

UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE
FILIERE : CHIMIE

MEMOIRE DE MASTER
SPECIALITE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

THEME

ETUDE DE LA TOXICITE DE L'HUILE ESSENTIELLE
ET DE LA COMPOSITION CHIMIQUE D'UNE PLANTE
MEDICINALE : *CARTHAMUS*

Présenté par : **Jaoudaren Hadjila**

Hadouchi Amine

Membres de jury :

Oukacha Djamilia	MCA	UMMTO	Présidente
Dahmani Nacera	MCA	UMMTO	Encadreur
Benchoulak Mounir	MCA	UMMTO	Examinateur

2019/2020

Résumé

De nombreuses plantes sont connues pour leur utilisation en médecine traditionnelle pour le traitement de plusieurs pathologies.

Leurs huiles essentielles sont des substances volatiles et lipophiles qui présentent de nombreuses vertus thérapeutiques. Le public recherchant de nos jours des produits plus naturels.

Toutefois, la médecine "naturelle" n'est pas pour autant synonyme de médecine sans danger, les huiles essentielles ne sont pas dénuées de risques de toxicité. Pour bien les utiliser, il est important de connaître leurs propriétés

Cette étude bibliographique traite de la toxicité des huiles essentielles, afin de caractériser certains risques sanitaires encourus par les populations.

Les informations récoltées au travers de nombreuses études scientifiques ont permis pas d'étudier la toxicologie des huiles essentielles. Il est ainsi difficile de prévenir les risques liés à l'utilisation de celles-ci.

Cependant, la complexité des huiles essentielles et l'état actuel des connaissances, ne donnent pas encore de certitudes concernant leur sécurité. Il sera alors nécessaire de poursuivre les recherches dans ce sens.

Abstract

Many plants are known for their use in traditional medicine for the treatment of several diseases, among them, and the *carthamus caeruleus* known for its healing properties.

Their essential oils are volatile and lipophilic substances with numerous therapeutic virtues. Nowadays, the public is looking for more natural products.

However, "natural" medicine does not necessarily mean safe medicine. Essential oils are not without risk of toxicity. In order to use them properly, it is important to know their properties.

This bibliographical study deals with the toxicity of essential oils in order to characterise certain health risks incurred by the populations.

The data gathered through numerous scientific studies has not made it possible the toxicological study of the essential oils. Therefore, It difficult to determine the risks linked to the use of essential oils.

However, the complexity of essential oils and the current state of knowledge does not yet give certainty about their safety. It will then be necessary to continue conducting research in this direction

Remerciement

*Avant tout, on remercie **Allah** de nous avoir donné la volonté afin d'arriver à la finalité de ce modeste travail.*

*Nos remerciements s'adressent en particulier à notre promotrice **Mme Dahmani Nacera**, Maitre de Conférences A à l'Université Mouloud Mammeri qui nous a suivi et guidé tout au long de ce travail et pour sa confiance et ses encouragements*

*Nos vifs remerciements vont aussi à monsieur : **Benchoulak M**, Maitre de conférences A à l'Université Mouloud Mammeri pour l'honneur d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nous remercions la présidente du jury, madame **Oukacha D**, Maitre de Conférences A à l'Université Mouloud Mammeri pour avoir initialement accepté de présider ce jury.*

*Nous remercions aussi tous les **enseignants** de département de chimie pour leurs conseils pratiques et scientifiques tout au long de notre cursus.*

SOMMAIRE

Glossaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

Chapitre 1 : Synthèse Bibliographique

I. Carthamus Caeruleus. L.....	01
I.1 Définition de « Carthamus caeruleus. L., cardoncelle bleue »	01
I.2 Description botanique	01
I.3 classification systématique.....	02
I.4 Distribution géographique	03
I.5 Composition phytochimique des racines de la plante.....	03
I.6 Utilisation de la Carthamus caeruleus.....	04
I.6.1. Utilisations médicinales	04
I.6.2 Utilisations traditionnelles	04
II Les huiles essentielles.....	05
II.1 Définition d'une huile essentielle	05
II.2 Facteurs de variabilité des huiles essentielle	06
II.3 Modes d'extraction des huiles essentielles	07
II.3.1 Distillation à l'eau	08
II.3.1.1. Hydrodistillation	08
II.3.1.2. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau	09
II.3.2 Enfleurage.....	09
II.3.3 Extraction par solvants	09
II.3.4. Extraction par micro-onde	10

II.4 Composition chimique des huiles essentielles.....	10
II.4.1 Terpènes et terpénoïdes	10
II.4.2 Composés aromatiques	11
II.4.3 Composés d'origine diverse	11
II.5 Propriétés et intérêt thérapeutique des huiles essentielles	12
II.6 Caractérisation des huiles essentielles	14
II.6.1. Caractérisation organoleptique	14
II.6.2. Caractérisation physique.....	15
II.6.3. Caractérisation chimique	16
II.7 Analyses des HEs	17
II.7.1 La Chromatographie Phase Gazeuse CPG	17
II.7.2 Chromatographie gazeuse couplée à la Spectrométrie de masse CG/SM	18
II.7.3. Grandeurs de rétention.....	19
II.8 Condition de conservation et de stockage	20
III Activité biologique	20
III.1 Activité antioxydante	20
III.1.1 Stress oxydant	20
III.1.2 Antioxydants	21
III.1.3 Evaluation de l'activité antioxydante	21
III.2 Activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	22
III.2.1 Mode d'action des huiles essentielles sur les bactéries.....	23
III.2.2 Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne par diffusion sur discs	23

Etude de toxicité

I Toxicologie des huiles essentielles	25
I.1 Toxicité cutanée	25
I.1.1 Photosensibilisation	25
I.1.2 Allergies	26
I.1.3 Dermocausticité et nécrose	26
I.2 Toxicité liée à la durée d'exposition	27
I.2.1 Toxicité aiguë	27
I.2.2 Toxicité chronique	27
I.3 Toxicocinétique des huiles essentielles.....	28

I.3.1 Absorption.....	28
I.3.2 Distribution	28
I.3.3 Métabolisme.....	29
I.3.4 Elimination.....	29
II Evaluation de la toxicité	29
II.1 Etude in vivo de la toxicité	29
II.1.1 Données épidémiologiques	29
II.1.2 Etudes toxicologiques chez des animaux de laboratoire	30
II.1.3 Mesures toxicologiques	31
II.1.3.1 LD50.....	31
II.1.3.2 DMSENO ou NOAEL.....	32
II.2 Etude de la toxicité fondée sur des méthodes in vitro	32
II.3 Etude in silico	33
III Les précautions à prendre avec les huiles essentielles	34
IV Précautions d'emplois	35

Chapitre 3 : Analyse des résultats

I Rendement de l'HE extraite des racines	39
II Propriétés chimiques et physiques.....	39
III Caractérisation phytochimique.....	40
III.1 Screening phytochimiques	40
III.2 Caractérisation chromatographique couplée à la spectroscopie de masse	41
III.2.1 Huiles essentielles	41
III.2.2 Extraits par solvants	43
IV Activités biologiques.....	46
IV.1 Evaluation de l'activité antioxydante.....	46
IV.2 Etude antibactérienne	48
IV.3 Test de la toxicité aigüe.....	49
IV.4 Activité cicatrisante des <i>Carthamus caeruleus</i>	50
IV.5 Evaluation de l'effet de <i>Carthamus caeruleus</i> sur la repousse de poils	52

Conclusion

Références bibliographiques

GLOSSAIRE

-

- **Erythémateuses** : Qui présente les caractères de l'érythème
- **Antitumoral** : Qui peut stagner l'évolution d'une tumeur ou détruire la tumeur elle-même
- **Antirétroviral** : Qui traite des infections liées aux rétrovirus
- **Antifongique** : substance possédant la capacité de traiter les mycoses
- **Carcinogénèse** : Processus de formation d'un cancer. On parle aussi d'oncogénèse
- **Antigène** : Qui peut engendrer des anticorps
- **Dermocausticité** : Qui entraîne des brûlures de la peau et des muqueuses
- **Nécrose** : Qui mène à la mort prématurée des cellules dans le tissu vivant
- **Neurotoxicité** : L'action d'une substance **neurotoxique** sur le système nerveux.
- **Épileptiformes** : Qui ressemble à une crise épileptique mais ne dépend pas des mêmes causes
- **Tétaniformes** : Qui ressemble à une crampe
- **Xénobiotiques** : Une substance présente dans un organisme vivant mais qui lui est étrangère : il n'est ni produit par l'organisme lui-même, ni par son alimentation naturelle.
- **Fibroblaste** : Cellule jeune, peu différenciée, du tissu conjonctif.
- **Photoprotection** : La photoprotection désigne tous les moyens, naturels ou artificiels, visant à limiter l'exposition de la peau au rayonnement solaire
- **Cytotoxique** : Se dit d'une substance toxique pour une espèce de cellule
- **Allergénicité** : Désigne le caractère spécifique de l'allergène, soit une substance susceptible de provoquer une allergie dans un organisme.
- **Génotoxicité** : Une substance ou un rayonnement sont dits génotoxiques quand ils peuvent compromettre l'intégrité physique ou fonctionnelle du génome

Liste des abréviations

ATP : Adénosine- Triphosphate

BPL : Bonne pratique de laboratoire

CC : *Carthamus Caeruleus*

cm : Centimètre

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

CPG/SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

DPPH : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle

ECVAM: European Center for the Validation of Alternative Methods

EPA: US Environmental Protection Agency.

FRAP: Ferricreducing-antioxidant power

HE : Huile essentielle

HECT : Huile essentielle chémotypée

IR50 : Inhibition radicalaire

Kg : Kilogramme

LD50 : Dose létale

mm: Millimetres

NOAEL: No Observed Adverse Effect Level

+nm : Nanomètres

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economiques

OH[•] : Hydroxyde

ORAC : Oxygen radical absorbance capacity

QA : contrôle de la qualité

(Q)SAR : (quantitative) structure-activity relation ships

SAR : Structure-activity relation ships

REACH: Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals

ROS : ReactiveOxygenSpecies

UV : Ultras violet

Liste des figures

Figure 1	Carthamus caeruleus L	02
Figure 2	La crème traditionnelle issue de rhizome de Carthamus caeruleus	04
Figure 3	Schéma de l'appareillage d'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation (Clivenger).	08
Figure 4	Extraction par hydrodistillation	09
Figure 5	Structure chimique de quelques composés des huiles essentielles	12
Figure 6	Appareillage de la chromatographie en phase gazeuse	18
Figure 7	Structure du radical stable DPPH°	21
Figure 8	Réaction de réduction du radical libre DPPH° par un antioxydant	22
Figure 9	Zone d'inhibition de l'activité antimicrobienne	23
Figure 10	Les résultats de IC50 obtenus pour différents solvants	47
Figure 11	Evolution des plaies des différents lots dans le temps	51
Figure 12	Effet de l'extrait de la <i>Carthamus caeruleus</i> sur la croissance des poils.	52
Figure 13	Effet de la <i>Carthamus caeruleus</i> et du Madécassol sur la repousse des poils	52

Liste des tableaux

Tableau 1	La classification phylogénique de la plante <i>Carthamus caeruleus</i>	3
Tableau 2	L'échelle d'estimation de l'activité antibactérienne	24
Tableau 3	L'échelle de Hodge et Sterner	31
Tableau 4	Résultats des indices de l'extrait huileux des racines de <i>C. caeruleus</i>	39
Tableau 5	Résultats de test phytochimique sur la plante <i>C caeruleus</i> L	40
Tableau 6	Composition chimique de l'huile essentielle de la <i>Carthamus caeruleus</i>	41
Tableau 7	Composés chimiques de l'HE de <i>C caeruleus</i> obtenus par CPG/SM.	44
Tableau 8	Activité antioxydante et pourcentage d'inhibition du radical DPPH	47
Tableau 9	Diamètre des zones d'inhibition des extraits et de l'huile essentielle des racines de <i>C caeruleus</i>	48
Tableau 10	Test de toxicité de l'extrait des racines de la <i>C caeruleus</i> au cours des 24 heures.	49
Tableau 11	Constitution des lots d'animaux	50

Introduction

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), près de 80 % des populations dépendent de la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaire (O.M.S, 2002). Des avantages économiques considérables dans le développement de cette médecine et dans l'utilisation des plantes médicinales pour le traitement des diverses maladies ont été constatés. Par conséquent, la recherche des principes actifs potentiels de la plante est plus que jamais d'actualité.

La nature a mis à notre disposition une vaste gamme de molécules, contenues dans les huiles essentielles synthétisées par les plantes aromatiques qui renferment un nombre très élevé de composés chimiques (flavonoïdes, quinone, vitamine, saponines, caroténoïdes, terpènes, polyphénols, alcaloïdes, etc) de propriétés physico-chimiques très variées et qui ont des activités biologiques différentes (antimicrobienne, antioxydante, antivirale, ...)

L'Algérie fait partie des pays riches en ressources phylogénétiques à intérêt médicinales et aromatiques (plus de 300 espèces à usage aromatique et médicinal), grâce à son climat très varié (la mer méditerranéenne au Nord et le Sahara dans le sud) et sa situation géographique particulière. Les travaux réalisés sont abondants et portent sur les propriétés biologiques, pharmacologiques et phytochimiques des plantes issues de médecine traditionnelle. Ces données sur les plantes médicinales ont permis d'une part d'expliquer leur action thérapeutique et d'autre part de confirmer leurs utilisations en médecine traditionnelle. Si les compositions chimiques des huiles essentielles de nombreuses plantes ont jusque-là été réalisées. Cependant, très peu de données existent sur leurs propriétés biologiques. Or, les huiles essentielles sont connues pour leurs nombreuses propriétés biologiques. Plus particulièrement leurs propriétés antibactériennes et antioxydantes.

Comme on peut le constater, la recherche de substances naturelles à activité antibactérienne et antioxydante issue de plantes constitue un enjeu scientifique important. C'est dans ce cadre qu'une investigation des composés volatils de la *Carthamus*, issues de la médecine traditionnelle Algérienne plus particulièrement en Kabylie a été entreprise. L'intérêt de cette plante pour la médecine et la recherche de nouvelles molécules, réside dans le fait que ces racines sont largement utilisées par les populations comme un cicatrisant contribue à guérir les brûlures, soit sous forme de poudre ou d'une crème préparée dans le lait ou dans l'eau.

L'origine naturelle des huiles essentielles les font souvent considérer, à tort, comme inoffensives, mais le fait que l'on utilise que des plantes ne signifie pas que cela est sans danger. Cependant, la médecine traditionnelle comporte un certain nombre de risque, certaines plantes contiennent des principes actifs qui peuvent être extrêmement puissants, d'autres sont toxiques à faible dose.

Après avoir évalué l'effet cicatrisant de la *Carthamus caeruleus* L et le composé responsable de cet effet, ce travail et une continuité consacré à prévoir les effets indésirable ou toxique de l'huile essentielle et de dégager la concentration maximale tolérable afin de procéder à une formulation médicamenteuse : pommade cicatrisante à base de l'huile essentielle et de sécuriser l'emploi de cette plante. Mais nous n'avons pas pu faire les expériences et le côté pratique en raison de la situation sanitaire causé par la pandémie Covid-19.

Ainsi, cette étude a été orientée sur trois chapitres ;

Le premier est consacré à la présentation de la plante choisie « *Carthamus caeruleus* L » et à l'étude des huiles essentielles d'une manière générale.

Le second concernera l'activité biologique, ainsi que l'étude de la toxicité des huiles essentielles et de mettre en perspective les méthodes d'évaluation de la toxicité

Le dernier chapitre est consacré à une présentation et une analyse des résultats des travaux antérieurs. Déjà réalisées sur le sujet qui nous permet de tirer une conclusion générale de ce travail.

.



Chapitre 1
Bibliographie



I *Carthamus Caeruleus*. L

I.1 Définition

Le nom générique découle du mot arabe Kurthum, qui signifie "teinture" (Kartam) ^[1]. C'est une plante à fleurs qui a des rapports avec les chardons ^[2]. *Carthamus* est un membre de la tribu des cynarées, sous-famille tubuliflore, et de la famille des Astéracées. Il comprend 25 espèces ^[3].

Les astéracées contiennent environ 23500 espèces réparties en 1620 genres et 13 sous-familles. Ils sont majoritairement des herbacées, le reste sont des arbustes (avec un nombre important), des vignes ou des arbres. La famille est répartie mondialement dans des régions tropiques avec une grande variété des habitats, elle peut représenter jusqu'à 10% de la flore autochtone. Elle existe principalement dans les régions arides à semi arides de latitudes subtropicales et tempérées inférieures. ^[2]

I.2 Description botanique

Carthamus caeruleus L est une herbe annuelle ou bisannuelle à tige ascendante simple ou très peu rameuse de 30 à 60 cm, non ramifiées. C'est une espèce peu commune rencontrée en méditerranée dans les clairières humides des forêts, les plaines, les bords des ruisseaux, surtout dans les terrains argileux et argilo-siliceux. La hauteur de cette plante vivace varie de 30 à 150 cm. La tige est dressée et velue. ^[4]

Les feuilles sont coriaces et luisantes, les supérieures sont fortement dentées et piquantes. L'inflorescence se présente sous forme d'un capitule dont les fleurs sont bleues. Les bractées de l'involucre sont aranéuses et très piquantes. Sa période de floraison s'étale de mai à juillet. ^[5]

Son Rhizome est composé de racine principale qui évolue horizontalement et des racines secondaires sortent de racine principale évoluent verticalement.

