

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة باجي مختار- عنابة-
-UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-ANNABA-



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET DE MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

En **BIOCHIMIE**
Option : Biochimie appliquée

THEME

**Synthèse des dérivés glucidiques, lipidiques et protéiques
d'origine biologique et applications industrielles**

Présentée par : **BARHOUCHE Badra**

Directeur de thèse : M^r **AOUADI Saoudi**

MCA, Université d' Annaba

Membres de Jury:

Président : M^r **LADJAMA Ali**

Professeur, Université d' Annaba

Examineur : M^r **NECIB Youcef**

Professeur, Université de Constantine 1

Examinatrice : M^{me} **BENJEDDOU Amel**

MCA, Université de Souk Ahras

Invité : M^r **MERZOUZ Miloud**

Professeur, Université d' Annaba

Invitée : M^{lle} **ABDI Akila**

MCA, Université d' Annaba

Année universitaire : 2014 / 2015

Remerciements

Nous remercions notre créateur Allah, Grand et Miséricordieux, le tout puissant pour le courage qu'il nous a donné pour mener ce travail à terme.

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement mon directeur de thèse, M^r **AOUADI Saoudi**, MCA à l'université d'Annaba pour m'avoir encadré durant les années de thèse et qui a orienté cette recherche. Je le remercie pour sa disponibilité, son aide, ses encouragements; ses contributions scientifiques et ses qualités humaines qui ont été déterminants pour la réussite de cette thèse.

Je tiens à remercier M^r **LADJAMA Ali**, Professeur à l'université d'Annaba, d'avoir accepté la présidence du jury de mon travail. Veuillez accepter monsieur, mes sentiments d'estime, de respect et de profonde reconnaissance.

J'adresse mes sincères remerciements également à M^r **NECIB Youcef**, Professeur à l'université de Constantine 1, de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail en tant que examinateur.

Je remercie également M^{me} **BENJEDDOU Amel**, MCA à l'université de Souk Ahras pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant d'examiner ce travail.

J'adresse mes remerciements à M^{elle} **ABDI Akila**, MCA à l'université d'Annaba, pour son aide et sa disponibilité.

Je remercie également M^r **MERZOUZ Miloud**, Professeur à l'université d'Annaba pour l'intérêt qu'il manifeste à ce travail.

Je n'oublie pas d'adresser mes remerciements aux membres du laboratoire : enseignants-chercheurs, personnel technique, personnel administratif et doctorants.

Je remercie aussi tous mes collègues et amis avec qui j'ai travaillé et dont j'ai aimé le grand enthousiasme et avec qui j'ai passé d'excellents moments aussi bien sur le plan humain que scientifique.

Je suis très reconnaissante à mes chers parents qui m'ont encouragé à poursuivre mes études et qui m'ont fourni tout le nécessaire pour mener à bien cette expérience avec succès. Ce travail est le fruit de tous vos sacrifices, que mieux que des mots, il traduit tout l'amour que je ressens pour vous. Que Dieu vous garde encore longtemps près de nous.

A toutes celles et tous ceux qui m'ont toujours aidé et soutenu mais dont j'ai oublié de citer le nom ici, qu'ils ne m'en tiennent pas rigueur et qu'ils acceptent mes sincères excuses. Mille mercis à vous tous.

Dédicace

En manière de reconnaissance, je dédie ce modeste travail :

À mes chers parents qu'ils trouvent ici toute ma gratitude
pour leur soutien tout le long de mes études.

À mon frère et à mes sœurs pour leurs encouragements

À toute ma famille

À tous mes amis et collègues

À toute personne qui me connaît.

BADRA

Résumé

Les plantes médicinales représentent une source renouvelable de composés naturels bioactifs. L'objectif principal est une tentative de valorisation partielle de trois plantes : *Myrtus communis*, *Globularia alypum* et *Calicotme villosa* par divers traitements et utilisations de constituants : huiles essentielles, composés phénoliques et éléments minéraux.

La détermination de rendement des huiles essentielles a montré une rentabilité en huile des feuilles de *M.communis* en stage de floraison de (1.14%), alors qu'il s'affaiblit durant les périodes de végétation et de fructification. En revanche, le rendement chez les fleurs est de (0.8%).

L'analyse par CPG/ms des huiles essentielles des feuilles et fleurs de *M.communis* a montré un profil chimique proche, dominé par l' α -pinène et le 1.8-cinéole.

Les huiles essentielles des feuilles et des fleurs de *M.communis* se sont avérées être un agent antibactérien efficace contre *Escherichia coli* et *Proteus vulgaris*.

Le dosage des composés phénoliques contenus dans l'extrait d'éther de pétrole obtenu à partir *G.alypum* a révélé des quantités appréciables de deux composés aromatiques connus pour leur utilisation potentielle en industrie alimentaire : eugénol (10.56%) et isoeugénol (0.86%). Cet extrait est de chémotype : Dihydroionone/eugénol/xylène.

L'étude du pouvoir antioxydant de l'extrait étheré de *G.alypum* a révélé sa capacité à piéger des radicaux libres. Par ailleurs, l'effet de synergie attendu, des autres constituants en mélange avec l'eugénol, s'est montré très insuffisant.

Les analyses par MEB et EDX montrent que les racines de *C.villosa* sont composées d'éléments minéraux (Ca, Si et Fe) organisés probablement en nanoparticules notamment l'oxyde de fer.

Ces minéraux additionnés à une matière grasse (beurre) d'origine bovine sont susceptibles d'inhiber la croissance de champignons : *Aspergillus sp* et *Fusarium sp*. Par ailleurs, les tests réalisés par la mesure de la résistance mécanique à la compression et la flexion montrent que ces minéraux pourraient être utilisés comme substituant partiel du ciment « Portland ».

Mots clés : *M.communis* ; *C.villosa* ; *G.alypum* ; huiles essentielles ; molécules organiques ; constituants minéraux ; biomatériaux, activités biologiques.

Abstract

Medicinal plants are a renewable source of natural bioactive compounds. The main objective is an attempt to partial recovery of three plants: *Myrtus communis*, *Globularia alypum* and *Calicotme villosa* by various treatments and uses components: essential oils, phenolic compounds and minerals.

The determination of essential oils yield showed profitability in *M.communis* leaves in the flowering stage (1.14%), while it weakens during the vegetative and fruiting periods when the flowers yield was (0.8%).

Analysis by GPC/ms of the essential oils from the leaves and flowers of *M.communis* was shown a close chemical profile dominated by α -pinene and 1.8 cineole.

Essential oils of leaves and flowers of *M.communis* proved an effective antibacterial agent against two strains including: *Escherichia coli* and *Proteus vulgaris*.

The dosage of the phenolic compounds contained in the petroleum ether extract of *G.alypum* showed appreciable amounts of two aromatic compounds known by their potentiality in alimentary industries: eugenol (10.56%) and isoeugenol (0.86%). Qualitatively, the analysis by GPC/ms of this extract showed the presence of multitude of compounds with chemotype: Dihydroionone / eugenol / xylene.

The study of the antioxidant activities confirmed the powerful properties owned petroleum ether extract of *G.alypum* to trap free radicals. According to the results that were obtained experimentally, the expected synergistic effect of the other components mixed with eugenol, was very insufficient.

Analysis by SEM and EDX highlighting that the roots of *C.villosa* are composed of minerals elements (Ca, Si and Fe) and nanoparticles probably organized as iron oxide.

These minerals added to a fat (butter) of bovine origin are able to inhibit the growth of two skin fungi: *Aspergillus sp* and *Fusarium sp*. Moreover, the tests carried out by measuring the mechanical resistance to compression and bending showed that these minerals can be used as partial substitute of cement "Portland".

Keywords: *M.communis*; *C.villosa*; *G.alypum*; essential oils; organic molecules; biomaterials, biological activities.

ملخص

تعتبر النباتات الطبية مورد متجدد للمواد والمكونات الطبيعية الفعالة. الهدف المنشود هو محاولة تثمين جزئية لنباتات جزائرية بحثة منتقاة المتمثلة في ثلاث أصناف محلية: *Myrtus communis*، *Globularia alypum* و *Calicotme villosa* من خلال معالجات واستعمالات متنوعة للمكونات: الزيوت الأساسية، المركبات الفينولية و العناصر المعدنية.

تحديد عائد الزيوت الأساسية اثبت أن المرودود الزيتي المستخلص من أوراق الريحان أثناء مرحلة الإزهار قدر ب 1.14% في حين انه تناقص في مرحلتي النمو و الإثمار. بالمقابل المرودود المحصل عليه من الأزهار كان 0.8%.

كشف التحليل الكيميائي للزيوت الأساسية المستخلصة من أزهار و أوراق الريحان بواسطة تقنية CPG/ms عن تركيب كيميائي متقارب يسوده عنصري: α pinène و 1.8 cinéole.

الزيوت الأساسية المستخلصة من أوراق و أزهار *M.communis* مثبتة كمضاد بكتيري فعال ضد *Escherichia coli* و *Proteus vulgaris*.

معايرة المكونات الفينولية الموجودة في مستخلص الايثر من *G.alypum* أظهرت كميات معتبرة من مكونين عطريين معروفين باستعمالتهما القيمة في الصناعة الغذائية: (0.86%) iso Eugenol (10.56%) eugenol. نوعياً اثبت التحليل أن المستخلص يحتوي على مكونات مختلفة و عديدة يسودها: Dihydroionone/eugenol/xylène.

أثبتت دراسة النشاط المضاد للأكسدة أن مستخلص الايثر من *G.alypum* يمتلك خصائص فعالة لتثبيط الجذور الحرة. حسب النتائج المحصل عليها تجريبياً بدأ التأثير المزودج للمكونات الأخرى الممزوجة مع eugenol غير كاف.

أوضح التحليل البنيوي بواسطة تقنيتي MEB و EDX أن جذور *C.villosa* تتكون من عناصر معدنية على وجه الخصوص: Si، Ca و Fe. و نانوجزيئات يحتمل أن تكون اوكسيد الحديد.

هذه المعادن المضافة الى مادة دهنية (زبدة) ذات مصدر بقري قابلة لتثبيط نمو الفطريات: *Aspergillus sp* و *Fusarium sp*. من جهة أخرى التجارب المنجزة الناجمة عن قياس المقاومة الميكانيكية للضغط و الثني برهنت أن هذه المعادن يمكن استخدامها كمعوض جزئي لاسمنت " Portland ".

كلمات مفتاحية: *M.communis*، *C.villosa*، *G.alypum*، الزيوت الأساسية، الجزيئات العضوية، المواد الحيوية، النشاطات البيولوجية.

Liste des abréviations

N°	Abréviation	Signification
1	AC	Acide citrique
2	AG	Acide gallique
3	ATCC	American type culture collection
4	Api20E	Analytical Profile Index 20 enterobacteria
5	APR	Pouvoir antiradicalaire relatif
6	AFNOR	Association française de normalization
7	BHT	L'hydroxytoluène butylé
8	BN	Bouillon nutritif
9	CAT	Capacité antioxydante totale
10	CMI	Concentration minimale inhibitrice
11	CMB	Concentration minimale bactéricide
12	CMF	Concentration minimale fongicide
13	Cc	Concentration critique
14	CCM	Chromatographie sur couche mince
15	CPG/ms	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
16	CCC	Composite ciment cendres
17	Dc	Diamètre critique
18	DMSO	Diméthylsulfoxyde
19	DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
20	EDTA	Éthylène Diamine Tétra Acétique
21	E	Eugénol
22	EC ₅₀	Efficient concentration
23	EDX	Energy-dispersive x-ray spectroscopy
24	FRAP	Ferric reducing antioxidant power
25	GN	Gélose nutritive
26	HE	Huile essentielle
27	IE	Isoeugénol
28	I	Souche intermédiaire
29	IC ₅₀	Concentration inhibitrice à 50%

30	IR	Indice de rétention
31	MH	Muller Hinton
32	MEB	Microscope électronique à balayage
33	MPa	Mégapascal
34	PE	Extrait d'éther de pétrole
35	pH	Potentiel hydrogène
36	PDA	Potato dextrose agar
37	R	Souche résistante
38	S	Souche sensible
39	TR	Temps de rétention
40	UFC	Unité formant colonie
41	UV	Ultraviolet
42	VC	Vitamine C
	Formule	Signification
43	Na₂HPO₄	Phosphate disodique
44	NaH₂PO₄	Phosphate monosodique
45	K₃Fe(CN)₆	Ferricyanure de potassium
46	FeCl₃	Chlorure de fer
47	AlCl₃	Chlorure d'aluminium
48	MgSO₄	Sulfate de magnésium
49	Na₂SO₄	Sulfate de sodium
50	Na₂CO₃	Carbonate de sodium
51	(C₂H₅)₂O	Ether diéthylique
52	CH₃OH	Méthanol
53	C₂H₆O	Ethanol
54	CH₂Cl₂	Dichlorométhane
55	CHCl₃	Chloroforme
56	Na₆O₁₈P₆	Héxamétaphosphate de sodium

Liste des figures

N°	Titre	Page
Figure (1)	Photo représentant les feuilles et les fleurs de <i>Myrtus communis</i>	5
Figure (2)	Photo représentant les feuilles de <i>Globularia alypum</i>	8
Figure (3)	Photo représentant la plante de <i>Calicotome villosa</i>	10
Figure (4)	Carte représentant les zones de prélèvements des plantes	42
Figure (5)	Etapas de l'extraction des huiles essentielles de <i>M.communis</i>	47
Figure (6)	Etapas de l'extraction des molécules organiques	49
Figure (7)	Description de protocole de l'analyse granulométrique d'un sol	50
Figure (8)	Dispositif d'essai de traction par flexion 3 points	72
Figure (9)	Dispositif d'essai de la compression	72
Figure (10)	Cinétique de l'extraction des HE des feuilles et des fleurs de <i>M.communis</i> par l'hydrodistillation en fonction du temps	74
Figure (11)	Représentation des rendements des HE extraites à partir des feuilles de myrte de différentes régions pendant les stades de développement	76
Figure (12)	Illustration du pourcentage de l'eugénol des espèces de différentes régions du monde	78
Figure (13)	Concentrations de deux composants majoritaires de l'HE des feuilles de <i>M.communis</i> de différentes régions du monde	80
Figure (14)	Structure chimique des composés identifiés dans l'HE des feuilles de <i>M.communis</i>	82
Figure (15)	Structure chimique des composés identifiés dans l'HE des fleurs de <i>M.communis</i>	84
Figure (16)	Structure chimique des composés identifiés dans la fraction d'éther de pétrole des feuilles de <i>G.alypum</i>	92
Figure (17)	Distribution en fonction du pourcentage des composants existant dans l'huile essentielle de fleurs de <i>M.communis</i>	93
Figure (18)	Distribution en fonction du pourcentage des différents composants existant dans l'huile essentielle des feuilles de <i>M.communis</i>	93
Figure (19)	Distribution en fonction du pourcentage des composants majoritaires existant dans l'extrait d'éther de pétrole de feuilles de <i>G.alypum</i>	93
Figure (20)	Observations des cendres de <i>C.villosa</i> par MEB	94
Figure (21)	Analyse des cendres de <i>C.villosa</i> par EDX	95
Figure (22)	Composé riche en calcium	96
Figure (23)	Composé riche en silicium	96

Figure (24)	Répartition des entérobactéries selon le sexe des patients	97
Figure (25)	Répartition des entérobactéries selon les tranches d'âge des patients	97
Figure (26)	Profil des entérobactéries résistantes vis -à-vis des antibiotiques	101
Figure (27)	Evaluation de la sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques	101
Figure (28)	Réduction de l'absorbance à 517nm, en fonction du temps pour l'extrait éthéré, l'eugénol, l'isoeugénol et les antioxydants de référence	109
Figure (29)	Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de différentes concentrations des extraits en comparaison avec les antioxydants de référence	109
Figure (30)	Capacité antioxydante totale (CAT) des extraits ; en comparaison avec les antioxydants de référence	113
Figure (31)	Pouvoir réducteur en fonction de la concentration des extraits et des témoins par la méthode de FRAP	114
Figure (32)	Pourcentage d'inhibition du radical H ₂ O ₂ des extraits en comparaison avec les antioxydants de référence	115
Figure (33)	Courbes contrainte-déformation en flexion 3 points	121
Figure (34)	Déformations obtenues avec un essai de compression	122
Figure (35)	Profil chromatographique de l'HE des feuilles de <i>M.communis</i> analysée par CPG/ms	126
Figure (36)	Profil chromatographique de l'HE des fleurs de <i>M.communis</i> analysée par CPG/ms	126
Figure (37)	Profil chromatographique de la fraction d'éther de pétrole des feuilles de <i>G.alypum</i> analysée par CPG/ms	127
Figure (38)	Photos représentant la sensibilité d' <i>Escherichia coli</i> testée par les huiles essentielles brutes des feuilles et des fleurs de <i>M.communis</i>	128
Figure (39)	Photos représentant la sensibilité de <i>Proteus vulgaris</i> testée par les huiles essentielles brutes des feuilles et des fleurs de <i>M.communis</i>	128
Figure (40)	Photos représentant l'activité anti- <i>Fusarium sp</i> de mélange préparé en présence des cendres et du beurre anhydre	129
Figure (41)	Photos représentant l'activité anti- <i>Fusarium sp</i> de mélange préparé en présence des cendres et du beurre stérile et anhydre	130
Figure (42)	Photos représentant l'activité anti- <i>Aspergillus sp</i> de mélange préparé en présence des cendres et du beurre anhydre	131
Figure (43)	Photos représentant l'activité anti- <i>Aspergillus sp</i> de mélange préparé en présence des cendres et du beurre stérile et anhydre	132

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
Tableau (1)	Récapitulatif des composants majoritaires des huiles essentielles de myrte de différentes régions du monde	21
Tableau (2)	Organes de certaines plantes riches en huiles essentielles	22
Tableau (3)	Activités antibactériennes de <i>M.communis</i> provenant de différentes régions du monde	25
Tableau (4)	Activités antifongique, antiparasitaire et insecticide de <i>M.communis</i> provenant de différentes régions du monde	30
Tableau (5)	Marché mondial des huiles essentielles	31
Tableau (6)	Les différents types de ciments courants	35
Tableau (7)	Caractéristiques chimiques de ciments courants	38
Tableau (8)	Caractéristiques mécaniques de ciments courants	38
Tableau (9)	Résistances garanties de ciments courants	39
Tableau (10)	Utilisation des ajouts dans les cimenteries algériennes	40
Tableau (11)	Caractéristiques des zones de prélèvements	41
Tableau (12)	Origine et date de prélèvements des plantes choisies	42
Tableau (13)	Description botanique des plantes étudiées	43
Tableau (14)	Caractères organoleptiques des organes végétaux destinés à l'extraction	44
Tableau (15)	Bactéries cliniques et de référence utilisées pour les tests	53
Tableau (16)	Antibiotiques utilisés et leurs diamètres critiques d'inhibition	55
Tableau (17)	Tableau de la lecture de la galerie Api 20 E	58
Tableau (18)	Composition des mélanges testés à base de cendres et de matière butyrique	65
Tableau (19)	Exigences chimiques définies en termes de valeurs caractéristiques de ciments courants type 42.5	68
Tableau (20)	Résistance mécanique à la compression du ciment utilisé	69
Tableau (21)	Conditions de formulation des composites CCC	71
Tableau (22)	Taux d'humidité (H%) et de la matière organique (MO%) des plantes étudiées	73

Tableau (23)	Récapitulatif regroupant les rendements d'extractions des différents échantillons	75
Tableau (24)	Comparaison selon le nombre des composants dans l'HE des feuilles de <i>M.communis</i> de différentes régions du monde	79
Tableau (25)	Composition chimique d'HE des feuilles de <i>Myrtus communis</i>	81
Tableau (26)	Composition chimique de l'HE des fleurs de <i>Myrtus communis</i>	83
Tableau (27)	Paramètres physicochimiques du sol et de l'eau de la zone de prélèvement	88
Tableau (28)	Analyse granulométrique du sol prélevé à l'Est d'Annaba	88
Tableau (29)	Distribution des composants majoritaires de l'HE des feuilles de <i>M.communis</i> selon le type du sol	89
Tableau (30)	Composition chimique de l'extrait d'éther de pétrole des feuilles de <i>G.alypum</i>	91
Tableau (31)	Caractères cultureux des souches bactériennes selon la gélose nutritive	98
Tableau (32)	Observation microscopique après coloration de Gram des souches bactériennes étudiées	98
Tableau (33)	Résultats des tests biochimiques par galerie Api 20 E des souches bactériennes étudiées	99
Tableau (34)	Diamètres d'inhibition (mm) et phénotypes des souches bactériennes étudiées vis-à-vis des antibiotiques	100
Tableau (35)	Diamètres d'inhibition (mm) et phénotypes des souches bactériennes testées par les HE de myrte	103
Tableau (36)	Les valeurs EC ₅₀ de l'extrait de <i>G.alypum</i> et des témoins (antioxydants de référence) après 30 min de contact avec le DPPH	108
Tableau (37)	Activité antifongique des cendres dans différentes conditions	117
Tableau (38)	Activité antifongique de diverses préparations	118

Sommaire

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale.....1

Partie bibliographique

Chapitre 1 : Valorisation des plantes du sol local

1. Cartographie de quelques plantes du sol local.....	4
1.1. Monographie de <i>Myrtus communis</i>	4
1.1.1. Etymologie et dénomination	4
1.1.2. Taxonomie.....	4
1.1.3. Caractères morphologiques.....	4
1.1.4. Répartition géographique de la plante	5
1.1.5. Culture et récolte de la plante	6
1.1.6. Utilisations du <i>M.communis</i> en médecine traditionnelle	6
1.2. Monographie de <i>Globularia alypum</i>	6
1.2.1. Etymologie et dénomination	6
1.2.2. Taxonomie	7
1.2.3. Caractères morphologiques	7
1.2.4. Répartition géographique de la plante.....	8
1.2.5. Culture et récolte de la plante	8
1.2.6. Utilisations du <i>G.alypum</i> en médecine traditionnelle	9
1.3. Monographie de <i>Calicotome villosa</i>	9
1.3.1. Etymologie et dénomination	9
1.3.2. Taxonomie	9
1.3.3. Caractères morphologiques	10
1.3.4. Répartition géographique de la plante	11
1.3.5. Culture et récolte de la plante	11
1.3.6. Utilisations du <i>C.villosa</i> en médecine traditionnelle	11

Sommaire

Chapitre 2 : Méthodes d'extraction et d'analyse d'extraits végétaux

1. Fractionnement de la matière végétale.....	12
1.1. L'hydrodistillation.....	12
1.2. Extraction au solvant	12
1.2.1. Extraction directe à l'aide d'un soxhlet.....	12
1.2.2. Fractionnement à l'aide de solvants.....	13
2. Production de minéraux.....	14
2.1. L'incinération et la calcination.....	14
3. Techniques d'analyses d'extraits végétaux	15
3.1. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	15
3.2. Microscope électronique à balayage	15
3.3. Spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie.....	16
4. Composition chimique d'extraits végétaux	17
4.1. Familles biochimiques	17
4.1.1. Les terpenoïdes	17
4.1.2. Les phénylpropanoïdes.....	18
4.1.3. Composés d'origines diverses.....	19
4.2. Structure de base et sites fonctionnels	19
4.3. Notion de chémotype	19
4.4. Facteurs de variabilité de la composition des HE.....	20
4.5. Facteurs techniques responsable de variabilités quantitative et qualitative des HE.....	23

Chapitre 3 : Applications et marché mondial

1. Activité antibactérienne.....	24
1.1. Techniques d'évaluation de l'activité antibactérienne.....	26
1.1.1. L'aromatogramme	26
1.1.2. Les concentrations critiques	26
1.1.3. Notion du bactéricide et du bactériostase	27
1.2. Facteurs affectant la bioactivité des HE	27
1.3. Mode d'action des HE sur les bactéries.....	28
2. Activité antifongique	29

Sommaire

3. Activité antioxydante	30
4. Marché mondial des HE.....	31
5. Fabrication des biomatériaux	32
5.1. Fabrication des pommades	32
5.1.1. Définition.....	32
5.1.2. Intérêts thérapeutiques des pommades	32
5.1.3. Classification des pommades.....	32
5.1.4. Préparation des pommades.....	33
5.1.5. Contrôle de qualité des pommades.....	34
5.2. Les matériaux de construction	34
5.2.1. Définition du ciment.....	34
5.2.2. Classification des ciments courants.....	35
5.2.3. Propriétés des ciments.....	36
5.2.4. L'intérêt de l'utilisation des ajouts minéraux.....	39
5.2.5. L'utilisation des ajouts en Algérie.....	40

Partie expérimentale

Matériel et méthodes.....	41
1. Matériel végétal.....	41
1.1. Critères de choix des plantes	41
1.2. Présentation de la zone d'étude.....	41
1.2.1. Situation géographique	41
1.2.2. Période et calendrier d'échantillonnage.....	42
1.2.3. Etude édaphique.....	42
1.3. Description botanique du matériel végétal	43
1.4. Caractères organoleptiques des organes destinés à l'extraction	44
1.5. Séchage et conservation.....	44
1.6. Taux d'humidité.....	44
2. Mode d'obtention de molécules organiques et de constituants minéraux.....	45
2.1. Extraction des HE des feuilles et des fleurs de <i>M. communis</i>	45
2.1.1. Description du dispositif d'hydrodistillation	45
2.1.2. Mode opératoire.....	45

Sommaire

2.1.3. Calcul de rendement	46
2.1.4. Cinétique d'extraction	46
2.1.5. Conservation des HE obtenues.....	46
2.2. Fractionnement à l'éther de pétrole de la phase aqueuse de <i>G.alypum</i>	47
2.3. Extraction de l'eugénol et de son acétate correspondant (isoeugénol) du clou de girofle (<i>S.aromaticum</i>).....	48
2.4. Incinération des racines de <i>C.villosa</i>	48
3. Méthodes d'analyse des échantillons	50
3.1. Analyse granulométrique du sol.....	50
3.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse des HE de <i>M.communis</i> et de l'extrait étheré de <i>G.alypum</i>	51
3.3. Analyse par MEB et EDX des cendres de <i>C.villosa</i>	52
3.3.1. Microscope électronique à balayage (MEB).....	52
3.3.2. Spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (EDX)	52
4. Applications.....	53
4.1. Activité antibactérienne des HE de <i>M.communis</i>	53
4.1.1. Matériel microbiologique.....	53
4.1.1.1. Critères de sélection des souches bactériennes.....	53
4.1.1.2. Les souches bactériennes.....	53
4.1.1.3. Conservation des souches bactériennes.....	54
4.1.1.4. Les milieux de culture.....	54
4.1.1.5. Les huiles essentielles.....	54
4.1.1.6. Les antibiotiques.....	55
4.1.2. Purification et identification des souches bactériennes.....	55
4.1.2.1. Mise en évidence de caractères cultureux.....	55
4.1.2.2. Observation microscopique	56
4.1.2.3. Tests biochimiques de pré-identification des bactéries.....	57
4.1.3. Préparation des pré-cultures.....	58
4.1.4. Antibiogramme	59
4.1.5. Aromatogramme	59
4.1.6. Détermination de valeurs critiques (CMI et CMB).....	60
4.2. Activité antioxydante de l'extrait étheré de <i>G.alypum</i>	61
4.2.1. Piégeage du radical libre DPPH.....	61
4.2.2. La capacité antioxydante totale.....	62

Sommaire

4.2.3. Réduction du fer.....	63
4.2.4. Piégeage du radical H ₂ O ₂	63
4.3. Propriétés fonctionnelles des cendres de <i>C.villosa</i>	64
4.3.1. Utilisation des cendres de <i>C.villosa</i> pour l'élaboration de préparation à activité antifongique.....	64
4.3.1.1. Critères de sélection des souches fongiques.....	64
4.3.1.2. Milieux de culture	64
4.3.1.3. Les agents antifongiques.....	64
4.3.1.4. Préparations des pré-cultures.....	65
4.3.1.5. Antifongigramme (Méthode de contact direct)	65
4.3.1.6. Détermination de valeurs critiques (CMI et CMF).....	67
4.3.2. Utilisation des cendres de <i>C.villosa</i> comme substituant partiel du ciment.....	67
4.3.2.1. Matériel.....	67
4.3.2.1.1. Formulation d'un mortier normal	67
4.3.2.1.2. Formulation d'un mortier renforcé par des cendres.....	69
4.3.2.2. Méthodologie	70
4.3.2.2.1. Formulation des composites CCC	70
4.3.2.2.2. Malaxage	71
4.3.2.2.3. Coulage et vibration.....	71
4.3.2.2.4. Mode de conservation des échantillons	71
4.3.2.2.5. Résistance en flexion 3 points.....	72
4.3.2.2.6. Résistance en compression	72
Résultats et discussion	73
1. Taux d'humidité des plantes étudiées	73
2. Obtention de molécules organiques et de constituants minéraux	73
2.1. Cinétique d'extraction par hydrodistillation des HE de <i>M.communis</i>	73
2.2. Rendements d'extractions.....	74
2.2.1. Les huiles essentielles des feuilles et des fleurs de <i>M.communis</i>	75
2.2.2. Rendements en molécules organiques de l'extrait éthéré de <i>G.alypum</i>	77
3. Analyse des échantillons	78
3.1. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse des HE de <i>M.communis</i> et de l'extrait éthéré de <i>G.alypum</i>	78
3.1.1. Composition chimique des HE de <i>M.communis</i>	78

Sommaire

3.1.1.1. Influence de la composition du sol.....	87
3.1.2. Composition chimique de l'extrait éthéré de <i>G.alypum</i>	89
3.2. Analyse par MEB et EDX des cendres de <i>C.villosa</i>	94
4. Applications	97
4.1. Activité antibactérienne des HE de <i>M.communis</i>	97
4.1.1. Purification des souches bactériennes	97
4.1.2. Identification biochimique des souches bactériennes	99
4.1.3. Antibiogramme	99
4.1.4. Activité antibactérienne des HE des feuilles et des fleurs de <i>M.communis</i>	102
4.2. Activité antioxydante de l'extrait éthéré de <i>G.alypum</i> et les extraits de <i>S.aromaticum</i> ..	107
4.2.1. Piégeage du radical libre DPPH.....	108
4.2.2. La capacité antioxydante totale	113
4.2.3. Réduction du fer	114
4.2.4. Piégeage du radical H ₂ O ₂	115
4.3. Propriétés fonctionnelles des cendres de <i>C.villosa</i>	116
4.3.1. Utilisation des cendres de <i>C.villosa</i> pour l'élaboration de préparation à activité antifongique.....	116
4.3.2. Utilisation des cendres de <i>C.villosa</i> comme substituant partiel du ciment.....	120
4.3.2.1. Comportement en flexion	120
4.3.2.2. Comportement en compression	121
Conclusion et perspectives	123
Annexes	125
Annexe 1 : Matériel utilisé et milieux de culture	125
Annexe 2 : Profils chromatographiques des principes actifs analysés par CPG/ms.....	126
Annexe 3 : Photos représentant les résultats de l'activité antibactérienne des HE.....	128
Annexe 4 : Photos représentant les résultats de l'activité antifongique de mélange préparé.....	129
Références bibliographiques	133

Introduction générale

Introduction générale

Les composants d'une plante, plus spécifiquement le bois d'un végétal, sont constitués pour la plupart par des molécules de masses moléculaires élevées : glucides et polymères phénoliques. La nature des autres constituants est très diverse, on distingue : les résines (comprenant des composés volatils, acides résiniques, esters d'acide gras et de glycérol ou des stérols, terpènes et composés terpéniques), les protéines, les constituants minéraux et les constituants mineurs (alcaloïdes, aldéhydes, acides dicarboxyliques sous la forme de leurs sels de calcium). Bien qu'ils représentent souvent moins de 20% de la matière sèche chez de nombreux végétaux, les résines et les constituants mineurs (alcaloïdes, aldéhydes) sont utilisés dans divers domaines industriels. Dans les pays développés, par exemple la France et l'Espagne pour le bassin méditerranéen ; la parfumerie, la cosmétique, l'hémisynthèse et les biotransformations (les propriétés chirales de certains composés naturels odorants en font des précurseurs de choix de la chimie fine) sont des secteurs en pleine évolution. A ces secteurs traditionnels, d'autres ont connu depuis peu un développement dans le domaine des produits antimicrobiens ou de certaine activité biologique (propriété antioxydante).

L'utilisation de façon non adéquate d'agents antimicrobiens a conduit à l'émergence d'un nombre de bactérie, de champignon et de virus résistant aux médicaments. Quant aux molécules à activité antioxydante, les autorités gouvernementales et les consommateurs sont très préoccupés par les effets potentiels des additifs synthétiques sur la santé. Les huiles essentielles et autres extraits sont obtenus à partir de matières végétales (fleurs, feuilles, racines, fruits, écorces, graines). Ils possèdent des propriétés antimicrobiennes, et sont actuellement considérés comme des alternatives potentielles aux antibiotiques pour traiter diverse maladies infectieuses, et aux agents chimiques de conservation des denrées alimentaires et produits cosmétiques.

Des huiles essentielles, issues de plantes aromatiques médicinales (par exemple *Foeniculum vulgare*, *Mentha piperita*, *Thymus vulgaris*, *Myrtus communis*) se sont montrées très actives aussi bien contre des bactéries Gram positif et Gram négatif que contre des levures, champignons et virus. Ce sont des mélanges de substances lipophiles et volatiles, tels que les monoterpènes, sesquiterpenes et/ou phénylpropanoïdes, qui ont une odeur agréable. Par ailleurs, elles sont associées aux mécanismes de défense des plantes contre les agressions extérieures [1].

Introduction générale

Les travaux réalisés ont montré que la fonction antimicrobienne s'exerce de deux manières selon les types de microorganismes et de biomolécules.

- Activité inhibitrice ou microbiostatique : blocage de la multiplication des cellules microbiennes ;
- Activité létale ou microbicide : mort des cellules microbiennes.

Le choix des techniques utilisées pour déterminer l'activité antimicrobienne a une grande influence sur les résultats. L'insolubilité des constituants des HE dans l'eau et leur volatilité constitue les principales difficultés rencontrées. Les techniques classiques mises au point *In vitro* permettent soit de caractériser le pouvoir antimicrobien soit de quantifier en termes de concentration minimale inhibitrice ou de concentration minimale microbicide. Ces méthodes sont appliquées en milieu solide ou en milieu liquide. Les différents protocoles peuvent être classés selon la nature du contact de l'HE avec le germe. Afin d'utiliser les HE en tant qu'antioxydant alimentaire par exemple, il convient d'évaluer l'efficacité antioxydante de ces dernières, afin de limiter leur ajout aux doses strictement indispensables aux objectifs de préservation à atteindre. Il existe une grande diversité de méthodes physicochimiques pour évaluer l'activité antioxydante des extraits naturels. Cependant, il n'existe pas de test universel. L'activité antioxydante peut être évaluée soit par des méthodes directes en dosant des produits formés (comme par exemple les hydroperoxydes), soit par des méthodes indirectes à l'aide desquelles l'efficacité d'un antioxydant sera révélée en mesurant la capacité de ce dernier à piéger des radicaux libres.

Outre son rôle d'usine de synthèse organique, la cellule végétale se distingue de la cellule animale au niveau de la teneur en certains macroéléments. Le silicium pratiquement absent des tissus animaux et présent à des taux de 0,2 à 0,5 % du poids sec chez les végétaux. Il se rencontre à des taux nettement plus élevés (4 à 5 %) par exemple chez les graminées. De même, certains végétaux sont particulièrement riches en calcium précipité dans les vacuoles sous forme de cristaux d'oxalate de Ca. Par ailleurs, la teneur plus élevée en magnésium des végétaux s'explique par le fait qu'il est l'un des constituants de la molécule de chlorophylle. De plus, il faut noter que, par suite de la teneur assez variable du sol en éléments, jointe au fait que la pénétration des ions au niveau des racines n'est pas toujours très sélective, la teneur en éléments, notamment celle en éléments métalliques, est fonction du sol. Les cendres des végétaux traités ou pas trouvent souvent des applications dans les domaines de la microbiologie, des médicaments et de l'alimentation.

Par ailleurs, la valorisation quantitative des cendres s'est imposée par souci de protection de l'environnement. Dans de nombreux pays tropicaux, l'industrie de l'huile de

Introduction générale

palme joue un rôle majeur dans leur développement économique. L'élimination des co-produits de cette industrie est un problème difficile à surmonter. Après incinération, des quantités considérables de cendres sont produites. Une proportion est utilisée comme fertilisant pour les plantations, cependant la nature hautement alcaline de ces cendres (pH= 11) nécessite des précautions quant à leur utilisation et élimination. D'après des travaux récents, une solution à ce problème pourrait être l'utilisation de ces cendres comme substituant partiel du ciment « Portland ».

C'est dans cette optique que se situe ce travail dont les objectifs principaux peuvent se résumer ainsi :

- Extraction des huiles essentielles et des molécules organiques de deux plantes de la flore algérienne et détermination de leur composition chimique ;
- Evaluation, *in vitro*, des activités pharmacologiques (antioxydante, antibactérienne et antifongique) ;
- Identification du ou des composés responsables de l'activité globale des principes actifs isolés ;
- Estimation de l'effet du type de sol sur la composition chimique des HE ;
- Fabrication d'un mélange de composés naturels sous forme de tablette et évaluation de son efficacité thérapeutique ;
- Renforcement du ciment « Portland » à l'aide des cendres et estimation des qualités mécaniques du matériau.

Partie bibliographique

Chapitre 1 : Valorisation des plantes du sol local

1. Cartographie de quelques plantes du sol local

1.1. Monographie de *Myrtus communis*

1.1.1. Etymologie et dénomination

Le nom générique dérive du grec myron-parfum qui indique que toute la plante est aromatique [2].

Mot grec : Myrtos= parfum à odeur aromatique.

Nom français : Myrte commun.

Nom latin : *Myrtus communis*.

Nom vernaculaire : Rihane, Mersin.

Nom habituel berbère : Chilmoun, Chélmoun, Selmùn (fruits uniquement) [3].

1.1.2. Taxonomie

La taxonomie de *Myrtus communis* du point de vue botanique est selon les divisions suivantes :

Règne : Plantae - végétal ;

Sous règne : Tracheobionta - Eucaryotae - plantes vasculaires ;

Super division : Spermatophytes - plantes à graines ;

Division : Magnoliophyte - Angiospermae - plantes à fleurs ;

Classe : Magniliopsida - dicotylédones ;

Sous classe : Rosidaes ;

Ordre : Myrtales ;

Famille : Myrtaceae ;

Genre : *Myrtus* ;

Espèce : *Myrtus communis* L [4].

1.1.3. Caractères morphologiques

Généralement, le *Myrtus communis* se distingue par les caractéristiques suivantes :

Morphologie : C'est un arbuste ligneux, mesurant le plus souvent 2 à 3 m mais pouvant aller jusqu'à 5 m ;

Feuillage : Les feuilles sont petites, ovales et opposées, persistantes, très odorantes, coriaces et aromatiques de couleur verte claire à verte sombre et brillantes ;

Fleurs : Les fleurs du myrte sont blanches et apparaissent à la fin du printemps. Elles sont très parfumées. Ce sont des fleurs mellifères, parfumées, étoilées au calice tubulaire à 5 sépales

Chapitre 1 : Valorisation des plantes du sol local

soudés, corolle formée de 5 pétales et très nombreuses étamines de couleur jaune entourant un style ;

Fruits: Le fruit du myrte est une baie comestible et ovoïde, de couleur noire bleutée à maturité, souvent consommé, on les transformant en confiture ;

Fécondation : Les fleurs sont hermaphrodites ;

Floraison : En printemps ;

Expositions : *Myrtus communis* requiert les expositions mi-ombre et au soleil ;

Plantation : Au printemps ;

Toxicité : Indéterminée [5].



Figure (1) : Photo représentant les feuilles et les fleurs de *Myrtus communis* [6].

1.1.4. Répartition géographique de la plante

Le myrte (*Myrtus communis* L) est un représentant typique de la flore méditerranéenne, un arbrisseau annuel qui pousse dans les forêts de pin et dans plusieurs régions situées à 600 m d'altitude. Cette espèce appartient à un groupement végétal dénommé en français « oléolentisque » qui est spontané et elle est répartie dans l'air méditerranéen, surtout dans le bois et les coteaux, on le trouve aussi dans les pays d'Afrique du nord (Maroc, Algérie, Tunisie et Egypte) et dans tous les pays de l'Europe et dans les pays de l'ouest et du sud de l'Asie [2, 3].

Chapitre 1 : Valorisation des plantes du sol local

1.1.5. Culture et récolte de la plante

On ne peut cultiver le myrte que dans le sud de l'Europe, il faut lui choisir un emplacement abrité et ensoleillé, exposé sur un sol bien drainé. Ce sont des plantes qui résistent bien à la sécheresse. Un excès d'eau est par contre néfaste. On peut aussi le cultiver comme plante d'ornement dans un pot, en plein soleil. On le multiplie par semis de graines, par bouturage ou marcottage. Dans les régions où des gelées trop fréquentes sont à craindre, il faut protéger les plantes en hiver par la paille. Les feuilles fraîches sont prélevées au fur et à mesure des besoins toute l'année, en vue de leur séchage, il vaut mieux les cueillir en été. Les baies se récoltent à leur maturité en septembre- octobre [5].

1.1.6. Utilisations du *M.communis* en médecine traditionnelle

Le myrte est utilisé pour lutter contre les bronchites et les dilatations bronchiques, les catarrhes muco-purulentes des voies respiratoires et urinaires, la tuberculose pulmonaire, la rhinorrhées, la sinusite, les otites, les diarrhées, les prostatites, et les hémorroïdes. Il est connu également par leur effet hypoglycémique [7].

L'huile en inhalation est utile dans les infections bronchiques et des voies respiratoires supérieures. Elle est aussi préconisée dans les infections urinaires. Traditionnellement, l'infusion des feuilles (30 g par litre d'eau) est utilisée comme cicatrisant antiseptique.

En Iran, on en usait, sous la forme d'un cataplasme chaud, pour traiter les furoncles. En Afrique du Nord, les fleurs séchées sont préconisées pour soulager l'asthme et pour traiter la variole. Enfin, les afro-américains inhalent des vapeurs chaudes de thé à base de myrte pour lutter contre les migraines causées par un rhume ou une grippe. En raison de ses propriétés balsamiques, le myrte commun a trouvé de multiples applications dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques et agroalimentaires [8].

1.2. Monographie de *Globularia alypum*

1.2.1. Etymologie et dénomination

Son nom *Globularia* fait référence à la forme globuleuse de l'inflorescence et le terme *alypum* vient du grec *alypon* qui signifie calmer la douleur.

Nom français : Globulaire d'Arabie.

Nom latin : *Globularia alypum*.

Nom vernaculaire : Tasselgha.

Nom habituel : Ein larneb au Maroc [2], Chebra, Zerga [4]. En Algérie, elle est appelée Tasselgha [9].

Chapitre 1 : Valorisation des plantes du sol local

Synonymes : *Globularia alypum* var. *vesceritensis* Batt., *Globularia eriocephala* Pomel, *Globularia alypum* var. *eriocephala* (Pomel) Batt.

Nomenclature : *Globularia alypum* var. *arabica* (Jaub. & Spach) Cavara & Grande, *Globularia arabica* Jaub. & Spach.

1.2.2. Taxonomie

La taxonomie de *Globularia alypum* du point de vue botanique est la suivante:

Règne : Plantae - végétal ;

Sous règne : Eucaryotae - plantes vasculaires ;

Super division : Spermatophytes - plantes à graines ;

Division : Magnoliophyte - Angiospermae - plantes à fleurs ;

Classe : Magniliopsida - dicotylédones ;

Sous classe : Asteridae ;

Ordre : Scrophlariales ;

Famille : Globulariaceae ;

Genre : *alypum* ;

Espèce : *Globularia alypum* L [4].

1.2.3. Caractères morphologiques

Généralement, le *Globularia alypum* se distingue par les caractéristiques suivantes :

Morphologie : C'est un arbuste rameux d'environ 60 cm d'hauteur.

Feuilles : Feuilles coriaces, glauques, de forme obovale, se terminant en une petite pointe.

Fleurs : Fleurs réunies en capitules denses à bractées ciliées, atteignant près de 2 cm de diamètre et disposées le long et au sommet des tiges. Calice velu à 5 dents aigues. Corolle bleue, bilabée, ayant la lèvre supérieure très courte et l'inférieure, à 3 dents ; 4 étamines, à anthères d'un bleu violacé. 1 style.

Fruits : Fruits akéniens.

Floraison : La période de la floraison se situe en hiver au début du printemps (janvier à mars/avril) [2].



Figure (2) : Photo représentant les feuilles de *Globularia alypum* [10].

1.2.4. Répartition géographique de la plante

Cette plante originaire de sud de l'Europe sur le pourtour méditerranéen jusqu'en Grèce, Afrique du nord (Algérie, Maroc jusqu'au Sahara) et Asie mineure (Egypte, Arabie) en forêts, dans les terrains rocaillieux. *Globularia alypum* L. est trouvé dans le sud de l'Europe et en Afrique du nord au Maroc à Fezzan, dans l'altitude du Tibesti nord, dans l'Atlas saharien et dans le Hoggar. Les sous-espèces de *G. alypum* L. sont mentionnées dans le bassin méditerranéen, alors que la sous-espèce arabica (Jaub. et Spach.) est mentionnée seulement pour l'Algérie, le Maroc et le Hoggar [2].

1.2.5. Culture et récolte de la plante

Cette plante est distribuée largement en Algérie. C'est beaucoup a cherché après pour ses vertus thérapeutiques et elle est donc un sujet à cueillette fréquente, non supervisée. En effet, les tiges et les feuilles sont séchées et sont vendus par les herboristes et les vendeurs de plantes médicinales dans les souks locaux.

Chapitre 1 : Valorisation des plantes du sol local

1.2.6. Utilisations de *G.alypum* en médecine traditionnelle

Elle est utilisée fondamentalement pour ses vertus purgatif et diurétique. En effet, au Sahara ; elle est utilisée comme un purgatif pour la fièvre, le mal de tête, le rhumatisme et l'incontinence urinaire [11]. En Tunisie, elle intervient dans la préparation de décoctions concentrées (feuilles et branches) pour guérir des ulcères, des infusions pour colique, et de cataplasme (avec miel) pour apporter les abcès à une tête rapidement. Les écrits de Ben Ali et Louis ont mentionné qu'elle est recommandée dans le traitement de la goutte [11].

Une étude clinique portant sur les différentes indications thérapeutiques signalées a été réalisée par le Blatt. L'expérimentation réalisée avec le décocté aqueux de feuilles (cinq feuilles pour un litre d'eau) a mis en évidence une action intéressante comme diurétique et hypotenseur d'appoint. De plus, une observation a été faite dans un cas de lithiase rénale et une autre dans un cas d'ictère par hépatite [12].

1.3. Monographie de *Calicotome villosa*

1.3.1. Etymologie et dénomination

Le nom générique de *Calicotome* dérive du grec calyx, calice. Le calice se rompt circulairement et paraît, comme coupé après la floraison [2].

Nom français : Genêt.

Nom latin : *Calicotome villosa*.

Nom vernaculaire : Guendoul.

1.3.2. Taxonomie

La taxonomie de *Calicotome villosa* du point de vue botanique est la suivante:

Règne : Plantae - végétal.

Sous règne : Tracheobionta - Eucaryotae - plantes vasculaires

Super division : Spermatophytes - plantes à graines

Division : Magnoliophyte - Angiospermae plantes à fleurs

Classe : Magniliopsida - dicotylédones

Sous classe : Rosidaes

Ordre : Fabales

Famille : Fabaceae

Sous famille : Papilionoideae (Faboideae)

Genre : *Calicotome*

Espèce : *Calicotome villosa*.

Chapitre 1 : Valorisation des plantes du sol local

1.3.3. Caractères morphologiques

Les Calicotomes sont des arbrisseaux épineux, genêt à tiges élancées et écartées, formant des buissons qui peuvent atteindre deux mètres d'hauteur. Son rameau est vert, puis brun en vieillissant, et se termine en épine. Les feuilles sont composées de trois folioles ovales. Elles sont petites peu nombreuses et caduques. Les fleurs apparaissent dès la fin de l'hiver. Elles sont jaunes, groupées et très nombreuses. Les fruits sont des gousses aplaties, longues de trois à quatre cm, contenant trois à huit graines.

C.villosa subsp. *intermedia* est très répandu dans l'ouest d'Algérie. Elle s'appelle localement «Guendoul». Cet arbuste se distingue par ses gousses soyeuses mais non ailées sur la suture ventrale qui est simplement épaissie. Cette espèce est considérée comme une sous-espèce de *C.villosa*. C'est un arbuste de 1-1,5 mètre d'hauteur, très ramifié, à nombreux rameaux courts se terminant en fortes épines. Les tiges sont parcourues par 13-16 fines côtes longitudinales. Les feuilles, assez longuement pétiolées, comportent trois folioles ovales obtuses. Enfin, la période de stade de floraison s'étale entre mars et juin.

Généralement, *C.villosa* se distingue par les caractéristiques suivantes [4]:

Rameaux : Gris courts se terminant en fortes épines, couverts d'un duvet pulvérulent.

Feuilles : Assez longuement pétiolées, comportent 3 folioles obovales.

Fleurs : Jaunes.

Tiges : parcourues par 13-16 fines côtes longitudinales.

Gousse : Aplatie villeuse, à ailes de la suture ventrale très courtes.



Figure (3) : Photo représentant la plante de *Calicotome villosa* [10].

Chapitre 1 : Valorisation des plantes du sol local

1.3.4. Répartition géographique de la plante

Le Calicotome préfère les sols siliceux. En région méditerranéenne, les Calicotomes sont représentés principalement par trois espèces (*C.spinosa*, *C.villosa*, *C.villosa* subsp. *intermedia*). Lorsqu'on le rencontre dans la garrigue, c'est le signe d'une certaine pauvreté en calcaire. On le trouve dans les forêts de pin maritime, dans les subéraies et le maquis qu'il contribue à rendre difficilement pénétrable.

Le genêt (*Calicotome villosa*) est un arbrisseau annuel et typique de la flore méditerranéenne [13, 14]. On le trouve dans les pays d'Afrique du nord (Maroc, Algérie et Tunisie) et l'Espagne [15]. Communément, cette espèce appartient à un groupement végétal dénommé « légumineuse » qui est spontané et elle est répartie dans l'air méditerranéen, surtout dans plusieurs régions situées entre 0-1200 m d'altitude [16]. En outre, quelques espèces poussent à l'état spontané dans la région de Sardaigne en Italie [17].

Le *C.villosa* subsp. *intermedia* vit dans les montagnes proches du littoral en Afrique du nord et en Espagne méridionale [4, 18].

1.3.5. Culture et récolte de la plante

Les genêts (*C.villosa*) sont capables grâce aux nodosités de leurs racines, de fixer l'azote atmosphérique et d'enrichir le sol en produits azotés. Les ruminants évitent cette plante à cause de ses épines.

1.3.6. Utilisations du *C.villosa* en médecine traditionnelle

Le *C.villosa* est utilisé pour lutter contre les furoncles, les abcès cutanés et les engelures dans la médecine populaire sicilienne [19]. Il est connu également par son effet antitumoral [20].

Chapitre 2 : Méthodes d'extraction et d'analyse d'extraits végétaux

1. Fractionnement de la matière végétale

Plusieurs techniques d'extraction peuvent être mises en œuvre pour extraire les principes actifs des plantes, toujours très recherchés pour toutes sortes d'application en alimentaire, cosmétique et pharmacie. Parmi les techniques conventionnelles, on trouve :

1.1. L'hydrodistillation

Ce mode d'extraction a été proposé par Garnier en 1891, c'est la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement la plus utilisée pour extraire les HE et pouvoir les séparer à l'état pur mais aussi de fournir de meilleurs rendements. Le principe consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition à pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement des cellules et la libération des molécules odorantes, ensuite les vapeurs hétérogènes vont se condenser sur une surface froide et l'HE sera alors séparée de l'hydrolat par différence de densité [21].

L'huile essentielle étant plus légère que l'eau (sauf quelques rares exceptions), elle surnage au-dessus de l'hydrolat. Cette technique dépend de plusieurs facteurs : la température de distillation autour de 100°C, la durée de distillation et l'acidité peuvent donner lieu à des réactions telles que l'hydrolyse des esters, la polymérisation des aldéhydes ou la décomposition d'autres composés [22].

Le protocole est le même pour une extraction à grande échelle mais le ballon et le chauffe-ballon sont remplacés par un alambic et l'erlenmeyer par un vase florentin. Bien que très avantageuse, l'hydrodistillation connaît des inconvénients ; l'alambic doit être en inox ou en cuivre, le chauffage doit être fait sous basse pression, éviter la suroxydation et la décomposition des molécules, et doit être contrôlé régulièrement, l'eau doit être de l'eau de source non calcaire et l'extraction est relativement longue [23].

En guise d'exemple, l'extraction par micro-ondes de *Myrtus communis* permet d'obtenir un rendement d'huile essentielle en 30 minutes alors que 180 minutes d'hydrodistillation sont nécessaires pour obtenir un rendement des composées oxygénées similaire à partir de la même masse de plante [24].

1.2. Extraction au solvant

1.2.1. Extraction directe à l'aide d'un soxhlet

L'extraction par Soxhlet est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première [25].

