être expliquée par l'induction des enzymes de détoxification et de métabolisation. Cette induction est signalée par Massaya et al. (2002) qui ont trouvé une augmentation significative du taux des protéines totales sous

l'effet d'un stress chimique chez des modèles biologiques différents (têtards, protistes ciliés et lapin).

Les protistes sont capables de synthétiser une multitude de protéines et d'enzymes spécifiques à la détoxification leur permettant de maintenir à un niveau suffisamment bas les concentrations intracellulaires de xénobiotique. De nombreuses études confirment le rôle des protéines du stress chez les microorganismes (Massaya et *al.*, 2002; Redouane, 2004).

Nos résultats, sont probablement similaires à ceux de Sbartai et *al.* (2009), qui ont montré que les manifestations toxiques du bifénazate (acaricide) sur la paramécie, sont accompagnées par une induction dose dépendante de la synthèse protéique chez les paramécies, le même effet est constaté après traitement de protistes cilié avec quatre acaricides Chlorfenapyr, Fenazaquin, Fenbutatin oxyde et Tebufenpyrad (Benbouzid, 2007).

Ainsi, Rouabhi et *al.* (2006), Redouane-Salah (2004) et Bebouzid (2012) qui ont mis en évidence une corrélation entre la perturbation du taux de protéines totales et la toxicité des pesticides chez la paramécie, il en est de même pour Grara (2011) qui a mis en évidence une forte perturbation du taux de protéines chez des escargots traités par des métaux lourds. Plus récemment Bebouzid (2012) a montré que chez les paramécies traitées par des pesticides le taux de protéines était fortement perturbé.

2-3 Effet des HEs sur le métabolisme respiratoire des paramécies

La respiration des paramécies se fait par des échanges gazeux avec l'environnement exclusivement par la surface corporelle car présentant un rapport surface / volume donc surface / masse corporelle élevé (Wehner et Gehring, 1995).

* Effet des HEs du *M. pipéríta*

La figure (38) met en évidence l'effet des HEs de *M. pipéríta* sur le taux d'oxygène consommé ($\mu\text{mole/mole}$) par les paramécies en fonction du temps.

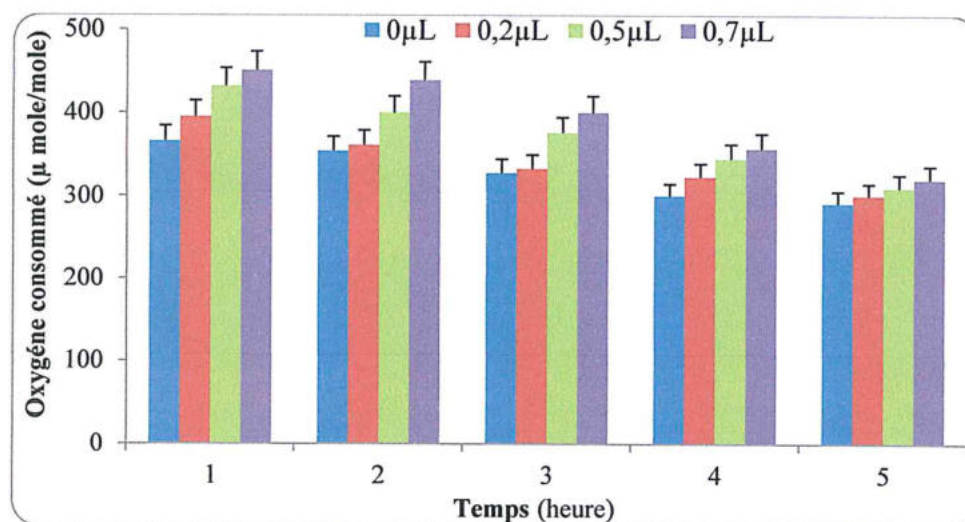


Figure 38: Effet des HEs du *M. pipéríta* sur le métabolisme respiratoire des paramécies en fonction du temps.

Nous constatons que le traitement par les HEs du *M. pipéríta* aux différentes doses stimule la consommation d'oxygène particulièrement à la plus forte dose (0.7 $\mu\text{l/ml}$) ou nous notons une consommation de 451 μmoles d' O_2 ce qui correspond d'environ 23.22 % de la consommation d' O_2 par rapport au témoin.

* Effet des HEs d'*A. herba-alba*

La figure (39) illustre l'effet des HEs d'*A. herba-alba* sur le métabolisme respiratoire des paramécies en fonction du temps.

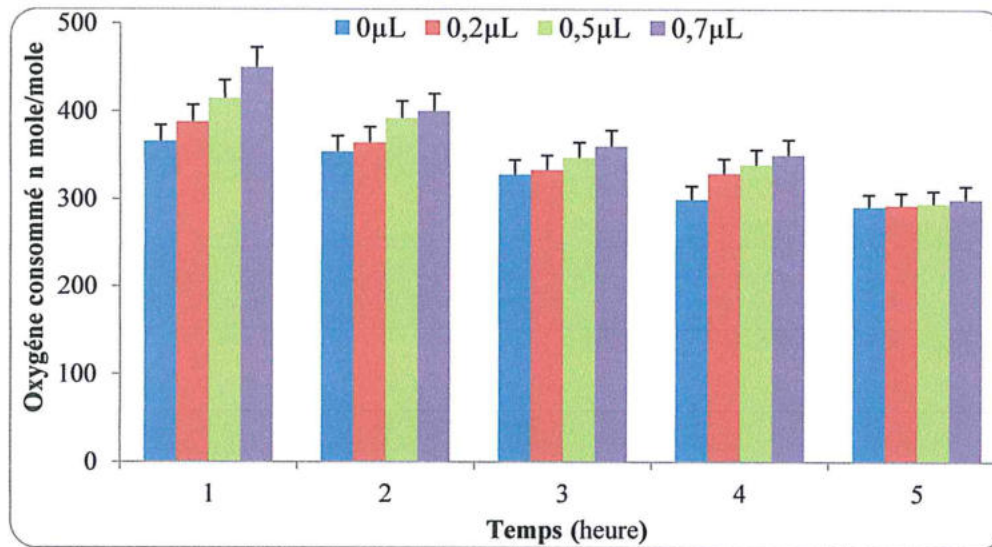


Figure 39 : Effet des HEs d'*A. herba-alba* sur le métabolisme respiratoire des paramécies en fonction du temps.

Entre 1h et 5h de traitement, nous constatons une stimulation de l'activité respiratoire, et ce pour toutes les doses des HEs d'*A. herba-alba*, testées.

Cette stimulation de l'activité respiratoire observée chez les paramécies traitées par les deux HEs serait peut être due à l'induction d'une voie alternative (Olaya et *al.*, 1998), permettant aux paramécies de croître à des doses élevées de xenobiotique.

D'après Vanlerberghe (2004) et Azouz (2012) l'enzyme clef de cette voie est l'oxydase alternative (AOX) caractéristique des végétaux et qui existe chez les protistes et certains animaux (Sluse et Jarmuszkievicz, 1998 ; McDonald et Vanlerberghe, 2004).

Les caractéristiques biochimiques des AOX des microorganismes sont très différentes de celles des plantes. Les nucléotides puriques, tels que AMP, ADP, GMP et IMP, ont montré une activité stimulante de l'AOX de *Moniliella tomentosa* (Vanderleyden et *al.*, 1980) *Neurospora crassa* (Vanderleyden et *al.*, 1980b), *Paramecium tetraurelia* (Doussiere et Vignais, 1984) et *Hansenula anomala* (Sakajo et *al.*, 1997).

Plusieurs études ont montré que l'expression des gènes de l'AOX est induite par les inhibiteurs de la respiration et les ROS tel que l' H_2O_2 et les radicaux superoxydes (Huh et Kang, 2001). L'induction des AOX par les ROS contribue à l'hypothèse qui implique les AOX dans le mécanisme de défense antioxydante par le maintien du pool ubiquinone suffisamment oxydé par l'empêchement de l'autoxydation des ubiquinones réduits et la formation ultérieure des ROS, quand le flux d'électrons à travers la voie du cytochrome

devient limité (Wagner et Moore, 1997). Tous ces travaux confortent nos résultats en effet nous avons mis en évidence une stimulation du métabolisme respiratoire des paramécies particulièrement aux fortes doses des HEs étudiées.

CHAPITRE V

STRESSE OXYDANT

Introduction

D'une manière générale, le stress oxydant est le résultat d'un déséquilibre entre la balance des pro-oxydants et les systèmes de défense ou antioxydants, avec comme conséquence, l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule (Sies, 1991).

Dans les conditions physiologiques, l'oxygène produit en permanence au niveau de la mitochondrie des espèces oxygénées activées (EOA) particulièrement toxiques pour l'intégrité cellulaire. Ces EOA, dont font partie les radicaux libres, sont dotées de propriétés oxydantes et peuvent entraîner l'oxydation des macromolécules telles que l'ADN (Vaughan, 1997).

La production des EOA est strictement régulée par l'organisme qui développe des systèmes de défenses antioxydants pouvant protéger la cellule contre les effets potentiellement destructeurs. Ces systèmes se composent d'enzymes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydases...), de protéines transporteuses, de molécules antioxydantes de petite taille (glutathion, acide urique, bilirubine, glucose, vitamines A, C, E, ubiquinone, caroténoïdes, flavonoïdes) et d'oligo-éléments (cuivre, zinc, sélénium) indispensables pour l'activité des enzymes antioxydantes (Azouz, 2012).

L'objectif de cette partie est d'une part mettre en évidence l'induction d'un stress oxydant et d'autre part d'étudier les effets du stress oxydant induit par les HEs dans le but de déterminer les mécanismes enzymatiques impliqués. Et ce à travers le suivi de l'évolution de certains biomarqueurs de la toxicité tels que le glutathion (GSH), l'activité GST, APX, l'activité CAT et le taux de malondialdéhyde (MDA) pour l'évaluation de la toxicité potentielle des deux HEs testés.

I- Matériel et méthodes

1- Dosage du glutathion (GSH)

Le principe de ce dosage repose sur la mesure de la densité optique (à une longueur d'onde de 412 nm) de l'acide 2-nitro-5-mercapturique. Ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5,5-dithio-2-nitrobenzoïque (réactif d'Ellman ou DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Une fois préparé, l'homogénat doit subir une déprotéinisation par l'acide sulfosalicylique à 0.25% afin de protéger les groupements (-SH) du glutathion (Weeckbeker et Cory, 1988). Le taux du glutathion est estimé selon la formule suivante :

$$X = \frac{\Delta D_o}{13,1} \times \frac{V_d}{V_h} \times \frac{V_t}{V_s} \quad / \quad \text{mg de protéines}$$

X : Micromoles de substrat hydrolysé par mg de protéines ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines).

ΔD_o : Différence de la Densité Optique obtenue après hydrolyse du substrat.

13,1 : Coefficient d'extinction molaire concernant le groupement thiol ($-\text{SH}$).

V_d : Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation : 1 ml [0,2 ml ASS + 0,8 ml homogénat].

V_h : Volume de l'homogénat utilise dans la dépoétisation : 0,8 ml

V_t : Volume total dans la cuve : 1,525 ml [0,5 ml surnageant + 1 ml tris/EDTA + 0,025 ml (DTNB)].

V_s : volume du surnageant dans la cuve : 0,5 ml.

2- Mesure de l'activité GST (glutathion S-transférase)

La mesure de l'activité de la GST consiste à fournir à l'enzyme un substrat (en général du chlorodinitrobenzène (CDNB)), qui réagit facilement avec de nombreuses formes du glutathion. La réaction catalysée par la conjugaison de ces deux produits entraîne la formation d'une nouvelle molécule, qui absorbe la lumière à une longueur d'onde de 340 nm. Il est possible de quantifier cette absorption au moyen d'un spectrophotomètre toutes les minutes, pendant 5 minutes. La valeur de la DO mesurée est directement proportionnelle à la quantité de conjugué formée, elle-même liée à l'intensité de l'activité GST (Habig et *al.*, 1974). L'activité est déterminée d'après la formule suivante :

$$X = \frac{\Delta D_o / \text{mn}}{9,6} \times \frac{V_t}{V_s} \quad / \quad \text{mg de protéines}$$

X : micromole de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines).