Les fruits sont des akènes nettement plus courts que l'aigrette de 1cm de long. Les grains sont exalbuminés.

Les fleurs sont bleues, en capitules terminaux solitaires, ont une corolle tubuleuse que prolongent 5 dents à valeur de court de lobes sommitaux. ^[6]



Figure 1. *Carthamus caeruleus*

I.3 Classification Systématique

- **Etymologie** : *Caeruleus* s'applique aux fleurs « de la couleur du ciel ».
- **Synonyme** : *Carthamuscaeruleus* L / *Carduncelluscaeruleus* L/ *Kentrophyllum caeruleum*/ *Onobromacearuleus* L
- **Floraison** : Avril-Juillet
- **Habitat** : Champs, terrains incultes, commun partout
- **Nom verniculaire**

En arabe : MerghresGhers, Kenjdar, Gergaa, Qartum

En berbère : Arvive'ntaga, Immerzezig, Immergzgz

En français : Cardoncelle bleue

En anglais : Blue thistle^[7]

Tableau 1 : La classification phylogénique de la plante *Carthamus caeruleus*^[4].

Règne : Plantae
Embranchement : Spermaphytes
Sous embranchement : Angiospermes
Classe : Dicotylédones
Ordre : Asterales
Famille : Asteraceae
Sous famille :Carduoideae
Genre : <i>Carthamus</i>

I.4 Distribution géographique

Cette espèce préfère les endroits ensoleillés dans le bassin méditerranéen, elle est d'origine de sud-ouest d'Asie mais elle se trouve dans le l'Est et du nord d'Afrique (Algérie, Maroc, Tunisie, Libye), Australie, (l'Amérique, et l'Europe (Grèce, Italie, France, Portugal, Espagne). En Algérie, elle se trouve dans les régions côtières méditerranéennes (Tiziouzou, Tipaza, Annaba, Mostaganem, Boumerdes, Sidi bel- abbés ainsi que dans les hauts plateaux à Sétif).^[8]

I.5 Composition phytochimique des racines de la plante

Le criblage phytochimique de *C. caeruleus* a révélé une richesse importante en : amidon, tanins gallique, flavonoïdes, alcaloïdes, irridoides, acides gras polyinsaturés, anthocyanes, leucoanthocyanines, sennosides, saponines, glycosides et coumarines, mucilages, qui ont un pouvoir calmant sur les tissus irrigués^[9]. La littérature existante indique que ces composants chimiques présentent plusieurs activités pharmacologiques antifongique, antirétrovirale, antitumorale, antidiabétique, anti-oxydante, anti-inflammatoire et antimicrobienne.^[10]

I.6 Utilisation de la *Carthamus caeruleus*

I.6.1 Utilisations médicales.

I.6.1.1 Activité antioxydant

L'extrait de racine de *Carthamus caeruleus* L est un inhibiteur efficace de xanthine oxydase, et il a des propriétés antioxydants significative de piégeage de radicaux libres, à cause de sa richesse en acides phénoliques et des flavonoïdes. ^[11]

I.6.1.2. Propriété cicatrisante

Des expériences de guérison de la peau d'animaux brûlés, où ayant subi une incision, par l'application de la crème de *Carthamus caeruleus* L, après observation macroscopique ont montré qu'il y a une guérison presque complète après 15 jours, dans le cas des blessures, la réduction en pourcentage de surface brûlée de l'animal est de 85,66%, ce qui est nettement supérieur à celui des animaux traités avec Madécassol 75,12%. ^[10]

I.6.2. Utilisations traditionnelles

Les racines de *C. caeruleus* sont utilisées en Algérie, pour traiter les maladies de la peau et comme un cicatrisant qui contribue à guérir les brûlures et même pour les inflammations articulaires ; les racines sont appliquées sous forme de poudre ou de crème préparé avec du lait. Des rhizomes frais du *Carthamus caeruleus*. L sont utilisés pour préparer la crème traditionnelle ; les rhizomes sont nettoyés, épluchés et coupés en petits morceaux et bouillis dans l'eau pendant 12 heures. Ils sont refroidis, ensuite filtrés, pour obtenir la crème qui est prête pour l'utilisation. ^[9]



Figure 2 : La crème traditionnelle issue de rhizome de *Carthamus caeruleus*

II Les huiles essentielles

Différentes plantes aromatiques sont caractérisées par la biosynthèse de molécules odorantes qui constituent ce qu'on appelle les huiles essentielles (HE). Les huiles essentielles ont, à toute époque, occupé une place importante dans la vie quotidienne de l'homme qui les utilisait pour se parfumer, aromatiser la nourriture ou même se soigner. Elles sont généralement des composés organiques volatils, aromatiques, d'un caractère huileux mais non gras. Les huiles essentielles sont constituées de composés organiques de structures et de fonctions chimiques très diverses.

II.1 Définition d'une huile essentielle

Une huile essentielle est la fraction odorante volatile extraite des végétaux. C'est le parfum concrétisé de la plante, un véritable concentré. Elle peut être extraite de différentes parties d'un végétal : les feuilles, les fleurs, l'écorce, le bois, le zeste et bien d'autres encore : les graines, les baies, les fruits, le bulbe.^[12]

La taille de ces gouttelettes est de quelques microns, c'est pour cela que nous ne les voyons pas. Mais lorsque que l'on froisse la plante aromatique, les gouttelettes d'huile essentielle sont libérées dans l'atmosphère et parviennent jusqu'à notre nez ^[13]

Les plantes survivent grâce à leurs huiles essentielles. Étant donné qu'elles ne peuvent se déplacer pour se mettre à l'abri, il leur fallait inventer un système de protection extrêmement efficace, antibiotique, antisolaire, etc. Ce sont elles, finalement, qui ont imaginé l'aromathérapie ! Les huiles essentielles leur servent à séduire les insectes pollinisateurs, à se protéger des brûlures solaires, des prédateurs et des maladies, et enfin à guérir (blessures, attaques diverses...). ^[12]

En chimie, une huile essentielle est un mélange hétérogène complexe pouvant contenir plusieurs dizaines de constituants dont les teneurs relatives peuvent varier de l'état de traces à plus de 90%. Les huiles essentielles sont utilisées pour apporter de la saveur, ce sont les ingrédients de base pour la préparation des parfums, elles sont utilisées dans les savons, les désinfectants et dans les produits sanitaires. Elles ont des applications importantes en médecine, soit pour leurs qualités odorantes, soit pour soulager la douleur ou pour leur efficacité physiologique (aromathérapie)

II.2 Facteurs de variabilité des huiles essentielle

La qualité des huiles essentielles varie selon :

- ✚ **L'origine botanique** : la composition d'une HE varie selon l'espèce productrice. Ainsi, il semble utile de souligner l'importance qu'il convient d'accorder à la nomenclature scientifique.^[14]

- ✚ **Le mode de culture** : cela précise si la plante est sauvage ou cultivée et issue d'une culture biologique ou non.^[15]

- ✚ **La nature du sol** : les résultats des expériences représentent une très bonne illustration sur l'influence de la nature du sol sur le rendement en huiles essentielle :

-L'azote augmente le rendement en essences des plantes ;

-Le potassium employé seul, au contraire, diminue sensiblement la teneur en HE.

- ✚ **Le stade de développement botanique** : les caractéristiques des chémotypes dépendent parfois du stade de développement (cueillette avant, pendant ou après floraison ...). Des variations parfois très importantes sont couramment observées dans certaines espèces par exemple, pour la coriandre, la teneur en linalol (alcool) est 50% plus élevée chez le fruit mur que chez le fruit vert. De ce fait le choix d'une date de récolte s'impose.^[14]

- ✚ **L'organe distillé (ou exprimé pour le zeste de citrus uniquement)** : la composition biochimique des HECT (huile essentielle chémotypée) varie en fonction de la partie ou organe de la plante distillée.^[15]

- ✚ **Le mode d'obtention** : la labilité des constituants des huiles essentielles explique que la composition du produit obtenu par hydrodistillation soit, le plus souvent différente de celle du mélange initialement présent dans les organes sécréteurs du végétal. En effet, au cours de l'hydrodistillation, l'eau et la température peuvent induire l'hydrolyse des esters, mais aussi, des réarrangements, des isomérisations et des oxydations. Donc pour assurer la qualité du produit et de la constance, il faut étudier, définir et contrôler l'ensemble des paramètres de la culture à l'élaboration du produit final.^[14]

- ✚ **La lumière et la température** : elles sont les plus influentes sur la composition des HE, d'ailleurs elles agissent sur celle-ci simultanément. Certains auteurs admettent que

la quantité d'HE augmente dans la journée, atteint un maximum dans l'après-midi ou le soir et diminue dans la nuit. D'autres disent, que les plantes aromatiques doivent être cueillies avant l'aube, lorsque la rosée du matin est encore présente et avant que la chaleur n'en libère la substance aromatique. Cependant, sur d'autres espèces, on signale que le rendement nocturne en HE est de 20% supérieur à celui du jour.

✚ **Les facteurs génétiques :**

Les hybridations : les hybridations introduisent l'hétérogénéité dans une population végétale. La composition des huiles essentielles issues de ces hybrides est variable et se situe en général entre celles des huiles essentielles des plantes mères.

Les facteurs de mutations : par mutation, une nouvelle race chimique peut apparaître. Elle peut être à peine perceptible dans les caractères morphologiques, alors qu'elle est susceptible de provoquer de profondes modifications dans la composition de l'huile essentielle.

Les races chimiques : les chimiotypes ou races chimiques sont très fréquents chez les plantes à huiles essentielles, et ceci, pour une même espèce botanique. Ces races chimiques peuvent fournir de part leur composition, différentes huiles essentielles.

✚ **Les problèmes phytosanitaires :**

Les maladies : les plantes malades sont caractérisées par une déformation, une chute prématurée des feuilles ainsi que les rameaux aux taches brunes. La récolte est alors compromise et la qualité de l'HE dépréciée.

Les ennemis animaux : les plus dévastateurs et donc les plus redoutables sont les nématodes pathogènes. Par les attaques qu'ils occasionnent aux parties sous-terraines, ces derniers diminuent la longévité des cultures et les rendements. ^[15]

II.3 Modes d'extraction des huiles essentielles

Il existe différentes méthodes permettant d'extraire l'essence produite par les plantes aromatiques. Parmi ces méthodes, la pharmacopée européenne n'en retient que trois pour obtenir un produit qui pourra être appelé huile essentielle : l'entraînement à la vapeur d'eau, la distillation sèche pour les tiges et écorces dans un appareil approprié, ou par un procédé mécanique adapté et sans chauffage pour les citrus. ^[16]

Le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ramilles), de la nature des composés (les flavonoïdes ou les tanins, par

exemple), du rendement en l'huile et de la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées. ^[17]

II.3.1 Distillation à l'eau

Le principe de la distillation à l'eau est de faire bouillir une suspension de plantes aromatiques et de l'eau au point que sa vapeur puisse se condenser, l'huile qui est immiscible avec l'eau, est ensuite séparée. Le facteur le plus important est que dans le distillateur ou l'eau est bouilli par contact direct avec le feu, l'eau présente dans le distillateur doit toujours être plus que suffisante pour persister au long de la distillation, autrement, le matériel végétal peut être surchauffé et carbonisé, quand ça arrive, des off-notes sont formé de réactions de Maillard. ^[18]

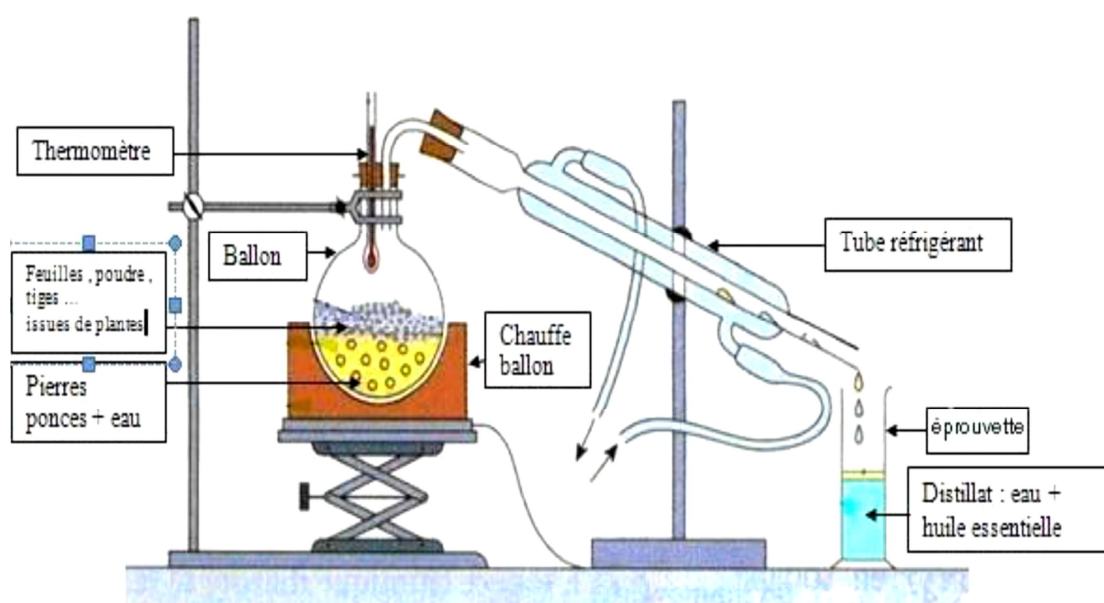


Figure 3: Schéma de l'appareillage d'extraction des huiles par hydrodistillation ^[19]

II.3.1.1 Hydrodistillation

La plante est mise en contact avec de l'eau dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel. Le tout est porté ensuite à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité. Cette méthode est simple dans son principe et son appareillage n'est pas coûteux ^[20].

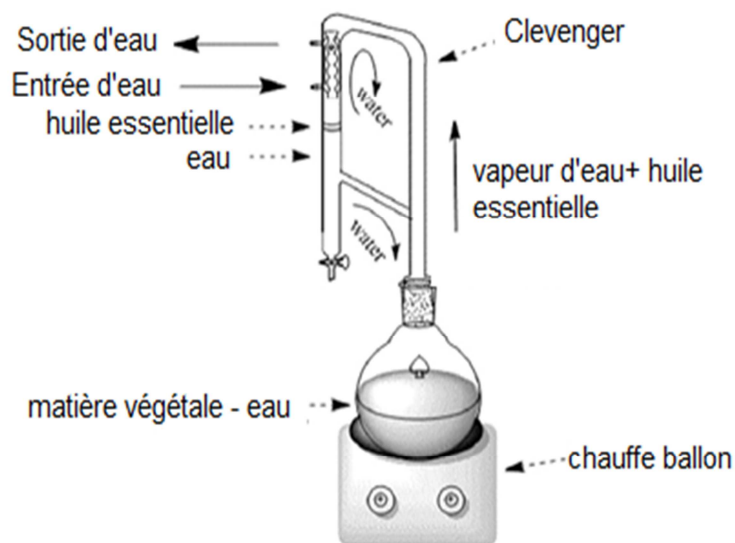


Figure 4 : Extraction par Clevenger

II.3.1.2. Extraction par entrainement à la vapeur d'eau

Le matériel végétal est placé sur une grille perforée à travers laquelle passe la vapeur d'eau. La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques ^[20].

II.3.2 L'enfleurage

La technique de l'enfleurage (ou macération à saturation) est ancienne. Elle concerne les plantes ou parties de plantes dont l'arôme est trop fragile pour supporter la chaleur d'une distillation. Elle consiste à étendre une couche de ces substances végétales fragiles entre deux couches épaisses de matière grasse. On renouvelle les matières végétales fraîche jusqu'à saturation de la graisse en fragrance. On débarrasse alors le parfum de l'excédent graisseux et l'on obtient une essence absolue (ou absolu), une huile essentielle de très haute qualité olfactive. ^[21] Cette technique est la seule qui permette de restituer au mieux la fragrance de la plante fraîche. ^[22]

II.3.3 Extraction par solvants

L'extraction par solvant organique volatil reste la méthode la plus pratique. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol moins fréquemment le

dichlorométhane et l'acétone. Le solvant est ensuite éliminé par distillation. Elle ne doit pas être employée si l'huile essentielle préparée est à usage thérapeutique, car il pourrait y rester des traces de solvant. Elle est parfois utilisée dans l'industrie des parfumes ^[21]

II.3.4. Extraction par micro-onde

Le procédé d'extraction par micro-ondes appelée Vacuum Micro-wavehydrodistillation consiste à extraire l'huile essentielle à l'aide d'un rayonnement micro-ondes d'énergie constante et d'une séquence de mise sous vide. Seule l'eau de constitution de la matière végétale entre dans le processus d'extraction des essences. Sous l'effet conjugué du chauffage sélectif des micro-ondes et de la pression réduite de façon séquentielle dans l'enceinte de l'extraction, l'eau de constitution de la matière végétale fraîche entre brutalement en ébullition. Le contenu des cellules est donc plus aisément transféré vers l'extérieur du tissu biologique, et l'essence est alors mise en œuvre par la condensation, le refroidissement des vapeurs et puis la décantation des condensats. Cette technique présente les avantages suivants : rapidité, économie du temps d'énergie et d'eau, extrait dépourvu de solvant résiduel ^[20].

