



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur Et de la Recherche Scientifique  
UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID-TLEMEN



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA)

MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de **Master**

**Filière** : Sciences Alimentaires

**Spécialité** : Nutrition et Diététique

Présenté par :

**Abderrahmane Nassima**

**Benbakhti Wafae**

**Thème** :

***Activités biologiques de l'huile essentielle du Cupressus sempervirens L. (Cyprès) de la région de Tlemcen***

Date de soutenance : 15/06/2023

Devant le jury composé de :

<b>BENAMAR DIB H.</b>	MCA	Université de Tlemcen	<b>Présidente</b>
<b>CHAUCHE MT.</b>	MCA	Université de Tlemcen	<b>Examineur</b>
<b>BEKKARA SELADJI M.</b>	MCA	Université d'Oran 1	<b>Encadrante</b>

Année universitaire : 2022-2023

## **Remerciement :**

En tout premier lieu, nous remercions le bon Dieu Tout Puissant de nous avoir donné courage, volonté et patience pour dépasser toutes les difficultés.

Nous voudrions remercier chaleureusement notre encadrante Mme SELADJI Meryem, Maître de conférences A au département de Biologie, Faculté SNV - Université d'Oran 1, d'avoir accepté de nous encadrer, pour toute son aide, sa disponibilité, son suivi et sa confiance.

Nous remercions vivement Mme BENAMAR DIB Hanane, Maître de conférences A au Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université de Tlemcen, de nous avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Nos remerciements vont également à Mr CHAUCHE Mohammed Tarik, Maître de conférences A au Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université de Tlemcen d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous tenons aussi à remercier toute l'équipe du Laboratoire des Produits Naturels « LAPRONA », particulièrement les doctorantes : M<sup>elle</sup> BENAMEUR Meriem, M<sup>elle</sup> SENHADJI Souad et M<sup>elle</sup> BELARBI Chahrazed pour, pour leurs aides précieuses et leurs disponibilités. Sans oublier l'ingénieure du laboratoire Mme AMICHE Fatima, à qui nous adressons un grand merci.

En guise de reconnaissance, nous tenons à témoigner nos sincères remerciements à toutes personnes ayant contribué de près ou de loin au bon déroulement de ce modeste travail.

## ***Dédicace :***

Avant toute chose, je tiens à remercier Dieu le tout puissant pour nous avoir donné la force et la patience

Je présente ma profonde gratitude et mes chaleureux et vifs remerciements à mes très chers parents « **MOHAMED** » et « **FATIMA** » pour leur encouragement, leur patience et leurs sacrifices, pour leur soutien moral et financier

Je dédie ce modeste travail,

Mes meilleurs Avant toute chose ma sœur **BOUCHRA** et mon frère **YOUCEF** à qui

Je souhaite le succès et le, bonheur durant leur vie.

, et mes plus proches amies : **NASSIMA, RAHMA** et **IBTISSAM**

A ma chère encadrante madame **SELADJI MERYEM**

Encore un grand merci à tous de m'avoir conduit à ce jour

**Wafae**

## **Dédicace :**

Au dernier échelon de l'échelle et au moment le plus fier où la fatigue et l'effort nous ont lavés avec l'eau du succès pour garder la réalité blanche et belle....

Je dédie la récompense de cette recherche à celui qui a eu le mérite de se plonger dans les domaines de la science, « **mon cher père** »

Je dédie le fruit de mes efforts et de mes études à celle qui a été mon refuge et celle qui a inspiré sa langue à prier pour moi, « **ma chère maman** »

Et aux bougies qui illuminent le chemin pour moi, mes frères **Oussama, Abdeljalil et Nabil**, et mes sœurs **Fozia et Zakia**, et leurs **enfants**.

Surtout mon soutien dans la vie (mon frère **Abde Nour**), qui a eu un grand impact en supprimant de nombreux obstacles et difficultés, il a été mon ombre quand j'étais fatigué et mon compagnon dans cette réussite.

Et pour celle qui m'a réuni avec les plus belles coïncidences de la vie, elle était la meilleure compagne et la meilleure des amies, **Manel**

A une amie avec qui j'ai passé de beaux moments durant mes études à l'université, **Wafae**

A tous mes honorables professeurs

**Merci à tous**

**Nassima**

## Table des matières :

Remerciement.....	i
Dédicace .....	ii
Dédicace .....	iii
Table des matières .....	i
List de figures.....	iv
Liste des tableaux .....	v
Liste Des abréviations .....	vi
Introduction générale.....	1
Chapitre 1 : Présentation de plante.....	3
1 Présentation de la famille des cupressacées .....	3
2 Genre <i>Cupressus</i> .....	3
3 Présentation de la plante étudiée.....	3
Description botanique.....	3
Description systématique de cyprès .....	5
Usages thérapeutiques .....	5
Travaux intérieurs.....	6
Chapitre II : Les huiles essentielles .....	7
1 Définition .....	7
2 Localisation.....	8
3 Techniques d'extraction des huiles essentielles.....	8
Expression à froid.....	8
Hydrodistillation.....	9
Entraînement à la vapeur d'eau .....	9
4 Rôles des huiles essentielles .....	10
5 Composition chimique des huiles essentielles .....	10
Terpénoïdes .....	11
Monoterpènes .....	11
Sesquiterpènes .....	11
Composés aromatiques .....	12
6 Propriétés physico-chimiques .....	12
7 Domaines d'utilisations des huiles essentielles .....	12

	Cosmétique .....	13
	Agro-alimentaire.....	13
	Pharmacie et thérapeutique.....	13
8	Toxicité des huiles essentielles .....	13
1	Activité antibactérienne .....	15
2	Activité antifongique.....	15
3	Activité antioxydante .....	16
4	Activité anti-inflammatoire.....	16
5	Activité anti-hémolytique .....	17
2 <sup>ème</sup>	partie : Matériel et Méthodes .....	18
1	Situation géographique de la station d'étude .....	19
	Identification botanique .....	20
	Préparation des échantillons .....	20
2	Extraction des huiles essentielles.....	20
3	Evaluation de l'activité anti-hémolytique .....	22
	Echantillons de sang humain .....	22
	Préparation de la suspension des globules rouges humains (GRh) .....	23
4	Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne et de l'activité antifongique .....	25
	Aromatogramme .....	25
	Souches bactériennes et fongiques testées.....	26
	Mode opératoire de la méthode de diffusion sur disque.....	27
	Méthode de micro-dilution en milieu liquide .....	27
3 <sup>ème</sup>	partie : Résultats et Discussion .....	29
1	Caractéristiques physico-chimiques de l'HE du cyprès vert .....	30
2	Rendement .....	31
3	Evaluation des activités biologiques .....	32
	Evaluation de l'activité anti-hémolytique.....	32
	Evaluation du pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de cyprès .....	35
	Méthode de diffusion sur disque .....	35
	Méthode de micro-dilution en milieu liquide.....	37
	Conclusion et perspectives .....	39
	Références .....	41
	Bibliographiques .....	41
	Annexes.....	50

## Liste de figures

<b>Figure 1 :</b> <i>Cupressus Sempervirens</i> L .....	4
<b>Figure 2 :</b> Principe schématisé de l'extraction par hydrodistillation.....	9
<b>Figure 3 :</b> Principe schématisé de l'extraction par entrainement à la vapeur d'eau.....	10
<b>Figure 4 :</b> Situation géographique de la région de Tlemcen .....	19
<b>Figure 5 :</b> Situation géographique de région d'Ain-Youcef et du lieu de récolte .....	20
<b>Figure 6 :</b> Dispositif d'extraction des HE par entrainement à la vapeur d'eau .....	21
<b>Figure 7 :</b> Sang humain frais .....	22
<b>Figure 8 :</b> Suspension des globules rouges humain .....	23
<b>Figure 9 :</b> Préparation du sang .....	24
<b>Figure 10 :</b> Gamme d'hémolyse des globules rouges .....	24
<b>Figure 11 :</b> Illustration de la méthode des aromatoigrammes sur boîte de pétri .....	25
<b>Figure 12 :</b> Les souches bactériennes.....	26
<b>Figure 13 :</b> Champignon (Levure) .....	26
<b>Figure 14 :</b> Huile essentielle de Cyprès par entrainement à la vapeur d'eau .....	31
<b>Figure 15 :</b> Hémolyse des globules rouges .....	33
<b>Figure 16 :</b> Pourcentage d'inhibition d'hémolyse des GR.....	33
<b>Figure 17 :</b> Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique.....	34
<b>Figure 18 :</b> Inhibition des souches ( <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> et <i>Proteus mirabilis</i> ) par l'huile essentielle de cyprès.....	36
<b>Figure 19 :</b> Inhibition des souches ( <i>Enterococcus faecalis</i> et <i>Citrobacterfreundii</i> ) par l'huile essentielle de cyprès .....	36
<b>Figure 20 :</b> Inhibition de <i>Candida albicans</i> par l'HE du cyprès .....	37

## Liste des tableaux

<b>Tableaux I</b> : Classification de Cyprès : <i>Cupressus sempervirens</i> L .....	<b>5</b>
<b>Tableaux II</b> : Les différentes souches microbiennes testées .....	<b>26</b>
<b>Tableaux III</b> : Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles de <i>Cupressus sempervirens</i> L.....	<b>30</b>
<b>Tableaux IV</b> : Rendement et densité des huiles essentielles de <i>Cupressus sempervirens</i> L.	<b>31</b>
<b>Tableaux V</b> : Résultats des diamètres d'inhibition en mm de l'activité antimicrobienne de l'HE de <i>Cupressus sempervirens</i> L.....	<b>35</b>
<b>Tableaux VI</b> : La concentration minimale inhibitrice de l'HE de <i>Cupressus sempervirens</i> L. ....	<b>37</b>

## Liste Des abréviations

**AFNOR** : Association Française de Normalisation

**ISO** : Organisation Internationale de Normalisation

**HE** : Huile Essentielle

**MeOH** : Méthanol

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**PBS** : Tampon Phosphate Saline

**Nacl** : Solution hypo-saline

**AA** : Acide ascorbique

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice

**R** : Rendement

**GRh** : Globule rouge humain

**C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>** : Isoprènes

**%** : Pourcentage

**[C]** : Concentration

**°C** : Degré Celsius

**mg** : Milligramme

**ml** : Millilitre

**min** : Minutes

**µl** : Microlitre

**NT** : Non Testé

# **Introduction générale**

Pendant des milliers d'années, l'homme a utilisé les différentes plantes présentes dans son environnement pour traiter et guérir diverses maladies, et ces plantes représentent une immense bibliothèque de composés potentiels attribués à des métabolites secondaires, qui ont la diversité des structures chimiques et les avantages de leur très large éventail d'activités biologiques. Cependant, l'évaluation de ces activités reste une tâche très intéressante qui peut faire l'objet de nombreuses études (**Chibah et Labandji, 2017**).

Les bactéries sont responsables de plusieurs maladies. Leur résistance aux antibiotiques est de plus en plus prononcée. Pour arrêter ce processus de résistance, il est impératif de chercher une approche dans le but de diminuer ou d'éliminer les affections sans l'utilisation des produits synthétiques (**Vanden Berghe et Vlietinck, 1991**).

La situation est davantage préoccupante à cause de l'apparition des souches de microorganismes antibiorésistants et l'émergence des infections non communes qui compromettent les traitements à l'aide des médicaments existants. Face à ces nombreux obstacles que présente l'utilisation des antibactériens disponibles, il est indispensable de chercher de nouvelles substances efficaces et à large spectre d'action (**Biyiti et al., 2004**).

L'Algérie, du fait de sa diversité climatique et de sa situation géographique stratégique, abrite un nombre considérable d'espèces naturelles, qui représentent un patrimoine génétique végétal très important (**Abdelli, 2018**).

C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressées à l'étude d'une plante qui pousse spontanément dans notre pays et qui est peu utilisée par l'homme, à savoir : « Cyprès vert ».

Le cyprès est un conifère à feuilles persistantes. Le genre *Cupressus*, comprenant douze espèces, il est réparti en Amérique du Nord, dans la région méditerranéenne et en Asie subtropicale à haute altitude (**Afif et al, 2006 ; Boukhris et al, 2012**).

D'une autre part, les huiles essentielles sont un mélange complexe de composés naturels. Elles sont des métabolites secondaires biosynthétisés par les plantes dites aromatiques. Ces plantes se caractérisent par la présence de structures qui sécrètent des huiles essentielles dans presque tous ses organes (**Bouhdid et al., 2012**).

L'objectif de notre travail est d'étudier les activités biologiques de l'huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau de la partie aérienne du cyprès pour d'éventuelles utilisations en lutte biologique. Cette recherche est principalement divisée en trois parties :

La première partie : consacrée à la synthèse bibliographique, elle est divisée en trois chapitres ;

Chapitre I : présentation de la plante étudiée (*Cupressus sempervirens* L.).