ΔD_o : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.

9,6 : coefficient d'extinction molaire du CDNB.

V_t : volume total dans la cuve : 1,4 ml [0,2 ml surnageant + 1,2 ml du mélange CDNB/GSH].

V_s : volume du surnageant dans la cuve : 0,2 ml.

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

3- Mesure de l'activité Ascorbate-peroxydases (APX) :

La mesure spectrophotométrique de l'activité ascorbate-peroxydase est réalisée suivant le protocole adopté par Nakano et Azada (1987).

Le volume réactionnel final de 3ml contient : 100µl d'extrait enzymatique, (50Mm NaK, 0.5mM ascorbate, pH= 7.2) la lecture est effectuée à 290 nm pendant 1 minute et ce pour un coefficient d'extinction lineique molaire, de $\epsilon = 2800M^{-1}.cm^{-1}$.

4- Mesure de l'activité Catalase (CAT) :

La mesure de l'activité Catalase (CAT) est déterminée selon la méthode de Regoli et Principato (1995) dont le principe repose sur la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à une longueur d'onde de 240nm. L'activité Catalase (CAT) est exprimée en µmol d'H₂O₂ par minute et par mg de protéines selon la formule suivante :

$$X \text{ (}\mu\text{mol /mn /mg prot)} = \frac{(\Delta DO \times 10)}{\epsilon \times L \times 0,05 \times \text{mg de protéine}}$$

X : µmoles de H₂O₂ consommées par minute et par mg de protéines

Δ Do : Différence de la Densité Optique obtenue après hydrolyse du substrat.

ε : Le coefficient d'extinction est de 0,0040 m M⁻¹. Cm⁻¹

L : Longueur de la cuve utilisée (1cm).

5- Dosage du malondialdéhyde (MDA) :

Ce dosage est réalisé selon la méthode de Draper et Hadley (1990), il est basé sur la mesure colorimétrique de la réaction entre l'acide thiobarbiturique (TBA) et le malondialdéhyde (MDA) donnant un produit rouge brun dont l'intensité est mesurée à une longueur d'onde de 532nm. Le taux de l'MDA est réalisé selon la formule suivante:

$$X = \frac{\Delta DO \times Vt}{156 \times Vs} / \text{mg de protéines}$$

X : micromole de substrat hydrolysé par mg de protéines (µM /mgP).

Δ DO : différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.

156: coefficient d'extinction molaire du TBA.

Vt: volume total dans la cuve : 1ml (volume total du butanol récupéré renfermant les complexes TBA/MDA).

Vs: Volume du surnageant utilisé dans le dosage : 0.5 ml.

6- Analyse statistique:

Le test statistique réalisé dans cette partie est l'ANOVA, il s'agit de l'analyse de variance à trois facteurs contrôlés et ce en fonction du temps, plantes et des doses utilisées. L'ANOVA permet d'effectuer des tests de comparaisons multiples afin d'expliquer les différences entre les moyennes.

2- Resultats et Discussion

2-1 Effet des HEs sur le taux de GSH

* Effet des HEs du *M. pipéríta*

L'évolution du taux de glutathion chez les paramécies traitées avec les doses croissantes des HEs du *M. pipéríta* est illustrée dans la figure (40).

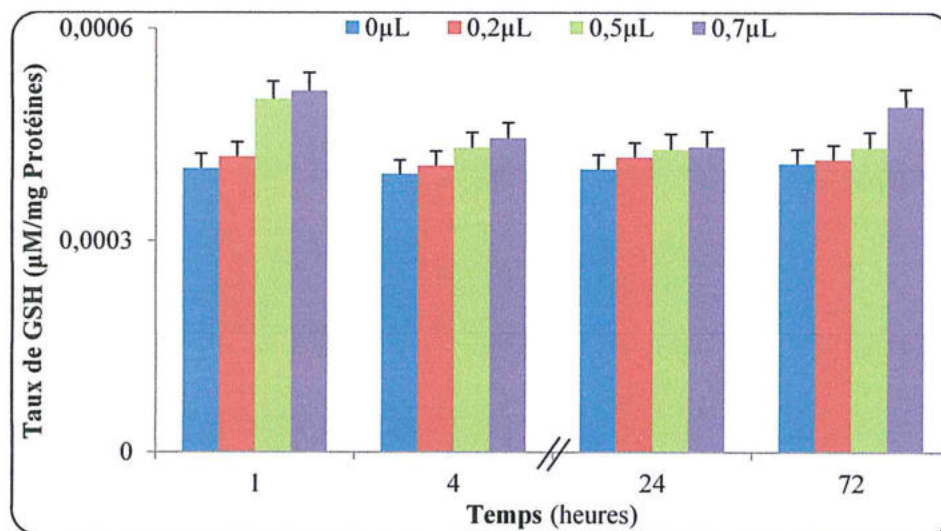


Figure 40 : Effet des HEs du *M. pipéríta* sur le taux de GSH en fonction du temps.

Nous remarquons que le taux de GSH tend à augmenter d'une manière dose dépendante par rapport aux témoins. Ainsi après une heure de traitement, le taux de GSH atteint 5.12×10^{-4} $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines avec la plus forte dose ($0.7 \mu\text{L}/\text{ml}$) alors qu'il est de 4.10×10^{-4} $\mu\text{M}/\text{mg}$ avec la dose la plus faible ($0.2 \mu\text{L}/\text{ml}$).

* Effet des HES d *A. herba-alba*

Dans la figure (41) nous avons représenté les variations des taux de GSH obtenues chez les paramécies traitées par les différentes doses des HES d'*A. herba-alba* en fonction du temps.

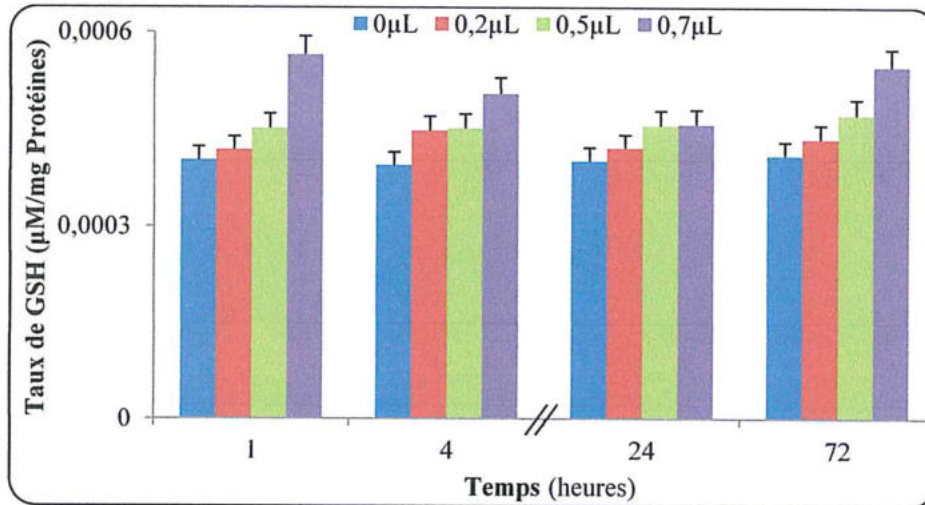


Figure 41 : Effet des HES d'*A. herba-alba* sur le taux de GSH en fonction du temps.

On remarque que le taux de GSH chez les traités par les HES d'*A. herba-alba* augmente d'une manière dose dépendante et significative ($p \leq 0.05$) pendant les 3 jours de traitement.

Après une heure de traitement avec les HES d'*A. herba-alba*, nous constatons une augmentation du taux de glutathion particulièrement pour la dose (0,7µL/ml) avec un taux de 5.65×10^{-4} µM/mg de protéines par apport aux témoins 4.03×10^{-4} µM/mg de protéines.

Le glutathion est un tripeptide qu'on trouve en concentration assez élevée dans les cellules animales et végétales (Wu et al., 2004). Le glutathion se trouve dans le cytosol en concentration élevée, le reste étant localisé dans les mitochondries, le noyau et les peroxyosomes (Lu, 2000).

Grâce à la fonction thiol de la cystéine, le glutathion joue un rôle très important dans le maintien de l'état réduit de la cellule (Kizek et al., 2004). Cette fonction thiol peut aussi fixer des fonctions électrophiles et sert donc à la détoxification. Une déficience en GSH expose les cellules à un risque oxydatif (Drögue, 2002). En effet, le GSH élimine les xénobiotiques par conjugaison.

Finalement, le GSH augmente d'une manière significative ($p \leq 0.05$) à partir d'une heure. Ceci est en parfait accord avec les travaux de Sbartai et *al.*, (2008) qui ont rapporté l'induction de la GSH dès les premières heures de traitement par le cadmium chez les racines de tomates. De mêmes résultats ont été rapportés par Grara et *al.*, (2009) qui ont travaillé sur l'effet des poussières métalliques sur des escargots pulmonés *Helix aspersa*.

Il semble que pour les fortes doses entre 4 et 24h de traitement, les systèmes en question sont dépassés avec une déplétion en GSH, ceci est en parfait accord avec les travaux de Chaoui et *al.*, (1997) et Cho et Park, (2000).

Tous ces travaux abondent dans le même sens que nos résultats, confirmant ainsi le rôle du GSH dans la défense de l'organisme.

2-2 Effets des HES sur l'activité glutathion S-transférase

* Effet des HES du *M. pipéríta*

Les données obtenues après dosage de l'activité GST exprimées en $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines mesurée au niveau des cellules de paramécies sont regroupées dans la figure (42).

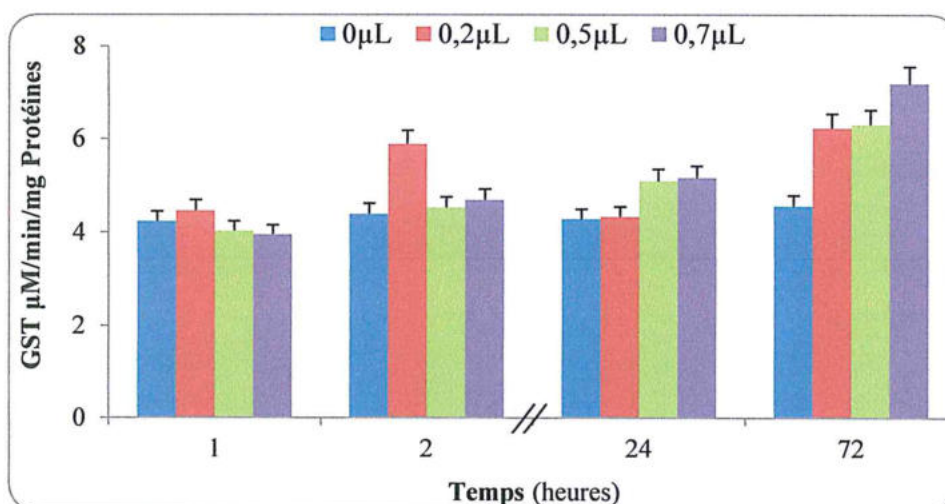


Figure 42 : Effet des HES du *M. pipéríta* sur l'activité GST en fonction du temps.

La figure (42) représente les variations de l'activité GST observées chez les paramécies traitées avec des doses croissantes d'HEs. Après une heure de traitement nous remarquons, une induction de l'activité glutathion S-transférase avec la dose 0.2 $\mu\text{l/ml}$ par rapport aux témoins.

Aux temps 2h et 72h, nous constatons une induction de l'activité GST chez les cellules traitées par les différentes doses des HEs cette stimulation est dose dépendante et hautement significative ($p \leq 0.01$).

* Effet des HES d *A. herba-alba*

Dans la figure (43) nous avons représenté les variations après dosage de l'activité GST exprimées en $\mu\text{moles/min/mg}$ de protéines obtenus chez les paramécies traitées par les différentes doses des HEs.