II.4 Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont constituées de composés organiques complexes de structures et de fonctions chimiques très diverses. Généralement, on classe ces composés en deux groupes : les hydrocarbures terpéniques sont formés d'unités isopréniques (en C5) constituant une famille très diversifiée tant au niveau structural que fonctionnel ^[23]. On rencontre principalement des mono et des sesquiterpènes (possédant respectivement 10 et 15 atomes de carbone) plus rarement des diterpènes (20 atomes de carbone) et les composés oxygénés (aromatique) tels que les esters, les aldéhydes, les cétones, et les alcools. Parfois la présence aussi des composés azotés et soufrés. ^[24]

II.4.1 Terpènes et terpénoïdes

Dans le règne végétal, les terpénoïdes sont classés dans la catégorie des métabolites secondaires. Dans le cas des huiles essentielles, seuls les terpènes les plus volatiles, c'est à dire, ceux dont la masse moléculaire n'est pas élevée. Leur classification est basée sur le nombre de répétition de l'unité de base : isoprène ; Hémiterpène (C5), monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20). Ils représentent le groupe le plus important ^[23]

Monoterpènes

Les carbures sont presque toujours présents. Ils peuvent être acyclique (terpinène, cymène) ou bi cyclique (pinène camphène, sabinène). Ils constituent parfois plus de 90% des huiles essentielles.

Sesquiterpènes

C'est la classe la plus diversifiée des terpènes puisqu'elle contient plus de 3000 molécules. Les variations structurales dans cette série sont de même nature que dans le cas précédent, carbures, alcools et cétones étant les plus fréquents. ^[24]

II.4.2 Composés aromatiques

Contrairement aux dérivés terpéniques, les composés aromatiques sont moins fréquents dans les HE. Très souvent, il s'agit d'allyle et de propénylphénol. Ces composés aromatiques constituent un ensemble important car ils sont généralement responsables des caractères organoleptiques des HE. On peut citer en exemple l'eugénol qui est responsable de l'odeur du clou de girofle.

II.4.3 Composés d'origine diverse

En générale, ils sont des hydrocarbures aliphatiques à chaîne linéaire ou ramifiée porteurs de différentes fonctions par exemple : l'heptane et la paraffine dans l'essence de camomille et sont de faibles poids moléculaire, entraînés lors de l'hydrodistillation,

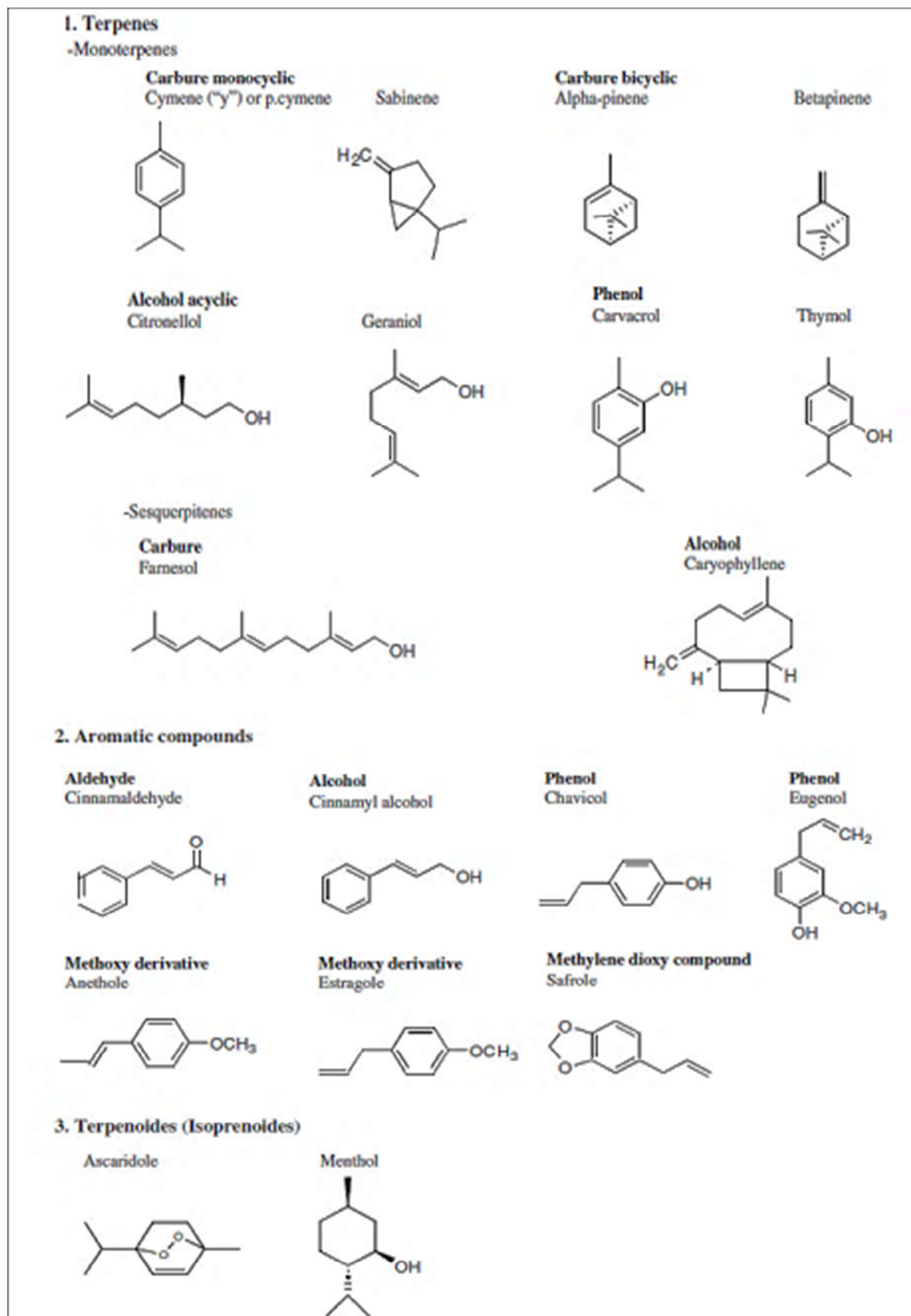


Figure 5 : Structure chimique de quelques composés des huiles essentielles [25]

II.5. Propriétés et intérêt thérapeutique des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont de nombreuses propriétés médicinales en commun, elles sont efficaces pour de nombreux germes et virus ainsi que les mycoses. Chaque huile essentielle à sa spécificité thérapeutique. Les propriétés et les modes d'utilisation particuliers ont donné naissance à la phytothérapie (l'aromathérapie), où elles sont utilisées comme antiseptiques contre les maladies infectieuses. Elles possèdent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre voir antiviral, avec des degrés d'action qui varie d'une huile à autre. Ce sont là leurs propriétés les mieux prouvées par la recherche scientifique moderne ^[27].

II.5.1. Propriétés antibactériennes

Les molécules aromatiques possédant le coefficient antibactérien le plus élevé sont les phénols (carvacrol, thymol, eugénol), les aldéhydes manifestent une certaine puissance antibactérienne (néral, géranial, citronnellal), les cétones présentent un intérêt dans le traitement des états infectieux (thujone, menthone, Carvone, fenchone, camphre, pulégone) et les monoterpénols (géraniol, nérol, linalool, citronnellol, terpinéol, bornéol, menthol). Par ailleurs, les monoterpénols stimulent les défenses naturelles

II.5.2. Propriétés antivirales

Les virus donnent lieu à des pathologies protéiformes (très variées) dont certaines posent des problèmes de santé aujourd'hui. Les réponses classiques à ces infections étant très limitées dans l'arsenal pharmaceutique, les huiles essentielles constituent une aubaine pour traiter ces fléaux infectieux. Plus d'une dizaine d'huiles essentielles ont des propriétés antivirales. Les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques et certaines pathologies virales graves se trouvent très nettement améliorées grâce à elles. De plus, les cellules saines des patients utilisant des HE, acquièrent une résistance toute particulière vis-à-vis de la pénétration virale. On a souvent recours aux HE à phénol et monoterpénol, sachant que les phénols sont nettement plus puissants, mais les monoterpénols ne présentent aucun effet secondaire. Citons; Clous de girofle, Niaouli, Armoise, Palmarosa, Ravensare, Ravintsara, Eucalyptus citronné. Les huiles essentielles parviennent au niveau cellulaire et participent à la destruction des agents pathogènes (microbes, champignons (mycoses), virus, toxines infectieuses) et à l'élimination des déchets du métabolisme, tout en respectant l'intégrité de la flore bénéfique. Les défenses immunitaires sont renforcées. L'HE agit indistinctement sur tous les virus et

c'est la raison pour laquelle il faut recommander l'emploi systématique dans toutes les affections virales : grippe, herpès, poliomyélite, sida, zona... vis-à-vis desquelles la médecine chimique se trouve encore à ce jour désarmée. Les aérosols pulmonaires constituent une voie de pénétration idéale, de même que les onctions cutanées et les bains aromatiques.

II.5.3. Propriétés antifongiques

Les infections fongiques (mycoses) sont d'une actualité criante car les antibiotiques prescrits de manière abusive favorisent leur extension. Ici, on utilisera les mêmes groupes que ceux cités plus haut mais le traitement sera plus long. On ajoutera les alcools sesquiterpéniques et les lactones sesquiterpéniques. Par ailleurs, les mycoses (*candida*) se plaisent bien en terrain acide. Ainsi, il faut chercher à alcaliniser le terrain en modifiant son alimentation. Parmi les HE antifongiques : Cannelle, Clou de girofle, Armoise, Eucalyptus citronné, Géranium rosat, Niaouli, Palmarosa, Ravensare, Tagète, Romarin cinéole, Calophyllum (huile végétale)

II.5.4. Propriétés antiparasitaires

Le groupe des phénols possède une action puissante contre les parasites. Les alcools mono terpéniques et les oxydes ont une action proche des précédentes. De même les cétones et les lactones (présentent une certaine toxicité). Citons : Cannelle, Clous de girofle, Hélichryse, Niaouli, Ravensare.

II.5.5. Propriétés antiseptique

Les aldéhydes et les terpènes sont réputés pour leurs propriétés désinfectantes et antiseptiques et s'opposent à la prolifération des germes pathogènes. Alors que les hôpitaux sont confrontés à des problèmes insurmontables (maladies nosocomiales, légionellose), les HE sont efficaces. La désinfection des locaux, des salles de réanimation et des chambres de malades peut faire appel à la diffusion d'HE riches en alcools et oxydes terpéniques. Citons: Cannelle, Eucalyptus citronné, Girofle, Ravensare, Romarin.

II.6 Caractérisation des huiles essentielles

II.6.1. Caractérisation organoleptique

- **Aspect** : Liquides à température ambiante, rarement visqueuses (myrrhe), certaines cristallisent partiellement ou totalement à plus faible température (anis : anéthole; menthe

des champs: menthol; thym saturéioïde : bémol); de même qu'à basse température (eucalyptus: eucalyptol).

Elles n'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes ^[27]

- **Couleur** : les HE fraîches sont rarement colorées. ^[28]
- **Odeur** : agréable, aromatique. ^[29]
- **Saveur** : douce, piquante, caractéristique, fruitée, fraîche, etc. ^[30]

II.6.2. Caractérisation physique

II.6.2.1. Pouvoir rotatoire :

Définit l'activité optique, qui est une caractéristique des molécules énantiomères (chirales), c'est-à-dire qu'elles existent sous deux configurations spatiales différentes et non superposables ^[31]. Elles ont la propriété de faire tourner le vecteur d'un faisceau lumineux les traversant. Il est mesuré à l'aide d'un polarimètre. Les HE sont le plus souvent optiquement actives ^[32].

II.6.2.2. Densité relative

Elle représente le rapport de la masse d'un volume de liquide (HE dans notre cas) par la masse du même volume d'eau. Elle est sans unité et varie selon la température. Elle permet le contrôle de la pureté de l'huile extraite. La densité relative est mesurée par deux appareils : le densimètre (ou aéromètre) et le pycnomètre. La densité des HE est plus souvent inférieure à celle de l'eau. ^[31]

Cependant, certaines ont une densité supérieure ou voisine de celle de l'eau, comme l'HE d'écorces de *Cinnamomum verum* ; ainsi que celles de sassafras, clous de girofle, et graines de carotte ^[27].

II.6.2.3. Indice de réfraction

C'est une grandeur sans dimension caractéristique d'un milieu, il nous renseigne sur l'état de dégradation d'une huile, décrivant le comportement de la lumière dans celui-ci ; il dépend de la longueur d'onde de mesure mais aussi des caractéristiques de l'environnement dans lequel se propage la lumière. L'appareil le plus couramment utilisé pour sa mesure est le réfractomètre. ^[31] Les HE ont un indice de réfraction élevé ^[32].

II.6.2.4. Solubilité des huiles essentielles

- **Dans l'eau** : elles ne sont naturellement pas, ou très peu, solubles dans l'eau ; certains composants sont néanmoins plus solubles que d'autres (verbénone du romarin officinal, lavandulol de la lavande vraie) ; quelques-unes ont des constituants particulièrement solubles, ce qui entraîne, durant la distillation des écorces de cannelle, l'obtention habituelle d'émulsions.

- **Dans les huiles fixes** : elles sont totalement solubles dans les huiles grasses (meilleurs solvants des huiles essentielles) ^[27].

- **Dans l'éthanol** : plusieurs tests de solubilité sont réalisés avec des volumes croissants d'alcool par rapport à la même quantité d'HE. Il suffira de déterminer la limite de solubilité de l'HE à analyser par rapport à l'éthanol.

Une composition très riche en terpénoïdes et souvent en molécules polaires, permet la solubilisation des HE dans l'éthanol ^[31].

- **Dans les solvants organiques** : les HE s'y solubilisent très bien ^[27].

- **Point d'ébullition** : le point d'ébullition des HE est relativement haut (150°C-300°C) cependant, elles sont extrêmement volatiles à température ambiante ^[32].

- **Point de solidification** : c'est la température maximale observée lorsque le liquide se solidifie au cours du refroidissement. Elle augmente en fonction de la teneur en 1,8-cinéole qui est dosé par des techniques chromatographiques ^[31]. Rares sont les HE qui se solidifient au froid (*Tanacetum annuum*: chamazulène) ^[27].

II.6.3. Caractérisation chimique

II.6.3.1. Indice d'acide :

IA est le nombre de milligramme (mg) de potasse nécessaire pour neutraliser les acides libres dans 1 gramme (g) d'HE selon la réaction :



L'IA permet donc de juger de l'état de détérioration des HEs. Une bonne huile possède un faible taux d'acidité (≤ 4 mg KOH/g d'huile ; norme imposée par Codex Alimentarius) qui contribue à lui donner une forte stabilité face à l'oxydation ^[33].

II.6.3.2. Indice d'ester

IE est le nombre de milligramme (mg) de potasse nécessaire pour saponifier les esters présents dans 1 gramme (g) d'HE selon la réaction :



II.6.3.3. Indice de saponification

IS est la masse d'hydroxyde de potassium KOH, exprimée en milligrammes, nécessaire pour neutraliser les acides libres et saponifier les acides estérifiés contenus dans un gramme d'HE

II.7. Analyse des huiles essentielles

Quel que soit le secteur concerné, l'analyse des huiles essentielles reste une étape importante qui, malgré les développements constants des méthodes de séparation et d'identification, elle demeure une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques.

II.7.1 La Chromatographie en Phase Gazeuse CPG

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique qui permet de séparer et d'analyser les molécules organiques d'un mélange complexe. Elle s'applique principalement aux molécules aisément vaporisables et thermiquement stables. Elle réalise à la fois une analyse qualitative et quantitative. La CPG permet aussi d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme.^[34]

Principe :

L'échantillon est introduit en tête de colonne à l'aide d'une micro-seringue qui traverse une petite pastille en caoutchouc appelée septum jusqu'à une chambre située en amont de la colonne appelée injecteur. Cet injecteur est traversé par le gaz vecteur (hélium, azote, argon ou hydrogène) et porté à une température adaptée à la volatilité de l'échantillon. Les différents constituants présents dans l'échantillon vont alors être emportés par le gaz vecteur à travers la colonne chromatographique et se séparer les uns après les autres en fonction de leur affinité avec la phase fixe.

Plus un constituant a d'affinité avec la phase fixe, plus il va mettre du temps à sortir de la colonne. Un temps caractéristique appelé temps de rétention est alors associé à chacun des

constituants précédemment séparés. C'est le temps qui s'écoule entre l'injection de l'échantillon en tête de colonne et le moment où le composé séparé sort de la colonne.