Chapitre II : fait l'état des généralités sur les huiles essentielles.

Chapitre III : présente des généralités sur les activités biologiques des huiles essentielles.

La deuxième partie décrit la phase expérimentale, elle concerne la manière d'extraire l'huile essentielle de cette plante, et les différentes analyses effectuées sur cette huile. Cette partie s'intéresse également aux différentes activités biologiques.

La troisième section est consacrée à la description et à la discussion des résultats obtenus. Enfin, une conclusion générale de notre travail ainsi que des perspectives.

# **1<sup>ère</sup> partie : Synthèse bibliographique**

**Chapitre 1 : Présentation de plante**

Cupressaceae est la première famille de plantes dont l'histoire évolutive détaillée remonte à la scission de la Pangée il y a environ 150 millions d'années. L'importance économique et socioculturelle répandue et profonde de cette espèce remonte au moins au troisième millénaire avant notre ère (Weick et al., 2023).

**1 Présentation de la famille des cupressacées :**

Les Cupressacées comprennent deux sous-familles, chacune divisée en trois tribus, les Cupressoideae et les Callitroideae, qui appartiennent essentiellement respectivement aux hémisphères Nord et Sud. Elle comprend une trentaine de genres (Haluk et Roussel, 2000 ; Hafsi et al., 2017).

**2 Genre *Cupressus* :**

Dans ce genre il existe environ 25 espèces de cyprès, dont 3 espèces méditerranéennes. Le cyprès vert (*Cupressus sempervirens* L.) originaire du bassin oriental de la Méditerranée a la plus grande aire de répartition naturelle (Bechir et al., 2004).

**3 Présentation de la plante étudiée :**

*Cupressus sempervirens* L., dit cyprès méditerranéen ou cyprès commun. Les semis poussent rapidement sur la plupart des types de sols, y compris les sols rocheux et compacts, adaptés aux climats méditerranéens avec des étés secs et chauds et des hivers pluvieux. Il peut former une forêt pure ou devenir l'espèce d'arbre dominante dans la forêt de pins. Ce cyprès est largement cultivé comme arbre d'ornement (Caudullo et al., 2016).

**Description botanique :**

*Cupressus sempervirens* L. Est un arbre pouvant atteindre une hauteur de 30 m. Les feuilles mesurent 0,5 à 1 mm, vert foncé et obtuses. Les cônes mâles mesurent 4 à 8 mm et les cônes femelles mesurent 25 à 40 mm. Ils sont ellipsoïdaux (rarement sphériques), verts lorsqu'ils sont jeunes et gris jaunâtre brillant à maturité, avec 8 à 14 écailles courtes et pointues. 8-20 graines sur chaque échelle (Al-Snafi, 2016).

- **Les feuilles** : sont des écaillés de type cyprès, opposées, croisées, superposées, légèrement aplaties.
- **Les fleurs** : à l'extrémité des rameaux, de couleur jaune à brun clair.
- **Les cônes** : écaillés ligneux polygonales verts, brun clair à brun foncé à maturité (tous les deux ans).
- **Port** : Mince, conique, compact et dense dans une colonne étroite (**Camus, 2014**).

Une distinction particulière est faite entre les formes à branches horizontales et à cime conique : *cupressus sempervirens* « horizontales » et les formes colonnaires formant des fuseaux plus ou moins étroits : *cupressus sempervirens* « pyramidalis » ou « stricta » (**Nichane, 2015**).

*Cupressus sempervirens* est un arbre à feuilles persistantes de taille moyenne à 35 m appartenant à la famille des Cupressacées, une espèce de cyprès originaire de la région de la Méditerranée orientale (**Elansary et al., 2012**).



**Figure 1** : *Cupressus Sempervirens* L. (Ain-Youcef, 17/03/2023).

**Description systématique de cyprès :**

*Cupressus sempervirens* L. est une belle plante persistante de la famille des conifères apparentant à la catégorie des cupressacées. Il compte douze espèces différentes, qui appartiennent toutes à l'ordre des cupressales.

**Tableau I :** Classification de Cyprès : *Cupressus sempervirens* L. (Al-Snafi, 2016).

Règne	Plantae
Sous-Règne	Viridiplantae
Embrenchement	Tracheophyta
Sous-Embrenchement	Spermatophytina
Classe	Pinopsida
Sous-Classe	pinidae
Ordre	Pinales
Famille	Cupressacées
Genre	Cupressus
Espèce	<i>Cupressus sempervirens</i> L.

**Usages thérapeutiques :**

Des exemples des domaines d'application les plus importants de cette plante sont les domaines thérapeutiques :

- Les feuilles séchées sont utilisées pour traiter les maux d'estomac et le diabète.
- Les feuilles et les cônes ont été utilisés dans les médecines traditionnelles comme antiseptique, antipyrétique, insectifuge, astringent, anti hémorroïdaire, anti diarrhéique et vasoconstricteur.
- La résine de cyprès est utilisée par voie orale pour la toux et les rhumatismes. En externe : il est utilisé pour traiter les fissures et les ulcères sur les pieds ; l'huile est

appliquée sur les plaies pour traiter les cicatrices. En interne, la bouillie de fruits est utilisée comme remède anti diarrhéique, hémostatique et contre le rhume.

- Cyprès a également été décrit comme un déodorant (**Rahmani, 2020**).
- Traitement des attaques respiratoires : protection du tissu conjonctif et effets antiviraux.
- Traitement des bouffées de chaleur chez les femmes ménopausées
- Ces huiles sont des immunostimulants (**Benarbiaet Nebhi, 2020**).

#### **Travaux intérieurs :**

La composition chimique et les activités biologiques des huiles essentielles de *Cupressus sempervirens* poussant dans différentes régions du monde a fait l'objet de plusieurs études (**Madar et al., 1999 ; Sacchetti et al., 2005 ; Tapondjou et al., 2005 ; Cheraief et al., 2006 ; Tognolini et al., 2006 ; Mazari et al., 2010 ; Amri et al., 2013 ; Herzi et al., 2013 ; Sedigheh et al., 2013 ; Amara et Boughérara, 2017 ; Jahani et al., 2019 ; Guinobert et al., 2020 ; Argui et al., 2021 ; Fadel et al., 2021 ; Frezza et al., 2022 ; Sriti et al., 2023**).

Les extraits de *Cupressus sempervirens* ont aussi fait l'objet de différentes études (**Selim et al., 2014 ; Guinobert et al., 2018 ; Aloui et al., 2020**).

## Chapitre II : Les huiles essentielles

La connaissance des huiles essentielles est ancienne, car les humains préhistoriques ont pratiqué à leur manière l'extraction des composants aromatiques et la combustion des pierres. La vapeur dégagée entraîne les molécules volatiles, et l'ensemble de la masse est ensuite récupéré à l'aide de peau d'animal qui, une fois essorée, libèrera quelques gouttes d'huile essentielle (**Haddou et Hammouche, 2012**).

L'extraction et l'utilisation des principes aromatiques des plantes se sont développées au cours des siècles, notamment dans les civilisations arabe et égyptienne, ce qui a d'abord été attribué à leur usage religieux. Puis petit à petit, ces huiles essentielles se sont fait connaître pour leurs bienfaits thérapeutiques puis sont devenues des remèdes courants en médecine traditionnelle (**Haddou et Hammouche, 2012**).

Aujourd'hui, les huiles sont largement utilisées dans des domaines tels que la pharmacologie, la cosmétique, les produits agricoles, et plus récemment les applications phytosanitaires agricoles, et leurs propriétés thérapeutiques font l'objet de nombreuses études scientifiques (**Haddou et Hammouche, 2012**).

### 1 Définition :

Les huiles essentielles sont un mélange complexe de composés naturels. Elles sont des métabolites secondaires bio-synthétisés par les plantes aromatiques dites aromatiques. Ces plantes se caractérisent par la présence de structures qui sécrètent des huiles essentielles dans presque tous les organes de la plante (**Bouhdid et al., 2012**).

**Selon la norme ISO 9235**, « Les huiles essentielles sont définies comme des produits obtenus à partir de matières premières d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par un procédé physique, soit par distillation à la vapeur, soit par un procédé mécanique, soit par distillation sèche » (**Al-Snafi, 2016**).

**Selon AFNOR** Les huiles essentielles sont des sécrétions naturelles des plantes. Il est produit par des organes sécrétoires situés dans différentes parties des plantes aromatiques et des arbres. Par distillation végétale, par vapeur basse pression (**Mejri, 2018**).

## 2 Localisation :

Toutes les plantes ont la capacité de produire des composés volatils, mais uniquement à l'état de traces. Parmi les espèces végétales, seules 10% sont considérées comme "aromatiques". Or, la capacité d'accumulation d'HE est une propriété de certaines familles végétales réparties dans tout le règne végétal, représentées par les gymnospermes Cupressaceae et Pinaceae et les angiospermes (**Boukhatem et al., 2019**).

Les sécrétions végétales naturelles, appelées HE, se trouvent dans diverses parties de la plante comme les fleurs, les feuilles, les racines, les fruits, les graines et même les bulbes et les rhizomes. Ces sécrétions sont contenues dans les cellules végétales et sont considérées comme étant de nature organique (**Boukhatem et al., 2019**).

## 3 Techniques analytiques des huiles essentielles :

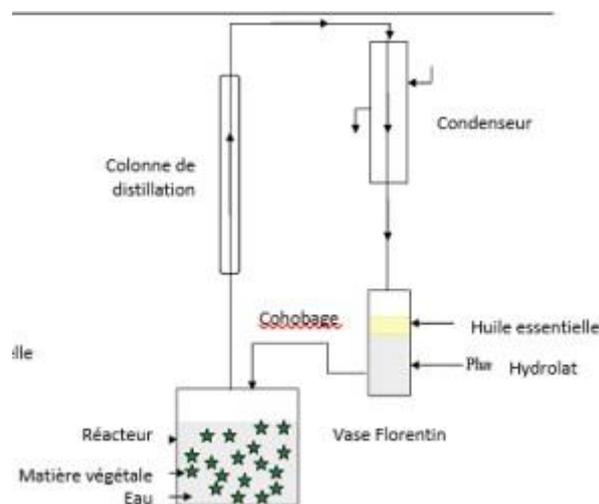
Parmi les méthodes d'extraction disponibles, seuls deux procédés donnent des huiles essentielles conformes à la Pharmacopée Européenne. Ceux-ci sont pressés à froid et distillés. Les huiles essentielles subissent des changements dans leur composition chimique lors de l'extraction, souvent en raison de la chaleur ou de l'interaction avec l'eau. Pour éviter une hydrolyse conduisant à la formation d'alcools et d'acides, il est possible d'utiliser des grilles, des paniers ou... dans la même enceinte, de préférence dans des cuves séparées pour séparer la matière première de l'eau ; c'est la distillation par entraînement à la vapeur (**Fillatre, 2011**).

### **Expression à froid :**

Le processus consiste d'abord à placer le fruit sur une coupelle munie d'une lame. La deuxième coupe, équivalente à la première, est alors attachée au fruit de telle manière qu'elle l'entoure. En même temps, un couteau rond fait un trou au fond du fruit. L'application d'une pression sur la paroi du fruit extrait le jus qui est transporté vers un collecteur, tandis que l'huile est extraite de la peau et récupérée à l'aide d'un jet d'eau. L'émulsion eau-huile est ensuite séparée par centrifugation. La force de cette technologie réside dans sa capacité à être intégrée à la production de jus, le produit commercial le plus important. C'est pourquoi la pression à froid est la méthode privilégiée d'extraction des huiles essentielles, d'autant plus que la distillation n'est pas une technique très adaptée (**Fillatre, 2011**).

**Hydrodistillation :**

Il s'agit de plonger les matières premières dans un bain-marie, puis de porter le tout à ébullition. Elle est généralement réalisée à pression atmosphérique. La distillation peut être réalisée avec ou sans coprécipitation de l'eau aromatique obtenue lors de la décantation. L'inconvénient de cette méthode est principalement dû à l'action de la vapeur ou de l'eau bouillante ; certains organes végétaux, notamment les fleurs, sont trop fragiles et ne supportent pas la distillation à la vapeur et le traitement d'hydrodistillation (**Boukhatem et al., 2019**).