Chapitre 2 : Méthodes d'extraction et d'analyse d'extraits végétaux

C'est une méthode classique pour l'extraction solide-liquide. L'échantillon entre rapidement en contact avec une portion de solvant pur, ce qui aide à déplacer l'équilibre de transfert vers le solvant. De plus, elle ne nécessite pas de filtration après extraction et peut être utilisée quelque soit la matrice végétale. Ses inconvénients les plus significatifs sont la durée importante d'extraction et la grande quantité de solvant consommée (devant être ultérieurement évaporé), ce qui limite sa rentabilité économique et la rend peu écologique. Il n'y a pas de possibilité de travailler à froid, ce qui peut être gênant avec des substances sensibles à la chaleur. Cette technique est limitée d'un point de vue de la sélectivité du solvant et n'est pas facilement automatisable. Elle donne les meilleurs résultats, mais selon les auteurs, cette technique n'est pas toujours acceptable à l'échelle industrielle du fait de la durée élevée de l'extraction, de la consommation élevée de solvants dangereux [25].

1.2.2. Fractionnement à l'aide de solvants

L'extraction par solvant organique volatil reste la méthode la plus pratiquée. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol, moins fréquemment le dichlorométhane et l'acétone [26]. Les huiles essentielles ont la propriété de se solubiliser dans la plupart des solvants organiques en particulier les hydrocarbures aliphatiques (n-pentane, n-hexane) [27]. Les solvants, purs ou en mélange sont choisis en fonction de leurs propriétés, entre autre, la polarité, la température d'ébullition, la réactivité et la possibilité d'être recyclés [28].

En fonction de la technique et du solvant utilisé, on obtient [29] :

- Des hydrolysats : extraction par solvant en présence d'eau.
- Des alcoolats : extraction avec l'éthanol dilué.
- Des teintures ou solutions non concentrées obtenues à partir de matières premières traitées par l'éthanol ou des mélanges éthanol/eau.
- De résinoïdes ou extraits éthanoliques concentrés.

Certains procédés d'extraction ne permettent pas d'obtenir des huiles essentielles à proprement parler mais des concrètes. Il s'agit d'extraits de plantes obtenus au moyen de solvants non aqueux. Ces derniers peuvent être des solvants usuels utilisés en chimie organique (hexane, éther de pétrole) mais aussi des graisses, des huiles (absorption des composés volatils lipophiles par des corps gras) ou même encore des gaz. Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras et bien d'autres [30, 31].

Chapitre 2 : Méthodes d'extraction et d'analyse d'extraits végétaux

Dans le cas des extraits à l'aide de corps gras, un lavage à l'éthanol permet l'élimination de ces composés non désirables. La solution alcoolique ainsi récoltée est refroidie jusqu'à -10 °C pour en séparer les cires végétales qui se solidifient. Après distillation de l'alcool, le produit obtenu est appelé "absolu" et sa composition se rapproche de celle d'une huile essentielle [32]. On épuise les plantes par des solvants volatils, qui sont distillés ensuite (par exemple l'essence de jasmin). On obtient par ce procédé les «concrètes», habituellement de consistances solides et insolubles dans l'alcool (une partie soluble pour 100 d'alcool à 95°). Ces « concrètes » par traitement, conduiront aux « absolues » (soluble dans l'alcool à froid). Cette technique utilise les propriétés de solubilité des produits concentrés dans un solvant donné. On distingue deux types de solvants : apolaire et polaire. Les solvants apolaires dissolvent les molécules apolaires par exemple, l'hexane est un bon solvant pour les terpènes. L'emploi restrictif de l'extraction par solvants organiques volatils se justifie par son coût, les problèmes de sécurité et de toxicité, ainsi que la réglementation liée à la protection de l'environnement. L'extraction à l'aide de solvants organiques pose un problème de toxicité des solvants résiduels ce qui n'est pas négligeable lorsque l'extrait est destiné aux industries pharmaceutique et agro-alimentaire [21].

2. Production de minéraux

2.1. L'incinération et la calcination

Ces procédés assurent l'oxydation à haute température en phase gazeuse (généralement supérieure à 850°C) des matières organiques contenus dans les déchets dont le but est la caractérisation des matières résiduelles. Lors de l'incinération, la température est atteinte grâce à la chaleur de combustion des matières organiques. En général, un déchet est composé d'eau et de la matière sèche. Cette matière sèche comprend une fraction minérale, des métaux et une fraction organique. Les cendres concentrent les matières minérales et les métaux. Les procédés de traitement des déchets visent à éliminer la matière organique et préserver si possible la matière minérale et métaux résiduels (cendres). L'incinération et la calcination assurent la combustion à haute température des matières organiques.

Les trois données essentielles à prendre en considération pour estimer les perspectives d'une incinération sont :

- La teneur en matière sèche (MS) du déchet brut ;
- La teneur en cendres (A) de la matière sèche. On en déduit la fraction organique (MO) de la matière sèche avec : $MO = 100 - A$;
- Le pouvoir calorifique inférieur de la matière organique (PCI_{MO} en MJ/kg) [33].

Chapitre 2 : Méthodes d'extraction et d'analyse d'extraits végétaux

3. Techniques d'analyses d'extraits végétaux

3.1. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (ms) est une technique physique d'analyse permettant d'identifier des molécules par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Avec un spectromètre de masse, on peut détecter tous les composés inorganiques et organiques.

Dans le secteur particulier des huiles essentielles, le couplage CPG/ms est, aujourd'hui, la technique de référence [34]. Lorsqu'on soumet un composé moléculaire à cette analyse, on déclenche un processus à plusieurs étapes [35] :

- Ionisation : les molécules présentes dans l'échantillon se volatilisent sous l'effet du vide et de la haute température (200°C), il en résulte un mélange d'ions issus de la fragmentation de l'échantillon de départ ;
- Accélération : Les ions formés se dirigent vers le dispositif de séparation sous l'effet d'un champ magnétique augmentant ainsi leurs énergies cinétiques.
- Séparation : Les ions seront distribués suivant leur rapport masse/charge ;
- Détection : après séparation, les ions sont recueillis par un détecteur sensible aux charges électriques transportées ;
- Traitement du signal : le signal de sortie de l'appareil conduit au spectre de masse qui constitue la représentation conventionnelle de l'abondance des ions en fonction de leurs rapports : masse/charge.

L'appareillage CPG/ms permet de fournir un chromatogramme accompagné d'un ensemble de spectres de masse correspondants à chaque pic chromatographique, ce qui permet l'identification précise de la majorité des constituants séparés par la CPG.

3.2. Microscope électronique à balayage

Parmi toutes les microscopies électroniques, la microscopie électronique à balayage (MEB) est une des méthodes d'observation et d'analyse les plus utilisées en géologie, science des matériaux et biologie. Cette nouvelle technologie a permis, du fait de sa profondeur de champ, l'observation du relief d'échantillons massifs.

Le microscope électronique à balayage n'est pas proprement dit un microscope conventionnel dans le sens optique du terme. En effet, il n'y a pas formation d'une image par une lentille objective comme cela est le cas en microscopie optique et en microscopie

Chapitre 2 : Méthodes d'extraction et d'analyse d'extraits végétaux

électronique en transmission mais l'image est formée de manière séquentielle en balayant la surface de l'échantillon et en recueillant les particules émises.

La microscopie électronique à balayage (MEB) utilise un faisceau électronique très fin qui balaie point par point la surface de l'échantillon sous vide. Le signal reçu par le détecteur est synchronisé avec celui du faisceau incident. Le faisceau incident provoque différentes interactions avec la matière rencontrée (échantillon), dans un certain volume (poire de diffusion $1\mu\text{m}^3$). Les différentes émissions sont alors mesurées par des détecteurs appropriés. Nous distinguerons principalement :

- Les électrons secondaires (interaction des électrons du faisceau avec les électrons des couches électroniques de l'atome) permettant l'imagerie de surface.
- Les électrons rétrodiffusés (l'interaction entre les électrons du faisceau, le noyau et le nuage électronique de l'atome) utilisés pour une image de composition (contraste en fonction du numéro atomique).
- Les Rayons X : L'atome ionisé se désexcite ; son retour à l'état stable induit soit l'émission d'un photon X, soit d'un électron Auger. L'énergie des rayons X émis lors de la désexcitation des atomes dépend de la nature chimique de l'atome (ce sont les raies caractéristiques). A partir du spectre de rayons X (EDX), on obtient une analyse chimique élémentaire ponctuelle ou une cartographie de répartition élémentaire de la zone étudiée.
- Les photons de grande longueur d'onde (400 à 1200 nm) révèlent souvent des zonation de croissance liées à de très faibles variations de teneur en éléments traces dans des minéraux [36].

3.3. Spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie

La spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (ou EDS, abréviation de l'anglais « Energy dispersive X-ray spectroscopy ») est une faculté analytique qui peut être couplée avec plusieurs applications, dont la microscopie électronique à balayage SEM, la microscopie électronique en transmission (TEM) et le microscope électronique en transmission par balayage (STEM).

Combinée à ces outils d'imagerie, l'EDS peut donner l'analyse élémentaire sur des surfaces aussi petites que la taille du nanomètre en diamètre. L'impact du faisceau d'électrons sur l'échantillon produit des rayons X qui sont caractéristiques des éléments présents sur l'échantillon. L'analyse peut servir à déterminer la composition élémentaire de points

Chapitre 2 : Méthodes d'extraction et d'analyse d'extraits végétaux

individuels ou à faire ressortir par cartographie à la distribution latérale d'éléments issus de la zone numérisée sous forme d'image [36].

4. Composition chimique d'extraits végétaux

4.1. Familles biochimiques

L'analyse chimique des huiles essentielles indiquent qu'elles sont homogènes ou hétérogènes dans leur composition au regard de la structure chimique des composés. Prés de 10000 sont chimiquement définis, on peut les regrouper dans les différentes familles de composés chimiques dont la masse moléculaire est relativement faible (terpènes : 136 u.m.a, terpénoles : 154 u.m.a.), ce qui leur confère un caractère volatil et est à la base de leurs propriétés olfactives. On y trouve généralement de nombreux constituants appartenant principalement à deux grandes familles chimiques : les composés terpéniques et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane, les deux sont synthétisés à travers deux voies métaboliques séparées.

4.1.1. Les terpénoïdes

Ils représentent le groupe le plus diversifié des métabolites secondaires dans les végétaux, plus de 15.000 composés différents sont décrits dans la littérature. Ils sont construits à partir de plusieurs entités isopréniques, constituant une famille très diversifiée tant au niveau structural que fonctionnel. Ils dérivent d'une structure de base à cinq carbones (C_5H_8), communément appelée isoprène. Selon le nombre répétitif de cette unité, Les composés terpéniques sont formés d'unités isopréniques en (C_5) et comprennent les monoterpènes en (C_{10}), les sesquiterpènes (C_{15}), les diterpènes (C_{20}) et les triterpènes en (C_{30}). Ils ont la même origine métabolique. Ces terpènes peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. Dans la composition de la plupart des huiles essentielles les monoterpénoïdes et les sesquiterpénoïdes forment la majeure partie.

- **Monoterpènes** : les carbures sont presque toujours présents. Les monoterpènes constituent parfois plus de 90% de l'huile essentielle (Citrus, térébenthies) [21]. Ils sont classés selon leurs nombre de cycle (composés acycliques : mono et bicycliques) et selon la nature des fonctions qu'ils portent [37]. Il existe plusieurs molécules fonctionnelles:
 - Alcools : acycliques (géraniol, linalol, citronellol), monocycliques (menthol, α -terpinéol, terpin-1-èn-4-ol), bicycliques (bornéol, feuchol) ;
 - Aldéhydes : sont le plus souvent acycliques (géraniol, néral, citronellal) ;

Chapitre 2 : Méthodes d'extraction et d'analyse d'extraits végétaux

- **Cétones** : acycliques (tagétone), monocycliques (menthone, isomenthone, carvone, pulégone), bicycliques (camphre, feuchone, thuyones) ;
 - **Esters** : acycliques (acétate ou propionate de linalyle, acétate de citronellyle), monocycliques (acétate de menthyle, acétate d' α -terpinyle), bicycliques (acétate d'isobornyle) ;
 - **Ethers** : 1,8-cinéole (ou dit aussi eucalyptol), di-éther, mais aussi les éthers cycliques, tétrahydrofuraniques ou di- et tétrahydropyraniques qui, pour certains, jouent un rôle majeur dans l'arome des fruits (oxydes de linalol, oxydes de rose) ;
 - **Peroxydes** : ascaridole ;
 - **Phénols** : thymol, carvacrol.
- **Sesquiterpènes** : les variations structurales dans cette série sont de même nature que dans le cas précédent, carbures, alcools et cétones étant les plus fréquents. Il convient de remarquer que l'allongement de la chaîne accroît le nombre des cyclisations possibles, d'où la très grande variété des structures connues (plus d'une centaine de squelettes différents ont été décrits). On trouve ci-contre quelques exemples des sesquiterpènes caractéristiques des huiles essentielles :
- **Carbures mono- ou polycycliques** : (β -bisabolène, β -caryophyllène, longifolène),
 - **Alcools** : (farnésol, carotol, β -santalol, patchoulol),
 - **Cétones** : (nootkatone, cis-longipinane-2,7-dione, β -vétivone),
 - **Aldéhydes** : (sinensals),
 - **Esters** : (acétate de cédryle).

4.1.2. Les phénylpropanoïdes

Ils sont moins fréquents par rapport aux terpénoïdes. Néanmoins, certaines plantes possèdent ces composés avec des proportions significatives. Les phénylpropanoïdes dérivent majoritairement de la phénylalanine. Ils sont constitués d'une chaîne carbonée liée à un noyau aromatique à six carbones. Ces composés aromatiques dérivés du phényl-propane tel que l'eugénol (huile essentielle de girofle), l'anéthol et l'aldéhyde anisique (huile essentielle de Badiane et d'anis), le carvacrol (huile essentielle d'origan), l'acide et l'aldéhyde cinnamiques. Ceux-ci constituent les principaux membres de cette famille. Les huiles essentielles peuvent contenir des composés aliphatiques plus ou moins fonctionnalisés.

Chapitre 2 : Méthodes d'extraction et d'analyse d'extraits végétaux

4.1.3. Composés d'origines diverses

Il s'agit là de produits résultants de transformation de molécules non volatiles. Ces composés contribuent souvent aux arômes de fruits. Ce sont des produits dont l'origine est la dégradation d'acide gras ou celles de terpènes, renfermant aussi des composés azotés ou soufrés [21]. Ces corps jouent un rôle important dans la saveur et l'odeur des fruits, des légumes, du thé et dans la formation de substances toxiques vis-à-vis des bactéries, des champignons et des insectes [38].

4.2. Structure de base et sites fonctionnels

La structure des composés des huiles essentielles est constituée d'un squelette hydrocarboné, constituant une chaîne plus ou moins longue. Sur ce squelette de base est souvent présent un ou plusieurs sites fonctionnels semblables ou différents. La majorité des sites fonctionnels sont des sites oxygénés avec un ou plusieurs atomes d'oxygène (O), pour quelques groupes fonctionnels azotés (N) ou soufrés (S), cette structure varie en fonction :

- Du nombre d'atomes de carbone qui la constitue : Monoterpènes C₁₀, Sesquiterpènes C₁₅, Diterpènes C₂₀.
- Du caractère saturé ou insaturé des liaisons.
- De leur agencement : linéaire ou cyclique.
- De la configuration spatiale. (forme de chaise, de bateau...).
- De la nature des groupes fonctionnels : terpènes, alcools terpéniques, cétones, phénols, aldéhydes, esters et éthers.

4.3. Notion de chémotype

C'est une classification chimique, biologique et botanique qui désigne la molécule majoritairement présente dans une HE [21]. Cette classification des HE selon le produit majoritaire ou chémotype dépend d'un certain nombre de facteurs, entre autres :

- Le mode de culture de la plante (région, saison, variété).
- La période de la récolte : Les taux des composées sont différents d'une récolte à l'autre.
- Le stade de développement botanique : pendant ou après la floraison : Les parties sécrétrices ou les plus concentrées de la plante sont récoltées à la période de rendement optimum : avant la floraison (Menthe), pendant (Myrte) et après celle-ci (plantes à graines et fruits). Quelques composants majoritaires de l'HE de myrte sont présentés dans le **tableau (1)**.
- L'organe distillé.

Chapitre 2 : Méthodes d'extraction et d'analyse d'extraits végétaux

- Le mode d'extraction utilisé tel que la distillation ou l'hydro-distillation.
- L'origine géographique de la plante.
- Le mode de la conservation : elles se conservent pendant plusieurs mois, voire plusieurs années si elles sont placées dans un lieu frais et sombre avec le bouchon bien fermé. Exposées à la lumière et à la chaleur, elles risquent de s'oxyder et de se transformer en résine. En respectant ainsi ces recommandations nous gardons les propriétés chimiques des huiles essentielles. Les huiles essentielles sont stables à température ambiante si elles sont conservées de manière adéquate : à l'abri de l'oxydation et de la polymérisation provoquée par l'air, par la lumière et par les variations de la température [21, 39, 40].

4.4. Facteurs de variabilité de la composition des HE

Etant formées de mélanges généralement complexes, les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs, que nous pouvons regrouper en deux catégories :

4.4.1. Facteurs intrinsèques

Ce sont des facteurs liés à l'espèce, au type de clone, à l'organe concerné, à l'interaction avec l'environnement (type de sol ou climat, ...) et au degré de maturité du végétal concerné, voire au moment de la récolte au cours de la journée. La variété des huiles essentielles dépend des facteurs suivants :

- **l'espèce botanique :**

En règle générale ; chaque espèce possède sa particularité aromatique et produit une essence spécifique [37].

- **l'organe sécréteur :**

La distinction de l'organe sécréteur importe peu pour les espèces utilisées en « plante entière », mais elle doit être précisée pour les autres. En règle générale, l'essence varie selon les organes, même pour les plantes annuelles ou bisannuelles, la *Mentha piperata* par exemple, cumule ses esters dans la tige alors que les alcools se trouvent plus abondamment dans les feuilles. Il est donc important de connaître l'organe distillé car la composition des essences étant différente selon les cas, les possibilités et vertus thérapeutiques seront distinctes (**Tableau 2**).

Chapitre 2 : Méthodes d'extraction et d'analyse d'extraits végétaux

Tableau (1) : Récapitulatif des composants majoritaires des huiles essentielles de myrte de différentes régions du monde

N°	Pays	Région	Nombre	1,8 cinéole	α -Pinène	Limonène	Linalool	α -Terpineol	Myrtenyl acetate	Linalyl acetate	Terpinène-4-ol	Geranyl acetate	Terpinyl acetate	
1	Algérie	Bainen		25.46	44.62	3.71	2.07	2.16	-	0.37	1.33	2.23	0.72	
			[24] [52] [53]		32.12	30.65	2.22	2.9	3.01	-	0.87	2.89	3.1	1.61
				24.3	50.8	2.6	1.3	2.5	-	-	-	-	2.1	0.9
				21.8	23.3	2.2	2.9	5.7	-	-	-	-	3.8	1.2
				35.7	45.4	8.36	1.93	-	0.13	-	0.35	-	-	-
2	Tunisie	Tabarka		24.2	51.1	6.1	2.3	-	-	-	-	1.7	1.7	
			[54][55]	39	18.97	52.29	9.13	1.58	1.12	0.16	1.23	1.29	0.87	1.32
			[53] [56]	49	23.5	29	16.6	11.55	-	0.2	1.22	0.11	1.25	0.38
					21.67	58.05	0.11	2.45	-	0.04	0.72	0.36	1.34	0.36
					20.9	30.5	10.1	17.7	-	0.84	-	0.29	-	-
3	Maroc [56]			22.3	30	18.16	9.24	-	0.89	-	0.27	-	-	
					32.5	18.5	8.9	1.7	-	14.8	-	-	1.8	3.7
					27.2	25.5	1.6	11.8	-	4.2	3.4	-	3.8	1.4
					29.4	21.2	10.6	3.1	-	4.6	0.5	-	1.3	
					26.54	19.39	0.54	15.96	8.42	0.43	7.72	1	3.05	3.45
4	Iran	Damavand		23.2	34	4	10.1	5.5	0.3	-	0.3	4.1		
			[47][58]		20.5	42.8	4	9.2	0.3	-	-	-	3	2.4
			[59][60]	20	24.6	31.8	14.8	8.3	-	-	3.4	-	-	1
					29.1	38.6	17.7	5.5	-	-	2.5	-	-	-
					26.3	32.1	19	6.8	1.1	2	2.2	-	1	1.6
5	Liban [56]				56.6	5.68	1.55	3	-	-	0.27	2.38	0.57	
			[61] [62]	30	24.2	28.9	-	2.9	2.8	-	0.7	-	-	1.1
6	Italie	Jerzu		30.1	52	5.9	1.8	1.1	-	-	-	1.6		
			[63][56] [64]		18.9	53.5	5.19	2.83	-	-	-	-	1.4	1.87
7	France	Corse		14	32.92	52.9	-	4.21	2.46	-	0.42	1.64	0.64	
			[63][56] [64]	16	50.13	-	4.26	12.65	7.57	-	-	0.37	-	-
8	Chypre [65]	Famagouste		10.5	6.4	-	16.3	4.3	10.8	5.5	-	4.2	0.8	
			[66][67]		24.2	31.2	13.8	8.8	4.9	-	3.9	-	-	4.19
9	Turquie	Zakynthos		12.7	10.1	TR	7	1.8	38.7	2.5	0.2	-	-	
			[68]	42										
10	Grèce [68]			-	10.4	20	-	2.7	7	-	-	-	-	
			[69]											
11	Portugal [69]			11.6	14.5	23.4	20.2	-	-	-	-	-	-	
			[70]											
12	Azerbaïdjan			21.6	23.8	12	7.5	-	14	1.8	-	2.2	2	
			[71]		21.8	19.4	10.9	8.8	2.1	11.4	2.6	-	0.9	-
13	Serbie [71]			12.6	6.6	-	10.8	3.9	13.5	2.7	-	1.4	-	
			[72]											
14	Croatie [72]			29.2	8.9	7.6	-	4.2	35.9	-	-	1.7	-	
			[73]											
15	Espagne [73]			25.7	14.7	4.1	10.1	3.1	21.6	-	-	3.4	1.4	
			[7]											
16	Monténégro	Ulcinj		23.9	35.9	4.5	10.9	2.8	5.4	-	-	2.3	0.5	
			[7]											

Chapitre 2 : Méthodes d'extraction et d'analyse d'extraits végétaux

Tableau (2): Organes de certaines plantes riches en huiles essentielles [41].

Partie de plante	Exemple
Feuilles	Romarin, sauge, myrte
Feuilles de confères	Sapin, cèdre
Tiges	Citronnelle, lemon-grass
Ecorce	Cannelier
Racine	Angelica, vétiver
Rhizomes	Acorus, gingembre
Bulbes	Oignon
Bois	Santal
Fruits	Bleuet, citron
Fleurs	Jasmin, rose
Graines	Aneth

- La dénomination botanique et partie de la plante

Une HE doit être rapportée au matériel botanique d'où elle est issue, d'où l'importance accordée à la nomenclature [42]. Elle peut s'extraire de plusieurs parties de la plante, la quantité et la qualité diffèrent, d'où la nécessité de spécifier le nom de la partie utilisée [43].

- Les hybridations :

Les hybridations introduisent l'hétérogénéité dans un peuplement végétal, les hybrides obtenues sont en général riches en principe actifs. De plus, beaucoup sont stériles et sont donc multipliées par voies végétales, ce qui permet de conserver leurs caractères [44].

- Le cycle végétatif :

Le cycle végétatif d'une plante est caractérisé par l'alternance de différentes phases de développement et toutes les modifications qui les accompagnent au niveau de la plante [21]. Une essence reste modulable en fonction des besoins particuliers de la plante. Sa composition n'est pas statique [45]. Des variations importantes peuvent se produire au cours du cycle végétal autant en ce qui concerne le rendement et la composition chimique en huile essentielle [45, 46]. Par exemple, le rendement de l'HE des feuilles de myrte est extrêmement élevé au cours de la phase de floraison par rapport aux autres périodes du cycle végétatif (la végétation et la fructification), ce qui influence directement sa composition chimique ainsi que l'activité biologique [42, 47, 48].

4.4.2. Facteurs extrinsèques

- Conditions d'environnement

Il s'agit là de l'incidence des facteurs de l'environnement et des pratiques culturales (l'apport d'engrais et l'influence des variations N.P.K., régime hydrique), la température, la

Chapitre 2 : Méthodes d'extraction et d'analyse d'extraits végétaux

durée totale d'insolation et le régime de vents exercent une influence directe sans ainsi oublier les facteurs géographiques et édaphiques [41, 42].

Les éventuelles modifications sont conséquentes principalement des conditions météorologiques ainsi que du stade végétatif. De trop mauvaises conditions météorologiques entraveront l'enrichissement en oxygène du précurseur. Par ailleurs, la plante pourra utiliser son essence à un stade avancé de son élaboration pour sa propre défense immunitaire.

- Méthode d'extraction

Huang et al (1995) ont montré l'influence des méthodes d'extraction sur la composition des huiles essentielles [49].

- Mode de conservation

Le stockage des matières premières avant distillation peut également influencer la composition et le rendement des huiles essentielles. Fantino (1990) a noté des pertes considérables d'huile essentielle lors d'un stockage prolongé au congélateur, mais peu d'évolution de la composition [50]. Par ailleurs le temps de stockage des HE après extraction tend aussi à modifier la composition de ces huiles. D'après Carette (2000), les huiles essentielles se conservent entre 12 et 18 mois après leur obtention, car, avec le temps, leurs propriétés tendent à décroître [51].

4.5. Facteurs techniques responsables de variabilités quantitative et qualitative des HE

Les facteurs affectant les rendements de l'extraction des HE sont les suivants :

- Une mauvaise conduite de la distillation via :
 - une mauvaise gestion de la chauffe ou un mauvais refroidissement.
- Un matériel végétal de mauvaise qualité.

Les problèmes de qualité rencontrés sont quant à eux imputables:

- Au stade avancé du matériel conduisant à des essences contenant des notes « de fermenté » ;
- A la carbonisation du matériel par contact avec les parois de la cucurbitte donnant des huiles avec des notes « de brûlé » ;
- Aux alambics rouillés donnant une mauvaise coloration de l'huile ;
- Au mauvais nettoyage de l'alambic, des essenciers, du refroidisseur ;
- Au stockage dans des récipients inadaptés.
- Les problèmes qualitatifs et quantitatifs rencontrés au laboratoire durant les distillations sont imputables aux mêmes causes que celles rencontrées lors de distillations sur le terrain.

Chapitre 3 : Applications et marché mondial

1. Activité antibactérienne

Les HE les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes appartiennent aux Labiatae : origan, thym, sauge, romarin, clou de girofle sont d'autant de plantes aromatiques à HE riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés possèdent une forte activité antibactérienne. Le carvacrol est le plus actif de tous, reconnu pour être non toxique, il est utilisé comme agent de conservation et arôme alimentaire dans les boissons, friandises et autres préparations. Le thymol et l'eugénol sont utilisés dans les produits cosmétiques et alimentaires. Ces composés ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium spp* et *Helicobacter pylori* [74].

Un autre exemple, l'huile essentielle des feuilles de myrte à plusieurs activités biologiques en tenant compte son activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries Gram- et Gram + grâce à sa composition chimique et ses composants majoritaires (**Tableau 3**) où l'effet antibactérien des feuilles de myrte a été récemment rapporté [65]. En parallèle, Salvagnini et al (2008) ont étudié l'activité antibactérienne de l'HE de myrte vis-à-vis *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Serratia marcescens* [75]. En plus, l'huile essentielle de myrte a montré une action antimicrobienne contre des souches cliniques de *Mycobacterium tuberculosis* ainsi que contre des souches d'*Helicobacter pylori* [76, 77].

Reconnu pour être non toxique, l'eugénol est un ingrédient actif utilisé principalement dans les produits cosmétiques, alimentaires, et dentaires. L'effet synergique de l'eugénol avec des antibiotiques a été élaboré contre les bactéries Gram négatif. Les bactéries Gram positif sont connues pour être plus sensibles aux huiles essentielles que les bactéries Gram négatif [78].

Chapitre 3 : Applications et marché mondial

Tableau (3) : Activités antibactériennes de *M. communis* provenant de différentes régions du monde

Souche bactérienne	Région											
	Algérie [105][24][53]	Tunisie [106]	Maroc [107]	Italie [77][108] [109][110][111]	Turquie [111][112]	Chypre [65]	France [63][64]	Iraq [113]	Syrie [114]	Egypte [115]	Iran [116][117][118] [119][63][120]	Pakistan [121]
<i>Helicobacter pylori</i>				+								+
<i>Escherichia coli</i>	+		-	+	+	+	+			+/-	+	
<i>Proteus mirabilis</i>	+										+	
<i>Proteus vulgaris</i>			+	+	+			+		+/-		
<i>Salmonella typhi</i>		+		+	+	+						-
<i>Salmonella enterica</i>	+											-
<i>Shigella dysenteriae</i>												-
<i>Klebsiella oxytoca</i>												-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+											+
<i>Enterobacter cloacae</i>	+					-						
<i>Enterobacter aerogenes</i>												-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+		+	-	+/-	-	-			+		+/-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>			+									
<i>Vibrio cholerae</i>												+
<i>Bacillus subtilis</i>	+		+	+	+	+				+/-	+	
<i>Bacillus licheniformis</i>												+
<i>Bacillus cereus</i>												
<i>Listeria innocua</i>			+									
<i>Listeria monocytogenes</i>	+		+			+						+
<i>Enterococcus faecium</i>			+									
<i>Enterococcus faecalis</i>												-
<i>Enterococcus durans</i>							+					
<i>Staphylococcus aureus</i>	+		+	+	+	+	+	+	+	+/-		+/-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>				+	+							
<i>Streptococcus faecalis</i>				+	+							-
<i>Streptococcus iniae</i>												+
<i>Sarcina lutea</i>										+		
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>				+								
<i>Mycobacterium phlei</i>										+/-		

Chapitre 3 : Applications et marché mondial

1.1. Techniques d'évaluation de l'activité antibactérienne

1.1.1. L'aromatogramme

Cette technique est comparable à l'antibiogramme. Le principe de cette méthode repose sur la diffusion du produit à tester (avec une concentration connue) en milieu solide, dans une boîte de pétri préalablement ensemencée. L'agent antimicrobien diffuse dans le milieu, créant une zone claire d'inhibition de croissance du germe, autour du disque chargé d'agent antimicrobien.

L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure de la zone d'inhibition. Il est indispensable d'établir un antibiogramme pour comparer l'effet du produit testé aux antibiotiques. En fonction du diamètre d'inhibition, on peut classer les souches étudiées en souches sensibles, intermédiaires ou résistantes. Pour obtenir des résultats fiables, il faut travailler dans des conditions standardisées car plusieurs facteurs peuvent influencer sur les résultats :

- La densité de l'inoculum
- La température d'incubation
- Le temps d'incubation
- La concentration du produit à tester
- La composition du milieu de culture, ainsi que l'épaisseur de la gélose.

Certains auteurs mentionnent que les résultats des tests des huiles essentielles ne sont pas toujours comparables d'un groupe à l'autre, car certains diffusent mal dans la gélose [79].

1.1.2. Les concentrations critiques

➤ **La concentration minimale inhibitrice (CMI)**

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en mg/l d'un antibiotique capable d'inhiber la croissance du microorganisme, après 18 heures de contact. Dans le cas des bactéries, la CMI est une donnée quantitative d'un antibiotique pour une souche bactérienne. C'est une information précise, nécessaire devant une bactérie multi-résistante à la recherche du niveau d'activité d'un antibiotique et permettant un choix thérapeutique adapté. Concernant les huiles essentielles, les techniques de détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI sont décrites par plusieurs études [80].

Chapitre 3 : Applications et marché mondial

➤ La concentration minimale bactéricide (CMB)

La CMB est définie comme étant la concentration de l'antibiotique qui laisse moins de 0,01% de survivants de microorganismes après 18 heures. Les antibiotiques classifiés comme bactéricides sont ceux pour lesquels il ya peu d'écart entre la CMI et la CMB [81].

1.1.3. Notion du bactéricide et du bactériostase

Quand l'antibiotique (ou l'HE) inhibe seulement la croissance des bactéries, on parle ici de l'effet bactériostase, mais lorsque l'antibiotique provoque la mort des bactéries on parle de l'effet bactéricide. Les huiles essentielles sont généralement très peu solubles dans l'eau, ce qui rend leur étude biologique et pharmacologique difficile, pour résoudre ce problème plusieurs auteurs suggèrent l'utilisation des solvants organiques comme l'acétone, le DMSO, DMF, ou l'utilisation des produits émulsifiants (tensioactif comme le tween 20 ou tween 80) pour aider l'huile essentielle à se solubiliser dans le milieu de culture [81].

1.2. Facteurs affectant la bioactivité des HE

L'étude des activités biologiques et pharmacologiques des huiles essentielles (ou leurs constituants) peut tenir en compte des paramètres et facteurs suivants :

- L'effet de la partie de la plante traitée

L'activité biologique des huiles essentielles diffère d'une partie à l'autre de la même plante, ceci est lié à la différence dans la répartition des composés actifs (ou principes actifs) qui sont fréquents dans certaines parties que dans d'autres.

- Effet du solvant/détergent :

La technique utilisée pour la dissolution des huiles essentielles testées, utilisant une moindre quantité du « tensioactif » tween 80 a mené dans un premier temps à une bonne solubilité, diffusion et dispersion des huiles essentielles dans l'eau, donc cela a assuré un meilleur contact de ces huiles ou de leurs constituants avec les microorganismes testés. Par conséquent, la qualité du tween 80 utilisé pour la dispersion de l'huile essentielle a eu une influence sur son activité biologique.

- Le milieu de culture

Il doit avoir une composition bien définie permettant la reproduction fidèle des résultats.

Chapitre 3 : Applications et marché mondial

- L'inoculum

La souche bactérienne à tester doit être jeune et le nombre de bactéries mises en contact de l'huile essentielle devrait toujours être le même.

En général les microorganismes à croissance rapide sont les plus sensibles.

- Composition chimique de l'huile essentielle

L'activité d'une huile essentielle dépend directement de sa composition chimique. Généralement, l'huile essentielle dans sa totalité agit moins que ses constituants majeurs (alcools, phénols, terpène, composés cétoniques) et ses constituants mineurs [87, 88].

1.3. Mode d'action des HE sur les bactéries

Les études sur les mécanismes d'action de l'activité antimicrobienne sont en nombre négligeable. En effet, certains chercheurs ont montré que la puissance de l'action des HE varie selon leurs constituants majoritaires, et que le mode d'action est principalement lié au profil chimique des constituants de chaque HE, qui est largement diversifié. Jusqu'à présent, il n'existe pas d'étude qui puisse nous donner une idée claire et précise sur le mode d'action des HE. Etant donné la complexité de leur composition chimique, tout laisse à penser que ce mode d'action est assez complexe et difficile à cerner du point de vue moléculaire. Il est très probable que chacun des constituants des HE ait son propre mécanisme d'action.

Le mode d'action des HE dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane. Les HE peuvent aussi inhiber la synthèse d'ADN, d'ARN, des protéines et des polysaccharides [82].

Quelques investigations sur le mécanisme d'action des HE ou de leurs constituants ont été menées par différents auteurs, de son côté, Franchomme suggère que les HE hydroxylées créent des perturbations enzymatiques et prennent pour cibles les enveloppes protectrices, le mésosome et le cytoplasme [83].

Une étude récente menée par Rhayour et al (2002) a examiné le mécanisme d'action des huiles essentielles du clou de girofle et d'origan simultanément avec ceux de deux de leurs constituants, le thymol et l'eugénol, Sur deux bactéries, *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis* prisent comme modèle de bactérie Gram+ et Gram – respectivement [84].

Du fait de la complexité de leur composition chimique, il est difficile de donner une idée précise sur le mode d'action des HE. Il est probable que leur activité antibactérienne ne

Chapitre 3 : Applications et marché mondial

soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire [85].

Oussalah et al (2006), suggère que l'action des HE sur la prolifération microbienne se fait à travers l'altération de la perméabilité membranaire des bactéries en perturbant les systèmes de transport ionique, le transport des électrons et la production d'énergie [86].

2. Activité antifongique

Le pouvoir antifongique des HE des plantes aromatiques a été mis en évidence par de nombreux auteurs contre les moisissures allergisantes [89] et contre les dermatophytes et les champignons pathogènes et opportunistes tels que *Candida albicans* (levure), *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* [90]. Omidbeygi et al. (2007) ont démontré que les HE de thym, de la sarriette et du clou de girofle présentent une activité antifongique « *in vitro* » contre *Aspergillus flavus* [91]. Les HE d'*Eucalyptus saligna* et d'*Eucalyptus camalduiensis* ont montré un effet fongistatique vis-à-vis de *Phaeoramularia angolensis* [92].

Il a été établi d'après Cox et al (2000) que généralement les champignons sont plus sensibles que les bactéries [93].

L'activité antifongique augmente selon le type de fonction chimique : Phénols> Alcools> Aldéhydes> Cétones> Ethers> Hydrocarbures. Parmi les aldéhydes aliphatiques, le cinnamaldéhyde s'est révélé le plus actif. En ce qui concerne les composés phénoliques, l'activité antifongique augmente avec l'encombrement stérique de la molécule (p-n-propylphénol> thymol> isoeugénol> eugénol). A titre d'exemple, l'eugénol est également un très bon agent antifongique et il a été testé contre une large gamme de champignons: *Candida* (*C. albicans*), *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*), *Penicillium chrysogenum*, et bien d'autres. La combinaison de ce dernier avec le cinnamaldéhyde induit une action synergétique contre des champignons de bois [94]. De même, le myrte est un exemple de plantes ayant des activités biologiques puissantes : activités antifongique, antiparasitaire, insecticide (**Tableau 4**).

Chapitre 3 : Applications et marché mondial

Tableau (4) : Activités antifongique, antiparasitaire et insecticide de *M. communis* provenant de différentes régions du monde

Région	Algérie [105]	Tunisie [106]	Maroc [107]	Italie [108][110]	Turquie[112]	Chypre [65]	France [63]	Iraq [113]	Syrie [114]	Egypte [115]	Iran [63]	Pakistan [121]
Levures	<i>Candida albicans</i>	+		+	-			+		+	+	
	<i>Candida glabrata</i>			+								
	<i>Candida krusei</i>			+								
	<i>Candida tropicalis</i>			+								
	<i>Candida parapsilosis</i>			+								
	<i>Candida liopolica</i>							+				
	<i>Candida pseudotropicalis</i>								-			
	<i>Saccharomyces Cerviceae</i>								-			+
Champignons	<i>Rhizoctonia solani</i>						+					
	<i>Fusarium solani</i>						+					
	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>						+					
	<i>Aspergillus sp</i>											+
	<i>Aspergillus flavus</i>	+										
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	+										
	<i>Fusarium culmorum</i>	+										
Parasite	<i>Plasmodium falciparum</i>				+							
Insectes	<i>Anopheles gambiae</i>				+							
	<i>Khapra Beetle</i>								+			
	<i>Ephestia kuehniella</i>					+						
	<i>Plodia interpunctella</i>					+						
	<i>Acanthoscelides obtectus</i>					+						

3. Activité antioxydante

Les propriétés antioxydantes des huiles essentielles sont depuis peu massivement étudiées. Le stress oxydatif, qui survient lors de déséquilibres entre la production de radicaux libres et d'enzymes antioxydantes, est en relation avec l'apparition de maladies telles que l'alzheimer, l'artériosclérose et le cancer. Une façon de prévenir ce stress oxydatif qui

Chapitre 3 : Applications et marché mondial

endommagement et détruit les cellules est de rechercher, dans l'alimentation, un apport supplémentaire de composés antioxydants (vitamine C, α -tocophérol, BHT).

Les huiles essentielles de cannelle, muscade, clou de girofle, basilic, persil, origan et thym possèdent de puissants composés antioxydants. L'eugénol et son dérivé sont encore une fois les composés les plus actifs. Leur activité est en relation avec leur structure phénolique car les composés de ce type ont des propriétés oxydo-réductrices et jouent ainsi un rôle important en neutralisant les radicaux libres et en décomposant les peroxydes [95].

L'activité antioxydante des huiles essentielles est également attribuable à certains alcools, éthers, cétones, et aldéhydes monoterpéniques: le linalool, le 1,8-cinéole, le géraniol/nérol, le citronellal, l'isomenthone, la menthone et quelques monoterpènes: α -terpinène, γ -terpinène et α -terpinolène [95].

4. Marché mondial des HE

Les huiles essentielles sont valorisées principalement sur les marchés de l'aromathérapie, de la parfumerie et de la cosmétique. Elles peuvent, soit rentrer dans la composition de produits élaborés (savons, crèmes, parfums, bougies,...), soit être utilisées en l'état. Elles sont recherchées pour leurs propriétés odorantes ou thérapeutiques. Les principaux marchés de consommation sont les pays développés qui représentent 80% des débouchés mondiaux (Europe 30 %, Japon et Amérique du Nord 50 %) (Tableau 5) [96].

Tableau (5): Marché mondial des huiles essentielles [96]

Marchés	Marché mondial (en milliards d'Euros)	Part des importations (en pour-cent)	Part des exportations (en pour-cent)
Europe de l'ouest	35	49	65
Etats-Unis et Canada	35	8	15
Japon	14	-	5
Europe de l'est	5	-	2
Méditerranée	2	3	1

Les pays d'Amérique du Sud et d'Asie font partie des plus grands producteurs mondiaux d'huiles essentielles. Plus de 50% des exportations des huiles essentielles du marché européen sont dominées par quelques pays : l'Allemagne constitue le plus grand

Chapitre 3 : Applications et marché mondial

marché (20 %), suivi par la France (18 %), le Royaume-Uni (16 %), l'Italie (14 %) et l'Espagne (10 %) qui disposent d'industries de parfumerie, de cosmétique et de détergence. Ce secteur connaît une croissance modérée de l'ordre de 3,5 % par an pour le marché européen. Le marché des pays émergents constitue un marché prometteur particulièrement pour les produits de gamme basse et moyenne. En Afrique, les quantités produites sont très faibles et les besoins sont compensés par des volumes importants importés à travers le monde, excepté l'Afrique du Nord où les pays du Maghreb (Maroc et Tunisie principalement) sont les leaders dans cette région [96].

5. Fabrication des biomatériaux

5.1. Fabrication des pommades

5.1.1. Définition

Les pommades sont des préparations de consistance molle, obtenues par le mélange d'une substance médicamenteuse avec un excipient approprié ; elles sont appliquées sur la peau soit dans le but d'administrer des médicaments par voie dermique, ou pour obtenir une action locale superficielle.

Les pommades qui contiennent des résines sont appelées des onguents et celles renfermant une forte proportion de poudres sont des pâtes dermiques. Les baumes sont des pommades douées d'une propriété antalgique et anti-inflammatoire.

Les crèmes sont des préparations de consistance liquide résultant de la dispersion d'un liquide sous forme de fines gouttelettes (huile) au sein d'un autre liquide non miscible (eau). Ces sont des émulsions [97]. Les gels sont des préparations de consistances solides constitués à l'aide d'agents gélifiants [98].

5.1.2. Intérêts thérapeutiques des pommades

Les pommades en plus de leurs actions émoullientes et protectrices sur la peau, règlent le potentiel d'hydrogène (pH) cutané à la normale. Elles ont une action générale par voie cutanée sans passer par le foie. En plus de leur application dermique, elles peuvent être appliquées sur les muqueuses rectales, vaginales et conjonctivales [99].

5.1.3. Classification des pommades

Suivant la nature de l'excipient, nous pouvons classer les pommades de la manière suivante [99]:

Chapitre 3 : Applications et marché mondial

- Les pommades hydrophobes ou lipophiles

Ces pommades n'absorbent que de petites quantités d'eau. Les excipients les plus communément utilisés pour leur préparation sont : la vaseline, la paraffine liquide, la paraffine solide, les huiles végétales, les graisses animales, les glycérides synthétiques, les cires et les polyalkylsiloxanes liquides. Dans ce groupe la vaseline, la paraffine solide et la paraffine liquide sont inscrites dans la pharmacopée française et sont obtenues par traitement approprié de certaines fractions d'un pétrole brut convenable.

- Les pommades absorbant l'eau

Elles peuvent absorber de quantités importantes d'eau. Leurs excipients sont ceux de pommades hydrophobes dans lesquels sont incorporés des émulsifiants de type eau dans huile (E/H) tels que la graisse de laine, les alcools de graisses de laine, les esters de sorbitanne, les monoglycérides et des acides gras. A la pharmacopée française figure une monographie des alcools de laine constituée par un mélange de stérols et d'alcools aliphatique.

- Les pommades hydrophiles

Ce sont des préparations dont les excipients sont miscibles dans l'eau. Elles sont constituées par des mélanges de polyéthylène glycols (macrogols) liquides et solides et peuvent contenir des quantités appropriées d'eau.

5.1.4. Préparation des pommades

Selon la pharmacopée française, les pommades doivent être homogènes. Il faut donc préparer un mélange onctueux facilement applicable dans lequel les composants solubles ou insolubles sont parfaitement dispersés et non visibles à l'application. En fonction des excipients, elles devront être préparées au moment du besoin pour éviter leur rancissement.

Le mélange des différents composants est réalisé en fonction du lieu de la préparation et des quantités à préparer. D'une façon générale la préparation des pommades s'effectue en deux temps :

Le mélange des excipients qui se fait le plus souvent en commençant par celui qui a le point de fusion le plus élevé, soit dans l'ordre des quantités croissantes ; l'addition des principes actifs solides ou liquides qui s'effectue en fonction de leur solubilité et de leur état solide insoluble ou liquide.

La préparation des pommades s'effectue généralement par trituration lorsque le principe actif est insoluble dans l'excipient ou dans l'eau. On peut aussi préparer les

Chapitre 3 : Applications et marché mondial

pommades après incorporation du principe actif préalablement dissout dans l'eau ou ramollit dans la glycérine ou encore en réalisant le mélange par fusion ou par digestion. S'il s'agit d'incorporer des liquides, on dispose la totalité de l'excipient dans le mortier et non les liquides. On enduira le mortier et le pilon de l'excipient. L'ajout des liquides s'effectuera peu à peu en triturant jusqu'à l'absorption complète. On terminera la préparation par battage énergique. Si l'excipient est la vaseline, il faudra faciliter l'incorporation des liquides en additionnant à cette vaseline un peu de cholestérol (1%) [98].

Les pommades seront ensuite conditionnées dans des pots ou des tubes. Le choix de l'excipient pour la préparation de pommades est fonction du but thérapeutique recherché et des qualités propres à l'excipient [100]. Le beurre de karité (ou beurre végétal, est une substance comestible extraite des fruits du karité, un arbre poussant dans les savanes arborées de l'Afrique de l'Ouest) est un excipient connu pour ses propriétés eudermiques, c'est l'excipient le plus utilisé en médecine traditionnelle pour la préparation des pommades. En effet, il est utilisé comme excipient pour la fabrication des crèmes, pommades suppositoires et produits de beauté [101].

5.1.5. Contrôle de qualité des pommades

Plusieurs méthodes sont utilisées pour le contrôle de qualité des pommades. Parmi celles-ci nous pouvons citer : l'observation des caractères macroscopiques des pommades surtout la consistance, la couleur, l'odeur et la stabilité ; la vérification de l'homogénéité; la mesure du potentiel d'hydrogène (pH); l'établissement du profil chromatographique par des méthodes chromatographiques [100].

5.2. Matériaux de construction

5.2.1. Définition du ciment

Le ciment est un produit moulu du refroidissement du clinker qui contient un mélange de silicates et d'aluminates de calcium porté à 1450-1550 C°, température de fusion. Le ciment usuel est aussi appelé liant hydraulique, car il a la propriété de s'hydrater et durcir en présence d'eau, et parce que cette hydratation transforme la pâte liante, qui a une consistance de départ plus ou moins fluide, en un solide pratiquement insoluble dans l'eau.

Ce durcissement est dû à l'hydratation de certains composés minéraux, notamment des silicates et des aluminates de calcium.

Chapitre 3 : Applications et marché mondial

5.2.2. Classification des ciments courants

Selon que des constituants, autres que le gypse, sont ou non ajoutés au clinker lors des opérations de fabrication, on obtient les différents types de ciments définis par la norme NF EN 197-1. Le **tableau (6)** ci-dessous donne la liste des différents types des ciments courants normalisés avec indication, pour chacun d'eux, de leur désignation propre et des pourcentages respectifs de constituants qu'ils comportent [102].

Tableau (6): Les différents types de ciments courants

Désignations	Types de ciments	Teneur en clinker	Teneur en% de l'un des constituants suivants : laitier-pouzzolanes-cendres-calcaires-schistes-fumées de silice	Teneur en constituants secondaires (filler)
C P A-CEM	Ciment portland	95 à 100%	/	0 à 5%
C PJ-CEM II/A	Ciment portland composé	80 à 94%	-de 6 à 20% de l'un quelconque des constituants, sauf dans les cas où les constituants sont des fumées de silice auquel cas la proportion est limitée à 10%	0 à 5%
C PJ-CEM II/B		65 à 79%	-de 21à35% avec les mêmes restrictions que ci-dessus	0 à 5%
CHF-CEM III/A	Ciment de haut-fourneau	35 à 64%	-35à65% de laitier de haut-fourneau	0 à 5%
CHF-CEM III/B		20 à 34%	-66à80% de laitier de haut-fourneau	0 à 5%
CHF-CEM III/C		5 à 19%	-81 à95% de laitier de haut-fourneau	0 à 5%
CPZ-CEMIV/A	ciment pouzzolanique	65 à 90%	-10à35%de pouzzolanes, cendres siliceuses ou fumées de silice, ces dernières étant limitées à10%.	0 à 5%
CPZ-CEMIV/B		45 à 64%	-36à55%comme ci-dessus	0 à 5%
CLC-CEM V/A	Ciment au laitier et aux cendres	40 à 64%	18à30% de laitier de haut-fourneau et 18 à30% de cendres siliceuses ou de pouzzolanes.	0 à 5%
CLC-CEM V/B		20 à 39%	-31 à50%de chacun des 2 constituants comme ci-dessus	0 à 5%

5.2.3. Propriétés des ciments

5.2.3.1. Caractéristiques physiques

- Comportement physico-chimique de la pâte

Le ciment est essentiellement constitué de:

- Silicate tricalcique : C_3S
- Silicate bicalcique: C_2S
- Aluminate tricalcique-: C_3A
- Aluminoferrite tétracalcique: C_4AF

Une fois la poudre de ciment mélangée à l'eau, les réactions d'hydratation se développent, il se produit alors une cristallisation qui aboutit à un nouveau système de constituants hydratés stables avec formation de cristaux en aiguilles plus ou moins enchevêtrés produisant la prise.

Cette réaction chimique est accompagnée d'un dégagement de chaleur plus ou moins important selon les ciments et la rapidité de prise.

- Prise

La prise du ciment c'est-à-dire le passage de la pâte de ciment (ciment + eau) d'une consistance fluide à un état solide est une phase essentielle dans la fabrication du béton ou mortier puisqu'elle donne sa cohésion au matériau. La norme spécifie, suivant les ciments, un temps de prise minimal d'1h30 pour les ciments des classes 32,5 et 32.5R. 1h pour les ciments des classes 42,5 ; 42,5R ; 52,5 et 52,5R.

D'une façon générale, les temps de prise sont supérieurs à ces valeurs minimales, l'ordre de grandeur étant de 2h30 à 3h30 pour la grande majorité des ciments, ces valeurs s'entendant pour une température ambiante de 20°C.

- Durcissement

Une fois la prise amorcée, le phénomène d'hydratation se poursuit, c'est la période de durcissement rapide qui se poursuit pendant des mois voire des années au cours desquelles les résistances mécaniques continuent de croître. Lorsqu'on désire un durcissement rapide, on choisit des ciments de classe élevée et de préférence de classe «R» c'est-à-dire ayant la caractéristique complémentaire «Rapide». Il est également possible d'utiliser du ciment alumineux fondu CA, qui après quelques jours a atteint la quasi-totalité de sa résistance [100].

Chapitre 3 : Applications et marché mondial

- Chaleur d'hydratation

La dissolution des différents constituants est exothermique et selon leurs pourcentages relatifs, le dégagement de chaleur est donc plus ou moins important, c'est le cas par exemple des ciments riches en C3A que l'on utilise par des temps chauds.

- Finesse de mouture

La finesse de mouture, également appelée finesse Blaine, exprimée en cm^2/g , représente la surface spécifique ou surface développée d'une masse de 1kg de ciment. Elle est d'une façon générale, comprise entre 3000 et 3500 cm^2/g , certains ciments prompts naturels «CNP» ont un Blaine supérieure à 4500 cm^2/g [102].

Plus la finesse est grande, plus les résistances sont précoces et élevées, mais en revanche, plus les risques de retrait et par conséquent de fissuration ainsi que d'événement du ciment sont accrus.

- Retrait

Lorsque l'élément du béton ou mortier se trouvera dans une atmosphère ayant une humidité relative inférieure à celle d'équilibre de l'élément, les dimensions de ce dernier diminuent ; c'est le retrait. On mesure le retrait sur des éprouvettes prismatiques de mortier de 16cm de longueur et d'une section droite de 4×4cm, conservées dans l'air à une température de 20°C et une hygrométrie de 50% [102].

La norme impose les valeurs limites, à 28 jours, de:

- 800 $\mu\text{m}/\text{m}$ pour les ciments portland CPA-CEM I ET CPJ-CEMII de classe 32,5R.
- 1000 $\mu\text{m}/\text{m}$ pour des types de ciment identique mais des classes 32,5R-42,5 et 42,5R.

Les principaux paramètres agissant sur le retrait sont :

- La nature du ciment;
- La finesse de mouture ;
- Le dosage en ciment, dans le béton ;
- Le dosage en eau ;
- La propreté et nature des granulats.

- Gonflement

Si l'élément se trouve dans une atmosphère à humidité relative supérieure à celle d'équilibre de l'élément, les dimensions de ce dernier augmentent ; c'est le gonflement. Ce qui entraîne l'apparition des tensions internes.

