



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTER DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université Abou Bekr Belkaïd - Tlemcen -

**FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA
TERRE ET DE L'UNIVERS**

Département de Biologie

Laboratoires

« Produits Naturels »

« Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique »

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

Master en Biologie

OPTION : Biochimie appliquée

Présenté par :

BENABDELKRIM Nafissa

Intitulé du thème

**Contribution à l'étude du rendement et du pouvoir
antimicrobien de l'huile essentielle de
Pituranthoschloranthus de la région de Biskra**

Soutenu le : 26/06 /2013 devant le jury suivant :

M^{me} BENMANSOUR M. Professeur Présidente

M^f BELYAGOUBI L. Maître Assistante A Examineur

M^{me} BEKHECHI C. Maître de conférences A Promotrice

Année Universitaire : 2012/ 2013

D é d i c a c e

*Je dédie ce travail à mes parentes, qu'ils
trouvent ici toute ma gratitude pour leur
soutien tout au long de mes études.*

A Mama Aicha.

A mes sœurs : Nourelhouda, Cherifa, Saïda

Keltoum

A mes frères : Ramdan, Abdelaziz,

Marwan, Hamza, Abdelazim.

*A mes oncles, mes tantes, mes cousins et
mes cousines (Batoul)*

*A mes amies : Zahia, Asma, Chahra,
Saadia, wafa, Mohamed,...*

*A mon encadreur M^{me} BEGHECHI
Chahrazed et sa famille, je vous
souhaite le bonheur.*

*A la doctorante M^{elle} Beddou
Fouzia.*

A tous mes collègues et les amies

Que Je n'ai pas mentionné.

NAFISSA

R e m e r c i e m e n t s

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 commence par exprimer ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements à **M^{me} BECHECHI Chahrazed**, Maître de conférence 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 Aboubekr Belkaid Tlemcen, Qui m'a honoré en acceptant de diriger ce travail, pour ses encouragements, ses conseils, sa disponibilité et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire. J'ai été satisfait de votre qualité exceptionnelle de bonne enseignante, merci de m'avoir guidé avec patience et d'avoir consacré autant d'heures pour les corrections de ce manuscrit ; je ne peux, Madame, que sincèrement vous exprimer mon respect et mon gratitude.*

*Je tiens à remercier **M^{me} BENMANSOUR M**, Professeur 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 Aboubekr Belkaid Tlemcen, d'avoir accepté la présidence du jury de mon travail, qu'elle trouve ici toutes mes expressions respectueuses.*

*Je tiens à exprimer ma très grande considération, et mon profond respect à **M^r BELYAGOUBI Larbi**, Maître Assistant 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 Aboubekr Belkaid Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner ce travail. On le remercie également pour son aide pour la réception des échantillons de cette plante.*

*Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements à la doctorante au laboratoire de Produits Naturels **M^{elle} BEDDOU Fouzia**, pour son aide, ses conseils et sa sympathie qui furent pour moi une source constante de motivation.*

*Je tiens à remercier **Mohamed ben yabba**, pour son appui et son soutien moral, quant à la réalisation de ce travail.*

Mes remerciements vont aussi à tous mes amis et notamment mes intimes, zahia, Asma, wafa, Chahra, saadia, ...

Je dédie enfin ce travail à ma famille pour la patience, le soutien moral et les encouragements qu'elle n'a cessé de me prodiguer tout au long de ma formation.