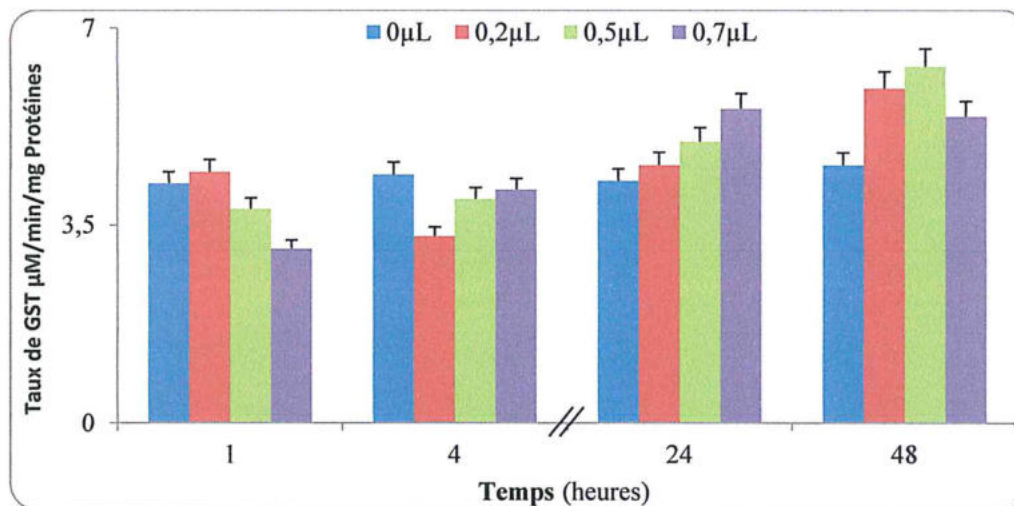


Figure 43 : Effet des HES d'*A. herba-alba* sur l'activité GST en fonction du temps.

Après une heure de traitement nous remarquons, une diminution dose-dépendante de l'activité glutathion S-transférase semble apparaître chez les cellules traitées par les différentes doses des HEs d'*A. herba-alba* cette stimulation est dose dépendante.

Dès 24 h de traitement, une augmentation significative de l'activité GST est observée, et ce pour toutes les doses des différentes HEs étudiées.

Nos résultats sont en accord avec les travaux de Ringwood et *al.*, (1999); Brigelius-Flohe, (1999) et Roche et *al* (2003). Les GST ont été mises en évidence chez la plupart des êtres vivants tels que la levure (Foley et Sheehan, 1998), les mollusques (Blanchette et Singh,

1999), les vers de terre (Borgeraas *et al.*, 1996), les crustacés (Leblanc et Cochrane, 1987), les insectes (Prapanthadara *et al.*, 1996), les poissons (George et Young, 1988; Pérez-López *et al.*, 2000), les mammifères (Rouimi *et al.*, 1996; Bolton et Ahokas, 1997) et les plantes (Hong *et al.*, 1999). L'intérêt pour les GSTs provient de leur participation dans la voie de biosynthèse des acides mercapturiques, molécules solubles dans l'eau et facilement excrétées par l'organisme. La réaction de conjugaison entre le GSH et les xénobiotiques représente en effet la première des quatre étapes menant à leur formation. (Beckett et Hayes, 1993).

D'après Beckett et Hayes (1993), la GST fait partie des enzymes de la phase II, son rôle essentiel est de conjuguer un groupement hydrosoluble à un xénobiotique préalablement métabolisé ou non par les enzymes de la phase I afin de le rendre lui-même plus hydrosoluble et donc plus facilement excrétable par l'organisme.

La principale activité catalytique des GSTs est de faciliter la formation ou la stabilisation de l'anion thiolate. Celui-ci peut ensuite attaquer le centre électrophile (atome de carbone, d'oxygène, de soufre ou d'azote) d'un autre substrat. Le composé résultant est un conjugué thioéther (Beckett et Hayes, 1993 ; Armstrong, 1991).

Outre leur capacité à former des conjugués thioéthers avec le GSH, les GSTs peuvent également catalyser d'autres réactions telles que la lyse des groupements thiols, la réduction d'hydroperoxydes organiques (réaction de type peroxydase). (Van Bladeren, 1988).

Les GSTs peuvent détoxifier un large spectre de xénobiotiques initialement électrophiles ou devenus électrophiles après métabolisation. En fin les GSTs sont capables de conjuguer les époxydes et leurs dérivés et constituent donc un système essentiel de protection (Hinson et Kadlubar, 1988).

Pour Milner, 2001, l'huile essentielle d'ail, par exemple, est une bonne source de composés sulfurés (Pyun *et al.*, 2006) reconnus pour leur effet préventif contre le cancer. Le diallyl sulfide, diallyl disulfide et le diallyl trisulfide en sont des exemples. Ces composés activent, chez le rat, les enzymes intervenant dans le processus de détoxification hépatique de phase I (désagrégation des liaisons chimiques qui relient les toxines carcinogènes les unes aux autres) et de phase II (liaisons des toxines libérées à des enzymes détoxifiantes telle la glutathione S-transférase) (Wu *et al.*, 2002). Il en est de même pour la myristicine, un allylbenzène présent dans certaines huiles essentielles, spécialement celle de noix de muscade (*Myristica fragrans*). Cette molécule est connue pour activer la glutathione S-transférase chez

la souris (Ahmad et *al.*, 1997) et inhiber la carcinogénèse induite par le benzo(a)pyrène au niveau des poumons de la souris (Zheng et *al.*, 1992). Récemment, il a été découvert que la myristicine induit l'apoptose des neuroblastomes (SK-N-SH) chez l'humain (Lee et al., 2005).

Dans notre travail l'induction de l'activité GST suggère que les paramécies synthétisent davantage de glutathion pour limiter l'oxydation des composés cellulaires.

La réduction du taux de GSH peut être expliquée par les réactions de réduction des espèces activées de l'oxygène et des lipides hydroperoxydés catalysées par les glutathion peroxydases et par l'utilisation massive de ce dernier par la GST dans les réactions de conjugaison. Bien que certains intermédiaires réactifs se conjuguent spontanément au GSH, la majeure partie de ces réactions est catalysée par la GST (Azouz, 2012).

2-3 Effets des HES sur l'activité APX

* Effet des HES du *M. pipéríta*

L'effet des HES du *M. pipéríta* sur l'activité APX chez les paramécies traitées est illustré dans la figure (44).

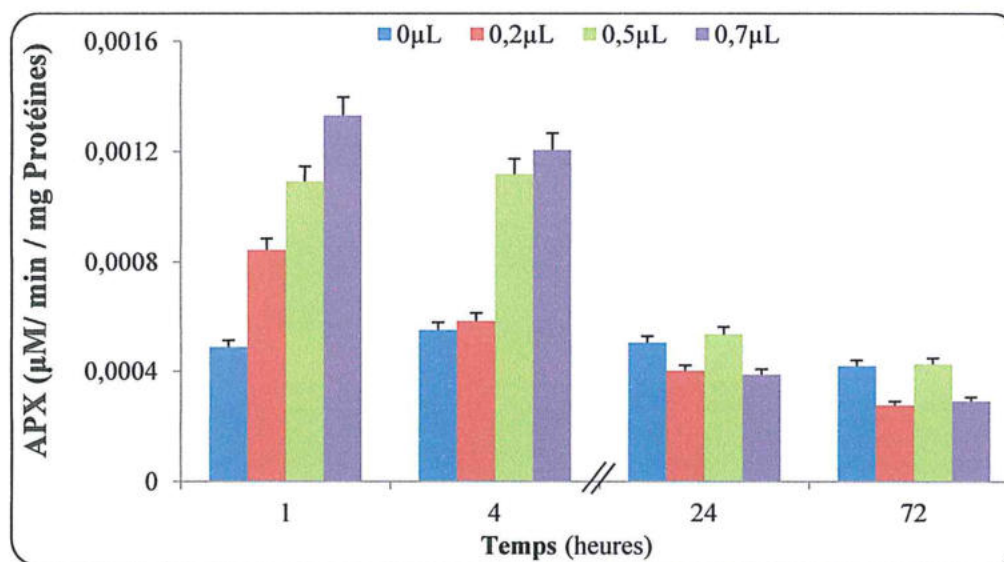


Figure 44 : Effet des HES du *M. pipéríta* sur l'activité APX en fonction du temps.

Nos résultats montrent que les HES du *M. pipéríta* induisent une augmentation significative ($P \leq 0.05$) de l'activité APX chez les paramécies traitées par rapport aux témoins et ceux après 1 h et 4 h de traitement. Ainsi, pour la plus forte dose par exemple, l'activité de cette enzyme est de l'ordre de $1.33 \cdot 10^{-3}$ après une heure de traitement, alors qu'elle n'est que de $0.48 \cdot 10^{-3}$ pour les témoins. Après 24 heures, on remarque une diminution de l'activité APX par rapport aux témoins. Ainsi, après 72h, l'activité APX est de $0.29 \cdot 10^{-3}$ chez les traités à la plus forte dose alors qu'elle est de $0.42 \cdot 10^{-3}$ chez les témoins.

* Effet des HES d *A. herba-alba*

Dans la figure (45) nous avons représenté les variations après dosage de l'activité APX exprimées en $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines obtenus chez les paramécies traitées par les différentes doses des HES d *A. herba-alba*.

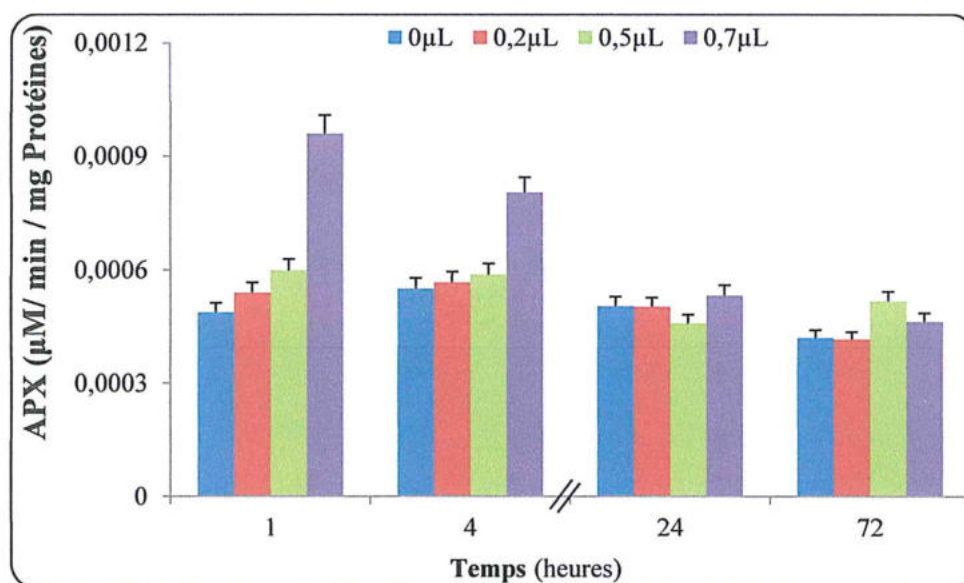


Figure 45: Effet des HES d'*A. herba-alba* sur la variation de l'activité APX en fonction du temps.

Nous remarquons une stimulation dose-dépendante que l'activité APX et ce par rapport aux témoins. Après 24 heures de traitement l'activité APX des traitées est équivalente à celle des témoins $0.5 \cdot 10^{-3}$.

L'APX est une enzyme clé dans le système de détoxification cellulaire, elle protège la cellule contre les dommages oxydatifs causés par le H_2O_2 toxique. Selon Ammar et *al.*

(2008) ; Dixit et *al.* (2001), les variations de leurs activités respectives sont directement liées à leur rôle dans l'élimination de l' H_2O_2 .