Chapitre 3 : Applications et marché mondial

5.2.3.2. Caractéristiques chimiques

D'une façon générale, les ciments doivent satisfaire au respect d'un certain nombre d'exigences, résumées dans le **tableau (7)** ci-après, quant à leur composition chimique.

Tableau (7): Caractéristiques chimiques de ciments courants [102].

Propriété	Type de ciment	Classe de résistance	Valeur maximale en% de la masse
Perte au feu	CPA-CEM I	Toutes classes	≤5
	CHF-CEM III		
	CLK-CEM III		
Oxyde de magnésium	CPA-CEM I	Toutes classes	≤5
Résidu insoluble	CPA-CEM I CHF-CEM III	Toutes classes	≤5
	CLK-CEM III		
	CPJ-CEM II (A et B)		
Sulfates SO ₃ limite supérieure	CPA-CEM I et	32,5	≤3,5
	CPJ-CEM II (A et B)	32,5 R	
		42,5	
	CPZ –CEM IV	42,5	
	et CLC –CEM V	52,5	
	CHF-CEM II	52,5 R	
Chlorures	Tous types de ciment	Toutes classes	≤4
	(CHF-CEM III/A et B et les CLK-CEM III/C)	52.5 R	≤0,05
		Toutes les classes	≤0,10

5.2.3.3. Caractéristiques mécaniques

Les ciments courants sont classés en fonction de leurs résistances mécaniques à la compression exprimées en MPa à 28 jours, la norme spécifiant une limite inférieure et une limite supérieure dont les valeurs sont les suivantes:

Tableau (8): Caractéristiques mécaniques de ciments courants [102].

Classe de ciments	Résistance à 2 jours (MPa)	Résistance minimale à 28 jours (MPa)	Résistance maximale à 28 jours (MPa)
32,5	-	≥32,5	≤52,5
32,5R	≥13,5	≥32,5	≤52,5
42,5	≥12,5	≥42,5	≤62,5
42,5R	≥20	≥42,5	≤62,5
52,5	≥20	≥52,5	-
52,5R	≥30	≥52,5	-

Chapitre 3 : Applications et marché mondial

Classes « R », rapides, présentent aux jeunes âges des caractéristiques mécaniques plus élevées et leur intérêt particulièrement dans certaines circonstances telles que bétonnage trouvant par temps froid, décoffrage rapide, préfabrication.

Il y a lieu de distinguer les valeurs spécifiées pour chaque classe de ciment par la norme (tableau précédent), la probabilité étant statistiquement de 95 % pour les résistances minimales et de 90 % pour les résistances maximales, et les valeurs garanties que le fabricant doit respecter à 100 % et qui sont indiquées dans le **tableau (9)** ci-dessous :

Tableau (9): Résistances garanties de ciments courants [102]

Classe de ciments	Résistances garanties à 2 jours (MPa)	Résistances garanties à 28 jours (MPa)	Résistances garanties à 28 jours (MPa)
32,5		17,5	30
32,5R	12	-	30
42,5	10	-	40
42,5R	18	-	40
52,5	18	-	50
52,5R	28	-	50

5.2.4. L'intérêt de l'utilisation des ajouts minéraux

L'utilisation d'ajouts minéraux dans les industries du ciment et du béton présente des avantages techniques, économiques et écologiques.

5.2.4.1. Intérêt du point de vue technique

L'incorporation de particules très fines dans un mélange de béton permet d'améliorer sa maniabilité et de réduire le besoin en eau à une consistance donnée (sauf pour les matériaux de très grande surface active, comme les fumées de silice). Les ajouts cimentaires améliorent généralement la résistance mécanique, l'imperméabilité et la ténacité aux attaques chimiques. Enfin, parce qu'ils permettent une faible chaleur d'hydratation des ciments composés, les ajouts minéraux améliorent la résistance à la fissuration [103].

5.2.4.2. Intérêt du point de vue économique

Le ciment Portland est le composant le plus onéreux au cours de la production du béton, puis qu'il est un matériau à forte intensité d'énergie. La plus part des ajouts susceptibles de remplacer le ciment dans le mortier ou le béton sont des sous-produits, et à ce titre, nécessite relativement moins d'énergie, si non aucune, et sont moins coûteux que le ciment Portland [103].

Chapitre 3 : Applications et marché mondial

5.2.4.3. Intérêt du point de vue environnemental

La production d'une tonne de ciment Portland libère dans l'atmosphère une quantité quasi-équivalente de gaz carbonique (CO₂). En effet, la substitution d'une fraction de clinker permet d'obtenir des ciments aux propriétés mécaniques exploitables, ce qui permet une diminution de rejets de CO₂. Le taux de substitution de clinker est du même ordre que la diminution de rejet de CO₂ [103].

5.2.4.4. Les inconvénients d'utilisation des ajouts minéraux

- Retard de prise.
- Résistance à la compression à jeune âge plus faible.
- Mûrissement plus long
- Résistance à l'écaillage controversée.
- Le broyage et le transport plus chers.

5.2.5. L'utilisation des ajouts en Algérie

L'industrie cimentaire est d'importance primordiale pour l'Algérie comme tous pays en voie de développement. Cependant, parmi les moyens efficaces qui existent pour augmenter la production du ciment est celui d'utiliser des ajouts qui sont très peu coûteux et disponibles en grandes quantités en Algérie, comme le laitier d'El-Hadjar, le calcaire et la pouzzolane naturelle de Beni-Saf. Le **tableau (10)** donne une idée sur les ajouts utilisés dans les cimenteries algériennes [104].

Tableau (10): Utilisation des ajouts dans les cimenteries algériennes

Entreprise	Cimenterie	Ajouts Utilisés
ERCE	Ain Touta	Pouzzolane
	Ain El Kebira	
	Hamma Bouziane	Laitier
	H'djar Essaoud	
	Tebessa	
ERCC	Meftah	Tuf / Calcaire
	Raïss Hamidou	Poussière
	Sour EL Ghozlane	Calcaire/Tuf
ECDE	Chlef	Calcaire
ERCO	Beni Saf	Pouzzolane
	Zahana	
	Saida	

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

1.1. Critères de choix des plantes

Le choix des plantes est basé sur une revue bibliographique et une enquête ethnopharmacologique auprès de la population ayant connaissance de leur usage en médecine traditionnelle. Les plantes choisies sont : *Myrtus communis*, *Globularia alypum* et *Calicotome villosa*. La plante *Syzygium aromaticum* a été utilisée comme témoin pour sa richesse en eugénol. Les critères de sélection des plantes médicinales utilisées dans notre étude, sont les suivants :

- Utilisation traditionnelle dans le traitement des maladies d'origine microbienne;
- La disponibilité de ces plantes dans notre région;
- La non toxicité des plantes (utiliser dans des préparations culinaires et dans des tisanes) ;
- La présence des substances aromatiques (huiles essentielles) avec un rendement satisfaisant;
- La capacité de ces extraits à piéger les radicaux libres (activité antioxydante) ;
- La possibilité de valorisation d'un produit pharmaceutique dermatologique par son incorporation comme additif naturel ;
- La méconnaissance de l'activité biologique ou la composition chimique de ces plantes de cette région.

1.2. Présentation de la zone d'étude

1.2.1. Situation géographique

Notre zone d'étude se situe aux Nord-est de l'Algérie et englobant deux wilayas : Souk ahras et Annaba. La wilaya de Souk ahras est d'une superficie de 812 km², située à 75 km au sud-est de Guelma et à 100 km au sud-est d'Annaba. Son climat continental est marqué par des hivers froids et humides et des étés secs et chauds. La wilaya d'Annaba est d'une superficie de 49 km². Elle est située à 152 km au nord-est de Constantine, à 246 km à l'est de Jijel et à environ 80 km à l'ouest de la frontière tunisienne (**Figure 4**).

Tableau (11): Caractéristiques des zones de prélèvements

Caractéristiques Régions	Altitude	Longitude	Latitude	Etage bioclimatique
Souk ahras	653 m	7° 57' 15" Est	36° 17' 15" Nord	Eté sec et chaud/Hiver froid et humide
Annaba	1008 m	7°45' 07" Est	36° 54' 15" Nord	Eté chaud /Hiver doux et humide



Figure (4): Carte représentant les zones de prélèvements des plantes

1.2.2. Période et calendrier d'échantillonnage

Tableau (12): Origine et date de prélèvements des plantes choisies

Plante	Origine	Dates de prélèvements	Stage de développement	Heure de récolte
<i>Myrtus communis</i>	Annaba	Avril 2013	Végétation	10h
		Juin 2013	Floraison	10h
		Novembre 2013	Fructification	10h
<i>Globularia alypum</i>	Souk ahras	Avril 2012	Floraison	10h
<i>Calicotome villosa</i>	Souk ahras	Avril 2012	Floraison	10h

1.2.3. Etude édaphique

Les paramètres chimiques d'un échantillon de sol et de l'eau de la région d'Annaba ont été mesurés:

- pH
- Conductivité
- Taux d'humidité
- Taux de matières organique et minérale

Une analyse granulométrique d'un échantillon de sol de la région d'Annaba a été effectuée (voir méthodes d'analyses).

Matériel et méthodes

1.3. Description botanique du matériel végétal

- *Myrtus communis*

Les feuilles de *Myrtus communis* sont opposées, de couleur verte, courtement pétiolées, persistantes, ovales-lancéolées, pourvues de glandes minuscules, les fleurs odorantes de 2 à 3 cm de diamètre, généralement solitaires, portées par des pédoncules naissant à l'aisselle des feuilles.

- *Globularia alypum*

Les feuilles de *Globularia alypum* sont coriaces, de couleur verte, glauques, de forme obovale, se terminant en une petite pointe.

- *Calicotome villosa*

Calicotome villosa est un buisson épineux, l'extrémité des tiges étant transformée en épine. Les jeunes tiges sont couvertes de poils courts donnant une teinte grisâtre. Les feuilles ont 3 folioles ovales d'environ 1 cm de longueur. Les fleurs sont jaunes de 12 à 18 mm de long, en grappes. Au moment de la floraison, la partie supérieure du calice se détache, ne laissant que la moitié inférieure.

- *Syzygium aromaticum*

Les boutons floraux de *Syzygium aromaticum* sont nommés « clous de girofle ». Après séchage à l'air libre, ils prennent la couleur brune. Cette plante est utilisée comme témoin.

L'identification et la classification des espèces choisies ont été faites au niveau du département de Biologie, Université Badji mokhtar, Annaba, Algérie.

Tableau (13) : Description botanique des plantes étudiées

Nom botanique	<i>Myrtus communis</i>	<i>Globularia alypum</i>	<i>Syzygium aromaticum</i>	<i>Calicotome villosa</i>
Nom commun	Myrte	Tsselga	Clous de girofle	Genet
Famille	Myrtacées	Globulariacées	Myrtacées	Fabacées
Genre	<i>Myrtus</i>	<i>Globularia</i>	<i>Syzygium</i>	<i>Calicotome</i>
Espèce	<i>communis</i>	<i>alypum</i>	<i>aromaticum</i>	<i>villosa</i>

Matériel et méthodes

1.4. Caractères organoleptiques des organes végétaux destinés à l'extraction

Tableau (14) : Caractères organoleptiques des organes végétaux destinés à l'extraction

Plante	Organe	Couleur	Odeur	Saveur
<i>Myrtus communis</i>	Feuilles	Verte	Forte	Astringente
	Fleurs	Jaune	Forte	Astringente
<i>Globularia alypum</i>	Feuilles	Verte	Faible	Astringente
<i>Calicotome villosa</i>	Racines	Marron	Faible	Astringente
<i>Syzygium aromaticum</i>	Boutons floraux	Marron	Forte	Astringente

1.5. Séchage et conservation

Les plantes, fraîchement récoltées, sont lavées et laissées sécher à l'ombre dans un endroit sec et aéré. Devenues sèches, les parties utilisées (**Tableau 14**) sont récupérées dans des sacs propres pour servir ultérieurement à l'extraction des principes actifs. Notant qu'avant le lavage, une quantité de plantes est récupérée pour la mesure du taux d'humidité.

1.6. Taux d'humidité

- Principe

Le taux d'humidité est la quantité d'eau contenue dans la matière végétale. Le contenu en humidité des plantes a été déterminé par le procédé de séchage à l'étuve isotherme à une température de $105^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ et à la pression atmosphérique jusqu' à ce que le poids devienne pratiquement constant. La teneur en eau est égale à la perte de masse subie dans les conditions de mesure [122].

- Mode opératoire

- Sécher des capsules vides à l'étuve durant 15min à $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$;
- Laisser refroidir dans un dessiccateur;
- Peser dans chaque capsule préalablement tarée 2g d'échantillon et les placer dans l'étuve réglée à $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 3 heures;
- Retirer les capsules de l'étuve, les placer dans le dessiccateur ;
- Peser les capsules après refroidissement. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'un poids constant (en réduisant la durée de séchage à 30 min).

- Expression des résultats

Le taux d'humidité est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$H \% = (M1 - M2) / P \times 100 \text{ Où :}$$

H%: Taux d'humidité en %

M1: Masse de la matière fraîche avant séchage en g;

M2: Masse de l'échantillon après séchage en g;

P : prise d'essai.

2. Mode d'obtention de molécules organiques et de constituants minéraux

2.1.Extraction des HE des feuilles et des fleurs de *M.communis*

2.1.1.Description du dispositif d'hydrodistillation

L'appareil utilisé pour l'hydrodistillation est de type Clevenger, il est constitué d'un ballon en verre pyrex où l'on place les plantes séchées et l'eau distillée, une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant) qui vient de l'échauffement du ballon, un collecteur en verre pyrex qui reçoit également les extraits de la distillation.

2.1.2. Mode opératoire

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydrodistillation: 50g de feuilles ou fleurs séchées sont introduites dans un ballon monocol de 1 litre, imprégné d'eau distillée, l'ensemble est porté à ébullition pendant 2 à 3 heures. Les vapeurs chargées d'huile ; en traversant un réfrigérant se condensent et chutent dans un collecteur. L'eau et l'huile se séparent par différence de densité, Le liquide recueilli résulte en un distillat avec une couche d'huile mince à la surface qui sera par la suite séparée, après repos du liquide [123]. L'huile séparée de l'eau aromatique (hydrolat) est séchée par le sulfate de sodium, et conservée à - 4°C à l'obscurité.

L'organigramme représentant le protocole adopté est mentionné ci-après (**Figure 5**).

2.1.3. Calcul de rendement

- Principe

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante à traiter [124].

- Expression des résultats

Le rendement, exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante :

$RHE (\%) = P_B / P_A \times 100$ où :

RHE (%) : rendement de l'huile essentielle en % ;

P_B : poids de l'huile en g ;

P_A : poids de la plante en g.

2.1.4. Cinétique d'extraction

- Principe

La cinétique d'extraction consiste à déterminer le rendement en fonction du temps d'extraction. Elle a pour but de fixer le temps nécessaire pour extraire le maximum d'huile et pour éviter les pertes de temps et d'énergie [125].

- Mode opératoire

Pour étudier la cinétique d'extraction de l'huile essentielle des feuilles et des fleurs de *Myrtus communis* à l'état sec, nous avons récupéré des quantités de l'huile essentielle correspondantes à des intervalles de temps de 10 min qui s'étalent de 0 à 120 minutes. Les quantités des huiles essentielles obtenues vont être exploitées dans le but de calculer le rendement à chaque intervalle de temps.

2.1.5. Conservation des HE obtenues

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

Matériel et méthodes

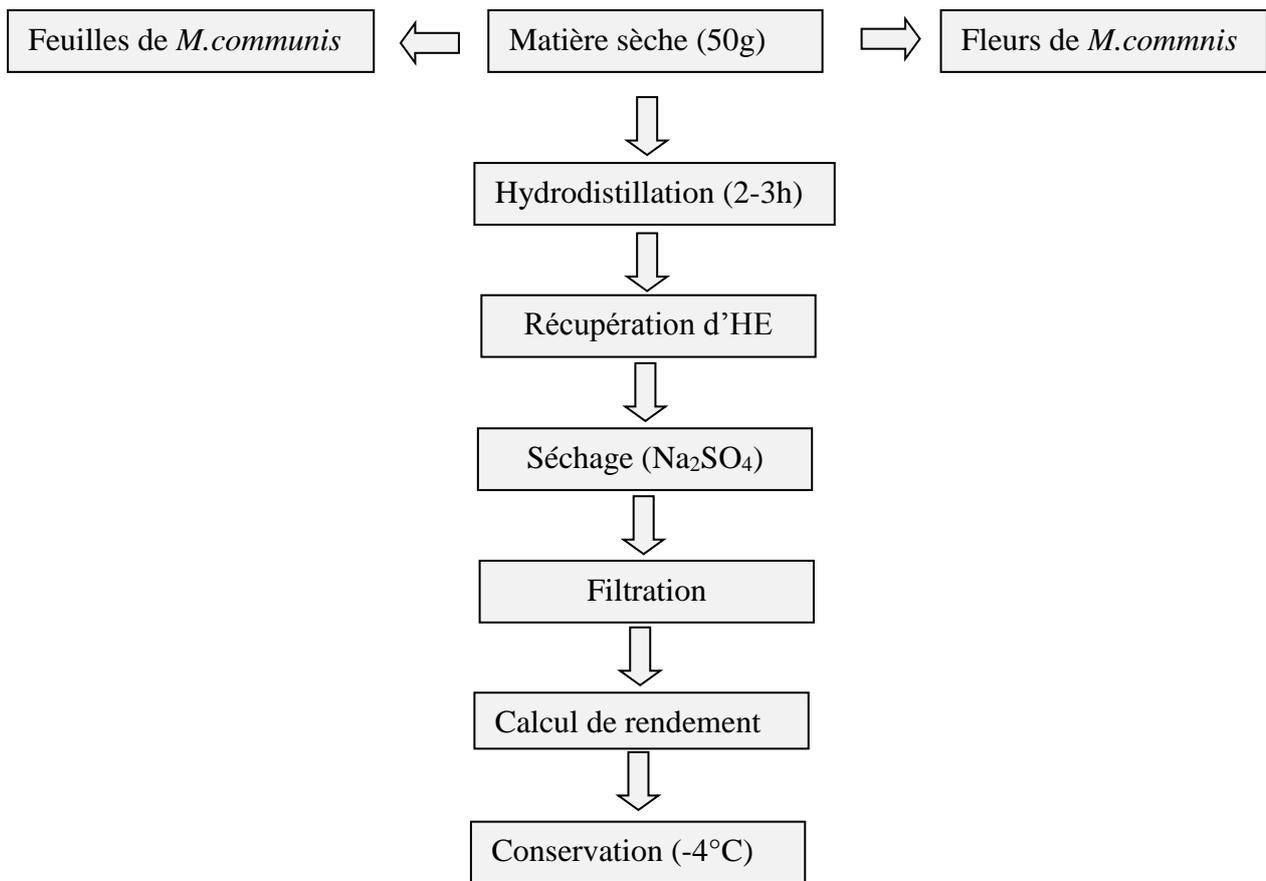


Figure (5) : Etapes de l'extraction des huiles essentielles de *M.communis* [123].

2.2. Fractionnement à l'éther de pétrole de la phase aqueuse de *G. alypum*

Elle consiste en un fractionnement à l'éther de pétrole.

- **Mode opératoire**

Le distillat obtenu par l'hydrodistillation est initialement mélangé avec l'éther de pétrole, le mélange est laissé décanter et la phase organique supérieure est récupérée. L'extraction est refaite plusieurs fois jusqu'à ce que le solvant devienne transparent. L'éther de pétrole est par la suite évaporé et l'extrait résultant (extrait sec) est considéré comme étant la fraction d'éther de pétrole.

L'organigramme représentant le protocole adopté est mentionné ci-dessous (**Figure 6**).

Matériel et méthodes

2.3.Extraction de l'eugénol et de son acétate correspondant (isoeugénol) du *S.aromaticum*

Elle consiste à extraire l'eugénol et son dérivé à partir les clous de girofle (*Syzygium aromaticum*). Cette plane est utilisée comme témoin [126].

• Mode opératoire

- Placer dans un ballon muni d'une ampoule de coulée, surmonté d'une tête de distillation comportant un thermomètre et raccordée à un réfrigérant, 10g de clou de girofle préalablement pilé et 50ml d'eau.
- Porter le tout à reflux. Ajouter peu à peu de l'eau par l'ampoule à décanter afin de maintenir le volume d'eau dans le ballon constant.
- Distiller jusqu' à obtenir environ 100 ml de distillat (récupération dans une éprouvette). Saturer la phase aqueuse avec du sel.
- Transvaser le distillat dans une ampoule à décanter et extraire par trois fois 10 ml de dichlorométhane. Sécher les phases organiques réunies sur sulfate de magnésium anhydre.
- Filtrer, évaporer le solvant sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif. Garder une goutte de liquide.
- Dissoudre le mélange dans 10ml d'éther et le transvaser dans une ampoule à décanter contenant 10ml d'une solution aqueuse saturée en bicarbonate. Extraire une seconde fois la phase étherée avec 10 ml d'une solution saturée en bicarbonate.
- Après séchage sur sulfate de magnésium. L'éther de la phase organique est évaporé sous pression réduite ; l'éthanoate d'eugényle est isolé.
- Les phases aqueuses sont réunies puis acidifiées (pH=1) à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique concentré. Cette solution est transférée dans une ampoule de coulée puis extraire par deux fois 5 ml d'éther.
- Après séchage de la phase étherée par du sulfate de magnésium, le solvant est évaporé sous pression réduite, l'eugénol est ainsi obtenu.

L'organigramme représentant le protocole adopté est mentionné ci-dessous (**Figure 6**).

2.4.Incineration des racines de *C.villosa*

Elle consiste à incinérer des racines séchées de *C.villosa* au four à moufle à 498°C pendant 4 heures. La méthode adoptée est celle de la détermination des taux de cendres qui est basée sur la destruction de toute matière organique sous l'effet d'une température élevée [127].

La poudre obtenue est pesée et conservée pour servir aux tests ultérieurs.

Matériel et méthodes

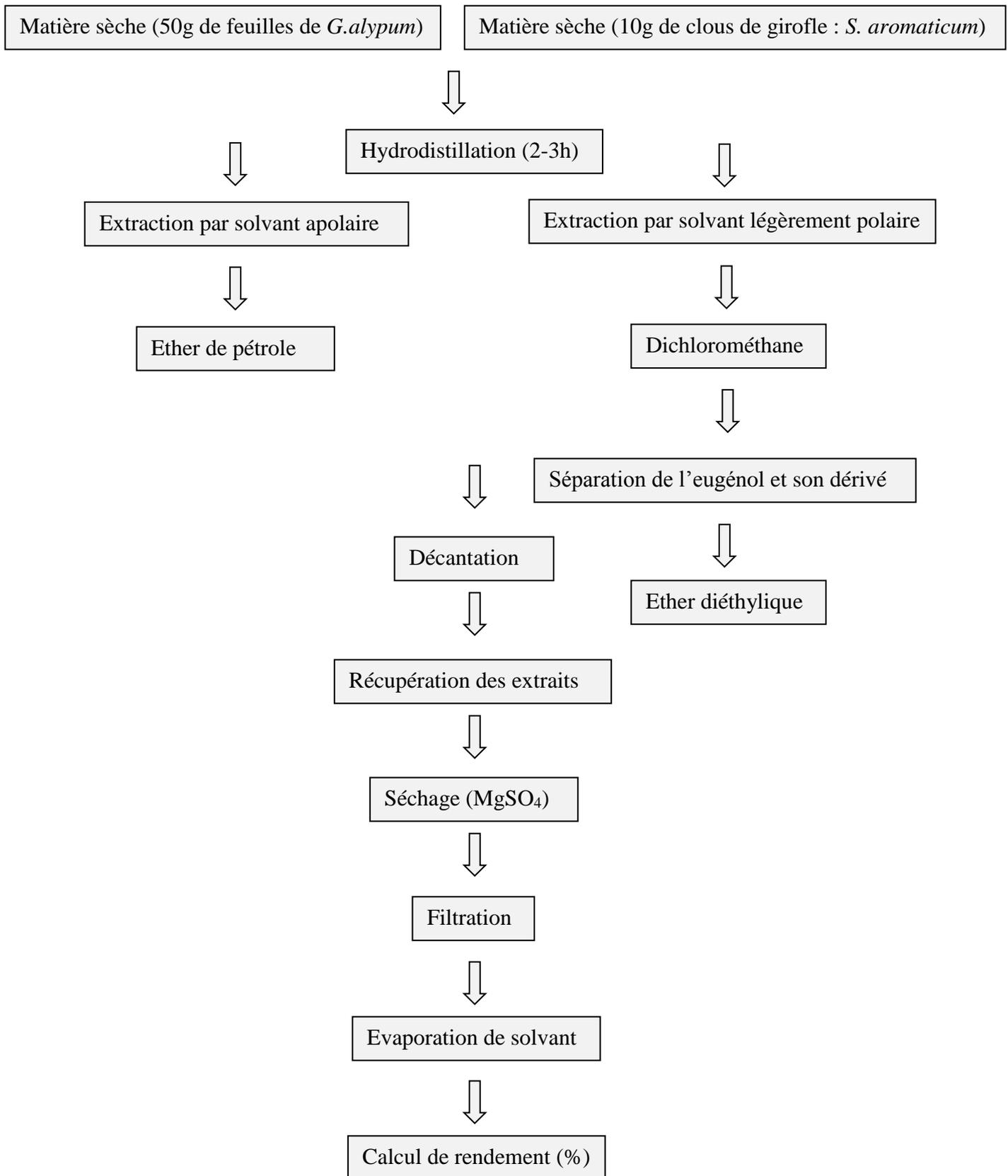


Figure (6) : Etapes de l'extraction des molécules organiques [126, 127]

3. Méthodes d'analyse des échantillons

3.1. Analyse granulométrique du sol

L'analyse du sol de la région d'Annaba a été effectuée par la méthode universelle de la pipette Robinson [128]. Le protocole est illustré dans l'organigramme ci-dessous (Figure 7)

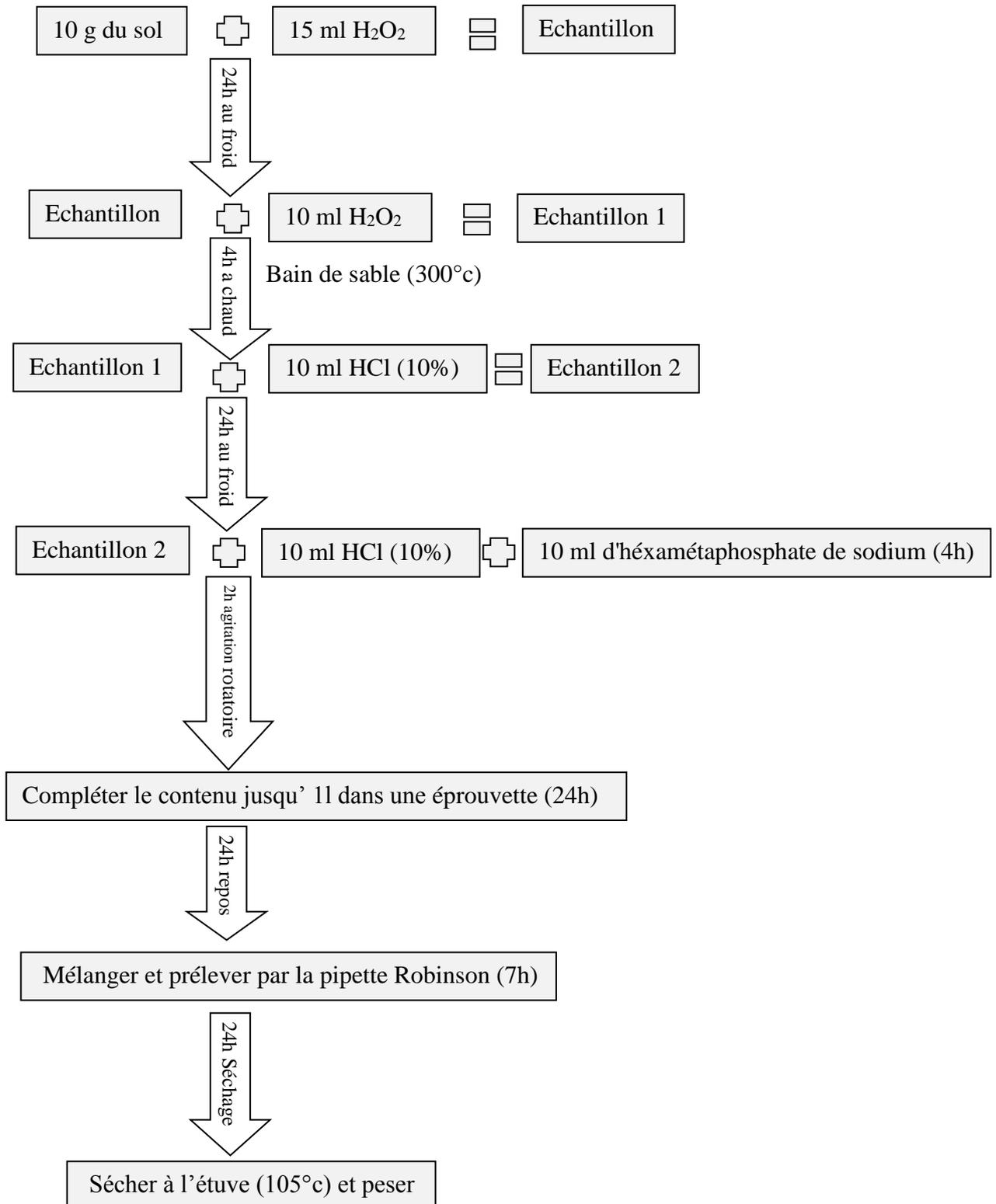


Figure (7) : Description du protocole de l'analyse granulométrique d'un sol [128]

3.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse des HE de *M. communis* et de l'extrait éthéré de *G. alypum*

• Principe

Le profil chimique des principes actifs (les HE et la fraction éthérée) a été mis en évidence par la technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse. Cette analyse a été effectuée au sein de centre de biotechnologie de Sfax, Tunisie. Le principe de cette technique repose sur la différence de répartition des constituants d'un mélange complexe entre la phase mobile (gaz vecteur ou porteur) et la phase stationnaire de la colonne. Les différents composants de l'huile essentielle ou l'extrait éthéré ont été identifiés par comparaison de leurs spectres de masse avec ceux de la base de données [129].

• Conditions opératoires

- Les HE (ou l'extrait éthéré) ont été analysées sur un chromatographe de type Hewlett Parckard HP 6890 équipé d'une colonne capillaire HP-5 (longueur : 25m, et de 0.25mm de diamètre intérieur, l'épaisseur du film est de 0.25mm)
- L'étude analytique de chaque principe actif a été réalisée par injection de 0.2µl d'HE (ou l'extrait éthéré) à l'aide d'une micro-seringue.
- Le mode d'injection (Split) doit être rapide pour éviter les élargissements des pics.
- Le gaz vecteur est l'hélium (He) d'un débit de 0.3ml/min;
- La programmation de la température de la colonne est comme suit: la température initiale d'injection est de 70°C pendant 2 min, puis s'élève par palier de 15°C/min à 240°C pendant 20min;
- L'appareil est piloté par un ordinateur menu d'un logiciel approprié pour ce genre d'analyse et d'une banque de données NIST qui permet l'identification des composés.
- Le temps de sortie de chaque pic, le «temps de rétention», caractérise qualitativement la substance concernée. L'aire limitée par ces pics permet de mesurer la concentration de chaque composé séparé.

3.3. Analyse par MEB et EDX des cendres de *C.villosa*

3.3.1. Microscope électronique à balayage

- **Principe**

La microscopie électronique à balayage permet la réalisation d'une analyse élémentaire par détection de l'énergie des rayons X émis. Le fort grandissement et la profondeur de champ très importante de cette technique d'analyse permettent de former des images de surfaces rugueuses ou lisses avec un grand pouvoir de résolution. L'observation d'échantillons des cendres préparés à partir de l'incinération des racines de *C.villosa* nécessite de les relier à la masse avec une colle conductrice qui permet d'évacuer les charges et de la fixer sur le porte échantillon.

Les observations ont été faites avec un microscope électronique à balayage et pratiquées sur des poudres d'échantillons, préalablement incinérés sous vide permettant d'obtenir des résolutions par électrons secondaires. Ces observations permettent de visualiser la structure des cendres ainsi que la composition chimiques et l'état des associations moléculaires des minéraux des cendres analysées.

- **Mode opératoire**

L'analyse des cendres a été réalisée à l'aide d'un MEB (microscope électronique à balayage) Jeol à canon thermoélectronique équipé d'un spectromètre EDX (microanalyse élémentaire). Les spectres ont été obtenus à l'aide d'un diffractomètre PANALYTICAL X'PERT PRO équipé d'un tube de Co (Cobalt) et d'un détecteur X'celerator (Laboratoire ITODYS université Paris 7 Diderot, France).

3.3.2. Spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (EDX)

- **Principe**

L'échantillon est bombardé par un faisceau d'électrons d'énergie de l'ordre de 10 à 40 KeV (en pratique, souvent dans un microscope électronique à balayage standard). L'impact provoque l'émission des rayons X caractéristiques des éléments constituent l'échantillon.

- **Mode opératoire**

Le détecteur EDX est un monocristal de silicium, dopé au lithium et polarisé. Un photon X d'énergie E_0 produit dans le cristal un nombre N de paires électrons-trous proportionnel à l'énergie du photon : $N = E_0 / 3,8$, l'énergie d'ionisation du Si étant de 3,8 eV $Q = E_0 \cdot e / 3,8$ est la charge collectée par les électrodes $V = Q / C$ collectée aux bornes d'une capacité en série avec le préamplificateur est donc également proportionnelle à l'énergie du photon incident. Un analyseur multicanaux permet de classer le nombre d'événements en fonction de leur énergie, et donc de reconstitue le spectre d'émission de l'échantillon (Laboratoire ITODYS université Paris 7 Diderot, France).

Matériel et méthodes

4. Applications

4.1. Activité antibactérienne des HE de *M. communis*

4.1.1. Matériel microbiologique

4.1.1.1. Critères de sélection des souches bactériennes

Les souches bactériennes choisies pour cette étude sont des entérobactéries d'origine clinique, impliquées fréquemment dans les troubles gastro-intestinaux.

4.1.1.2. Les souches bactériennes

20 souches bactériennes ont été utilisées dans ce travail, dont deux souches de référence, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*, obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC) et 18 souches d'entérobactéries isolées de patients hospitalisés d'origine urinaire (**Tableau 15**).

Ces souches nous ont aimablement été fournies par le Laboratoire de Bactériologie, Clinique El-Farabi, Annaba durant la période (2010-2011).

Tableau (15) : Bactéries cliniques et de référence utilisées pour les tests

Bactéries	Souche	Symbole/Référence
Bactéries Gram négatif	<i>Escherichia coli</i> (ATCC)	ECR/25922
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC)	KPR/700603
	1- <i>Escherichia coli</i>	EC
	2- <i>Acinetobacter baumannii</i>	AB
	3- <i>Klebsiella pneumoniae</i>	KP
	4- <i>Klebsiella oxytoca</i>	KO
	5- <i>Enterobacter aerogenes</i>	EA
	6- <i>Enterobacter intermedium</i>	EI
	7- <i>Enterobacter sakazakii</i>	ES
	8- <i>Enterobacter cloacae</i>	EL
	9- <i>Serratia marcescens</i>	SM
	10- <i>Serratia fonticola</i>	SF
	11- <i>Proteus mirabilis</i>	PM
	12- <i>Proteus vulgaris</i>	PV
	13- <i>Morganella morganii</i>	MM
	14- <i>Citrobacter freundii</i>	CF
	15- <i>Citrobacter koseri</i>	CK
	16- <i>Shigella sonnei</i>	SS
17- <i>Salmonella typhimurium</i>	ST	
18- <i>Salmonella sp.</i>	S	

4.1.1.3. Conservation des souches bactériennes

Les souches bactériennes sont entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance à l'obscurité pendant 24h à 37°C ; elles sont ensuite conservées à 5°C dans des tubes contenant de la gélose nutritive inclinée.

Des repiquages sont effectués tout les trois mois.

4.1.1.4. Milieux de culture

Dans ce travail différents milieux de culture nécessaire pour l'isolement, la purification, la conservation des souches et pour les tests antimicrobiens ont été utilisés. Selon les souches microbiennes et selon les méthodes utilisées dans les essais antimicrobiens, nous avons choisis les milieux suivants:

- La gélose **Macconkey** pour l'isolement et la sélection des entérobactéries;
- la gélose nutritive (**GN**) pour la conservation des souches bactériennes;
- La gélose Mueller Hinton (**MH**) pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques et aux différentes HE. C'est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens.

4.1.1.5. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles utilisées dans cette étude ont été extraites à partir des feuilles et des fleurs de *M. communis*. Ces huiles essentielles sont conservées à l'obscurité à 4°C avant d'être testées contre des entérobactéries préalablement sélectionnées. Ces huiles essentielles sont testées, d'une part, à l'état brut, et d'autre part à l'état dilué.

La préparation de la solution mère a été faite par la solubilisation de l'huile essentielle brute dans un solvant approprié, le DMSO, dont les proportions sont fixées HE/DMSO (50/50, v/v), afin de permettre la dispersion des constituants de l'HE au sein de la solution.

L'émulsion réalisée par le mélange du DMSO et l'huile essentielle est suivie par une observation microscopique qui doit donner un aspect granuleux uniforme. A partir de cette émulsion de départ (solution mère) une série de dilutions sont effectuées afin d'obtenir une série de solutions de concentrations différentes en huile essentielle.

Le DMSO seul est utilisé comme un control négatif dans les tests.

Matériel et méthodes

4.1.1.6. Les antibiotiques

Les antibiotiques utilisés sont sélectives et spécifiques pour les entérobactéries. Les caractéristiques de chaque antibiotique sont illustrées dans le **tableau (16)** [130].

Tableau (16) : Antibiotiques utilisés et leurs diamètres critiques d'inhibition (mm)

N°	Antibiotique	Symbole	Famille	Classe	Charge du disque	Cc (mg/l)		Dc (mm)	
						S	R	S	R
1	Cefotaxime	CTX	Bêta-lactamines	Céphalosporines	30 µg	≤1	>2	≥26	<23
2	Ac nalidixique	NA	Quinolones	Quinolones	30µg	≤8	>16	≥20	<15
3	Colistine	CS	Polymyxines	Polymyxines E	25µg	≤2	>2	≥15	<15
4	Erythromycine	E	Macrolides	Macrolides	15ug	≤1	>4	≥22	<17
5	Ac pipemedique	Pi	Quinolones	Quinolones	20µg	≤8	>16	≥19	<14
6	Amoxicilline	AM	Bêta-lactamines	Aminopénicilline	10µg	≤2	>8	≥23	<16
7	Tétracycline	TE	Cyclines	Tétracyclines	30ug	≤4	>8	≥19	<17
8	Imipeneme	IMP	Bêta-lactamines	Carbapénèmes	10µg	≤2	>8	≥24	<17
9	Ofloxacin	OFX	Quinolones	Fluoroquinolones	5µg	≤0.5	>1	≥25	<22
10	Amikacine	AK	Aminoglycosides	Aminosides	30µg	≤8	>16	≥17	<15
11	Gentamicine	GEN	Aminoglycosides	Aminosides	10µg	≤2	>4	≥18	<16
12	Ampicilline	AMP	Bêta-lactamines	Aminopenicillines	25µg	≤2	>8	≥21	<16
13	Ticarciline	Ti	Bêta-lactamines	Carboxypenicillines	75µg	≤8	>16	≥24	<22
14	Nitroxoline	NO	Oxyquinoléines	Oxyquinoléines	30µg	≤1	>32	≥30	<12
15	Ciprofloxacine	CIP	Quinolones	Fluoroquinolones.	5µg	≤0.5	>1	≥25	<22
16	Ceftazidime	CAZ	Bêta-lactamines	Céphalosporines	30µg	≤4	>8	≥21	<19
17	Cefixime	CFM	Bêta-lactamines	Céphalosporines	5µg	≤1	>2	≥25	<22
18	Cefalexine	CN	Bêta-lactamines	Céphalosporines	30µg	≤8	>32	≥18	<12
19	Cotrimoxazole	COT	Sulfamides	Sulfamide + Triméthoprime	25ug	≤8	>16	≥16	<10
20	Chloramphénicol	C	Phénicoles	Chloramphénicol	30µg	≤8	>16	≥23	<19
21	Doxycycline	DO	Cyclines	Tétracyclines	30ug	≤4	>8	≥19	<17

4.1.2. Purification et identification des souches bactériennes

4.1.2.1. Mise en évidence des caractères cultureux

- Culture sur gélose nutritive

- **Principe:** Ce milieu permet de cultiver la plupart des microorganismes qui n'ont pas d'exigences particulières. C'est également une base intéressante à laquelle on pourra rajouter

Matériel et méthodes

divers ingrédients en fonction des germes à cultiver (par exemple : du glucose pour la culture de la levure).

- **Lecture** : Les colonies de certaines espèces peuvent avoir des couleurs caractéristiques.

- **Culture sur gélose MacConkey**

- **Principe** : ce milieu contient des sels biliaires et du cristal violet, qui inhibent les bactéries à Gram positif. La fermentation du lactose est mise en évidence par le virage au rose-rouge d'un indicateur coloré.
 - Les bactéries lactose positif donnent des colonies roses.
 - Les bactéries lactose négatif donnent des colonies incolores.
- **Lecture** : Par exemple, les colonies de *klebsiella* sur MacConkey sont de couleur rose.

4.1.2.2.Observation microscopique

- **Coloration de Gram**

- **Principe**

C'est une coloration différentielle qui divise les bactéries en deux classes : Gram+ et Gram-. Elle est basé sur la composition différentielle de la paroi en lipides qui sont élevées (20%) chez les Gram- et faibles chez les Gram +.

- **Mode opératoire**

- Préparation du frottis : étaler une goutte de la suspension bactérienne sur une lame propre et fixer à la flamme du bec benzen ;
- Recouvrir le frottis avec le violet de Gentiane pendant une minute, puis rincer à l'eau courante ;
- Rajouter le lugol ; (agit comme mordant) et laisser agir pendant une minute ;
- Rincer à l'eau courante ;
- Décolorer à l'alcool à 95° jusqu'à ce que les dernières gouttes d'alcool qui s'écoulent deviennent incolores ;
- Rincer à l'eau courante ;
- Recouvrir la lame avec une solution de fuschine pendant 30 secondes.
- Laver abondamment à l'eau, égoutter puis sécher entre deux feuilles de papier buvard.
- Observer au microscope optique à l'objectif (x100) après avoir déposé une goutte d'huile de cèdre [131].

Matériel et méthodes

- Lecture

- Cellules colorées en violet → Gram +
- Cellules colorées en rose → Gram –

4.1.2.3. Tests biochimiques de pré-identification des souches bactériennes

• Recherche de la catalase

- **Principe :** La catalase est une enzyme qui a la propriété de décomposer l'eau oxygénée (H₂O₂) avec libération d'oxygène et formation d'eau. La réaction chimique est la suivante :



- **Mode opératoire :** sur une lame stérile, déposer une goutte d'H₂O₂ à 10% et introduire la colonie bactérienne à étudier
- **Lecture :** L'observation d'un dégagement de bulles gazeuses signifie que la bactérie possède une catalase.

• Identification biochimique par le système de galerie Api 20 E

- **Principe :** la détermination des caractères biochimiques est indispensable pour l'identification précise des genres et des espèces bactériennes. Elle nécessite l'utilisation d'une galerie biochimique destinée à révéler un ensemble de caractères biochimiques, cette galerie doit être ensemencée par une suspension d'une culture pure. Après incubation, l'exploitation des résultats conduit à l'identification de l'espèce bactérienne.
- **Galerie Api 20 E :** est un système standardisé pour l'identification des Entérobactéries et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données.
- **Mode opératoire :** Préparation et ensemencement des galeries : selon le protocole fourni par le fabricant. La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui constitue les tests. L'utilisation de substrat par la bactérie se traduit par un changement de couleur du milieu ou par apparition de couleur après addition de réactif.
- **Lecture :** La lecture des galeries s'effectue en se référant aux tableaux de lecture (**Tableau 17**). L'identification quant à elle est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification [132].

Matériel et méthodes

4.1.3. Préparation des pré-cultures

A partir d'une culture pure de 18h à 24h d'incubation sur gélose nutritive, racler à l'aide d'une anse de platine 3 à 5 colonies bien isolée et parfaitement identiques. Décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9 %, bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 MacFarland c'est à dire une densité optique de 0.08 à 0,1 lue à 625 nm.

Tableau (17) : Table de la lecture de la galerie Api 20 E [132].

Tests	Substrats	Réactions enzymatiques	Résultats	
			Négatifs	Positifs
ONPG	Ortho-nitro-phényl-galactoside	B-galactosidase	Incolore	Jaune
ADH	Argénine	Argénine Dihydrolase	Jaune	Rouge /orangé
LDC	Lysine	Lysine Décarboxylase	Jaune	Orangé
ODC	Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge /Orangé
CIT	Citrate de sodium	Utilisation du citrate	Vert pale/ grisâtre	Bleu-vert/vert
H2S	Thiosulfate de sodium	Production d' H2S	Incolore/ grisâtre	Dépôt noir/fin liseré
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge /Orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Jaune	TDA/immédiat Marron foncé
IND	Indole	Production d'indole	JAMES (immédiat) ou IND (2nm) JAMES incolore vert pale/jaune IND jaune	JAMES rose IND Anneau Rouge
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	INcolore	VP1+VP2 (10mn) Rosé/rouge
GEL	Gélatinase de khon	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	Glucose	Ferment/oxyde	Bleu/Bleu vert	Jaune
MAN	Mannitol	Ferment/oxyde	Bleu/Bleu vert	Jaune
INO	Inositol	Ferment/oxyde	Bleu/Bleu vert	Jaune
SOR	Sorbitol	Ferment/oxyde	Bleu/Bleu vert	Jaune
RHA	Rhamnose	Ferment/oxyde	Bleu/Bleu vert	Jaune
SAC	Saccharose	Ferment/oxyde	Bleu/Bleu vert	Jaune
MEL	Melibiose	Ferment/oxyde	Bleu/Bleu vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Ferment/oxyde	Bleu/Bleu vert	Jaune
ARA	Arabinose	Ferment/oxyde	Bleu/Bleu vert	Jaune
OX		Cytochrome Oxydase	Incolore	Ox (1-2 mn) Violet
NO ₃ -NO ₂	Tube Glu	Production de (NO ₂) Production de (NO ₃)	NIT 1+ NIT 2 (2-3 nm) Jaune	Rouge
			+ ZN Rouge	Jaune

4.1.4. Antibiogramme

- **Principe**

C'est une méthode qui reflète l'aspect quantitatif de sensibilité bactérienne aux antibiotiques. Elle est d'un intérêt capital pour le clinicien qui doit établir ou rectifier une thérapie déjà entreprise. L'antibiogramme a été réalisé pour comparer les résultats avec ceux obtenus par l'aromatogramme.

La méthode adoptée est la méthode des disques selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM) [130].

- **Mode opératoire**

- **Milieu** : la gélose Mueller Hinton (MH) est coulée et séchée en boîte de Pétri.

- **Inoculum** : à partir d'une pré-culture de 18h. Une suspension bactérienne d'une densité optique de 0.08 à 0.1 lue à 625 nm doit être préparée.

- **Ensemencement** : à l'aide d'un écouvillon, la suspension bactérienne doit être bien étalée sur la surface de la gélose MH séchée : frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas, en stries serrées. Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

- **Application des disques** : il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90mm de diamètre ; pour s'assurer de l'application du disque, il doit être pressé à l'aide d'une pince bactériologique stérile.

- **Incubation** : 18h à 37°C.

- **Expression des résultats**

- **Lecture** : mesurer avec précision des diamètres des zones d'inhibition et les comparer des résultats aux valeurs critiques de références données dans le **tableau (16)**.

4.1.5. Aromatogramme

- **Principe**

L'aromatogramme est méthode inspirée de l'antibiogramme qui permet de déterminer l'activité des HE par la mesure du diamètre d'inhibition autour des disques [133].

- **Mode opératoire**

Des disques de papier filtre stérilisés de 6 mm de diamètre, imprégnés de 10µl d'huiles essentielles à tester, sont déposés à la surface du milieu de Mueller-Hinton coulé en boîte de Pétri, préalablement ensemencée en surface à l'aide d'un écouvillon avec 0,1 ml d'une suspension bactérienne préparée dans l'eau distillée stérile d'une densité optique de 0,08 à 0,1 mesurée à 625

Matériel et méthodes

nm. Cette suspension est préparée à partir d'une pré-culture des bactéries sur gélose nutritive incubée à 37°C environ 24 h [134].

Les boîtes de Pétri sont déposées à 4°C pendant 2h.

- **Expression des résultats**

Après incubation à 37°C pendant 24h, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre, en mm, de la zone d'inhibition. Pour chaque HE, 3 tests sont réalisés.

4.1.6. Détermination des valeurs critiques (CMI et CMB)

- **Principe**

Cette méthode consiste à diluer l'huile essentielle dans un milieu liquide et à inoculer ce dernier avec les souches bactériennes à tester [135]. Elle est utilisée pour déterminer la concentration minimale inhibitrice à partir d'une gamme de concentrations d'HE diluée, la CMI est définie comme la plus faible concentration d'HE capable d'inhiber un germe [136].

La concentration minimale bactéricide (CMB) est définie comme la plus faible concentration d'HE qui détruit 99,9% de l'inoculum bactérien, ce qui correspond dans notre étude à un dénombrement bactérien à 10^4 à 10^2 UFC/ml après 24h d'incubation (l'inoculum initial est entre 10^6 et 10^8 UFC/ml) [137].

- **Mode opératoire**

- Nous avons préparé une solution mère concentrée à 10 mg/ml ;
- Une gamme de concentrations de notre HE a été préparée à partir de la solution mère, soient des dilutions 1/2, 1/4, 1/8 et 1/16 dans le DMSO (méthode de dilution en progression géométrique à raison de 2) ;
- Des pré-cultures de 18 heures des souches à tester ont été inoculées dans des tubes contenant 9 ml de bouillon nutritif, de façon à avoir un inoculum à 10^6 CFU/ml ;
- 1 ml de chaque concentration de l'huile essentielle a été ajouté aux différents tubes ;
- Des tubes témoins ont été préparés, le tube à témoin négatif qui contient le bouillon nutritif seulement et le tube à témoin positif contenant l'inoculum non traité par l'HE ;
- Incubation à 37°C pendant 24heures ;
- Remarque : la concentration de DMSO utilisé pour les différentes dilutions a été testée préalablement sur les souches bactériennes et elle n'a donné aucune activité antibactérienne, elle n'interfère donc pas dans l'interprétation des résultats.
- Pour la CMB, un volume de 0,1ml de tous les tubes qui ne montrent pas de turbidité est cultivé sur un milieu de gélose nutritive et incubé à 37°C pendant 18h à 24h.

- **Expressions des résultats**

Lecture : La CMI est indiquée par le tube que contient la plus faible concentration d'HE ou il n'y pas de croissance bactérienne, elle sera donnée par la concentration de l'HE du premier tube qui ne montre pas une croissance (trouble) visible à l'œil nu [138, 139].

La CMB correspond à la plus petite concentration d'huile essentielle pour la quelle aucune croissance n'est observée qui correspond à un dénombrement bactérien inférieur à 10^2 UFC/ml [140].

4.2. Activité antioxydante de l'extrait éthéré de *G.alypum* et des extraits de *S.aromaticum* (Témoin)

Les extraits de la plante sélectionnée : *Globularia alypum* et de la plante (témoin) : *Syzygium aromaticum* ont été testés pour leurs activités antioxydantes en adoptant quatre méthodes d'évaluation.

4.2.1. Piégeage du radical libre DPPH

- **Principe**

Cette méthode est basée sur la réduction d'un radical libre très stable; le 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) en présence d'un antioxydant donneur d'électron [141].

Ce dernier est réduit à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène. La réduction du radical libre DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517nm provoquée par la présence de l'extrait. Le DPPH est initialement violet, il se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie. Cette décoloration est représentative de la capacité de l'extrait à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques. Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir anti-radicalaire direct de nos extraits.

- **Mode opératoire**

Le mélange réactionnel est préparé comme suit : 50 µl de différentes concentrations des extraits exprimées 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 minutes, 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, l'acide gallique, l'acide citrique, l'EDTA et les extraits de *S.aromaticum* sont pris comme antioxydants de référence.

- **Expression des résultats**

Le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH pour les différents extraits (I%) est calculé selon la formule suivante : $I\% = \frac{A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{blanc}}} \times 100$

A_{blanc} : l'absorbance du contrôle réactif (ne contient pas l'extrait)

$A_{\text{échantillon}}$: l'absorbance de l'extrait avec le réactif

Le pourcentage d'inhibition permet de calculer le paramètre EC_{50} «Efficient Concentration». Ce paramètre a été introduit par Brand-Williams et ses collaborateurs et a été ensuite employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats [142]. Il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH [143]. Ces EC_{50} sont déterminées graphiquement par la droite de régression dont l'abscisse représente la concentration des échantillons et l'ordonnée l'activité antioxydante en pourcentage. Le pouvoir anti-radicalaire relatif (APR) est inversement proportionnel à l' EC_{50} ($APR = 1/EC_{50}$) [144].

4.2.2. La capacité antioxydante totale (Test Molybdate Phosphate)

- **Principe**

La capacité antioxydante totale (CAT) des extraits est évaluée par la méthode au phosphomolybdène de Prieto et al [145]. L'analyse de Molybdate Phosphate est un essai direct qu'on emploie principalement pour mesurer la possibilité et la puissance des antioxydants non enzymatique. Cette méthode dépend de la réduction du Molybdate (VI) au Molybdate (V) et la formation d'un complexe de Molybdate Phosphate de couleur verte, qui est détecté par spectrophotométrie en mesurant le changement de l'absorption à 695nm.

