



Chapitre 01: Les huiles essentielles

Résumé:

Les huiles essentielles ont déjà attiré l'attention de nombreux universitaires et industriels en vue de développer de nouvelles substances, pouvant être utilisées pour la préservation des aliments ou pour les besoins de l'industrie cosmétique et chimique.

Dans ce chapitre, nous insisterons sur la production des huiles essentielles par les plantes, leurs extraction et certaines de leurs propriétés d'intérêt pour la préservation des aliments et le traitement de certaines infections. Ainsi nous traitons l'activité anti-oxydante des huiles essentielles par le test au DPPH puis l'activité antibactérienne par la détermination de la CMI et de la CMB pour quelques bactéries à Gram positives et à Gram négative.

4 - Activités biologiques des huiles essentielles.

4.1 - Activité antioxydante des huiles essentielles.

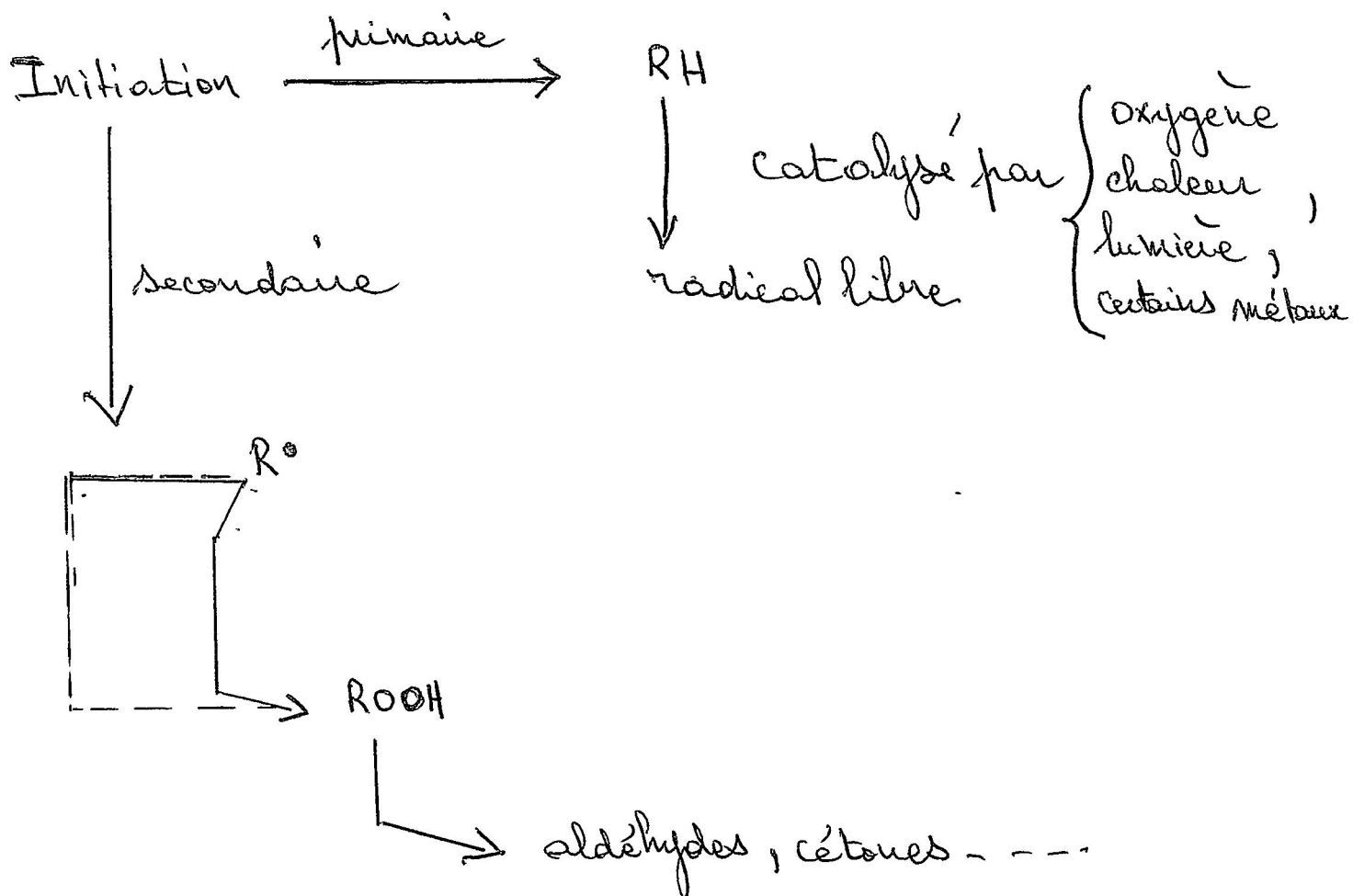
Les récents progrès dans le domaine biomédical indiquent l'implication des radicaux libres dans de nombreuses maladies. Pour prolonger le stockage des aliments, l'industrie alimentaire a utilisé de nombreux protecteurs d'origine synthétique en particulier le 3-tertiobutyl-4-~~hydroxytoluène~~ hydroxyanisole (BHA) ou le 3,5-ditertio-butyl-4-hydroxytoluène (BHT). Cependant devant le refus croissant des consommateurs ^{contre} les substances ^{des filières chimiques.} ~~issues de l'industrie chimique~~, par exemple, ces protecteurs peuvent favoriser certains ^{types de} cancers dans l'organisme :