Nos résultats sont comparables à ceux obtenus par Rucinska et *al.* (1999); Gallego et *al.* (2002) et Mediouni et *al.* (2009), nous avons mis en évidence une induction de l'activité APX en présence des HES. Cet effet pourrait s'expliquer par le fait que l'APX réduit le peroxyde d'hydrogène en eau en utilisant l'Ascorbate comme donneur d'électron. Il sera recyclé en Ascorbate par le biais du GSH comme donneur d'électron et le Gluthation oxyde (GSSG) est converti en GSH par la NADPH qui dépend de la Gluthation réductase. Selon Asada et Takahashi, (1987), ou ceux de Khaldi et *al.* (2009) ont mis en évidence l'augmentation de l'activité APX chez des lichens (*Ramalina farinacea*) traitées par des engrais (NPKs). Il en est de même des travaux de Prasad et *al.* (1999) et qui ont mis en évidence une induction de cette enzyme chez les lichens soumises à un stress chimique. (Gallego et *al.*, 2002; Mediouni et *al.*, 2009).

2-4 Effets des HES sur l'activité catalase

* Effet des HES du *M. pipéríta*

Dans la figure (46) nous avons représenté les résultats des variations de l'activité catalase obtenus chez les paramécies traitées par les différentes doses des HES.

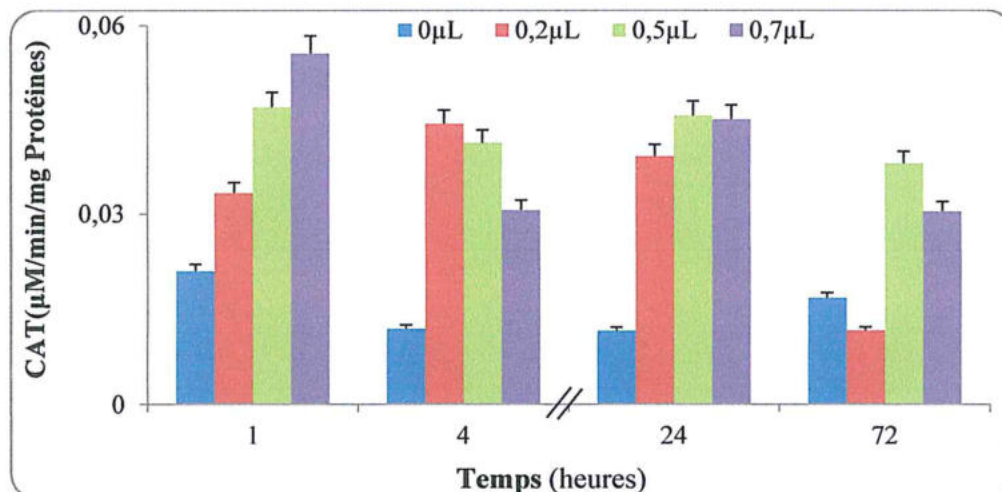


Figure 46 : Effet des HES du *M. pipéríta* sur la variation de l'activité catalase en fonction du temps.

Nos résultats montrent qu'après 1h de traitement avec les HES du *M. pipéríta*, l'activité CAT augmente d'une manière significative ($P \leq 0.05$). Ainsi après 72 h de traitement avec la

plus forte dose 0.03 ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ Protéines) nous remarquons une augmentation de l'activité catalase par rapport au témoin 0.016 ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ Protéines).

* Effet des HEs d'*A. herba-alba*

Dans la figure (47) nous avons représenté les résultats des variations de l'activité catalase chez les paramécies traitées par les différentes doses des HEs d'*A. herba-alba*.

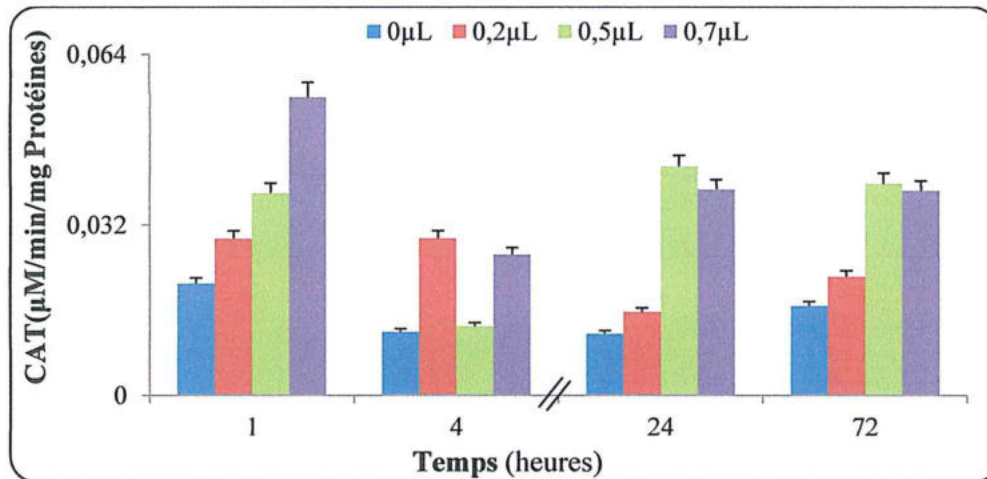


Figure 47 : Effet des HEs d'*A. herba-alba* sur l'activité catalase en fonction du temps.

Nos résultats montrent, une induction dose dépendante de l'activité catalase est à noter, dont le maximum est observé au temps 1h avec la valeur (0,056 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protéines), par rapport aux témoins (0,021 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protéines). Ainsi après 72h de traitement l'activité catalase est de l'ordre de 0,038 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protéines avec la plus forte dose alors qu'elle n'est que de (0,016 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protéines) chez le témoin.

Parmi les enzymes impliquées dans les systèmes de détoxification, la Catalase occupe une place de choix. En effet cette enzyme apparait dans les premières lignes de défense contre les radicaux libres. Le caractère transitoire de cette stimulation des activités enzymatiques sous l'effet des HEs nous laisse penser que des systèmes cellulaires de défense ont pu être mis en place. Ceci supposerait donc que les paramécies ont réussi à gérer le stress oxydatif (par réactivation des enzymes initialement perturbées ou par induction de la synthèse de nouvelles unités enzymatiques).

Azzouz (2012) a mis en évidence une forte induction de l'activité CAT chez *Paramecium tetraurelia*, traitées avec deux pesticides : Amistar Xtra et le Glyphosate, il en est de même pour les travaux de Benbouzid (2012) qui ont aussi démontré une induction de l'activité

Catalase chez ce même modèle biologique suite à un traitement avec des phényl phosphoramidates.

De ce fait, nos travaux confirment ceux cités ci-dessus puisque nous avons également mis en évidence une augmentation de l'activité Catalase chez les paramécies traitées par les doses croissantes des HEs des deux plantes étudiées confirmant ainsi la toxicité des deux xénobiotiques particulièrement aux fortes doses.

Nos résultats sont en parfait accord avec ceux de Tripathi et *al.*, (2006), qui rapportent une induction de l'activité catalase chez des algues (*Scenedesmus sp.*) exposées à des concentrations de cuivre à court et à long terme (6 h - 7j). Ce qui conforte nos résultats confirmant ainsi encore une fois l'induction de la catalase dès les premières heures de traitement par les HEs chez les protistes étudiés.

Cependant, Luna et *al.* (1994) ont montré que le niveau accru de ROS suite à l'exposition des feuilles d'avoine à des doses élevées de Cu^{+2} inhibait les activités de la CAT et APX. De mêmes résultats ont été rapportés par Mediouni et *al.*, (2009), Grara et *al.*, (2009), Stephensen et *al.* (2000).

2-5 Effets des HES sur l'activité MDA

* Effet des HES du *M. pipéríta*

Les données obtenues après dosage de taux de MDA exprimées en $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines mesuré au niveau des cellules de paramécies sont regroupées dans la figure (48).

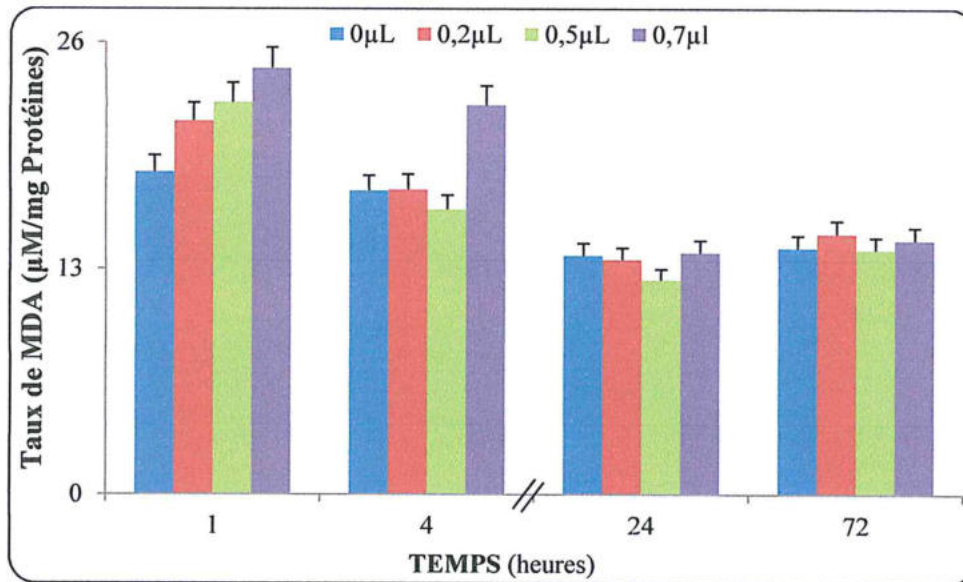


Figure 48 : Effet des HES du *M. pipéríta* sur l'activité MDA en fonction du temps.

Une induction dose-dépendante et significative ($p < 0.05$) du taux de MDA semble apparaître chez les cellules traitées par les différentes doses des HES de *M. pipéríta* après 1 h et 4 h de traitement.

* Effet des HES d *A. herba-alba*

L'effet des HES d'*A. herba-alba* sur l'activité MDA chez les paramécies traitées est illustré dans la figure (49).

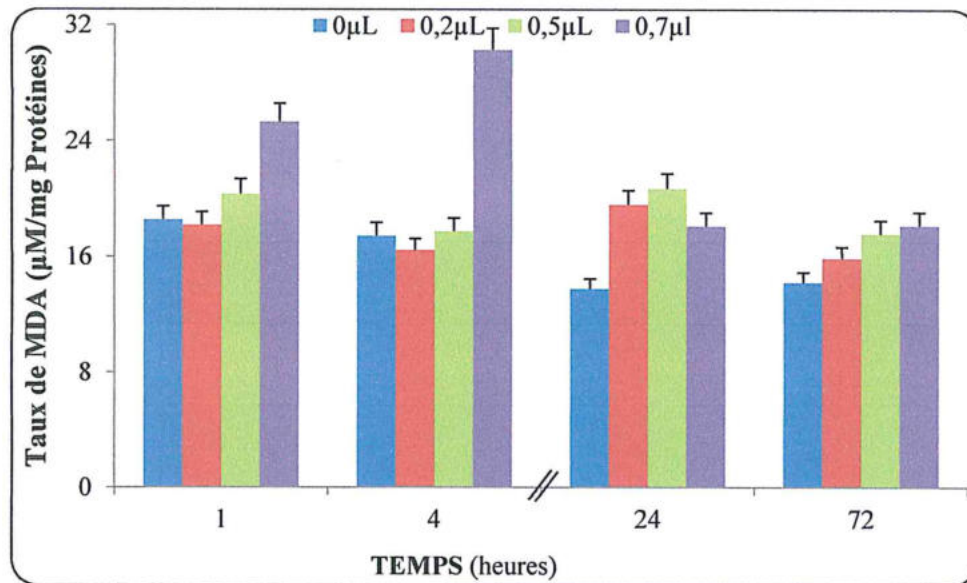


Figure 49 : Effet des HEs d'*A. herba-alba* sur la variation de l'activité MDA en fonction du temps.

Nous remarquons entre 1h et 72h de traitement, une induction dose-dépendante et significative ($p < 0.05$) de l'activité MDA chez les cellules traitées par les différentes doses des HEs d'*A. herba-alba* par rapport au témoin.