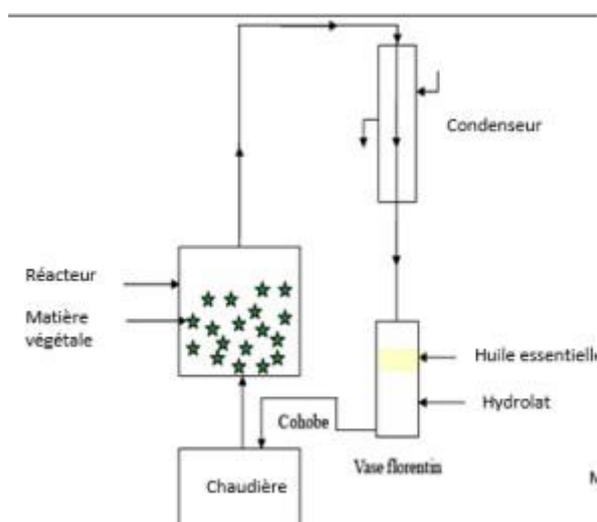


**Figure 2 :** Principe schématisé de l'extraction par hydrodistillation (**Boukhatem et al., 2019**).

## Entraînement à la vapeur d'eau :

Il s'agit d'une installation de cohobage classique composée d'une chaudière, d'un générateur de vapeur, d'un extracteur, d'un col de cygne, d'un condenseur à serpentin relié au col de cygne, d'un refroidissement par eau et d'un décanteur centrifuge.

Un échantillon représentatif pré-pesé de matériel végétal a été introduit dans l'extracteur et soumis à une distillation à la vapeur pendant 2 heures. Lors de l'extraction, le débit de vapeur est contrôlé en mesurant le volume d'eau distillée récupéré dans le décanteur par unité de temps. Les huiles essentielles ont été séparées de l'eau distillée par décantation et pesée (**Stoyka et al., 2013**).



**Figure 3 :** Principe schématisé de l'extraction par entraînement à la vapeur (**Boukhatem et al., 2019**).

Il existe des autres méthodes d'extraction des huiles essentielles comme l'extraction par solvant organique, par micro-ondes, par fluide à l'état supercritique (**Boukhatem et al., 2019**).

#### 4 Rôles des huiles essentielles :

Le rôle important des HE<sub>s</sub> dans les plantes n'a pas été bien élucidé. Les recherches menées dans ce sens ont montré que ces espèces constituent un moyen de défense contre les prédateurs (microorganismes, champignons, insectes, herbivores) en modulant leur comportement vis-à-vis des végétaux. Ils peuvent également jouer un rôle important en tant que régulateurs des réactions d'oxydation intramoléculaires, protégeant les plantes des facteurs atmosphériques. Les plantes aromatiques utilisent également des huiles essentielles pour inhiber la germination et le développement d'autres espèces végétales à proximité. D'autres rôles de l'HE sont liés à l'attraction des insectes pollinisateurs, à la dispersion des graines et à la répulsion des herbivores. (**Bouyahya et al., 2017**).

#### 5 Composition chimique des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des mélanges compliqués de composés volatils tels que les terpènes (des monoterpènes et des sesquiterpènes), phénoliques et alcools (**Hireche et Ferhat, 2019**).

**Terpénoïdes :**

Les terpènes, également appelés isoprènes ( $C_5H_8$ ), ou terpénoïdes ou isoprénoïdes, lorsqu'ils contiennent de l'oxygène, constituent le plus grand groupe de composés naturels, avec plus de 30 000 structures connues. Le nom "terpène" vient du fait que les premiers membres décrits de cette classe ont été isolés de la térébenthine, un liquide riche en monoterpènes extrait de la résine de divers pins. Les terpènes sont classés en fonction du nombre d'unités d'isoprène dont ils sont issus bio génétiquement, bien qu'une certaine perte ou addition d'atomes de carbone puisse se produire par la suite. Ainsi, les hémiterpènes, les monoterpènes, les sesquiterpènes et les diterpènes (**Christine *et al.*, 2011**).

**Monoterpènes :**

Un monoterpène est formé lorsque deux unités isoprène  $C_5$  sont liées, formant un squelette avec la formule moléculaire  $C_{10}H_{16}$ . Malgré la simplicité initiale, les substitutions, cyclisations et/ou isomérisations ultérieures génèrent une multitude de structures monoterpénoïdes. Les monoterpènes peuvent être cycliques (c'est-à-dire en forme d'anneau) ou acycliques (également appelés linéaires), réguliers ou irréguliers, et leurs dérivés comprennent des alcools, des esters, des phénols, des cétones, des lactones, des aldéhydes et des oxydes. Les monoterpènes cycliques comprennent les monoterpènes monocycliques, bicycliques et même les composés tricycliques. Ces anneaux sont créés par des enzymes appelées monoterpène cyclases dans un processus en plusieurs étapes appelé cyclisation. Les monoterpènes cycliques contenant des cycles benzéniques, tels que le p-cymène, sont connus sous le nom de monoterpènes aromatiques et sont des constituants communs de nombreuses huiles essentielles.

Les terpènes acycliques trouvés dans les huiles essentielles peuvent être des structures linéaires régulières dans lesquelles l'arrangement tête-bêche des unités isoprène est facilement observé, comme dans les hydrocarbures  $\beta$ -myrcènes (**Christine *et al.*, 2011**).

**Sesquiterpènes :**

Les sesquiterpènes sont les deuxièmes les plus courants, après les principaux monoterpènes. Ils sont formés par l'association de trois motifs isoprène de formule  $C_{15}H_{24}$ . Ce sont des groupes structurellement divers, tous dérivés du pyrophosphate de farnésyle par divers processus de cyclisation, souvent suivis de réarrangements squelettiques. Les sesquiterpènes peuvent être

linéaires, ramifiés ou cycliques. Les sesquiterpènes cycliques peuvent être monocycliques, bicycliques ou tricycliques (**Christine et al., 2011**).

### **Composés aromatiques :**

Les composés aromatiques des huiles essentielles sont principalement des dérivés du phénylpropane C6-C3. Ils sont beaucoup moins courants que les terpènes. Ils peuvent comprendre des phénols, des aldéhydes, des alcools, des dérivés méthoxy ou méthylènedioxy. Les composants azotés ou soufrés tels que les glucosinolates ou les dérivés d'isothiocyanates sont également caractéristiques de divers métabolites secondaires végétaux (**Mnayer, 2014**).

### **6 Propriétés physico-chimiques :**

- ✓ Liquide à température ambiante.
- ✓ Huileux mais pas gras.
- ✓ Les substances volatiles sont telles que leur volatilité augmente avec la chaleur.
- ✓ Insoluble dans l'eau, généralement plus léger que l'eau. Souvent parfumé, coloré.
- ✓ Les huiles essentielles s'enflamment facilement.
- ✓ Ils sont solubles dans les huiles végétales et les alcools jusqu'à un certain point pourcentage.
- ✓ Lorsqu'il est exposé à la lumière, il est facilement oxydé, résinisé par absorption d'oxygène et, en même temps, l'odeur change, le point d'ébullition augmente et la solubilité diminue.
- ✓ Ils réagissent avec le chlore, le brome et l'iode pour libérer de la chaleur.
- ✓ Ils peuvent se combiner avec de l'eau pour former des alcools (**Bouhoune et Laoufi, 2010**).

### **7 Domaines d'utilisations des huiles essentielles :**

Bien que les huiles essentielles soient l'un des éléments fondamentaux dans les industries cosmétiques et pharmaceutiques (dont l'aromathérapie), elles sont de plus en plus utilisées dans l'industrie agro-alimentaire.

**Cosmétique :**

Les huiles essentielles sont utilisées dans les industries de la cosmétique, de la parfumerie, de la toilette et de l'hygiène. L'utilisation des huiles essentielles dans les crèmes et les gels préserve ces cosmétiques, grâce à leurs capacités antiseptiques et antioxydantes, tout en leur procurant une odeur agréable (**Haddouchi et Benmansour, 2008**).

**Agro-alimentaire :**

Les consommateurs sont toujours à la recherche d'une conservation saine et durable des produits qu'ils consomment. Une technique pour réduire la prolifération microbienne réside dans l'utilisation d'huiles essentielles.

Les huiles essentielles ont de nombreuses applications dans l'industrie alimentaire. Il existe plusieurs industries alimentaires qui sont consommatrices : boissons gazeuses, confiseries, produits laitiers, soupes, sauces, boulangeries, sans oublier la nutrition animale (**Haddou et Hammouche, 2012**).

**Pharmacie et thérapeutique :**

Les huiles essentielles sont utilisées en milieu clinique pour traiter les affections inflammatoires telles que les rhumatismes, les allergies, l'arthrite, et pour traiter certaines affections internes et externes telles que les infections bactériennes ou virales, les troubles humoraux ou neurologiques.

Certaines huiles essentielles sont également utilisées dans l'industrie pharmaceutique, notamment dans le domaine des conservateurs topiques, et plus généralement, pour aromatiser des formes pharmaceutiques à administration orale (**Haddou et Hammouche, 2012**).

**8 Toxicité des huiles essentielles :**

On pense que la cytotoxicité des huiles essentielles est due à leurs effets sur la sécurité cellulaire conduisant à la maladie et à l'apoptose. Des tentatives ont été faites pour examiner les plantes médicinales et leurs constituants d'huile essentielle qui se sont révélés cytotoxiques *in vitro*. La membrane plasmique de la cellule est facilement pénétrée par les huiles essentielles, perturbant ainsi sa structure et la perméabilisant. Ainsi, la cytotoxicité peut causer de tels dommages aux membranes cellulaires. Les huiles essentielles ont la capacité de durcir le cytoplasme, détruisant

ainsi les lipides et les protéines. Les dommages aux parois cellulaires et aux membranes peuvent entraîner un clivage et une fuite de macromolécules. Les huiles essentielles ont la capacité de durcir le cytoplasme, détruisant ainsi les lipides et les protéines. Les dommages aux parois cellulaires et aux membranes peuvent entraîner un clivage et une fuite de macromolécules. Les huiles essentielles peuvent stimuler la dépolarisation de la membrane mitochondriale dans les cellules eucaryotes en abaissant le potentiel membranaire, en affectant le cycle ionique de  $\text{Ca}^{++}$  et d'autres canaux ioniques et en réduisant le gradient de pH (**Rassem *et al.*, 2018**).

---

**Chapitre III : Activités biologiques des huiles essentielles**

Les effets physiologiques des huiles essentielles sur le règne végétal sont encore méconnus. Cependant, la diversité moléculaire des métabolites qu'ils contiennent leur confère des rôles et des propriétés biologiques très divers, connus et utilisés depuis longtemps, mais cette utilisation repose sur des pratiques traditionnelles et des applications sans fondement scientifique précis. Aujourd'hui, leur utilisation est réalisée sur une base scientifique et justifiée, tant d'efforts de recherche ont porté sur des activités antimicrobiennes, antioxydantes, antivirales, anti-inflammatoires et antifongiques (**Lamamra, 2017**).

**1 Activité antibactérienne :**

Les microorganismes tels que les bactéries, les champignons, les virus et les protozoaires sont les agents pathogènes de nombreuses maladies infectieuses, et des composants ayant une activité spécifique contre ces microorganismes sont des antimicrobiens actifs. Les tentatives de traitement de ces maladies ont souvent utilisé des médicaments à base de plantes contenant des composés à activité antimicrobienne. Ces herbes contiennent des huiles essentielles (**Carson et Hammer, 2011**).

Les anciens Égyptiens utilisaient des plantes aromatiques (et les huiles essentielles qu'elles contenaient) pour l'embaumement afin que les bactéries cessent de se développer et que la décomposition soit évitée. Les huiles essentielles agissent comme antimicrobiens contre de nombreuses souches de bactéries pathogènes dont : *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*... (**Egza, 2020**).

**2 Activité antifongique :**

Les infections fongiques sont causées par des organismes eucaryotes, il est donc plus difficile de déterminer leur présence et d'appliquer un traitement approprié que les infections bactériennes. L'HE est peut-être l'un des produits naturels les plus prometteurs contre les champignons. Comme d'autres composés phytochimiques, l'HE peut inhiber la croissance microbienne et le développement du biofilm par des mécanismes spécifiques. De nombreuses huiles essentielles sont utilisées pour contrôler la détérioration microbienne, maintenir la qualité et la sécurité des aliments et prolonger la durée de conservation. Capable de perturber les membranes cellulaires, d'induire la mort cellulaire ou d'inhiber la sporulation et la germination

des champignons d'altération des aliments. Le défi consiste à élaborer une stratégie solide pour faire face aux maladies fongiques, pour le traitement des infections fongiques opportunistes chez les patients séropositifs et d'autres personnes immunodéprimées en raison d'une chimiothérapie (Egza, 2020 ; Nazzaro *et al.*, 2017).

### 3 Activité antioxydante :

Les radicaux libres et autres espèces réactives de l'oxygène oxydent les protéines, les acides aminés, les lipides insaturés et l'ADN. Les espèces réactives de l'oxygène produisent des changements moléculaires associés au vieillissement, à l'artériosclérose et au cancer, à la maladie d'Alzheimer, à la maladie de Parkinson, au diabète et à l'asthme. Presque toutes les cellules du corps ont des mécanismes de défense contre les radicaux libres. Existe-t-il un déséquilibre entre la production de radicaux libres et leur élimination par le système antioxydant de l'organisme, Ce déséquilibre conduit à un phénomène connu sous le nom de "stress oxydatif". L'équilibre entre les radicaux libres et les antioxydants peut être restauré avec un apport externe d'antioxydants.