Ainsi de nombreux rapports ont décrit des antioxydants et des composés ayant une activité d'élimination des radicaux présents dans les herbes, les fruits, les légumes et les extraits de céréales.

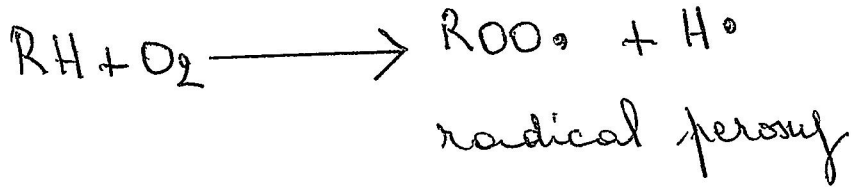
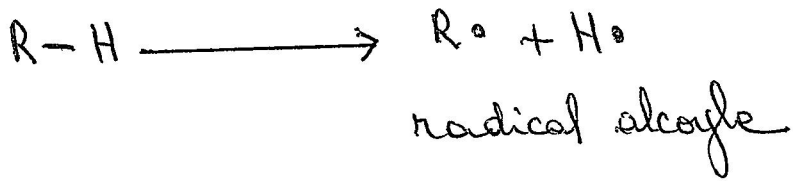
Les substrats des réactions de rancissement des aliments sont principalement les acides gras non saturés; libres, il s'oxydent en général plus vite que lorsqu'ils font partie de molécules de triglycérides, ou de phospholipides. Certains hydrocarbures non saturés présents dans les huiles peuvent aussi subir des réactions d'oxydation analogue. On peut distinguer, dans l'oxydation des lipides trois groupes de réactions.

42 - Mécanismes des réactions radicalaires (exemple les lipides).

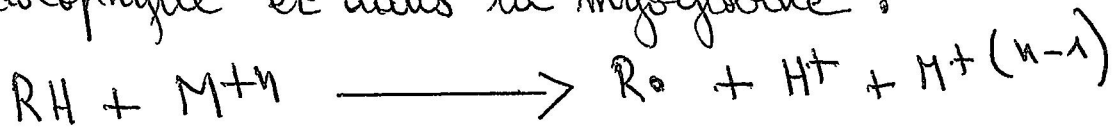
421 - Initiation.



Les réactions d'initiations primaire, sont du type :

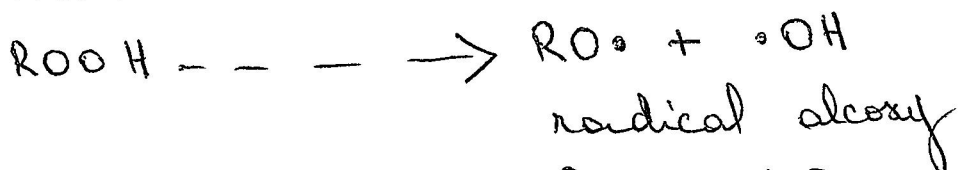


Les réactions sont difficiles et peu probables ; elles peuvent cependant être facilitées par les températures élevées et surtout par la lumière et par les traces de certains métaux, y compris ceux qui sont présents dans la chlorophylle et dans la myoglobine.



Les catalyseurs agissent probablement par l'intermédiaire de la formation de singulets $O_2 (^1O-O^1)$ dont on s'accorde pour reconnaître le rôle important dans les réactions d'oxydation des lipides.