Lorsque des organismes vivants sont soumis à des fluctuations dans leur environnement, ils subissent un stress intense, provoquant une batterie de réponses, via l'activation d'une cascade de mécanismes de détoxification, afin de survivre ou de s'acclimater à ce changement (Lagadic et al., 1997). L'utilisation de biomarqueurs pertinents peut s'avérer très utile pour déterminer des réponses biologiques à ces expositions.

Dans notre travail nous nous sommes intéressés à la réponse des paramécies vis-à-vis d'un stress oxydatif, via le suivi des mécanismes de défense spécifiques à ce type de toxicité ou encore le cas échéant par la mise en évidence d'un stress oxydatif au niveau cellulaire et ce à travers le suivi de l'évolution de biomarqueurs spécifiques de la destruction de la membrane par les radicaux oxygénés et qui sont les MDA.

Notre intérêt s'est porté sur l'évolution du taux de MDA, car ces molécules lorsqu'elles sont abondantes dans le milieu intracellulaire rendent compte d'une toxicité spécifiques aux radicaux libres.

Dans ce travail, nous avons mis en évidence une augmentation de MDA en présence des deux xénobiotiques testés. Nos résultats confirment ceux de Recknagel et Turocy (1977) qui a

démontré que les produits dérivés d'une fonction oxydative microsomale, sont très toxiques pour les cellules de *Paramecium multimicronucleatum*, Sbartai (2013) et Djekoun et al (2012) ont mis en évidence une augmentation du taux de MDA chez respectivement *Paramecium sp* et *Sacharomyces cerivisiae*.

Selon Pampanin et al., (2005) l'augmentation du taux de Malondialdéhyde indique une peroxydation lipidique, cette dernière est suivie de changements et d'une dégradation des structures membranaires, Il s'ensuit une perte des récepteurs et des enzymes de la membrane. Ainsi la peroxydation lipidique est une source endogène des dommages de l'ADN (Marnett, 2002) et l'accumulation des produits de la peroxydation lipidique constitue le marqueur biochimique le plus commun du stress oxydatif. (Chen et al., 2005).

CONCLUSION ET GENERALE ET PERSPECTIVES

Les huiles essentielles sont des métabolites secondaires. Leur connaissance remonte à fort longtemps puisque l'homme préhistorique pratiquait déjà, à sa manière. Elles ont, à toutes époques, occupé une place importante dans la vie quotidienne des hommes qui les utilisaient autant pour se parfumer que pour aromatiser sa nourriture.

Progressivement, ses HES se font connaître pour leurs vertus thérapeutiques et deviennent alors des remèdes courants des médecines traditionnelles. Pour tenter de trouver de nouveaux remèdes, la communauté scientifique s'est récemment tournée vers les constituants des huiles essentielles, car un nombre non négligeable de composés volatils, tels que les sesquiterpènes, ont montré des activités pharmacologiques remarquables contre les maladies comme le cancer. Le thymol, par exemple, est employé en soins dentaires pour ses propriétés antiseptiques ou encore l'eugénol pour ses propriétés analgésiques. En effet, de nombreux composés volatils sont aujourd'hui des ingrédients courants des préparations pharmaceutiques.

En réalité certaines huiles essentielles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leur pouvoir irritant (huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde ou phototoxique (huiles de citrus contenant des furocoumarines). Les cétones comme l' α -thujone sont particulièrement toxiques pour les tissus nerveux. Certains HES peuvent induire des cancers, c'est le cas par exemple de dérivés d'allylbenzènes ou de propénylbenzènes comme le safrole (Sassafras), l'estragole (*Artemisia dracunculus*), le β -asarone (*Acorus calamus*) et le méthyl-eugénol. Le safrole et l'estragole, sont métabolisés par les microsomes des rats et des souris en dérivés hydroxylés puis en esters sulfuriques électrophiles qui eux sont capables d'interagir avec les acides nucléiques et les protéines. En plus, présent dans de nombreuses huiles essentielles, le camphre est connu pour être potentiellement mortel à doses élevées.

C'est dans cette optique que se situe notre travail qui consiste en la mise en évidence de la toxicité potentielle de deux HES extraites par hydrodistillation de plantes couramment utilisées (*Mentha pipérta* et *Artémisia herba-alba*) et collectées de la région de l'est d'Algérie, sur un modèle biologique unicellulaire d'eau douce considéré également -et à juste titre- comme bioindicateur de la toxicité (*Paramecium sp*) et surtout comme modèle alternatif.

Pour arriver à l'objectif assigné à ce travail qui est l'étude de l'effet toxique des huiles essentielles sur *Paramecium sp* nous avons essayé d'étudier :

- Dans une première approche, le suivi de la cinétique d'extraction qui a montré que la quasi-totalité de l'huile essentielle est extraite au bout de la première heure. En plus l'extraction montre que la Menthe poivrée est plus riche en huiles essentielles par rapport à l'Armoise blanche. La différence entre les rendements en HES peut être associée au stade de développement des plantes collectées.

- Dans une deuxième approche, les analyses physico-chimiques de nos HES restent toujours dans les normes. L'analyse de la composition des HES par CPG a permis de calculer le nombre des composants de chaque HES nous avons mis en évidence la présence de nombreux composants ce qui explique l'intensité des effets.

L'évaluation des effets cytotoxiques d'un xénobiotique peut être réalisée en utilisant différents paramètres, parmi lesquels la croissance cellulaire qui reflète chez les microorganismes l'état du métabolisme de la cellule.

À la manière des agents chimiques, on distingue deux sortes d'effets des HES sur les microorganismes: une activité létale et une inhibition de la croissance. Nos résultats montrent que les HES inhibent la croissance des protistes de manière dose dépendante. Une réduction du nombre des paramecies est également notée en présence des HES étudiées probablement due à leurs richesses en terpènes qui inhibent la croissance.

Cet effet d'inhibition des HES sur la croissance des paramecies pourrait être expliqué par une dénaturation des protéines provoquée par le rôle solvant et déshydratant des huiles, certainement en raison d'un effet sur la bicouche lipidique de la cellule cible grâce à sa propriété hydrophobe, ce qui entraîne une perturbation de la perméabilité et perte des constituants de la cellule.

2 L'activité enzymatique

Nous avons également mis en évidence une augmentation des activités enzymatiques confirmant leur implication dans la métabolisation des HES et par là même la présence de ROS conduisant à une peroxydation lipidique bien mise en évidence par l'augmentation du taux de MDA.

Il est également important de signaler la variabilité de l'effet entre les doses, ce qui suggère un effet sélectif des HES qui dépend fortement de la composition de chaque extrait. A

la fin et d'après nos résultats qui confirme la capacité d'altérations à l'échelle cellulaire de nos HEs.

Perspectives : Dans le but de progresser dans ce domaine, il est indispensable de faire :

-La caractérisation des huiles essentielles pour mieux comprendre leur mécanisme d'action sur le microorganisme étudié.

-En outre, il serait intéressant d'étudier la capacité et le mécanisme d'adaptation cellulaire en présence de ces métabolites secondaires, pour éventuellement pouvoir proposer de nouveaux biomarqueurs due à l'exposition aux HEs.

-Comme il est nécessaire d'étudier les effets des HEs sur les bactéries et champignons qui vivent dans les infusoires des paramécies.

-Il est utile aussi de faire des études en système continu pour déterminer les effets de ces plantes ainsi que de leurs HEs dans une chaîne alimentaire. Et étendre le champ d'investigation vers d'autres plantes et leurs métabolites.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

Abou El-Hamd, M. A. I., Touw, D. J., Wilhelm, A. J., Bast, A., Van Der Vijgh, W. J. F. Stability of monoHER in an aqueous formulation for i.v. administration. *Inter. J. Pharm.*, 2010, 211 (1-2), 51-56.

AFNOR, Huiles essentielles, Tome 1- Echantillonnage et méthode d'analyse, Tome 2-Vol.1 et 2, Monographies relatives aux huiles essentielles, 6ème édition. Afnor, Paris, 2000, France.

Aghaei M., Alizadeh M., Sharifian I. 2011. Chemical composition of essential oil of *Artemisia herba-alba* from West Azerbaijan, Iran. *E-J. Env. Agric. & Food Chem.* 10(6): 2413-2416.

Ahmad H., Tijerina M.T., Tobola A.S. 1997. Preferential overexpression of a class MU glutathione S-transferase subunit in mouse liver by myristicin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 236: 825-828.

Al-Mamary M., Al-Meerri A., Al-Haboui M. 2002. antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research.* 22: 1041-1047.

Alvaez-Castellanos, P. P. and Pascual-Viilalobos, M. J. (2003). Effect of fertilizer on yield and composition of flowerhead essential oil of *Chrysanthemum caronarium* (Asteraceae) cultivated in Spain. *Ind. Crops Prod.* 17, 77-81.

Amiot J. 2005. *Thymus vulgaris*, un cas de polymorphisme chimique pour comprendre l'écologie évolutive des composés secondaires. Thèse-doctorat-Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier. France.

Amlan K., Patra J.S. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry.* 71: 1198-1222.

André J., Grassé P.P. 1994. *Traité de zoologie: anatomie, systématique, biologie. Infusoires ciliés. Structure, physiologie, reproduction, Vol. 2.* University of Chicago. P : 821.

André R. 1998. *La maladie de parkinson.* Ed. Masson. 16-19.

Angelopoulou D., Denetzos C., Perdetzoglou D. 2002. Diurnal and seasonal variation of the essential oil labdanes and clerodanes from *Cistusmonspeliensis* L. leaves. Biochemical System.

Arakawa T., Shibata M., Hosomi K., Watanabe T., Honma Y., Kawasumi K., Takeuchi Y. 1992. Anti-allergic effects of peppermint oil, chicle and jelutong. J. Food Hygienic Soc. Jpn. 33: 569–575.

Arora D., Kaur J. 1999. Antimicrobial activity of spices. International Journal of Antimicrobial agents. 12 : 257-262.

Assad, Y. O. H., Torto, B. et al. (1997). Seasonal variation in the essential oil composition of *Commiphora quadricincta* and its effect on the maturation of immature adults of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Phytochemistry* 44, 833-841.

Atawodi S.E. 2005. Antioxidant potential of African medicinal plants. African Journal of Biotechnology. 4 (2): 128-133.

Audigie C.L., Dupon G., Zonsgain F. 1995. Principes des méthodes d'analyse biochimique. T1, 2ème ED. Doin, Paris. P : 44.

Azevedo N.R., Campos I.F.P., Ferreira H.D., Portes T.A., Santos S.C., Seraphin J.C. Paula J.R., Ferri P.H. 2001. Chemical variability in the essential oil of *Hyptissuaveolens*. *Phytochemistry*. 57:733-736

Bagamboula, C, Uyttendaele, M and Debevere, J (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri* Food Microbiology 21: 33-42.

Bagchi G.D., Srivastava G.N. 2003. Fruits and Seed. Spices and Flavoring (Flavouring) crops/fruits and seeds. Elsevier Science Ltd. 5465-5477.

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils. *Food Chemical Toxicology*. 46 : 446–475.

Baser K.H.C. and Buchbauer G., 2010. Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America. 994.

Baudoux D. 1997. Un procédé, une analyse, une définition. Aroma News.Lettred'information de N.A.R.D: Natural Aromatherapy Research and Development.

Beaumont et Cassier. 1998. Travaux Pratiques de Biologie Animale, Zoologie, Embryologie, Histologie, 3^{ème} édition DUNOD. pp : 123-143.

Beesley A., Hardcastle J., Hardcastle P.T., Taylor C.J. 1996. Influence of peppermint oil on absorptive and secretory processes in rat small intestine. Gut. 39: 214–219.

Bego P.H. 2001. Connaître l'essentiel sur les huiles essentielles. Collection aromathérapie pratique et familiale. Ed. MDB Paris. pp : 2-3.

Belaiche P. 1979. Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1 : l'aromatogramme .Ed. Maloine. Paris.

Béliveau R., Gingras D. 2005. Les aliments contre le cancer. Édition du Trécarré. Outremont. 213.