Les constituants du mélange ainsi séparés par chromatographie peuvent ensuite être détectés à l'aide d'un détecteur spécifique afin d'être identifiés et quantifiés (détecteur à ionisation de flamme, Spectromètre de masse, etc.).^[35]

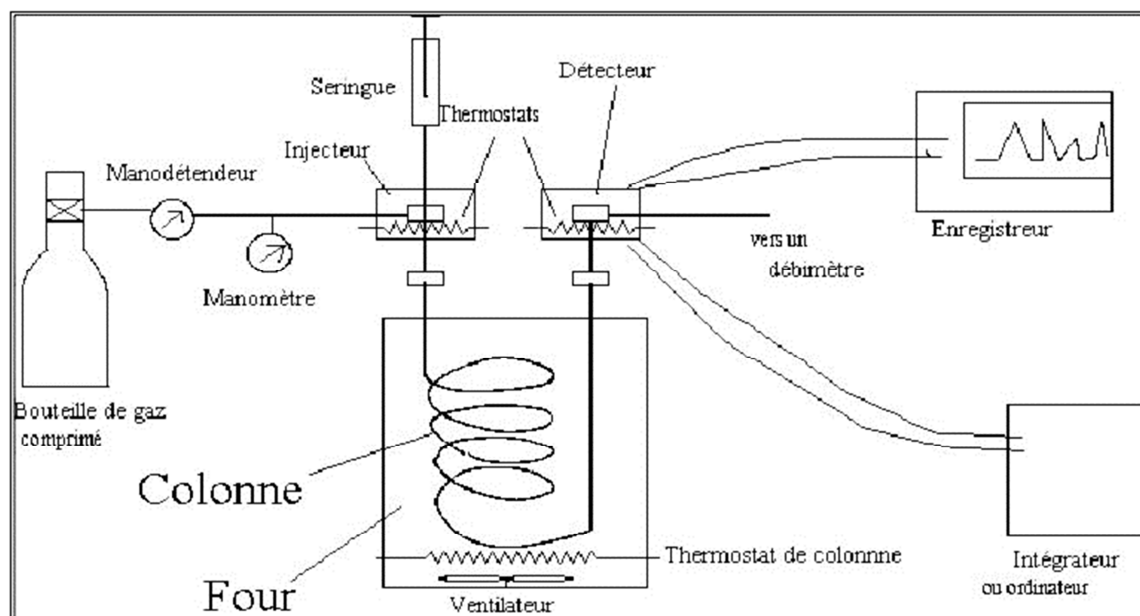


Figure 6 : Appareillage de la chromatographie en phase gazeuse.^[36]

Pour une colonne donnée, chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indices de Kováts) ou en programmation de température (indices de rétention). Ces derniers demeurent reproductibles dans la mesure où les conditions expérimentales restent identiques ; ils sont calculés sur colonne polaire (I_{rp}) et apolaire (I_{ra}) et sont comparés à ceux d'échantillons authentiques contenus dans une bibliothèque de référence propre au laboratoire, dans des bibliothèques commerciales ou encore reportés dans la littérature^[37].

II.7.2 Chromatographie gazeuse couplée à la Spectrométrie de masse CG/SM

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse, pour la séparation des composés d'un échantillon, et de la spectrométrie de masse, pour la détection et l'identification des composés en fonction de leur rapport masse sur charge des différents constituants d'un mélange complexe^[38]

Principe

Ces composés sont d'abord fragmentés et transformés en ions (particules chargées électriquement) en utilisant divers moyens (bombardement avec des électrons, des atomes ou des photons...). Après ionisation, les ions moléculaires formés sont séparés par un champ magnétique qui va dévier leur trajectoire en fonction de leur masse et de leur charge électrique, ce qui va permettre de les détecter puis de les identifier formellement à l'aide d'une spectrothèque.

Les résultats obtenus sont présentés au moyen d'un graphe appelé spectre de masse sur lequel on reporte les abondances relatives (%) des ions formés en fonction du rapport masse/charge. En opérant dans des conditions expérimentales identiques, la fragmentation décrite précédemment est reproductible et est caractéristique des composés étudiés, permettant ainsi de les identifier par comparaison avec des spectres de masse de référence.

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse (séparation) et de la spectrométrie de masse (détection/quantification) fait partie des moyens les plus sûrs pour identifier des substances complexes pouvant être présentes en très faible quantité. [39]

II.7.3. Grandeurs de rétention

- **Temps de rétention (tr)** : est le temps écoulé entre le début de l'injection et la sortie du produit, Il dépend de la température de la colonne et du couple soluté/phase stationnaire
- **Volume de rétention** : correspond au volume de phase mobile nécessaire pour éluer le produit
- **Indice de rétention** : utilisé pour convertir les temps de rétention en constantes indépendantes du système, introduit par Kovats en chromatographie isotherme puis par Van den Dool et Kratz à température programmée par l'expression suivante :

$$I_P = 100z + \frac{\text{tr}(x) - \text{tr}(z)}{\text{tr}(z+1) - \text{tr}(z)} \times 100$$

Avec :

- **tr(x)** : C'est le temps de rétention du soluté (x) étudié.
- **tr(z)** : C'est le temps de rétention de l'alcane à z atome de carbone qui précède (x).
- **tr(z+1)** : C'est le temps de rétention de l'alcane à z+1 atome de carbone qui suit (x).
- **n** : Différence du nombre d'atome de carbone entre les deux alcanes (généralement n =1).

[41]

II.8 Condition de conservation et de stockage

Les huiles essentielles sont fragiles et peuvent s'altérer dans de mauvaises conditions de stockage. Sous l'influence de l'oxygène, de la chaleur, de l'humidité, et de la lumière, leurs constituants s'oxydent. ^[42]

En effet, les conséquences de la dégradation sont nombreuses : photo isomérisation, hydrolyse, coupure oxydative, peroxydation, décomposition en cétones et alcool... Celles-ci peuvent modifier et /ou mettre en cause l'innocuité de l'HE ^[43].

- L'emploi de flaconnage en verre coloré et foncé (brun ou ambré), en aluminium ou en acier inoxydable, de faible volume, évite la détérioration de l'HE par l'oxygène et la lumière. Le flacon doit être pourvu d'un bouchon vissé et bien scellé pour éviter l'évaporation. L'emploi de petites billes en verre à la surface de l'HE réduit l'action oxydante de l'air.

- Le stockage doit se faire dans un endroit sec (à l'abri de toute trace d'humidité), frais (loin des sources de chaleur), dépourvu de la lumière, même artificielle et à l'abri du froid. La durée de conservation d'une HE, si on a respecté les bonnes conditions de stockage, est environ 3 ans. Les essences d'agrumes font exception, ils ne peuvent se conserver que pendant 6 mois. ^[42]

III Activité biologique

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique et en particulier, avec les groupements fonctionnels des composés majoritaires : les phénols, les alcools, les aldéhydes et les composés terpéniques et cétoniques. Les composés minoritaires jouent aussi un rôle important en renforçant les effets des composés principaux. L'efficacité d'une huile essentielle dépend ainsi de sa richesse en composés phytochimiques ; plus elle est riche en substances actives, plus son activité est importante ^[44].

III.1 Activité antioxydante

III.1.1 Stress oxydant

Dans les systèmes biologiques, l'oxygène est normalement transformé en molécules d'eau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette réaction est cruciale puisqu'elle apporte à la cellule toute l'énergie nécessaire (sous forme d'adénosine triphosphate (ATP)) pour assurer ses multiples fonctions. Le processus n'est toutefois pas parfait car une faible partie de l'oxygène (2 à 5%) est convertie en espèces réactives de l'oxygène (ROS) (composés

chimiquement instables porteurs d'électrons non appariés et qui réagissent avec d'autres molécules, les déstabilisant à leur tour, et induisent ainsi une réaction en chaîne). Le stress oxydant représente donc l'incapacité pour l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces réactives d'oxygène (ROS), en raison de l'existence d'un déséquilibre entre la production de ces substances et la capacité de défense des antioxydants. Le radical hydroxyle (OH^\cdot) et le radical super oxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) sont les radicaux les plus réactifs. [44]

III.1.2 Antioxydants

Le concept d'antioxydant biologique se réfère à toute substance qui, lorsqu'elle est présente à de faible concentration par rapport à celle d'un substrat oxydable, elle retarde ou empêche l'oxydation de ce substrat de manière significative. Il peut agir en supprimant les ROS (ReactiveOxygenSpecies), ou en empêchant leur formation, ou encore en réparant les dommages causés par ceux-ci. Ils sont classés en antioxydants endogènes qui peuvent être enzymatiques et non enzymatiques et en antioxydants exogènes. [45]

III.1.3 Evaluation de l'activité antioxydante

Plusieurs tests ont été introduits (DPPH., FRAP, β -carotène, ORAC...) pour mesurer la capacité antioxydante de composés uniques et/ou de mélanges complexes. Toutes ces techniques sont basées sur des dosages colorimétriques et/ou fluorimétriques.

III.1.3.1 Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl)

Pour étudier l'activité antiradicalaire des différents extraits, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH comme un radical libre relativement stable qui absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm. [46]

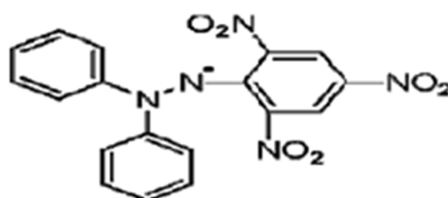


Figure 7: Structure du radical stable DPPH° [47]

Principe : La réduction du radical libre DPPH° (2,2'-diphényle-1-picrylhydrazyl) par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV- Visible, le test consiste à mettre le radical

DPPH (de couleur violette), en présence des molécules antioxydantes pour mesurer leur capacité à le réduire. La forme réduite (diphénylpicryl-hydrazine) de couleur jaune n'absorbe plus à 517 nm, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance.^[48]

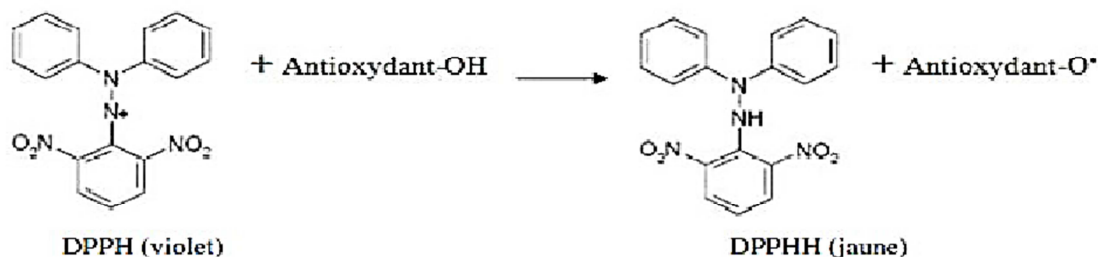


Figure 8 : réaction de réduction du radical libre DPPH° par un antioxydant.^[49]

III.1.3.2. Détermination de L'inhibition du radical DPPH

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH (IR %) par l'huile essentielle est calculé comme suit:

$$IR(\%) = \left(\frac{A_t - A_c}{A_t} \right) \times 100$$

- IR: Pourcentage d'inhibition (%)
- At : Absorbance en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif)
- AC : Absorbance en présence de l'inhibiteur (échantillon)^[50]

III.2 Activité antimicrobienne des huiles essentielles

Un micro-organisme est un organisme vivant microscopique (1 à 2 micromètres), unicellulaire, il peut être une bactérie, un virus, champignon microscopique (micromycète). La plupart de ces microbes sont sans danger et beaucoup sont bénéfiques.^[23]

L'organisme humain, constamment exposé à une multitude de microbes (bactéries, virus, parasites, champignons microscopique), possède un système complexe de défense qui lui permet de rencontrer ou d'héberger ces microbes sans leur permettre d'envahir ses tissus. Cependant, dans certaines conditions, l'infection peut entraîner une maladie infectieuse grave. Pour lutter contre ces infections, de nombreux programmes ont été conduit pour découvrir et développer de nombreux agents antimicrobiens d'origine biologique.^[51]

Un agent antimicrobien, est un agent qui tue les micro-organismes ou inhibe leur croissance. Celui qui les tue est appelé « microbicide » et celui qui inhibe seulement leur croissance est appelé « microbiostatique ».^[52]

III.2.1 Mode d'action des huiles essentielles sur les bactéries

Les huiles essentielles peuvent présenter une action cytotoxique sur les bactéries, en agissant sur plusieurs structures

On peut résumer l'action des HE par deux catégories principales :

- **Dommages membranaires** : en traversant la paroi bactérienne et la membrane plasmique, les composés aromatiques des HE perméabilisent la membrane et perturbent son fonctionnement. Par exemple, ils peuvent la rendre perméable aux protons et à divers ions, et inhiber la production d'ATP. A terme, cela peut aboutir à une lyse de la bactérie. Ils peuvent aussi réduire la fluidité membranaire, ce qui nuit au bon fonctionnement de la bactérie.
- **Dommages cytoplasmiques** : les composés organiques volatils des HE peuvent déclencher une coagulation du cytoplasme et endommager les protéines et lipides qu'il contient. ^[53]

III.2.2 Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne par diffusion sur discs

A partir de colonies de chaque souche, une suspension bactérienne est réalisée dans l'eau physiologique. La turbidité de cette suspension est ajustée à 0.5 Mc Farland. Un inoculum est alors obtenu, et ensemencé par inondation sur des boîtes de pétri contenant la gélose Mueller Hinton. Des disques stériles de papier filtre imprégnés de différents extraits sont ensuite délicatement déposés à la surface de la gélose. Les boîtes de pétri sont incubées à 37°C à l'étuve pendant 24 heures. L'activité antimicrobienne est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque. ^[54]

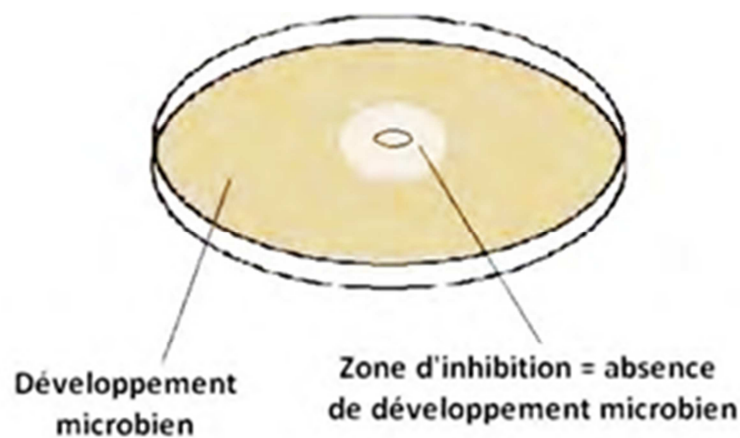


Figure 9 : Zone d'inhibition de l'activité antimicrobienne. ^[55]

L'échelle d'estimation de l'activité est classée par les diamètres d'inhibition de la croissance microbienne en cinq classes ^[56]

Tableau 2 : L'échelle d'estimation de l'activité antibactérienne

$D \geq 30 \text{ mm}$	• Très forte inhibition
$21 \text{ mm} \leq D \leq 29 \text{ mm}$	• Forte inhibition
$16 \text{ mm} \leq D \leq 20 \text{ mm}$	• Moyenne inhibition
$11 \text{ mm} \leq D \leq 16 \text{ mm}$	• Légère inhibition
$D \leq 10 \text{ mm}$	• Pas d'inhibition



CHAPITRE 2
ÉTUDE DE LA
TOXICITÉ



I Toxicologie des huiles essentielles

Les plantes aromatiques et leurs huiles essentielles apparaissent comme des produits de plus en plus populaires. Certaines personnes mal informées les perçoivent comme des produits ne présentant que des effets bénéfiques, dépourvus d'effets néfastes pour l'organisme. Ils sont peu informés sur la nature de ces substances et du risque potentiel que peut susciter un mauvais usage. ^[57]

Ainsi, il est capital de connaître la toxicité de ces substances, qui sont très actives, afin de bénéficier au mieux de leurs propriétés dans le domaine médical et de ne pas s'exposer à des effets toxiques ou allergiques.

La *Carthamus C* une plante très peut étudier dont l'huile essentielle possède une activité antioxydante, antibactérienne et antifongique en plus d'une activité cicatrisante et une efficacité à régénérer les poils. Cette étude a été réalisée à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou et prouvée par des essais cliniques au niveau du Centre de Recherche et Développement Soidal et de l'Ecole National Vétérinaire. Dans la continuité du travail il est nécessaire de faire une étude de la toxicité de l'huile essentielle afin de déterminer la concentration maximale efficace sans danger ni risque de toxicité cutanée dans le but de concevoir une préparation pharmaceutique et pouvoir bénéficier des vertus de cette plante.

I.1 Toxicité cutanée

Les réactions cutanées sont les plus répandues compte tenu de l'emploi majoritaire de la voie cutanée en aromathérapie. Ces réactions de plusieurs types sont souvent difficiles à prévenir.

La réaction cutanée dépend de nombreux facteurs :

- Le lieu d'exposition
- La surface exposée
- La fréquence et la durée d'exposition
- La substance appliquée, son véhicule le cas échéant
- La quantité et la concentration
- L'utilisation ou non d'un système occlusif
- L'intégrité de la peau (présence d'inflammation ou d'autre maladie)
- Les facteurs environnementaux comme la lumière (ultraviolets) la température et l'humidité

[58]

I.1.1 Photosensibilisation

L'application cutanée de certaines huiles contenant des furo et pyrocoumarines peut initier sous une exposition solaire, des réactions de photosensibilisation. Ce phénomène de stress oxydatif induit au niveau de la peau, des réactions érythémateuses susceptibles de favoriser la carcinogénèse. ^[59]

De plus, il apparait que ce phénomène de photosensibilisation peut être survenir par voie orale. Que ce soit après une utilisation interne ou externe, il convient ainsi de laisser un intervalle de temps minimal de 24 heures avant de s'exposer au soleil. ^[62]

Ce sont les essences de citrus tels que le citron, l'orange, la mandarine, le pamplemousse, l'angélique qui sont responsables de ce risque de photosensibilisation et d'apparition de tâches sur la peau. ^[63]

I.1.2 Allergies

Une allergie est une hypersensibilité (une réponse allergique) causée par l'exposition antigène (à un allergène) qui y aboutit à une réactivité accrue à l'antigène suite à l'exposition subséquente.