Les huiles essentielles sont riches en composés phénoliques, ce qui a incité les chercheurs à évaluer leur activité en tant qu'antioxydants ou piègeurs de radicaux libres (Egza, 2020).

### 4 Activité anti-inflammatoire :

La thérapie anti-inflammatoire est généralement réalisée avec des molécules synthétiques de la classe des anti-inflammatoires non stéroïdiens ou stéroïdiens (corticostéroïdes), qui sont des médicaments largement utilisés, mais dont les effets secondaires sont parfois graves, notamment la toxicité pour les systèmes rénal et digestif (Trabsa, 2015).

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont des médicaments qui ont des propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et antalgiques. Ils présentent une hétérogénéité chimique considérable, mais ils ont tous en commun une inhibition non sélective de la cyclooxygénase (COX) (Trabsa, 2015).

Les stéroïdes anti-inflammatoires (AIS) ou glucocorticoïdes sont des dérivés du cortisol. Ils représentent les traitements les plus efficaces pour les maladies inflammatoires chroniques telles que la polyarthrite rhumatoïde et les maladies auto-immunes (Trabsa, 2015).

**5 Activité anti-hémolytique :**

L'hémolyse est la libération de composants intracellulaires des globules rouges, y compris l'hémoglobine, suite à la rupture de la membrane des érythrocytes.

Les agents anti-hémolytiques sont des substances qui ont la capacité de retarder ou d'inhiber la lyse des globules rouges (**Besbas, 2020**).

## **2<sup>ème</sup> partie : Matériel et Méthodes**

Cette partie est dédiée à la présentation du protocole d'extraction de l'huile essentielle de *Cupressus sempervirens* L. par la méthode d'entraînement à la vapeur d'eau, et l'évaluation des activités biologiques de cette huile essentielle.

Nous présenterons ainsi la description des matériaux, l'ensemble des procédés expérimentaux et toutes les techniques analytiques réalisées au sein de cette étude.

Notre travail a été effectué au sein du laboratoire de recherche des produits naturels « LAPRONA », Université de Tlemcen.

### 1 Situation géographique de la station d'étude :

Tlemcen est une ville du Nord-ouest de l'Algérie, dont :

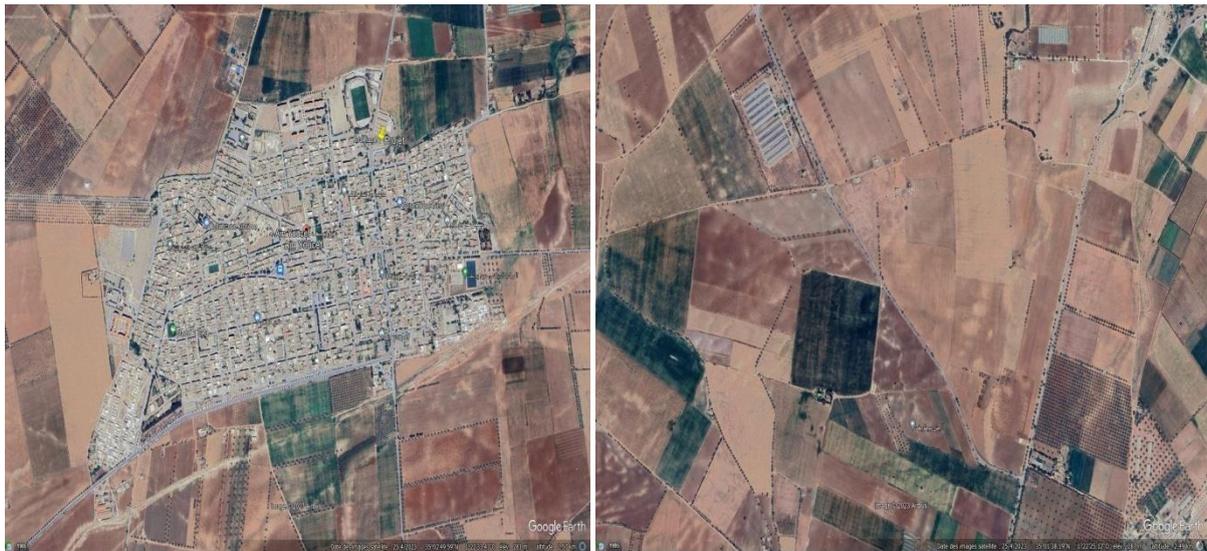
- La latitude est de 34.56°.
- A une altitude de 830m.
- Distance de la mer de 45Km (Amara et al., 2007).

La wilaya de Tlemcen est limitée au Nord par la mer Méditerranéenne et la wilaya d'Ain-Temouchent, à l'Est par la wilaya de Sidi Bel-Abbes, au Sud par la wilaya de Naâma et à l'Ouest par le Maroc (Figure 4) (Merghache et al., 2009).



**Figure 4 :** Situation géographique de la région de Tlemcen (Hamma et al., 2016).

Le matériel végétal (*Cupressus sempervirens* L.) utilisé a été collecté le mois de Mars (17/03/2023) auprès d'un jardin de la municipalité d'Ain-youcef, situé à quelques kilomètres de la municipalité de Henaya, de la wilaya de Tlemcen, à la température 17°C (Figure 5).



**Figure 5 :** Situation géographique de région d'Ain-Youcef et du lieu de récolte (17/03/2023 ; Google MAPS).

### **Identification botanique :**

L'identification de cette espèce a été réalisée par Docteur BABALI Ibrahim, Enseignant chercheur à l'université de Tlemcen, membre du laboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels, Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen (Algérie).

### **Préparation des échantillons :**

Le matériel végétal a été séché à la température ambiante dans un endroit aéré et l'abri de la lumière (à l'ombre) pendant sept jours.

### **2 Extraction des huiles essentielles :**

L'extraction des huiles essentielles des rameaux et des cônes du cyprès a été effectué par entraînement à la vapeur pendant 3 heures (figure 6).

L'appareil utilisé consistait en un ballon métallique rempli de 5 L d'eau, placé au-dessus d'une source de chaleur et surmonté d'une enceinte contenant du matériel végétal posé sur une grille (Figure 6). La virole est quant à elle reliée à un refroidisseur qui condense la vapeur recueillie dans le ballon sous forme de distillat à décanter. Cette phase a été séchée sur sulfate de magnésium. Les échantillons d'huiles essentielles obtenus ont été conservés à -18 °C jusqu'aux prochains tests.



**Figure 6 :** Dispositif d'extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur d'eau (Tlemcen, Mars 2023).

### ➤ Calcul du rendement :

Le rendement est le rapport de la quantité d'huile recueillie après distillation sur la quantité de la biomasse, exprimé en pourcentage (Mahboub *et al.*, 2019).

$$R = \frac{mh}{mv} \times 100$$

Où :

- **R** : Rendement en HE en (%).
- **mh** : Masse de l'huile essentielle.
- **mv** : Masse végétale sèche.

- **Densité relative à 20°C** : La densité est déterminée par le rapport entre la masse d'un certain volume de l'essence et la masse du même volume d'eau distillée pris à la même température (Mahboub *et al.*, 2019).

$$D = \frac{m1 - m0}{m - m0}$$

Où :

**m 1** : Masse en g de la tube contenant 0,20 ml d'essence.

**m 0** : Masse en g de la tube vide.

**m** : Masse en g de la tube contenant 0,20 ml d'eau.

### 3 Evaluation de l'activité anti-hémolytique :

L'évaluation de l'activité anti-hémolytique, *in vitro*, de l'huile essentielle par la méthode de stabilisation membranaire des globules rouges.

Le principe de cette méthode est basé sur la capacité des extraits à empêcher l'hémolyse des globules rouges (GRh), induite par l'hypotonie et la chaleur et donc prévenir la libération de l'hémoglobine. Ce test a été réalisé selon la méthode décrite par (Sadique *et al.*, 1989 ; oyedapo *et al.*, 2010).

#### Echantillons de sang humain

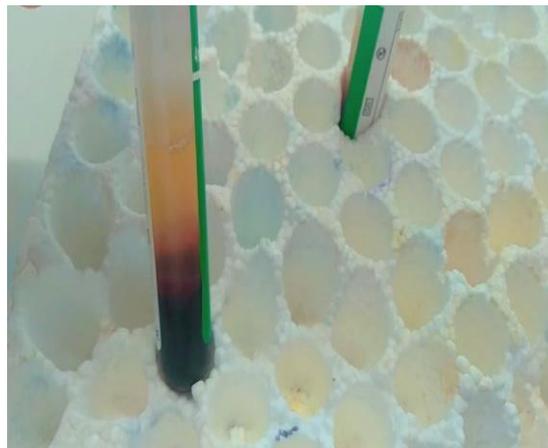
Des échantillons de sang frais (environ 8 ml) ont été récupérés dans des tubes héparinés, au niveau du laboratoire, où la prise de sang a été effectuée, sur des volontaires sains (20 à 40 ans).



**Figure 7** : Le sang humain frais (Tlemcen, 4/5/2023).

### Préparation de la suspension des globules rouges humains (GRh)

Les différents échantillons de sang humain récupérés sont centrifugés à 3000 rpm, pendant 10 min, afin d'éliminer le plasma et les cellules polynucléaires. Ensuite, le culot de globules rouges est lavé trois fois, avec un volume équitable de solution iso-saline. Après cette étape, le surnageant est remplacé par un même volume d'une solution tampon phosphate saline (PBS à 0.9%) et utilisé immédiatement. Les résultats sont présentés dans la figure 8 :



**Figure 8 :** Suspension des globules rouges humain

### Mode opératoire :

L'huile essentielle a été solubilisé dans du DMSO, 1.5 ml de PBS (0,9% NaCl, pH=7,4) et 2 ml d'une solution hypo-saline (NaCl 0.36%) ont été ajoutés à 0,5 ml de chaque concentration d'HE à tester déjà préparés dans le PBS (0.0077, 0.0155, 0.031 et 0.062 µg/ml), et incubé à 37°C pendant 20 min. Après l'incubation, ajouté 0,5 ml de suspension érythrocytaire à 10 % (qui a été préparée dans le PBS (molarité  $10^{-3}$  M, pH de 7,4)), puis une deuxième incubation à 56°C pendant 60 min. Après incubation, le refroidissement des tubes se fait à l'eau courante. Ensuite, les échantillons ont subi une centrifugation à 2500 tours pendant 5 min. Enfin, la lecture des DO a été réalisée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Afin d'avoir une hémolyse totale (100%) un contrôle contenant 2 ml de suspension érythrocytaire a été incubé avec 2 ml de PBS et 2 ml de NaCl. L'acide ascorbique (0.09, 0.187, 0.375, 0.75 et 1.5 µg/ml) a été utilisé comme standard dans les mêmes conditions. Trois essais pour chaque concentration ont été réalisés dans le but de la confirmation des résultats.

Expression des résultats : Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse a été calculé selon la formule suivante :

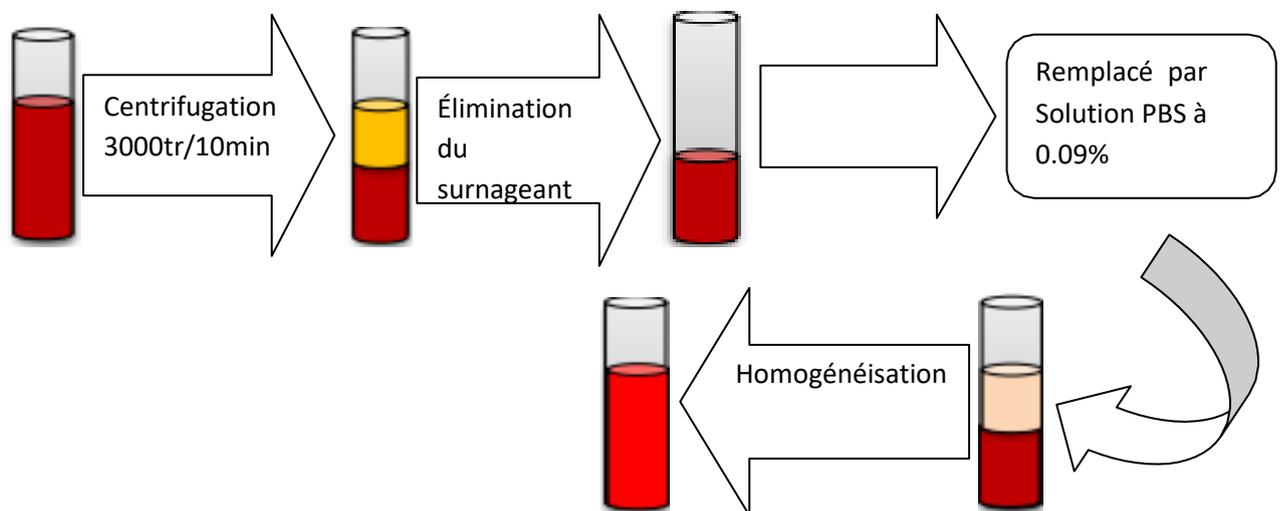
$$\% I = (Ac - At / Ac) \times 100.$$

Où :