Benalia Y. 2008. Valorisation des ressources végétales steppiques par l'étude des huiles essentielles. Cas : MarrubiumdesertiDeNoé. Mémoire de Magistère, Département de biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif.

Benayad N.2008. Utilisation des huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines comme insecticides pour lutter contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées (blé, maïs, riz...). Rapport d'activité, Faculté des Sciences- Rabat, Maroc.

Benchaar C., Calsamiglia S., Chaves A.V., Fraser G.R., Colombatto D., McAllister T.A.2008. Plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. Animal Feed Science and Technology.145 : 209–228.

Bencheikh H. 2005. Contribution à l'étude de la composition, de l'activité antimicrobienne et de la cytotoxicité des huiles essentielles de *Thymus fontanesii* et de *Foeniculumvulgare*. Mémoire de Magistère, Département de biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif.

Benjilali B. 2004. Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. 17-59.

Bennis, S and Chami, F (2004). Surface alteration of *Saccharomyces cervisiae* induced by thymol and eugenol. *Letters in Applied Microbiology* 38: 454-458.

Boira H. et Blanquer A. 1998. Environmental factors affecting chemical variability of essential oils in *Thymus piperella* L. *Biochemical Systematic and Ecology*. 26:811-822.

Bonnet J.L., Guiraud P., Dusser M., Kadri M., Lafosse J., steiman R., Bohatier J. 2005. Assessment of anthracene toxicity toward environmental eukaryotic microorganisms: *Tetrahymena pyriformis* and selected micromycetes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 60: 87-100.

Bouaoun, D, Hilan, C, Garabeth, F and Sfeir, R (2007). Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'une plante sauvage *Prangos asperula* Boiss. *Phytothérapie* 5: 129-134.

Bouaricha H. 2013. Evaluation du stress oxydatif induit par le Proclaim : Essai comparatif sur deux modèles biologiques (*Helix aspersa* et *Paramecium* sp.). Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba. 55p.

Bouaricha H., Berrebbeh H., Grara N., Djebbar M.R. 2013. Response of *paramecium* sp. with respect to an insecticide (Proclaim): growth, content of MDA, AChE activity and respiratory metabolism. *Journal of Applied Sciences Research*. 8(8): 4172-4180.

Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*. 161: 839-851.

Boutkhil S., El Idrissi M., Amechrouq A., Lakhlifi T., Chakir S. 2009. Chemical composition of the essential oil of *Artemisia herba Alba* (Asso) populations. *Phys. & Chem. News*. 47: 133-137.

Bowen I.H., Cubbin I.J. 1992. *Mentha piperita* and *Mentha spicata*. In: *Adverse Effects of Herbal Drugs*, De Smet, P.A.G.M., Keller, K., Hänsel, R., and Chandler, R.F., Eds., *Adverse effects of herbal drugs 1*. Springer-Verlag, Berlin. pp: 171-178.

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.

Braga P.C, Dal Sasso M., Culici M., GaSastri L, Marceca MX, Guffanti E.E. 2006. Antioxidant potential of thymol determined by chemiluminescence inhibition in human neutrophils and cell-free systems. *Pharmacology*. 76: 61-68.

Branger A., Richer M.M., Roustel S. (2007). *Microbiochimie et alimentation*. Educagri Editions. 343.

Briggs, C.J. 1993. Peppermint: Medicinal herb and flavoring agent. *Canad. Pharm. J.* 126: 89-92.

Bruneton J. 1999. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 3^{ème} édition, Ed. TEC et DOC. Paris.

Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 223-253.

Butterfield D., Lauderback C. 2002. Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide associated free radical oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 32: 1050-1060.

Caillet, S et Lacroix, M (2007). *Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire*. Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) INRS-Institut Armand-Frappier, Université de Laval (Québec).

Calcabrini A., Stringaro A., Toccaceli L, Meschini S., Marra M., Colone M., Salvatore G., Mondello F., Arancia G., Molinari A. 2004. Terpinen-4-ol, the main component of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits the in vitro growth of human melanoma cells. *J. invest. Dermatol.* 122: 349-360.

Caldefie-Chézet F., Guerry M., Chalchat J.C., Fusillier C., Vasson M.P., Guillot J. 2004. Anti-inflammatory effects of *Malaleuca alternifolia* essential oil on human polymorphonuclear neutrophils and monocytes. *Free Radical Res.* 38: 805-811.

Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P.W., Castillejos L., Ferret A. 2007. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*. 90 : 2580-2595.

Calvarano, I., Sacco, T., Codignola, A. Chemical research on *Mentha longifolia* var. *mollissima* gathered from Stara Di Demonte Valley in the Calabre region. *Essenze Deriv. Agrum.*, 1969, 44, 236–240.

Carnesecchi S., Bras-Gonçalves R., Bradaia A., Zeisel M., Gossé F., Poupon M.F., Raul F. 2004. Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorourcil efficacy on human colon tumor xenografts. *Cancer Lett.* 215: 53-59.

Carnesecchi S., Schneider Y., Ceraline J., Duranton B., Gosse F., Seiler N. Raul F. 2001. Geraniol, a Component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. *J. Phamacol. Exp. Ther.* 298 (1): 197-200.

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. *Antimicrobial Agents Chemotherapy.* 46 : 1914–1920.

Caude M., ardy A. 1996. Méthodes chromatographiques. Dossier P1445. Base documentaire, Techniques d'analyse.

Cavaleiro C., Salgueiro L.R., Dacunha A.P., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Casanova J. 2003. Composition and variability of the essential oils of the leaves and berries from *Juniperus navicularis*. *Biochemical Systematic and Ecology.* 31:193-201.

Cavalieri E. et al. 2004. a-Bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 315: 589-594.

Chalchat J.K., Carry L.P., Menut C., Lamaty G., Malhuret R., Chopineau J. 1997. Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. *J. Essent. Oil Res.* 9: 67-75.

Chassaing V. 2006. *L'Aromathérapie: les huiles essentielles au service du cheval*; Ed: violainechassain. p: 4- 8.

Clarke S. 2008. *Essential oils*, Ed 2: churchilllivingstone, Elsevier. p: 42- 77.

Cohen J., 2007. Génétique de la dynamique cellulaire chez la paramécie. Centre National de la Recherche Scientifique (C.N.R.S.).Département de Génétique des Fonctions Cellulaires.

Collin G. 2000. Quelques techniques d'extraction de produits naturels. Info-essences. 13 :4-5.

Combrinck S., Du Plooy G.W., Mccrindle R.I., Botha B.M.2007. Morphology and Histochemistry of the Glandular Trichomes of *Lippiascaberrima* (Verbenaceae).Annals of botany. 99 (6) : 1111–1119.

Cosentino, S and Tuberoso, CIG (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., Markam J.L. 2001. Interaction between components of the essential oil of *Melaleucaalternifolia*.Journal of Applied Microbiology.91 : 492–497.

Croteau R., Kutchan TM ., Lewis NG. Natural product (Secondary Metabolites) In Biochemistry and Molecular Biologie of Plants.

Cudmore L.D., Charles N. A. 1977: The Center of Life, A Natural History of the Cell.

Curtay J.P., Robin J.M. 2000. Intérêt des complexes antioxydants. Nutrithérapie Info. Centre d'étude et de développement de la nutrithérapie.

Dahmani-Hamzani N., Baaliouamer A. 2005. Chemical composition of the Algerian essential oil of *Artemisia herba-alba* native to Dejelfa. Riv. Ital. EPPOS. 40: 7-13.

De Leiris J. 2003. Biochemistry of free radicals.Heart Metabolism. 19: 40-44.

De Maack F., Sablier M. 1994.Couplage chromatographiques avec la spectrométrie de masse. Bases documentaires, Techniques d'analyse. P2614.

De Moffarts B., Kirschvink N., Pincemail J., Lekeux P. 2005. Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. Animale. Médecine. Vétérinaire. 149: 1-9.

De Sousa A., Alviano A., Blank A., Alves P., Alviano C, Gattass C. 2004. Melisa *officinalis* L essential oil: antitumoral and antioxidant activities. J. Pharm. Pharmacol. 56: 677-681.

Debbab, A., Mosaddak, B., Aly, A. H., Hakiki, A., Mosaddak M. Chemical characterization and toxicological evaluation of the essential oil of *Mentha piperita* L. growing in Morocco. *Studii si Cercetari Stiintifice: Chimie si Inginerie Chimica, Biotech., Ind. Alim.*, 2007, 8(3), 281-288.

Derwich E., Chabir R., Taouil R., Senhaji O., (2011). In-vitro antioxidant activity and GC/MS studies on the leaves of *Mentha piperita* (Lamiaceae) from Morocco. *I. J. Pharm. Sci. & Drug Res.*, 2011, 3(2), 130-136.

Desjobert J.M., Bianchini A., Tommy P., Costa J., Bernardini A. F. 1997. Etude d'huiles essentielles par couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse. Application à la valorisation des plantes de la flore Corse. *Analysis*. 25 (6) : 13-16.

Desport J.C. and Couratier P. 2002. Stress oxydant et maladies neurodégénératives. *Nutrition clinique et métabolisme*. 16 : 253-259.

Dias N. ; Mortara R.A. ; Lima N. ; 2003 . Morphological and physiological changes in *Tetrahymena pyriformis* for the in vitro cytotoxicity assessment of Triton X-100. *Toxicology in vitro* : 1- 9.

Djebar M. R. 1988. Isolement d'une fraction membranaire convertissant l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique en éthylène chez la pomme et effets de l'éthylène sur les mitochondries végétales. Thèse de Doctorat de l'université Paris VI, UPMC. 188 pages.

Djebar M. R., Djebar H. 2000. Bioénergétique. Les mitochondries végétales. *Synthèse*. 8 : 23-25.

Djebar M. R., Moreau F. 1990. In vitro conversion of aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by apple mitochondria. *Plant Physiol. and Biochem.* 28. (4), 523-530.

Djekoun M., Djebar M.R., Zaoui L., Bensoltan S., Djebar, H. 2012. Biochemical, Enzymatic and Energy Alteration observed in *saccharomycescerivisiae* subjected to oxidative stress. *AEJTS*. 2(1) : 36-42.

Djibo A.K., Samaté A.D. et Nacro M. (2004) - Composition chimique de l'huile essentielle de *Ocimum americanum* Linn., syn. *O. canum* sins du Burkina Faso. *Comptes Rendus Chimie*, 7 : 1033-1037.

Djibo A.K., Samaté A.D., Nacro M. 2004. Composition chimique de l'huile essentielle de *Ocimumamericanum* Linn., syn. *O. canumsins* du Burkina Faso. Comptes Rendus Chimie. 7 : 1033-1037.

Dorman H.J.D., Deans S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology. 88 : 308–316.

Dorman, HJD and Deans, SG (2000). Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology 88: 308-316.

Dragesco J., Dragesco-Kernéis A., Fryd-Versavel G. 1986. Ciliés libres de l'Afrique intertropicale: introduction à la connaissance et à l'étude des Ciliés. IRD Editions. pp: 559.

Dryden M.S., Daiily S., Crouch M. 2004. A randomized controlled trial of tea tree topical preparations versus a standard topical regimen for the clearance of MRSA colonization. J. Hosp. Infect. 58: 86-87.

Dudareva, N., F. Negre, et al. (2006). "Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives." Critical Reviews in Plant Sciences 25(5): 417-440.

Duraffourd C., D'Hervicourt L. et Lapraz J. C. 1990. Cahiers de phytothérapie clinique. 1. Examens de laboratoires galénique. Eléments thérapeutiques synergiques. 2^{ème} éd. Masson, Paris.

Edris A.E. 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. Phytother. Res. 21: 308-323.

Edris A.E., Shalaby A., Fadel H. 2003. Evaluation of a chemotype of spearmint (*Menthaspicata* L) growing in Siwa Oasis, Egypt. Eur. Food Technol. 218: 74-78.

Eisenhut M. 2007. The toxicity of essential oils, article in presse, International Journal of Infectious Diseases. 11(4): 365.