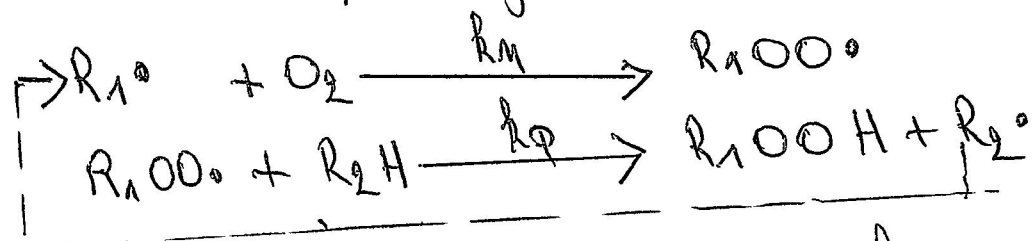
Lorsque l'oxydation est plus avancée, et que la teneur en peroxydes s'accroît, l'initiation, dite initiation secondaire, résulte essentiellement de la décomposition peut être "mono" ou "bimoléculaire" selon la concentration en peroxydes :



Les ~~énergies~~ ^{enthalpies} libres d'activation $\Delta G^\ddagger$ [notation d'Eyring] de ces deux réactions sont élevées mais sont abaissées par la lumière et par les catalyseurs métalliques.

La vitesse d'oxydation est proportionnelle à la teneur (ou à la racine carrée de la teneur) en peroxydes. La plupart des aliments qui ont été soumis à un traitement technologique présentent une teneur en peroxydes relativement élevée, de ce fait l'initiation secondaire est favorisée, et l'oxydation démarre plus vite.

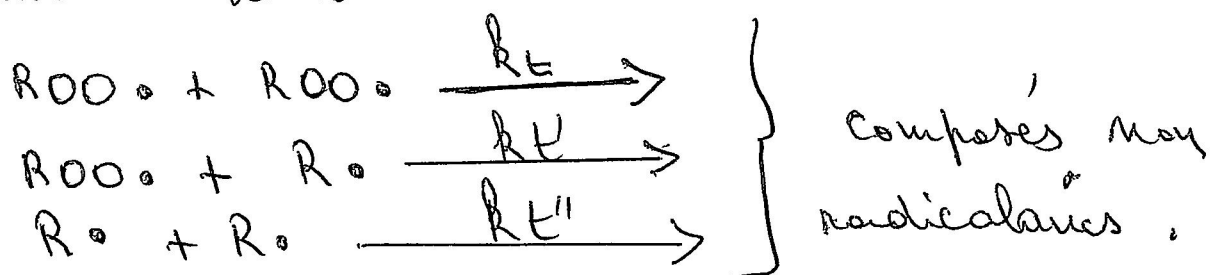
422 - La propagation :



Ces réactions sont en général rapides, car les radicaux libres, porteurs d'un électron non apparié, sont très réactifs. Les enthalpies libres d'activation de ces réactions sont très faibles (0 à 5 Kcal/mole). Si l'apport d'oxygène n'est pas limité, la totalité des lipides non saturés peut être oxydée. Ces deux réactions ne sont pas les seules possibles; on peut envisager en effet un grand nombre de réactions de modification de radicaux libres.

423 - Arrêt

En même temps que les réactions d'initiation et de propagation, des réactions d'arrêt peuvent se produire et entraîner la disparition d'une certaine proportion de radicaux libres.



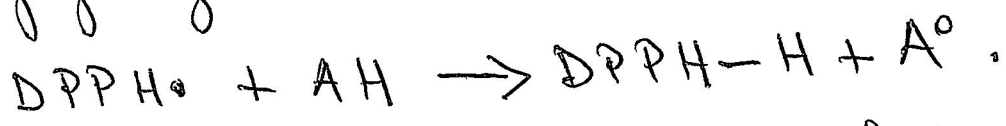
L'enthalpie libre d'activation de ces réactions est relativement élevée par rapport aux réactions de propagations.

Il existe une grande diversité de méthodes physicochimiques pour évaluer l'activité antioxydante des extraits naturels. Cependant il n'existe pas de test universel.

43 - Test au DPPH.

Cette méthode mesure la capacité réductrice d'un antioxydant en présence d'un radical libre, le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl).

La réduction du radical DPPH par un donneur d'atome d'hydrogène (AH) conduit à la 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine.



Le potentiel donneur d'un atome d'hydrogène d'un échantillon est le plus souvent exprimé par le paramètre IC_{50} qui correspond à la concentration d'antioxydant nécessaire pour réduire de 50% la concentration initiale de DPPH. Plus l' IC_{50} est petite, plus la molécule est antioxydante.