**% I** : Pourcentage d'inhibition de l'hémolyse.

**Ac** : Absorbance de contrôle.

**At** : Absorbance de test.



**Figure 9** : Préparation du sang (GRh)



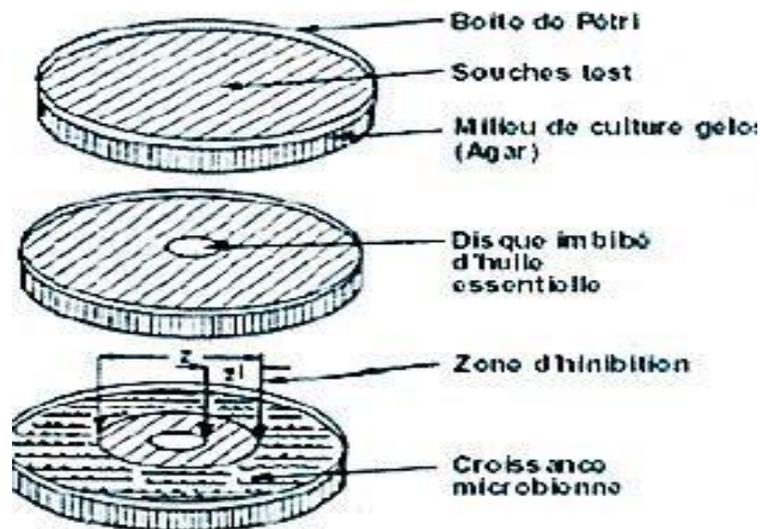
**Figure 10** : Gamme d'hémolyse des globules rouges par solution PBS

**4 Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne et de l'activité antifongique :**

L'étude de l'activité antimicrobienne vis-à-vis des souches de références est réalisée par des techniques différentes et complémentaires : Dans un premier temps, nous avons utilisé la méthode de diffusion sur milieu solide en utilisant la méthode des disques (une méthode rapide) et dans l'affirmation, on a utilisé la méthode de diffusion sur milieu liquide en déterminant les concentrations minimales inhibitrices (CMI).

**Aromatogramme :**

L'activité antimicrobienne a été évaluée par la méthode de l'aromatogramme, qui détermine la sensibilité de diverses espèces bactériennes à une huile essentielle donnée. La méthode aromatoigramme implique l'utilisation de boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé approprié qui a été solidifié et inoculé avec la souche microbienne testée. Un disque de papier buvard de 6 mm de diamètre préimprégné d'une quantité connue d'huile essentielle (10 µl) a ensuite été placé sur la surface de la gélose. En règle générale, les microorganismes sont classés comme sensibles, modérés ou résistants en fonction du diamètre de la zone d'inhibition (**Boutabia et al., 2016**).



**Figure 11 :** Illustration de la méthode des aromatoigrammes sur boîte de Pétri (**Haddouchi et Benmansour, 2008**).

**Souches bactériennes et fongiques testées :**

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle a été évaluée sur 6 souches pathogènes (Tableau II). Les souches bactériennes et fongiques proviennent du Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : Physico-Chimique, Synthèse et Activité Biologique, Faculté SNV-STU de l'université de Tlemcen.

**Tableau II :** Les différentes souches microbiennes testées

<b>Bactéries à Gram négatif</b>	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659
<b>Bactéries à Gram positif</b>	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452
<b>Levures</b>	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231



**Figure 12 :** Les souches bactériennes



**Figure 13 :** Champignon (Levures)

✓ **Mise en culture des souches :**

Les souches conservées à 4°C dans des boîtes de pétri contenant une gélose nutritive à 37±1 °C pour les bactéries et 30±1°C pour la levure pendant 24 h à 48h, puis ensemencées sur boîtes contenant des milieux sélectifs pour vérifier leur pureté.

Après 24 h d'incubation à  $37\pm 1$  °C pour les bactéries et  $30\pm 1$  °C pour la levure, les souches sont ensemencées sur bouillon nutritif puis incubées à  $37\pm 1$  °C pour les bactéries et  $30\pm 1$  °C pour la levure pendant 18 à 20 h à 37°C dans l'étuve afin d'obtenir une culture jeune des bactéries et des champignons pour déterminer l'activité. De cette dernière culture, nous avons prélevé quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques de chacune des souches bactériennes à tester, et ont été mises dans l'eau physiologique stérile à 0,9%. La suspension bactérienne est bien homogénéisée (Choi *et al.*, 2006). La turbidité est ajustée à 0.5 McFarland avec un spectrophotomètre, ce qui correspond à  $1-2 \times 10^8$  UFC/ml pour les bactéries (DO =  $0,08 \pm 0,1$  /  $\lambda = 625$  nm) (Pessini *et al.*, 2003), et  $1-5 \times 10^6$  UFC/ml pour les levures (DO =  $0,12 \pm 0,15$  /  $\lambda = 530$  nm) (Pfaller *et al.*, 1998).

### **Mode opératoire de la méthode de diffusion sur disque :**

Afin de tester l'activité antimicrobienne vis-à-vis des souches de références, on a utilisé la méthode de l'aromatogramme par diffusion à partir de disques imprégnés. Pour effectuer le test, des disques de papier filtre de 6 mm de diamètre imprégnés de 10  $\mu$ l des huiles essentielles et 10  $\mu$ l de DMSO sont déposés à la surface d'un milieu gélosé en boîte de Pétri (3 disques par boîte), préalablement ensemencées en surface par écouvillonnage de suspension microbienne ( $10^6$  UFC/ml pour les levures et souches bactériennes) (Joffin et Leyral, 2001).

Les milieux de culture utilisés, sont la gélose Mueller-Hinton pour les bactéries, le milieu Sabouraud pour les levures.

En parallèle, nous avons utilisé un disque témoin négatif imprégné de DMSO (10  $\mu$ l/disque). Les boîtes sont laissées 1 h à température ambiante puis retournées et incubées à  $37\pm 1$  °C pendant 18-24 h pour les bactéries, à  $30\pm 1$  °C pendant 24-48 h pour. Après incubation, l'effet de l'HE se traduit par l'apparition autour du disque d'une zone circulaire transparente correspondant à l'absence de la croissance. Le diamètre des zones d'inhibition est mesuré (mm), disque inclus. Plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible (Choi *et al.*, 2006).

### **Méthode de micro-dilution en milieu liquide :**

Nous avons utilisé la technique décrite en 2003 par la méthode de CLSI (NCCLS, 2003). Cette dernière donne des résultats rapides, reproductibles et économiques. C'est la méthode de référence qui permet de tester l'efficacité des antibactériens et des antifongiques et de déterminer les CMI correspondantes.

A partir d'une culture jeune sur gélose nutritive pour les bactéries, nous avons prélevé quelques colonies que nous avons suspendues dans 5 ml d'eau physiologique. Puis l'inoculum est ajusté (une DO de 0,08 à 0,1) par lecture de la densité optique à une longueur d'onde de 625 nm.

Après ajustement de l'inoculum, une série de dilutions est faite ; 200 µl d'une solution préparée à partir de 200 µl de bouillon Nutritif, 200 µl d'huile essentielle, sont transférés dans une microplaque à 96 puits et une gamme de concentrations de chaque huile essentielle est effectuée par des dilutions au demi dans les milieux de culture.

A partir d'une culture bactérienne de 24 h d'incubation, nous avons préparé un inoculum de  $10^6$  UFC/ml (pour les bactéries) dans une solution de chlorure de sodium (0,9%). Ensuite 100 µl de cet inoculum sont homogénéisés dans chaque puits de la gamme de concentrations préalablement préparée puis incubée à  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant 24 h. Les concentrations finales de la gamme ainsi générée sont comprises entre 10 et 0,156 µl/ml. Deux puits représentent les témoins négatifs : un 1<sup>er</sup> puit contient le milieu de culture et l'inoculum et un 2<sup>ème</sup> puit contient uniquement le milieu de culture.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la plus faible concentration de l'extrait capable d'inhiber toute croissance visible du germe. Elle mesure donc, un effet bactériostatique et ne renseigne pas sur l'état de la population bactérienne, ne permettant notamment pas de préciser si elle a été tuée en partie ou totalement ou si elle a seulement cessé de se multiplier (**Bergogne-Bérézin et Brogard, 1999**). La turbidité de chaque puit est appréciée à l'œil nu à la lumière du jour.

## **3<sup>ème</sup> partie : Résultats et Discussion**

Cette partie est consacrée à nos résultats et à leur discussion. Elle est divisée en deux parties fondamentales dont la première traite l'extraction de l'huile essentielle de cyprès par la technique d'entraînement à la vapeur. Dans la deuxième partie, les résultats des activités biologiques de cette HE seront présentés.

### 1 Caractéristiques organoleptiques de l'HE du cyprès vert

Les propriétés sensorielles et physicochimiques constituent les moyens d'authentification et de contrôle de la qualité des huiles essentielles. On rappelle que l'extraction des huiles essentielles du *Cupressus Sempervirens* L. est réalisée par entraînement à la vapeur d'eau. Les tableaux III et IV nous montrent comment les propriétés de notre HE se comparent à d'autres études réalisées sur la même plante.

**Tableau III** : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de *Cupressus sempervirens* L.

Propriétés	Notre étude	AFNOR
Aspect	Liquide, limpide et mobile	Liquide, mobile et limpide
Couleur	Jaune très pale	Jaune très pale à jaune orangé
Odeur	Boisée Fort	Térébenthine, boisée et ambrée



**Figure 14 :** L'huile essentielle du Cyprès obtenue

## 2 Rendement :

Le rendement moyen en huile essentielle des parties aériennes de cyprès extraites par entraînement à la vapeur d'eau a été calculé en fonction de la masse de la matière végétale traitée. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau IV :** Rendement et densité en huile essentielle des huiles essentielles de *Cupressus sempervirens* L.

Paramètres étudiés	Notre étude	Amara et Boughérrat, 2017	AFNOR ; Amara et Boughérrat, 2017
<b>Rendement</b> (%)	0,31	0,41	/
<b>Densité relative à</b> <b>20°C</b>	0,86	0,878	0,863- 0,885

D'après les résultats mentionnés dans le tableau III, l'huile essentielle que nous avons obtenue était de couleur jaunâtre, avait l'odeur caractéristique de la matière végétale, avait un fort arôme boisé et avait un aspect fluide et clair. Nous avons constaté que les propriétés organoleptiques de nos huiles sont très proches de celles présentées par la norme française **AFNOR** et des études

antérieures réalisées en Algérie. Cependant, il peut y avoir de légères différences dues à la méthode de conservation ou d'extraction de ces huiles.

Les rendements varient selon la méthode d'extraction et aussi selon la partie de la plante. A travers les résultats dans le tableau III, nous avons remarqué que le rendement en huile essentielle, obtenu par entraînement à la vapeur d'eau est de 0,31%. Ce taux est proche par rapport à celui rapporté par **Amara et al., 2014** avec un rendement de (0,41%).

### **3 Evaluation des activités biologiques :**

#### **Evaluation de l'activité anti-hémolytique :**

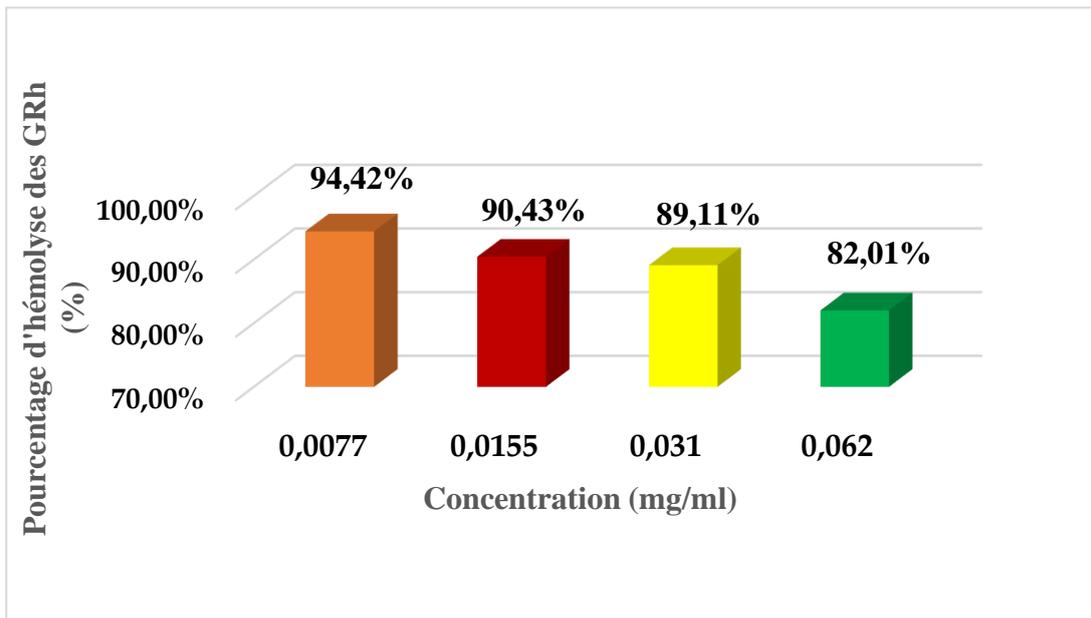
L'étude de la protection de la membrane érythrocytaire est d'une grande importance pour le traitement de certaines maladies hémolytiques. Le but de cette étude était d'évaluer la capacité des huiles essentielles à prévenir l'hémolyse des globules rouges humains (GRh), induite d'une part par la pression osmotique et le stress thermique. La motivation pour l'utilisation des globules rouges est leur acceptation comme modèle cellulaire dans la recherche scientifique et leur similitude avec d'autres membranes cellulaires, en particulier celle du lysosome (**Aberrane et al., 2018**).