El Kolli M. 2008. Contribution à l'étude de la composition chimique et de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Athemispedunculata* Desp., d'*Athemispunctata* Vahl. et de *Daucus crinitus* Desf. Mémoire de Magistère, Département de biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif.

Ershov Y.A., Pletneva T.V., Sinyuk T.F., Dolgoplova V.A. (1999). Evaluation of growth parameters in *Paramecium caudatum* test model for standardization of biological screening. Bull. Exper. Biol. Med. 127(6): 656-659.

Fabian D., Sabol M., Domaracké K., Bujnéková D. 2006. Essential oils - their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. Toxicol. *in vitro*. 20: 1435-1445.

Faure-Frémiet. 1924: Contribution à la connaissance des infusoires planctoniques. Bull. Biol. Fr. Belg., suppl. 6 : 1-171.

Favier A. 2003. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique. 108-115.

Fellah A., Bouzerzour H., Benmahammed A. et Djekoun A. 2002. Selection pour améliorer la tolérance aux stress abiotiques chez le blé dur (*Triticum durum*, Desf.). Actes IAV, 22: 161-168.

Flaxman D., Griffiths P. 2005. Is tea tree oil effective at eradicating MRSA colonization? A review. Br. J. Community Nurs. 10 : 123-126.

Fontaine E., Barnoud D., Schwebel C., Leverve X. 2002. Place des antioxydants dans la nutrition du patient septique. Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS. 11 : 411-420.

Forster H.B., Niklas H., Lutz S. 1980. Antispasmodic effects of some medicinal plants. Planta Med. 40: 309-319.

France-Ida J. 1996. Bref survol de diverses méthodes d'extraction d'huiles essentielles. Info-essence. 3 : 5-6.

France-Ida J. 1998. Comment s'assurer de la pureté d'une huile essentielle? Info - essences. 7: 1-2.

Franchomme P., Pénéol D. 1990. L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jallois éditeur. Limoges. P. 445.

Gardner, P. 1997. Superoxide-driven a conitase FE-S center cycling. *BioscienceRep.* 17: 33-42.

Génoscope. 2007. Centre National de Séquençage. France.

Georgetti S.R., Casagrande R., Di Mambro V.M., Azzolini Ana ECS., Fonseca Maria J.V. 2003. Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. *AAPS Pharma.Sci.* 5 (2): 5p.

Ghestem A., Seguin E., Paris M., Orecchioni A.M. 2001. *Le préparateur en pharmacie. Dossier 2, Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie, Homéopathie.* Ed. TEC et DOC. Paris.

Göbel H., Schmidt G., Soyka D. 1995. Effect of peppermint and eucalyptus oil preparations on neurophysiological and experimental algometric headache parameters. *Cephalagia.* 14: 228–234.

Gogendeau D., Keller A-M., Yanagi A., Cohen J., Koll F. 2005. Nd6p, a Novel Protein with RCC1-Like Domains Involved in Exocytosis in *Paramecium tetraurelia*. *EukaryoticCell.* 4(12): 2129-2139.

Gräf F. and Stahr K.; 1999: A Soil and Terrain Map of SW-Niger (NiSOTER). In: *Atlas of Benin and Niger.*

Grara, N. 2011. Evaluation de la toxicité de certains polluants industriels sur un animal bioaccumulateur (*Gasteropode Helix aspersa*): Cas des métaux. Thèse de doctorat de l'Université de Annaba. 120 : 91.

Griffin S.G., Wyllie S.G., Markham J.L., Leach D.L. 1999. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour Fragrance Journal.* 14 : 322–332.

Groussard C. 2006. Stress oxydatif et exercice anaérobie. *Oxidative stress and anaerobic exercise.* *Science & Sports.* 21 : 201-209.

Grysole J. 2004. La commercialisation des huiles essentielles. *Manuel pratique des huiles essentielles : de la plante à la commercialisation.* 139-141.

Guba R. 2001. Toxicity myths - essential oils and their carcinogenic potential. *Int. J. Aromather.* 11: 76-83.

Guignard J., Dupont F. 2004. *Botanique- systématique moléculaire-* Ed. Masson. 13^{ème} édition.

Guignard J.L. 2000. *Biochimie végétale.* 2^{ème} Ed. De l'abrégé Dunod. Paris. pp.177-185.

Guignard J.L., Cosson L., Henry M. 1985. *Abrégé de phytochimie.* Ed. Masson. Paris. pp.155-174.

Gustafson R.H., Bowen R.E. 1997. Antibiotic use in animal agriculture. *Journal of Applied Microbiology.* 83 : 531-541.

Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. 1974. Gluthation-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry.* 249: 7130-7139.

Halliwell B. 1994. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet.* 344: 721- 724.

Hammer, KA, Carson, CF and Riley, TV (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiology* 86: 985-990.

Hart P.H., Brand C, Carson CF., Riley T.V., Prager R.H., Finlay-Jones J.J. 2000. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Malaleuca altemifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *inflamm. Res.* 49: 619-626.

Hensser S. et Dupry H.G. 1998. *Atlas – Biologie Animale- 1 - Les Grands Plans d'Organisation.* Ed. Dunod. Paris. P: 5.

Homburger F., Boger E. 1968. The carcinogenicity of essential oils, flavors and spices: A review. *Cancer Res.* 28: 2372-2374.

Houmani M., Houmani Z et Melpomeni S., (2004) Intérêt d'*Artemisia herba alba* Asso dans l'alimentation du bétail des steppes algériennes, Acta Botanica Gallica, 151:2, 165-172, DOI: 10.1080/12538078.2004.10516031.

Hudaib, M. M., Aburjai, T. A. Composition of the essential oil from *Artemisia herba-alba* grown in Jordan. J. Essent. Oil. Res., 2006, 18(3), 301-304.

Jordan M.J., Martinez R.M., Goodner K.L., Baldwin E.A., Sotomayor J.A. 2006. Seasonal variation of *Thymus hyemalis* and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. Industrial Crops and Products.

Juergens U. R., Stöber M., Vetter H. 1998. The anti-inflammatory activity of L-menthol compared to mint oil in human monocytes in vitro: a novel perspective for its therapeutic use in inflammatory diseases. Eur. J. Med. Res. 3: 539–545.

Juteau F., Masotte V., Bessiere J.M., Viano J. 2002. Compositional characteristics of essential oil of *Artemisia campestris* var. *glutinosa*. Biochemical Systematic and Ecology. 30:1065-1070.

Kadri A., Ben Chobba I., Zarai Z., Bekir A., Gharsallah N., Damak M., Gdoura R. 2011. Chemical constituents and antioxidant activity of the essential oil from aerial parts of *Artemisia herba-alba* grown in Tunisian semi-arid region. African J. Biotech. 10(15): 2923-2929.

Kalemba D., Thierrs B. 2004. Constituents of the essential oils of four micropopagated *Solidago* species. Flavour Frag. J. 19: 40-43.

Kaloustian J., Hadji- Minaglou F., La connaissance des huiles essentielles : entre sciences et tradition pour une application médicale raisonnée, Springer-verlag France, Paris, 2012, p.5-10.

Kanko C., (2004) . Study of physicochemical properties of essential oils from *Lippia multiflora* , *Cymbopogon citratus* , *Cymbopogon nardus* , *Cymbopogon giganteus*. Comptes Rendus Chimie Volume 7, n° 10-11: 1039-1042.

Kar A.; 2007; Pharmacognosy and Pharmabiotechnologie; Ed 2: new age international publishers; p: 1-30.

Karasawa, D., Shatar, S., Erdenechimeg, A., Okamoto, Y., Tateba, H., Shimizu, S. A study on Mongolian mints. A new chemotype from *Mentha asiatica* Borriss and constituents of *M. arvensis* L. and *M. piperita* L. *J. Essent. Oil. Res.*, 1995, 7, 255-260.

Karou D., Dicko M. H., Simpore J., Yameogo S., Sanon S., Traore A.S. 2005. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 106: 119-133.

Karray-Bouraoui N., Rabhi M., Neffati M., Baldan B., Ranieri A., Marzouk B. et al. 2009. Salt effect on yield and composition of shoot essential oil and trichome morphology and density on leaves of *Menthapulegium*. *Industrial Crops and Products*. 30 : 338–343.

Khajeh M., Yamini Y., Sefidkon F., Bahramifar N. 2004. Comparison of essential oil composition of *Carumcopticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chemistry*. 86: 587-591.

Kim S.G., Liem A., Stewart B.C., Miller J.A. 1999. New studies on trans-anethole oxide and trans-asarone oxide. *Carcinogenesis*. 20:1303-1307.

Koechlin-Ramonatxo C. 2006. Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoire. *Nutrition clinique et métabolisme*. 20 : 165-177.

Lagunez-Rivera L. 2006. Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse.

Lahlou M. 2004. Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*. 18: 435-448.

Laouer H. 2004. Inventaire de la flore médicinale utilisée dans les régions de Sétif, de Bejaia, de Msila et de Djelfa, composition et activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Ammoidespusilla* et de *Magydarispastinacea*. Thèse de Doctorat d'état, Département de Biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif.

Lee B.K., Kim J.H., Jung J.W., Choi J.W., Han E.S., Lee S.H., Ko K.H., Ryu J.H. 2005. Myristicin-induced neurotoxicity in human neuroblastoma MSK-N-SH cells. *Toxicol.Lett.* 157 : 49-56.

Lee J., Koo N., Min D.B. 2006. Reactive oxygen species, aging and antioxidant nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 3 (1): 21-33.

Legault J., Dahl W., Debiton E., Pichette A., Madelmont J.C. 2003. Antitumor activity of balsam fir oil: Production of reactive oxygen species induced by α -humulene as possible mechanism of action. *Planta Med.* 69: 402-407.

Lopes, N. P., Kato, M. J. et al. (1997). Orcadian and seasonal variation in the essential oil from *Virola surinamensis* leaves, *Phytochemistry* 46, 689-693.

Lopes-Lutz D., Alviano D.S., Alviano C.S., Kolodziejczyk P.P. 2008. "Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils". *Phytochemistry.* 69 (8): 1732-1738.

Lydie B. 2002. Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop & Food Research.* Number 45. p4.

Madeira S.V.F., Rabelo M., Soares P.M.G., Souza E.P., Meineles A.V.P., Montenegro C., Lima R.F., Assreuy A.M.S., Criddle D.N. 2005. Temporal variation of chemical composition and relaxant action of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L.(labiatae) on Guinea-pig ileum. *Phytomedicine*, 12:506-509.

Maruyama, N., Sekimoto, N., Ishibashi, H. 2005. Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil. *J. inflamm.* 2,1-11.

Massion P., Preise R.J.C., Balligand J.L. 2002. Les espèces réactives de l'azote : bénéfiques ou délétères. Reactive nitrogen species: deleterious or not. *Nutrition clinique et métabolisme.* 16: 248-252.

Milner J.Â. 2001. A historical perspective on garlic and cancer. Recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as a supplement. *J. Nutr.* 131: 1027-1031.

Mockute D. and Judzentiene A. (2003) - Variability of the essential oils composition of *Achillea millefolium ssp. millefolium* growing wild in Lithuania. *Biochemical systematic and Ecology*, 31:1033-1045.

Mohamed A. E. H., El-Sayed M. A., Hegazy M. E., Helaly S. E., Esmail A. M., Mohamed N. S. 2010. Chemical constituents and biological activities of *Artemisia herba-alba*. *Rec. Nat. Prod.* 4(1): 1-25.

Moro et Buronzo A. 2008. *Le Grand Guide des Huiles Essentielles: Santé, Beauté, Bien être*. Ed : Hachette pratique ; p: 14- 43.

Naganuma M., Hirose S., Nakayama Y., Nakajima K., Someya T. 1985. A study of the phototoxicity of lemon oil. *Arch. Dermatol. Res.* 278 : 31-36.

Nicole M. 1996. Aperçu de l'aromathérapie. *Info.essence.* 2: 4-5.