- **Mode opératoire**

Ce test nous a permis d'évaluer le statut antioxydant, en utilisant les antioxydants présents dans notre extrait comme réducteur dans une réaction redox colorimétrique, l'analyse de molybdate phosphate est réalisée en suivant le protocole décrit comme suit :

Un volume de 0.3 ml de chaque extrait méthanolique est mélangé avec 3 ml de solution du réactif (0.6 M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM molybdate d'ammonium). Les tubes sont vissés et incubés à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 3 ml de la solution du réactif et 0.3 ml de méthanol et il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon.

- **Expression des résultats**

La capacité antioxydante totale est exprimée en rapport de milligramme équivalents d'acide ascorbique par milligramme de l'extrait brut (mg EAA/ mg EB). Les expériences sont répétées 3

Matériel et méthodes

fois. Les antioxydants la vitamine C, le BHT, l'acide gallique, l'acide citrique, l'EDTA et les extraits de *S.aromaticum* sont pris comme antioxydants de référence.

4.2.3. Réduction du fer (pouvoir réducteur)

- **Principe**

Cette méthode adoptée est celle de Yildirim et al avec quelques modifications [146]. Cette méthode dépend de la réduction du fer (III) qui est détecté par spectrophotométrie en mesurant le changement de l'absorption à 700nm.

- **Mode opératoire**

Les différentes concentrations des extraits dans le méthanol (1ml) sont mélangées avec 2.5 ml de la solution tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 2.5 ml de ferricyanure de potassium [$K_3Fe(CN)_6$] (1%). Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 20min. Après l'incubation, 2.5 ml d'acide trichloracétique (10%) est additionné. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min.

A la fin, 2.5 ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 2.5 ml d'eau distillée et 0.5 ml de $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ (0.1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm. L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction de fer. La concentration IC_{50} qui est définie comme la concentration des antioxydants nécessaire pour réduire 50% de la concentration initiale du thiocyanate ferrique est un indice utilisé pour comparer et exprimer la puissance des capacités réductrices des substances bioactives.

- **Expression des résultats**

Les résultats de la réduction de fer sont exprimés par l'augmentation proportionnelle de l'absorbance de chaque extrait testé qui indique l'augmentation de la réduction de fer. La vitamine C, le BHT, l'acide gallique, l'acide citrique, l'EDTA et les extraits de *S.aromaticum* sont utilisés comme contrôle positif.

4.2.4. Piégeage du radical H_2O_2

- **Principe**

Cette méthode adoptée est celle de Ruch et al [147]. Elle consiste à tester la capacité des extraits à piéger le radical libre H_2O_2 .

- **Mode opératoire**

La solution de l'eau oxygénée (40 mM) est préparée dans une solution tampon phosphate (pH=7.4). Les différentes concentrations des extraits dissouts (1mg/ml) dans l'eau distillée (1ml) sont mélangées avec 0.6 ml de la solution de H_2O_2 (0.6 ml, 40mM). Les mélanges sont incubés à

Matériel et méthodes

50°C. Après 10min, l'absorbance est alors mesurée à 230 nm pour un blanc de la solution de l'eau oxygénée sans solution tampon phosphate.

• Expression des résultats

Le pourcentage d'inhibition du radical libre H₂O₂ pour les différents extraits (I%) est calculé selon la formule suivante : $I\% = \frac{A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{blanc}}} \times 100$

A_{blanc} : l'absorbance du contrôle réactif (ne contient pas l'extrait)

A_{échantillon} : l'absorbance de l'extrait avec le réactif

La vitamine C, le BHT, l'acide gallique, l'acide citrique, l'EDTA et les extraits de *S.aromaticum* sont utilisés comme contrôle positif.

4.3. Propriétés fonctionnelles des cendres de *C.villosa*

4.3.1. Utilisation des cendres de *C.villosa* pour l'élaboration de préparation à activité antifongique

4.3.1.1. Critères de sélection des souches fongiques

Les souches fongiques sont des champignons impliqués généralement dans les problèmes de la peau. Il s'agit de : *Fusarium sp* et *Aspergillus sp*. Ces souches d'origine clinique (pus et infections cutanées), ont été identifiées par le Laboratoire de recherche de Biochimie et de Microbiologie appliquée, université d'Annaba.

4.3.1.2. Milieux de culture

On utilise dans notre travail un milieu de culture spécifique nécessaire pour l'isolement, la purification des champignons et pour les tests antifongiques. C'est le milieu **PDA** (Potato dextrose agar). Les champignons sont conservés dans des tubes stériles contenant l'eau distillée stérile à 5°C.

4.3.1.3. Les agents antifongiques

Les cendres de *C.villosa* ont été incinérées préalablement pour servir à la préparation d'un mélange avec une matière grasse d'origine animale (beurre de bovins). La mixture a été faite avec des concentrations précises en tenant compte du taux d'humidité de la matière butyrique (la déshydratation), l'addition de sel (la salinité) et l'intervention des lactobacilles de la matière butyrique (la stérilisation du beurre). Ces préparations (**Tableau 18**) sont ainsi testées contre deux champignons (*Fusarium sp* et *Aspergillus sp*). La nystatine est utilisée comme un contrôle positif.

Matériel et méthodes

Tableau (18) : Composition des mélanges testés à base de cendres et de matière butyrique

N°	Symbole	Mélanges testés
1	B	Matière butyrique
2	B _s	Matière butyrique stérile
3	B _d	Matière butyrique anhydre
4	B _{sd}	Matière butyrique stérile anhydre
5	B _n	Matière butyrique additionnée du sel (NaCl)
6	B _{sn}	Matière butyrique stérile et additionnée de sel
7	B _{dn}	Matière butyrique anhydre et additionnée de sel
8	B _{sdn}	Matière butyrique stérile, anhydre et additionnée de sel
9	C	Cendres
10	B +C	Cendres + Matière butyrique
11	B _s +C	Cendres + Matière butyrique stérile
12	B _d +C	Cendres + Matière butyrique anhydre
13	B _{sd} +C	Cendres + Matière butyrique stérile et anhydre
14	B _n +C	Cendres + Matière butyrique additionnée de sel
15	B _{sn} +C	Cendres + Matière butyrique stérile et additionnée de sel
16	B _{dn} +C	Cendres + Matière butyrique anhydre et additionnée de sel
17	B _{sdn} +C	Cendres + Matière butyrique stérile, anhydre et additionnée de sel

4.3.1.4. Préparations des pré-cultures

Sur des boîtes de pétri, contenant le milieu PDA solide, on dépose un disque de chaque souche fongique au centre de chaque boîte provenant d'une culture pure préparée au préalable. On les incube pendant 7 jours à température 28°C [148].

4.3.1.5. Antifongigramme (Méthode de contact direct)

• Principe

Pour l'évaluation de l'activité antifongique, on a adopté la méthode de contact direct où les diamètres de la zone de croissance du mycélium ont été mesurés dont le but est de calculer des taux d'inhibition [149].

Matériel et méthodes

• Mode opératoire

- L'agent antifongique utilisé est le mélange (cendres/matière butyrique, w/v) qui a été testé avec des concentrations : 30, 40, 50, 60 et 70 (mg/ml).
- Ces concentrations sont obtenues par l'addition de 1ml des solutions préparées préalablement à 20 ml du milieu PDA tiède (encore à l'état liquide) dans un tube à essai. Après homogénéisation, le milieu est coulé dans des boîtes de Pétrie de 8,5cm de diamètre.
- L'inoculation se fait par le dépôt au centre de la boîte d'un disque du mycélium d'environ 06mm de diamètre d'une pré-culture de 7 jours.
- Deux boîtes de Pétri contenant 20ml de milieu PDA, l'une est inoculée par la souche fongique pour servir de témoin négatif, l'autre avec un antifongique de référence qui est la nystatine (25 µg/ml de PDA) est aussi inoculée pour servir le témoin positif. Cette dose de nystatine représente la demi-concentration additionnée aux milieux sélectifs d'isolement des bactéries pour empêcher la croissance des champignons.

• Expression des résultats

- Après incubation à 28°C pendant 7 jours en tenant compte de la croissance de témoin négatif, on calcule l'indice antifongique (Pourcentage d'inhibition) qui est déterminé par la formule [149]:
- Indice antifongique = $(1 - D_a / D_b) \times 100$ avec :

D_a : le diamètre de la zone de croissance de l'essai

D_b : le diamètre de la zone de croissance du témoin.

A titre comparatif, des tests antibactériens ont été effectués pour chaque mélange préparé préalablement contre cinq souches de référence : *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) et *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) en adoptant la méthode de puits [150].

- **Principe** : La méthode utilisée est celle de diffusion en puits sur gélose et elle que décrite par Berghe et Vlietinck (1991). Le milieu MH est coulé en boîte de pétri à une épaisseur de 8 mm. Après inoculation par inondation d'une dilution adéquate ($DO \approx 0.1/\lambda = 625\text{nm}$) de la souche à tester réalisée suivant une échelle de MacFarland, des puits de 6 mm de diamètre sont réalisés de manière concentrique dans la gélose MH en boîte de pétri, puis un volume de 1ml de chaque mélange de concentration 50 mg/ml est introduite dans chaque puits [150].

4.3.1.6. Détermination de valeurs critiques (CMI et CMF)

- **Principe**

Pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale fongicide (CMF), on a adopté la méthode de dilution en milieu solide qu'elle est décrite par Leite-De-Souza et al (2005) avec quelques modifications [151].

- **Mode opératoire**

Les mélanges préparés préalablement avec une gamme de concentrations de chaque mélange : 30, 40, 50, 60 et 70 (mg/ml) sont alors incorporées dans la gélose PDA en cours de solidification. À l'aide d'une anse de platine stérile, des disques de mycélium de culture jeune (après 7 jours d'incubation) de diamètre de 6mm ont été prélevés, ces derniers ont été déposés dans les milieux préparés préalablement avec des dilutions des agents à tester.

- **Expression des résultats**

La CMI a été déterminée en mesurant le diamètre de croissance des champignons pour évaluer la plus petite concentration pour laquelle aucun développement n'est visible à l'œil nu.

Pour les boîtes qui ne présentent pas de croissance, le disque de mycélium est transféré sur un milieu PDA neuf pour déterminer la CMF de chaque mélange testé où il s'agit en parallèle d'évaluer la plus petite concentration pour laquelle aucun développement n'est visible à l'œil nu.

4.3.2. Utilisation des cendres de *C.villosa* comme substituant partiel du ciment

4.3.2.1. Matériel

Le but est de présenter les matériaux utilisés dans le présent travail. Dans cette partie, nous présenterons les différentes caractéristiques des constituants qui composent le composite ciment-cendre (CCC).

4.3.2.1.1. Formulation d'un mortier normal

- **Définition**

C'est un mélange de plusieurs composants : Ciment + Sable + Eau de gâchage

Matériel et méthodes

- Composition

• Le ciment

- Définition

Le ciment est un liant hydraulique, c'est-à-dire une matière inorganique finement moulue qui, gâchée avec de l'eau, forme une pâte qui fait prise et durcit par suite de réactions et processus d'hydratation et qui, après durcissement, conserve sa résistance et sa stabilité même sous l'eau. Le ciment est obtenu à partir d'un ou plusieurs constituant(s). Les ciments sont répartis en trois classes de résistance, 32,5 - 42,5 - 52,5, définies par la valeur minimale de la résistance normale du ciment à 28 jours en MPa. Le ciment utilisé est un ciment type GPJ 42,5 fabriqué par la cimenterie de Hadjar essoud, Wilaya de Skikda. Ce type de ciment a été utilisé en tant que ciment de base pour cette étude.

- Exigences chimiques

Les exigences chimiques définies en termes de valeurs caractéristiques des ciments courants type 42.5 sont également explicitées dans le **tableau (19)** ci-après.

Tableau (19) : Exigences chimiques définies en termes de valeurs caractéristiques de ciments courants type 42.5

Propriétés	Référence de l'essai	Classe de résistance	Exigences
Perte au feu	NF EN 196-2	42.5 R	$\leq 5,0 \%$
Résidu insoluble		42.5 N	$\leq 5,0 \%$
Sulfate SO ₃		42.5 N	$\leq 3,5 \%$
		42.5 R	$\leq 4,0 \%$
Chlorure		42.5 R	$\leq 0,1 \%$
Pouzzolanicité	NF EN 196-5	42.5 N	Satisfait à l'essai

- Résistance à la compression

La résistance normale d'un ciment est la résistance mécanique à la compression mesurée à 28 jours conformément à la norme NF EN 196-1 et exprimée en MPa (1 MPa = 1 N/mm²=10 bars). Pour les ciments de la classe 42,5, il est fixé une valeur maximale de la résistance normale à 28 jours, comme indiqué dans le **tableau (20)**. Pour chaque classe de résistance courante, deux classes de résistance à court terme sont définies, une classe avec résistance à court terme ordinaire (indiquée par la lettre N) et une classe avec résistance à court terme élevée (indiquée par la lettre R).

La conformité d'un lot de ciment est appréciée pour ce qui concerne la résistance à la compression en fonction des valeurs du **tableau (20)** qui sont des limites absolues applicables à chaque résultat d'essai.

Matériel et méthodes

Tableau (20) : Résistance mécanique à la compression du ciment utilisé

Désignation de la classe de résistance	Résistance à la compression en MPa		
	Résistance à court terme à 2 jours	Résistance à court terme à 7 jours	Résistance courante à 28 jours
42.5 N	≥ 10	-	≥ 42.5 ≤ 62.5
42.5 R	≥ 20	-	
	Valeurs limites applicables à chacun des résultats		
42.5 N	8	-	40
42.5 R	18	-	40

- **Le sable**

Le sable fait partie de l'une des familles des granulats. La taille d'un granulat répond à des critères granulométriques précis. Les granulats sont classés en fonction de leur granularité (distribution dimensionnelle des grains) déterminée par analyse granulométrique à l'aide de tamis. Le granulat est désigné par le couple d/D avec d: dimension inférieure du granulat D: dimension supérieure du granulat. Par conséquent, les sables les plus utilisés ont des caractéristiques de l'ordre : $d = 0$ et $D \leq 4\text{mm}$.

Le sable utilisé dans notre étude est un sable de dune reconstitué de sable fin naturel et avec un ajout alluvionnaire à granulométrie initiale de 0/5 mm de diamètre et provenant d'une sablière de la région d'Annaba.

- **Eau de gâchage**

L'eau utilisée dans notre étude provient de la distribution de l'eau potable de la région d'Annaba.

4.3.2.1.2. Formulation d'un mortier renforcé par les cendres

- **Définition**

C'est un mélange de plusieurs composants : Ciment + Sable + Eau de gâchage + Cendres

- **Composition**

La composition d'un mortier renforcé par les cendres est la même de celle d'un mortier normal sauf qu'elle est additionnée des cendres des racines de *C.villosa*.

- **Le ciment**
- **Le sable**
- **L'eau de gâchage**

- **Les cendres**

Ce sont des cendres préparées à partir de l'incinération des racines de *C.villosa* au four à moufle à 498°C (voir mode d'obtention des molécules organiques et des constituants minéraux).

4.3.2.2.Méthodologie

L'intérêt de cette partie est d'exposer la méthodologie des expériences menées sur les différents échantillons confectionnés dont le but est la formulation des mortiers renforcés par des cendres (25%, 50% et 75%) et la contribution de comportement mécanique des composites ciment-cendres. Ces techniques expérimentales seront menées conformément aux normes en vigueur.

4.3.2.2.1. Formulation des composites CCC

- **Objectif de la formulation**

Il est bien connu que l'incorporation des cendres est d'améliorer la résistance à la flexion du composite et de contrôler le comportement post-fissuration. Cela impose l'utilisation de plusieurs concentrations de cendres pour intervenir de l'initiation des microfissures jusqu'à leurs coalescences en macro-fissures. La formulation du composite ne suffit pas à caractériser le matériau. Il est nécessaire de le qualifier par une application empruntant obligatoirement un processus de mise en œuvre facile sans utilisation de moyens trop énergiques.

L'objectif recherché ici est d'optimiser le taux de cendres à incorporer en fonction des différents pourcentages de cendres. Le composite ciment-cendre n'est pas encore régi par des normes spécifiques. Le dosage des différents constituants est choisi en fonction de l'usage de ce genre de matériau et principalement de ses propriétés rhéologiques obtenues.

- **Démarche de la formulation**

Notre démarche de la formulation est basée sur le choix d'un mortier classique (Ciment/Sable =1/3) en le renforçant par des cendres d'origine végétale. La formulation des mortiers est basée sur le choix des concentrations définies préalablement (25%, 50% et 75%). La composition de ce composite est illustré dans le tableau suivant :

Matériel et méthodes

Tableau (21): Conditions de formulation des composites CCC

Composition	Ciment (g)	Sable (g)	Cendres (g)	Eau de gâchage (g)
Mortier (Témoin)	500	1500	/	250
Composite (25%)	375	1500	125	250
Composite (50%)	250	1500	250	250
Composite (75%)	125	1500	375	250

4.3.2.2.2. Malaxage

La réaction entre les différents composants est d'autant plus complète que le mélange est homogène. Trois étapes constituent le mode de fabrication des CCC (composite ciment-cendres) :

- L'homogénéisation du mélange à sec (ciment et sable) pendant 2 min environ à vitesse lente ;
- Introduction de l'eau de gâchage au cours du malaxage qui a pour but de mouiller le mélange d'une part et de faciliter la mise en place d'autre part et ceci pendant 2 min à vitesse rapide ;
- Les cendres sont ajoutées progressivement ;
- L'homogénéisation est réalisée à l'aide d'un malaxeur.

4.3.2.2.3. Coulage et vibration

Le mélange préparé est mis en place par coulage et vibration. Le coulage se fait en deux phases. Le moule rempli aux trois quarts est soumis à une vibration jusqu'à l'apparition d'un léger ressuage. Ensuite le moule est complété et la vibration reprend pendant une minute.

4.3.2.2.4. Modes de conservation des échantillons

Le mode de conservation choisi est celui dans un milieu humide. En effet, la conservation des échantillons a été réalisée dans un bassin plein d'eau courante pendant 28 jours.

4.3.2.2.5. Résistance en flexion 3 points

L'essai de traction par flexion a été mené après 28 jours de conservation des échantillons sur les éprouvettes $4 \times 4 \times 16 \text{ cm}^3$ sur une presse de traction type Zwick/Roell, munies d'un banc de flexion 3 points. Le procédé expérimental est conforme à la norme NF P 18407 et représenté sur la **figure 8**.

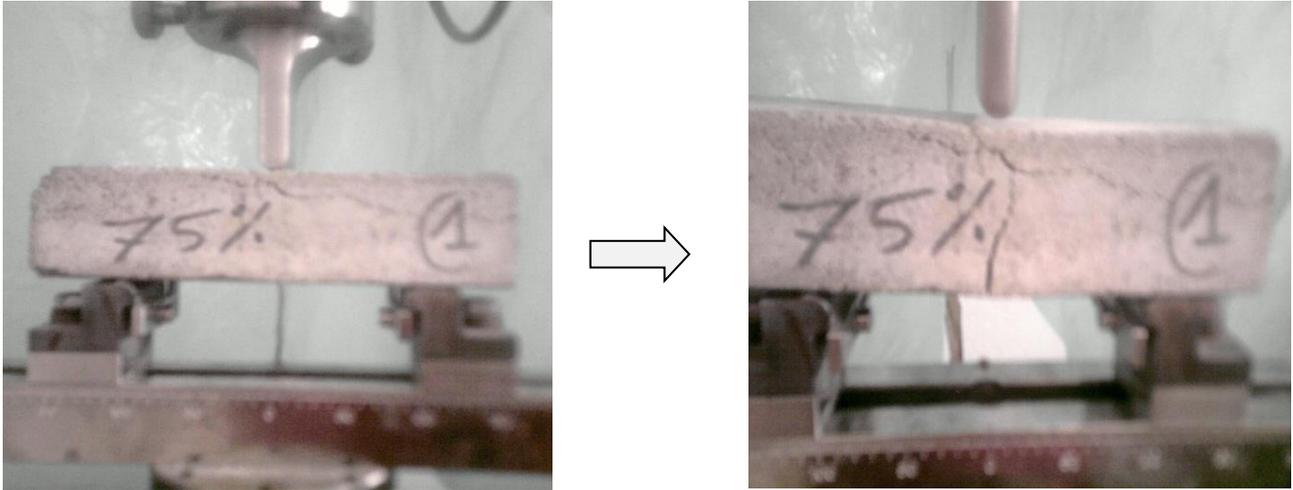


Figure (8) : Dispositif d'essai de traction par flexion 3 points

4.3.2.2.6. Résistance en compression

L'essai de compression est mené sur les demi-échantillons rompus en flexion. La section de compression est $4 \times 4 \text{ cm}^2$. La vitesse de chargement est constante et la presse utilisée est type Zwick/Roell 20kN. . Le procédé expérimental est représenté sur la **figure 9**.

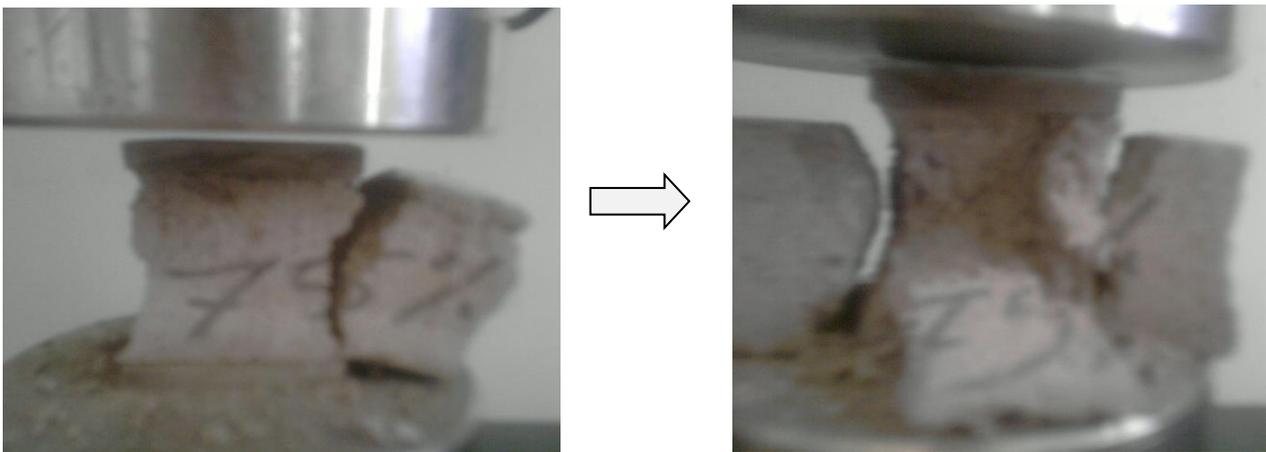


Figure (9): Dispositif d'essai de la compression

Résultats et discussion

Résultats et discussion

L'utilisation d'extraits végétaux correspond particulièrement à une nécessité croissante de développer les valorisations tout alimentaires que non alimentaires des plantes de la flore algérienne. Prenant exemple sur de nombreux pays du sud de la méditerranée, nous avons entrepris une étude sur les plantes suivantes : *Calicotome villosa*, *Globularia alypum* et *Myrtus communis*.

1. Taux d'humidité des plantes étudiées

Les végétaux sont riches en eau, les plantes fraîches renferment 60 à 80 % d'eau. Pour assurer une bonne conservation, la teneur en eau doit être inférieure ou égale à 10 % [152]. La méthode pondérale a été retenue pour la détermination de la teneur en eau des organes végétaux séchés au laboratoire. Les résultats de cette analyse ont révélé un taux d'humidité inférieur à 10% : pour *G.alypum* (4.56 ± 0.21) et *C.villosa* ($6,54\pm 0,23$) alors que pour *M.communis*, ce taux est de $11,76\pm 0,54$. Une teneur en eau, inférieure à 10% confère à nos poudres une meilleure conservation à long terme. Par ailleurs, le taux d'humidité de *S.aromaticum* était de $5,15\pm 0,73$.

Tableau (22): Taux d'humidité (H%) et de matière organique (MO%) des plantes étudiées

Prise de poids	N°	<i>M.communis</i> (feuilles)	<i>G.alypum</i> (feuilles)	<i>C.villosa</i> (racines)
	1	12,09	4,8	6,43
	2	12,07	4,53	6,39
	3	11,13	4,37	6,82
H%		11,76±0,54	4,56±0,21	6,54±0,23
	1	95,66	92,63	91,46
	2	95,87	92,86	90,96
	3	95,08	92,88	92,01
MO%		95,53±0,40	92,79±0,13	91,47±0,52

2. Obtention de molécules organiques et de constituants minéraux

2.1. Cinétique de l'extraction par hydrodistillation des HE de *M.communis*

L'huile essentielle de *M.communis* a été extraite par la méthode d'hydrodistillation. D'après la formule du RHE (%), nous avons obtenu les résultats illustrés dans la **figure (10)** qui représentent la cinétique d'extraction des HE à partir des feuilles et des fleurs de *M.communis*. Ces résultats montrent que la vitesse d'extraction des HE des feuilles est plus rapide par rapport aux fleurs. En effet, l'extraction complète est achevée en moins de 60 min à partir des feuilles, dans le cas des fleurs, le temps est de 120 min. Ceci est peut être due à la rigidité de la paroi des structures sécrétrices des HE des organes végétaux étudiés.

Résultats et discussion

La cinétique d'extraction consiste à déterminer le rendement en fonction du temps d'extraction. Cette étude a pour but de fixer le temps nécessaire pour extraire le maximum d'huile et d'éviter ainsi les pertes de temps et d'énergie. Donc, elle a un but surtout économique.

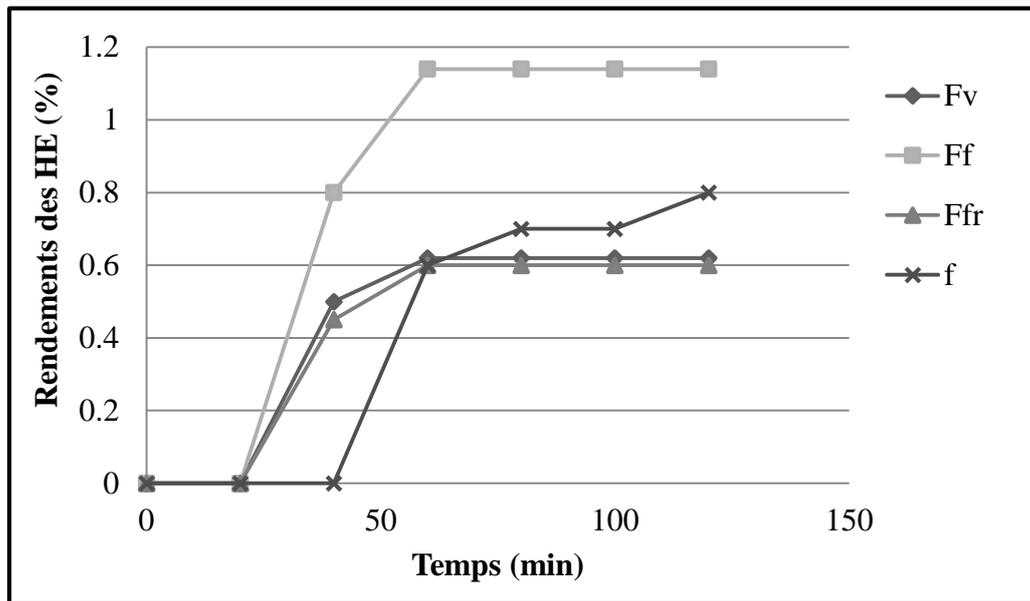


Figure (10) : Cinétique de l'extraction des HE des feuilles (F) et des fleurs (f) de *Myrtus communis* par l'hydrodistillation en fonction du temps (0-120min), F_v: Stade végétatif, F_f: Stade de la floraison, F_{fr}: Stade de la fructification

2.2.Rendements d'extractions

Pour chaque échantillon, nous avons calculé le rendement de l'extraction. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau (23)**.

Le rendement d'extraction des huiles essentielles de *M. communis* est différent selon l'organe utilisé (feuilles ou fleurs) et aussi selon la saison de récolte. Le rendement le plus élevé est obtenu à partir des feuilles lorsque la plante a atteint le stade de la floraison (1.14%) alors que pour les fleurs ce rendement est de 0.8%. En effet, les rendements maximum, intermédiaire et minimum sont obtenus durant le stade de la floraison (1.14%), le stade végétatif (0.62%) et le stade de la fructification (0.6%) respectivement.

En ce qui concerne les deux autres plantes, les résultats montrent que la fraction étherée obtenue des feuilles de *G.alypum* présente un rendement de 11,73%. Pour les cendres résultant de l'incinération des racines de *C.villosa*, le rendement est de 17,6%. Il faut noter que l'eugénol extrait à partir des clous de girofle (plante témoin) représente un rendement de 73,06%.

Résultats et discussion

Tableau (23): Récapitulatif regroupant les rendements d'extractions des différents échantillons

Matériel végétal	Organe	Saison	Prises	Masse (mg)	Rendements (%)	
<i>Myrtus communis</i>	Feuilles (HE)	Stade végétatif	P1	0,310	0,62	
			P2	0,305	0,61	
			P3	0,315	0,63	
					0,31±0,005	0,62±0,01
		Stade de la floraison	P1	0,570	1,14	
			P2	0,575	1,15	
			P3	0,565	1,13	
					0,57±0,005	1,14±0,01
		Stade de la fructification	P1	0,3	0,6	
	P2		0,3	0,6		
	P3		0,305	0,61		
				0,30±0,002	0,6±0,007	
Fleurs (HE)	Stade de la floraison	P1	0,4	0,80		
		P2	0,38	0,76		
		P3	0,43	0,86		
				0,4±0,02	0,8±0,05	
	Stade de la floraison	P1	0,3	6		
P2		0,52	10,4			
P3		0,94	18,8			
			0,58±0,32	11,73±6,5		
<i>Calicotome villosa</i>	Racines (C)	Stade de la floraison	P1	0,85	17	
			P2	0,89	17,8	
			P3	0,90	18	
					0,88±0,02	17,6±0,52

2.2.1. Les huiles essentielles des feuilles et des fleurs de *M.communis*

Nous avons obtenu une huile de couleur jaune foncée avec une odeur âcre. Nous n'avons pas pu récupérer une quantité importante, le rendement obtenu à partir des feuilles de notre myrte est faible par rapport aux résultats obtenus par Zrira et al (2003) indiquant que des feuilles sèches de myrte provenant d'une région de la Grèce ont donné des teneurs en huile essentielle équivalentes respectivement à 1.2%, 1.45% et 1.45% durant les périodes : végétative, floraison et fructification [151]. Ces derniers résultats corroborent avec le rendement extrême d'huile essentielle de parties aériennes de myrte obtenu en Italie en période de floraison (4,53%) (Figure 11)[108].

A noter que le rendement par type d'organe (feuilles et fleurs) montre que les feuilles sont plus riches en HE que les fleurs. Nous pouvons déjà observer une différence significative entre les rendements d'extraction de la plante étudiée en fonction des différents stades (stade végétatif, de la

Résultats et discussion

fructification et de la floraison). Le rendement était largement variable, lisiblement montré dans la **figure (11)**. Le rendement le plus élevé a été obtenu à partir des feuilles en stade d'épanouissement ($1,14 \pm 0,01\%$) non seulement en comparaison avec les autres rendements obtenus à partir le myrte algérien mais aussi avec la même espèce d'autres régions de Tunisie. Cette différence pourrait être expliquée par le choix de la période de récolte car elle est primordiale en termes de rendement et de qualité de l'HE [62].

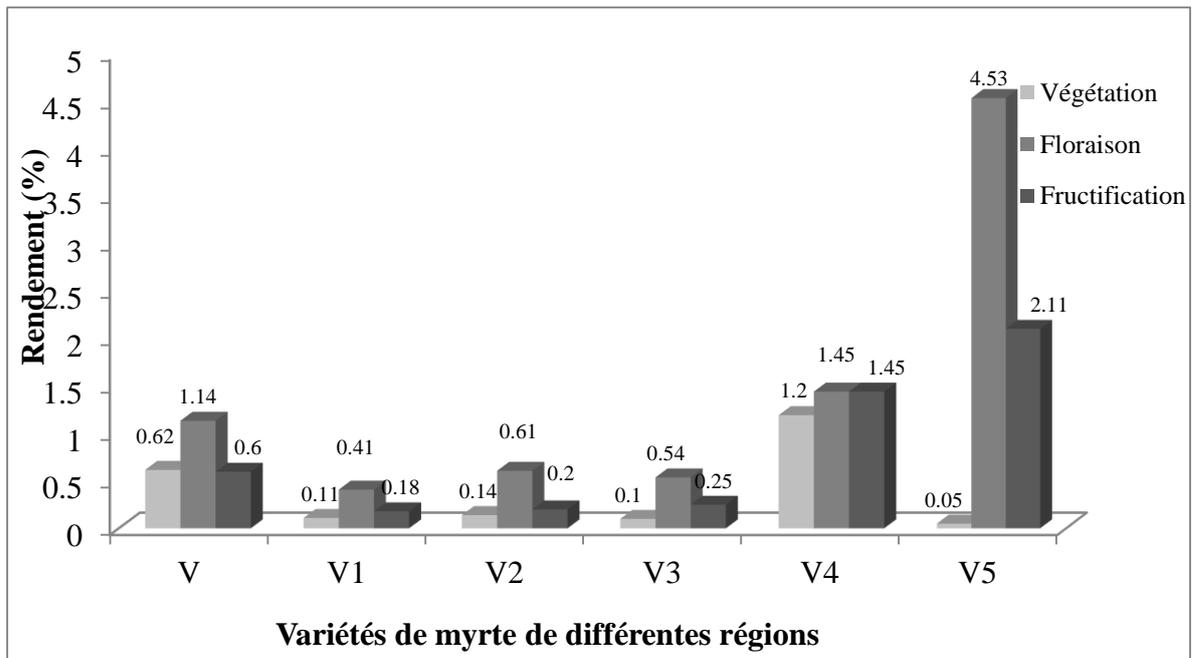


Figure (11) : Représentation des rendements des HE extraites à partir des feuilles de myrte de différentes régions pendant les stades de développement (Stade végétatif, de la floraison et de la fructification), (V): HE de myrte de l'Algérie (espèce étudiée), (V1, V2 et V3) : HE de 3 variétés de myrte tunisien, (V4) : HE de myrte de Grèce, (V5) : HE de myrte de l'Italie, [72, 54, 55, 108].

Les différences existantes entre les rendements d'extraction obtenus pour cette espèce poussant dans la région d'Annaba peuvent être liées aux facteurs climatiques (chaleur, froid, stress hydrique), géographiques (altitude, nature du sol, taux d'exposition au soleil) et génétiques (croisement naturel). En outre, le moment de la récolte et la méthode d'extraction ont un impact sur la différence de la teneur des huiles essentielles [154].

Une étude comparative a été faite en Tunisie sur la même espèce dont l'aboutissement donne les mêmes résultats [54]. Ceci est en concordance avec d'autres chercheurs qui ont montré une forte corrélation entre le rendement de l'extraction et le cycle végétatif de la plante avec une biosynthèse maximale des huiles essentielles pendant le stade de la floraison [72, 155]. En revanche, Gardeli et al

Résultats et discussion

(2008) ont rapporté que le rendement des HE des feuilles de myrte ne diffère pas significativement avec les saisons [55]. Dans le cadre de similarité avec nos résultats, Zrira et al (2003) ont le même point de vu sur la stabilité de la production quantitative d'huile essentielle de myrte durant les saisons où des variations qualitatives en composition chimique ont été observées [153].

2.2.2. Rendements en molécules organiques de l'extrait étheré de *G.alypum*

Il faut noter que les feuilles de *Globularia alypum* ont été traitées par une hydrodistillation et la phase aqueuse résultante a été soumise à un fractionnement par des solvants polaires ou apolaires. Un rendement important en molécules organiques a été obtenu par extraction à l'éther de pétrole (11,73%). En effet, Le profil chimique de la fraction d'éther de pétrole présente une fluctuation remarquable caractérisée par la présence de : l'eugénol (10.56%) et de l'isoeugénol (0.87%). Ces molécules sont particulièrement intéressantes dans les domaines de la parfumerie et de la dentisterie [66]. Par ailleurs, l'eugénol et l'isoeugénol extraits de *Syzygium aromaticum* ont été utilisés comme témoin en place de ceux du commerce. Nous avons réalisé une hydrodistillation suivie d'un fractionnement au dichlorométhane (apolaire) et à l'éther diéthylique (moins apolaire). Le rendement obtenu est de $97\pm 0,7\%$ pour l'eugénol et $1,83\pm 0,6\%$ pour l'isoeugénol. L'eugénol est un composé disponible et connu depuis longtemps dans les clous de girofle (*Syzygium aromaticum* : *Eugenia caryophyllata*, Myrtaceae) au coté d'autres composés aromatiques : acétyl eugénol, chavicol, acétyl salicylate et humulènes [156].

La **figure (12)** montre la richesse en eugénol de différentes espèces à travers le monde. Une étude algérienne récente a été menée par hydrodistillation suivie d'analyse de l'huile essentielle des feuilles de *G.alypum* de deux localités (Boutaleb et Khenchla) qui indique des rendements en eugénol et isoeugénol de l'ordre de 3,06% et 0,22% respectivement [157].

Résultats et discussion

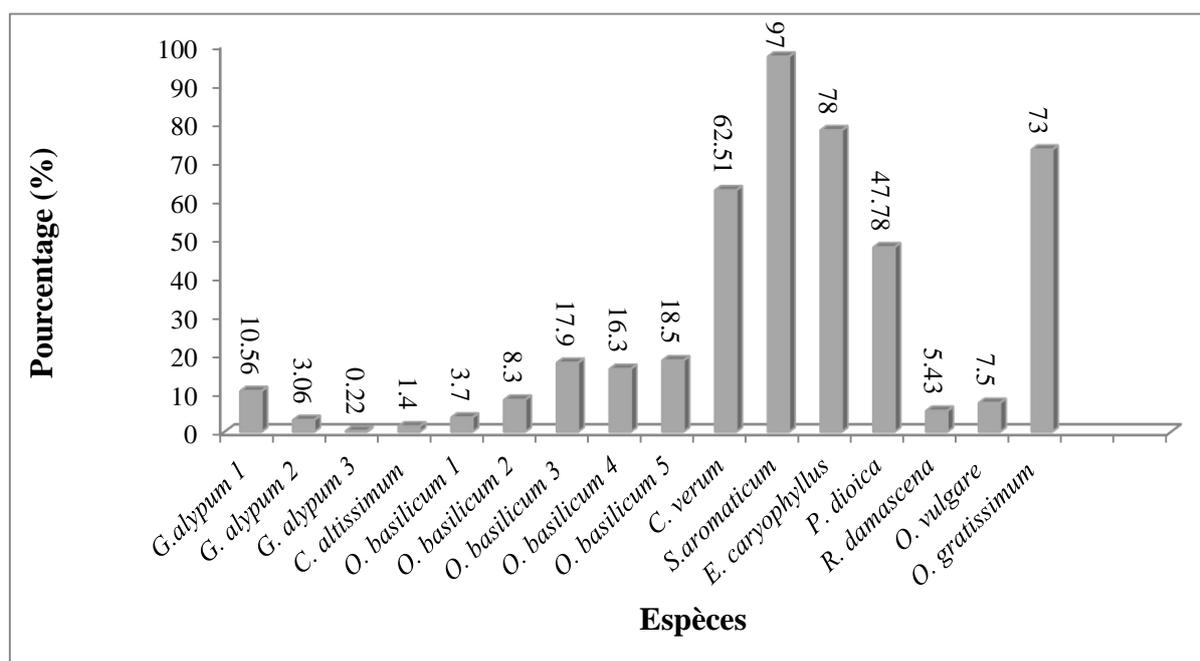


Figure (12) : Illustration du pourcentage de l'eugénol des espèces de différentes régions du monde.

Globularia alypum 1 (GA₁ : Algérie, Soukahras, espèce étudiée), *Globularia alypum* 2 (GA₂ : Algérie, Boutaleb), *Globularia alypum* 3 (GA₃ : Algérie, Khenchla), *Syzygium aromaticum* (SA : Témoin), *Ocimum basilicum* 1 (OB₁ : Turquie, Localité 1), *Ocimum basilicum* 2 (OB₂ : Turquie, Localité 2), *Ocimum basilicum* 3 (OB₃ : États-Unis, Localité 1), *Ocimum basilicum* 4 (OB₄ : États-Unis, Localité 2), *Ocimum basilicum* 5 (OB₅ : Grèce), *Cinnamomum altissimum* Kosterm (CA : Malaisie), *Cinnamomum verum* (CV : Madagascar), *Eugenia caryophyllus* (EC : Madagascar), *Pimenta dioica* (PD : Antilles), *Rosa damascene* (RD : Iran), *Origanum vulgare* (OV : Croatie), *Ocimum gratissimum* (OG : Inde). L'ordre de l'abondance est le suivant :

SA>EC>OG>CV>PD>OB₅>OB₃>OB₄>GA₁>OB₂>OV>RD>OB₁>GA₂>CA>GA₃.

[86, 157, 158, 159, 160, 161, 162].

3. Analyse des échantillons

3.1. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse des HE de *M. communis* et de l'extrait éthéré de *G. alypum*

3.1.1. Composition chimique des HE de *M. communis*

Après analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/ms), 49 composés ont été identifiés dans l'huile essentielle des feuilles de *M. communis* et 54 composés pour l'huile des fleurs. Les résultats de l'analyse de la composition chimique sont obtenus

Résultats et discussion

par comparaison des données de la masse des spectres et des temps de rétention. Ils sont résumés dans les **tableaux (25, 26)**. L'analyse chimique a fait ressortir un nombre déterminé de constituants majoritaires (>1%) pour les deux HE des feuilles et celle des fleurs de *M. communis* représentant 92,53% et 89,65% respectivement.

Les **figures (17, 18)** donnent une distribution des différents composés identifiés et contenus dans les huiles essentielles, suivant les proportions nous pouvons distinguer le(s) composés majoritaires, qui représentent le principe actif et nous pouvons déterminer donc le chémotype de la plante.

On constate que dans les **tableaux (25, 26)**, deux composés majoritaires (alpha-pinene >1,8-cinéole) sont présents dans les huiles essentielles de myrte quelque soit les organes végétaux d'où provient ces huiles (feuilles ou fleurs).

Le chémotype ou race chimique de chaque organe est donc:

- Chémotype α -pinene/1,8-cinéole/limonene pour l'huile essentielle des feuilles de *M. communis*, avec une prépondérance du premier composé (α -pinene >1,8-cinéole=limonene).
- l'huile essentielle des fleurs de *M. communis* est de même chémotype que les feuilles α -pinene/1,8-cinéole, avec prédominance de premier composé majoritaire (α -pinene >1,8-cinéole).

L'analyse préliminaire d'huiles essentielles des feuilles et des fleurs de *M. communis* d'Annaba a montré des profils chromatographiques qualitativement presque similaires mais avec une différence quantitative dans l'abondance de leurs principaux composants. Il est à noter d'après cette analyse par CPG/ms qu'il y a en effet des composés majoritaires et des composés minoritaires. D'une part, des composés de différentes familles chimiques sont abondants dans les feuilles alors qu'ils sont absents dans les fleurs et d'autre part certains composés des feuilles sont présents dans les fleurs. Une diversification du nombre des composés identifiés dans l'HE des feuilles a été remarquée lors de la comparaison entre notre espèce et le myrte provenant de différentes localités, ces résultats sont consignés dans le **tableau (24)**.

Tableau (24): Comparaison selon le nombre des composants dans l'HE des feuilles de *M. communis* de différentes régions du monde

Région	Algérie	Tunisie	Italie	Iran	France	Grèce	Chypre
		[54]	[61]	[47]	[66]	[68]	[65]
Nombre	49	39	30	32	14	42	16

Résultats et discussion

Les huiles essentielles des parties aériennes spécialement des feuilles de *M. communis* ont été largement étudiées. Comme pour toutes les huiles, une grande variabilité chimique a été rapportée. Sur la base des résultats fournis par la littérature (**Figure 13**), plusieurs huiles provenant de différentes régions peuvent être distinguées : Celles dont la composition est dominée par deux types de composés majoritaires : 1,8-cinéole (l'eucalyptol) et l' α -pinène avec une prépondérance du 1,8-cinéole d'une part et celles caractérisées par la dominance d' α -pinène avec une différence de leur concentrations d'autre part. Nos huiles appartiennent à ce dernier type avec la codominance de l' α -pinène et le 1,8-cinéole.

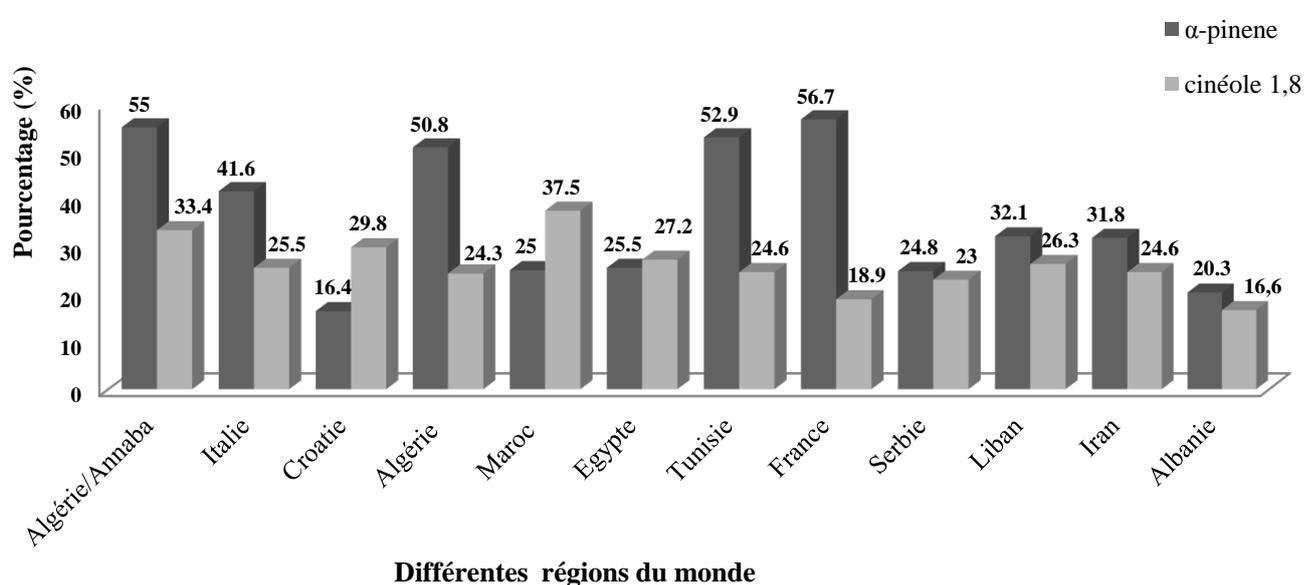


Figure (13) : Concentrations de deux composants majoritaires de l'HE des feuilles de *M. communis* de différentes régions du monde [52, 56, 57, 58, 61, 71, 155].