La Sécurité dans l'utilisation d'huiles essentielles à base de plante ou des produits d'huile essentielle est toujours la première considération et une réponse allergique topique ou systémique à un produit doit toujours être traitée avec diligence. ^[64]

De nombreuses huiles essentielles présentent des molécules potentiellement allergisantes (dépendamment de la sensibilité de chaque personne). Certaines molécules sont notamment connues pour être à l'origine de réactions allergiques comme le limonène, le linalol, le géraniol, les citrales ou encore les lactones sesquiterpéniques qui peuvent entraîner des dermites bulleuses après application sur la peau. Notons qu'un usage prolongé d'une même huile essentielle peut également favoriser l'apparition de l'allergie chez un sujet non allergique auparavant. ^[65]

Un grand nombre de molécules composant les HEs ont un potentiel allergisant, ce qui implique que les risques d'allergies ne doivent pas être sous-estimés. Leur utilisation étant de plus en plus répandue, grâce à l'engouement que suscitent les médecines dites "naturelles", le nombre de personnes exposées est grandissant. ^[16]

I.1.3 Dermocausticité et nécrose

Dès la première utilisation, certaines huiles peuvent provoquer une dermocausticité voire une nécrose des tissus cutanés. On note, parmi ces agents irritants pour la peau et les muqueuses, les huiles essentielles riches en phénols, aldéhydes aromatiques et terpéniques. Exemples d'huiles contenant des phénols : *Thymus vulgaris* (thym CT thymol et CT carvacrol), *Eugenia caryophyllus* (Giroflier), *Saturejamontana* (Sariette des montagnes), *Origanumcompactum* (Origan compact) ...

Exemples d'huiles contenant des aldéhydes : *Litseacitrata* (Litsée citronnée), *Cymbopogoncitratus* (Lemongrass), *Cinnamomumzeylanicum* et cassia (Cannelle de Ceylan et de Chine). Il convient donc d'effectuer une dilution afin d'utiliser ces huiles en usage cutanée, soit 20% d'huile essentielle et 80% d'huile végétale, puis d'appliquer cette préparation sur des zones corporelles bien définies. Cette précaution d'emploi, prévaudra notamment chez les personnes présentant une hypersensibilité cutanée. De plus, certaines huiles connues pour être révulsives et nécrosantes devront être bannies lors d'utilisation cutanée comme les huiles de moutarde, de croton et de sabiné.

L'utilisation des huiles essentielles par voie cutanée, chez des personnes non averties, peut ainsi apparaître préoccupante quand bon nombre de revues de vulgarisation préconisent l'utilisation des huiles essentielles dans le bain notamment pour leurs vertus relaxantes

I.2 Toxicité liée à la durée d'exposition

I.2.1 Toxicité aigüe

En règle générale, la toxicité aigüe des HE est définie surtout pour la voie orale. En effet, les accidents les plus graves sont généralement observés chez les enfants suite à l'ingestion de quantités importantes d'huiles essentielles.

Elle est mesurée par la DL50 (dose létale 50) donnant pour une population (test donnée) (rongeurs le plus souvent), dans des conditions expérimentales définies, la dose tuant 50% des cobayes. La dose létale varie avec le poids corporel, elle est comptée en g/kg de poids corporel ^[31].

On connaît aussi la neurotoxicité des huiles essentielles à thuyones (thuya, armoise, absinthe, tanaïsie, sauge officinale) ou à pinocamphone (hysope) : ces huiles essentielles induisent des crises épileptiformes et tétaniformes, des troubles psychiques et sensoriels nécessitant l'hospitalisation ^[66].

Test de toxicité :

Principe : selon la méthode décrite par l'Organisation de la Coopération Economique et Développement (OCDE); Ce test consiste à administrer les doses expérimentales aux animaux et observer pour toute manifestation de toxicité, augmentation dans l'activité, salivation, convulsion, coma et mort. Ces observations sont faites régulièrement jusqu'à 24 heures.^[66]

I.2.2 Toxicité chronique

La toxicité chronique des huiles essentielles est assez mal connue, au moins en ce qui concerne leur utilisation dans le cadre de pratiques comme l'aromathérapie et ce quelle que soit la voie d'administration : les éventuels effets secondaires ne sont que rarement signalés. On dispose par contre de beaucoup de données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi (surtout celui de leurs constituants ou des plantes qui en renferment) en tant qu'arômes alimentaires (ou épices, condiments, etc.), domaine dans lequel les doses ingérées journalièrement sont le plus souvent très faibles.

I.3 Toxicocinétique des huiles essentielles

Les huiles essentielles étant par définition des produits de composition complexe, leur action est assimilée à l'action de l'un ou de quelqu'un de ses composants, ainsi qu'à certains métabolites issus de ses constituants. Les HE sont constitués d'un mélange d'une multitude de composés, il est alors difficile d'établir leurs toxicocinétique^[30] On peut toutefois décrire les règles générales régissant la cinétique d'absorption des HE.

I.3.1 Absorption

Le passage de molécules dans l'organisme est principalement réalisé par diffusion passive. Les caractéristiques de cette dernière sont les suivantes : sans énergie, non saturable, non spécifique et fonction d'un gradient allant de la zone la plus concentrée vers la moins concentrée.

La voie cutanée est certainement celle la plus couramment utilisée en thérapeutique aromatique de part la praticité de son mode d'utilisation. Elle constitue en effet une très bonne voie d'administration pour une activité topique, mais aussi pour des indications plus systémiques. Il convient toutefois de prêter attention à une possible toxicité systémique, bien qu'elle soit rare.^[30]

I.3.2 Distribution

Dans le sang, les substances aromatiques se fixent réversiblement aux protéines plasmatiques. Le complexe substance-protéine est atoxique. Les substances aromatiques étant lipophiles, leur passage du sang vers les organes riches en lipides se trouve facilité. Elles passent rapidement dans le cerveau et le foie, les muscles, puis sont stockées dans le tissu adipeux. De fait, une administration des doses répétées peut entraîner une toxicité par accumulation ^[57].

I.3.3 Métabolisme

Une fois absorbées, les molécules aromatiques vont subir des biotransformations dont le but final est de rendre ces substances plus hydrophiles et accélérer ainsi leur élimination au niveau rénal. Si la plupart des organes sont capables de métaboliser les xénobiotiques, l'organe majeur du métabolisme reste le foie, suivent les reins, la muqueuse intestinale, les poumons... De nombreuses réactions de biotransformation sont possibles selon la molécule envisagée. En effet chaque molécule peut conduire, par plusieurs chaînes de réactions, à des métabolites différents. Il n'existe pas de métabolite final commun à toutes les substances exogènes. ^[31]

I.3.4 Elimination

L'élimination des substances exogènes se fait principalement par les reins, le foie, les poumons et la peau. Mais, on retient surtout la part importante que représentent les reins dans cette fonction. L'élimination est aussi caractérisée par le temps mis pour épurer ces substances. L'insuffisance de l'élimination d'une substance se traduit par un allongement de sa demi-vie, un risque d'accumulation et une augmentation de toxicité ^[31].

II Evaluation de la toxicité

II.1. Etude in vivo de la toxicité

II.1.1. Données épidémiologiques

En premier lieu, il est nécessaire d'effectuer des recherches bibliographiques exhaustives des données publiées tant dans la littérature que dans les banques de données montrant les effets éventuels chez l'homme et/ou traitant de la vigilance.

En second lieu, des investigations chez l'homme peuvent être réalisées. Cependant, elles ne peuvent être envisagées que pour confirmer la bonne tolérance d'une HE ou de ses constituants dans des conditions proches de celles prévues pour leur utilisation chez l'homme et ce, pour autant que des données de sécurité suffisantes, permettant de s'assurer de l'absence de risque pour les personnes participant aux essais, soient disponibles.^[67]

Lorsqu'on dispose de données provenant d'études épidémiologiques positives, il est vivement conseillé de les utiliser pour l'évaluation des risques. De même, s'il existe des données obtenues lors d'études cliniques chez l'homme, elles devraient être utilisées pour l'identification des dangers et peut-être dans d'autres étapes.

Cependant, pour la plupart des substances chimiques, il est rare que l'on dispose de données cliniques et épidémiologiques. En outre, des données épidémiologiques négatives peuvent être difficiles à interpréter aux fins de l'évaluation des risques, car la puissance statistique de la plupart des études épidémiologiques est insuffisante pour détecter des effets à des niveaux relativement faibles dans les populations humaines. Enfin, même si l'on reconnaît la valeur des données épidémiologiques, les données positives indiquent qu'un effet défavorable s'est déjà produit ; les décisions relatives à la gestion des risques doivent donc ne pas être retardée en attendant la mise au point de telles études.

Les études épidémiologiques dont les données sont exploitées pour l'évaluation des risques doivent être menées selon des protocoles normalisés reconnus.^[68]

II.1.2 Etudes toxicologiques chez des animaux de laboratoire

La plupart des données toxicologiques utilisées pour l'évaluation des risques proviennent d'études menées chez l'animal ; il est donc essentiel que ces études soient effectuées selon des protocoles d'essais normalisés et largement acceptés. Il existe de nombreux protocoles à cet effet (OCDE, EPA, etc.), Quel que soit le protocole utilisé, toutes les études doivent respecter les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) et les procédures normalisées d'assurance et de contrôle de la qualité (QA/QC).

Des spécifications concernant les caractéristiques minimales que doivent présenter les données destinées à l'évaluation des risques présentés par les HEs sont généralement disponibles et doivent être utilisées. Il s'agit notamment des spécifications concernant le nombre d'espèces ou de souches, l'utilisation d'animaux des deux sexes, le choix des doses, la voie d'exposition et la taille des échantillons. En général, la source de données (études

publiées, études non publiées, données fournies par les entreprises, etc.) ne pose pas de gros problèmes dans la mesure où les études sont transparentes et où l'on peut prouver qu'elles ont été menées dans le respect des BPL et des procédures QA/QC.

Dans la mesure du possible, les études chez l'animal doivent non seulement mettre en évidence les effets indésirables potentiels chez l'homme, mais aussi fournir des informations sur la pertinence de ces effets pour l'évaluation du risque. Ces informations peuvent être fournies par des études qui caractérisent le mécanisme d'action, la relation entre la dose administrée et la dose effectivement délivrée, ainsi que par des études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. ^[67, 68]

II.1.3 Mesures toxicologiques

II.1.3.1 LD50 :

La LD50 ou dose létale 50 correspond à la dose d'une substance pouvant causer la mort de la moitié (50%) d'une population animale dans des conditions d'expérimentation précises, est une façon de mesurer le potentiel toxique à court terme (toxicité aigüe). Elle peut être influencée par plusieurs facteurs, tels que l'espèce animales, le sexe, l'âge, le régime alimentaire, la saison, etc. ^[69]

Cette dose permet d'identifier les symptômes de l'intoxication et de comparer les substances entre elles quant à leur potentiel toxique, elle sert souvent de point de départ des études de toxicité car elle fournit un minimum de connaissances. Mais elle n'est plus la méthode recommandée pour évaluer la toxicité en raison de l'éthique de l'utilisation d'un grand nombre d'animaux, et de la variabilité des réponses chez les animaux et les humains et de l'utilisation de la mortalité comme seul critère d'évaluation, donc les organismes de réglementation n'utilisent la DL50 que si cela est justifié par une nécessité scientifique et des considération éthique. ^[70]

En s'appuyant sur cette DL50, il sera possible de classer les molécules par niveau de toxicité. L'échelle de Hodge et Sterner permet ainsi de classer les toxicités en fonction des DL50 orale mesurées chez le rat. ^[16]

Tableau 3 : L'échelle de Hodge et Sterner

DL ₅₀ orale (rat)	Indice de toxicité
Jusqu'à 1 mg/kg	1 = extrêmement toxique
De 1 à 50 mg/kg	2 = hautement toxique
De 50 à 500 mg/kg	3 = modérément toxique
De 500 à 5 000 mg/kg	4 = légèrement toxique
De 5 000 à 15 000 mg/kg	5 = presque pas toxique
Plus de 15 000 mg/kg	6 = relativement inoffensif

Selon ce tableau, aucune huile essentielle n'appartient actuellement aux 2 premières catégories.^[16] Avec une DL₅₀ de 130 mg/kg, l'huile essentielle de Boldo (*Peumusboldus*) est la première HE à y faire son entrée. Il faut noter que des convulsions ont été observées chez le rat à une dose de 70 mg/kg. On trouve ensuite l'huile de Chénopode vermifuge (*Chenopodiumambrosioides*) avec une DL₅₀ chez le rat de 255 mg/kg. Quatre cas d'intoxication mortelle chez l'enfant ayant été recensés, il a été établi que la dose fatale chez l'homme était comprise entre 10 et 40 mg/kg. C'est pourquoi cette huile essentielle est règlementée par le code de la santé publique cité en première partie. Enfin, l'huile essentielle de Thuya (*Thujaoccidentalis*)^[70]

II.1.3.2 DMSENO ou NOAEL

Pour presque tous les types d'effets toxiques (organospécifiques, neurocomportementaux, immunologiques, cancérogènes épigénétiques...), on estime généralement qu'il existe une dose ou une concentration en dessous de laquelle aucun effet indésirable ne se produit : il existe un seuil de toxicité. L'objectif est alors de déterminer la dose ou la concentration en dessous de laquelle la probabilité de survenue de l'effet critique sera en théorie nulle : la dose maximale sans effet nocif observable (DMSENO ou NOAEL en anglais pour No Observed Adverse EffectLevel).

En pratique, il s'agit de la dose maximale n'induisant aucun signe de toxicité dans l'espèce animale la plus sensible et la plus appropriée et en utilisant l'indicateur de toxicité le plus sensible par rapport à un groupe d'animaux non exposés. Mais en réalité, cette dose n'est pas nécessairement une dose sans aucun effet. L'objectif est de déterminer la plus haute dose qui peut être administrée expérimentalement aux animaux sans observer l'effet critique choisi, car l'emploi d'un nouvel indicateur de toxicité ou l'utilisation d'un protocole expérimental plus

sensible (espèce animale différente, plus grand nombre d'animaux...) pourrait révéler un seuil de toxicité encore plus faible. ^[71]

II.2 Etude de la toxicité fondée sur des méthodes *in vitro*

Le terme *in vitro* s'oppose au terme *in vivo*, ces méthodes pouvant être complémentaires ou alternatives à l'expérimentation animale. Les méthodes *in vitro* sont de plus en plus utilisées. Leur facilité de mise en œuvre, leur isolement de tout contexte physiologique qui permet d'étudier un mécanisme d'action toxique, et surtout la possibilité d'utiliser des cellules humaines qui permettent de s'affranchir des différences inter espèces, en font un outil incontournable.

De nombreuses méthodes sont disponibles et applicables aux HE moyennant toute fois des adaptations méthodologiques compte tenu de leur très faible hydrosolubilité, de leur pouvoir bactéricide et de leur éventuelle toxicité. Du fait des spécificités des HE, une attention particulière doit être portée au choix des conditions expérimentales (concentrations à tester, solvants à utiliser, ...). ^[72]

Un certain nombre de tests ont été validés par l'ECVAM et/ou l'OCDE ou sont en cours de validation sachant qu'une méthode *in vitro* ne peut à elle seule mettre en évidence tous les aspects de la toxicité.

Chacune des méthodes ne peut explorer qu'un paramètre particulier, ceci implique donc le recours à un ensemble de tests dont le choix dépendra du domaine d'investigation. Les méthodes *in vitro* sont par nature incapables de couvrir tous les points d'impacts habituellement étudiés par l'expérimentation animale.

En cas de mélange d'HE, il conviendrait de réaliser certains de ces tests sur le mélange afin de s'assurer qu'il n'apparaît pas d'effet toxique majeur synergique ou antagoniste. ^[73]

II.3 Etude *in silico*

Ces méthodes, également appelées les SAR ou (Q)SAR pour (quantitative) structure-activity relationships, font appel à des outils informatiques, d'où leur nom « *in silico* ».

Ces deux catégories reposent sur des bases de données obtenues d'après des études *in vivo* ou *in vitro*, ou d'après des observations d'études cliniques, et les relient par des corrélations statistiques aux informations structurales.

La qualité des (Q)SAR dépend donc de la qualité de la base de données utilisée. Actuellement, ces

méthodes *in silico* jouent un rôle d'orientation pour l'évaluation de produits pour lesquels aucune donnée n'est disponible. [74]

La structure du produit à étudier est saisie grâce à un logiciel de dessin, et le programme applique les lois de relation structure-activité contenues dans le répertoire, ainsi que toutes les données toxicologiques. Le système prédit la toxicité du produit et fournit les éléments sur lesquels il se fonde pour cette prédiction (commentaires, références bibliographiques, données de toxicité...). Ceci permet à l'utilisateur de savoir dans quelle mesure il est en accord avec les prédictions, d'envisager des modifications de structure afin d'obtenir un produit moins toxique, et de conduire une étude bibliographique plus poussée si nécessaire.