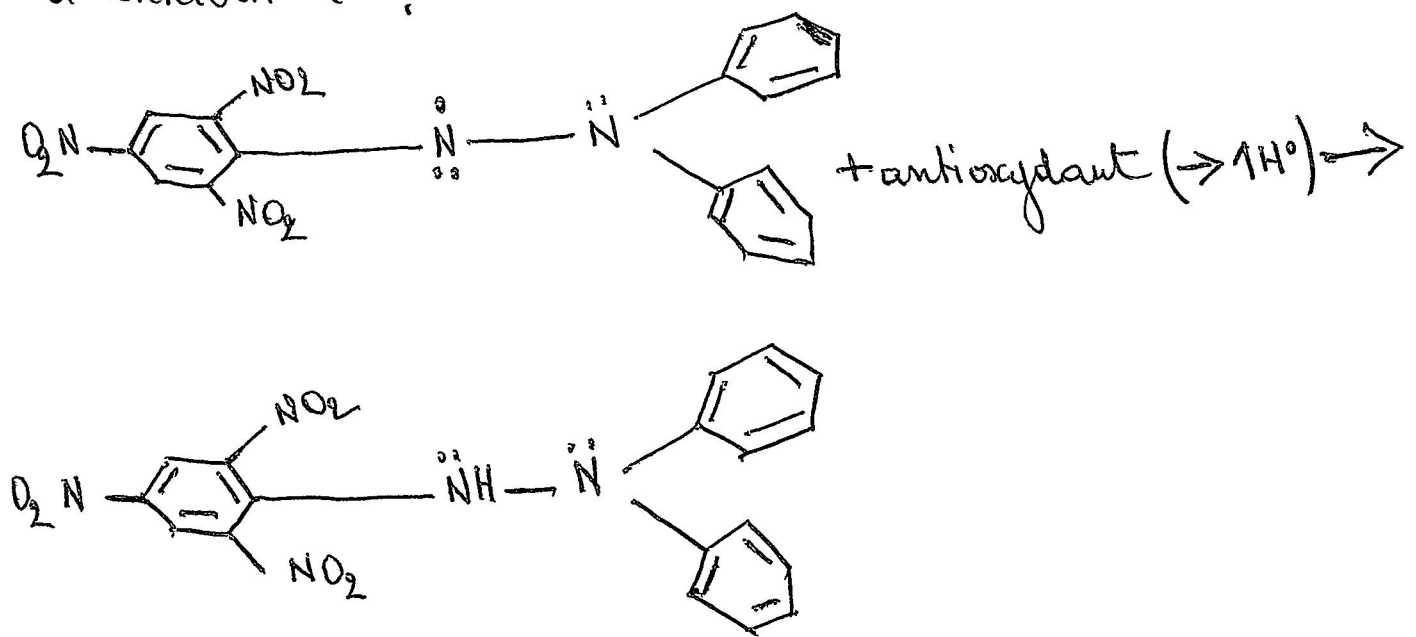
Mode opératoire !

Le mélange réactionnel est préparé comme suit : 50 microlitres de différentes concentrations des extraits exprimés en mg/ml, dissous dans le méthanol sont ajoutées à 5 ml de la solution de DPPH (0,004% dans

le méthanol) fraîchement préparée. Après une incubation de 30 min, à la température ambiante, l'absorbance à 517 nm est mesurée à des intervalles différents de temps jusqu'à l'obtention du plateau.

La vitamine C, le BHT (3,5-ditertiobutyl-4-hydroxytoluène), l'acide gallique, l'acide citrique, l'éthylènediaminetetraacétate (EDTA), les extraits de *Syzygium aromaticum* peuvent être utilisés comme antioxydants de référence.

- Réaction au DPPH et détermination du pourcentage d'inhibition :



$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{Abs Contrôle} - \text{Abs échantillon}}{\text{Abs contrôle}}$$

L'IC₅₀ est calculé graphiquement par la régression linéaire. Sur la figure ci-dessous, on remarque qu'il est impossible de déterminer directement l'IC₅₀ de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*. Les calculs théoriques lui ont attribués une valeur de 9258,18 microgrammes/ml. Cette huile ne présente pas une activité antioxydante intéressante. En revanche on peut déterminer directement, sur le graphe, celle d'*Origanum glandulosum* ainsi que celles des extraits méthanoliques des deux plantes, et la vitamine C (témoin).