Un érythrocyte, est une cellule anucléée unique dont le cytoplasme est composé à 95% d'hémoglobine. Ces cellules présentent de nombreuses propriétés attribuables aux protéines et aux lipides membranaires et sont hautement spécialisées dans le transport des complexes d'oxygène des poumons vers le reste du corps. Leur durée de vie est de 120 jours, période pendant laquelle ils parcourent près de 500 kilomètres en microcirculation (**Tighiouare et al., 2018**).

L'activité anti-hémolytique a été évaluée en utilisant des concentrations différentes de l'HE, le pourcentage de l'inhibition de l'hémolyse a été présenté dans les figures (18, 19 et 20) :

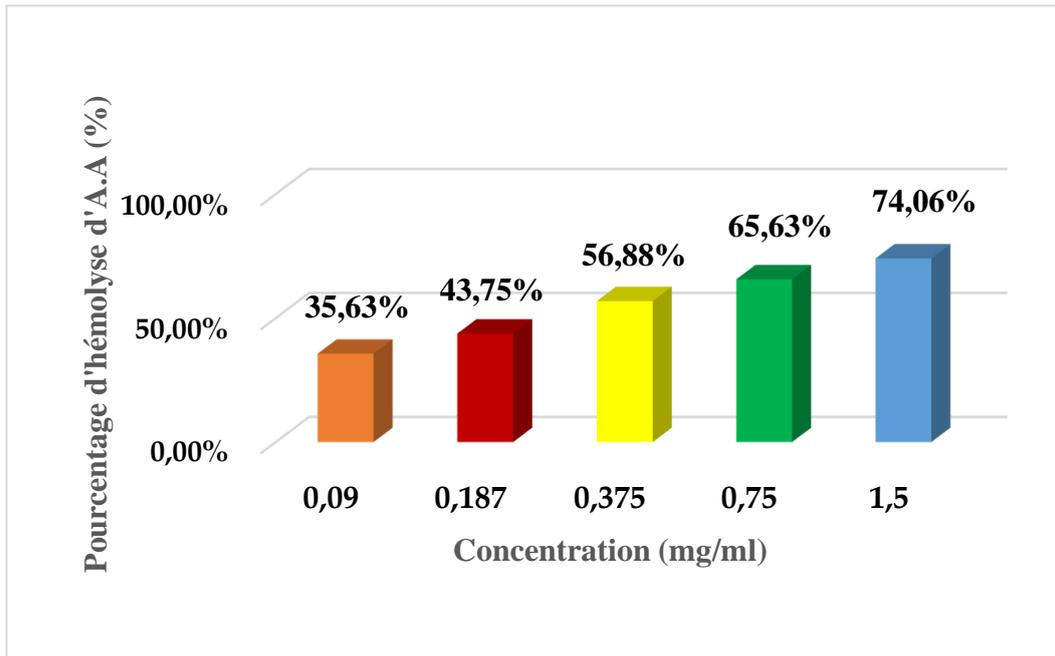


**Figure 15 :** Hémolyse des globules rouges



**Figure 16 :** Pourcentage d'inhibition de l'hémolyse des globules rouges

L'évaluation de la stabilisation membranaire est mesurée par le taux de libération de l'hémoglobine à 560 nm pour chaque concentration de l'huile essentielle utilisée en comparant à l'acide ascorbique qui est un anti-hémolytique.



**Figure 17 :** Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique

Nos résultats montrent que l'acide ascorbique à des concentrations de 0,187 , et 0,375 mg/ml présente un effet protecteur moyen des membranes des GR, allant de 43,75 à 56,88 %, et atteint son minimum à une concentration de 0,09 mg/ml avec (35,63 %) de protection. Par la suite, l'effet protecteur augmente significativement et présente un effet anti-hémolytique, protecteur et stabilisateur des membranes des GR avec un pourcentage d'inhibition allant de 65,63 % et 74,06 % aux concentrations 0,75 et 1,5 mg/ml respectivement.

Les résultats montrent que cette huile essentielle a un bon potentiel comme agent anti-hémolytique et à un puissant degré en comparaison à l'acide ascorbique. Cette activité stabilisatrice de la membrane des GR varie avec la concentration.

L'évolution de l'activité anti-hémolytique a été inversement proportionnelle à la concentration de l'huile essentielle, c'est-à-dire, plus la concentration de l'huile essentielle diminuait plus le pourcentage d'inhibition augmentait, tout l'inverse de l'acide ascorbique.

**Evaluation du pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de cyprès :**

**Méthode de diffusion sur disque :**

L'activité antimicrobienne a été effectuée par aromatoigramme. Le diamètre des zones d'inhibition ainsi que la sensibilité des souches bactérienne vis-à-vis de l'huile essentielle du cyprès sont résumés dans le tableau V et les figures : 21 ; 22 et 23 :

**Tableau V :** Résultats des diamètres des zones d'inhibition en mm de l'activité antimicrobienne de l'HE de *Cupressus sempervirens* L.

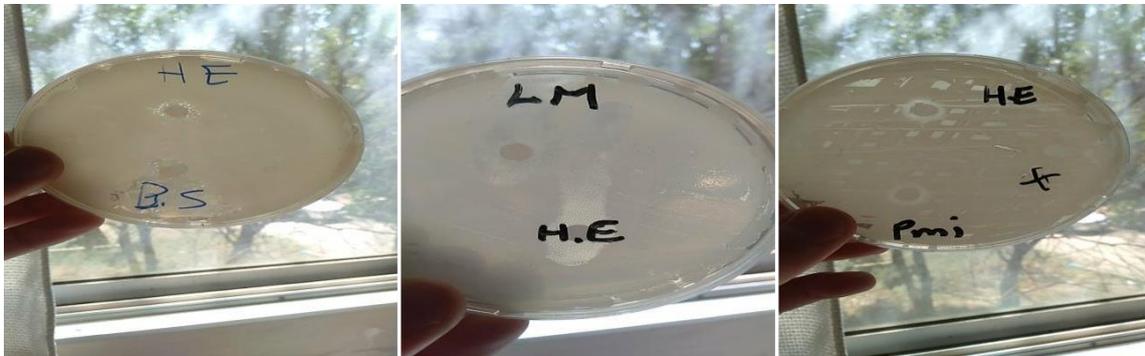
Souches microbiennes	Zone d'inhibition	DMSO	Gentamicine	Nystatine
<i>Proteus mirabilis</i>	10,75	6	24	NT
<i>Citrobacterfreundii</i>	6	6	29	NT
<i>Bacillus subtilis</i>	12,5	6	14	NT
<i>Enterococcus faecalis</i>	6	6	16	NT
<i>Listeria monocytogenes</i>	17	6	11	NT
<i>Candida albicans</i>	10	6	NT	15

L'huile essentielle de *Cupressus sempervirens* L. montrent une sensibilité aux différentes souches testées. Ainsi, l'HE possède une activité modérée contre *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis* et *Candida albicans* avec des zones d'inhibition variant de 10 à 12,5 mm. Alors que *Listeria monocytogenes* s'est révélée très sensible à l'huile essentielle avec un diamètre de l'ordre de 17 mm dépassant largement le diamètre d'inhibition de l'antibiotique de référence à savoir la gentamicine (11mm). Par contre pour *Citrobacter freundii* et *Enterococcus faecalis* (6 mm) l'effet inhibiteur est absolument absent.

Nous avons noté une certaine différence de sensibilité entre les bactéries à Gram+ et à Gram-, nous avons remarqué que les souches à Gram+ étaient très sensibles à l'activité antibactérienne de l'HE que les souches à Gram-. D'un autre côté, les souches à Gram<sup>-</sup> étaient résistantes. Nos résultats sont en concordance avec plusieurs travaux antérieurs notamment ceux de **Bouzouita et al., 2008.** qui confirment que les souches à Gram+ sont plus sensibles à l'action antimicrobienne de l'HE que celles à Gram-. D'une autre part, **Amara et Boughérara, 2017.**

ont remarqué que *Candida albicans* est l'espèce la plus sensible à l'action inhibitrice de l'HE avec un diamètre de zone d'inhibition égale à 20 mm. Suivi par *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (13 mm). Ces résultats ne sont pas en accord avec nos travaux. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'un microorganisme à un autre et d'un extrait à un autre, la méthode d'extraction ainsi que la quantité des extraits mise dans les disques pourrait être à l'origine de ces résultats.

La nystatine étant l'antifongique de référence, son diamètre d'inhibition vis-à-vis de *Candida albicans* (15mm) été supérieur à celui de notre HE (10mm).



**Figure 18 :** Zones d'inhibition des souches (*Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* et *Proteus mirabilis*).



**Figure 19 :** Zones d'inhibition des souches (*Enterococcus faecalis* et *Citrobacterfreundii*).



**Figure 20 :** Zone d’inhibition de *Candida albicans* par l’huile essentielle de cyprès.

Plusieurs études ont montré que les huiles essentielles des plantes, ont la plus grande efficacité dans le traitement des pathologies infectieuses (**Rios et Recio, 2005**). Elles ont l’avantage de ne pas engendrer une résistance bactérienne dû à leur contenu en un large spectre de composés bioactifs (**Maggi et al., 2009**). Les substances hydrosolubles exercent un effet plus faible comparé à celui des substances non hydrosolubles. Ceci est dû probablement à la capacité des molécules liposolubles de s’intercaler dans les membranes des cellules bactériennes et les endommager (**Candan et al., 2003**).

**Méthode de micro-dilution en milieu liquide :**

Les résultats obtenus par la méthode de diffusion en puits nous ont permis de confirmer quantitativement l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de cyprès contre les souches bactériennes les plus sensibles et d'exprimer la zone d'inhibition. L'évaluation quantitative de l'activité antibactérienne a été réalisée en déterminant la concentration minimale inhibitrice par dilution en milieu liquide. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau VI.

**Tableau VI :** La concentration minimale inhibitrice de l’HE de *Cupressus sempervirens* L.

Souches bactériennes	CMI (µl/ ml)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1,25
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	2,5
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	2,5

D'après les résultats obtenus dans le tableau V, nous remarquons que cette méthode confirme les résultats obtenus avec la méthode de diffusion par disque.

Après 24 heures d'incubation à 37°C, la souche *Bacillus subtilis* s'est avérée la plus sensible avec une CMI égale à 1,5 µl/ml et ce cyprès s'est montré efficace contre cette souche. Nos résultats sont en contraste avec d'autres études. D'après **Mazari et al., 2010**. Ils ont montré que l'huile de *C. Sempervirens* était inactive contre les souches bactériennes étudiées.

Il convient de noter que l'activité antibactérienne dépend également du stade de croissance des cellules bactériennes. En fait, selon **Bakkali et al., 2008**. Les cellules en division seraient plus sensibles, peut-être parce que l'extrait pénètre plus efficacement dans le site de croissance.

L'activité d'une huile essentielle est directement liée à sa composition chimique. On considère que les huiles essentielles riches en composés oxygénés sont celles qui donnent les meilleures activités et à l'inverse celles qui sont riches en constituants hydrocarbonés ont une activité modérée (**Burt, 2004**).

De nombreuses études ont démontré la corrélation entre l'activité antibactérienne et le profil chimique d'une huile essentielle. Le classement de l'activité exercée par les composés majoritaires des huiles essentielles est dans l'ordre suivant : phénols > alcools > aldéhydes > cétones > éthers > hydrocarbures (**Kalemba et Kunicha, 2003**).

## **Conclusion et perspectives**

Les plantes aromatiques constituent une source inépuisable de molécules bioactives principalement les huiles essentielles qui pourront constituer un choix aux agents antimicrobiens conventionnels. Nous avons fait une étude sur l'espèce *Cupressus sempervirens* L. appartenant à la des Cupressacées, et fait extraire les huiles essentielles de ses parties aériennes. Nous nous sommes aussi intéressés à l'évaluation de leurs activités anti-hémolytique et antimicrobienne.