L'utilisation optimale des méthodes *in silico* dans le cadre de REACH pourrait diminuer les besoins en animal de laboratoire de 1,3 à 1,9 millions. [72]

REACH prévoit que « les résultats de R(Q)SA peuvent être utilisés, lorsque les conditions suivantes sont réunies : les résultats sont issus d'un modèle R(Q)SA dont la validité scientifique a été établie, la substance relève du domaine d'applicabilité du modèle R(Q)SA, les résultats conviennent pour la classification et l'étiquetage et/ou pour l'évaluation des risques, et une description suffisante et fiable de la méthode appliquée est fournie » [75]

III Les précautions à prendre avec les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont entièrement naturelles, en vente libre, cela ne veut pas dire qu'elles soient dénuées de danger. Toutefois, il est important de savoir qu'elles sont très concentrées et doivent être utilisées avec précaution.

✿ Lors de l'achat :

L'achat des huiles essentielles doit se faire en pharmacie ou parapharmacie pour garantir la qualité de l'huile essentielle. Il est important aussi de garder la notice d'utilisation présente dans la boîte afin de garder en mémoire leurs propriétés, leurs contre-indications ainsi que leur toxicité. Le conditionnement d'huile essentielle avec des comptes gouttes peut éviter le surdosage.

✿ Lors du stockage :

Les huiles essentielles doivent être stockées avec une grande prudence.

Elles peuvent se conserver environ 4 ans après ouverture dans l'emballage d'origine (flacons en verre ambré) à l'abri de la lumière et de l'air ce qui permettra de les conserver dans de bonnes conditions, les HEs d'agrumes étant les plus sensibles à l'oxydation. [76]

✂ **Lors de l'utilisation :**

Lors de la première utilisation d'une huile essentielle, il faudra faire un test de tolérance, par exemple en mettant quelques gouttes au niveau du coude. Ce test devra être fait à chaque nouveau flacon, car d'un laboratoire à un autre, on peut avoir des réactions différentes. [77]

Pour éviter toute intoxication accidentelle, il faudra bien respecter le dosage ainsi que les conseils d'application de chaque huile essentielle, respecter les dilutions conseillées pour toute application cutanée pour éviter des irritations de la peau. Il est souvent conseillé de la mélanger avec une base végétale. [78]

Il faut faire attention aux interactions avec les traitements des patients. Les huiles essentielles peuvent interagir avec un médicament. Par exemple, l'huile essentielle d'ail stimule la thyroïde alors que celle de fenouil diminue son activité. Toutes les HEs sont déconseillées aux femmes enceintes et allaitant, et aussi aux enfants de moins de 8 ans. [34]

IV. Précautions d'emplois

Outre les recommandations figurant dans la partie précédente pour chaque voie d'administration, il sera décrit ci-dessous les précautions d'emplois concernant chaque famille biochimique de molécules contenues dans les HEs.

• **Les monoterpènes**

- Ne pas appliquer pur pour éviter toute irritation cutanée ou muqueuse ;
- Ne pas utiliser de doses trop fortes ou sur de trop longues périodes pour éviter une possible néphrotoxicité par voie orale.

Molécules : Limonène, α et β pinène

HEs : Pin sylvestre, sapin, genévrier

• **Les phénols**

- Ne pas utiliser à forte dose car ils sont excitants ;
- Limiter l'utilisation cutanée pour éviter de possibles irritations, sinon diluer dans une huile végétale ;
- Hépatotoxiques à doses élevées et répétées.

Molécules: thymol, carvacrol, eugénol

HEs :Thym, sarriette, girofle

- **Les monoterpénols**

- Menthol contre-indiqué avant 6 ans (risque de spasme laryngée potentiellement mortel) et chez les femmes enceintes ;

- Contre-indication en cas de calculs biliaires (menthol) ;

- Ne pas appliquer sur de grandes surfaces.

Molécules : linalol, géraniol, α -terpinéol, menthol, bornéol

HEs : bois de rose, palmarosa, arbre à thé, menthe poivrée.

- **Les alcools sesquiterpéniques :**

- Déconseillés en cas de cancer hormono-dépendant

Molécules : bisabolol ; viridoflorol, cédrool

HEs : matricaire, niaouli, cyprès

- **Les aldéhydes**

- Ne pas utiliser à des concentrations supérieures à 10% pour un usage cutané ;

- Ne pas diffuser ;

- Contre-indiqués avant 8 ans et chez la femme enceinte.

Molécules : aldéhyde cinnamique, aldéhyde cuminique

HEs : cannelle, cumin

- **Les cétones**

- Ne pas utiliser à fortes doses ou de façon répétée même par voie aérienne pour éviter les effets neurotoxiques ;

- Toutes voies contre-indiquées chez la femme enceinte ou allaitante et les bébés.

Molécules : carvone, menthone, pipéritone, camphre, thuyone, pinocamphone

HEs : Carvi, Menthe poivrée, Romarin, Sauge officinale, Hysope

- **Les esters :**

- Ils peuvent causer un dessèchement des téguments s'ils sont utilisés de façon régulière : les diluer dans une huile végétale permettra d'atténuer cet effet.

- Le salicylate de méthyle de Gaultheria procubens est irritant pour la peau, de plus il présente un risque d'allergie chez les personnes sensibles à l'aspirine.

Molécules : salicylate de méthyle, acétate de linalyle, acétate de géranyle

HEs : gaulthérie, lavande, hélichryse

- **Les éthers :**

Certains exposent à un risque de troubles neurosensoriels comme l'anéthol, l'apiol, la myristicine. Ces deux dernières molécules conduisent à la formation de molécules de type amphétaminique provoquant surexcitation, ivresse alcoolique et convulsions. L'apiol et la myristicine ont aussi un effet abortif à dose élevée. Ainsi les éthers ne seront utilisés qu'à dose faible et ils sont contre-indiqués chez la femme enceinte, allaitante et le nourrisson.

Molécules : méthyleugénol, trans-anéthol, apiol, myristicine, méthylchavicol

HEs : laurier noble, anis, badiane, persil, noix de muscade, basilic, estragon

- **Les oxydes :**

- Le 1,8-cinéole est épiléptogène à dose élevée. Il est donc contre-indiqué aux épiléptiques et chez les enfants de moins de 3 ans ;

- Ils dessèchent les voies respiratoires et sont mal tolérés par les asthmatiques ;

- L'ascaridol du chénopode vermifuge (réglementé) est toxique pour le système nerveux central.

Molécules : 1,8-cinéole, linalol oxyde

HEs : Eucalyptus globuleux, Eucalyptus radié

- **Les coumarines :**

Il faudra veiller à ne pas s'exposer au soleil car elles sont photo sensibilisantes. Les pyrano coumarines sont hépatotoxiques et carcinogènes.

Molécules : coumarine, bergaptène, angelicine, psoralène

HEs : essences de citrus, angélique

- **Les lactones :**

- Dermocaustiques et allergisantes ;

- Neurotoxiques : contre-indication chez la femme enceinte et allaitantes ainsi que chez les jeunes enfants avant 6 ans.

Molécules : alantolactone, santonine

HEs : camomille noble, laurier noble

- **Les composés soufrés :**

- Ne pas appliquer sur la peau

- Ne pas diffuser

Molécules : isothiocyanate d'allyle, butyl-propényldisulfide

HEs : moutarde, ail, oignon

- **Les composés azotés :**

- Photo sensibilisants

Molécules : N-méthylanthralinate de méthyl

HEs : mandarine rouge ^[16]



CHAPITRE 3
ANALYSE DES
RESULTATS



I Rendement de l'HE extraite des racines

La moyenne des rendements des extraits de l'HE par hydrodistillation des racines de la *Carthamus caeruleus* L. sont presque identiques, il est bien évident que la *Carthamus caeruleus* L. renferme peu d'HE [0.02-0,21%]. Cette différence pourrait être expliquée par le choix de la période de récolte car elle est primordiale en termes de rendement et qualité de l'HE. Le climat, la zone géographique, la génétique de la plante, l'organe de la plante utilisé, le degré de fraîcheur, la période de séchage, la méthode d'extraction employée, etc. Ce sont des facteurs entre autres qui peuvent avoir un impact direct sur le rendement en HE. S'il est difficile d'expliquer l'origine de ces variations au fil des saisons, elles montrent néanmoins, qu'il est possible de connaître les variations dans la composition chimique d'une huile essentielle à travers les saisons et donc de définir le meilleur moment pour la récolte.

II Propriétés chimiques et physiques

Pour le contrôle de leur qualité, on prescrit la détermination d'un certain nombre de constantes physiques : densité et indice de réfraction, ainsi qu'une étude chimique qui concerne la détermination des indices : d'ester, de peroxyde, d'iode, d'acide et de saponification.

Les résultats obtenus de l'analyse de l'extrait huileux des racines de *C. caeruleus* ; sont résumé dans le tableau suivant :

Tableau 4 : Résultats des indices de l'extrait huileux des racines de *C. caeruleus*.^[79]

Indice d'acide	2.24 mg KOH/g
Indice de saponification	151.47 mg KOH/g
Indice d'ester	149.23 mg KOH/g
Indice de peroxyde	2.05 meq d'O ₂ /kg
Indice de réfraction	1.471
Densité	0.919

III Caractérisation phytochimique

III.1 Screening phytochimiques

Le screening phytochimique a permis de nous renseigner sur les familles chimiques produites par les racines de *Carthamus caeruleus*. Les résultats obtenus sur une étude réalisée à l'Université Mouloud Mammeri sont résumés dans le tableau 5 :

Tableau 5 : Résultats de test phytochimique sur la plante *Carthamus caeruleus* L. ^[11]

Substances	Précipitation ou une coloration par des réactifs spécifiques
Tanins totaux	+++
Tanins catéchiques	-
Tanins galliques	++
Flavonoïdes	+++
Anthocyanes	+++
Leucoanthocyanes	+++
Sénosides	+++
Amidon	+
Quinones Libres	+++
Saponosides	+++
Alcaloïdes	-
Glucosides	+++
Mucilage	+++
Iridoïdes	-
Coumarines	+++

(-) : absence de substance ; (+) : faible présence de substance ; (++) : Moyenne présence de substance ;
(+++): Forte présence de substance

Selon ces résultats, on remarque que les racines de *Carthamus caeruleus* sont très riches en tanins totaux, tanins galliques, flavonoïdes, saponosides, mucilages, anthocyanes, leucoanthocyanes et coumarines, ce qui confère à la plante des vertus médicinales importantes à valoriser soit antioxydantes, anti-inflammatoires, inhibiteurs d'enzymes, antiallergiques, antiulcérogènes, et effets protecteurs vasculaires, antimicrobiens, antitumoraux, antisécréteurs et antidiarrhétiques hypotenseurs, aphrodisiaques et une activité cicatrisante des plaies.

Les résultats de la présente étude sont en accord avec ceux déjà cités ^[80] ayant signalés la richesse des racines de *Carthamus caeruleus* récoltée à Boumerdes en tanins galliques, flavonoïdes, saponosides et en mucilages

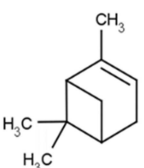
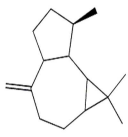
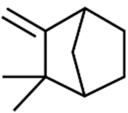
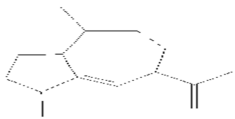
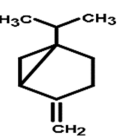
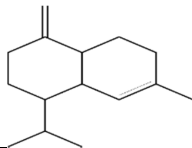
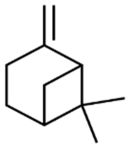
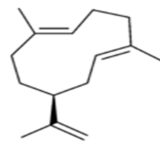
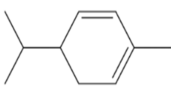
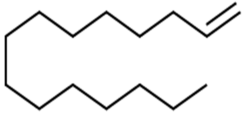
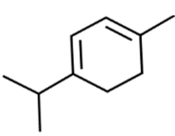
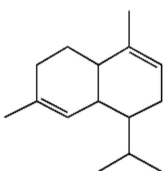
III.2 Caractérisation chromatographique couplée à la spectroscopie de masse

III.2.1 Huiles essentielles

Les résultats de l'analyse par CG/SM de l'huile essentielle de *Carthamus caeruleus* extraite par hydrodistillation à montré une richesse en composé bioactives, elle a permis d'identifier 32 constituants, représentant 95,23% de la composition totale de l'HE. Les résultats sont reportés dans le tableau suivant ^[81]

L'étude montre une prédominance du méthyl linoléate (77,69 %), suivi de pentadécène (3.06 %), trans- β -farnesene (2.92 %), transcaryophyllène (2.01 %), caryophyllène oxyde (1.40 %), δ -cadinène (1.25 %) et le cadina-1,4-diène (1.00 %), les autres composés sont à l'état de traces.

Tableau 6 : Composition chimique de l'huile essentielle de la *Carthamuscaeruleus*

N°	Composés	Structure	%	N°	Composés	Structure	%
1	α -pinène		0.05	17	Allo aromadendrene		0.11
2	camphène		0.01	18	γ -gurjunène		0.09
3	sabinène		0.02	19	γ -muroène		0.48
4	β -pinène		0.02	20	D germacrène		0.36
5	α -phellandrène		0.31	21	pentadecène		3.06
6	α -terpinène		0.11	22	α -muroène		0.38

N°	Composés	Structure	%	N°	Composés	Structure	%
7	p-cymene		0.05	23	γ -cadinène		0.76
8	β -phellandrene		0.09	24	δ -cadinène		1.25
9	γ -terpinene		0.04	25	cadina-1,4-diène		1.00
10	Cyclosativene		0.47	26	α -cadinène		0.16
11	α -copaène		0.69	27	β -calacorène		0.05
12	sativène		0.04	28	Oxyde de caryophylène		1.40
13	Cyperène		0.42	29	Acide linoléique		0.14
14	α -Gurjunène		0.39	30	8-epi- γ -eudesmol		0.21
15	Transcaryophyllène		2.01	31	méthyl linoléate		77.69
1	trans- β -farnesene		2.92	32	heptadecene		0.45

L'acide α -linoléique est un acide gras polyinsaturé de la famille des Oméga-3. Les bienfaits des Oméga-3 sur la santé cardiovasculaire et sur le système nerveux ne sont plus à prouver. L'acide linoléique est uniquement présent dans le règne végétal. Non synthétisé par l'organisme, il doit être entièrement fourni par l'alimentation.

Le linoléate de méthyle est un ester méthylique d'acide gras qui dérive de l'acide α -linoléique, joue un rôle de métabolite de plante et d'attractif pour les insectes. Il pourrait être utilisé comme un anti-mélanogénèse (produit dépigmentant pour la peau) et aussi comme agent de blanchiment dans les cosmétiques et est un potentiel traitement des troubles d'hyperpigmentation en clinique ^[82].

En contrepartie, la molécule d'octanoate de méthyl est très irritante pour la peau, ceci doit nous mettre en garde contre l'utilisation directe de l'HE de la plante sur la peau, une fois qu'elle a été exposée à l'air et à la chaleur. Ajoutant à cela la présence du pentadécène qui est un hydrocarbure de la famille d'acyle gras, un composé très irritant pour la peau et les yeux même à de faible quantité. ^[85]

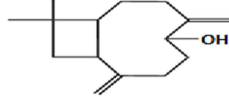
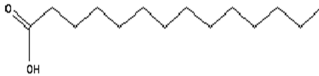


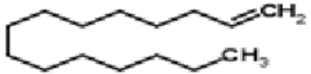
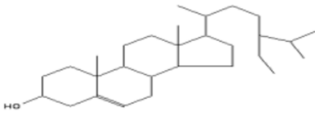
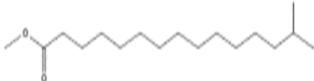
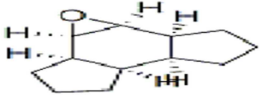

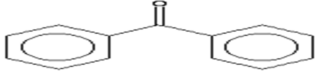
Peu d'études ont été réalisées sur la composition chimique en huile essentielle, vu le faible rendement en huile essentielle et la période limitée de la floraison de cette plante. Les racines sont généralement la partie qui contient le moins d'huile essentielle ce qui rend la période d'étude sur la *Carthamuscaeruleus* très limitée. Tous les travaux entrepris jusqu'à présent sont sur des extraits de solvant alcoolique ou organiques.