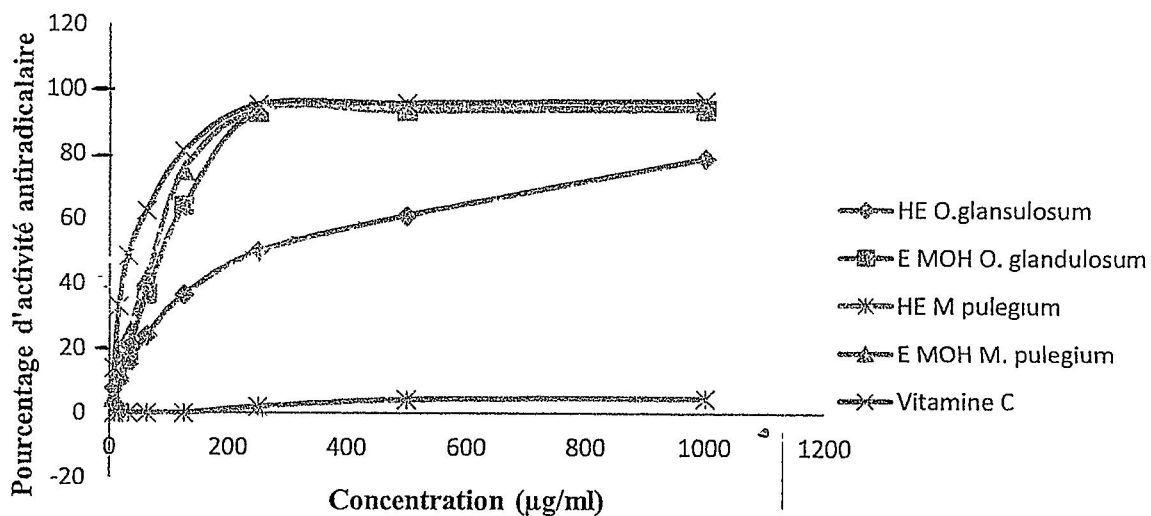


Fig. 3 : Taux de l'activité antioxydante en fonction de la concentration.

Tableau 3 : Activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits méthanoliques d'*Origanum glandulosum* et de *Mentha pulegium*

AAI (indice de l'activité antioxydante) = concentration finale de DPPH / IC₅₀.

	Echantillon	IC ₅₀ (µg/ml)	AAI
<i>Origanum glandulosum</i>	Huile essentielle	461.62	0.17
	Extrait méthanolique	25.59	3.12
<i>Mentha pulegium</i>	Huile essentielle	9258.18	0.008
	Extrait méthanolique	187.37	0.42
	Vitamine C	6.35	12.6

42 - Activité antimicrobienne des huiles essentielles.

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits de plantes suscite un intérêt croissant dans la préservation des aliments, les préparations pharmaceutiques, la médecine alternative, les thérapies naturelles. Ainsi une variété de plantes médicinales et des extraits de plantes ont été testés pour leur activité antimicrobienne. Des huiles essentielles issues de plantes aromatiques (exemple: *Foeniculum vulgare*, *Mentha piperita*, *Thymus vulgaris*), se sont montrées actives contre des bactéries Gram-positives et Gram-négatives ainsi que contre des levures, champignons et virus.

421 - Activité antibactérienne.

4211 - Test préliminaire.

On utilise la méthode de diffusion sur disque. Les boîtes de pétri : gelose Mueller Hinton ; ce milieu est employé pour l'étude de la sensibilité des bactéries, en milieu solide, vis à vis de l'antibiotique, des huiles essentielles et des extraits de plantes. Une suspension bactérienne (Densité optique correspondant à 0,5 Mc Farland) est ensemencée en surface des boîtes. Des disques stériles de diamètre 6mm (papier Whatman N°1) sont imbibés d'huile essentielle, dispersée dans un solvant, puis déposés au centre de la boîte. Le volume d'huile essentielle pure est de 5 microlitres / disque. Les boîtes sont alors incubées à 37°C pendant 24 heures.

L'observation d'une zone claire autour du disque indique une activité microbicide positive. Elle est mesurée en millimètre incluant le diamètre du disque. Deux témoins sont réalisés :

- Un témoin négatif : solvant utilisé pour la solubilisation de l'huile essentielle, par exemple : diméthylsulfoxyde (DMSO)
- Un témoin positif : gentamycine (10 microgramme / disque).

Ce test peut être répété trois fois.

4212 - Détermination de la concentration minimale inhibitrice (MIC) et de la concentration minimale bactéricide (CMB).