Oliveira M.J., Iani F.P.C., Oliveira C.B.A., Santos M.R., Souza P.S., Santos S.C., Seraphin J.C., Ferri P.H. 2005. Influence of growth phase on the essential oil composition of *Hyptissuaveolens*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33: 275-285.

Paena A.T., D'Aquila P.S., Panin F., Pippia P., Moretti M.D.L. 2002. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine.* 9: 721-726.

Palà-paul J., Perez-Alonso M.J., Velasco-Negueruel A., Pala-paul R., Sanz J., and Conejero F. 2001. Seasonal variation in chemical constituents of *Santolarosmarinifolia L. ssp. rosmarinifolia*. *Biochemical Systematic and Ecology.* 29: 663-672.

Paré J. 1997. Procédé assisté par micro-ondes. *Info-essences, Bulletin sur les huiles essentielles.* 4: 4.

Paris M. et Hurabielle M. 1981. *Abrégé de matière médicale (pharmacognosie)*. Ed. Masson .339.

Pauli, A. 2001. Antimicrobial properties of essential oil constituents. *Int. J. Aromather.* 11: 126-133.

Peng H.Y., and Yang X.E. (2005) - Volatile constituents in the flowers of *Elsholtzia argyi* and their variation: a possible utilization of plant resources after phytoremediation. *Journal of Zhejiang University Science*, 6B (2): 91-95.

Perrier R., Auffrer Van Der Kemp T., Zouszain F. 1997. Expériences faciles et moins faciles en sciences biologiques. Edition Doin, pp : 272-280.

Pibiri M. C. 2006. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse Doctorat, EPFL Lausanne. p.161.

Pincemail J. et Defraigne J.O. 2004. Les antioxydants: un vaste réseau de défenses pour lutter contre les effets toxiques de l'oxygène, Symposium « antioxydant et alimentation » institut Danone. 23/10/2004.

Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J. O. 2002. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*. 16 : 233-239.

Pincemail J., Meurisse M., Limet R. et Defraigne J.O. 1999. L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumon*. (4) :5.

Pino, J. A., Rosado, A., Fuentes, V. Chemical composition of the essential oil of *Mentha pulegium* L. from Cuba. *J. Essent. Oil. Res.*, 1996, 8(3), 295-296.

Platzer N. 2002. Application de la RMN à la détermination des structures. Base Documentaire, Techniques d'analyse, Dossier : P1092, vol. TA1.

Porter N. 2001. Essential oils and their production. *Crop & Food Research*. Number 39.

Pradeau D., Dauphin C. 2007. Chromatographie planaire: applications. Dossier P1476, Base documentaire: Techniques d'analyse.

Pyun M.S., Shin S. 2006. Antifungal effects of the volatile oils from *Asium* plants against *Trichophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole. *Phytomedicine*. 13: 394-400.

Quezel P., Santa S. 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des Régions Désertiques et Méridionales. Tome I et II, Editions CNRS, Paris.

Rai M.K., Acharya D., Wadegaonkar P. 2003. Plant derived-antimycotics: potential of Asteraceous plants, In : plant-derived antimycotics : Current Trends and Future prospects, Haworth press, N-York, Londin, Oxford. 165-185.

Randrianali J.A., Ramanoelina P.A.R., Rasoarzhona J.R.E., Gaydou E.M. 2005. Seasonal and chemotype influences on the chemical composition of *Lantana camara* L.essential oils from Madagascar. *AnalyticaChimicaActa*. 545: 46-52.

Randrianalijaona J.A., Ramanoelina P.A.R., Rasoarzhona J.R.E. and Gaydou E.M. (2005) – Seasonal and chemotype influences on the chemical composition of *Lantana camara* L.essential oils from Madagascar. *Analytica Chimica Acta*, 545:46-52.

Ré D.B., Nafia I., Nieoullon A., Goff L.K.L., Had-aissouni L. 2005.Stress oxydatif cérébral: les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate. Implications sur la survie neuronale. *Annales Françaises d’Anesthésie et de Réanimation*. 24 : 502-509.

Redouane-Salah S.; 2004: Effets des rejets métalliques des aciéries du complexe sidérurgique d’El-Hadjar de Annaba sur un model cellulaire marin: *Tetraselmis suecica*. *Sciences et Technologies C-N°22*, pp: 121-124.

Rouessac F., Rouessac A. 2004. Analyse chimique, méthodes et techniques instrumentales modernes, méthodes séparatives. 6^{ème} Ed. Dunod, Paris, p 102.

Salido, S., Altarejos, J., Nogueras, M., Sanchez, A. Chemical composition of the essential oil of *Artemisia herba-alba Asso ssp. valentina* (Lam.) Marcl. *J. Essent. Oil. Res.*, 2001, 13(4), 221-224.

Salle J.L. et Pelletier J. (1991) - Les huiles essentielles, synthèse d’aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. Ed. Frison-Roche. pp 19-45.

Samworth M., Morgan M. 2000: Article on pond life: *Paramecium*. *Miscap Article: Paramecium*, Updated by the Miscap. Ed. April 2000.

Sangwan N.S., Farooqi A.H.A., Shabih F., Sangwan R.S. 2001.Regulation of essential oil production in plants.*Plant Growth Regulation*. 34: 3–21.

Sauvant M.P. ; Pepin D. and Piccini E.; 1999. *Tetrahymena pyriformis*. A tool for toxicological studies. *Chemosphere*, 38(7) : 1631-1669.

Scheffer J.J.C. 1996. Various methods for the isolation of essential oils. *Phytother. Res.*, 10:S6-S7.

Schiller C., Schiller D. 1994. *500 Formulas for Aromatherapy (Mixing Essential Oils for Every Use)*. ed: sterling publishing. p: 11-22.

Schwedt G. (1993) - *Méthodes d'analyse*. Ed. Flammarion.

Schwob I., Bessiere J.M., Masotti V., Viano J. 2004. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum L.*) aerial parts during its phenological cycle. *Biochemical Systematics and Ecology*. 32: 735-745.

Sefidkon F., Abbasi K. Jamzad Z. and Ahmadi S. 2007. The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Saturejarechingerijamzad*. *Food chemistry*. 100: 1054-1058.

Sell, C.S. 2006. *The Chemistry of Fragrance. From Perfumer to Consumer*. 2nd edition. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. 329 p.

Sevanian A., Nordenbrand K., Kim E., Ernester L., Hochstein P. 1990. Microsomal lipid peroxidation: The role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450. *Free Radic Biol Med*. 8: 145-152.

Shin T.-Y., Kim D.-K. 1998. Antiallergic activity of *menthae herba*. *Kor. J. Pharmacogn*. 29: 248-253.

Sikkema J., Bont J.A.M., Poolman B. 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 269 : 8022-8028.

Skandamis P., Koutsoumanis K., Fasseas K., Nychas G.J.E. 2001. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. *Italian Journal of Food Science*. 13 (1) : 65-75.

Smallfield B. (2001) – Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop & Food Research*. Number 45, p4.

Smith C.K., Moore C.A., Alahi E.N., Smart Â.T., Hotchkiss S.A. 2000. Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde and cinnamic alcohol. *Toxico. Appl. Pharmacol.* 168: 189-99.

Sonneborn T. M. 1975. The *Paramecium aurelia* complex of 14 sibling species. *Trans. Amer. Microsc. Soc.* 94 : 155-178.

Sunset Western Garden Book. 1995. 606–607.

Svoboda K. P. and Hampson J. B. (1999) – Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities.

Svoboda K. P. and Hampson J. B. (1999) – Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities.

Svoboda K. P., Hampson J. B. 1999. Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. <http://www.csl.gov.uv/ienica/seminars/>

Svoboda K.P., Greenaway R.I. 2003. Investigation of volatile oil glands of *Satureja Hortensis* L. (Summer savory) and phytochemical comparison of different varieties. *The International Journal of Aromatherapy.* 13(4):196-202.

Svoboda k.P., Svoboda T. 2000. Secretory structures of aromatic and medicinal lantd. ed: *microscopix publications.* p: 7-12.

Sylvestre M., Legault J., Dufour D., Pichette A. 2005. Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrlca gale* L. *Phytomedecine.* 12: 299-304.

Sylvestre M., Pichette A., Lavoie S., Longtin A., Legault J. 2007. Composition and cytotoxic activity of the leaf essential oil of *Comptonia peregrine*.L *Phytother. Res.* 6 : 536-540.

Sylvestre M., Pichette Â., Longtin A., Nagau F., Legault J. 2006. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. *J. Ethnopharmacol.* 103: 99-102.

Tamer F.M.D. 2003. Free Radicals, Types, Sources and Damaging Reactions. Internal Medicine Articles.

Tanker, M., Aki, O., Mener, B., Soner, O. Orta Anadolu'da yetiytirilen bazi Mentha türleri üzerinde bir arastirma. Ankara Ecz. Fak. Mec., 1976, 6, 126-136.

Thompson J.D. et al., 2003. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* CHEMOTYPES. *J. Chem. Ecol.*, 29(4), 859-880.

Uedo N., Tatsuta M., Lishi H., Baba M., Sakai N., Yano H., Otani T. 1999. Inhibition by Dlimonene of gastric carcinogenesis induced by A/-methy!-/V'-nitro-A/-nitrosoguanimidine in wistar rats. *Cancer Lett.* 137: 131-136.

Ultee A., Bennik M.H.J., Moezelaar R.2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology.* 68 : 1561–1568.

Ultée A., Kets E.P.W., Smid E. 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *J. Appl. Microbiol.* 65 (10) : 4606-4610.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 39: 44-48.

Valnet J. 1984. Aromathérapie. Traitement des maladies par les essences des plantes. Maloine S.A. éditeur. Paris. p 544

Vansant G. 2004. Radicaux libres et antioxydants : principes de base. Symposium « Antioxydants et alimentation ». Institut Danone.

Vasconcelos Silva, M. G., Craveiro, A. A. et al. (1999). Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum*. *Fitoterapia* 70, 32-34.

Vashist, V.N., Nath, Y., Nazir, B. N., Handa, K.L. The essential oils of the species of genus *Mentha*. *Perfum. Essent. Oil. Rec.*, 1963, 55, 323–329.

Viaud H. 1993. Les huiles essentielles, qualité distillation. GNOMA, Revue électronique. www.nature-helps.com/France/viaud2.htm

Vila, R.; Mundina, M.; Tomi, F.; FurSan, R.; Zacchino, S.; Casanova, J.; Canigüreal, S. 2002. Composition and antifungal activity of the essential oil of *Solidago chilensis*. *Planta med.* 68, 164-167.

Viljoen A.M., Denirci B., Baser K.H.C., Potgieter C.J., Edwards T.J. 2006 - Micro distillation and essential oil chemistry- a useful tool for detecting hybridisation in *Plectranthus* (Lamiaceae). *South African Journal of Botany.* 72:99-104.

Walsh, SE, Maillard, JY and Al., e (2003). Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram -positive and negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology.* 94(2): 240- 247.

Wang B.S., Li B.S., Zeng Q.X. 2008. Antioxidant and free radical scavenging activities of pigments extracted from molasses alcohol wastewater. *Food chemistry.* 107 : 1198-1204.

Wehner, Gehring. 1995. *Biologie et Physiologie Animales. Bases moléculaires, cellulaires, anatomiques et fonctionnelles : Orientation comparée et évolutive.* Deboeck Université. Thieme Verlag, p : 286-287.

White D.A., Bell G.D., Middleton B. 1986. Effects of terpenes and terpene analogues on cholesterol metabolism. In: *Pharmacological Control of Hyperlipidaemia*, Miller, N., Prous, J.R., Eds., Rome. 389–399.

Wichtel M., Anton R. 1999. *Plantes thérapeutiques: tradition, pratiques officinales, science et thérapeutiques.* Ed. Tec et Doc.

Wiseman R.W., Miller E.C., Liem A. 1987. Structure-activity studies of the hepatocarcinogenicities of alkenylbenzene derivatives related to estragole and safrole on administration to preweanling male C57BL/6J x C3H/HeJ FI mice. *Cancer Res.* 47: 2275-2283.