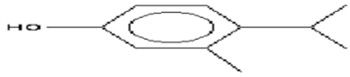
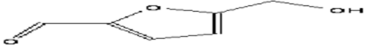

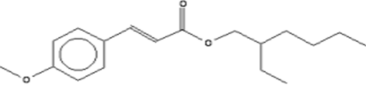
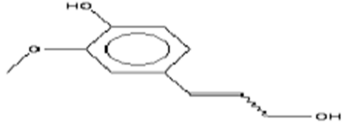
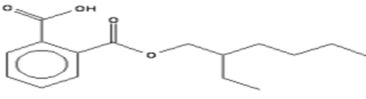
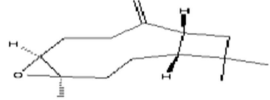
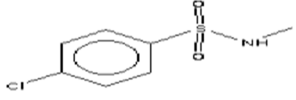

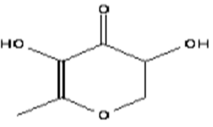

III.2.2 Extraits par solvants

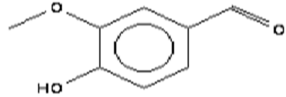
Les résultats de l'analyse par CG/SM de l'extrait méthanolique de *Carthamuscaeruleus* qui ont été déjà obtenus a montré une richesse en composé bioactives, elle a permis d'identifier 24 constituants, représentant 90% de la composition totale de l'extrait néanmoins la composition en pourcentage reste inconnus. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 7:

Parmi les molécules identifiées, l'acide n-Hexadécanoïque (acide palmitique) et l'acide 9,12-octadécadiénoïque (acide linoléique) et Acide (E,E)-9,12-Octadécadiénoïque, méthyl ester (linoléate de méthyl). Ces composés sont des métabolites secondaires connus comme ayant de nombreuses propriétés biologiques, en particulier l'effet antimicrobien, anti-inflammatoire, hypocholestérolémiant, préventif du cancer, hépatoprotecteur et antioxydant ^[84]

Tableau 7 : Composés chimiques de l'extrait de la *Carthamus. caeruleus*^{11]}

Composés chimiques	Tr (min)	Structure
Caryophylla-3(15),7(14)-dien-6-ol	23,76	
Acide Tetradecanoïque (Acide myristique)	25,93	
Acide (Z,Z)- Octadeca-9,12-dienoïque (Acide linoléïque)	32,08	
Acide Hexadecanoïque (Acide palmitique)	29,43	
Pentadecene	20,62	
γ -Sitosterol	44,02	
Methyl iso hexadecanoate	28,7	
(7R,8S)-cis-anti-cis-7,8-Epoxytricyclo [7.3.0.0(2,6)] dodecane	27,34	
Acide (E,E)-9,12-Octadecadienoïque, methyl ester (Methyl linoléate)	31,41	
Benzophenone	23,58	

3-Methyl-4-isopropylphenol (o-cymen-5-ol)	16,53	
Composés chimiques	Tr (min)	Structure
2-Furancarboxaldehyde, 5-hydroxymethyl (5-Hydroxymethylfurfura)	15,06	
Furfural	4,9	
2-Propenoic acid, 3-(4-methoxyphenyl)-, 2-ethylhexyl ester (Octinoxate)	34,54	
Coniferol	25,64	
1,2-Benzenedicarboxylic acid, mono(2-ethylhexyl) ester (mono (2-éthylhexyl) phthalate)	37,65	
Caryophylleneoxide	22,8	
4-Chlorobenzenesulfonamide, N-methyl	28,3	
Cyclodecene	26,07	
2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one (pyranone)	12,86	
9-Tetradecenal, (Z)	29,04	

Vanillin	18,78	
----------	-------	---

On remarque que l'huile essentielle présente comme composé majoritaire linoléate de méthyle (9, 12, 15 Octadécatriénoïque, méthyl ester) et la présence de l'acide linoléique (9, 12, 15 Octadécatriénoïque), par contre dans l'extrait on parle de l'acide linoléique et de linoléate de méthyl.

Une étude antérieure réalisée à l'Université de Boumerdes des huiles essentielles des racines de la *Carthamuscaeruleus* par GC/MS (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse) a montré la présence de l'acide n-hexadécanoïque (acide palmitique), le mono (2-éthylhexyl) phtalate (MEHP), le 5- (hydroxyméthyl) -2-furancarboxaldéhyde (5-HMF) et le 8-méthylène-3-oxatricyclo [5.2. 0,0 (2,4)] nonane. ^[82]Des composés non identifiés dans notre huile essentielle.

La différence dans d'identification dans l'huile essentielle et l'extrait est du certainement à la similitude des deux acides gras polyinsaturés et de leurs esters, sachant qu'ils se différencient uniquement par le nombre d'insaturation l'un et « diène » et l'autre « triène ». Néanmoins, les deux acides gras polyinsaturés sont des facteurs nutritionnels essentiels car ils ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent lui être apportés par l'alimentation. Ce sont des acides gras indispensables : acide linoléique et acide linoléique.

IV Activités biologiques

IV.1 Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante d'huile essentielle a été évaluée au moyen du test DPPH, il est généralement présentée par la valeur IC₅₀ (la concentration de l'extrait nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH) ; calculée pour chaque extrait de la *Carthamus caeruleus* L) ainsi que celle de l'acide ascorbique (référence), elle permet de les classer entre eux. Plus l'IC₅₀ est petite, plus la molécule est antioxydante. Le changement de couleur de violet vers le jaune indique la présence d'une activité antioxydante.

Les valeurs obtenues des pourcentages d'inhibition IR% et les concentrations efficaces inhibitrices sont présentées dans le tableau 8

Tableau 8 : Activité antioxydante et pourcentage d'inhibition du radical DPPH.

Solvant	Concentration	IR%	IC ₅₀ ± DS(µg/ml)
Méthanol	125	46	125,171
	250	64	
	500	95	
Ethanol	125	65	-
	250	73	
	500	82	
Ethanol-eau	10	7,9	29,049
	20	26	
	25	38	
	50	99	
Acide ascorbique	25	77	14
	50	83	
	100	97	

Les valeurs signalées montrent un effet inhibiteur plus puissant de l'extrait éthanol-eau avec plus de 99 % d'inhibition pour une concentration de 50 µg/mL par rapport à l'acide ascorbique dont le pourcentage d'inhibition est de 83% pour la même concentration. Tandis que les extraits à l'éthanol et méthanol n'excèdent pas 50% pour une concentration de 125 µg/mL.

La IC50 des 3 solvants utilisés sont représentées dans la figure

Figure 10 : Les résultats d'IC50 obtenus pour différents solvants ^[46]

L'extrait de l'éthanol a la valeur IC50 la plus basse, il présente une meilleure efficacité donc une meilleure inhibition. L'activité antioxydante très élevée des extraits d'éthanol pourrait être le résultat de ses composants phénolique, ou les sesquiterpènes, flavonoïdes ou acides chlorogénique.^[86]

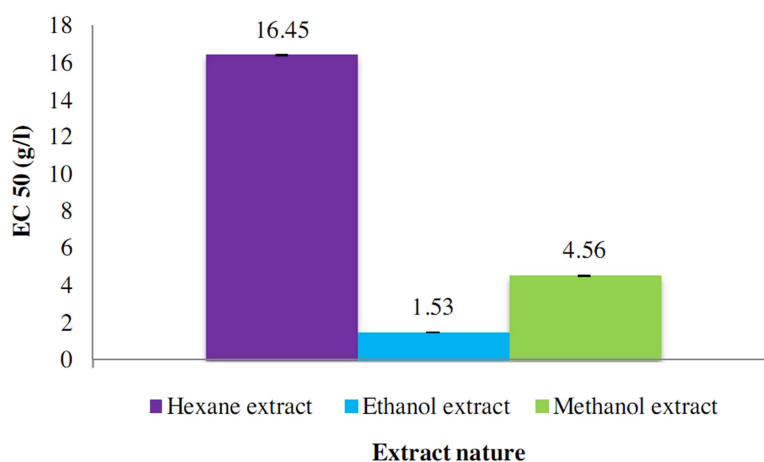
Les interactions synergiques entre les différents constituants d'une huile essentielle sont à l'origine d'un pouvoir antioxydant beaucoup plus important. En effet, certains composés autres que les composés phénoliques tels que le γ -terpinène possèdent aussi une forte activité antioxydante.^[87]

IV.2 Etude antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits et de l'huile essentielle de la plante a été faite par la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller Hinton agar, elle est traduite par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre.

Le diamètre (mm) des zones d'inhibition des différents extraits et de l'huile essentielle des racines de *Carthamus caeruleus* obtenu est mentionné dans le tableau 9 suivant :

Tableau 9 : Diamètre des zones d'inhibition des extraits et de l'huile essentielle des racines



de *Carthamuscaeruleus*.

Souches bactérienne	Extrait	Zone d'inhibition (mm)	Remarque
<i>Staphylococcus aureus</i>	HE	108	Très forte inhibition
	Méthanol	16	Moyenne inhibition
	Ethanol	14	Légère inhibition
	Ethanol-Eau	8	Pas d'inhibition
<i>Escherichia coli</i>	HE	12	Légère inhibition
	Méthanol	-	-
	Ethanol	6	Pas d'inhibition
	Ethanol-Eau	-	-

Ces résultats montrent que l'huile essentielle des racines de la *Carthamus caeruleus* présente une puissante activité inhibitrice sur la souche *staphylococcus aureus* avec un diamètre d'inhibition très grand (108 mm).

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, aldéhydes) et les effets synergiques entre les composants. Ainsi les composés chimiques les plus efficaces et qui possèdent un large spectre d'action antimicrobienne sont les phénols (thymol, carvacrol et eugénol), les alcools (α -terpinéol, terpinen-4-ol, menthol, géraniol, linalol), les aldéhydes (géraniol, citral et néral), les cétones (carvone, pulégone et camphre) ^[88]

IV.3 Test de la toxicité aigüe

Le test a été réalisé sur un effectif de 5 souris pesant (35 ± 5 g) réparties en deux lots. Chaque lot reçoit par voie orale la solution test à deux doses différentes :

Lot 1 : Reçoit l'extrait aqueux de *C. caeruleus* à la dose de 300 mg/Kg .

Lot 2 : Reçoit l'extrait aqueux de *C. caeruleus* à la dose de 600 mg/Kg .

Les résultats obtenus, sont reportés dans le tableau 10 ^[83]

Tableau10: Test de toxicité de l'extrait des racines de la *C caeruleus* au cours des 24 heures

Lots (1)	intoxication (300 mg /kg de P .C)	Lots (2)	intoxication (600 mg /kg de P .C)
----------	---------------------------------------	----------	---------------------------------------

Souris 1	–	Souris 1	–
Souris 2	–	Souris 2	–
Souris 3	–	Souris 3	–
Souris 4	–	Souris 4	–
Souris 5	–	Souris 5	–

Ces résultats montrent que l'administration orale de l'extrait aqueux des racines de *Carthamus caeruleus* L aux doses de 300 et 600 mg/kg de P.C aux souris n'a induit aucun signe de toxicité aigüe au cours des 24 heures d'observation (de comportement des animaux, coma, mort ...).

IV.4 Activité cicatrisante des *Carthamus caeruleus* :

Une étude a été réalisée au laboratoire de pharmacotoxicologie du Centre de Recherche et Développement du groupe Sidal (CRD) sur des rats wistar dont le poids moyen est de 263 ± 33 g. Les rats, répartis en 5 lots selon le tableau 11, ils sont anesthésiés par une injection intramusculaire de la kétamine® HCL à raison de 100mg/kg, Les poils du dos de l'animal ont été rasés avec une tondeuse. Ensuite, une plaie d'un diamètre de 19.65 mm a été effectuée. Les quatre lots sont respectivement traités avec de la (Biafine®), Pommade à base de l'HE, Pommade à base d'extrait hydro-éthanolique et la Crème traditionnelle. Les applications sont faites de façon quotidienne, pendant 21 jours

Tableau 11 : Constitution des lots d'animaux ^[81]

Lots	Lot témoins	Lot référence	Lot essai 1	Lot essai 2	Lot essai 3
Quantité	5 rats	5 rats	5 rats	5 rats	5 rats
Produit utilisé	Aucun traitement	(Biafine®)	Pommade à base de l'HE	Pommade à base d'extrait hydro-éthanolique	Crème traditionnelle

L'interprétation des observations est basée sur la comparaison de l'évolution de la surface des plaies à l'aide d'un logiciel de traitement d'image (Mesurim®). Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 11

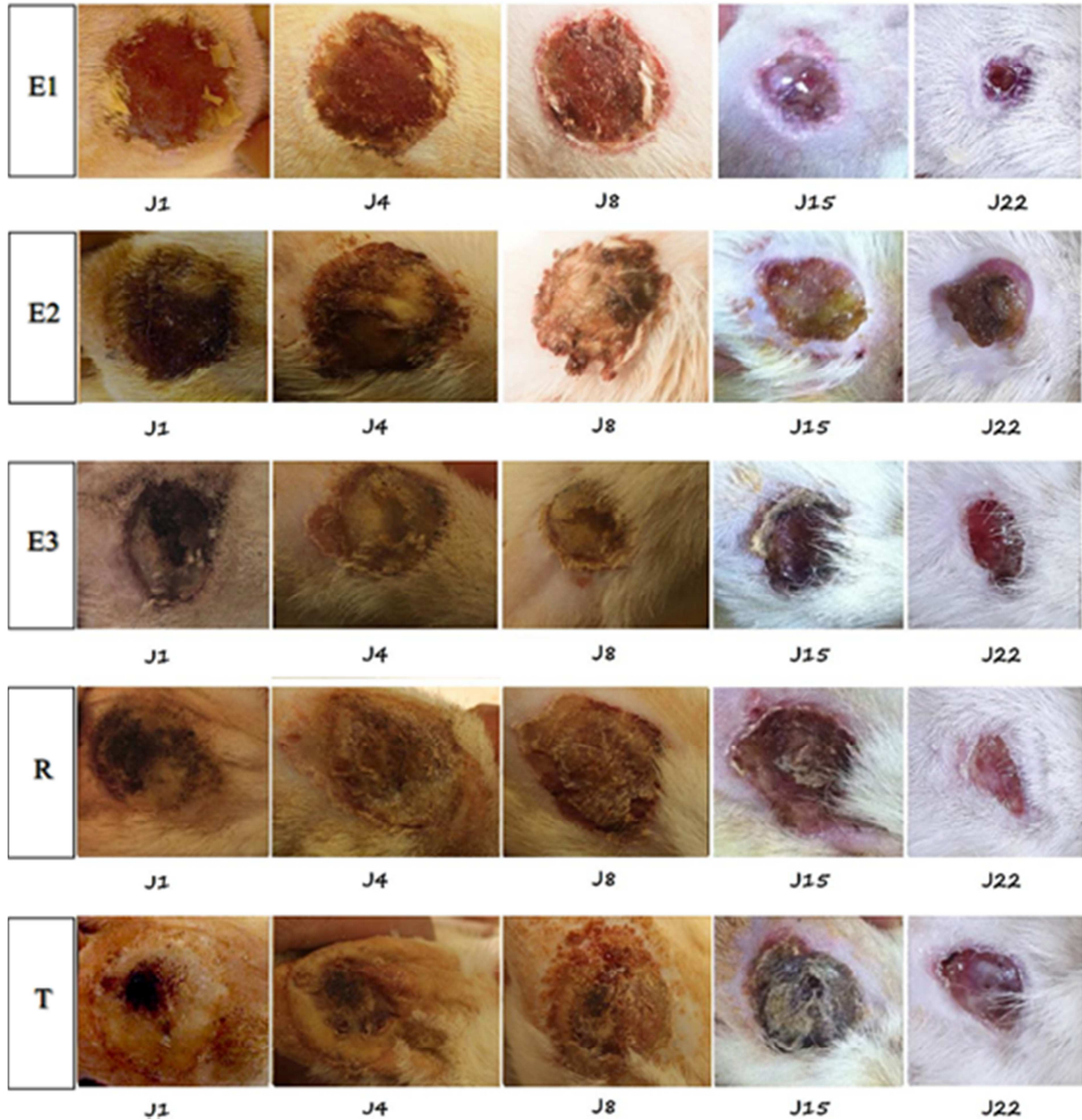


Figure 11 : Evolution des plaies des différents lots dans le temps.^[82]

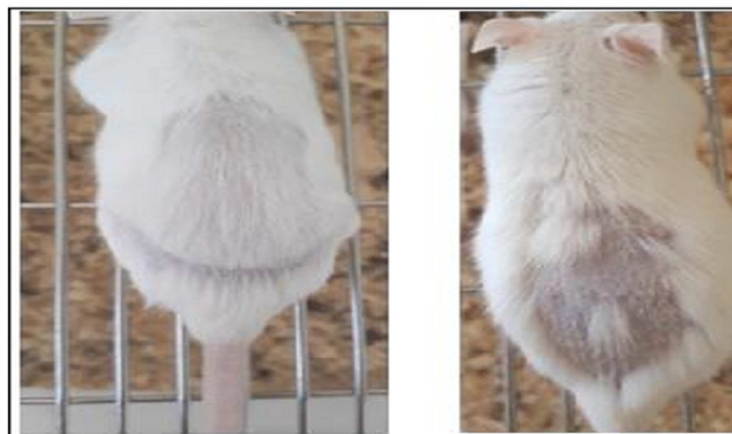
Les résultats montrent que toutes les plaies ont enregistré une réduction progressive de leurs tailles avec le temps. Néanmoins, la pommade issue des racines de *Carthamuscaeruleus*L montre une accélération du processus de cicatrisation en comparaison avec les témoins (E2,

E3, R et T), l'un des premiers facteurs qui a nettement accéléré la cicatrisation des plaies de lots E1, est étroitement liée à l'effet antibactérien de l'HE et à la composition de l'huile

IV.5 Evaluation de l'effet de *Carthamus caeruleus* sur la repousse de poils

L'étude a montré que l'extrait des racines de *Carthamus caeruleus*, a un effet puissant sur la croissance des poils des rats.

Les résultats des tests de croissance des poils in vivo ont fait ressortir que la *Carthamus caeruleus* contribue à l'induction de la phase anagène de la croissance des poils chez le modèle animal, comparativement au lot témoin ; Sur les six rats traités avec la *Carthamus caeruleus* Lon a 50% qui ont récupéré leurs poils entièrement contrairement aux lots témoins qui n'ont aucun cas de repousse de poils.