Résultats et discussion

Tableau (25) : Composition chimique d'HE des feuilles de *Myrtus communis*

Pic	Composé	TR(min)	(%)	IR	M (g/mole)	Formule
1	Isobutyl isobutyrate	7.963	0.19	807	144.21	C ₈ H ₁₆ O ₂
2	Alpha-pinene	8.676	55.00	925	136,23	C ₁₀ H ₁₆
3	Camphene	8.935	0.76	968	136,23	C ₁₀ H ₁₆
4	1-(Méthylencyclopropyl)-1-cyclopentene	9.099	0.03	995	120.19	C ₉ H ₁₂
5	Beta-pinene	9.751	0.38	1103	136,23	C ₁₀ H ₁₆
6	Ethylidene cyclopropane	10.265	0.08	1188	68.11	C ₅ H ₈
7	Isobutyl-2-méthylbutyrate	10.597	0.22	1243	158.24	C ₉ H ₁₈ O ₂
8	Delta-3-carene	10.784	0.25	1274	136,23	C ₁₀ H ₁₆
9	Isoamyl isobutyrate	11.044	0.10	1317	158.24	C ₉ H ₁₈ O ₂
10	Limonene	11.54	33.42	1399	136,23	C ₁₀ H ₁₆
11	1,8-Cinéole	11.54	33.42	1399	154,24	C ₁₀ H ₁₈ O
12	Gamma-terpinene	12.301	0.16	1525	136,23	C ₁₀ H ₁₆
13	Alpha-terpinolene	13.177	0.12	1670	136,23	C ₁₀ H ₁₆
14	Linalool	13.648	1.43	1748	154,24	C ₁₀ H ₁₈ O
15	Ethylbutyl acetylene	14.041	0.04	1813	110.19	C ₈ H ₁₄
16	α-Campholenal	14.325	0.09	1860	152.24	C ₁₀ H ₁₆ O
17	Pinocarveol	14.754	0.24	1931	152.24	C ₁₀ H ₁₆ O
18	Cis-verbenol	14.947	0.05	1963	152.24	C ₁₀ H ₁₆ O
19	Cycloocta-1,4-dien-3-one	15.376	0.05	2034	108,18	C ₈ H ₁₂
20	4-Terpineol	15.908	0.15	2122	154,24	C ₁₀ H ₁₈ O
21	Linalyl propionate	16.367	1.20	2198	210.31	C ₁₃ H ₂₂ O ₂
22	Linalyl acetate	18.017	0.44	2471	196.29	C ₁₂ H ₂₀ O ₂
23	Geraniol	18.137	0.25	2491	154,24	C ₁₀ H ₁₈ O
24	Myrtenyl acetate	19.249	0.03	2675	194.27	C ₁₂ H ₁₈ O ₂
25	1,7-Octadien-3-one	19.932	0.06	2788	150.21	C ₁₀ H ₁₄ O
26	2-Acetoxy-1,8-cineole	20.367	0.05	2860	212.28	C ₁₂ H ₂₀ O ₃
27	Isohexane	20.596	0.64	2898	86,17	C ₆ H ₁₄
28	Neryl acetate	20.965	0.16	2959	196.29	C ₁₂ H ₂₀ O ₂
29	Geranyl acetate	21.491	2.04	3046	196.29	C ₁₂ H ₂₀ O ₂
30	Methyleugenol	22.137	0.64	3153	178,22	C ₁₁ H ₁₄ O ₂
31	Beta-caryophyllene	22.445	0.29	3204	204,35	C ₁₅ H ₂₄
32	Alpha-humulene	23.315	0.08	3348	204,35	C ₁₅ H ₂₄
33	Thiophene	23.424	0.05	3366	84.14	C ₄ H ₄ S
34	Germacrene-D	24.004	0.11	3462	204,35	C ₁₅ H ₂₄
35	3-Ethyl-3-méthyl-2-pentanol	24.379	0.06	3524	130.22	C ₈ H ₁₈ O
36	Cinrolone	24.910	0.13	3612	166.22	C ₁₀ H ₁₄ O ₂
37	Artemisia acetate	25.472	0.12	3705	196.28	C ₁₂ H ₂₀ O ₂
38	Germacrene B	25.841	0.10	3766	204,35	C ₁₅ H ₂₄
39	Caryophyllene oxide	26.481	0.55	3872	220.35	C ₁₅ H ₂₄ O
40	2-Méthylcyclopentenone	27.098	0.13	3974	96.12	C ₆ H ₈ O
41	P-Pentyloxynitrobenzene	27.224	0.07	3995	209.24	C ₁₁ H ₁₅ NO ₃
42	Cubebene	27.406	0.08	4025	204,35	C ₁₅ H ₂₄
43	Patchulane	27.690	0.06	4072	206,36	C ₁₅ H ₂₆
44	Adamantane	27.768	0.16	4085	136,23	C ₁₀ H ₁₆
45	4,5-Diethyloctane	28.227	0.14	4161	170,33	C ₁₂ H ₂₆
46	Cis-8-méthylènebicyclo(5.1.0)octane	28.590	0.03	4221	122,20	C ₉ H ₁₄
47	(-)-Pinane-3-carboxylic acid	28.663	0.03	4233	182,25	C ₁₁ H ₁₈ O ₂
48	1,6-Dibromohexane	28.983	0.06	4286	243,96	C ₆ H ₁₂ Br ₂
49	2-Butanoylthiazole	29.490	0.04	4370	155,21	C ₇ H ₉ NOS
Rendement des composés majoritaires (>1%)			92,53			
Rendement des composés minoritaires (<1%)			7,47			

Résultats et discussion

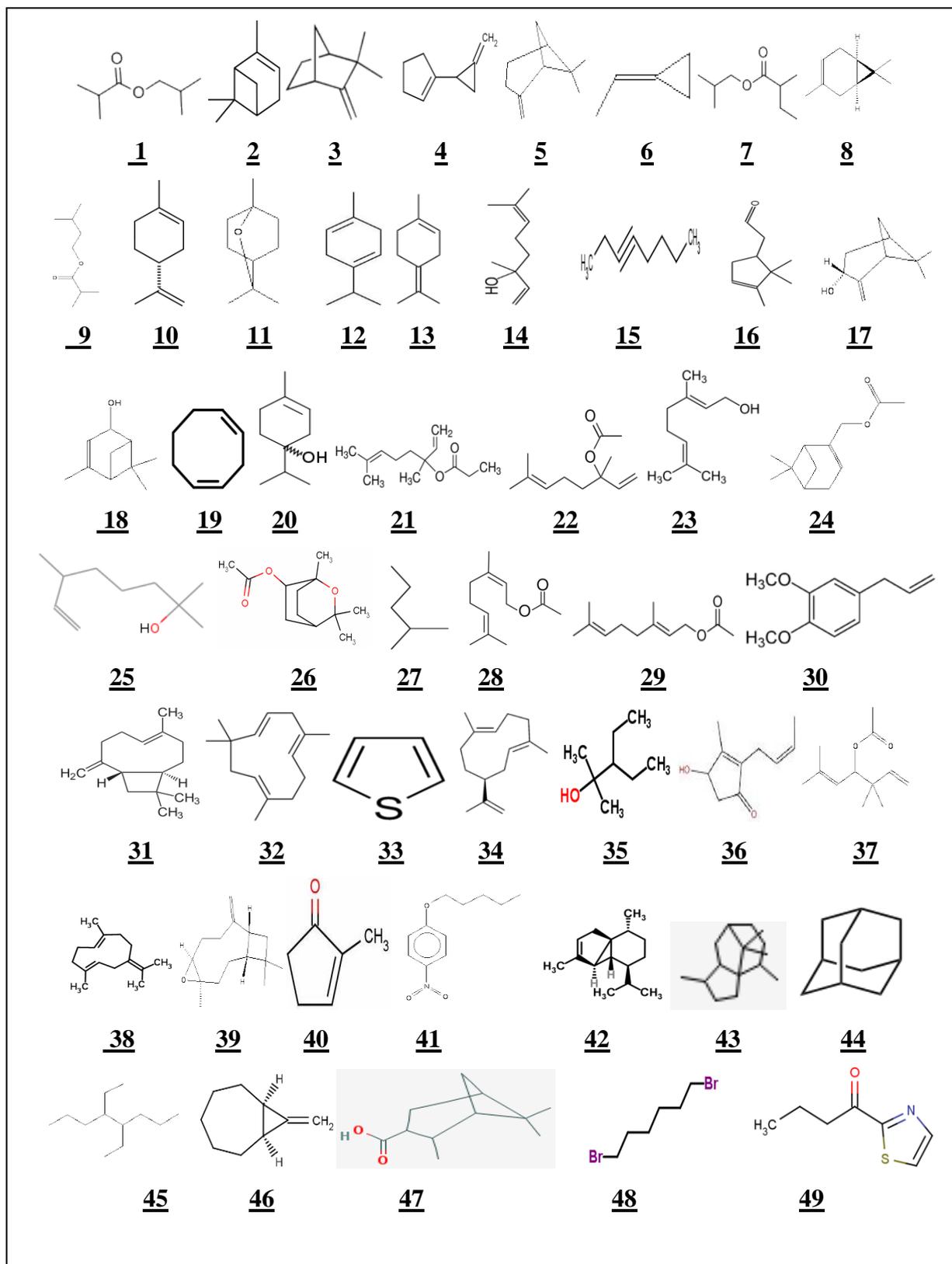


Figure (14) : Structure chimique des composés identifiés dans l'HE des feuilles de *M.communis*

Résultats et discussion

Tableau (26) : Composition chimique de l'HE des fleurs de *Myrtus communis*

Pic	Composé	TR(min)	(%)	IR	M (g/mole)	Formule
1	Isobutyl isobutyrate	7.969	0.06	808	144.21	C ₈ H ₁₆ O ₂
2	Alpha-thujene	8.337	0.30	869	136.23	C ₁₀ H ₁₆
3	Alpha-pinene	8.639	48.94	919	136.23	C ₁₀ H ₁₆
4	Beta-pinene	8.923	0.57	966	136.23	C ₁₀ H ₁₆
5	1-allyltricyclo [4.1.0(2,7)] heptane	9.092	0.06	994	134.21	C ₁₀ H ₁₄
6	Ocimene	10.252	0.15	1186	136.23	C ₁₀ H ₁₆
7	Alpha-phellandrene	10.621	0.38	1247	136.24	C ₁₀ H ₁₆
8	Delta-3-carene	10.784	0.48	1274	136.23	C ₁₀ H ₁₆
9	Alpha-terpinene	11.020	1.76	1313	136.23	C ₁₀ H ₁₆
10	1,8-cineole	11.503	28.3	1393	154.24	C ₁₀ H ₁₈ O
11	Gamma-terpinene	12.301	0.65	1525	136.23	C ₁₀ H ₁₆
12	Alpha-terpinolene	13.183	0.75	1671	136.23	C ₁₀ H ₁₆
13	Guajol	13.527	0.04	1728	124.13	C ₇ H ₈ O ₂
14	Linalol	13.654	2.37	1749	154.24	C ₁₀ H ₁₈ O
15	α-Campholenal	14.319	0.09	1859	152.23	C ₁₀ H ₁₆ O
16	2,5-octadiene	14.754	0.05	1931	110.19	C ₈ H ₁₄
17	2-Methyl-1,3-pentadiene	14.814	0.06	1941	82.14	C ₆ H ₁₀
18	Alpha-phellandren-8-ol	15.678	0.06	2084	152.23	C ₁₀ H ₁₆ O
19	4-terpineol	15.908	0.22	2122	154.24	C ₁₀ H ₁₈ O
20	Alpha-Terpineol	16.379	2.02	2200	154.25	C ₁₀ H ₁₈ O
21	Cyclohexene	17.364	0.07	2363	82,143	C ₆ H ₁₀
22	Carvon	17.799	0.43	2435	150.21	C ₁₀ H ₁₄ O
23	Linalyl acetate	18.016	0.40	2471	196.29	C ₁₂ H ₂₀ O ₂
24	Geraniol	18.131	0.60	2490	154.24	C ₁₀ H ₁₈ O
25	2-hendecanone	19.110	0.11	2652	170.29	C ₁₁ H ₂₂ O
26	S-cbz-cysteine	19.243	0.06	2674	178.22	C ₁₁ H ₁₄ O ₂
27	O-Acetyl-p-cresol	19.932	0.22	2788	150.17	C ₉ H ₁₀ O ₂
28	Exo-2-hydroxycineole acetate	20.367	0.11	2860	212.28	C ₁₂ H ₂₀ O ₃
29	2,4-Dimethyl-2,4-hexadiene	20.790	0.06	2930	110.19	C ₈ H ₁₄
30	Eugenol	21.001	2.91	2965	164.20	C ₁₀ H ₁₂ O ₂
31	Geranyl acetate	21.503	2.65	3048	196.29	C ₁₂ H ₂₀ O ₂
32	2- Phenylbutyric acid	21.617	0.11	3067	164.20	C ₁₀ H ₁₂ O ₂
33	Thymoquinon	21.738	0.12	3087	164.20	C ₁₀ H ₁₂ O ₂
34	Methyleugenol	22.137	1.40	3153	178.22	C ₁₁ H ₁₄ O ₂
35	Beta-caryophyllene	22.451	0.65	3205	204.36	C ₁₅ H ₂₄
36	p-Ethoxyanisole	22.929	0.19	3284	152.19	C ₉ H ₁₂ O ₂
37	Alpha-humulene	23.321	0.17	3349	204.35	C ₁₅ H ₂₄
38	Germacrene D	24.004	0.09	3462	204.35	C ₁₅ H ₂₄
39	Aromadendrene	24.149	0.12	3486	204.35	C ₁₅ H ₂₄
40	Ledene	24.367	0.12	3522	204.35	C ₁₅ H ₂₄
41	Nerol	24.693	0.05	3576	154.24	C ₁₀ H ₁₈ O
42	Methylxanthine	24.916	0.26	3613	166.13	C ₆ H ₆ N ₄ O ₂
43	Mayurone	25.478	0.14	3706	204.308	C ₁₄ H ₂₀ O
44	1-{2-[3-(2-Acetyloxiran-2-yl)-1,1dimethyl propyl]cycloprop-2-enyl}ethanone	25.738	0.03	3749	236.30	C ₁₄ H ₂₀ O ₃
45	Beta-selinene	25.841	0.62	3766	204.18	C ₁₅ H ₂₄
46	Caryophyllene oxide	26.481	0.66	3872	220.35	C ₁₅ H ₂₄ O
47	2-Methyl-2 cyclopentenone	27.104	0.22	3975	96.13	C ₆ H ₈ O
48	4,6-Dimethyl-2-amino-1,3-diazine	27.230	0.15	3996	123.15	C ₆ H ₉ N ₃
49	1,4-Dihydrophenanthrene	27.412	0.18	4026	180.24	C ₁₄ H ₁₂
50	Isolimonene	28.191	0.18	4155	136.23	C ₁₀ H ₂₄
51	N-acetylpiperidone	29.490	0.30	4370	141.17	C ₇ H ₁₁ NO ₂
52	2-Nitro-1-decen-4-yne	29.744	0.07	4412	181.23	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂
53	Aromadendrene oxide-(1)	30.705	0.15	4571	220.35	C ₁₅ H ₂₄ O
54	2-Butanoylthiazole	31.538	0.06	4709	155.21	C ₇ H ₉ NOS
Rendement des composés majoritaires (>1%)			89,65			
Rendement des composés minoritaires (<1%)			10,35			

Résultats et discussion

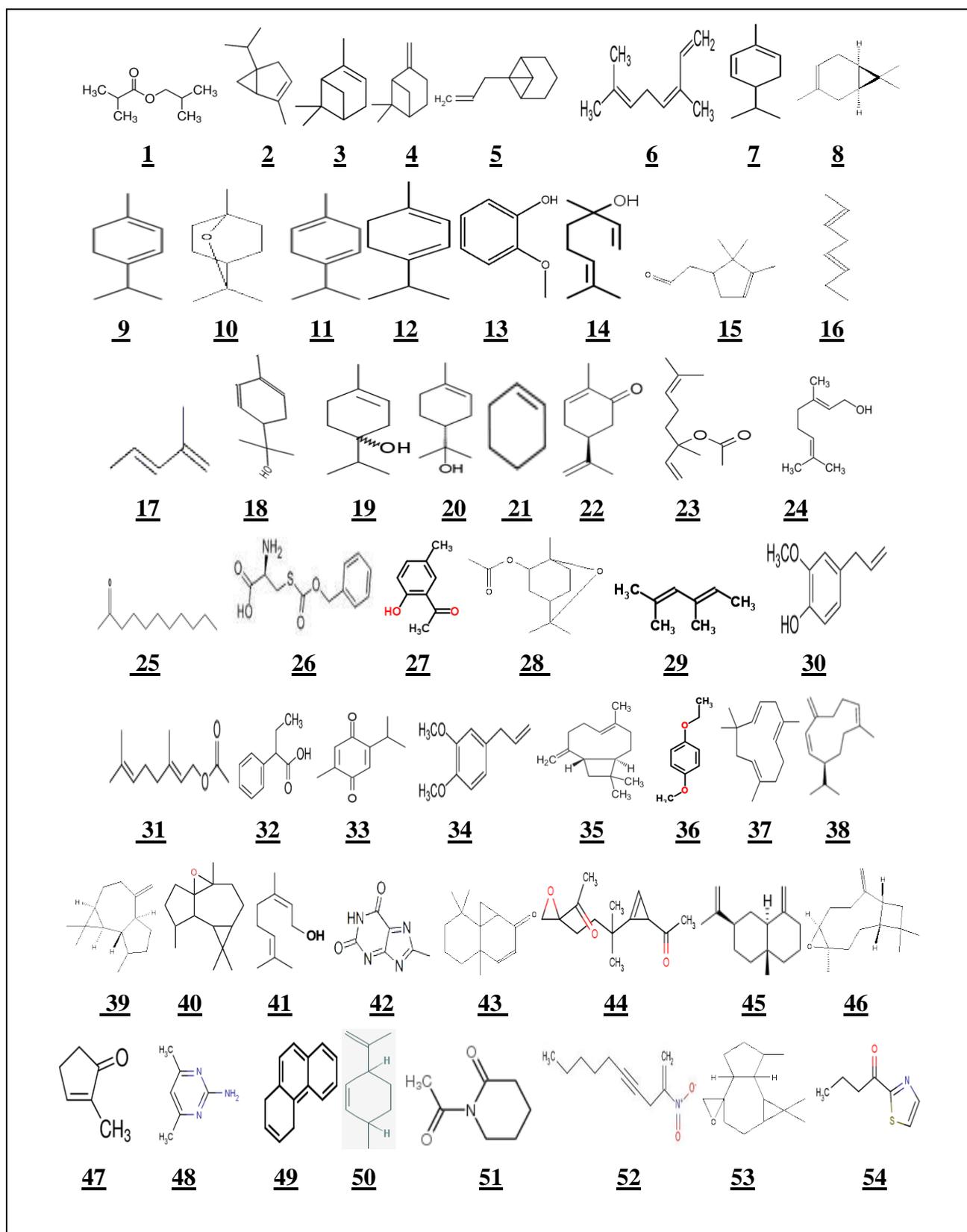


Figure (15) : Structure chimique des composés identifiés dans l'HE des fleurs de *M. communis*

Résultats et discussion

Par conséquent, l' α -pinène a été signalé comme composant majoritaire dans l'huile essentielle de *M. communis* en province du Liban, France, Serbie et Albanie ainsi que des espèces d'Algérie, Iran, Italie et celles de la Tunisie (**Figure 13**). L'huile essentielle de Famagouste, localité au nord de Chypre est exempte de ce composé [65]. En plus, des travaux antérieurs ont montré que l'HE tunisienne possède le chémotype alpha-pinene détecté irrégulièrement dans deux variétés de *M. communis* durant les trois stades de développement : stade végétatif, de la floraison et de la fructification. D'autres composants majoritaires sont présents comme le 1,8-cineole, le limonene et le linalool dont les proportions sont différentes ; cette variabilité est due aux comportements physiologiques de la plante induits par des facteurs biotiques et abiotiques [54]. En accord avec une analyse par CPG/ms d'un autre échantillon d'HE isolé à partir de feuilles jeunes de myrte de Tunisie, 36 constituants sont caractérisés. Ils sont représentés par l' α -pinene (34%) et le 1,8-cinéole (23.2%) dominant l'hierarchie de la composition chimique [47].

Plusieurs auteurs ont suggéré que certains composés tels que l' α -pinene, le camphene, l'1,8-cinéole et le géraniol peuvent être considérés comme des marqueurs régionaux. Ces composés sont capables de faciliter la recherche de l'amélioration de l'espèce par des études sur le polymorphisme isoenzymatique à cause de la présence d'une corrélation entre la variation de ces composants et la distribution d'allèles particuliers qui est due à des paramètres enzymatiques différents ce qui induit le choix des génotypes et l'élaboration des stratégies de la conservation [48]. En parallèle, il est possible d'en déduire que la forte variabilité de la composition des HE de myrte ne soit pas forcément due à l'origine géographique de la plante et des conditions environnementales mais aussi à la variété et les facteurs génétiques [61].

Les huiles essentielles dominées par le 1,8-cinéole ont été trouvées ; au Maroc, Egypte et en Croatie (**Figure 13**). On note également l'absence du 1,8-cinéole dans l'huile essentielle originaire de l'Italie [61].

En agrément avec nos résultats, des travaux tunisiens ont montré que l'HE de myrte est dominée par l' α -pinene, le 1,8-cinéole et le limonene [55]. Ils ont identifié aussi 39 composants presque identiques (ou proches) en composition chimique de l'HE d'Italie [109]. Curini et al (2003) ont analysé la composition chimique de l'HE de *M. communis* provenant de la France, ils ont identifié 14 composants avec une prépondérance d' α -pinène et 1,8-cinéole représentant approximativement 86% [63].

Nos résultats concernant le profil chimique de l'huile concordent avec ceux des chercheurs français qui ont montré que les essences des feuilles de myrte d'une province de la Corse sont caractérisées par l' α -pinène (52%) comme le composant le plus crucial majoritairement détecté [64].

Résultats et discussion

Nos valeurs obtenues corroborent avec celles rapportées dans une variété d'Iran. En effet, les mêmes composants majoritaires ont été identifiés dans l'HE d'une province d'Iran totalisant 32 composants avec des rendements différents pour l' α -pinene (29.1%), le limonene (21.5%), l'1,8-cinéole (17.9%) et le linalool (10.4%) [116]. Ces valeurs sont assez semblables avec celles obtenues pour l'HE provenant d'une autre région d'Iran dont les concentrations des composés dominants analogues sont définitivement distinctes [163].

Le myrtenyl acétate est identifié comme étant le constituant majoritaire dans l'huile essentielle originaire de l'Espagne (35.9%) [73]. Il est également l'un des composés principaux dans l'huile essentielle originaire de la Croatie (13.5%) et celle de Zakynthos en Grèce (38.7%) [72, 68]. D'après nos résultats, le myrtenyl acétate est abondant dans l'HE de feuilles et il est totalement absent dans celle des fleurs ; il n'a marqué sa présence dans notre huile que faiblement avec un pourcentage de (0.03%).

Des études algériennes ont comparé la composition chimique des huiles essentielles de *M. communis* obtenues par différentes méthodes d'extraction. Ils ont montré que l' α -pinene (44.62%) et le 1,8-cinéole (25.46%) sont prédominants dans les huiles essentielles de myrte algérien obtenues par hydrodistillation tandis que leurs valeurs étaient respectivement de 30.65% et 32.12% dans le cas d'extraction par micro-ondes [24]. Cependant, des études similaires en Iran ont montré que l'intervention de la méthode d'extraction n'a pas d'influence puisque la composition chimique d'HE hydrodistillée ne diffère pas grandement de celle isolée par la méthode de CO₂ supercritique dont le composé majoritaire est l' α -pinene avec des pourcentages de 42.8% et 31.8% respectivement [58].

Un cas exceptionnel a été marqué par la dominance de linalool (16.3%) dans l'HE provenant de la Turquie avec l'inexistence de limonène alors que l' α -pinene (6.4%) et le 1,8-cinéole (10.5%) sont représentés avec un taux élevé dans la même plante [66].

Nos résultats sont relativement différents de ceux obtenus par le groupe de Mahboubi (2010) [164], des HE de myrte provenant de la Turquie. La composition chimique de cette HE est constituée principalement de taux élevé de linalool et le linalyl acétate donnant ainsi un profil chimique différent carrément de cette espèce cultivée dans la zone méditerranéenne [164]. En revanche, l'HE de *M. communis* a été établie en Italie comme constituée approximativement de monoterpènes hydrocarbonés (58.3%), spécialement l' α -terpinene (51.8%); monoterpènes oxygénés (38.3%) représenté principalement par le 1,8-cinéole (35.6%); et des quantités infimes d'aldéhydes (1.5%) et sesquiterpènes hydrocarbonés (1.2%) mise à part l' α -pinene qu'était absent dans son profil chimique [77].

Résultats et discussion

En ce qui concerne l'HE de myrte en provenance du Portugal, elle ne présente pas du tout le même profil chimique. Cette huile contient en effet le limonène comme composé majoritaire (20%) suivi par l' α -pinène (10.4%), Ceci n'est pas le cas du 1,8-cinéole, lequel est en effet inexistant dans cette huile [69]. Ces derniers résultats sont assez similaires à ceux de l'HE d'Azerbaïdjan puisque le composé majoritaire est le limonène (23.4%) suivi du linalool (20.2%) [70].

En étudiant la composition chimique de douze populations naturelles de myrte provenant de différents sites de la Tunisie, les chercheurs ont confirmé la présence de 24 composants avec une différence remarquable dans les populations à cause probablement de la diversité génétique des espèces [48]. En parallèle, un autre échantillon de myrte tunisien est constitué majoritairement de 1,8-cinéole (61%) et d' α -pinène (23.7%) mais il est exempt de myrtenal ou myrtenyl acétate tandis que l' α -terpineol, le geranyl acétate et le linalool ne sont représentés qu'à des taux faibles (3.3%, 1.9% et 1.7%) respectivement [165].

D'après ces résultats, on remarque que la composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de l'espèce *M. communis* cultivée à Annaba est différente de celle obtenue dans de nombreux travaux dans les différentes régions du monde, avec une prédominance des composés monoterpéniques dans la plupart des cas mais à des proportions différentes.

Cette différence de composition est due probablement à diverses conditions notamment l'environnement, le génotype, l'origine géographique, la période de récolte, le lieu de séchage, la température et la durée de séchage, les parasites et les méthodes d'extraction [111]. Selon Senatore et al (2000), les variations rencontrées habituellement dans la composition chimique des HE, des points de vue qualitative et quantitative, peuvent dépendre de l'un ou de la combinaison des facteurs: le patrimoine génétique, l'âge, l'environnement de la plante et la présence de chémotype [111]. L'espèce *M. communis* est une plante médicinale active, sa composition chimique est tout à fait différente des autres espèces. Dans la même espèce, le contenu biochimique de l'huile essentielle trouvé dans les fleurs, la tige ou les feuilles est différent de manière significative selon où et dans quelles conditions la plante a fait sa croissance. La présence et la concentration de certains constituants chimiques fluctuent également selon la saison, la géographie, la température et les facteurs de l'environnement [166].

3.1.1.1. Influence de la composition du sol

L'analyse du sol et de l'eau de la station où le myrte utilisé pousse spontanément durant cette saison (fructification : Novembre 2013) montrent une diversité de la composition chimique du site d'échantillonnage de cette région (Annaba). Après l'enregistrement des résultats, une description des

Résultats et discussion

paramètres chimiques (pH, conductivité) ainsi que le taux d'humidité, de la matière organique et de la matière minérale sont rapportée dans le **tableau (27)**.

Tableau (27) : Paramètres physicochimiques du sol et de l'eau de la zone de prélèvement

Paramètres	N°	Annaba	
		Sol	Eau
pH	1	6,74	7,22
	2	6,61	7,24
	3	6,60	7,10
		6,65±0,075	7,18±0,075
Conductivité	1	107	485
	2	102	479
	3	106	484
		105±2,64	482,67±3,21
H%	1	2,8	99,92
	2	0,01	99,88
	3	0,01	99,93
		0,94±1,61	99,91±0,026
MO%	1	7,82	0,00
	2	9,8	0,00
	3	10,34	0,00
		9,32±1,32	0,00

Les résultats obtenus après analyse granulométrique de sédiment prélevé montrent que ce sol est constitué de : 58.3% de sable et 41.7% de boue qui est constitué généralement d'argile (1%) et limon (0.9%) (**Tableau 28**). Le sol est acide et il ne réagit pas avec HCl, ce sol est donc siliceux.

Tableau (28) : Analyse granulométrique du sol prélevé à l'Est d'Annaba

Prélèvements	Prises	Masse (g)	Composition de sol	Rendements (%)
Prélèvement 1	P1	63.92		
	P2	63.83	Limon	0.9
	P3	0.09		
Prélèvement 2	P1	73.84		
	P2	73.74	Argile	1
	P3	0.1		
Prélèvement 3	P1	75.5		
	P2	70.12	Sable	58.3
	P3	5.83		

Résultats et discussion

Le type de sol est considéré comme un paramètre important dans la variabilité de la composition des huiles essentielles. Cette hypothèse a été confirmée par des chercheurs italiens en faisant la comparaison entre la composition des huiles essentielles des plantes d'espèce *M. communis* cultivées en sols siliceux et calcaireux de deux localités différentes [61]. En effet, les différences en composition laissent présager l'existence de polymorphisme chimique pour les huiles essentielles. A titre confirmatif, il serait nécessaire de cultiver ces plantes au chémotypes différents dans les mêmes conditions environnementales afin de comparer leur composition [167].

Cette étude nous a permis de réaliser une analyse du sol ainsi que de l'eau du site d'échantillonnage de notre plante, le myrte était en plein stade de fructification. D'après les résultats de la granulométrie, le sol a une composition chimique diversifiée qui correspond à un sol sableux et siliceux. Nos résultats sont différents de ceux obtenus par Flamini et al, (2004) qui ont examiné la composition chimique des huiles essentielles de myrte d'un sol siliceux en Italie, dominée par le linalool, le linalyl acetate et le trans-myrtanol acetate [61]. En effet, nos feuilles de myrte cultivées en sol siliceux sont caractérisées par un profil chimique distinct et présentant l' α -pinene et l'1,8-cinéole comme composants majoritaires. Ces derniers ont été signalés comme constituants dominants dans l'HE de myrte de Tunisie, cultivé en sol calcaireux [54].

Tableau (29): Distribution des composants majoritaires de l'HE des feuilles de *M. communis* selon le type du sol

Pays	Algérie	Italie [61]	Italie [61]	Tunisie [54]
Type du sol	Sol siliceux	Sol siliceux	Sol calcaireux	Sol calcaireux
Composants majeurs	- α -pinene - 1,8-cineole	- Linalool - Linalyl acetate - Trans-myrtanol acetate	- Limonene - α -pinene	- α -pinene - 1,8-cineole

La nature d'un sol a certainement une influence sur la vie d'une plante. Cependant, avant d'entreprendre une telle démarche, il serait intéressant d'étudier aussi d'autres facteurs (génotype et conditions climatiques).

3.1.2. Composition chimique de l'extrait éthéré de *G. alypum*

Après analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/ms), 31 composés ont été identifiés dans l'extrait d'éther de pétrole isolé des feuilles de *G. alypum*. Les résultats de l'analyse de la composition chimique sont obtenus par comparaison des données de la masse des spectres et des temps de rétention. Ils sont résumés dans le **tableau (30)**.

Résultats et discussion

L'analyse chimique fait ressortir un nombre déterminé de constituants majoritaires (>2%) pour la fraction d'éther de pétrole des feuilles de *G.alypum* représentant 82,36%.

La **figure (19)** donne une distribution des différents composés majoritaires identifiés et contenus dans l'extrait d'éther de pétrole, suivant les proportions nous pouvons distinguer le(s) composés majoritaires, qui représentent le principe actif et donc nous pouvons déterminer le chémotype de cet extrait.

Le chémotype ou race chimique sera donc :

- L'extrait d'éther de pétrole issu de *G.alypum* est de chémotype : dihydroionone/xylene/eugenol, avec une dominance du premier composé (dihydroionone>xylene \approx eugenol).

Un nombre élevé des phénols et des éthers phénoliques sont produits dans la nature telle que le thymol, le safrole et l'eugénol qui sont présentés dans le marché comme des substances aromatiques. A titre d'exemple, l'eugénol est une molécule organique intéressante abondante dans nombreuses espèces ou il atteint 1,4 % dans l'huile essentielle de *Cinnamomum altissimum Kosterm* [158]. Cependant, *Syzygium aromaticum (Eugenia caryophyllata, Myrtacée)* est caractérisé aussi par un taux élevé d'eugénol, acétyleugénol, chavicol, acetyl salicylate et humulenes [156].

Ramdani et al (2014) ont détecté récemment des quantités infimes d'eugénol et d'isoeugénol dans l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation de feuilles de *Globularia alypum* cultivé dans deux localités algériennes différentes, Khenchla et Bentaleb dont les concentrations sont 3,06% et 0,22% respectivement et présentant une efficacité antibactérienne significative [157]. Le traitement des feuilles dans un soxhlet à l'aide d'éther de pétrole a donné un extrait constitué de stérols et d'un peu de flavonoïdes. Ces substances ont été caractérisées par des tests phytochimiques simples, basés sur la chromatographie sur couche mince [168]. La logique de fractionnement utilisée dans nos expériences comporte une hydrodistillation puis une extraction à l'éther de pétrole.

L'analyse chimique de notre extrait fait ressortir 31 composants inclut l'eugénol parmi les composants majoritaires. En effet, l'eugénol trouve souvent des applications dans de nombreux domaines. Il est suggéré comme médicament pour la prévention de l'endommagement du foie par les hépatotoxines [169]. Dans le cadre des activités antimicrobiennes, l'interaction synergique entre les antibiotiques et l'eugénol a été démontrée contre des bactéries Gram négatif et sa combinaison avec le cinnamaldehyde induit aussi un effet synergique contre les champignons du bois [94, 170]. La codominance de l'eugénol avec les autres composants majoritaires dans l'extrait d'éther de pétrole implique probablement une activité antioxydante. En effet, les composés de nature phénolique sont

Résultats et discussion

généralement doués d'activité biologique. La présence de substituants en ortho dans les flavonoïdes pourrait augmenter la capacité antioxydante de ces composés [171].

Tableau (30) : Composition chimique de l'extrait d'éther de pétrole des feuilles de *G.alypum*

Pic	Composé	TR (min)	(%)	M (g/mole)	Formule
1	Ethylbenzene	6.343	1.75	106,16	C ₈ H ₁₀
2	Xylene	6.567	11.72	106,16	C ₈ H ₁₀
3	D-Fenchone	12.923	1.83	152,23	C ₁₀ H ₁₆ O
4	Camphor	14.585	3.62	152,23	C ₁₀ H ₁₆ O
5	Alpha-terpineol	16.083	1.2	154,25	C ₁₀ H ₁₈ O
6	Neohexane	18.246	0.36	86,18	C ₆ H ₁₄
7	Alpha-fenchyl acetate	18.615	1.15	196,28	C ₁₂ H ₂₀ O ₂
8	n-Tetradecane	19.038	1.44	198,38	C ₁₄ H ₃₀
9	Sabinyl acetate	19.702	0.45	194,27	C ₁₂ H ₁₈ O ₂
10	1-Ethyl-1,5-cyclooctadiene	20.482	0.16	136,23	C ₁₀ H ₁₆
11	Eugenol	20.868	10.56	164,20	C ₁₀ H ₁₂ O ₂
12	Isoeugenol	20.971	0.87	164,20	C ₁₀ H ₁₂ O ₂
13	Diethylmethyl-borane	22.868	1.19	83,96	C ₅ H ₁₃ B
14	Eicosane	23.225	0.65	282,54	C ₂₀ H ₄₂
15	17-Pentatriacontene	23.829	0.60	490,93	C ₃₅ H ₇₀
16	Nonadecane	23.992	0.68	268,52	C ₁₉ H ₄₀
17	Pentadecane	24.119	2.13	212,41	C ₁₅ H ₃₂
18	n-Octadecyl chloride	24.318	4.79	288,94	C ₁₈ H ₃₇ Cl
19	Bicyclopentyl-2'-en-2-yl-dimethyl-amine	24.578	0.50	179,30	C ₁₂ H ₂₁ N
20	3-Cyclopentyl-pentane	25.219	0.63	140,26	C ₁₀ H ₂₀
21	Lignocerol	25.370	1.42	354,65	C ₂₄ H ₅₀ O
22	Viridiflorol	26.403	3.81	222,36	C ₁₅ H ₂₆ O
23	Cetane	26.475	2.94	226,44	C ₁₆ H ₃₄
24	Alpha-cadinol	26.711	4.92	222,37	C ₁₅ H ₂₆ O
25	Aromadendrene, (+)-	27.212	1.21	204,35	C ₁₅ H ₂₄
26	2,2-Dimethyl-6,10-dithiaspiro[4.5]decan-1-ol	27.309	1.13	218,07	C ₁₀ H ₁₈ OS ₂
27	Hexatriacontane	27.545	4.98	506,97	C ₃₆ H ₇₄
28	Neoclovene	28.360	1.32	204,35	C ₁₅ H ₂₄
29	Dehydroionone	31.907	18.13	190,28	C ₁₃ H ₁₈ O
30	Amphetamine oxime acetate	32.366	4.56	191,22	C ₁₁ H ₁₃ NO ₂
31	Phthalic acid	44.136	10.20	166,14	C ₈ H ₆ O ₄
Rendement des composés majoritaires (>2%)			82.36		
Rendement des composés minoritaires (<2%)			17.64		

Résultats et discussion

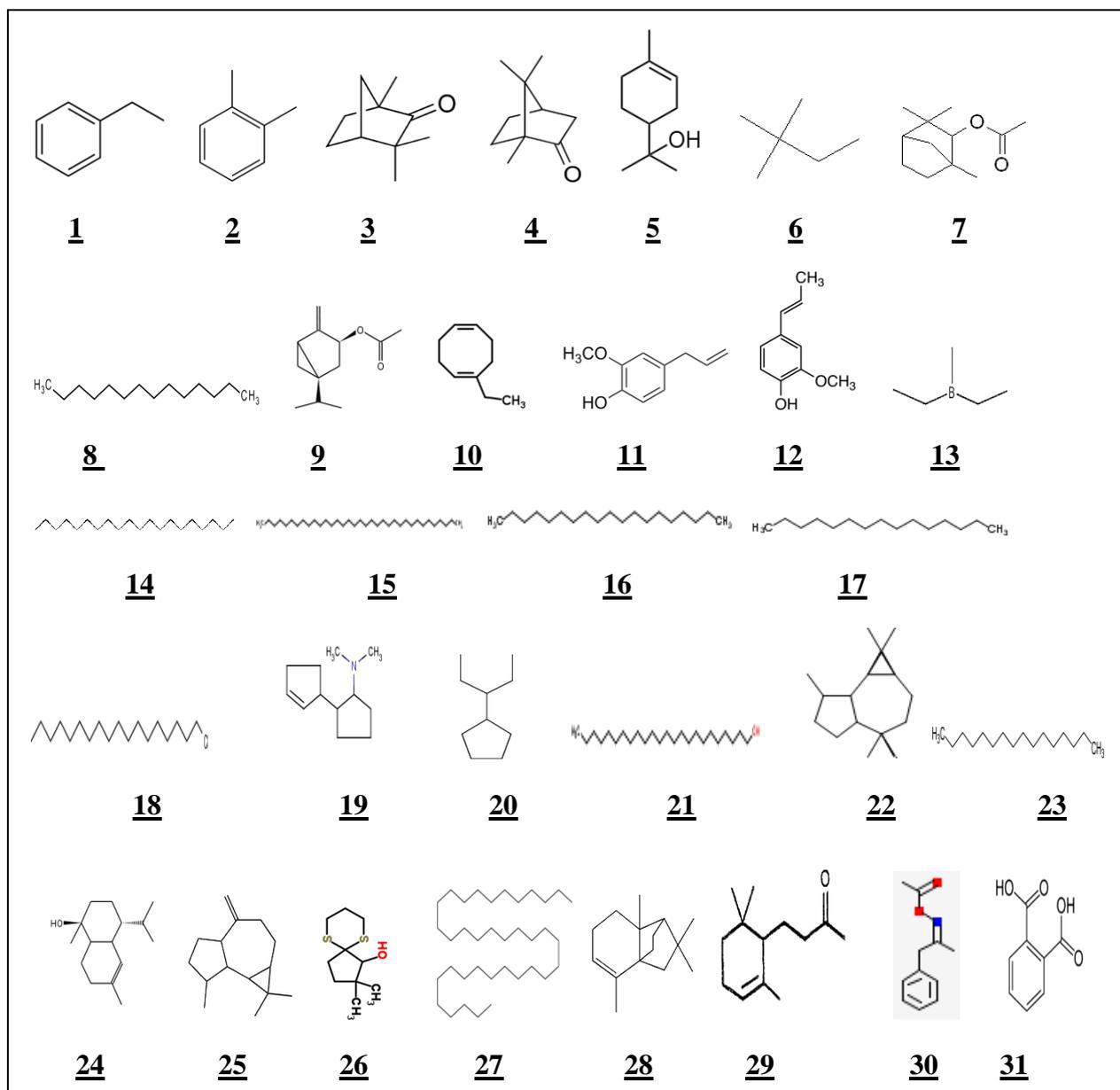


Figure (16) : Structure chimique des composés identifiés dans la fraction étherée des feuilles de *G. alypum*

Résultats et discussion

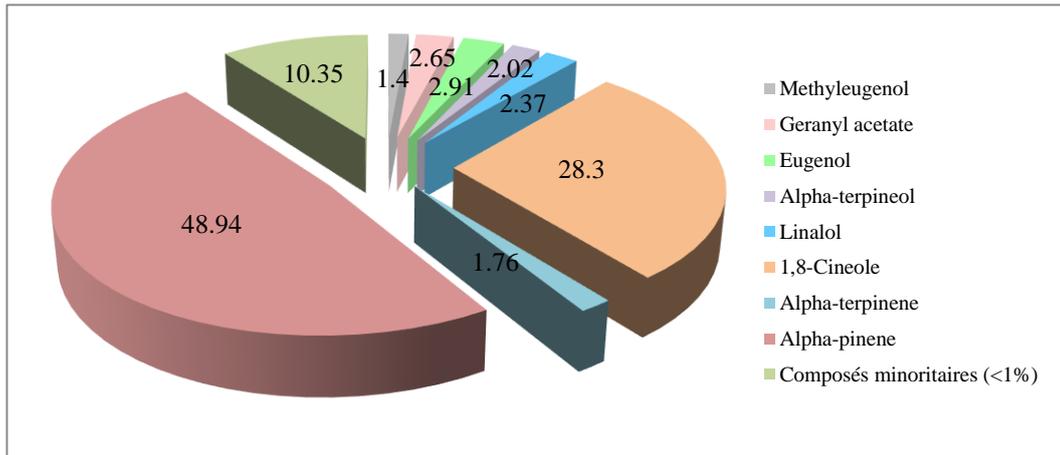


Figure (17) : Distribution en fonction du pourcentage des différents composants existant dans l'huile essentielle des fleurs de *M.communis*

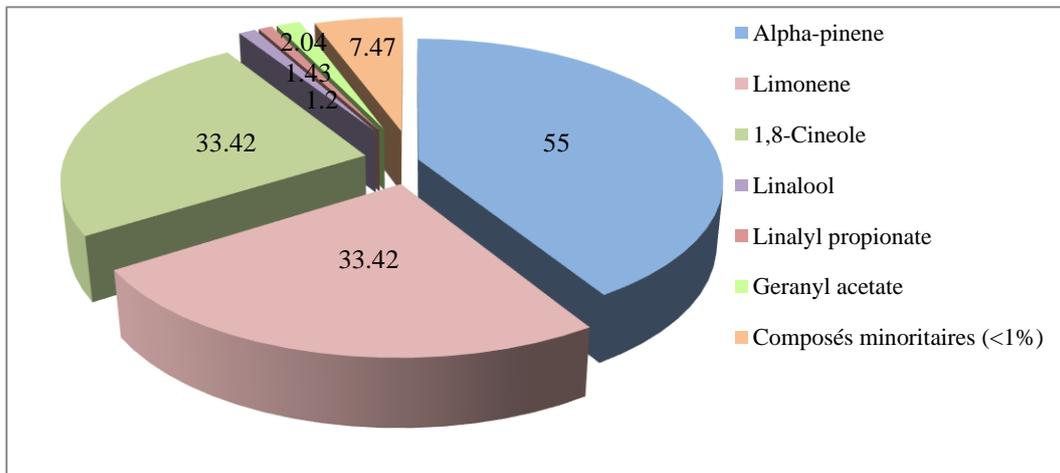


Figure (18) : Distribution en fonction du pourcentage des composants existant dans l'huile essentielle de feuilles de *M.communis*

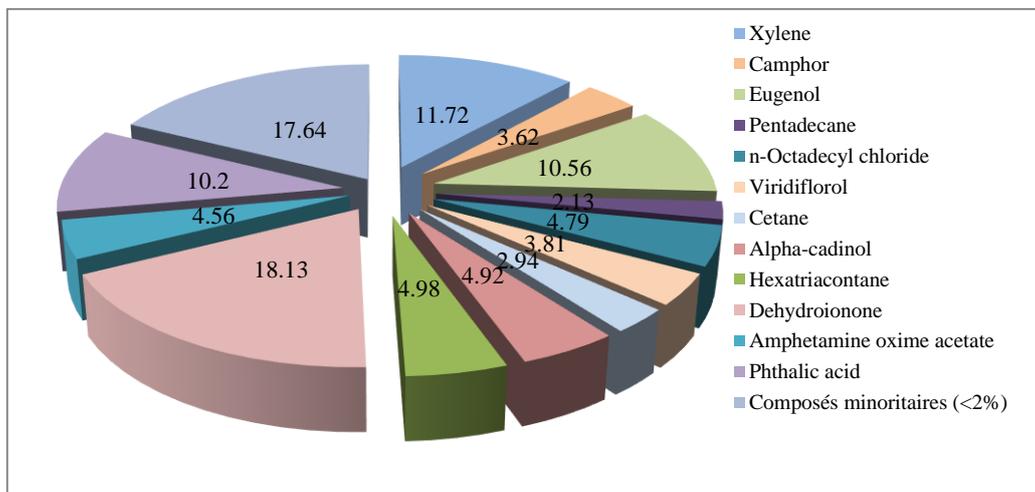


Figure (19) : Distribution en fonction du pourcentage des composants majoritaires existant dans l'extrait d'éther de pétrole de feuilles de *G.alypum*

Résultats et discussion

3.2. Analyse par MEB et EDX des cendres de *C.villosa*

Les observations MEB mettent en évidence la présence de nanoparticules agglomérées de taille d'environ 50 nm (A, B, C et D). Celles-ci sont en extrême surface et nous notons également la présence de grains anguleux qui sont dans une matrice organique (Figure 20).

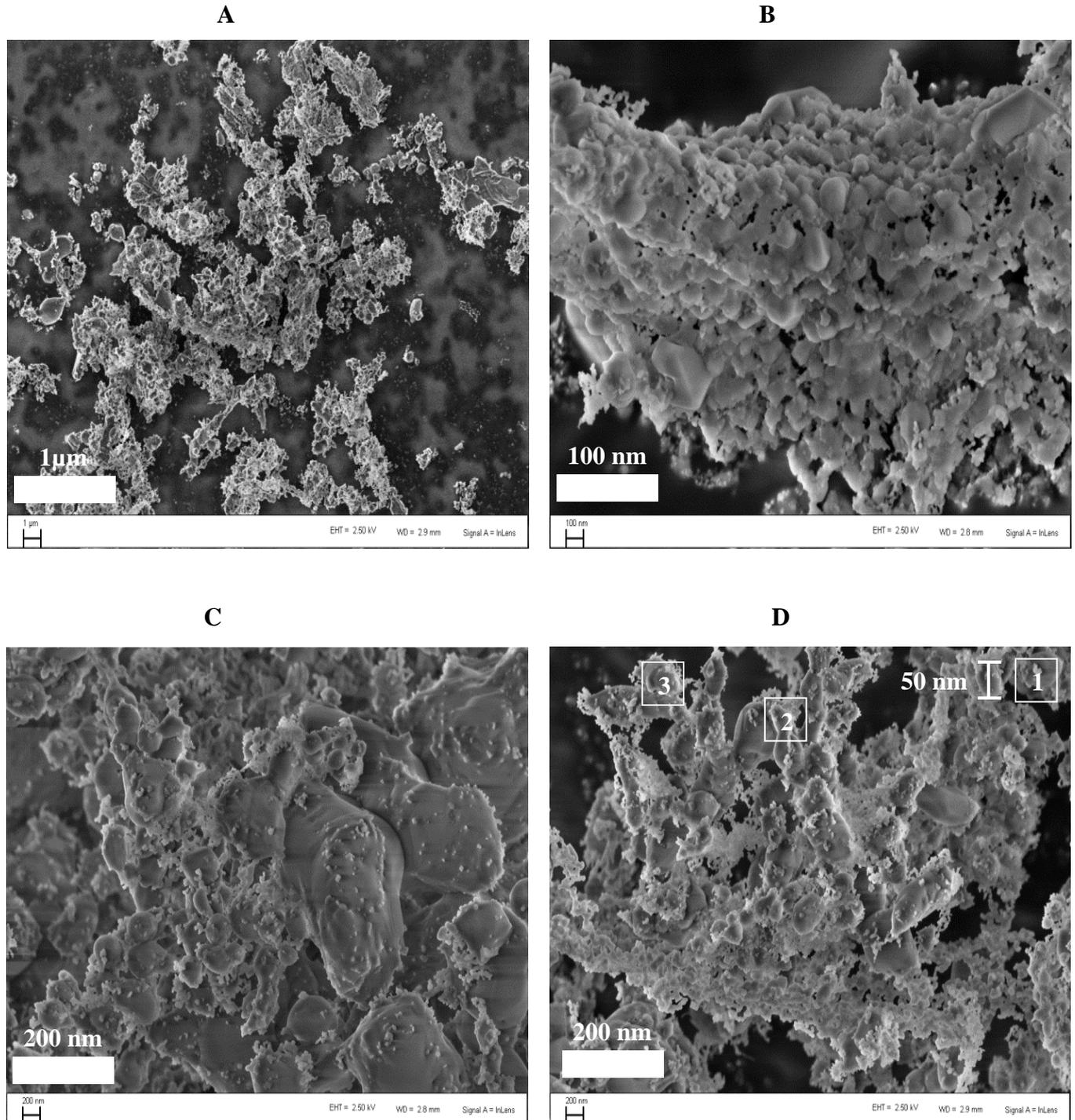


Figure (20): Observations des cendres de *C.villosa* par MEB (Microscope électronique à balayage), le numéro (1) représente les nanoparticules agglomérées (50nm), les numéros (2) et (3) représentent les grains anguleux

Résultats et discussion

Les analyses EDX mettent en évidence la présence de fer, de sodium, d'aluminium, de magnésium, de silicium, de potassium, de calcium, d'oxygène et de carbone (**Figure 21**). Nous notons également la présence de composés riche en calcium (**Figure 22**) et d'autres riches en silicium (**Figure 23**).

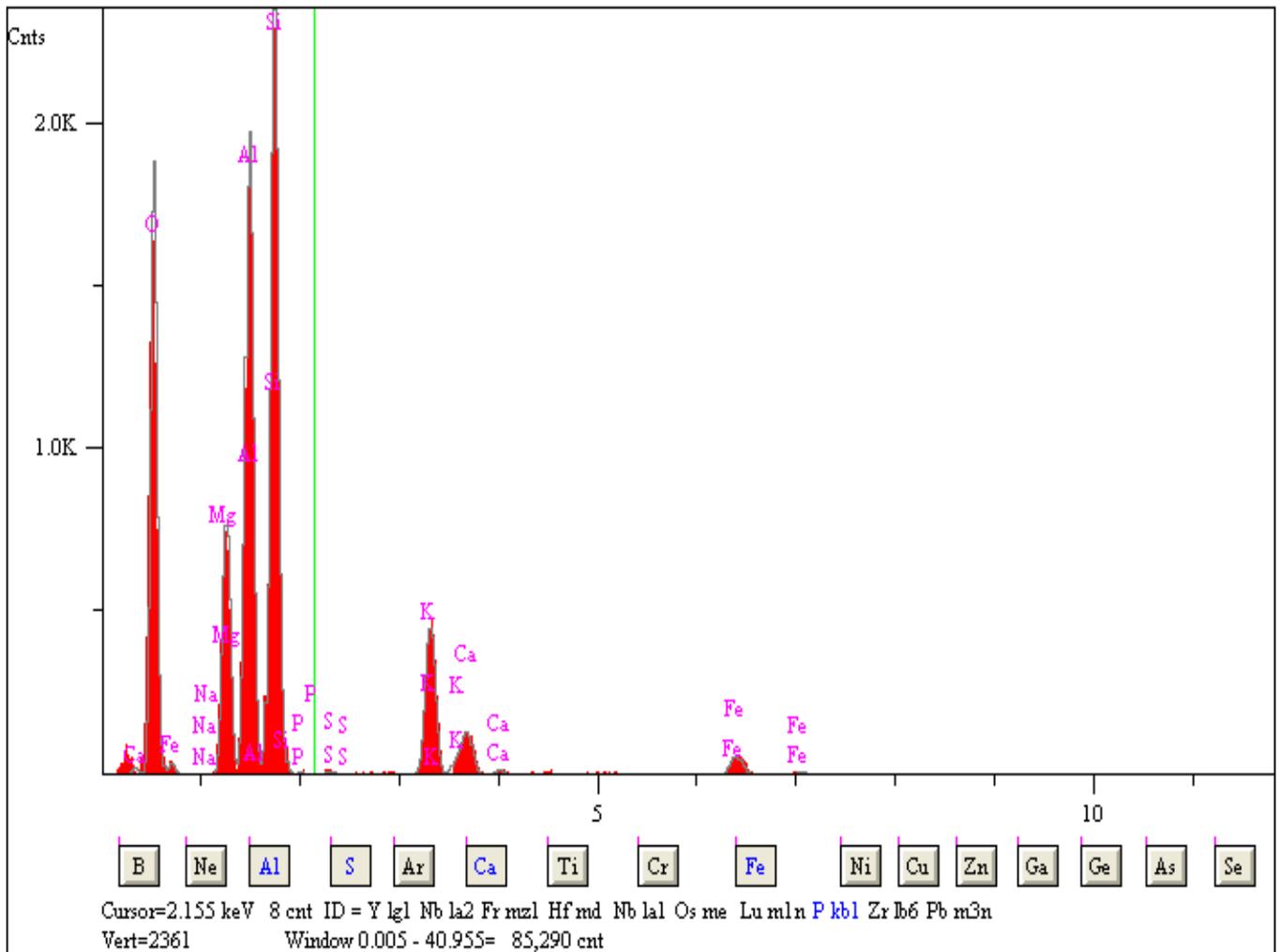


Figure (21): Analyse des cendres de *C.villosa* par EDX (Spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie)

Résultats et discussion

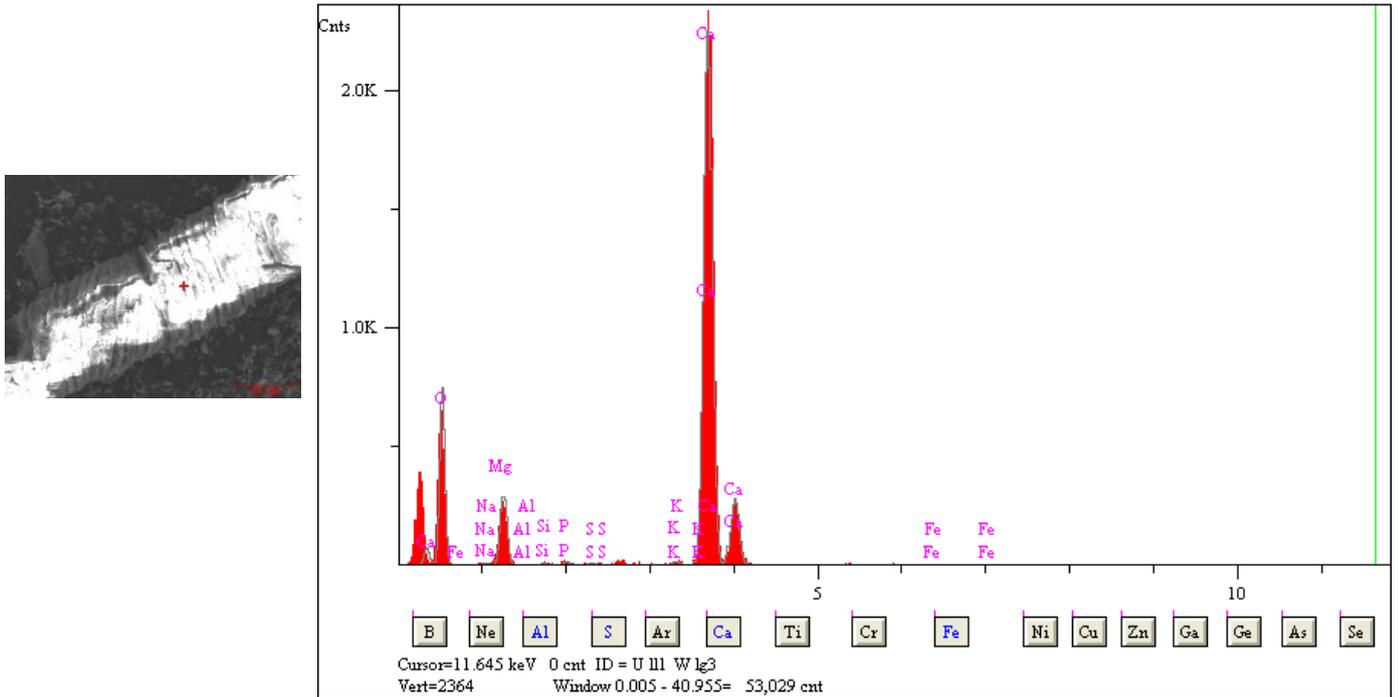


Figure (22):Composé riche en calcium

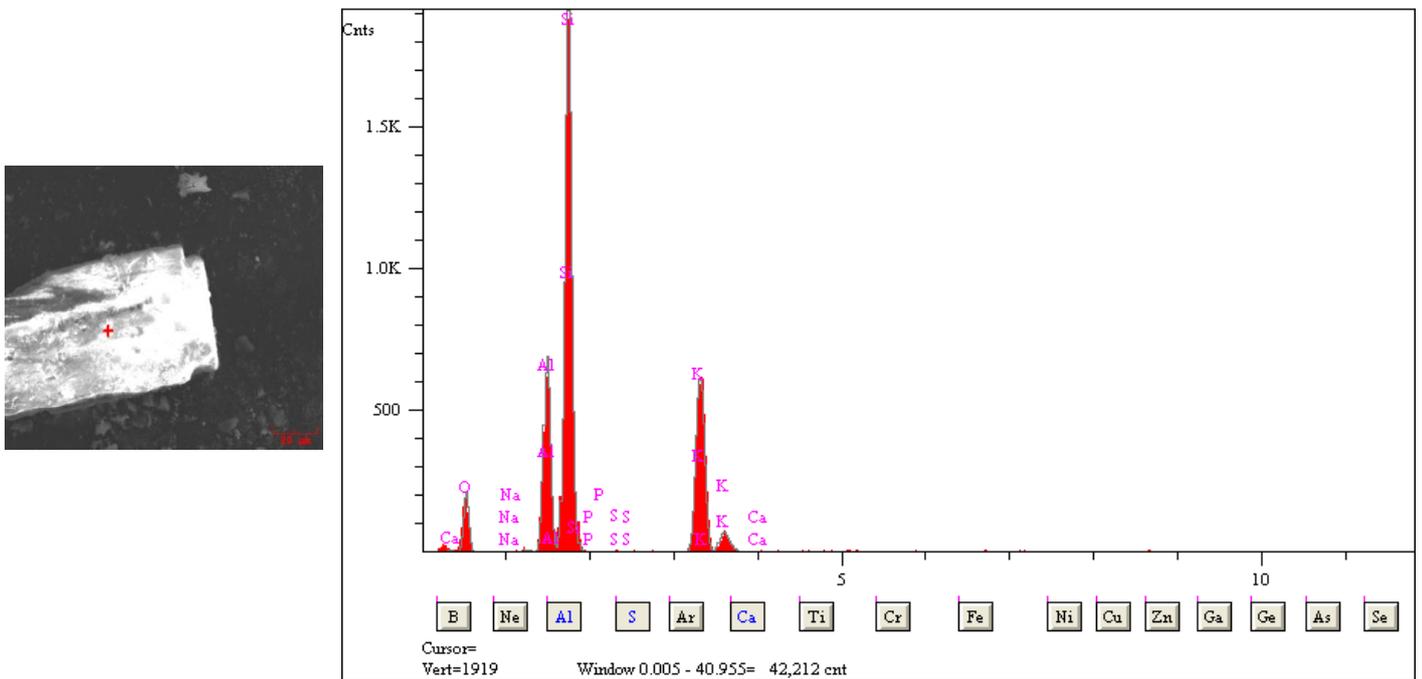


Figure (23): Composé riche en silicium

A partir des résultats d'analyses par MEB et EDX, on peut conclure que la racine de *C. villosa* est composée d'éléments minéraux ainsi que de nanoparticules probablement d'oxyde de fer.