La valeur de la concentration minimale inhibitrice est déterminée pour les bactéries présentant une sensibilité lors du test par la méthode des disques. Le milieu à base de bouillon Mueller Hinton (MHB) est utilisé pour l'étude de la concentration minimale inhibitrice.

L'inoculum est préparé à partir d'une culture bactérienne de 12 heures (turbidité correspondant à 0,5 Mc Farland).

L'huile essentielle (HE) est dissoute dans le diméthylsulfoxyde (solvant) à une concentration de 50 mg/ml. Une gamme de concentration allant de 50 mg/ml à 0,048 mg/ml peut être préparée.

La méthode de dilution des puits ("microwell dilution method") a été retenue pour l'évaluation de la CMI.

- Les plaques de 96 puits sont préparées en distribuant dans chaque puit, 95 microlitres de MHB et 5 microlitres de l'inoculum préalablement préparé.
- Cent microlitres de la solution mère d'huile essentielle initialement préparés, d'une concentration égale à 50 mg/ml, sont ajoutés dans les premiers puits.
- Cent microlitres de chaque dilution sont transférés dans les 10 puits consécutifs.
- Le dernier puit, contenant 195 microlitres de MHB et 5 microlitres de l'inoculum, est utilisé comme témoin négatif.

Le volume final dans chaque puit est de 200 microlitres. Les plaques sont recouvertes à l'aide de parafilm stérile avant d'être incubées à 37°C pendant 18-24 heures.

La croissance bactérienne est indiquée par la présence d'un amas sous la forme d'une pastille blanche au fond du puit.

Le NBT ("nitroblue tetrazolium") est un bon indicateur de la croissance de microorganismes. L'addition de 10 microlitres de NBT, de concentration 2 mg/ml dans l'eau, puis l'incubation à 37°C pendant 30 minutes permet d'indiquer une activité biologique par un virage du jaune au bleu - pourpre.

• La CMI (concentration minimale inhibitrice) est définie comme étant la plus faible concentration d'huile essentielle à laquelle le microorganisme testé ne démontre pas une croissance visible.

- La CMB (concentration minimale bactéricide) est la plus faible concentration à laquelle aucune croissance n'est observée après repiquage en bouillon frais ou sur boîte de pétri.

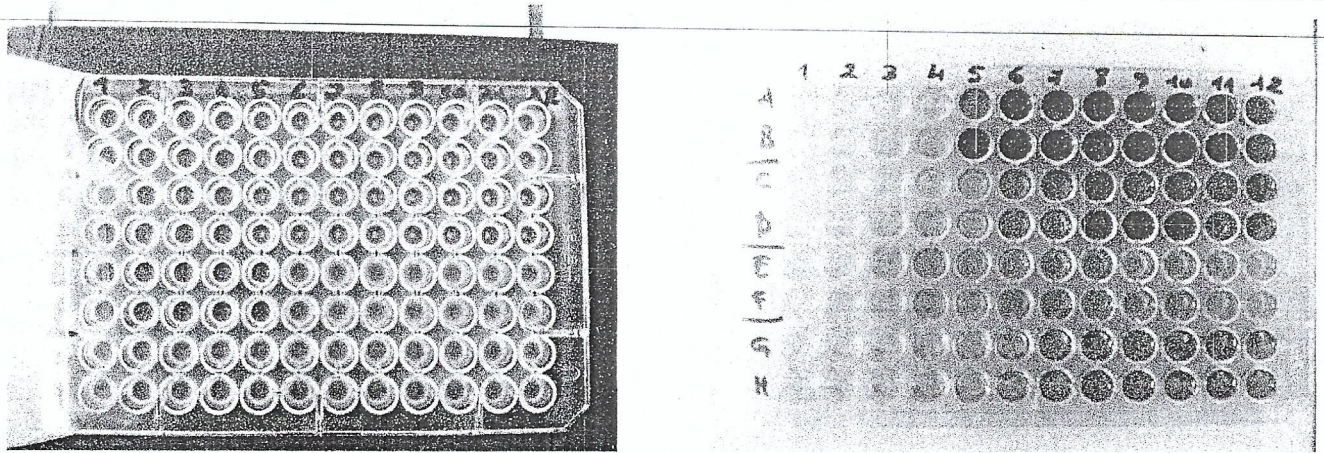


Figure 4 : Photos représentant la détermination des valeurs de CMI par la méthode de microdilution de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* avant (A) et après révélation par le NBT. (A, B : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ; C, D : *Escherichia coli* ATCC 25922 ; E, F : *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ; G, H : *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603)