En premier lieu l'extraction de l'huile essentielle par entraînement à la vapeur d'eau des parties aériennes (rameau, cônes et tiges) du cyprès, de la région de Tlemcen, a donné un rendement 0,31%.

Par la suite nous avons évalué l'activité anti-hémolytique de notre HE sur la base du modèle érythrocytaire. La sensibilité des GRh a été notée à différentes concentrations d'huile. Cette étude a montré que l'huile ne provoquait pas une hémolyse (94,42% à 82,005%) ; Les résultats ont montré que l'huile avait un effet anti-hémolytique significatif. Par conséquent, on peut dire que l'huile a un effet stabilisant sur les membranes des globules rouges et a donc le même potentiel pour les membranes lysosomales.

Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons évalué l'effet antimicrobien de cette HE, les résultats ont montré que l'huile essentielle de cyprès a présenté un effet antimicrobien puissant contre *Bacillus subtilis*, *Lysteria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Candida albicans*. Il a eu la plus basse CMI (1,25 µl/ml) contre *Bacillus subtilis*.

L'ensemble de ces résultats a permis d'évaluer les activités anti-hémolytique et antimicrobienne de l'HE du Cyprès vert afin de mieux connaître, de valoriser et d'utiliser ces ressources dans le domaine thérapeutique. Pour plus d'efficacité, de nombreuses perspectives sont envisagées :

- ✓ Compléter ce travail par l'analyse chimique de cette huile essentielle.
- ✓ Elargir le panel des tests des activités *in vitro*, afin d'y trouver une application pharmaceutique, cosmétologique ou alors en industrie agro-alimentaire.

**Références**  
**Bibliographiques**

### A

**Aberrane S., Mehalla M., (2018).** Etude de l'activité ant-inflammatoire et antihémolytique de l'extrait aqueux de feuilles de *Malva sylvestris* L. Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme Master : Biochimie Appliquée, Université Mouloud Mamaeri, Tizi-Ouazou, Algérie.

**Abdelli W, (2018).** « Caractérisation chimique et étude de quelques activités biologiques des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* et de *Thymus vulgaris* ». Thèse présentée en vue de l'obtention d'un diplôme de doctorat, Université de Mostaganem (Algérie).

**Afif H., Mokahli S., Bourra H., Aichane A., Bouayade Z., (2006).** Sensibilisation cutanée au Cyprés à Casablanca. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie clinique*, 46 : 633-639.

**AFNOR, (2000).** « Recueil de normes » : les huiles essentielles Tome 2. Monographies relatives aux huiles essentielles. AFNOR. Paris (France). 661-663.

**Aloui F., Nefzia., Jedidis., Selmi H., Hasnaoui F., Dallalis., Bouraoui H., MOUHBI R., Abbas C., (2020).** Analyse phytochimique et évaluation in vitro de la digestibilité des feuilles et des cônes de *Cupressus sempervirens* originaires de Tunisie. *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology*, 71(2): 4311-4318.

**AL-Snafi A.E., (June 2016).** Medical importance of cupressus sempervirens-Areview. *IOSR journal of pharmacy*, 6 (2): 66-67.

**Amara N., Boughérara Y., (2017).** Activité Antimicrobienne de l'Huile Essentielle du Cyprés Vert (*Cupressus Sempervirens* L.), *Algerian Journal of Natural Products*, 5(2) : 455-462.

**Amara S., Benmoussat A., Benyoucef B., Nordell B., (2007).** Evaluation des besoins énergétique de chauffage et climatisation d'un bâtiment pour le site de Tlemcen. 13<sup>èmes</sup> Journées Internationales de Thermique.

**Amri I., Hamrouni L., Mohsen H., Gargouri S., Jamoussi B., (2013).** Chemical composition, bio-herbicide and antifungal activities of essential oils isolated from Tunisian common cypress (*Cupressus sempervirens* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(16): 1070-1080.

**Argui H., Ben Youchret-Zalleza O., Can Suner S., Deniz Periz Ç., Türker G., Ulusoy S., Ben-Attia M., Büyükkaya F., Oral A., Coskun Y., Said H., (2021).** Chemical Composition, Physicochemical Properties, and Antibacterial Activity of *Cupressus sempervirens* L. Essential Oil, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 24(3) : 439-452.

**Asgary S., Naderi G.A., Ardekani M.R.S., Sahebkar A., Airin A., Aslani S., Kasher T., Emami S.A., (2013).** Chemical analysis and biological activities of *Cupressus sempervirens* var. *horizontalis* essential oils. *Pharmaceutical Biology*, 51: 137-144.

### B

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

**Bechir A., El Mousadik A., Pichot CH., (2004).** Diversité allozymique de peuplements de cyprès naturels et introduction au Maroc : conséquences pour la gestion des ressources, *Ann. For. Sci*, 61 : 669-676.

**Benarbia S., Nebhi NH, (2020).** L'effet antifongique des huiles essentielles du Cyprès (*Cupressus sempervirens* L.) et du Genévrier (*Juniperus phoenicea* L.) sur *Fusarium*. Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme Master : Phytopathologie, Université Akli Mouhand Oulhadj Bouira, Algérie.

**Bergogne-Bérézin E, Dellamonica P, (1999).** Antibiothérapie en pratique clinique. 2<sup>ème</sup> Ed. Masson. Paris. France.

**Besbas S, (2020).** Métabolites secondaires d'*ouonis mitissima* L. (Fabaceae et évaluation biologique). Thèse présentée en vue de l'obtention d'un diplôme de doctorat : chimie organique, Université Hadj-Batna 1, Algérie.

**Biyiti L., Meko'o D., Tamzc V. & Amvam Zollo P., (2004).** Recherche de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales camerounaises. *Pharm. Med. Trad. Afr.*, 13: 11-20.

**Boligon A.A., Machzdo M.M., Athyade M.L., (2014).** Technical Evaluation of Antioxidant Activity. *Medicinal chemistry*, 4(7) : 517-522.

**Bouallaoui I., Khaldi A., Brikat A, (2022).** Extraction, caractérisation et évaluation de l'activité antibactérienne d'huile essentielle d'*Artemisia campestris* L. Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme Master : Biochimie Appliquée, Université Ahmed DRAÏA – Adrar, Algérie.

**Bouhdid S., Abrini J., Baudoux D., Manresa A., Zhiri A., (2012).** Les huiles essentielles de l'origan compact et de la cannelle de Ceylan : pouvoir antibactérien et mécanisme d'action. *J Pharm Clin*, 31(3) : 141-8.

**Bouhoune A.H., Laoufi M.** Conception, réalisation et mise en œuvre d'une installation semi pilote pour l'entraînement à la vapeur d'eau des huiles essentielles. Optimisation de l'extraction de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* L. Projet de Fin d'Etudes Pour l'obtention du diplôme

D'Ingénieur d'Etat en Génie Chimique, Ecole Nationale Polytechnique, Algérien, 01 juillet 2010.

**Boukhatem M.N., Ferhat A., Kameli A., (2019).** Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles : revue de littérature. *Revue Agrobiologia*, 9(2) : 1653-1659.

**Boukhris M., Regane G., Yangui T., Sayadi S., Bouaziz M., (2012).** Chemical Composition and Biological Potential of Essential Oil from Tunisian Cupressus sempervirens L. *Journal of Arid Land Studies*, 22 : 329-332.

**Boutabia L., Telailia S., Bouguetof I., (2016).** Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. de la région de Hammamet (Tébessa-Algérie), Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, 85 : 174-189.

**Bouyahya A., Bakri Y., El-touys A., Talbaoui A., Khouchla A., Charfi S., Abrini J., Dakka N., (2017).** Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. Resistance to Antibiotics and Mechanisms of Action of Essential Oils against Bacteria, P. 1-11.

**Bouزيد W., Yahia M., Abdeddaim M., Aberka N.M.C., Ayachi A., (2011)** Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de l'Aubepine monogyne. *Lebanese Science Journal*, 12(1).

**Bouzouita., N., Kachouri F., Benhalima, M., Chaabouni, M.M., (2008).** Composition chimique et activité antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de Juniperus phoenicea. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 10 : 119-125.

**Burt S. A., (2004).** Essential oils : their antibacterial properties and potentiel applications in foods-A reiew. *International J. of Food Microbiology*, 94 : 223-253

### C

**Candan F., Unlu M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., Sökmen A., Akpulat H.A.. (2003).** Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of Achillea millefolium subsp. millefolium Afan. (Asteraceae). *J Ethnopharmacol.* 87(2-3): 215-20.

**Camus A, (1914).** Les cyprès (Genre Cupressus) : monographie-systématique- anatomie-culture-principaux usage, Paris, P9.

**Carson CH.F., Hammer K.A., (2011).** Chemistry and Bioactivity of Essential Oils, Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents, 204-238.

**Chanegriha N., Baaliouamer A., Meklati B.Y., Chretien J.R., Keravis G., (2011).** GCand GC/MS Leaf Oil Analysis of Four Algerian Cypres Species. *Journal of Essential Oil Research*, 9: 555-559.

**Cheraief I., Ben Jannet H., Hammami M., (2006).** Composition chimique de l'huile essentielle des cônes du *Cupressus sempervirens* L. Poussant en Tunisie.

**Choi Y.M., Noh D.O., Cho S.Y., Suh H.J., Kim K.M., Kim J.M., (2006).** Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT- Food Science and Technology*, 39: 756-761.

**Christine F. Carson K.A., Carson H., (2011).** Chemistry and Bioactivity of Essential Oils. Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents.

**Caudullo G., de Rigo D., (2016).** *Cupressus sempervirens* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. European Atlas of Forest Tree Species.

### D

**Didi A.O., Yakoubi S.I., (2021).** Extraction analyse et encapsulation d'huile essentielle de déchets de citron (*Citrus limon*) et déchets d'orange (*Citrus sinensis*), en vue de leurs valorisations. Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme Master : Bio-industrie Analyse et contrôle, Université les frères Mentouri de Constantine, Algérie.

### E

**Egza T.F., (2020).** A Review on Extraction, Isolation, Characterization and Some Biological Activities of Essential Oils from Various Plants. *GSJ*, Vol. 8: P 1692-1722.

**Elansary H.O., Salem M.Z.M., Ashmaxy N.A., Yacut M.M., (2012).** Chemical Composition, Antibacterial and Antioxidant Activities of Leaves Essential Oils from *Syzygium cumini* L., *Cupressus sempervirens* L. and *Lantana camara* L. from Egypt. *Journal of Agricultural Science*, 4(10) : P 144-152.

### F

**Fadel H., Benayache F., Chalchat J.C., Figueredo G., Chalard P., Hazmoune H., Benayache S., (2021).** Essential oil constituents of *Juniperus oxycedrus* L. and *Cupressus sempervirens* L. (Cupressaceae) growing in Aures region of Algeria. *Natural Product Research*, 35(15) : 2616-2620.

**Fillatre Y., (2011).** Produits phytosanitaires : Développement d'une méthode d'analyse multi-résidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem. Thèse de Doctorat : Chimie analytique, Université Angers, France.

**Frezza C., De Vita D., Sciubba F., Toniolo Ch., Tomassini L., Nicoletti M., Franceschin M., Guiso M., Bianco A., Serafini M., Foddai S., (2022).** There Is Not Only *Cupressus*

sempervirens L. : A Review on the Phytochemistry and Bioactivities of the Other *Cupressus* L. Species. *Applied Sciences*, 12(14).

### G

**Guinobert I., Bardot V., Berthomier L., Ripoche I, Faivre C., Haddioui L., Belkhelfa H., (2018).** Activité virucide in vitro d'un extrait de cyprès sur des virus humains et bovins. *Phytothérapie*, 16(28) : 281-289.

### H

**Habibou H.H., Idrissa M., Khalid I., (April 2019).** Activité Antioxydante des Extraits Méthanoliques de Différents Organes de *Detarium microcarpum* Guill. & Perr. *Journal*, 15(12).

**Haddouchi F., Benmansour A., (2008).** Huiles essentielles, utilisations et activités biologique. Application à deux plantes aromatiques. *Les technologies de laboratoire –N°8*, P 20-27.

**Haddou F., Hammouche I, (2012).** Extraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. et valorisation des eaux de distillation. Projet de Fin d'Etudes pour l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat en Génie Chimique, Ecole Nationale Polytechnique, Algérie.

**Hafsi Z, Belhadj S., Derridj A., Mevy J., Notonnter R., Tonetto A., Gauquelin T., (2017).** Etude de la variabilité morphologique (Aiguilles, Galbules) du complexe spécifique *Juniperus oxycedrus* L., Le genévrier oxycèdre, Au sein de sept populations d'Algérie, *Revue d'Ecologie (Terre de vie)*, 72 (4) : 353-373.