Résultats et discussion

4. Applications

4.1. Activité antibactérienne des HE de *M. communis*

4.1.1. Purification des souches bactériennes

4.1.1.1. Répartition des entérobactéries récoltées

Les souches bactériennes récoltées ont été réparties selon le sexe et les tranches d'âge des patients (figures 24 et 25).

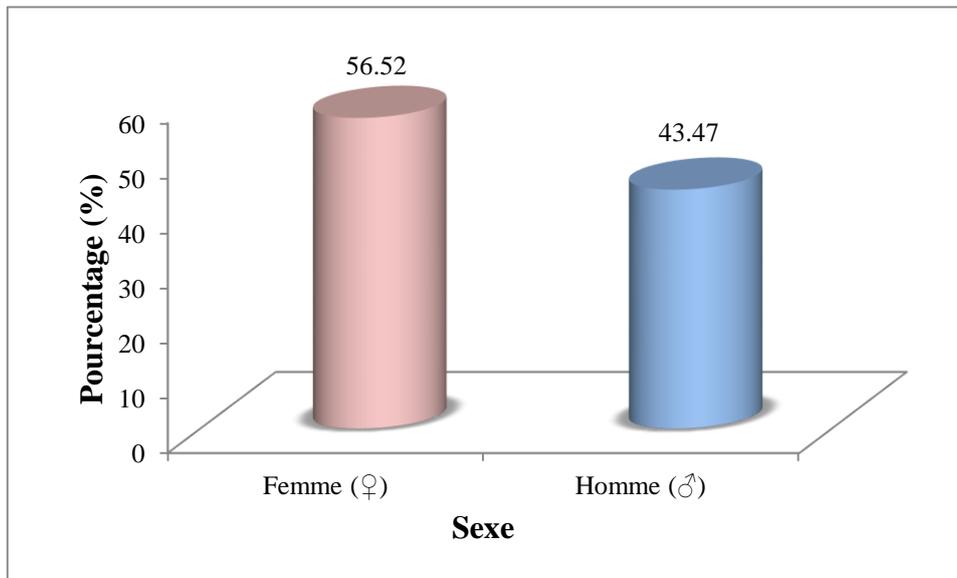


Figure (24) : Répartition des entérobactéries selon le sexe des patients.

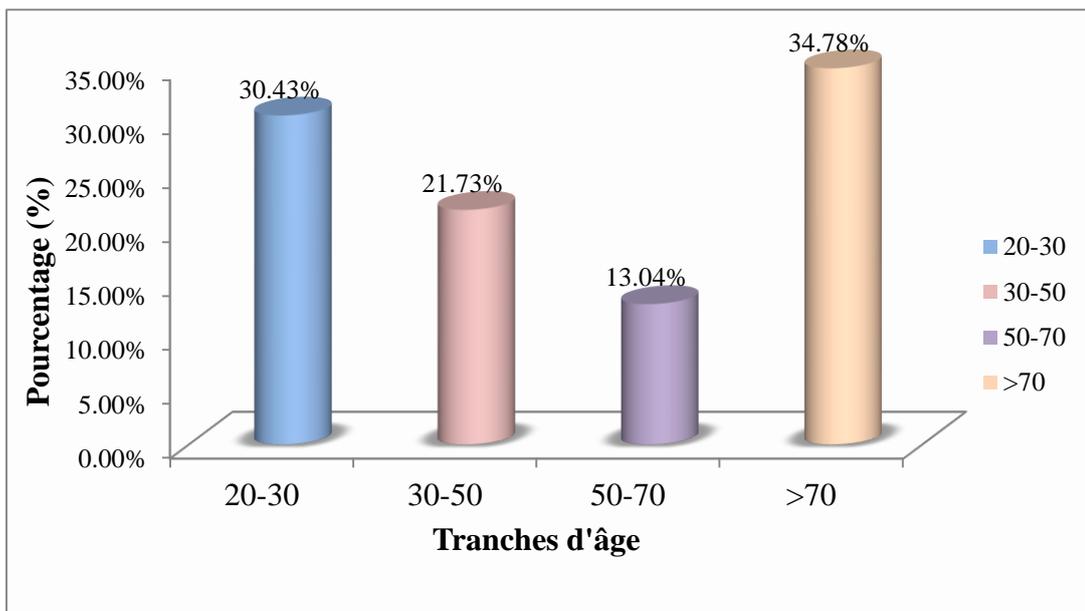


Figure (25) : Répartition des entérobactéries selon les tranches d'âge des patients.

Résultats et discussion

4.1.1.2. Caractères cultureux :

Les activités antibactériennes ont été déterminées sur des souches d'entérobactéries préconisées être pathogènes de l'Homme. Le **tableau (15)** regroupe l'ensemble des souches testées (voir matériel et méthodes).

Après 24h d'incubation à 37°C, l'examen macroscopique des colonies bactériennes sur gélose nutritive est consigné dans le **tableau (31)**.

Tableau (31): Caractères cultureux des souches bactériennes sur la gélose nutritive

Bactéries	Milieux de culture	Caractères des colonies			
		Couleur	Contour	Forme	Opacité
<i>Escherichia coli</i>	GN	Jaunâtres	Bord régulier	Lisse et arrondie	Translucide
<i>Acinetobacter baumannii</i>	GN	Jaunâtres	Bord régulier	Lisse et arrondie	Translucide
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	GN	Jaunâtres	Bord irrégulier	gluant et bombé	Translucide
<i>Enterobacter aerogenes</i>	GN	Jaunâtres	Bord régulier	Lisse et arrondie	Translucide
<i>Serratia marscecens</i>	GN	Roses	Bord régulier	Lisse et arrondie	Translucide
<i>Proteus mirabilis</i>	GN	Jaunâtres	Bord irrégulier	Lisse	Translucide
<i>Morganella morganii</i>	GN	Jaunâtres	Bord régulier	Lisse	Translucide
<i>Citrobacter freundii</i>	GN	Jaunâtres	Bord irrégulier	Lisse	Translucide
<i>Shigella sonnei</i>	GN	Jaunâtres	Bord régulier	Lisse arrondie	Translucide
<i>Salmonella typhimurium</i>	GN	Jaunâtres	Bord irrégulier	arrondie	Translucide

4.1.1.3. Observations microscopiques

Les résultats des observations microscopiques après coloration de Gram, représentant la forme, l'arrangement cellulaire, et le type de Gram des souches étudiées sont consignés dans le **tableau (32)**.

Tableau (32): Observation microscopique après coloration de Gram des souches bactériennes

Bactéries	Forme et regroupement	Couleur et type de Gram
<i>Escherichia coli</i>	Bacilles isolés	Rose : Gram négatif
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Bacilles en chainettes	Rose : Gram négatif
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Petits bacilles isolés	Rose : Gram négatif
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Bacilles isolés courts	Rose : Gram négatif
<i>Serratia marscecens</i>	Bacilles isolés droits	Rose : Gram négatif
<i>Proteus mirabilis</i>	Petits bacilles longs	Rose : Gram négatif
<i>Morganella morganii</i>	Bacilles isolés	Rose : Gram négatif
<i>Citrobacter freundii</i>	Bacilles petits et courts	Rose : Gram négatif
<i>Shigella sonnei</i>	Petits coccobacilles isolés	Rose : Gram négatif
<i>Salmonella typhimurium</i>	Bacilles regroupés en chainettes	Rose : Gram négatif

Résultats et discussion

4.1.2. Identification biochimique des souches bactériennes

Pour les tests préliminaires, seul le test catalase a été réalisé, les résultats montrent que les souches d'entérobactéries sont catalase positive.

Après 24h d'incubation à 37°C, l'examen des Api 20 E réalisés sur les entérobactéries est rapporté dans le **tableau (33)**.

Tableau (33) : Résultats des tests biochimiques d'identification par galeries Api 20 E des souches bactériennes étudiées

	ONPG	ADH	LDC	ODC	CTT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	IND	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
<i>EC</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-
<i>AB</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>KP</i>	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>KO</i>	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>EA</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>EI</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>ES</i>	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>EL</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-
<i>SM</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>SF</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>PM</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>PV</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>MM</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>CF</i>	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>CK</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>SS</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>ST</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
<i>S</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-

4.1.3. Antibiogramme

Les résultats de l'activité de 21 antibiotiques sélectionnés vis-à-vis de 20 entérobactéries sont présentés dans le tableau suivant :

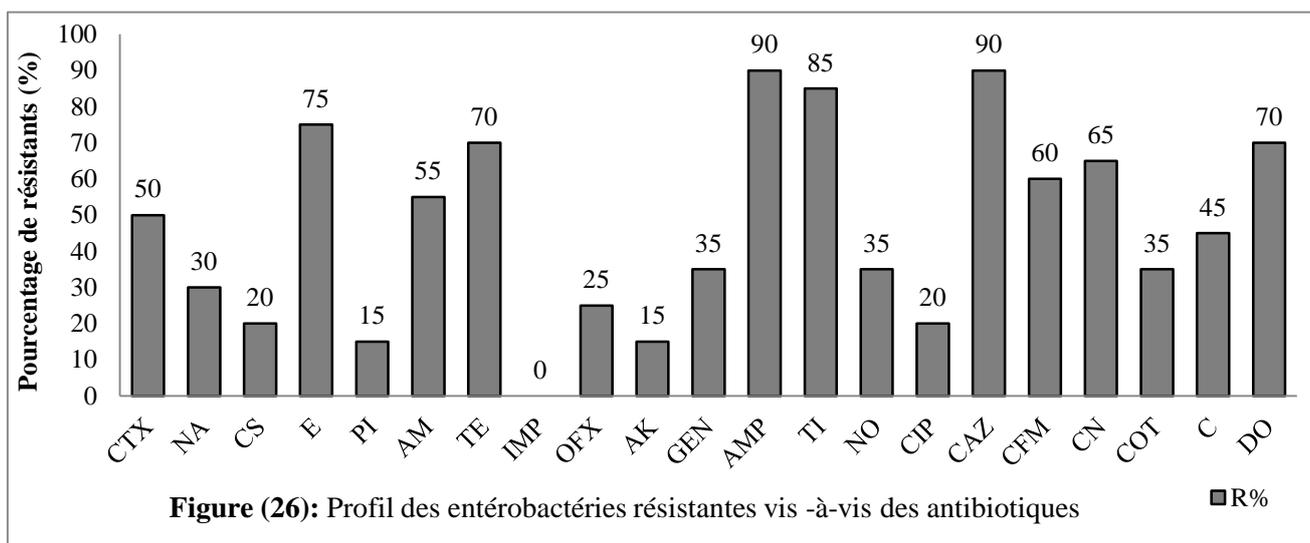
Résultats et discussion

Tableau (34) : Diamètres d'inhibition (mm) et phénotypes des souches bactériennes étudiées vis-à-vis des antibiotiques

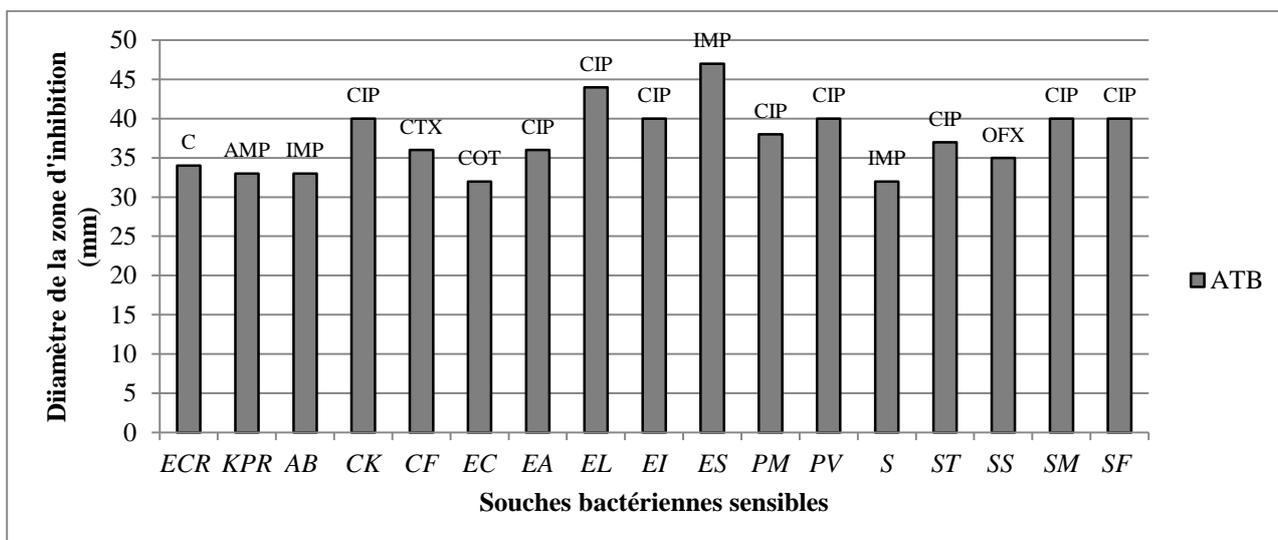
	CTX	NA	CS	E	PI	AM	TE	IMP	OEX	AK	GEN	AMP	TI	NO	CIP	CAZ	CFM	CN	COT	C	DO
ECR	29	31	18	18	29	16	20	33	30	30	30	05	25	30	20	10	19	19	31	34	26
	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S
KPR	20	21	20	08	19	05	15	33	18	28	19	21	05	15	21	05	08	05	20	13	14
	R	S	S	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R	I	R	R	R	R	S	R	R
AB	05	05	15	17	05	05	08	33	05	23	11	05	15	08	05	05	05	05	05	14	13
	R	R	S	I	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CK	30	29	16	13	30	25	06	38	16	24	20	20	09	30	40	14	26	16	05	28	07
	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S	I	R	S	S	R	S	I	R	S	R
CF	36	31	06	13	27	06	07	32	30	25	22	06	30	25	35	16	34	20	30	27	06
	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	I	S	R	S	S	S	S	R
EC	27	24	16	11	23	20	05	27	27	25	21	07	07	29	30	06	26	06	32	30	06
	S	S	S	R	S	I	R	S	S	S	S	R	R	I	S	R	S	R	S	S	R
EA	05	05	17	05	05	16	05	30	08	23	21	06	07	28	36	15	27	10	24	25	17
	R	R	S	R	R	I	R	S	R	S	S	R	R	I	S	R	S	R	S	S	I
EL	06	08	16	18	20	06	13	33	24	27	08	06	06	06	44	06	06	06	06	08	13
	R	R	S	I	S	R	R	S	I	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
EI	25	06	17	06	05	20	05	30	08	30	19	14	19	26	40	06	06	06	06	11	22
	S	R	S	R	R	I	R	S	R	S	S	R	R	I	S	R	R	R	R	R	S
ES	30	28	17	20	30	06	25	47	33	24	22	06	06	06	30	14	21	06	06	10	18
	S	S	S	I	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	I
KP	28	25	20	05	30	24	05	34	32	26	16	06	06	30	34	06	06	06	34	32	10
	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	I	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R
KO	30	05	20	10	20	30	21	25	30	28	21	07	06	30	30	12	25	06	30	30	08
	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	R	S	S	R
MM	14	05	20	10	10	06	40	40	36	06	06	07	06	25	27	06	06	24	35	28	08
	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	I	S	R	R	S	S	S	R
PM	36	30	05	07	30	30	05	32	30	24	17	06	06	24	38	19	32	20	34	27	08
	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	I	R	R	I	S	I	S	S	S	S	R
PV	20	23	25	25	28	06	08	32	34	07	07	06	06	06	40	10	20	06	06	13	08
	R	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
S	07	07	20	07	05	10	05	32	11	23	15	06	06	26	16	06	06	06	15	27	09
	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	I	R	R	R	R	I	S	R
ST	05	36	16	16	30	05	25	30	35	25	13	05	05	07	37	05	05	05	05	12	20
	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S
SS	33	30	20	05	28	08	30	32	35	22	20	07	07	27	30	15	23	06	16	16	20
	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	I	S	R	I	R	S	R	S
SM	30	25	06	15	30	20	06	35	30	27	26	06	27	29	40	19	25	16	33	30	19
	S	S	R	R	S	I	R	S	S	S	S	R	S	I	S	I	S	I	S	S	S
SF	14	23	08	13	30	06	08	30	32	07	07	06	06	06	40	10	19	06	06	10	06
	R	S	R	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R

Résultats et discussion

L'antibiogramme consiste à rechercher la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis des antibiotiques. Nous avons testé l'activité de 21 antibiotiques par la méthode standard des disques. Les mesures des diamètres de zones d'inhibition figurant dans le **tableau (34)** nous ont permis de classer les souches suivant l'antibiotique. La plupart des entérobactéries sont résistantes vis-à-vis des antibiotiques testés, La **figure (26)** montre le pourcentage des entérobactéries résistantes vis-à-vis des antibiotiques sélectionnés.



Les résultats de l'antibiogramme sont résumés dans le (**Tableau 34**), qui montre une forte activité (zone d'inhibition de 47 mm de diamètre) pour certains et une faible inhibition pour d'autres. L'ampicilline et la ceftazidime de troisième génération n'ont pas donné de bonnes zones d'inhibition avec les bactéries gram-négatif, globalement, elles ont révélé le plus haut niveau de résistants qui est de 90%.



Résultats et discussion

D'après les travaux antérieurs sur le comportement des entérobactéries vis-à-vis les antibiotiques, *Escherichia coli* montre une résistance au cefixime tandis que François et al (2003) ont détecté un effet antibactérien d'ampicilline sur la croissance de cette bactérie [172]. Pour la souche *Enterobacter aerogenes*, sa résistance aux nos ATB utilisés est de l'ordre de 60%, ce qui rapproche approximativement à celui d'autres recherches réalisées par Bryskier (1999) dont les mêmes activités antibactériennes des ATB ont été obtenues [173]. Cependant, un travail réalisé a confirmé la résistance de la bactérie *Serratia marcescens* vis-à-vis des ATB testés [173].

4.1.4. Activité antibactérienne des HE des feuilles et des fleurs de *M.communis*

Si ces huiles doivent être soumises aux essais biologiques, la toxicité du solvant peut également être critique même à l'état de traces, le solvant ne devrait pas empêcher la conduite du processus biologique. L'attention devrait également être prêtée aux interactions possibles entre le solvant et les corps dissous pendant que le solvant peut réagir avec certains composés pour produire des complexes ou causer la décomposition, la déshydratation, ou l'isomérisation de ces composés [174].

Le test préliminaire avec les solvants suivants : le tween 80, le méthanol, l'éthanol et le DMSO a été réalisé dans le but de choisir le solvant approprié ne présentant aucun effet apparent sur l'HE. D'après les résultats, on a constaté que le tween 80, le méthanol et l'éthanol engendrent une recristallisation de nos HE. C'est pour cela que nous avons employé la méthode qui consiste à additionner directement l'huile lors de la réalisation des tests antibactériens. Le DMSO a été retenu comme solvant de choix vue les résultats satisfaisants du test préliminaire de ce dernier et en plus il n'a aucun effet sur les bactéries testées.

La sensibilité des différentes souches vis-à-vis des HE étudiées est classée selon le diamètre d'inhibition d'après les critères suivants: résistantes (R) pour un diamètre d'inhibition (D) < 10 mm; sensibles (S) pour un diamètre d'inhibition > 10 mm [175].

Résultats et discussion

Tableau (35) : Diamètres d'inhibition (mm) et phénotypes des souches bactériennes testées par les HE de myrte

Souche	HE brute [10ul]				HE diluée [10ul]				MIC [HEB] (mg/ml)	
	Feuilles	R/S	Fleurs	R/S	Feuilles	R/S	Fleurs	R/S	Fleurs	Feuilles
<i>ECR</i>	25	S	23	S	09	R	15	S	2.5	0.6
<i>KPR</i>	09	R	10	I	07	R	09	R	2.5	2.5
<i>AB</i>	09	R	10	I	05	R	05	R	1.25	1.25
<i>CF</i>	09	R	11	S	05	R	05	R	2.5	2.5
<i>CK</i>	08	R	10	I	05	R	05	R	2.5	1.25
<i>EC</i>	35	S	25	S	10	I	10	I	1.25	0.6
<i>EA</i>	10	I	18	S	10	I	10	I	0.6	0.6
<i>EL</i>	10	I	08	R	07	R	05	R	1.25	1.25
<i>EI</i>	10	I	10	I	08	R	09	R	1.25	1.25
<i>ES</i>	10	I	10	I	07	R	09	R	1.25	1.25
<i>KP</i>	09	R	10	I	05	R	09	R	1.25	1.25
<i>KO</i>	10	I	20	S	05	R	16	S	2.5	2.5
<i>MM</i>	08	R	08	R	05	R	05	R	1.25	1.25
<i>PM</i>	09	R	19	S	05	R	06	R	2.5	2.5
<i>PV</i>	11	S	11	S	07	R	08	R	0.6	0.6
<i>S</i>	08	R	08	R	05	R	08	R	1.25	1.25
<i>ST</i>	10	I	09	R	09	R	05	R	1.25	1.25
<i>SS</i>	10	I	08	R	09	R	08	R	0.6	0.6
<i>SM</i>	09	R	20	S	05	R	08	R	1.25	1.25
<i>SF</i>	09	R	08	R	09	R	05	R	1.25	1.25
DMSO	-	R	-	R	-	R	-	R	-	-

Les effets antibactériens des huiles essentielles de *M.communis* ont été récemment rapportés [65, 76]. En plus, des recherches approfondies de leurs effets antimutagènes ont été réalisées [7]. Ces caractéristiques en font un modèle parfait pour notre étude qui a été réalisée pour déterminer l'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites des fleurs et des feuilles de myrte algérien contre des souches cliniques présentant une résistance primaire à certains antibiotiques. En général, la contamination microbienne induit la détérioration des aliments y compris les produits alimentaires de grande consommation en Algérie où la majorité des infections humaines est particulièrement provoquée par la consommation d'aliments contaminés notamment par *Salmonella sp.* et *Escherichia coli*. Elles représentent la plupart des bactéries Gram-négatif d'origine alimentaire qui sont souvent distribuées dans la nature ainsi que dans un grand nombre d'aliments en Algérie.

L'effet inhibiteur des huiles diluées sur la croissance microbienne varie d'un microorganisme à un autre [110]. Toutes nos huiles essentielles testées inhibent significativement la croissance de

Résultats et discussion

nombreuses souches bactériennes testées. En ce qui concerne la comparaison entre les effets des huiles diluées et non diluées, on remarque que l'effet inhibiteur des huiles diluées était modéré sur toutes les souches.

Les résultats de l'essai biologique sont résumés dans le **tableau (35)**, où il est évident que les huiles essentielles des feuilles ont montré une activité antibactérienne plus forte que les huiles obtenues à partir des fleurs, et les diamètres des zones d'inhibitions varient entre 08 -35 mm et 08-25 mm, respectivement. D'après cette technique, l'activité la plus élevée a été observée contre *E. coli* avec une zone d'inhibition (35 mm) pour les huiles essentielles brutes issues des feuilles. Les valeurs de CMI varient de 0,6 à 2,5 mg/ml, mais les tests de CMB indiquent un effet bactériostatique de nos huiles essentielles, ceci est démontré par la croissance remarquable qui s'est produite sur les boîtes.

Après incubation de la majorité des souches bactériennes testées, aucune zone n'a été observée autour des disques utilisant des HE diluées. L'HE des feuilles a montré l'activité antibactérienne la plus élevée par rapport aux HE des fleurs, notant qu'elle est sans activité sur trois souches à savoir *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* et *Salmonella sp.* Quelques zones d'inhibition faibles ont été enregistrées, toutes inférieures à 4 mm avec *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter koseri* et *Morganella morganii*.

Les HE des feuilles et des fleurs ont présenté une certaine activité modérée dont les diamètres d'inhibition n'ont pas dépassé 12 mm sur quelques souches bactériennes ciblées. Le pouvoir antibactérien de *M. communis* le plus élevé a été observé contre les souches d'*E. coli* dont la valeur du diamètre d'inhibition (35 mm) correspond à un effet bactéricide. On a remarqué aussi que *Morganella morganii*, *Serratia fonticola*, *Salmonella sp.* et *Shigella sonnei* se sont montrées insensibles à l'action des HE des fleurs.

En accord avec les études antérieures, les huiles essentielles de myrte provenant de l'Algérie et de la Tunisie sont caractérisées par les mêmes composants prédominants (l' α -pinène et le 1,8-cinéole) ou les tests de l'huile essentielle non diluée révèlent un effet bactéricide contre les souches d'*E. coli* [53]. Les huiles essentielles de myrte iranien ont montré une activité puissante contre la souche *E. coli*, alors que d'autres huiles essentielles de myrte provenant d'Egypte ne présentent aucune activité contre la même espèce [24, 115, 176]. En fait, *E. coli* est sensible à plusieurs huiles essentielles de certaines plantes, y compris la menthe poivrée, le thé, l'origan, la cannelle, la citronnelle, le thym, le romarin, la sarriette, l'eucalyptus [1]. En effet, de nombreux composés majeurs sont généralement bactéricides vis-à-vis d'*E. coli* comme le farnesol, le nérolidol, le carvacrol, le thymol et le menthol [1].

Résultats et discussion

La littérature fait état d'une seule étude sur *Enterobacter aerogenes*, elle indique qu'il n'y a pas d'impact antibactérien de l'HE de myrte provenant de la France sur cette souche [64].

En dehors de ces faits, les souches d'*E.coli* ont été modérément inhibées par toutes les huiles diluées, alors que *K. pneumoniae* était résistante. En revanche, ces résultats ne concordent pas avec les travaux de Rasooli et al (2002) qui ont observé que cette bactérie est sensible à l'action de l'huile essentielle de myrte provenant d'Iran [163].

Les résultats résumés dans le **tableau (35)** concordent avec les résultats de la littérature en particulier en ce qui concerne les effets inhibiteurs modérés contre *Proteus vulgaris*. Il est à noter que l'HE de myrte récolté en Egypte ne manifeste aucune activité contre *Proteus vulgaris* [111, 115].

Toutefois, nos résultats indiquent clairement que la susceptibilité de *Salmonella sp.* aux HE de myrte apparaît avec une zone d'inhibition inférieure à ceux de la littérature; ce résultat est en accord avec les travaux d'Akin et al (2010) [65]. Cette bactérie omniprésente dans l'environnement a présenté une légère sensibilité vis-à-vis des huiles essentielles de myrte provenant de Turquie et d'Italie [111]. En revanche, cette bactérie Gram-négatif est le micro-organisme le plus sensible aux huiles de plusieurs variétés algériennes et tunisiennes de myrte dans des conditions strictement identiques [53].

En ce qui concerne les autres souches bactériennes Gram négatif et Gram positif, les résultats présentés dans cette étude sont en accord avec le nombre limité d'articles publiés sur les effets de l'HE des fleurs de *M. communis* sur la croissance bactérienne. Nous avons pu constater que pour les feuilles, les résultats peuvent être différents d'une huile à une autre. A titre d'exemple, Salvagnini et al (2008) ont rapporté l'activité antimicrobienne d'huile essentielle de feuilles contre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* et *Candida albicans* [24, 177].

En outre, l'huile essentielle de Myrte a montré une bonne activité antimicrobienne contre les souches cliniques de *Mycobacterium tuberculosis* et elle a également montré des résultats significatifs contre *Helicobacter pylori* [76, 77]. Il a été révélé aussi que l'huile de myrte avait une bonne activité antibactérienne contre *Salmonella typhimurium* [178, 179].

En règle générale, ces résultats suggèrent des variations dans la vulnérabilité des différents micro-organismes testés aux différentes huiles volatiles. Ces activités variables vis-à-vis des bactéries isolées et des souches standards sont dues normalement à une composition chimique différente selon l'huile testée. Les activités biologiques des huiles peuvent être influencées par le type d'organe de la plante qui peut offrir des effets antibactériens précieux [115].

Résultats et discussion

D'un point de vue écologique, les fleurs de *M. communis* sont extrêmement riches en structures sécrétoires d'HE, réparties dans tous les organes floraux, la présence de composés phénoliques peut être liée à la production de sécrétions volatiles [176]. D'après des preuves récentes, les données ont montré que la répartition des composés d'huiles essentielles de myrte était absolument dépendante de l'organe [180]. Cette différence peut être due aux nutriments des sols et de leur accumulation dans les feuilles ainsi qu'aux changements dans les gènes à travers les générations et les hybridations naturelles, qui peuvent entraîner la production d'huiles différentes [48]. En fait, les écotypes différents des espèces et leur adaptation à l'environnement affichent également des potentiels bactéricides différents dans les tests mentionnés précédemment.

Par conséquent, l'une des caractéristiques les plus frappantes de cette disparité de l'efficacité de notre HE est sa relation avec les ingrédients antibactériens actifs, y compris l' α -pinène et le 1,8-cinéole qui ont été signalés comme des éléments majeurs à conférer leurs effets microbicides sur *E. coli*, *S. aureus* et *C. albicans* [181]. Plusieurs travaux affirment que les terpènes oxygénés, tels que le 1,8-cinéole, le linalol et l' α -terpinéol présentent une activité antibactérienne puissante [182]. Une fois de plus, des résultats similaires ont été rapportés par d'autres auteurs concernant le 1,8-cinéole et l' α -pinène qui sont connus par leurs activités antibactériennes significatives [72].

De nombreuses études sur différentes plantes ont démontré l'action synergique des huiles essentielles ou de leurs fractions avec des médicaments synthétiques comme les agents antifongiques et antibactériens. Nous citerons tout particulièrement l'eucalyptol (1,8-cinéole) et le géraniol qui ont pu interagir de manière synergique avec la norfloxacine contre *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus* et *E. coli* [183]. Fait intéressant, les effets synergiques des combinaisons de 1,8-cinéole et de l'aromadendrone contre les *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (SARM) et les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) en particulier *Enterococcus faecalis* ont été rapportés [184]. D'autres combinaisons incluant un hydrocarbure monoterpénique (α -pinène) avec le limonène ou le linalol ont également montré des effets additifs et synergiques [185]. En outre, l'efficacité synergique *in vitro* de la combinaison de l'amphotéricine B avec l'HE de *M. communis* contre les isolats cliniques de *Candida albicans* a également été effectuée pour explorer la possibilité de développer une combinaison thérapeutique plus puissante [164].

Le mode d'interaction entre les huiles essentielles et les microorganismes, qui se traduit une activité antimicrobienne n'est pas bien compris. Jusqu'à présent, les différents sites et les modes d'action ciblés sont discutés. Auparavant, le terpinen-4-ol; l' α -terpinéol; le 1,8-cinéole; l' γ -terpinène et l' α -terpinène ont été signalés comme des substances capables de modifier à la fois la perméabilité et la fluidité de la membrane de nombreuses levures testées [186]. Sur la base de ces résultats, il a été

Résultats et discussion

supposé que les huiles essentielles peuvent avoir une activité antimicrobienne en influençant des cibles bactériennes et fongiques impliquées dans le métabolisme cytoplasmique et la paroi cellulaire. Il est indiqué par plusieurs chercheurs que ce sont surtout les monoterpènes qui vont augmenter la fluidité et la perméabilité de la membrane cytoplasmique, troubler l'ordre des protéines membranaires intégrées, inhiber la respiration cellulaire, et modifier les processus de transport d'ions [1].

Il faut noter en particulier que la résistance des bactéries Gram négatif à l'égard des substances antibactériennes est liée à la surface hydrophile de la membrane extérieure qui est riche en lipopolysaccharides, présentant une barrière contre la pénétration de nombreux antibiotiques mais une grande tolérance aux huiles essentielles. Ce phénomène est également associé aux enzymes dans l'espace périplasmique, qui sont capables de décomposer les molécules introduites de l'extérieur [187].

En outre, la plupart des études sur l'apparition d'une interaction synergique entre l'huile essentielle et leurs composés phénoliques s'est concentrée sur leurs effets sur les parois et les membranes cellulaires qui peuvent subir des dommages. Chaque structure qui se désintègre au sein de la membrane externe des bactéries Gram-négatif provoque la libération des lipopolysaccharides (LPS), l'augmentation de la perméabilité de la membrane cytoplasmique à l'ATP, engendre des fuites de matériaux cellulaires et finalement la mort des micro-organismes, mais également en interférant avec la fonction des membranes telles que le transport d'électrons, l'activité enzymatique ou l'absorption des nutriments [107].

D'une façon générale, des études antérieures ont détecté l'effet de plusieurs huiles essentielles sur la croissance et la morphologie des bactéries Gram négatif et les données ultrastructurales ont révélé des changements morphologiques caractéristiques de l'induction d'une activité bactéricide ou bactériostatique. D'autres études concernant l'activité antibactérienne et le mode d'action des huiles essentielles de myrte sont en cours de discussion.

4.2. Activité antioxydante de l'extrait éthéré de *G.alypum* et les extraits de *S.aromaticum*

Jusqu'à présent, il n'existe pas de méthode universelle pour l'évaluation de l'activité antioxydante [188]. Pour cette raison, nous avons utilisé quatre techniques complémentaires dont le but est d'évaluer les propriétés antioxydantes d'une plante algérienne, *Globularia alypum*.

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits de plantes a été réalisée par quatre techniques chimiques (la capacité antioxydante totale, la réduction de fer, le piégeage du radical libre DPPH et le piégeage du radical peroxyde H₂O₂).

Résultats et discussion

4.2.1. Piégeage du radical libre DPPH

La présence de composés antioxydants dans les extraits conduit à une diminution de l'absorbance en fonction du temps (**Figure 30**). Ces résultats montrent que pour une concentration donnée tous les extraits testés sont capables de neutraliser le radical DPPH au cours du temps, ceci se traduit par la diminution de la concentration initiale de ce radical en comparaison avec les contrôles (l'acide ascorbique, l'acide gallique, l'acide citrique, l'EDTA et le BHT) et ainsi l'augmentation du pourcentage d'inhibition (%) (**Figure 30**).

Tableau (36): Les valeurs EC_{50} (mg/ml) de l'extrait de *G. alypum* et des témoins (antioxydants de référence) après 30 min de contact avec le DPPH

Echantillons	EC_{50}	R^2	APR	Ordre	
Extraits	E	0,258±0,26	0,984	3,875±3,84	2
	IE	0,336±0,22	0,993	2,976±4,54	4
	PE	0,460±0,16	0,999	2,173±6,25	6
	VC	0,241±0,29	0,992	4,149±3,44	1
Contrôles	AC	0,352±0,23	0,999	2,840±4,34	5
	AG	1,454±0,54	0,989	0,687±1,85	8
	BHT	0,331±0,21	0,983	3,021±4,76	3
	EDTA	0,824±0,20	0,996	1,213±5,00	7

- Déviations standards (DS) ne dépassant pas 0,54 (EC_{50}) et 6,25 (APR).
- EC_{50} est exprimé par mg d'antioxydant /ml de méthanol.
- Le pouvoir antiradicalaire relatif (APR) est exprimé comme l'inverse de EC_{50} ($APR = 1/EC_{50}$).
- L'ordre de la réactivité est comme suit: VC > E > BHT > IE > CA > PE > EDTA > GA.

Pour cette étude, nous avons considéré que les plantes étudiées pouvaient être une source potentielle d'antioxydants naturels. Les résultats obtenus lors des tests antioxydants ont confirmé cette hypothèse. Nous avons observé que les extraits de deux plantes (*G. alypum* et *S. aromaticum*) sont capables d'inhiber le radical libre stable DPPH. Les plus efficaces d'entre eux présentent une activité proche à certains antioxydants de référence tels que la vitamine C.

Résultats et discussion

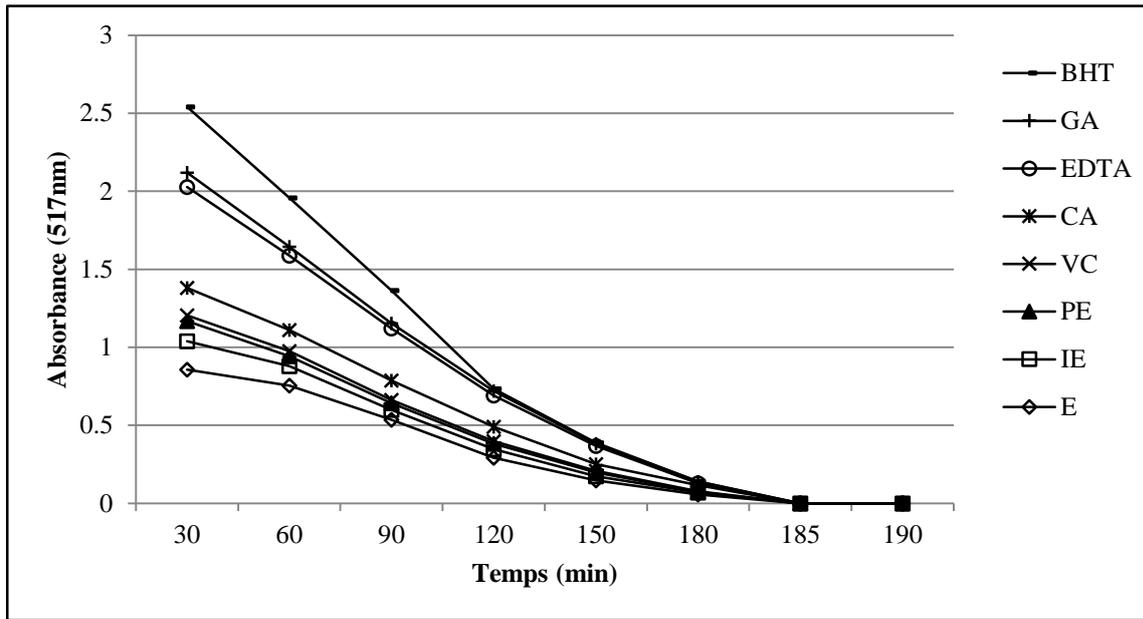


Figure (28): Réduction de l'absorbance à 517nm, en fonction du temps pour l'extrait éthéré, l'eugénol, l'isoeugénol et les antioxydants de référence. Extraits: Eugénol, Isoeugénol et Extrait d'Ether de Pétrole. Témoins: Vitamine C, Acide Citrique, EDTA, Acide Gallique et BHT.

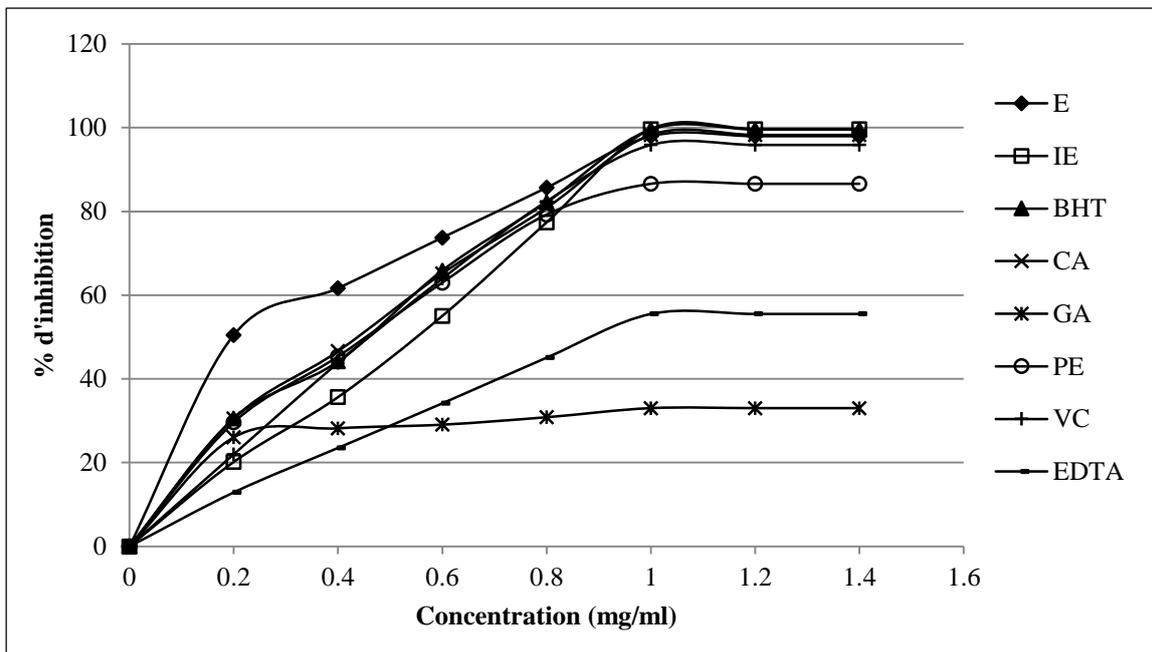


Figure (29): Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de différentes concentrations des extraits en comparaison avec les antioxydants de référence. Extraits: Eugénol, Isoeugénol et Extrait d'Ether de Pétrole. Témoins: Vitamine C, Acide Citrique, EDTA, Acide Gallique et BHT.

Résultats et discussion

Les profils d'activités antiradicalaires obtenus révèlent que l'extrait d'éther de pétrole de *G. alypum* est de loin le moins actif en comparaison avec les extraits de *S. aromaticum* servant de témoin, les EC₅₀ de chacun de ces extraits ont été déterminés.

Parmi les trois extraits étudiés, l'eugénol peut être considéré comme l'extrait le plus actif avec une EC₅₀ de l'ordre de 0,258±0,26 mg/ml, en revanche, la capacité anti-radicalaire des antioxydants de référence est plus faible à l'exception de la vitamine C qui est l'antioxydant standard le plus performant avec une EC₅₀ de l'ordre de 0,241±0,29 mg/ml (**Tableau 36**). Pour l'extrait d'éther de pétrole, la capacité antioxydante estimée par le test au DPPH est relativement faible par rapport à l'eugénol et l'isoeugénol (0,460±0,16 mg/ml).

En effet, l'activité anti-radicalaire des différents extraits a été évaluée par le test au DPPH, celui-ci est souvent utilisé pour la rapidité des résultats comme il est employé pour le criblage des molécules douées d'activités antioxydantes présentes dans les extraits des végétaux [189].

Vu sa teneur en composés phénoliques, l'extrait hydrométhanolique ; des feuilles du *G. alypum* récoltées en Tunisie ; est doté d'une forte activité antioxydante (IC₅₀=6.45±0.19ug/ml) par comparaison au BHT (8.31±0.2ug/ml). Cette activité est due probablement à l'abondance des polyphénols, des flavonoïdes et des anthocyanines dans l'extrait [190].

De même, Daycem et al (2011) ont démontré aussi que la fraction méthanolique des feuilles de *G. alypum* isolée par la méthode de soxhlet révèle une forte activité à piéger les radicaux DPPH (IC₅₀= 15.58±0.17mg/l) suivie par l'extrait d'acétone (20.33±0.61 mg/l) par comparaison avec la vitamine C [191]. Par ailleurs, une faible activité à inhiber l'oxydation a été détecté pour les extraits d'éther de pétrole et de dichlorométhane avec des IC₅₀ de l'ordre de 285.22±2.77 mg/l et 512.05±2.061 mg/l respectivement [191]. Les mêmes auteurs rapportent aussi que la fraction polaire constitue un bon extracteur du radical libre DPPH et mieux que la fraction apolaire puisque le changement de la polarité du solvant modifie la dissolution des composants antioxydants et ainsi il diminue l'activité antioxydante [191]. Ainsi, Kang et al (2003) ont suggéré que les extraits des végétaux qui contiennent des molécules polaires montrent une activité anti-radicalaire élevée [192].

En Maroc, Es-Safi et al (2007) ont isolé un anthocyane : le 6-hydroxy-luteolin-7-O-laminaribioside à partir des feuilles de *G. alypum* et ils ont révélé qu'il possède une activité antioxydante importante avec une IC₅₀= 1.76 mg/l [193].

D'autres travaux sur la même plante ont montré que les extraits phénoliques du *G. alypum* possèdent une activité antioxydante puissante estimée par une valeur de TEAC de l'ordre de 20.31 (mmol TEAC/g PS) (mmol de la capacité antioxydante équivalente à Trolox/g du poids sec) [194]. Par comparaison avec les travaux de Djeridane et al (2010), la plante *G. alypum* détient une bonne

Résultats et discussion

capacité à piéger le radical DPPH ($EC_{50} = 0,877 \pm 0,04 \text{ mg/l}$). Cette plante est classifiée comme inhibiteur du radical libre dont l'activité est meilleure que celle de la vitamine C laquelle est connue comme l'antioxydant le plus puissant [195].

Dans une étude réalisée par Rached et al (2010), deux méthodes chimiques : la méthode spectrophotométrique et la méthode de bioautographie par CCM ont été effectuées pour tester l'activité inhibitrice du radical libre DPPH des feuilles, des fleurs et des racines du *G. alypum*. En effet, ces deux techniques révèlent une activité performante et variable de chaque organe de la plante, les racines présentent une meilleure activité ($19,40 \pm 0,12 \text{ ug/ml}$) suivie par celle des feuilles ($24,43 \pm 0,85 \text{ ug/ml}$) tandis que les fleurs dévoilent un faible effet antioxydant ($25,50 \pm 1,32 \text{ ug/ml}$) [196].

D'une façon générale, le comportement antioxydant des composés dans les émulsions n'a pas encore été complètement expliqué [197]. Les extraits bruts obtenus à partir de deux plantes *Globulria alypum* et *Syzygium aromaticum* (témoin), renferment un mélange de composés différents, contenant l'eugénol et l'isoeugénol. Les extraits bruts de *S. aromaticum* possèdent un très bon pouvoir antioxydant, ceci est connu car l'eugénol et son dérivé l'acétate d'eugényle sont des capteurs puissants de radicaux [198, 199, 200].

Un groupe de chercheurs indiens a observé que l'activité d'inhibition du radical libre DPPH par l'eugénol est proportionnelle à sa concentration. En se basant sur les paramètres EC_{50} , la capacité de balayage de l'acide ascorbique est supérieure à celui de l'eugénol ($242,47 \text{ ug/ml}$) [159]. Nos observations sur l'activité à piéger les radicaux libres par l'eugénol extrait de *S. aromaticum* viennent renforcer ceux observées sur le rôle de l'eugénol encapsulé durant le stockage des nouilles de poulet [201]. D'autres auteurs rapportent le pouvoir antioxydant de l'eugénol par des travaux *in vivo* et *in vitro* lors la peroxydation des lipides [202].

Santanu kar et al (2014) rapportent que l'eugénol isolé et purifié de *O. gratissimum* présente une potentialité réductrice proportionnelle à sa concentration mais elle est faible par rapport l'acide ascorbique [159].

Pour les extraits des autres plantes, leurs capacités à céder l'électron sont différentes pour exprimer ainsi les propriétés antioxydantes. Ce résultat a été corroboré par Miliauskas et al (2004) qui ont montré d'une part qu'un antioxydant efficace dans un test n'est pas forcément efficace dans un autre [203]. D'autre part, les activités antioxydantes sont plus à l'intérieur des espèces de la plante (inter-espèce) que dans la même espèce (intra-espèce) [204]. Les valeurs d' EC_{50} d'eugénol ($0,258 \pm 0,26 \text{ mg/ml}$) et d'isoeugénol ($0,336 \pm 0,22 \text{ mg/ml}$) indiquent que ces deux composés aromatiques ont une activité antioxydante performante par comparaison avec l'extrait d'éther de

Résultats et discussion

pétrole ($0,460 \pm 0,16$ mg/ml). En effet, ces résultats indiquent qu'il n'y a pas un effet scavenger synergique entre l'eugénol, son dérivé et aussi les autres composés présents dans l'extrait d'éther de pétrole. Ce mélange possède un faible potentiel redox d'inhiber les radicaux libres car à l'exception de l'eugénol et l'isoeugénol, cet extrait d'éther de pétrole est dépourvu de dérivés phénoliques. L'association eugénol et composés phénoliques mineurs ne devrait pas être négligée car Bourgou et al (2008) notent qu'un tel mélange est doué d'une certaine activité biologique [205]. En revanche, Fallah et al (2008) indiquent que diverses fractions phénoliques peuvent être démunies d'interactions synergiques [206].

Beaucoup de facteurs influencent l'augmentation de l'activité réductrice ou la diminution de l'absorbance due à l'eugénol, par exemple après son estérification ainsi que l'augmentation de sa concentration [207]. En effet, Loo et ses collaborateurs ont rapporté que l'activité antioxydante est chimiquement dépendante de l'augmentation du nombre des groupes hydroxyle et methoxy du noyau phenyl qui augmente ainsi la capacité réductrice des hydroxybenzenes et methoxyphenols [208]. La discrimination entre nos résultats et la littérature est attribuée à l'organe de la plante, les méthodes d'extraction, les changements climatiques en Algérie, Maroc et Tunisie, la géographie, la récolte et les conditions de culture [209].

Parmi les facteurs responsables de l'efficacité antioxydante, la structure chimique illustrée par la configuration des atomes ou la position de la double liaison dans la chaîne C- des flavonoïdes, le nombre et la position relative des groupes hydroxyle (-OH) sur un noyau aromatique sont les paramètres les plus importants pour expliquer le changement de l'activité des extraits phénoliques [210]. La présence substituants ortho sur les noyaux de flavonoïdes est un facteur crucial responsable de leur activité antioxydante. Ceci a fait l'objet d'une étude approfondie sur la relation structure-activité des extraits isolés à partir de *G.alypum* [211]. L'attribution de l'activité antioxydante à un composé dans un extrait de plante est inutile, puisque le pouvoir antioxydant pourrait être le résultat d'une action synergique ou le mode d'action exact reste ambigu.

Résultats et discussion

4.2.2. La capacité antioxydante totale (CAT)

La **figure (30)** montre que les extraits testés présentent des activités antioxydantes différentes. Ces activités sont estimées par le rapport entre chaque antioxydant de référence (mg) et l'échantillon (mg). Les deux fractions : eugénol et isoéugénol isolées des clous de girofle (*S. aromaticum*) révèlent une activité réductrice supérieure ou égale aux antioxydants standards à l'exception de la vitamine C. Cette dernière est le standard le plus puissant par rapport à l'isoéugénol avec une valeur de l'ordre de 0.989. L'extrait d'éther de pétrole des feuilles de *G. alypum* possède une capacité antioxydante totale considérable de l'ordre de 2.155 et 1.192 par rapport à l'EDTA et l'acide citrique respectivement. L'eugénol montre une activité semblable à celle de la vitamine C avec une valeur enregistrée égale à 1.

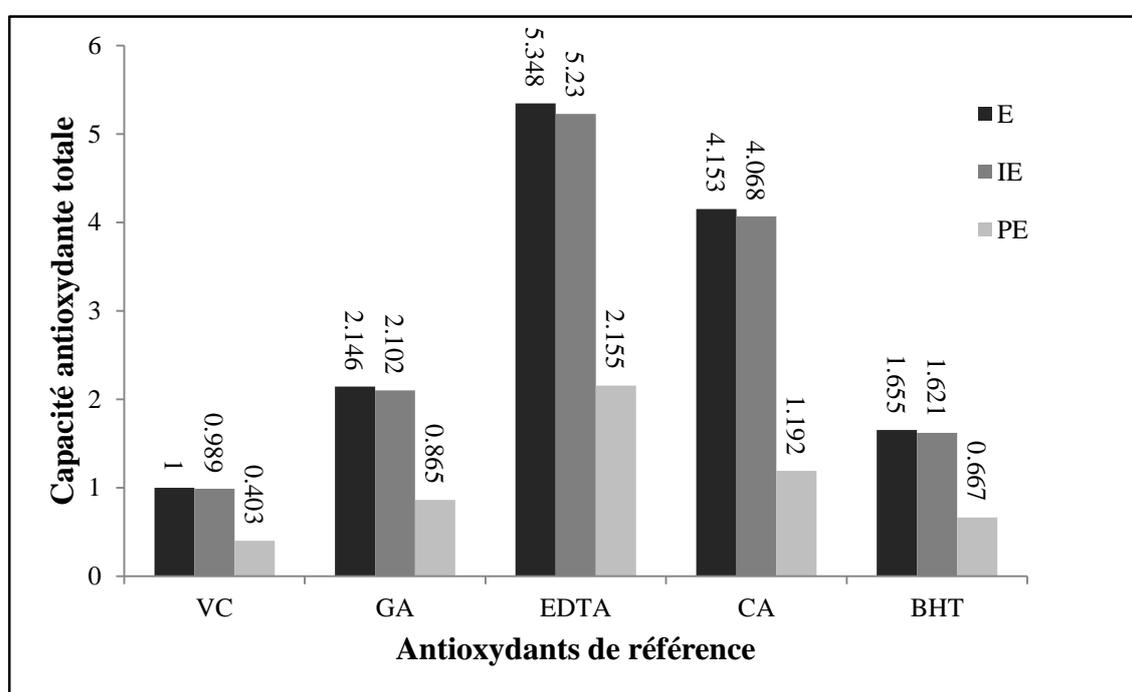


Figure (30): Capacité antioxydante totale (CAT) des extraits ; en comparaison avec les antioxydants de référence. Extraits: Eugénol, Isoéugénol et Extrait d'Ether de Pétrole. Témoins: Vitamine C, Acide Citrique, EDTA, Acide Gallique et BHT.