C. caeruleus

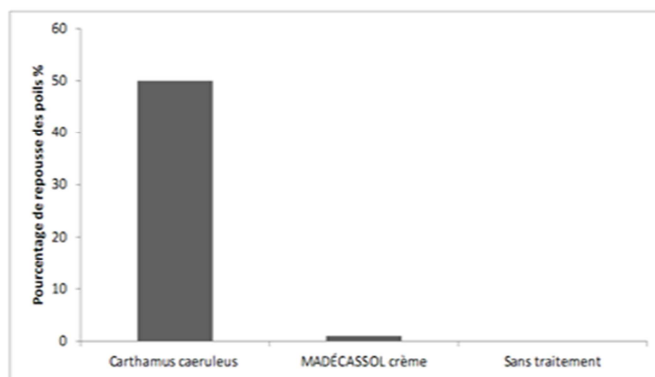
Témoin

Figure 12 : Effet de l'extrait de la *Carthamus caeruleus* sur la croissance des poils.

Figure 13 : Effet de la *Carthamus caeruleus* et du Madécassol sur la repousse des poils

Un certain nombre de chercheurs ont montré que les flavonoïdes ont une activité sur la croissance des cheveux par le renforcement de la paroi du capillaire des petits vaisseaux sanguins alimentant les follicules pileux ; ces composants améliorent la circulation sanguine favorisant ainsi la croissance des poils [89].

Le screening phytochimique des racines de la *Carthamus caeruleus* a montré une richesse remarquable de cette plante médicinale en flavonoïde.



CONCLUSION

Le *Carthamus Caeruleus* a montré une grande efficacité, dans le cadre d'une médication traditionnelle. ses huiles essentielles présentent de nombreuses vertus thérapeutiques.

Mais au-delà du bénéfice procuré par les huiles essentielles, on peut toutefois se rendre compte qu'au fil des rapports mentionnés et des études analysées, il existait des risques de toxicité. Malgré que dans la plupart des études citées, les doses nécessaires à l'apparition d'une toxicité sont très élevées.

Les HE peuvent donc être à l'origine d'intolérances locales (irritation, sensibilisation et phototoxicité) voire d'effets systémiques indésirables. Leur composition chimique et leur toxicité varie suivant de nombreux critères : origine géographique de la plante (altitude, composition du sol, ensoleillement), partie utilisée, maturité de la plante récoltée, ...

La composition chimique des huiles essentielles est très variée et très complexe, la question de l'évaluation du risque lié à leur emploi se pose, car les nombreuses publications scientifiques disponibles ne décrivent bien souvent que la toxicologie de l'un ou l'autre des constituants à l'état pur des HE. Peu de travaux toxico-cliniques de valeur ont été effectués avec des HE dont le profil chimique complexe avait été préalablement déterminé avec précision.

Pour remédier à ces intoxications, ou les diminuer au maximum, les huiles essentielles doivent répondre à des normes d'assurance qualité internationale, et il est important de les utiliser avec précaution pour toutes les voies d'administration que ce soit par voie orale ou externe.

Toutefois, la médecine "naturelle" n'est pas pour autant synonyme de médecine sans danger. La sécurité que les consommateurs pensent trouver dans les produits d'aromathérapie n'est en effet, que toute relative. Pour ce faire, une connaissance approfondie du circuit de production ainsi que des règles et de la législation qui l'entoure est indispensable. L'analyse de nombreuses études déjà réalisées sur le sujet a permis, d'explorer de façon détaillée la toxicité des huiles essentielles, donnant ainsi les clés nécessaires à leur utilisation rigoureuse en pratique courante.

*Références
bibliographiques*

- [1] Beniston, N.W. 1984. Fleurs d'Algérie. Entreprise nationale du livre. Algérie.
- [2] Lamarck, J.B. et Marie, J.L. 1785. Encyclopédie méthodique botanique. Clément Plomteux : France.2.
- [3] Murthy I et Anjani K. 2008. Fatty acid composition in *Carthamus* species.7th international safflower conference, Australie
- [4] Flore, la flore électronique de Tela Botanica. *Carthamus caeruleus* L.www.tela-botanica.org
- [5] Boullard B. 2001. Physiologie végétale. De Boeck Supérieur. 1éd
- [6] Pastrokos G. 2018. *Carthamus caeruleus* L. Cardueae, Asteraceae, a new record for rodos Island, Greece. Parnassiana archives. www.wildgreeceditions.com/parnassiana-archives. P: 11-13
- [7] Ferhat A, Belhadj M. 2016. Evaluation de l'activité cicatrisante et de l'effet anti-inflammatoire de *Carthamus caeruleus* L, Master. Université de Boumerdes.
- [8] Karima S. 2015. Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de *Carthamus caeruleus* L et de *Plantago major* L, Doc. Université de Sétif.
- [9] Suman S, 2010. Phytochemical investigation of *Sonchus oleraceus* leaves and *Citrullus colocynthis* root. J Herbal Med Toxicol. 4:159–162
- [10] Arroudj L et Zitoune C.2017. Evaluation des activités biologiques d'une plante médicinale local *Carthamus Caeruleus* L. Master. Université de Bejaia.
- [11] Dahmani M. 2019. Evaluation de l'activité biologique des polyphénols de *Carthamus caeruleus* L (Asteraceae). Doc. Université de Boumerdes.
- [12] Article sur les huiles essentiels. (En ligne) : http://fr.labohevea.com/downloads/HE_fr.pdf.
- [13] Danièle F. 2014. Ma bible des huiles essentielles. Paris. Quotidien malin
- [14] Herboristerie Bardou. Critères de qualité des huiles essentielles chémotypées [En ligne]. Disponible sur : <http://www.herboristeriebardou.com.fr>
- [15] Biotechnologie végétale. Les huiles essentielles 2012. Disponible sur : <http://mirabiotechnologievegetale.blogspot.com>
- [16] Poirot T. 2016. Bon usage des huiles essentielles, effets indésirables et toxicologie. Doc. Pharmacie. Université de lorraine.
- [17] Bousbian. 2011. Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Doc. Ecole Nationale Supérieure Agronomique.

- [18] Tuley D.S. 1995. A Manual On The Essential Oil Industry. Flavour and fragrance journal. UNIDO.12 :3
- [19] Zingiber officinale rose. L'extraction de l'huile essentielle. Gingembre-monsite.com
- [20] Dahmani N., 2010. Etude de la composition chimique de l'Artemesiaherba-alba poussant en Algérie. Doc. Université USTHB.
- [21] Dorosso S.J. 2002. Composition chimique des huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone soudanienne du Burkina Faso : valorisation. Doc. Université Ouagadougou.
- [22] Rayaud J. 2006. Prescription et conseil en aromathérapie. Ed. Tec. Tavoisier, p: 96
- [23] Abbes A. 2014. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles d'ammoidesverticillataNoukha de la région de tlemcen.Master. Universités Tlemcen
- [24] Chouiteh O. 2012. Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de Glycyrrhizaglabra. Doc. Université d'Oran.
- [25] Hesas T &Simoud S. 2018. Contribution à l'étude de la composition chimique et à l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de Thymus sp. Doc. Médecine. Université de tiziouzou.
- [26] Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D &Idaomar M.2008. Biological effects of essential oils.Food and ChemicalToxicology, 46 : 446-475
- [27] Franchomme P., Jollois R &Pénoel D. 2001. L'aromathérapie exactement : Encyclopédie de l'utilisation des extraits aromatiques. Paris : Éditions Roger Jollois.
- [28] Khenaka K. 2011. Effets de diverse plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogèneseruminale chez l'ovin. Magister : microbiologie. Université de Constantine 1.
- [29] Benabdelkader T. 2012. Biodiversité, Bioactivité et Biosynthèse des composés terpéniques volatils des Lavandes Ailées, Lavandulastoechas Sensu Lato, un complexe d'espèces Méditerranéennes d'intérêt pharmacologique. Doc. Ecole Normale Supérieure de Kouba et Université de Saint-Étienne.
- [30] Duval L.2012. Les huiles essentielles à l'officine. Doc. Université de Rouen.
- [31] Haddad D & Hadji D. 2016. Contribution à l'étude de l'huile essentielle de Myrtuscommunis L. Doc. Université de Tizi-Ouzou.
- [32] Kaloustian J & Hadji-Minaglou F. 2012. La connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie. Paris : Editions Springer.
- [33] Caractérisation des huiles essentielles de trois plantes aromatiques. Disponible sur le site : www.memoireonline.com)

- [34] Benhaoua S. 2016. Activité antioxydante et analyse chimique des acides gras et des insaponifiables de *Carthamus caeruleus*. Master : Chimie. Université de Tlemcen.
- [35] Bellabes R. 2018. Recherche de nouveaux principes actifs présents dans cinq plantes de la famille des Asteraceae. Doc : chimie. Université de Tlemcen
- [36] Laboratoire pluridisciplinaire de criminalistique. Chromatographie en phase gazeuse. Consulté le 27/07/2020.<https://www.lpc-expert.fr/instrumentation/27-chromatographe-en-phase-gazeuse>
- [37] Antonot E., Marchal R & Ueber J. 1992. Une chromatographie que l'on peut porter. *Journal of Chemical Education*, p :877-978
- [38] Yamaguchi T., Takamura H., Matoba T & Terao J. 1998. HPLC for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 62: 1201-1204
- [39] Singh P., Srivastava B., Kumar A., Kumar R., Dubey N K & Gupta R. 2008. *J. Sci. Food Agric*, 88 : 2421
- [40] <https://www.lpc-expert.fr/instrumentation/27-chromatographe-en-phase-gazeuse>
- [41] Chaker E K. 2010. Caractéristique chimiques et biologique des extraits de plantes aromatiques oubliées de midi-pyrénées. Doc, Université de Toulouse.
- [42] Baudoux D. 2012. L'aromathérapie : se soigner par les huiles essentielles. Editions Amyris, ISBN : 9782930353616
- [43] Mutai C., Bii C., Abatis D & Roussis V. 2009. Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupanetripenes-. *Journal of Ethnopharmacologie*. 123(1) :143-8
- [44] Courtial S. 2005. Précis d'aromathérapie vétérinaire à l'usage des pharmaciens d'officine. Doc : pharmacie. Université de Nante,
- [45] Zhiri A, & Baudoux D. 2018. Huiles essentielle chémotypées et leurs synergies. Edition InspirDevelopment. Luxembourg.
- [46] Belkhiri F & Baghiani A. 2018. Activité antimicrobienne et antioxydante des extraits du *Tumuscum communis* et *Carthamus caeruleus*. Editions universitaires européennes.
- [47] Belkhiri F. 2018. Activité antimicrobienne et Antioxydante de deux Plantes médicinales : *Salvia verbenaca* et *Lepidium sativum*. Doc : Biologie. Université de Sétif
- [48] Toubane A., Rezzoug S., Besombes C & Daoud K. 2017. Optimization of Accelerated Solvent Extraction of *Carthamus caeruleus* L evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activity of extracts. *Industrial Crops and Products*. 97: 620–631
- [49] Sigma-Aldrich. DPPH free radical. www.sigmaaldrich.com

- [50] Tepe B., Sokmen M., Akpulat HA & Sokmen A. 2006. Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chemistry*. 95: 200-204
- [51] Chimactiv. Détermination de l'activité d'un antioxydant par test DPPH. www.chimactiv.agroparistech.fr
- [52] Brand-Williams W., Cuvelier M. E & C. Berset. 1994. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant, *Lebensm, Wiss-Technol*.
- [53] Fekih N. 2015. Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre *Pinus* poussant en Algérie. Doc Université de Tlemcen
- [54] Drouet E. Le monde microbien : partie1 : Microbes et microbiologie [cour], consulté le 12/07/2020. Disponible sur www.medatice-grenoble.fr.
- [55] Laboratoire Dumani. Le mode d'action des huiles essentielles sur les bactéries. www.laboratoire dumani.fr
- [56] Bolou G., Attioua B., N'Guessan A., Coulibaly A., N'Guessan J & Djamana J. 2011. Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch. sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*. *Bul. Soc. Roy. Sci de Liège*. 80 : 772-790.
- [57] Charier M. recherche de traitement par huiles essentielles adaptées contre différentes souche de *Mammites caprines*. www.docplayer.fr
- [58] Moroh A. 2008. Study of the antibacterial activity of *Morindamorindoides* (Baker) milne-redheat (rubiaceae) acetatique extract (ACE) on in-vitro growth of *Escherichia coli* strains, *Bul. Soc. Roy. Sci de Liège*, p:334.
- [59] Gaborieau B. 2015. Etat des lieux sur l'aromathérapie dans les officines : enquête sectorielle dans le département de la Vienne. Doc : Pharmacie. Université de Poitiers
- [60] Arôma Essentielles. Les huiles essentielles chémotypées. http://www.aroma-essentiel.fr/fr/espace-conseil-pranarom-huile-essentielle-bio/labels-bio-ecocert-hect-ab-cosmebio-bdih1.html#.VVz0_rntmko.
- [61] Sikkema J., De Bont J.A & Poolman B. 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem*, 269 (11) :8022-8028.
- [62] Carson C.F., Meeb J & Riley T.V. 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (teatree) oil on *Staphylococcus aureus* determined par time-kill, lysis, leakage and salttolerance assays and electronmicroscopy. *Antimicrob. Agents Chemother*, 46 (6): 1914-1920
- [63] <https://www.actmd.org/articles/200808allergiehuileessentiellef.htm>
- [64] <https://melleapothicaire.fr/les-dangers-des-huiles-essentielles/>

- [65] Santé Canada. 2007. Détermination de terme toxique. <http://www.santecanada.gc.ca>
- [66] Afssaps. 2010. Recommandations relatives à l'évaluation du risque lié à l'utilisation des huiles essentielles dans les produits cosmétiques. Direction de l'évaluation de la publicité, des produits cosmétiques et biocides Unité d'évaluation toxicologique et microbiologique
- [67] <http://www.fao.org/3/ae922f/ae922f06.htm>
- [68] CCHST.Qu'est-ce que DL50 et CL50.consulté le 05/07/2020
<https://www.ccohs.ca/oshanswers/chemicals/ld50.html>
- [69] CCOHS: LD50 and LC50?.<https://www.ccohs.ca/oshanswers/chemicals/ld50.html>
- [70] Nathalie B & Frédéric D. 2002. Valeurs Toxicologiques de référence : méthodes d'élaboration. Institut de Veille Sanitaire
- [71] Nancy C., Françoise G & André G. 2009. La place des méthodes in silico, in vitro, in omic dans l'évaluation de la sécurité des médicaments. Med Sci. Paris. 25(1) :105-110.
- [72] Jacques C. 2009. Complémentarité des méthodes d'évaluation de la toxicité par prédiction in silico et par expérimentation in vitro: application aux perturbateurs endocriniens et au développement fœtal. BioChem Consulting SAS Olivet. p :118-121
- [73] Lewis A., Kazantis N., Fishtik L & al. 2007. Integrating process safety with molecular modelling-based risk assessment of chemicals with in REACH regulatory framework : benefit and future challenges. J Hasard Mat. 142 : 592-602
- [74] Stéphane M. 2017. Méthodes d'évaluation de la toxicité effets sur la reproduction. INRS Paris
- [75] Aroma Zone. Produit : utilisation, composition, conservation. Consulté le 07/08/2020.
www.aroma-zone.com
- [76] Solvarome. Suis-je allergique aux huiles essentielles ? consulté le 08/08/2020.
www.solvarome.com
- [77] Réponse conso. Huiles essentielles : utilisez-les avec précaution. Consulté le 08/08/2020. www.reponse-conso.fr
- [78] Velé H. 2015. Valorisation officinale des huiles essentielles autorisées dans les phytomédicaments. Doc Université de Angers.
- [79] Benhamou, A &Fazouane, F. 2013. Ethnobotanical study, phytochemical characterization and healing effect of Carthamus coeruleus L. Rhizomes. International journal of medicinal and aromatic plants.3(1):1-8

- [80] Hammi S & Khaldi F. 2019. Caractérisation phytochimique et étude biologique de l'huile essentielle et des extraits lourds de *Carthamus caeruleus* et évaluation de leurs effets cicatrisants. Master : Chimie. Université de Tizi-Ouzou.
- [81] Ko GA. 2018. Sageretia fruit extracts rich in methyl linoleate and methyl linolenate downregulate melanogenesis via the Akt/GSK3 β signaling pathway, Nutrition Research and Practice.
- [82] Bouhenni I & Benkabilia I. 2019. Evaluation d'activité anti-inflammatoire du *Carthamus caeruleus* L : Etude in vivo –chez les souris NMRI. Master : Biologie. Université de Mostaganem
- [83] Ma, J., Xu, R.-R., Lu, Y., Ren, D.-F & Lu, J. 2018. Composition antimicrobial and antioxidant activity of supercritical fluid extract of *Elsholtzia ciliata*. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 21: 556-562
- [84] HSDB: <https://toxnet.nlm.nih.gov>
- [85] Li, Q.M., Luo, J.G., Wang, X.B., Yang, M.H & Kong, L.Y. 2013. Sesquiterpenes from the rhizomes of *Alpinia Japonica* and their inhibitory effects on nitric oxide production. Fitoterapia 86: 29–34.
- [86] Ruberto G. & Barrata M.T. 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. Food Chem. 69: 167-174.
- [87] Moleyar V. 1992. Antibacterial activity of essential oil components. International Journal of Food Microbiology. 16: 337-342.
- [88] Kobayashi T & al. 1993. Isolation and characterization of a yeast gene that is homologous with a meiosis-specific DNA from a plant. Mol Gen Genet. 237 (1-2) : 225-232