**Hamma W. Djedid A., Ouissi M.N., (2016).** Délimitation du patrimoine urbain de la ville historique de Tlemcen en Algérie. *Algérie. Cinq continents*, 6(13): 42-60.

**Herzi N., Camy S., Boujila J., (2013).** Extraction of essential oil from *Cupressus sempervirens*: comparison of global yields, chemical composition and antioxidant activity obtained by hydrodistillation and supercritical extraction. *Natural Product Research*, 27 : 1795-1799.

**Hireche B., Ferhat H, (2019).** Etude de l'effet inhibiteur des huiles essentielles de Cyprès (*Cupressus Sempervirens* L.) sur la corrosion de l'acier X70 (sans et avec soudure). Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme Master : Physique des matériaux, Université Mohamed Khider de Biskra, Algérie.

### J

**Jahani M., Akaberi M., Khayyat M.H., Emami S.A., (2019).** Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils from *Cupressus sempervirens*. var. *sempervirens*, C.

*sempervirens*. cv. *Cereiformis* and *C. sempervirens* var. *horizontalis*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 22(4): 917-931.

**Joffin J.N., Leyral G., (2001).** Microbiologie technique 1 dictionnaire des techniques. 3<sup>ème</sup> Ed. Biologie Technique. Bordeaux. France.

### K

**Kalemba D., Kunicka A., (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.*, 10 : 813-829.

### L

**Lamamra M, (2017).** Activités biologiques et composition chimique des huiles essentielles d'*Ammiopsis aristidis* Coss. (Syn. *Daucus aristidis* Coss.) Et d'*Achillea santolinoides* Lag. Thèse présentée en vue de l'obtention d'un diplôme de doctorat : Biologie végétale, Université Ferhat Abbas Sétif 1, Algérie.

### M

**Maggi F., Bramucci M., Cecchini C., Coman M.M., Cresci A., Cristalli G., Lupidi G., Papa F., Quassinti L., Sagratini G., Vittori S., (2009).** Composition and biological activity of essential oil of *Achillea ligustica* All. (Asteraceae) naturalized in central Italy: Ideal candidate for anti-cariogenic formulations. *Fitoterapia*, 80 : 313-319.

**Mahboub N., Slimani N., Ben Nadji S., Bouzeguag C., Kadri M., Khelil A., (2019).** Extraction et caractérisation physico-chimique et biologique des huiles essentielles à partir de *Cymbopogon schoenanthus* dans la région de Ghardaia. *Revue des Bio Ressources*, 19(2) : 21-34.

**Mazari K., Bendimerad N., Bekhechi C., Fernandez X., (2010).** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Algerian *Juniperus phoenicea* L. and *Cupressus sempervirens* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(10) : 959-964.

**Mejri J., Aydi A., Abderrabba M., Mejri M., (2018).** Emerging extraction processes of essential oil: A review. *Asian Journal of Green Chemistry*.

**Merghache S., Hamza M., Tabti B., (2009).** Etude physicochimique de l'huile essentielle de *Ruta Chalepensis* L. de Tlemcen, Algérie. *Afrique Science*, 5(1) : 67-81.

**Mnayer D, (2014).** Eco-Extraction des huiles essentielles et des arômes alimentaires en vue d'une application comme agents antioxydants et antimicrobiens. Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur : Chimie, Université d'Avignon, Vaucluse.

### N

**Nazzaro F., Fratianni F., Coppola R., De Feo V., (2017).** Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals*, 10(4).

**Nichane M, (2015).** Contribution à l'étude de l'entomofaune de quelques espèces résineux de la région de Traras occidentaux (W.Tlemcen). Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister en Foresterie : Gestion et conservation des écosystèmes. Tlemcen. P35. P39. P41.

### O

**Oyedapo O.O., Akinpelu B.A., Akinwunmi K.F., Adeyinka M.O., Sipeolu F.O., (2010).** Red blood cell membrane stabilizing potentials of extracts of *Lantana camara* and its fractions. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 2: 46-51.

### P

**Pessini G.L., Prado Dias Filho Celso B., Nakamura V., Cortez D.A.G., (2003).** Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper Regnelli* (Miq).C.D.C. Var. *Pallescens* (C.D.C). Yunk. Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz, P 98.

**Pfaller M.A., Messer S.A., Karlsson Å., Bolmström A., (1998).** Evaluation of the Etest method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by using three different agar media. *Journal of Clinical Microbiology*, 36 : 2586-2589.

**Pibiri M.C, (2005).** Assaïsement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat présentée à faculté environnement naturel, Architectural et construit, Ecole polytechnique fédérale de Lausanne.

### R

**Rahmani Z, (2020).** Contribution à l'étude phytochimique, Electrochimique et biologique des extraits de *Cupressus sempervirens* (L). Thèse présentée en vue de l'obtention d'un diplôme de doctorat : Analyses Physico-Chimiques et Réactivité des Espèces Moléculaires, Université Kasdi Merbah-Ouargla, Algérie, 22 Octobre.

**Rassem H.H., Abdurahman Hamid N., Rosli M.Y., (2018).** Biological activities of essential oils – A review. *Pacific International Journal*, 1(2): 1-14.

**Rios J.L., Recio M.C., (2005).** Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100 : 80-84.

### S

**Sadique J., Elango V., Thenmozhi V., (1989).** Anti-Inflammatory activity of some Indian medicinal plants. *Anc Sci Life*, 8(3-4): 258-261.

**Selim S.A., Adam, M.E., Hassan S.M., Albalawi R.A., (2014).** Chemical composition, antimicrobial and antibiofilmactivity of the essential oil and methanolextract of the Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L.). *BMC Complement Alternative Medicine*.

**Sriti J., Haj Salem M., Aidi Wannes W., Bachrouch O., Mejri H., Belloumi S., Fares N., Jallouli S., Haoual-Hamdi S., Mediouni-Ben Jemâa J., Limam F., (2023).** Antioxidant, antibacterial and insecticidal activities of cypress (*Cupressus sempervirens* L.) essential oil. *International Journal of Environmental Health Research*, P 1-12.

**Stoyka CH., Boualem B., SAID A., (2013).** Entraînement à la vapeur d'eau à l'échelle semi-pilote de l'huile essentielle du Rosmarinus officinalis L. : optimisation et extraction assistée par tensioactif. *Récents Progrès en Génie des Procédés*, N 104.

### T

**Tappel A., Moller L., (1996).** Glutathion Peroxidase and other Selenoproteinler. Ed. VAN Nostrand Co. New York.

**Tighiouaret F., Hassani K., (2018).** Etude de l'effet de l'oxyde de manganés sur la viabilité cellulaire des globules rouges humaines et le rôle de Globularia alypum et Juniperus oxycedrus. *Toxicologie*, Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi, Algérie.

**Touafek O., (2010).** « Etude phytochimique des plantes médicinales du Nord et du Sud Algérien » ; Thèse présentée en vue de l'obtention d'un diplôme de doctorat : phytochimie ; université de Mentouri ; Constantine, Algérie.

**Trabsa H., (2015).** Activité antioxydante et anti-inflammatoire des fractions des plantes médicinales : Sedum sediforme et Lycium arabicum. Thèse présentée en vue de l'obtention d'un diplôme de doctorat : Biochimie, Université Ferhat Abbas Sétif 1, Algérie.

### V

**Vanden Berghe D.A. & Vlietinck, A.J., (1991).** Screening for antibacterial and antiviral agents. In: Hostettmann, K. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry, Vol. 6, Assays for Bioactivity*. London, Academic Press, 47-59

### W

**WeiCk CW., Aamir N., ReiChart J., (2023).** The Ethnobotanical Evolution of the Mediterranean Cypress (*Cupressus sempervirens*). *Economic Botany*, P 1–19.

# **Annexes**



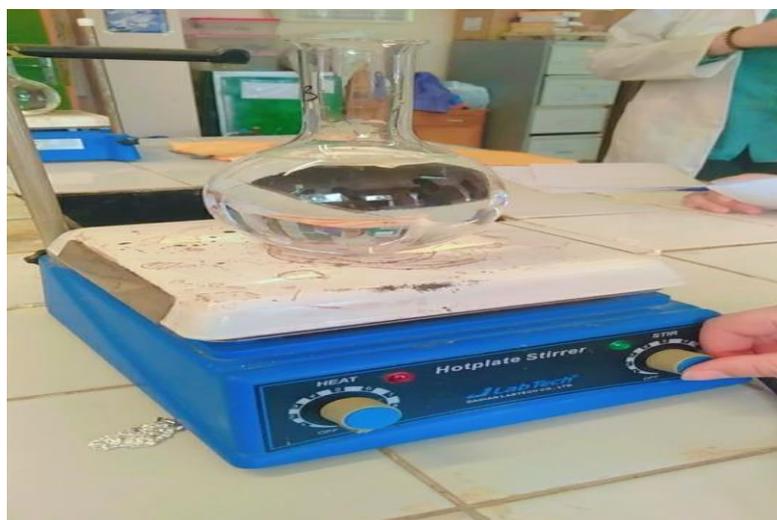
pH mètre



Autoclave (TIMO)



Balance analytique



Agitateur



Etuve



Spectrophotomètre



Centrifugeuse

## الملخص :

ينتمي *Cupressus sempervirens* L. ، إلى جنس *Cupressus* من عائلة *Cupressaceae* ، ويستخدم في مجالات علاجية مختلفة ، وخاصة في الطب التقليدي مثل علاج النوبات التنفسية ، وعلاج الندبات ، ومضادات الإسهال ، وخافض الحرارة ... من أجل تعزيز هذا النبات ، يهدف عملنا إلى استخراج زيوتها الأساسية بالإضافة إلى تقييم نشاطها المضاد للبكتيريا والمضاد للدم. لهذا أجرينا دراسة على النبات. أعطى استخراج الزيت العطري من جميع الأجزاء الهوائية لهذا النبات بالتقطير بالبخار عائداً قدره 0.31%. قمنا بتقييم النشاط المضاد للدم على أساس نموذج كرات الدم الحمراء، تظهر نتائج عملنا أن الزيت لم يسبب انحلال الدم بعد ذلك ، تم تقييم النشاط المضاد للميكروبات بواسطة التصوير العطري وطريقة التخفيف الدقيق على خمس سلالات بكتيرية ، وخميرة واحدة. أظهرت النتائج أن زيتنا له تأثير على ثلاث سلالات هي *Pseudomonas aeruginosa* و *Bacillus subtilis* و *Listeria monocytogenes* وكذلك خميرة *Candida albicans*.

**الكلمات المفتاحية:** *Cupressus sempervirens* L.، نشاط مضاد للجراثيم، مضاد للتحلل، زيت عطري

## Résumé :

*Cupressus sempervirens* L., appartient au genre *Cupressus* de la famille des cupressacées, elle est utilisée dans différents domaines thérapeutiques surtout dans la médecine traditionnelle comme le traitement des attaques respiratoires, traitement des cicatrices, anti-diarrhéique, antipyrétique...

Dans le but de la valorisation de cette plante, notre travail a visé à extraire leurs huiles essentielles en plus d'évaluer son activité antibactérienne, et anti-hémolytique. Pour cela, on a effectué une étude sur la plante. L'extraction de l'huile essentielle de toute la partie aérienne de cette plante par entraînement à la vapeur d'eau, a donné un rendement de 0.31%.

On a évalué l'activité anti-hémolytique sur la base de modèle érythrocytaire, les résultats de notre travail montrent que l'huile ne provoquait pas d'hémolyse. Après, on a évalué l'activité antimicrobienne par les méthodes de l'aromatogramme et des micro-dilutions sur cinq souches bactériennes, et une levure. Les résultats montrent que notre huile a un effet sur trois souches à savoir : *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* et *Listeria monocytogenes* ainsi que la levure *Candida albicans*.

**Mots clés :** *Cupressus sempervirens* L., activité antimicrobienne, activité anti-hémolytique, huile essentielle.

## Abstrat :

*Cupressus sempervirens* L., belongs to the *Cupressus* genus of the *Cupressaceae* family, it is used in various therapeutic areas, especially in traditional medicine such as the treatment of respiratory attacks, treatment of scars, anti-diarrheal, antipyretic... In order to enhance this plant, our work aimed to extract their essential oils in addition to evaluating its antibacterial and anti-hemolytic activity. For this, we carried out a study on the plant. The extraction of the essential oil from all the aerial part of this plant by steam distillation gave a yield of 0.31%. We evaluated the anti-hemolytic activity on the basis of erythrocyte model, the results of our work show that the oil did not cause hemolysis. Afterwards, the antimicrobial activity was evaluated by the aromatogram and micro-dilutions methods on five bacterial strains, and one yeast. The results show that our oil has an effect on three strains namely: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* and *Listeria monocytogenes* as well as *Candida albicans* yeast.

**Keywords:** *Cupressus sempervirens* L, antibacterial activity, antihemolytic activity, essential oil.