La capacité antioxydante totale (CAT) est utilisée généralement pour évaluer la possibilité d'un antioxydant à céder un électron, ceci a été démontré par de nombreux travaux réalisés sur l'activité anti-radicalaire d'extraits de plantes. En effet, la présence d'antioxydants dans les herbes, réduit Fe^{+3} en Fe^{+2} jouant ainsi le rôle d'un donneur d'électrons [179, 212]. Globalement, les résultats obtenus par le test au molybdate phosphate indiquent l'existence d'une corrélation remarquable entre le pouvoir réducteur des extraits et ses concentrations.

Résultats et discussion

4.2.3. Méthode de réduction du fer

Les résultats de l'activité réductrice des extraits des plantes sont représentés dans la **figure (31)**. Nous constatons que la capacité réductrice est proportionnelle à l'augmentation de la concentration.

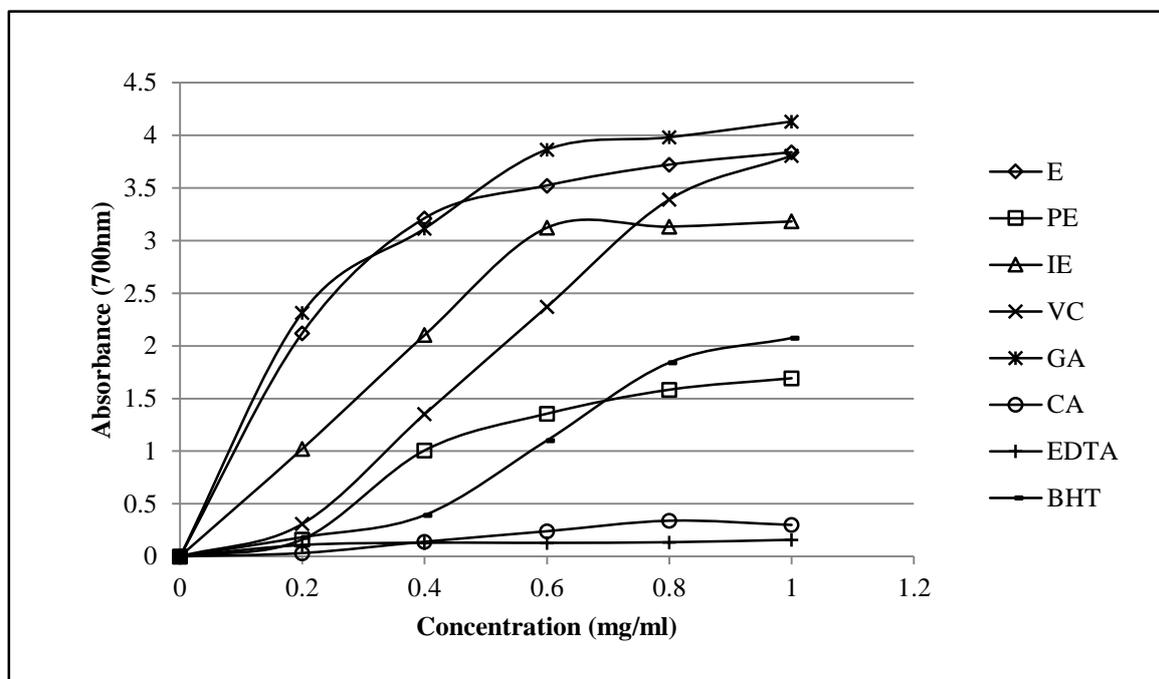


Figure (31): Pouvoir réducteur en fonction de la concentration des extraits et des témoins par la méthode de FRAP. Extraits: Eugénol, Isoeugénol et Extrait d'Ether de Pétrole. Témoins: Vitamine C, Acide Citrique, EDTA, Acide Gallique et BHT.

Le pouvoir réducteur de l'eugénol, l'isoeugénol des clous de girofle (Témoin) s'élève de 2,122 et 1,023 pour une concentration de : 0.2 mg/ ml et 3,839 et 3,184 pour une concentration de : 1 mg/ml respectivement. Nous avons constaté que c'est la fraction d'éther de pétrole des feuilles de *G. alypum* (0,162) qui présente une activité antioxydante satisfaisante comparable à l'antioxydant standard BHT (0,172) à 0.2 mg/ml. La fraction d'isoeugénol présente un pouvoir réducteur considérable par rapport à la fraction d'éther de pétrole et aux autres antioxydants standards (VC, BHT, AC, EDTA) illustrées dans la **figure (31)**.

L'efficacité de réduction de fer décroît dans l'ordre suivant :

GA>E>IE>VC>BHT>PE>CA>EDTA. Ces résultats nous ont permis de conclure que la fraction eugénol isolée des clous de girofle (Témoin) présente une meilleure activité antioxydante par rapport à tous les extraits testés.

Résultats et discussion

Dans un travail similaire, Harzallah et al (2010) ont étudié l'activité antioxydante de quatre extraits de *Globularia alypum* par la méthode de macération au solvant, ils ont trouvé des valeurs de IC_{50} de 1.1 ± 0.005 mM et 1.3 ± 0.005 mM pour l'extrait de l'éther de pétrole par la méthode de FRAP et RP respectivement. Ces valeurs sont relativement très faibles par comparaison à ceux des extraits : aqueux, méthanolique, et à l'acétate d'éthyle de la même plante [168].

4.2.4. Piégeage du radical peroxyde H_2O_2

Nous observons des activités antioxydantes différentes selon la nature de la substance utilisée (Figure 32). Dans des conditions strictement identiques, on obtient des taux d'inhibition distincts en fonction des concentrations. Tous les extraits présentent une activité à piéger le radical peroxyde, supérieure à 32.65 %. La vitamine C et le BHT ont une bonne capacité inhibitrice comparée aux extraits étudiés (E, IE et PE). L'eugénol, l'isoeugénol et la fraction d'éther de pétrole ont une meilleure activité par rapport à tous les antioxydants standards testés avec des pourcentages de l'ordre de 89.72, 88.15 et 70.57 % respectivement.

La classification par ordre décroissant de la capacité des extraits à piéger le H_2O_2 est la suivante :

VC > BHT > E > IE > PE > GA > CA > EDTA.

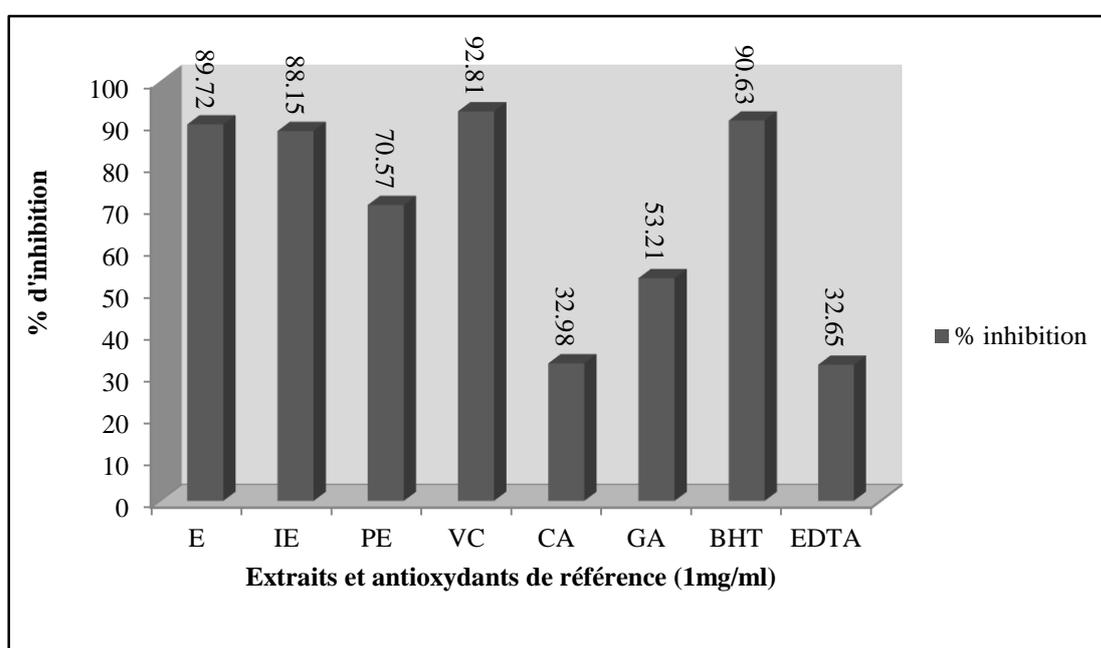


Figure (32): Pourcentage d'inhibition du radical H_2O_2 des extraits en comparaison avec les antioxydants de référence. Extraits: Eugénol, Isoeugénol et Extrait d'Ether de Pétrole. Témoins: Vitamine C, Acide Citrique, EDTA, Acide Gallique et BHT.

4.3. Propriétés fonctionnelles des cendres de *C.villosa*

4.3.1. Utilisation des cendres de *C.villosa* pour l'élaboration de préparation à activité antifongique

La majorité des conditions étudiées (**Tableau 18**, voir matériel et méthodes) ne donne pas un résultat positif contre la prolifération des souches fongiques. Seuls les mélanges préparés à base de cendres et de matière butyrique se distinguent des autres avec un taux d'inhibition extrême indiquant une activité fongicide. Les résultats de l'activité des cendres des racines de *C.villosa* dans différentes conditions sont présentés dans les **tableaux (37) et (38)**.

Les praticiens de la médecine traditionnelle en Algérie emploient un nombre non négligeable de plantes du sol local. A titre d'exemple, le genêt connu en botanique sous le nom de *Calicotome villosa* est utilisé dans certaines infections cutanées.

A cet égard, notre travail se propose de rapporter la technique de préparation d'une tablette à base de minéraux et de matière grasse animale (matière butyrique) utilisée pour ses effets bénéfiques.

Un screening a été mené à l'aide d'une préparation à 50mg/ml (cendres/beurre, 50/1, w/v) sous 17 conditions différentes. Seuls cinq échantillons (B +C, B_s +C, B_d +C, B_{sd} +C, B_{sdn} +C) ont montré une activité antifongique. La détermination de CMF des mélanges actifs ont révélé expérimentalement cinq conditions positives.

Cette procédure a mis en évidence l'effet de synergie entre les minéraux extraits des racines de la plante et le beurre de bovins, car aucune germination des spores des deux souches fongiques testées n'a été observée sous l'effet de ce mélange.

En revanche, la réalisation de tests utilisant séparément le sel, le beurre ou les cendres pendant 10 jours conduit à l'absence des structures typiques de mycélium.

L'observation à l'œil nu de mycélium est significativement différente car elle dépend de la concentration de l'agent antifongique. Les résultats ont révélé des activités inhibitrices de ces cinq mélanges avec des valeurs de CMI de 50 à 70 mg/ml. Les mixtures de B_s+C, B_d+C et B_{sdn}+C exercent la plus forte activité antifongique contre tous les souches testées avec un taux d'inhibition de 100%.

Résultats et discussion

Tableau (37) : Activité antifongique des cendres dans différentes conditions

Souches fongiques	Inhibition de la croissance mycélienne							
	<i>Fusarium sp</i>				<i>Aspergillus sp</i>			
	Diamètre (mm)	Taux d'inhibition (%)	Effet (-/+)	Phénotype	Diamètre (mm)	Taux d'inhibition (%)	Effet (-/+)	Phénotype
Témoin (-)	83±0.51	/	(-) ³	/	27.5±1.1	/	(-) ³	/
Nystatine (+)	05±1.12	81.81±0.4	++	S	40±2.13	51.5±0.3	++	S
B	83±0.51	00±0.00	-	R	27±0.34	1.81±0.56	+	S
B _s	83±0.51	00±0.00	-	R	27±0.56	1.81±0.57	+	S
B _d	83±0.51	00±0.00	-	R	30±0.78	nm	-	R
B _{sd}	83±0.51	00±0.00	-	R	24.5±0.4	10.9±0.77	+	S
B _n	83±0.51	00±0.00	-	R	30±0.23	nm	-	R
B _{sn}	83±0.51	00±0.00	-	R	29±0.12	nm	-	R
B _{dn}	83±0.51	00±0.00	-	R	32.5±0.4	nm	-	R
B _{sdn}	83±0.51	00±0.00	-	R	28±0.12	Nm	-	R
C	83±0.51	00±0.00	-	R	27.5±0.2	00±0.00	-	R
B+C	40±0.21	51.5±0.3	++	S	05±0.67	81.81±0.1	++	S
B _s +C	00±0.00	100±0.00	+++	S	00±0.00	100±0.00	+++	S
B _d +C	00±0.00	100±0.00	+++	S	24±0.21	12.72±0.2	+	S
B _{sd} +C	77.5±1.3	06.62±2.1	+	S	10±0.11	63.63±0.1	++	S
B _n +C	83±0.51	00±0.00	-	R	28.5±0.2	nm	-	R
B _{sn} +C	83±0.51	00±0.00	-	R	30±0.78	nm	-	R
B _{dn} +C	83±0.51	00±0.00	-	R	32.5±0.99	nm	-	R
B _{sdn} +C	10±0.16	87.95±0.5	++	S	00±0.00	100±0.00	+++	S

C: Cendres, **B:** Matière butyrique, **B_s:** Matière butyrique stérile, **B_d:** Matière butyrique anhydre, **B_n:** Matière butyrique additionnée du sel, **B_{sd}:** Matière butyrique stérile et anhydre, **B_{sn}:** Matière butyrique stérile et additionnée du sel, **B_{dn}:** Matière butyrique anhydre et additionnée du sel, **B_{sdn}:** Matière butyrique anhydre, stérile et additionnée de sel. Effet détecté : (-/+), Diamètre mesuré (mm), Pourcentage d'inhibition (%), Phénotype (P), Activité antifongique : (+++) effective, (++) modérée, (+) pauvre, (-) pas d'activité, (-)³ : le nombre de jours après lequel les contrôles (échantillons non traités) ont été complètement recouvertes de colonies.

Résultats et discussion

Tableau (38) : Activité antifongique de diverses préparations

Souches fongiques	Inhibition de la croissance mycélienne								
	<i>Fusarium sp</i>				<i>Aspergillus sp</i>				
	Diamètre (mm)	Taux d'inhibition (%)	Effet (-/+)	Phénotype	Diamètre (mm)	Taux d'inhibition (%)	Effet (-/+)	Phénotype	
Témoin (-)	85±0.01	/	(-) ³	/	28±0.23	/	(-) ³	/	
Nystatine (+)	05±0.09	81.81±0.2	++	S	40±0.33	51.5±0.5	++	S	
B+C	30	85±0.01	00±0.00	-	R	25±0.59	10.71±0.2	+	S
	40	85±0.01	00±0.00	-	R	25±0.56	10.71±0.3	+	S
	50	85±0.01	00±0.00	-	R	29±0.55	/	-	R
	60	85±0.01	00±0.00	-	R	25±0.34	10.71±0.2	+	S
	70	85±0.01	00±0.00	-	R	22.5±0.4	19.64±0.4	+	S
B _s +C	30	85±0.01	00±0.00	-	R	30±0.04	/	-	R
	40	85±0.01	00±0.00	-	R	27.5±0.5	1.78±0.35	+	S
	50	60±0.09	/	-	R	25±0.41	10.71±0.9	+	S
	60	85±0.01	00±0.00	-	R	22.5±0.1	19.64±0.5	+	S
	70	85±0.01	00±0.00	-	R	25±0.43	10.71±0.8	+	S
B _d +C	30	75±0.04	/	-	R	30±0.03	/	-	R
	40	00±0.00	100±0.00	+++	S	22.5±0.3	19.64±0.8	+	S
	50	55±0.67	4.34±0.5	+	S	00±0.00	100±0.00	+++	S
	60	51±0.23	11.3±0.34	+	S	00±0.00	100±0.00	+++	S
	70	00±0.00	100±0.00	+++	S	00±0.00	100±0.00	+++	S
B _{sd} +C	30	75±0.04	/	+++	S	00±0.00	100±0.00	+++	S
	40	00±0.00	100±0.00	+++	S	00±0.00	100±0.00	+++	S
	50	55±0.67	4.34±0.5	+++	S	00±0.00	100±0.00	+++	S
	60	51±0.23	11.3±0.34	+++	S	00±0.00	100±0.00	+++	S
	70	00±0.00	100±0.00	+++	S	00±0.00	100±0.00	+++	S
B _{dn} +C	30	00±0.00	100±0.00	-	R	32.5±0.2	/	-	R
	40	00±0.00	100±0.00	-	R	28.5±0.1	/	-	R
	50	00±0.00	100±0.00	-	R	47.5±0.3	/	-	R
	60	00±0.00	100±0.00	-	R	44±0.02	/	-	R
	70	00±0.00	100±0.00	+++	S	25±0.01	/	-	R

C: Cendres, B: Matière butyrique, B_s: Matière butyrique stérile, B_a: Matière butyrique anhydre, B_n: Matière butyrique additionnée de sel, B_{sd}: Matière butyrique stérile et anhydre, B_{sn}: Matière butyrique stérile et additionnée de sel, B_{an}: Matière butyrique anhydre et additionnée de sel, B_{sdn}: Matière butyrique anhydre, stérile et additionnée de sel. Effet détecté : (-/+), Diamètre mesuré (mm), Pourcentage d'inhibition (%), Phénotype (P), Activité antifongique : (+++) effective, (++) modérée, (+) pauvre, (-) pas d'activité, (-)³: le nombre de jours après lequel les contrôles (échantillons non traités) ont été complètement recouvertes de colonies.

Résultats et discussion

Dans le cadre de l'étude de l'activité antibactérienne de cette préparation, un mélange à (50/1, w/v) a été testé par la méthode des puits sur cinq souches bactériennes de référence, Gram négatif et Gram positif (*Escherichia coli*, *klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*). Après une incubation dans des conditions identiques, les mélanges testés ont donné des résultats négatifs sur toutes les souches utilisées.

C.villosa renferment des alcaloïdes connus. Leur analyse a été réalisée par la technique de diffraction des rayons X. Ces deux alcaloïdes sont : l'isoquinoléine -N- oxyde et le dihydroisoquinoléine -N- oxyde [213, 214]. Nos résultats montre que l'analyse qualitative des cendres de *C.villosa* a montré la présence de plusieurs constituants minéraux (**Figure 21**) : Fer (Fe), sodium (Na), aluminium (Al), magnésium (Mg), silicium (Si), potassium (K) et calcium (Ca).

Le mélange dans des rapports bien déterminés (minéraux/matière grasse) fournit une suspension douée d'activité antifongique très puissante. Le refus croissant des produits de synthèses pourrait inciter des industriels à étudier de façon positive ce type de préparation.

Il est important de déterminer les proportions de chaque élément (Fe, Ca, Si) dans ces cendres. Des quantités élevées de Fer peuvent conduire à un effet inhibiteur sur le rythme de croissance mycélienne. La présence d'oxalate de calcium est aussi fréquemment associée à une activité antifongique [215]. De même, l'intervention du Zinc est également discutée où les propriétés antifongiques sont dues au mécanisme possible de libération très lente d'ions sous des conditions humides [216].

On peut retenir que l'activité antimicrobienne du mélange est due à une synergie des différents constituants du beurre et des cendres. Les deux souches testées réagissent différemment au type de mixture préparé. Il est possible donc d'adapter la préparation on fonction du champignon à éliminer.

Toutefois les tests sur l'homme sont conditionnés par une meilleure connaissance de la flore naturelle de la peau et la composition de chaque ingrédient du mélange.

Résultats et discussion

4.3.2. Utilisation des cendres de *C.villosa* comme substituant partiel du ciment

Comportement à rupture des CCC (composite ciment-cendre)

L'intérêt de ces tests est de définir une carte d'identité du matériau par une présentation des principales caractéristiques mécaniques du matériau composite renforcé de cendres. La définition des comportements à rupture en compression et en flexion semble un passage obligé de la caractérisation mécanique. Les essais mécaniques à rupture sont réalisés sur 3 types d'échantillons (à 25%, 50% et 75% de cendres) après 28 jours d'incubation dans une enceinte humide.

4.3.2.1. Comportement en flexion

La **figure (33)** présente 3 courbes contrainte-déformation obtenues lors des essais de flexion 3 points. Ces essais ont été effectués après 28 jours d'incubation sur des éprouvettes prismatiques 4x4x16 cm et ils ont été menés sur une presse de traction type Zwick/Roell, munies d'un banc de flexion 3 points.

Ces courbes représentés dans la **figure (33)** sont relatives aux comportements à rupture des matériaux : sans cendres, à 25%, 50% et à 75% de cendres respectivement. L'échantillon de référence a un comportement quasi-linéaire suivi d'une chute brutale de la contrainte (rupture totale de l'échantillon).

D'après les résultats, on a constaté que les cendres améliorent la résistance en flexion du mortier à un pourcentage de 50%. Donc, on peut dire que 50%, c'est le pourcentage optimum par rapport 25% et 75%. Pour le mortier témoin et le mortier renforcé par 50% de cendres, on a enregistré que la résistance en flexion est améliorée. On peut estimer que les cendres de *C.villosa* jouent un rôle très important sur le comportement mécanique des mortiers.

Résultats et discussion

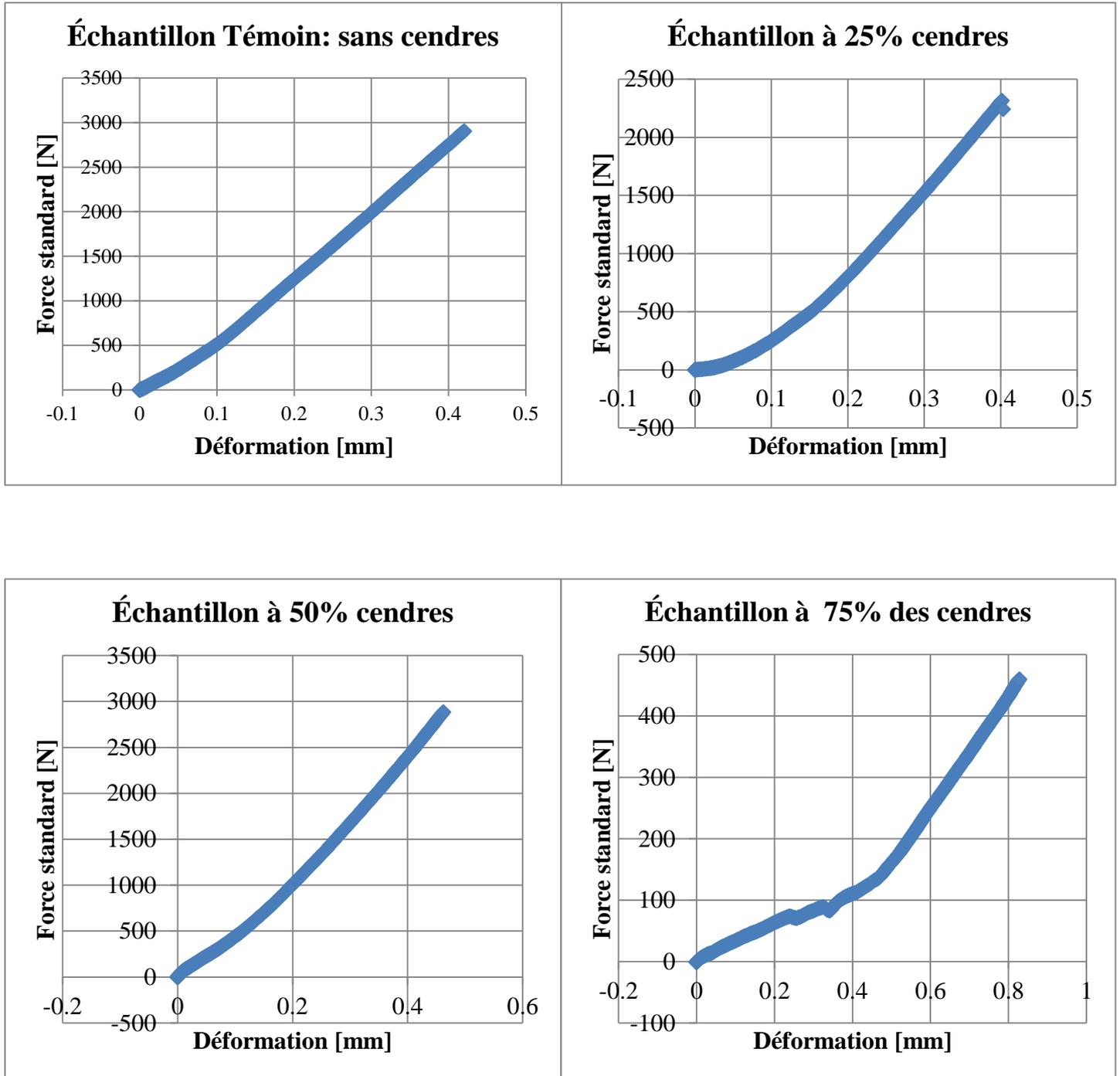


Figure (33) : Courbes contrainte-déformation en flexion 3 points

Résultats et discussion

4.3.2.2. Comportement en compression

La **figure (34)** illustre les valeurs enregistrées après le calcul de la résistance en compression R_c (MPa) pour les matériaux à base de cendres à 25%, à 50% et à 75% à partir l'équation suivante :

R_c (MPa) : F/S où

F : la valeur maximale de la force

S : la surface de la section de l'éprouvette = $40 \times 40 \text{ mm}^2$

Ces essais ont été effectués à 28 jours sur les demi-éprouvettes rompues en flexion où la section de compression est $4 \times 4 \text{ cm}^2$ et ils ont été menés sur une vitesse de chargement constante et la presse utilisée est type Zwick/Roell 20kN.

D'après les résultats, on a enregistré que plus le pourcentage des cendres augmente, plus la résistance en compression diminue.

A partir de ces résultats, il apparaît que les cendres interviennent dans les propriétés mécaniques en compression des CCC.

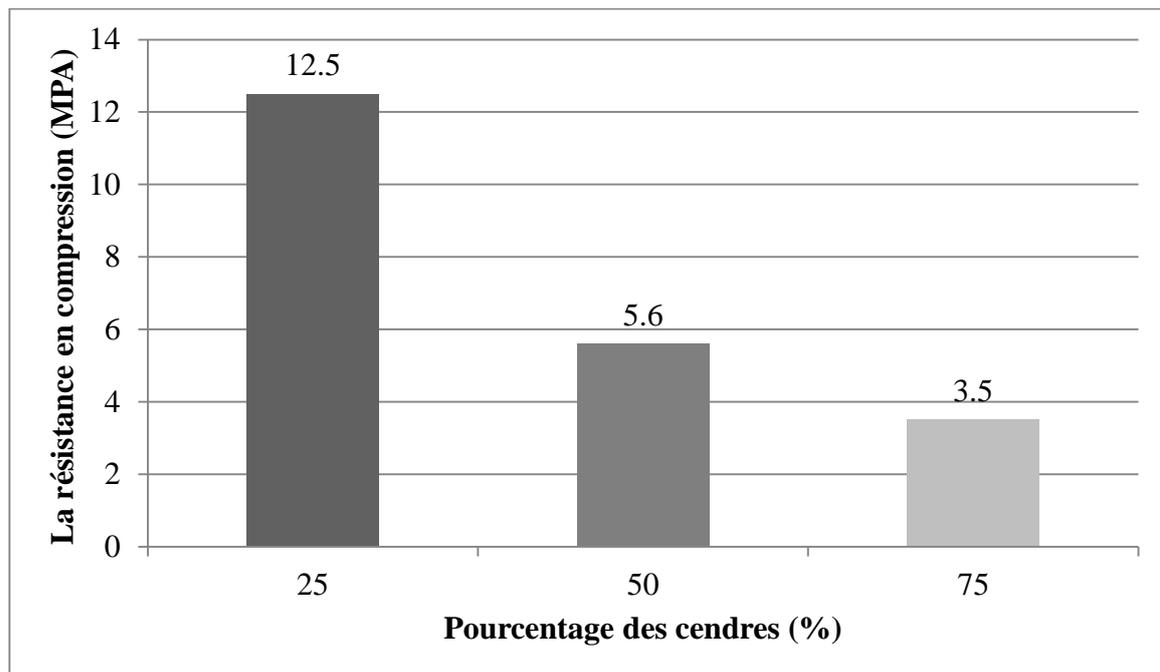


Figure (34): Déformations obtenues avec un essai de compression

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les huiles essentielles sont aujourd'hui de plus en plus présentes dans le marché des produits naturels. Les praticiens en aromathérapie les utilisent souvent en compléments d'une thérapie alternative et leur popularité auprès des consommateurs est principalement due à l'absence de certains effets secondaires rencontrés chez les produits de synthèse. Malgré cet engouement, une liste de plantes de la flore algérienne n'est pas encore clairement établie.

Les travaux de recherche entrepris dans ce domaine ont permis, dans un premier lieu, de mettre en lumière le potentiel pharmacologique des huiles essentielles ainsi que de constituants volatils de plantes de la flore algérienne. Lors du criblage biologique réalisé sur une vingtaine d'entérobactéries, l'huile essentielle issue des feuilles de *M.communis* s'est distinguée par son activité bactéricide puissante en particulier sur des souches d'*Escherichia coli*. En revanche, celle des fleurs présente une activité plus faible. L'huile essentielle des fleurs a été peu étudiée et sa composition chimique n'a jamais été clairement établie. Les huiles essentielles des feuilles et fleurs présentent approximativement un profil chimique proche dominé par le 1.8-cinéole et l' α -pinène qui sont bien connus pour leur activité antibactérienne.

L'analyse du sol de la zone d'échantillonnage a été effectuée dans le but de déterminer l'influence de ce sol sur la composition chimique de l'huile extraite. Cette démarche pourrait facilement être généralisée afin d'obtenir des molécules volatiles de composition chimique et activité biologique constantes.

L'hydrodistillation reste la technique de choix pour l'extraction d'une huile essentielle. Cependant, la phase aqueuse résultante peut servir à l'extraction de molécules organiques à l'aide de solvant polaire ou apolaire.

En effet, l'extrait à l'éther de pétrole obtenu à partir de *G.alypum* renferme l'eugénol et l'isoeugénol. Comme un bon nombre de composés aromatiques, ces molécules interviennent habituellement dans diverses applications industrielles et pharmaceutiques. Les tests effectués révèlent une activité antioxydante de l'extrait étheré de *G.alypum*. Cependant, elle est plus faible que le mélange constitué de l'eugénol et l'isoeugénol que nous avons

Conclusion et perspectives

extrait de *S.aromaticum*. Selon les prédictions *in silico* des propriétés structurales de la fraction étherée et les tests réalisés *in vitro*, le pouvoir antioxydant satisfaisant de cette fraction peut être attribué à la présence de composés phénoliques : l'eugénol et l'isoeugénol. Ces molécules ne possèdent aucun effet synergétique sur l'activité antioxydante globale de la fraction étherée.

D'autre part, le criblage biologique a également permis de mettre en évidence l'activité antifongique d'une préparation à base de cendres de racines de *C.villosa* et de beurre de bovins. Les résultats de l'activité antifongique pourraient faire l'objet de tests plus poussés pour la mise au point d'une préparation pouvant éliminer les dermatophytes.

Une partie importante a été consacrée à l'étude des propriétés mécaniques des mortiers renforcés par les cendres des racines de *C.villosa*. L'analyse de ces résultats indique que le mélange utilisant 50% de cendres peut être considéré comme un bon candidat de renforcement des ciments. Toutefois, ces tests nécessitent encore une validation par des études complémentaires.

Les résultats obtenus mettent en évidence le potentiel pharmacologique des huiles essentielles, des molécules organiques et de minéraux issus des espèces végétales du sol local. Cette flore recèle sûrement d'autres plantes dont le potentiel pharmacologique n'a encore jamais été étudié ce qui ouvre d'intéressantes perspectives de recherche pour les années à venir.

Annexe 1 : Matériel utilisé et milieux de culture

1- Mueller-Hinton (MH) :

- Infusion de viande de bœuf : 300 ml
- Peptone de caséine : 17,5 g
- Amidon de maïs : 1,5 g
- Agar : 17,0 g
- pH = 7,4

2- Gélose nutritive (GN) :

- Extrait de viande : 1 g/l
- Extrait de levure : 2.5 g/l
- Peptone : 5 g/l
- Chlorure de sodium : 5 g/l
- Agar : 15 g/l
- pH = 7

3- Gélose Mac Conkey :

- Peptone : 20 g
- Lactose : 10 g
- Sel biliaires n°3 : 1,5 g
- Cristal violet : 0,001 g
- Rouge neutre : 0,05 g
- Chlorure de sodium : 5 g
- Agar : 15 g

4- Bouillon nutritif

- Tryptone : 10 g
- Extrait de viande : 5g
- Peptone : 5 g
- Chlorure de Sodium : 5 g
- pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 7,2

5- Potato dextrose agar (PDA)

- Eau distillée : 1l
- Pomme de terre : 200g
- Dextrose : 20g
- Agar : 20
- pH = 5

6- Matériel utilisé

- Four à moufle (Raypa n 4932. HM-2), Centrifugeuse (Hettich zentrifugen EBA 20), Balance de précision (Sartorius RC 210 S), Etuve (Bio concept Firlabo-sa), Distillateur (GFL D-30938 Burgwedel), pH-mètre (Hanna instruments 211), Spectrophotomètre (Jenway 6305 RC : 232), Vortex (Heidolph Top-Mix 94323), Presse de flexion (Zwick/Roell), Presse de compression (Zwick/Roell 20kN)

Annexes

Annexe 2 : Profils chromatographiques des principes actifs analysés par CPG/ms

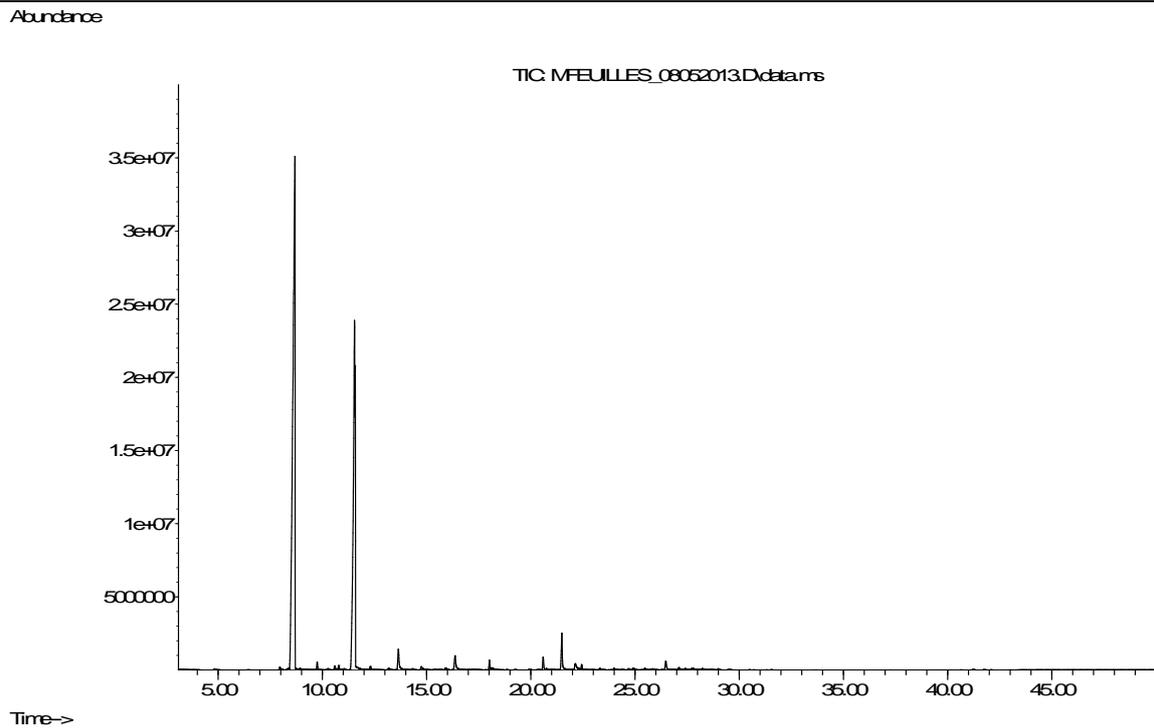


Figure (35) : Profil chromatographique de l'HE des feuilles de *M.communis* analysée par CPG/ms

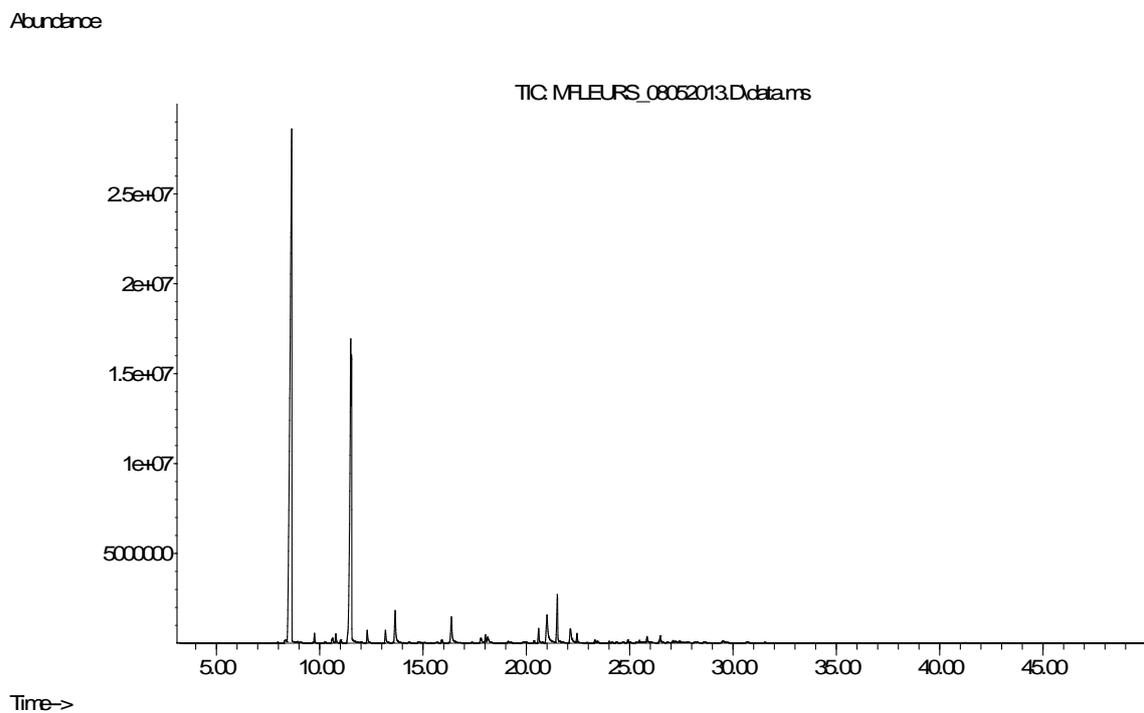


Figure (36) : Profil chromatographique de l'HE des fleurs de *M.communis* analysée par CPG/ms

Abundance

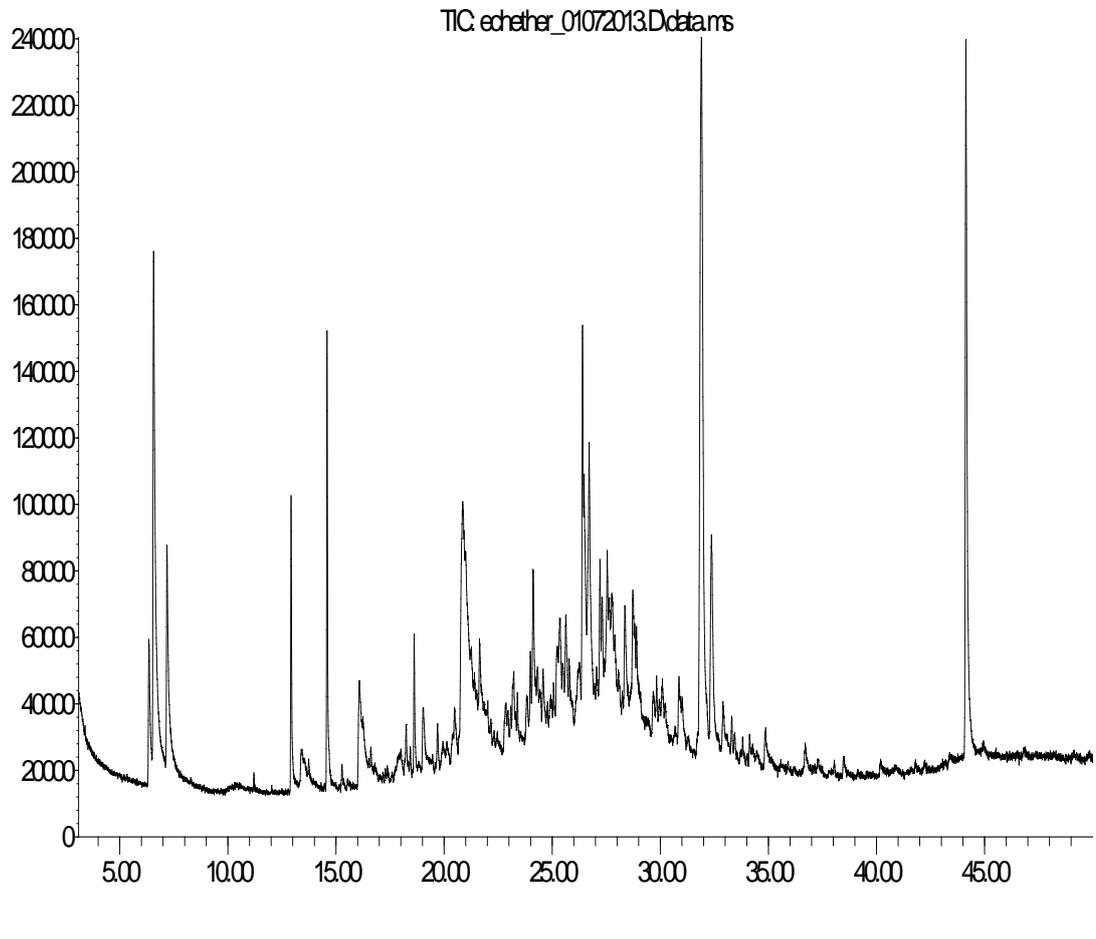


Figure (37) : Profil chromatographique de la fraction d'ether de pétrole des feuilles de *G. alypum* analysée par CPG/ms

Annexes

Annexe 3 : Photos représentant les résultats de l'activité antibactérienne des HE

Figure (38) : Photos représentant la sensibilité d'*Escherichia coli* testée par les huiles essentielles brutes des feuilles et des fleurs de *M.communis* ([A] : l'effet d'HE des feuilles, [B] : l'effet d'HE des fleurs).

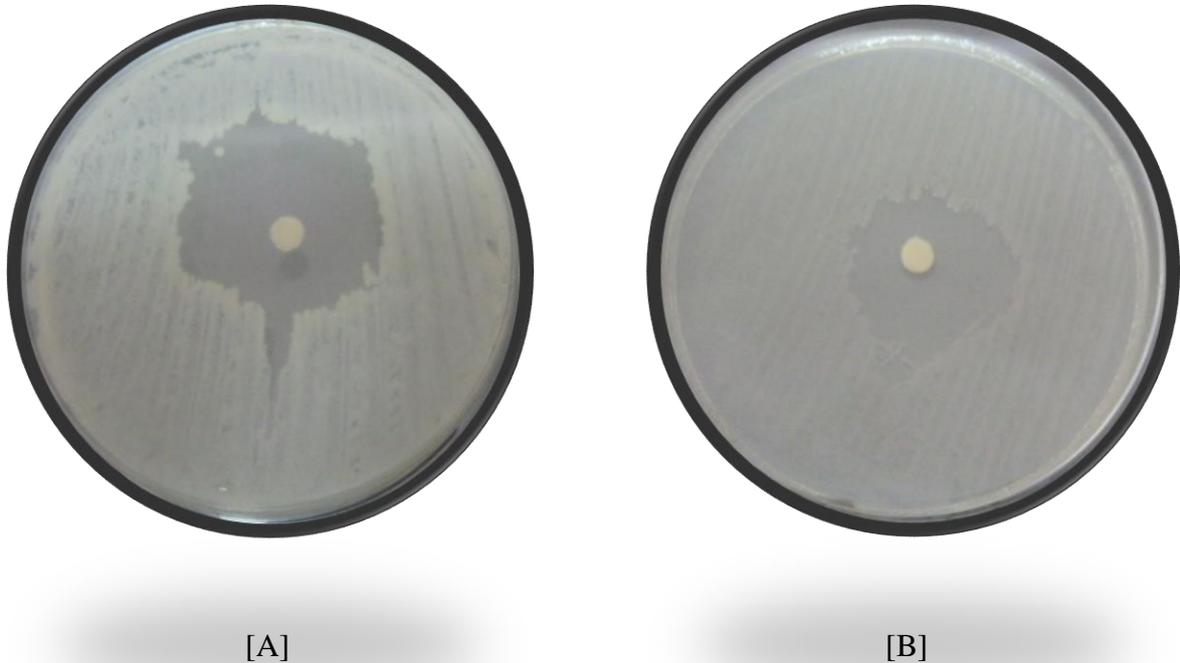
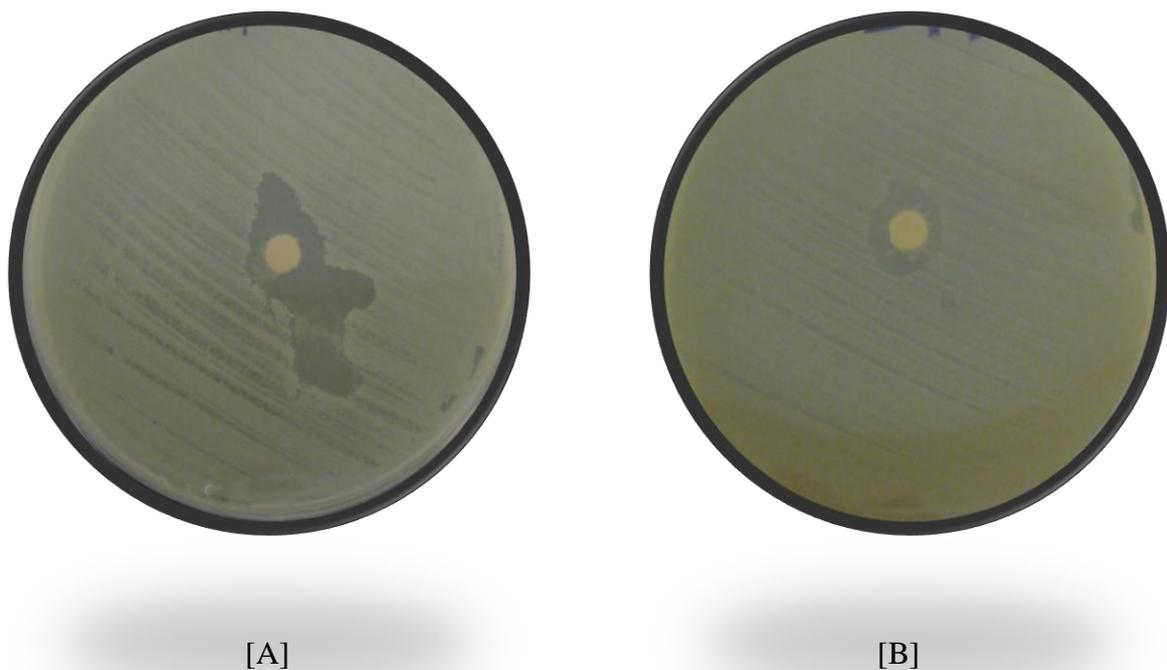


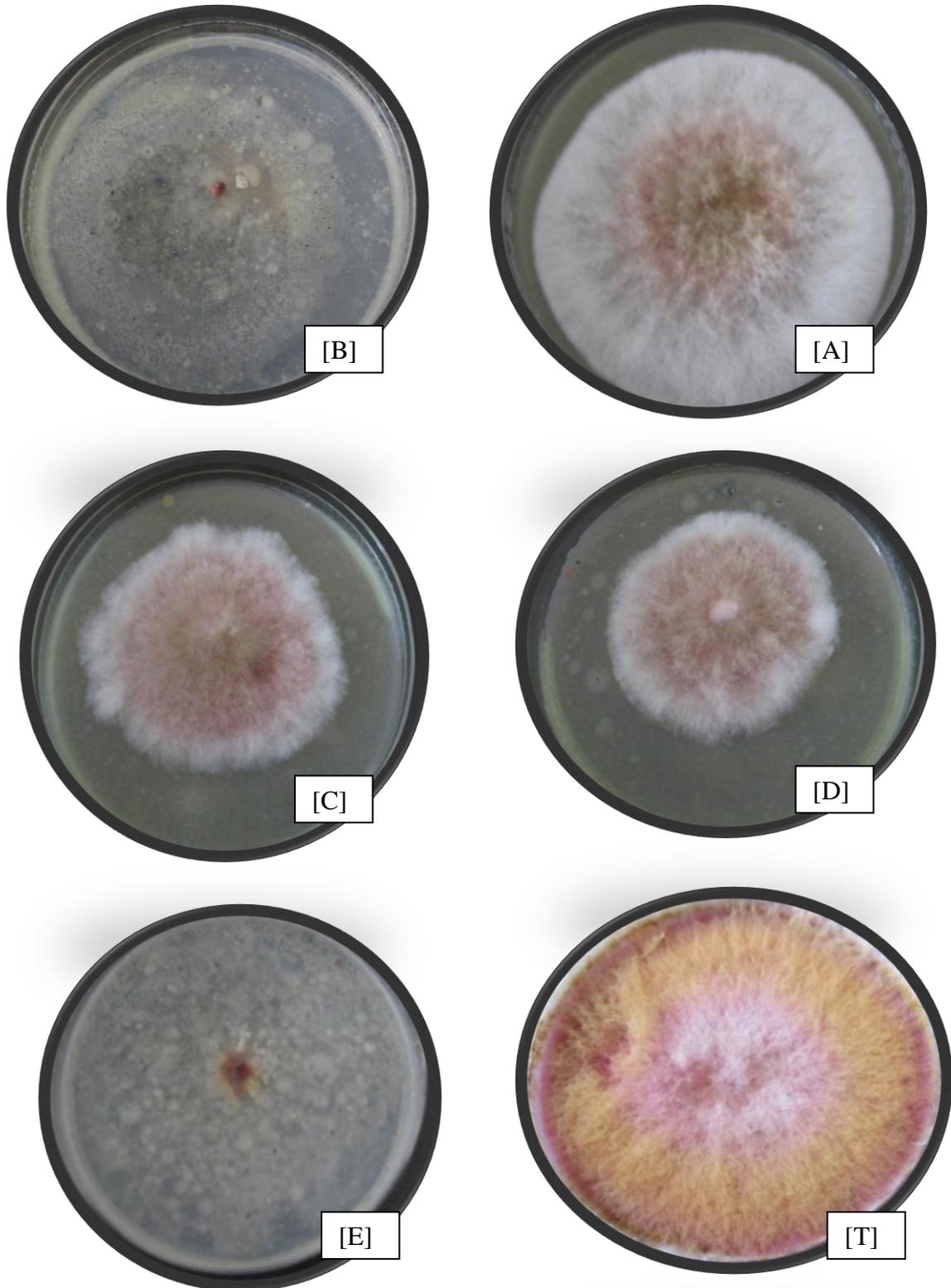
Figure (39) : Photos représentant la sensibilité de *Proteus vulgaris* testée par les huiles essentielles brutes des feuilles et des fleurs de *M.communis* ([A] : l'effet d'HE des feuilles, [B] : l'effet d'HE des fleurs).



Annexes

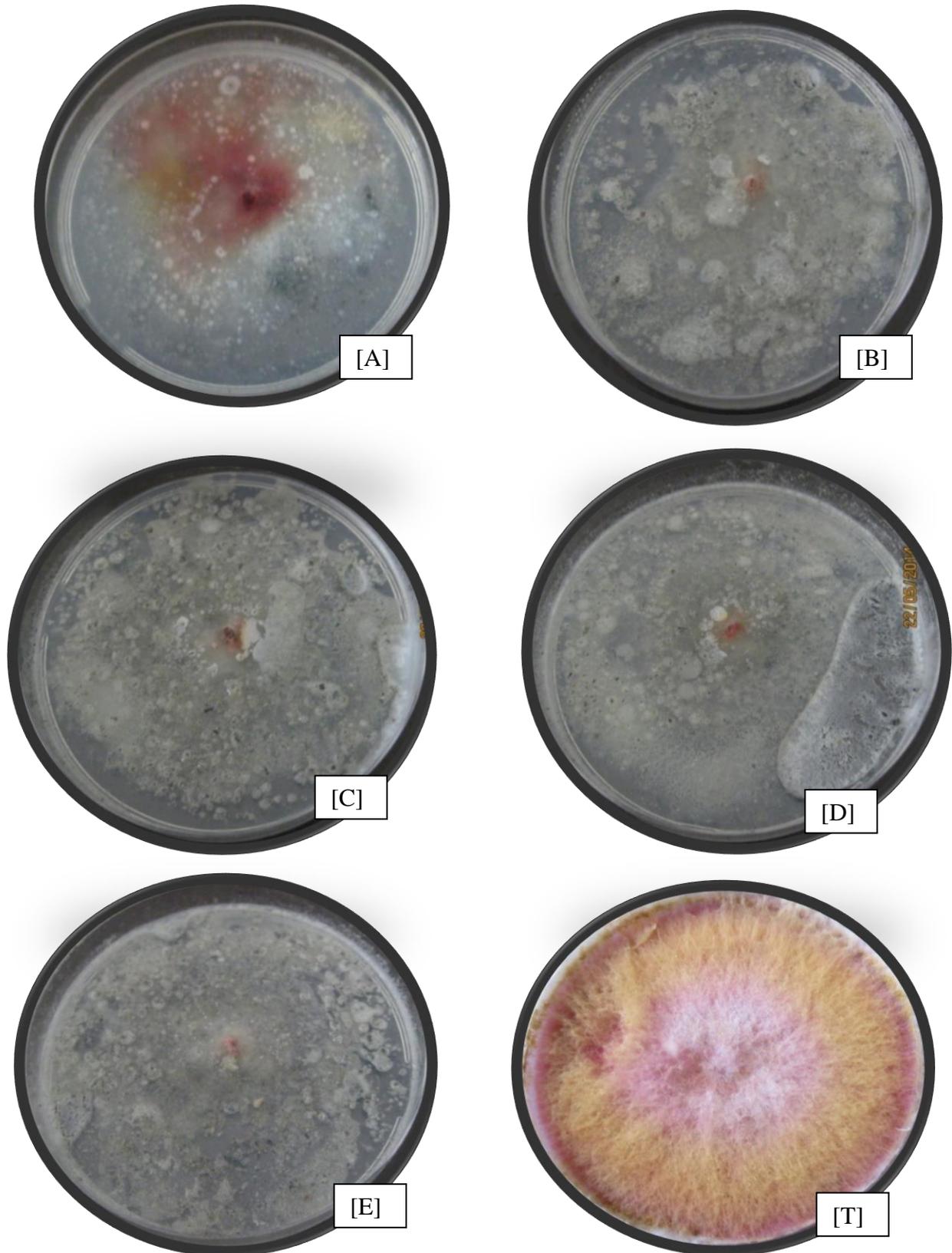
Annexe 4 : Photos représentant les résultats de l'activité antifongique

Figure (40) : Photos représentant l'activité anti- *Fusarium sp* de mélange préparé en présence des cendres et du beurre anhydre. (30 mg/ml : [A]), (40 mg/ml : [B]), (50 mg/ml : [C]), (60 mg/ml : [D]), (70 mg/ml : [E]) et (Témoin : [T])



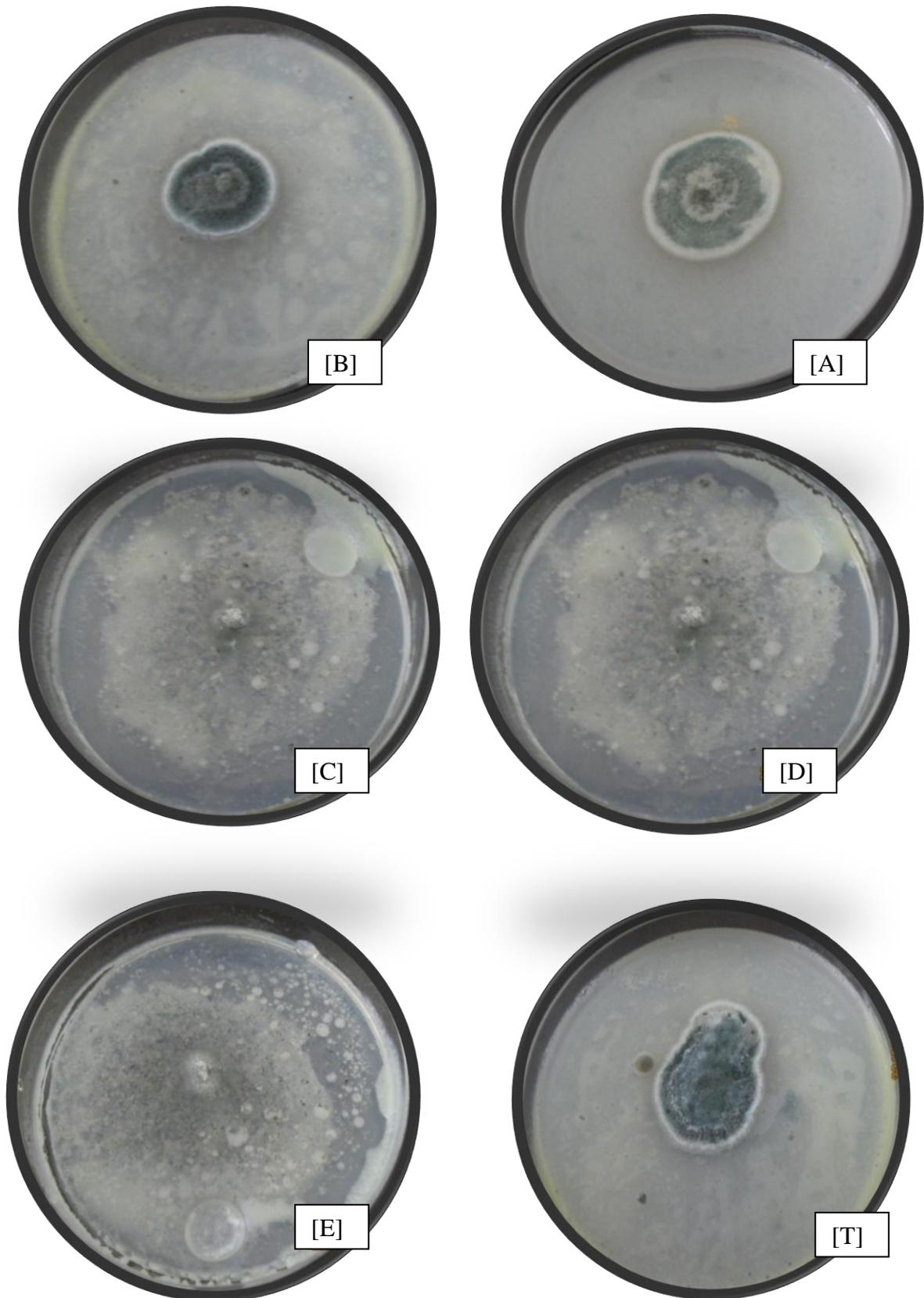
Annexes

Figure (41) : Photos représentant l'activité anti- *Fusarium sp* de mélange préparé en présence des cendres et du beurre stérile et anhydre. (30mg/ml : [A]), (40 mg/ml : [B]), (50 mg/ml : [C]), (60 mg/ml : [D]), (70 mg/ml : [E]) et (Témoin : [T])



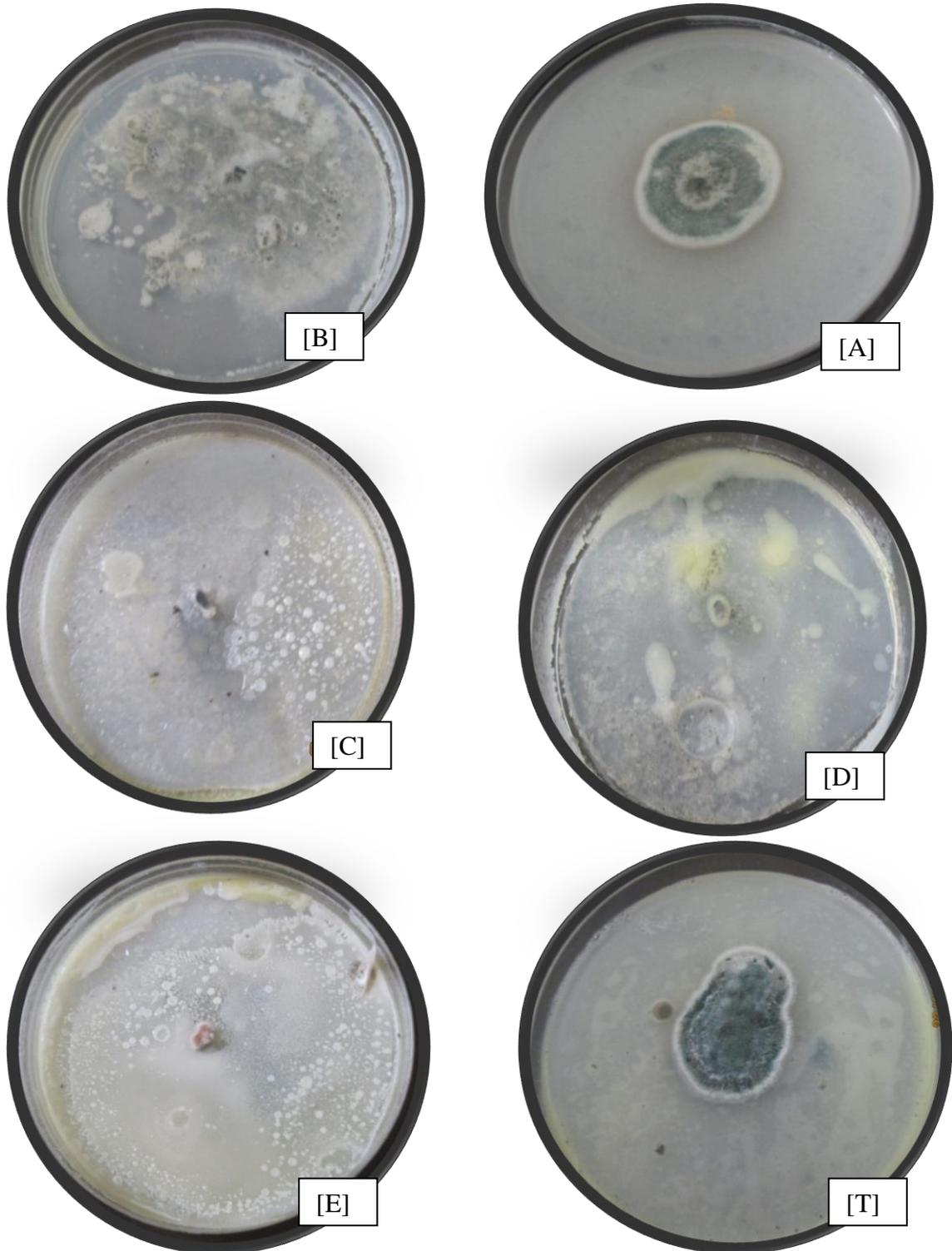
Annexes

Figure (42) : Photos représentant l'activité anti- *Aspergillus sp* de mélange préparé en présence des cendres et du beurre anhydre. (30mg/ml : [A]), (40 mg/ml : [B]), (50 mg/ml : [C]), (60 mg/ml : [D]), (70 mg/ml : [E]) et (Témoin : [T])



Annexes

Figure (43) : Photos représentant l'activité anti-*Aspergillus sp* de mélange préparé en présence des cendres et du beurre stérile et anhydre. (30mg/ml : [A]), (40 mg/ml : [B]), (50 mg/ml : [C]), (60 mg/ml : [D]), (70 mg/ml : [E]) et (Témoin : [T])



Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] Reichling J., Schnitzler P., Suschke U., Saller R. **2009**. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral and cytotoxic properties - an Overview. *Forsch Komplementmed.* 16. P: 79-90.
- [2] Beniston N.T., Beniston W.S. **1984**. Flore d'Algérie, entreprise nationale du livre. Alger. P : 08.
- [3] Mohand A.Y. **2006**. Plantes médicinales de Kabylie, édition Ibis press, Paris. P : 220-223.
- [4] Quezel P., Santa S. **1963**. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II Edition. CNRS. Paris.
- [5] Jean M.P., Simone D. **2001**. Plantes aromatiques et condimentaires, Lossange, P : 61.
- [6] Oxford Botanic Garden. **2003**. Robert haines plant pictures
- [7] Mimica. Dukić N., Bugarin D., Grbović S., Mitić-Ćulafić D., Vuković-Gačić B., Orčić D., Jovin E., Couladis M. **2010**. Essential oil of *Myrtus communis* L. as a potential antioxidant and antimutagenic agents. *Molecules.* 15. P: 2759-2770.
- [8] Coda L. **1998**. Il liquore di mirto: aspetti storiche tradizione; Confindustria della Sardegna: Cagliari, Italy. P : 11-34.
- [9] Jouad H., Maghrani M., Eddouks M. **2002**. Hypoglycemic effect of *Rubus fruticosus* L. and *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology.* 81, 3. P: 351- 356.
- [10] Photographies : Franck Le Driant / FloreAlpes.com, © 2003-2015
- [11] Le Floc'h E. **1983**. Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne. Programme. Flore et végétation tunisienne. Min. de l'En. Sup. et de la Rech. Sci. P : 387.
- [12] Kerharo J., Adam J.G. **1974**. La pharmacopée sénégalaise traditionnelle. Plantes médicinales et toxiques, Vigot frères, Paris. P : 1007.
- [13] Gibbs P.E. **1968**. Taxonomy and distribution of the genus *Calicotome*. *Notes Roy. Bot. Gard.* 28 : 275-286.
- [14] Tutin G.T. **1972**. Flora Europea. University Press, Cambridge.
- [15] Greuter W., Burdet H.M., Long G. **1989**. A critical inventory of vascular plants of the circum-mediterranean countries. Dicotyledones (Lauraceae-Rhamnaceae). Geneva, Switzerland, Med-Checklist 4.
- [16] Pistelli L., Fiumi C., Morelli I., Giachi I. **2003**. Flavonoids from *Calicotome villosa*. *Fitoterapia.* 74: 417-419.

Références bibliographiques

- [17] Dessí M.A., Deiana M., Rosa A., Piredda M., Cottiglia F., Bonsignore L., Deidda D., Pompei R., Corongiu F.P. **2001**. Antioxidant activity of extracts from plants growing in Sardinia. *Journal of Phytotherapy Research*, 15, 6. P: 511-518.
- [18] Domínguez E., Valdés B., Talavera S., Fernández-Galiano E. **1987**. *Calicotome villosa* Link. (Ed. Ketres). *Flora Vasculare de Andalucía Occidental*. 2. P: 45-170.
- [19] Lentini F., Aleo M., Amenta R. **1993**. L'uso popolare delle piante nelle Isole Egadi (Sicilia). *Giorn. Bot. Ital.* 127, 3: 702.
- [20] Hartwell J.L. **1982**. *Plants used against cancer. A survey*, USA7 Quarterman Publications, Lawrence, MA.
- [21] Bruneton J. **1999**. *Pharmacognosie-Phytochimie-Plantes médicinales*, 3.Ed. Tec& Doc, Paris.
- [22] Bousbia N. **2004**. *Extraction et identification de quelques huiles essentielles (Nigelle, Coriandre, Origan, Thym, Romarin), étude de leurs activités antibactériennes*. Thèse de Magistère. Option Sciences Alimentaires, INA. Algérie. P: 9-14.
- [23] Willem J.P. **2004**. *Les huiles essentielles, médecine d'avenir*. P : 318.
- [24] Berka Zougali B., Ferhat M.A., Hassani A., Chemat F., Allaf K. **2012**. Comparative study of essential oils extracted from Algerian *Myrtus Communis* L. leaves using microwaves and hydrodistillation. *Int. J. Mol. Sci.* 13. P: 4673-4695.
- [25] Penchev P.I. **2010**. *Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions*. Thèse de doctorat. Université de Toulouse, France.
- [26] Kim N.S., Lee D.S. **2002**. Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 98. P: 31-47.
- [27] Bernard T., Periau F., Brav O., Delmas M., Gaset A. **1988**. *Extraction des huiles essentielles*. Chimie et Technologie. Information chimie.
- [28] Luque de Castro M.D., Jiménez C.M.M., Fernández P. **1999**. Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. *Trends in Analytical Chemistry*, 18 (11). P : 708-716.
- [29] AFNOR. **2000**. *Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 1. Echantillonnage et méthodes d'analyse*. Paris. P : 440.
- [30] Richard H. **1992**. *Epices et aromates. Technologie et documentation-Lavoisier*. Paris. P : 339.
- [31] Robert G. **2000**. *Les sens du parfum*. Osman Eroylls Multimedia. Paris. P : 224.
- [32] Proust B. **2006**. *Petite géométrie des parfums*. Editions du Seuil. Paris. P : 126.

Références bibliographiques

- [33] Fontana A., **2007**. Les techniques thermiques : Pyrolyse-Thermolyse et Gazéification. Bruxelles. P : 1-13.
- [34] Constantin E. **1996**. Spectrométrie de masse, Lavoisier Tec & Doc, Paris. P: 1-14.
- [35] Pradeau D., Cohen Y. **1992**. L'analyse pratique du médicament, Ed. médicales internationales. P:418-428.
- [36] Everhart T.E. **1996**. Persistence pays off: Sir Charles Oatley and the scanning electron microscope, J. Vac. Sci. Technol.B. 14,6.
- [37] Ghesten A., Seguin E., Paris M., Orecchioni A.M. **2001**. Le préparateur en pharmacie dossier 2 "botanique-pharmacognosie- phytothérapie-homéothérapie". Paris Lavoisier Ed. P : 193-199-206-207.
- [38] Guignard J.L. **2000**. Biochimie végétale. Edition Masson. Paris.
- [39] Brada M., Bezzina M., Marlier M., Carlier A., Lognay G. **2007**. Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* du Nord de l'Algérie. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 11, 1. P: 3-7.
- [40] Flamini G., Tebano M., Ciano P.L., Ceccarini L., Ricci S.A., Longo I. **2007**. Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis* L. and a novel method which uses microwaves applied *in situ*, without resorting to an oven. Journal of Chromatography A. 1143. P: 36-40.
- [41] Ntezurubanza L. **2000**. In « Les huiles essentielles du Rwanda ». LASEVE-UQAC, Chicoutimi, Quebec.
- [42] Barry N. **2001**. Art d'extraire les huiles essentielles : De parfum à faire soi même. Ed: Tec & Doc. Lavoisier, Paris. P : 125-128.
- [43] Couderc V.L. **2001**. Toxicité des huiles essentielles. Thèse de grade Docteur Vétérinaire. Université Paul Sabatier de Toulouse. P : 61.
- [44] Karasse A. **1999**. Contribution à l'analyse physico-chimique de l'huile essentielle de la graine de *Foeniculum vulgare* Mill, et dosage des protéines et lipides. Thèse de D.E.S en biologie Univ de Tlemcen.
- [45] Perry N.B., Anderson R.E., Brenna N.J. **1999**. Essential oils from Dalmatian sage (*Salvia officinalis*): variation among individuals, plant parts, seasons and sites. J. Agric.Chem. 47, 5. P: 48-54.
- [46] Garnéro J. **1991**. Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. Ed: Techniques-Encyclopédie des médecines naturelles, Paris. P : 2-20.
- [47] Rowshan V., Najafian S., Tarakemeh A. **2012**. Essential oil chemical composition changes affected by leaf ontogeny stages of myrtle (*Myrtus communis* L.). Int. J. Med. Aroma. Plants. 2, 1. P: 114-117.

Références bibliographiques

- [48] Messaoud C., Zaouali Y., Ben Salah A., Khoudja M.L., Boussaid M. **2005**. *Myrtus communis* in Tunisia: variability of the essential oil composition in natural populations. *Flavour and Fragrance Journal*. 20. P: 577-582.
- [49] Huang H.S., Chang L.H., Jong T.T., Nien Y.F., Chang C.M.J. **1995**. Supercritical carbon dioxide extraction of turmeric oil from *Curcuma longa* Linn., and purification of turmerones. *Separation and Purification Technology*. 47. P: 119-125.
- [50] Fantino N.S. **1990**. Etude du polymorphisme au d'une population de lavande (*Lavandula angustifolia* Mill.). Détermination de critères précoces de sélection. Thèse de doctorat. Université de La Rochelle. P:41-45.
- [51] Carette A.S. **2000**. La lavande et son huile essentielle. Thèse de doctorat. Université de Toulouse. P:100.
- [52] Berka-Zougali B., Hassani A., Besombes C., Allaf K. **2010**. Extraction of essential oils from Algerian myrtle leaves using instant controlled pressure drop technology. *J. Chromatogr. A*, 1217. P: 6134-6142.
- [53] Ben Ghnaya A., Chograni H., Messoud C., Boussaid M. **2013**. Comparative chemical composition and antibacterial activities of *Myrtus communis* L. essential Oils isolated from Tunisian and Algerian population. *Plant. Pathology. Microbiology*. 4. P: 186.
- [54] Aidi Wannes W., Mhamdi B., Marzouk B. **2008**. GC comparative analysis of leaf essential oils from two myrtle varieties at different phenological stages. *Chromatographia*. J. 69. P: 145-150.
- [55] Gardeli C., Papageorgiou V., Mallouchos A., Theodosis K., Komaitis M. **2008**. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L. Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts, *Food Chem*, 107. P: 1120-1130.
- [56] Chalchat J.C., Garry R.P., Michet A. **1998**. Essential oil of Myrtle (*Myrtus Communis* L.) of the Mediterranean littoral. *Journal of Essential Oil Research*. 10. P: 613-617.
- [57] Nassar M., Aboutabl E.A., Ahmed R.F., El-Khrisy E.D.A., Ibrahim K.M., Sleem A.A. **2010**. Secondary metabolites and bioactivities of *Myrtus communis*. *Pharmacognosy Res*. 2. P: 325-329.
- [58] Ghasemi E., Raofie F., Mashkouri-Najafi N. **2010**. Application of response surface methodology and central composite design for the optimization of supercritical fluid extraction of essential oils from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chem*. 126. P: 1449-1453.
- [59] Owlia P., Saderi H., Rasooli I., Sefidkon F. **2009**. Antimicrobial characteristics of some herbal Oils on *Pseudomonas aeruginosa* with special reference to their chemical compositions. *Iran. J. Pharm. Res*. 8. P: 107-114.

Références bibliographiques

- [60] Ardakani A.S., Hosyninejad S.A., pourshirzad A. **2013**. Killing effects of *Myrtus communis* L. essential oil on *Meloidogyne incognita*. International Journal of Agriculture and Crop Sciences. IJACS. 5-8. P: 806-810.
- [61] Flamini G., Cioni P.L., Morelli I., Maccioni S., Baldini R. **2004**. Phytochemical typologies in some populations of *Myrtus communis* L. On Caprione Promontory (East Liguria, Italy). Food Chem. 85. P: 599-604.
- [62] Kelen M., Tepe b. **2008**. Chemical composition, antioxydant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. Bioresource Technology. 99. P: 4096-4104.
- [63] Curini M., Bianchi A., Epifano F., Bruni R., Torta L., Zambonelli A. **2003**. Composition and *in vitro* antifungal activity of essential oils of *Erigeron canadensis* and *Myrtus communis* from France. Chemistry of Natural Compounds. 39, 2. P: 191.
- [64] Rossi P.G., Beri L., Panighi J., Luciani A., Maury J., Muselli A. **2007**. Antibacterial action of essential oils of Corsica. J. Essent.oil Res. 19. P : 176.
- [65] Akin M., Aktumsek A., Nostro A. **2010**. Antibacterial activity and composition of the essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn and *Myrtus communis* L. growing in Northern Cyprus. African Journal of Biotechnology. 9, 4. P: 531-535.
- [66] Özek T., Demirci B., Baser K.H.C. **2000**. Chemical composition of Turkish myrtle oil. J. Essent. Oil Res. 12. P: 541-544.
- [67] Biricik H., Yesilbag D., Gezen S.S., Bulbul T. **2012**. Effects of dietary myrtle oil (*Myrtus communis* L.) supplementation on growth performance, meat oxidative stability, meat quality and erythrocyte parameters in quails. Revue Méd. Vét. 163, 3. P: 131-138.
- [68] Deshpande A., Verma S., Macwan C. **2014**. Allergic Reaction Associated with the use of Eugenol Containing Dental Cement in a Young Child. Austin J Dent. 1, 2. P: 1007.
- [69] Pereira P.C., Cebola M.J., Bernardo-Gil M.G. **2009**. Evolution of the yields and composition of essential oil from Portuguese myrtle (*Myrtus communis* L.) through the Vegetative Cycle. Molecules 14. P: 3094-3105.
- [70] Jukić M., Miloš M. **2005**. Catalytic oxidation properties of thyme essential oils (*Thymus Vulgarae* L.). Croat. Chem. Acta. 78. P: 105-110.
- [71] Asllani U. **2000**. Chemical composition of Albanian myrtle oil (*Myrtus communis* L.). J. Essent. Oil Res. 12(2). P: 140-142.
- [72] Jamoussi B., Romdhane M., Abderraba A., Ben Hassine B., El Gadri A. **2005**. Effect of harvest time on the yield and composition of Tunisian myrtle oils, Flavour. Fragrance. J. 20. P: 274-277.
- [73] Boelens M.H., Jimenez R. **1992**. The chemical composition of Spanish myrtle oils. Part II. J. Essent. Oil. Res. 4. P: 349-353.

Références bibliographiques

- [74] Pauli A. **2001**. Antimicrobial properties of essential oil constituents. *International Journal of Aromatherapy*. 11. P: 126-133.
- [75] Salvagnini L.E., Oliveira J.R.S., Dos Santos L.E., Moreira R.R., Pietro R.C.L.R. **2008**. Evaluation of the antibacterial activity of *Myrtus communis* (Myrtaceae) leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia-Bazilian J. Pharmacog.* 18. P: 241-244.
- [76] Zanetti S., Cannas S., Molicotti P., Bua P., Cubeddu M., Porcedda S., Marongiu B., Sechi A. **2010**. Evaluation of the Antimicrobial properties of the essential oil of *Myrtus communis* L. against clinical strains of *Mycobacterium* spp. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* P: 1-3.
- [77] Deriu A., Branca G., Molicotti P., Pintore G., Chessa M., Tirillini B., Paglietti B., Mura A., Sechi L. A., Fadda G., Zanetti S. **2007**. *In vitro* activity of essential oil of *Myrtus communis*. L. against *Helicobacter pylori*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 30. P: 562-565.
- [78] Hemaiswarya S., Doble M. **2009**. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against gram negative bacteria. *Phytomedicine*. 16. P: 997-1005.
- [79] Guerin-Faubleee V., Carret G. **1999**. L'antibiogramme, principes, méthodologie, intérêts et limites. *Journées Nationales GTV- INRA*. P: 5-12.
- [80] Mann C.M., Markham J.L. **1998**. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 84. P: 538-544.
- [81] Haddouchi F., Lazouni H., Ahammer K.A., Carson C.F., Riley T.V. **1999**. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. 86. P: 985-990.
- [82] Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R., Wyllie S.G. **2000**. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*. 88. P: 170-175.
- [83] Franchomme P., Pénoel D., Reverdy M.E. **1990**. Clefs pour l'aromathérapie. La molécule aromatique: matière, énergie, information. L'aromathérapie exactement. R.J. Editeur. Limoges. 2. P: 73-227.
- [84] Rhayour K. **2002**. Thèse de doctorat " Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum* ", Université de Mohamed Ben Abdallah Fès.
- [85] Dorman H.J.D., Deans S.G. **2000**. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88, 2. P: 308-316.
- [86] Oussalah M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M. **2006**. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 69, 5. P : 1046-1055.

Références bibliographiques

- [87] Belaïche P. **1979**. Traité de phytothérapie et l'aromatothérapie. Tome I: L'aromatogramme. Ed: maloine S.A. Paris. P: 204.
- [88] Leclerc H. **1999**. La nouvelle phytothérapie. Paris ED ROMAT. P : 68.
- [89] Oussou K.R., Coffi K., Nathalie G., Seriyolou, Gerard K., Mireille D., Yao T.N., Gilles F., Jean-Claude C.H. **2004**. Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. Comptes Rendus de Chimie, 7. P : 1081-1086.
- [90] Teixeira-Duarte M.C., Mara Figueira G., Sartoratto A. **2005**. Anti-*candida* activity of Brazilian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, 97. P: 305-311.
- [91] Omidbeygi M., Barzegar M., Hamidi Z., Naghdibadi H. **2007**. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus xavus* in liquid medium and tomato paste. Food Control, 18. P: 1518-1523.
- [92] Jaset-Dongmo P.M., Tatsadjieu N.L., Tchinda Sonwa E., Kuate J., Amvam Zollo P.H., Menut C. **2008**. Antiradical potentiel and antifungal activities of essential oils of the leaves of *Eucalyptus saligna* and *E. camaldulensis* against *Phaeoramularia angolensis*. African Journal of Biotechnology, 7. P: 4045-4050.
- [93] Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R., Wyllie S.G. **2000**. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Journal of Applied Microbiology, 88. P: 170-175.
- [94] Yen T.B., Chang S.T. **2008**. Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi. Bioresource Technology., 99. P: 232-236.
- [95] Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon H. **2001**. Les antioxydants dans les aliments. Les applications pratiques. Wood head Publishing limited. CRC Press. Cambridge Angleterre.
- [96] Kalayasiri P., Jeyashoke N., Krisnangkura K. **1996**. Survey of Seed Oils for Use as Diesel Fuels. JAOCS, 73 (4). P: 471-474.
- [97] Legrand G. **1986**. Manuel du préparateur en pharmacie, 10^{ème} édition Masson, Paris. P : 618.
- [98] Legrand G. **1993**. 12^{ème} édition par J.M Aiache : Manuel du préparateur en pharmacie à l'usage des élèves préparateurs, préparateurs et étudiants stagiaires en pharmacie. P : 644.
- [99] Koné S. **1993**. Contribution à la formulation de pommades dermiques à base d'extraits de plantes à propriétés antifongiques et antibactériennes. Thèse de Doctorat en Pharmacie – Bamako. P : 85.
- [100] Konipo A. **2001**. Etude du marché des Médicaments Traditionnels Améliorés (M.T.A) et mise au point de pommades dermiques à base de *Mitracarpus scaber*- Zucc (Rubiaceae); Thèse de Doctorat en Pharmacie – Bamako. P : 77.
- [101] Ezema D.O., Ozioko P.O. **1990**. *Butyrospermum* lipids as an ointment base. International Journal of Pharmacognosy, 30 (2). P: 117-123.

Références bibliographiques

- [102] Dreux G. **1998**. "Nouveau guide du béton " Edition, Eyrolles-Paris. P : 29-41.
- [103] Djobo yankwa J.N. **2013**. Effets de l'incorporation d'adjuvants minéraux sur les propriétés de ciments géopolyinères à base scories volcanique.
- [104] Kerbouche A., Mouli M., Laoufi L, Senhadji Y., Benosmane S. (Faculté des sciences, Laboratoire de Chimie des Polymères, Université d'Oran, Essénia, Oran) (Influence des ajouts minéraux sur les résistances mécaniques des mortiers).
- [105] Bouabdelli F., Djelloul A., Kaid-Omar Z., Semmoud A., Addou A. **2012**. Antimicrobial Activity of 22 Plants Used in Urolithiasis Medicine in Western Algeria. Asian Pacific Journal of Tropical Disease. P: S530-S535.
- [106] Hayder N., Kilani S., Abdelwahed A., Mahmoud A., Meftahi K., Ben Chibani J., Ghedira K., Chekir-Ghedira L. **2003**. Antimutagenic activity of aqueous extracts and essential oil isolated from *Myrtus communis*. Pharmazie 58. P: 25-27.
- [107] Amensour M., Bouhdid S., Fernández-López J., Idaomar M., Senhaji N.S., Abrini J. **2010**. Antibacterial activity of extracts of *Myrtus communis* against food-borne pathogenic and spoilage bacteria. International Journal of Food Properties. 13(6). P: 1215-24.
- [108] Dell'Agli M., Sanna C., Rubiolo P., Basilico N., Colombo E., Scaltrito M. M., Ndiath M.O., Maccarone L., Taramelli, D., Bicchi C., Ballero M., Bosisio E. **2012**. Anti-plasmodial and insecticidal activities of the essential oils of aromatic plants growing in the Mediterranean area. Malaria Journal. 11. P: 219.
- [109] Cannas S., Molicotti P., Ruggeri M., Cubeddu M., Sanguinetti M., Marongiu B., Zanetti S. **2013**. Antimycotic activity of *Myrtus communis* L. towards *Candida spp.* from clinical isolates. J Infect Dev Ctries. 7(3). P: 295-298.
- [110] Kivanc M., Akgul A. **1986**. Antibacterial Activities of Essential Oils from Turkish Species and Citrus. Flavour. Fragr. J. 1. P: 175-179.
- [111] Senatore F., Formisano C., Napolitano F., Rigano D., Özcan M. **2013**. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Myrtus communis* L. growing wild in Italy and Turkey. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 9(2). P: 162-169.
- [112] Tuba Mert., Tuğçe Fafal., Bijen Kivçak., Tansel Öztürk. **2008**. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Myrtus communis* L. J. Fac. Pharm, Ankara. 37, 3. P: 191-199.
- [113] Ahmed M., Al-zohyri A.A., Al-jeboory., Abdul-latif M. Jawad. **1985**. Cardiovascular and antimicrobial effects of *Myrtus communis*. Indian journal of pharmacology. 77. P: 233-235.
- [114] Al Laham SH., Al Fadel F. **2013**. Antibacterial effectiveness of many plants extracts against the resistant Negative Coagulase *Staphylococcus* that cause Clinical Mastitis in Cows. International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 5, 2. P: 72-78.

Références bibliographiques

- [115] Aboutabl E.A., Meselhy K.M., Elkhreisy E.M., Nassar M.I., Fawzi R. **2013**. Composition and Bioactivity of Essential Oils from Leaves and Fruits of *Myrtus communis* and *Eugenia supraxillaris* (Myrtaceae) Grown in Egypt. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. P: 192-200.
- [116] Yadegarinia D., Gachkar L., Bagher Rezaei M., Taghizadeh M. S., Astaneh Al., Rasooli I. **2006**. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochemistry*. 67. P: 1249-1255.
- [117] Gholamhoseinian Najar A., Mansouri S., Rahighi S. **2009**. Effects of sub-inhibitory concentrations of *Myrtus communis* leave extracts on the induction of free radicals in *staphylococcus aureus*; A possible mechanism for the antibacterial action. *Asian journal of plant sciences*. 8, 8. P: 551-556.
- [118] Ghasemi Pirbalouti A., Jahanbazi P., Enteshari S., Malekpoor F, Hamed B. **2010**. Antimicrobial activity of some Iranian medicinal plants. *Arch. Bio. Sci., Belgrade*, 62, 3. P: 633-642.
- [119] Keyhanfar M., Nazeri S., Bayat M. **2011**. Evaluation of antibacterial activities of some medicinal plants traditionally used in Iran. *Iranian journal of pharmaceutical sciences*. 8, 1. P: 353-358.
- [120] Suhad A.A., Abbas A.M., Wasnaa H.M., Ali H.S. **2013**. Effect of methanolic extract of *Myrtus Communis* on Some Pathogenic Bacteria. *Eng. Tech. Journal*. Vol. 31. N°2. P: 122- 129.
- [121] Faisal S., Zaidi H., Yamada K., Kadowaki M., Usmanghani K., Sugiyama T. **2009**. Bactericidal activity of medicinal plants, employed for the treatment of gastrointestinal ailments, against *Helicobacter pylori*. *Journal of Ethnopharmacology*. 121. P: 286-291.
- [122] Twidwell E.K., Wagner J.J., Thiex Nancy J. **2002**. Use a Microwave Oven to Determine Moisture Content of Forages. *Ex 8077*. P : 2.
- [123] Peyron L., Richard H. **1992**. L'extraction des épices et herbes aromatiques et les différents types d'extraits. In Richard H (coordonnateur) *Epice et Aromates*. Tec et Doc-Lavoisier, Apria.
- [124] Carée P. **1953**. Précis de technologie et de chimie industrielle. Tome III. Ed: Ballière J.B.et fils.
- [125] Bachelot C., Blaise A., Corbel T., Le Guernic A. **2006**. Les huiles essentielles: extraction et comparaison. *U.C.O Bretagne*. P : 1-18.
- [126] Chae-Bin Y., Ki-Tae H., Kyu-Seok C., Joohun H., Hee-Juhn P., Jung-Hwan N., Uk-Hyun K., Kyung-Tae L. **2005**. Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Cancer Letters*., 225: 41-52.
- [127] Linden G. **1981**. Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Ed collection sciences et techniques. Paris. P : 434.
- [128] A.F.E.S (Association Française de l'étude des sols). **1995**. Référentiel pédologique. INRA, Paris. P : 329.

Références bibliographiques

- [129] Bouchonnet S., Hoppilliard Y., Kargar-Grisel T. **1999**. Les différents types de spectromètres de masse utilisés pour l'analyse des composés organiques et bio-organiques. *Spectra Analyse*. 207. P : 11-25.
- [130] Cavallo J.D. **2007**. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.
- [131] Singleton P. **1999**. Bactériologie. Ed: Dunod (4^{ème} édition). P : 153-156.
- [132] BioMérieux, Marcy l'étoile, 69260 Charbonnière France. In Gay L., Joffin J. N. **1998**. Microbiologie techniques; collection biologie, 2^{ème} édition aquitaine. P : 76-192.
- [133] Cavallo J.D., Mérens A. **2008**. Antibacterial spectrum of an antibiotic and clinical categorization. *Pathologie Biologie*, 56. P: 300-304.
- [134] Prabuseenivasan S., Jayakumar M., Ignacimuthu S. **2006**. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement. Altern. Med.* P: 6-39.
- [135] Moulari B. **2005**. Propriétés antimicrobiennes in vitro d'extraits de deux plantes africaines - rôle de l'Astilbine - potentialisation du pouvoir antibactérien par nanoencapsulation. Thèse de Doctorat. Université Franche-comté, France. P : 209.
- [136] CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute). **2006**. Approved Standard M100-S12. NCCLS, methods for dilution antimicrobial susceptibility tests of bacterial that grow aerobically. 7th ed. PA: Wayne.
- [137] Andrews J.M. **2001**. The development of the BSAC standardization method of disc diffusion testing JAC. Ed: British society for antimicrobial chemotherapy. 48, S1: 29-42.
- [138] Ponce A.G., Fritz R., DEL Valle C., Roura S.I. **2003**. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaftund Technologic*, 36. P: 679-684.
- [139] Kamagate A., Kone D., Coulibaly N.T., Brou E., Sixou M. **2001**. Etude comparative de différentes méthodes d'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies strictes de la flore sous gingivale. *Odonto-Stomatologie Tropicale*. N°95.
- [140] Ganiere J.P., Mangion C., Peridy M. **2004**. Détermination des concentrations Minimales Inhibitrices et Bactéricides de la cefquinome, la marbofloxacin, la tylosine et la spiramycine en solution dans du lait vis-à-vis de bactéries isolées de mammites bovines. *Revue médecine vétérinaire*. 155, 8, P : 411- 416.
- [141] Burits M., Bucar F. **2000**. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*, 14. P: 323-328.
- [142] Mighri H., Hajlaoui H., Akrouit A., Najjaa H., Neffati M. **2010**. *Comptes Rendus Chimie*, 13. P: 380-386.

Références bibliographiques

- [143] Molyneux P. **2004**. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26 (2). P: 211-219.
- [144] Prakash D., Upadhyay G., Brahma N., Singh H.B. **2007**. Singh antioxidant and free radical scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycinemax*). *Food Chemistry.* (104). P: 783-790.
- [145] Prieto P., Pineda M., Aguillar M. **1999**. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of phosphomolybdenum complex: specific application to determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269. P: 337-341.
- [146] Yildirim A., Mavi A., Kara A.A. **2001**. Determination of Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Rumex crispus* L. Extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 49. P: 4083-4089.
- [147] Ruch R.J., Cheng S.J., Klaunig J.E. **1989**. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis.*, 10. P: 1003-1008.
- [148] Belhattab R., Boudjouref M., Barroso J.G., Pedro L.P., Figueirido A.C. **2011**. Essential oil composition from *Artemisia campestris* grown in Algeria. *Advances in Environmental Biology*, 5 (2). P: 429-432.
- [149] Chang S.T., Wang S.Y., Wu C.L., Su Y.C, Kuo, Y.H. **1999**. Antifungal compounds in the ethyl acetate soluble fraction of the extractives of Taiwania (*Taiwania cryptomerioides* Hayata) heartwood. *Holzforschung*. P: 53-487-490.
- [150] Berghe V.A., Vlietinck A.J. **1991**. Screening Methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. *Method for Plant Biochemistry* 6, P: 47-68.
- [151] Leite de Souza E., Edeltrudes de Oliveira L., De Luna K.R. **2005**. Brazilian archives of biology and technology. 48, 2, P: 245- 250.
- [152] Paris R., Moyses H. **1969**. Précis de matière médicinale. Paris, Masson.
- [153] Zrira S., Elamrani A., Benjilali B. **2003**. Chemical composition of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Morocco - A seasonal variation, Flavour. *Fragrance. Journal*, pp. 18. P: 475-480.
- [154] Besombes C., **2008**. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse Doctorat. Université de La Rochelle. P: 41-45.
- [155] Jerkovic I., Radonic A., Borcic I. **2002**. Comparative study of leaf, fruit and flower essential oils from Croatian *Myrtus communis* L. during a one-year vegetative cycle. *Journal of Essential Oil Research*. 14. P: 266-270.
- [156] Zheng G.Q., Kenney P.M., Lam L.K.T. **1992**. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. *J. Nat. Prod.*, 55. P: 999-1003.

Références bibliographiques

- [157] Ramdani M., Lograda T., Ounoughi A., Chalard P., Figueredo G., Laidoudi H., Elkolli M. **2014**. Chemical composition, Antimicrobial activity and chromosome number of *Globularia alipum* from Algeria. *J.Curr. Microbiol.App.Sci.*, 3, 7. P: 306-318.
- [158] Abdelwahab S.I., Adam Mariod A., Elhassan Taha M.M., Qamaruz Zaman F., Ahmed Abdelmageed A.H., Khamis S., Sivasothy Y., Awang K. **2014**. Chemical composition and antioxidant properties of the essential oil of *Cinnamomum altissimum Kosterm.* (Lauraceae). *Arabian Journal of Chemistry*. 1878-5352.
- [159] Santanu Kar M., Somenath R. **2014**. Phytopharmacological approach of free radical scavenging and anti-oxidative potential of eugenol and *Ocimum gratissimum* Linn. *Asian Pac J Trop Med.*, 7(Suppl 1). P: S391-S397.
- [160] Pascual-Villalobos M.J., Ballesta-Acosta M.C. **2003**. Chemical variation in an *Ocimum basilicum germplasm* collection and activity of the essential oils on *Callosobruchus maculatus*. *Biochemical Systematics and Ecology.*, 31, 7. P: 673-679.
- [161] Milos M., Mastelic J., Jerkovic I. **2000**. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare*, L. ssp. *hirtum*). *Food Chemistry.*, 71. P: 79-83.
- [162] Sereshti H., Karimi M., Samadi S. **2009**. Application of response surface method for optimization of dispersive liquid-liquid microextraction of water-soluble components of *Rosa damascena* Mill. essential oil. *Journal of Chromatography A.*, 1216. P: 198-204.
- [163] Rasooli I., Moosavi M. L., Rezaee M. B., Jaimand K. **2002**. Susceptibility of Microorganisms to *Myrtus communis*. L. Essential Oil and its Chemical Composition. *J. Agric. Sci. Technol.* Vol. 4. P: 127-133.
- [164] Mahboubi M., Ghazian Bidgoli F. **2010**. *In vitro* synergistic efficacy of combination of amphotericin B with *Myrtus communis* essential oil against clinical isolates of *Candida albicans*. *Phytomedicine*. 17. P: 771-774.
- [165] Bouzouita N., kachouri F., Hamdi M., Chhbouni M.M. **2003**. Antimicrobial activity of essential oils from Tunisian aromatic plants. In *Flav. Fragr. J.* vol. 18. P: 380-383.
- [166] Scora, R.W. **1973**. Essential leaf oil variability in green, variegated and albino foliage of *Myrtus communis*. *Phytochemistry*. 12. P: 153-155.
- [167] Tkachev A.V., Korolyuk E.A., Letchamo W. **2006**. Volatile oil-bearing flora of siberia VII: essential oil composition and antimicrobial activity of wild *Solidago virgaurea* L. from the Russian Altai. *J. Essent. Oil Res.* 18. P: 46-48.

Références bibliographiques

- [168] Harzallah H.J., Neffati A., Skandrani I., Maaloul E., Ghedira L.C., Mahjoub T. **2010**. Antioxidant and antigenotoxic activities of *Globularia alypum* leaves extracts. Journal of medicinal plants research. 4, 19. P: 2048-2053.
- [169] Baskaran Y., Periyasamy V., Venkatraman A.C. **2010**. Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. Toxicology., 268. P: 204-212.
- [170] Hemaiswarya S., Doble M. **2009**. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against gram negative bacteria. Phytomedicine. 16. P: 997-1005.
- [171] Gülçin İ. **2011**. Antioxidant activity of eugenol: a structure-activity relationship study. J Med Food., 14, 9. P: 975-85.
- [172] François J., Chomarat M., Weber M.A., Gérard J. **2003**. De l'antibiogramme à la prescription. Biomériaux (2^{ème} édition). P : 8-22.
- [173] Bryskier A. **1999**. Fluoroquinolones (II). Usage en thérapeutiques et tolérance. Encycl Méd Chir, Maladies infectieuses. P: 14.
- [174] Yrjönen T. **2004**. Extraction and Planar Chromatographic Separation Techniques in the Analysis of Natural Products. Conference Room 513 at Viikki Infocentre (Viikinkaari 11), Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki. P: 64.
- [175] Ponce A.G., Fritz R., Delvalle C., Roura S.I. **2003**. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. 36, P: 679-684.
- [176] Ciccarelli D., Garbari F., Pagni A.M. **2008**. The flower of *Myrtus communis* (Myrtaceae): Secretory structures, unicellular papillae, and their ecological role. Flora. 203. P: 85-93.
- [177] Salvagnini L.E., Oliveira J.R.S., Dos Santos L.E., Moreira R.R., Pietro R.C.L.R. **2008**. Evaluation of the antibacterial activity of *Myrtus communis* (Myrtaceae) leaves. Revista Brasileira de Farmacognosia-Bazilian J. Pharmacog. 18. P: 241-244.
- [178] Gündüz G.T., Gönül Ş.A., Karapinar M. **2009**. Efficacy of myrtle oil against *Salmonella Typhimurium* on fresh produce. International Journal of Food Microbiology. 130. P: 147-150.
- [179] Yildirim A., Mavi A., Kara A.A. **2001**. Determination of Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Rumex crispus* L. Extracts. J. Agric. Food Chem., 49. P: 4083-4089.
- [180] Aidi Wannes W., Mhamdi B., Sriti J., Ben Jemia M., Ouchikh O., Hamdaoui G., Kchouk M.E., Marzouk B. **2010**. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. Food and Chemical Toxicology. 48. P: 1362-1370.
- [181] Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., **2001**. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. Journal of Applied Microbiology. 91. P: 492-497.

Références bibliographiques

- [182] Randrianarivelo R., Sarter S., Odoux E., Brat P., Lebrun M., Romestand B., Menut C., Andrianoeliso H.S., Raherimandimby M., Danthu P. **2009**. Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. Food Chem 114. P: 680-4.
- [183] Rosato A., Vitali C., De Laurentis N., Armenise D et al. **2007**. Antibacterial effect of some essential oils administrated alone and in combination with norfloxacin. Phytomedicine. 14. P: 727-732.
- [184] Mulyaningsih S., Sporer F., Zimmermann S., Reichling J., Wink M. **2010**. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globules* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. Phytomedicine. 17. P: 1061-1066.
- [185] Tserennadmid R., Takó M., Galgóczy L., Papp T., Pesti M., Vágvölgyi C., Almássy K., Krisch J. **2011**. Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. Int. J. Food Microbiol. 144. P: 480-486.
- [186] Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V. **2004**. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. J. Antimicrob. Chemother. 12. P: 1-5.
- [187] Gao Y., Van Belkum M.J. Stiles M.E. **1999**. The outer membrane of Gram-negative bacteria inhibits antibacterial activity of brochocin-C. Appl. Environ.Microb. 65. P: 4329-4333.
- [188] Prior R.I., Wu X.L., Schaich K. **2005**. Standardizes methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J. Agric Food Chem, 53, 10. P: 4290-4302.
- [189] Yi Z., Yan Y., Liang Y., Zeng B. **2008**. *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of Pericarpium Citri Reticulatae of a new Citrus Cultivar and its main flavonoid. LWT, 41. P: 597-603.
- [190] Ben Mansour R., Gargouri B., Gargouri B., Elloumi N., Ben haj Jilani I., Ghrabi Gammar Z., Lassoued S. **2012**. Investigation of antioxidant activity of alcoholic extract of *Globularia alypum L.* Journal of Medicinal Plants Research. Vol. 6, 25. P: 4193-4199.
- [191] Daycem K., Moktar H., El Hayouni A., Cazaux S., Souchard J.P., Couderc F., Bouajila J. **2011**. Global chemical composition and antioxidant and anti-Tuberculosis activities of various extracts of *Globularia alypum L.* (Globulariaceae) leaves. Molecules. 16. P: 10592-10603.
- [192] Kang D.G., Yun C.K., Lee H.S. **2003**. Screening and comparison of antioxidant activity of extracts of herbal medicines used in Korea. Journal of Ethnopharmacol. 87. P: 231-236.
- [193] Es-Safi N., Kollmann A., Khlifi S., Ducrot P.H. **2007**. Antioxidative effect of compounds isolated from *Globularia alypum L.* structure–activity relationship LWT. 40. P: 1246-1252.
- [194] Djeridane A., Yousfi M., Brunel J.M., Stocker P. **2010**. Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the *in vitro* antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. Food.Chem.Toxicol., 48. P: 2599-2606.

Références bibliographiques

- [195] Yousef M.I., Awad T.I., Elhag F.A., Khaled F.A. **2007**. Study of the protective effect of ascorbic acid against the toxicity of stannous chloride on oxidative damage, antioxidant enzymes and biochemical parameters in rabbits. *Toxicology*. 235. P : 194-202.
- [196] Rached W., Benamar H., Bennaceur M., Marouf A. **2010**. Screening of the antioxidant potential of some Algerian indigenous plants. *Journal of biological sciences*. 10, 4. P: 316-324.
- [197] Schwarz K., Huang S.W., German B.J. et al. **2000**. Activities of antioxidants are affected by colloidal properties of oil-in-water and water-in-oil emulsions and bulk oils. *J. Agric. Food Chem.* 48. P: 4874-4882.
- [198] Cheng S.S., Liu J.Y., Chang E.H., Chang S.T. **2008**. Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. *Bioresource Technology*., 99, 11. P: 5145-5149.
- [199] Awah F.M., Verla A.W. **2010**. Antioxidant activity, nitric oxide scavenging activity and phenolic contents of *Ocimum gratissimum* leaf extract. *J Med Plant Res*. 4, P: 2479-2487.
- [200] Fujisawa S., Atsumi T., Kadoma Y. **2002**. Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. *Toxicology*. 177. P: 39-54.
- [201] Khare A.K., Biswas A.K., Sahoo J. **2014**. Comparison study of chitosan, EDTA, eugenol and peppermint oil for antioxidant and antimicrobial potentials in chicken noodles and their effect on colour and oxidative stability at ambient temperature storage. *LWT - Food Science and Technology*., 55. P: 286-293.
- [202] Nagababu E., Rifkind J.M., Sesikeran B., Lakshmaiah N. **2010**. Assessment of antioxidant activities of eugenol by *in vitro* and *in vivo* methods. *Methods Mol Biol*., 610. P: 165-180.
- [203] Hendra R., Ahmad S., Oskoueian E., Sukari A., Shukor M.Y. **2011**. Antioxidant, Anti-inflammatory and Cytotoxicity of *Phaleria macrocarpa* (Boerl.) Scheff Fruit. *BMC Complement Altern Med*., 11. P: 110.
- [204] Miliauskas G., Venskutonis P.R., Van Beek T.A. **2004**. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem*, 85. P: 231-237.
- [205] Ksouri R., Megdiche W., Falleh H., Trabelsi N., Boulaaba M., Smaoui A., Abdelly C. **2008**. Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *C. R. Biol*, 331, P: 865- 873.
- [206] Bourgou S., Ksouri R., Bellila A., Skandrani I., Falleh H., Marzouk B. **2008**. Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *C.R. Biologies*, 331. P: 48-55.
- [207] Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C. **2008**. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C.R. Biologies*, 331. P: 372-379.

Références bibliographiques

- [208] Horchani F., Aschi-Smiti S., Brouquisse R. **2010**. Involvement of nitrate reduction in the tolerance of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants to prolonged root hypoxia. *Acta Physiol.Plant.* 32. P: 1113-1123.
- [209] Loo A.Y., Jain K., Darah I. **2008**. Antioxidant activity of compounds isolated from the pyroligneous acid, *Rhizophora apiculata*. *Food Chem.*, 107. P: 1151-1160.
- [210] Es-Safi N., Khlifi S.L., Albert K., Ducrot K.P.H. **2005**. Antioxidant constituents of the aerial parts of *Globularia alypum* growing in Morocco. *J. Nat. Prod.*, 68. P : 1293-1296.
- [211] Marfak A. **2003**. Thèse: Radiolyse gamma des Flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: Formation de despides, Université de Limoges. P : 30-40.
- [212] Foti M., Piattelli M., Baratta M.T., Ruberto G. **1996**. Flavonoids, coumarins, and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. Structure-activity relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 44. P: 497-501.
- [213] El Antri A., Messouri I., Bouktaib M., El Alami R., Bolte M., El Bali B., Lachkar M. **2004**. Isolation and X-ray crystal structure of a new isoquinoline-N-oxide alkaloid from *Calycotome villosa* subsp. *intermedia*. *Fitoterapia.* 75: 774-778.
- [214] Elkhamlichi A., El Antri A., El Hajaji H., El Bali B., Oulyadi H., Lachkar M. **2014**. Phytochemical constituents from the seeds of *Calycotome villosa* subsp. *intermedia*. *Arabian Journal of Chemistry.*
- [215] De la Torre M.A., Gomez-Alarcon G., Palacios J.M. **1993**. Vitro biofilm formation by *Penicillium frequentans* strains on sandstone, granite and limestone. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 408-415.
- [216] Martínez, C.E., Motto, H.L. **2000**. Solubility of lead, zinc, and copper added to mineral soils. *Environ. Pollut.* 107: 153-158.