Liste des abréviations

AFNOR : Association Française de Normalisation

DMSO : Diméthyle Sulfoxyde

MH : Mueller-Hinton

UFC : Unité Formant Colonie

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DO : Densité Optique

HE : Huile Essentielle

PDA : Potato Dextrose Agar

Liste des figures

Page	
	Figure 01 : Structure chimique du flavonoïde glucoside.....7
	Figure 02 : Structure chimique de quelques composés flavoniques7
	Figure 03 : Structure chimique de quelques composés des huiles végétales identifiés dans l'espèce <i>Pituranthostortuosus</i>8
	Figure 04 : Structure chimique de deux monoterpénoïdes coumariniques identifiés dans l'espèce <i>Pituranthostriradiatus</i>8
	Figure 05 : Structure chimique de monoterpénoïdes coumariniques.....9
	Figure 06 : Structure chimique des composés coumariniques.....9
	Figure 07 : Structure chimique de cnidiline10
	Figure 08 : structures chimiques de composés isocoumariniques10
	Figure 09 : Structure chimique des composés identifiés dans l'huile essentielle de l'espèce <i>P. scoparius</i>..... 11
	Figure 10 : Structure chimique des flavonoïdes glucosidiques identifiés dans l'espèce <i>Pituranthos chloranthus</i> 11
	Figure 11: Structure de l'unité isoprénique.....13
	Figure 12: Structure de deux composés sesquiterpéniques.....13
	Figure 13: Exemples de quelques monoterpènes.....15
	Figure 14: Exemples de quelques sesquiterpènes16
	Figure 15: Exemples de quelques diterpènes.....16
	Figure 16: Structure de l'Acide mévalonique17
	Figure 17: Synthèse des monoterpènes18
	Figure 18: Synthèse des sesquiterpènes18
	Figure 19: Montage de l'hydro distillation21
	Figure 20: Schéma illustrant la méthode des chromatogrammes.....26
	Figure 21 : Schéma illustrant la méthode de micro-atmosphère26
	Figure 22 : Carte géographique du lieu du prélèvement28

Figure 23 : Montage d'hydrodistillation.....	29
Figure 24: Rendements moyens en huiles essentielles de <i>Pituranthos chloranthus</i>.....	35
Figure 25 : Taux d'inhibition de la croissance des colonies fongiques.....	39

Liste des tableaux

Tableau 01: Souches microbiennes testées.....	30
Tableau 02 : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition (en mm) des huiles essentielles de <i>Pituranthos chloranthus</i> relatives aux souches microbiennes testées.....	37
Tableau 03 : Concentrations minimales inhibitrices d'huile essentielle de <i>Pituranthos chloranthus</i> vis-à-vis des levures.....	38

Liste des photos

Photo 1 : Sensibilité des souches microbiennes selon la méthode de diffusion sur Disque.....	38
---	-----------

Résumé :

Les huiles essentielles possèdent d'importantes activités antimicrobiennes et peuvent se substituer avec succès aux antibiotiques qui montrent leurs inefficacités à l'encontre des microorganismes résistants.

Pour cela, nous nous intéressés à l'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Pituranthos chloranthus*. L'extraction de plusieurs échantillons est effectuée par hydrodistillation. Les rendements varient entre 0.8 et 1.5% (P/P). L'activité antimicrobienne est mise en évidence par la méthode de diffusion sur disque et par contact direct. L'huile essentielle de *Pituranthos chloranthus* est inactive vis-à-vis des bactéries testées sauf *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurimqui* se sont révélées sensibles. Les souches fongiques les plus sensibles sont : Les deux *Candida albicans* et *Aspergillus flavus* qui présentent une sensibilité avec des diamètres des zones d'inhibition variant entre 14,0 et 29.5mm et avec des CMI de l'ordre 4µl/ml. Les espèces microbiennes les plus résistantes sont : *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, et *Fusarium Oxysporum*.

Mots clés : *Pituranthos chloranthus*, huile essentielle, rendement, activité antimicrobienne.

Abstract:

Essential oils have important antimicrobial activities and can replace with success antibiotics which show their inefficiency against resistant microorganisms. In this study we have tested the antimicrobial activities of the essential oils of *Pituranthos chloranthus*. The extraction is done by hydrodistillation method.

Antimicrobial activity was tested by using the agar diffusion test. Both *Candida albicans* and *Aspergillus flavus* with sensitivities with diameters of inhibition ranging between 14.0 and 29.5mm and with MICs of 4µl/ml order areas. The most resistant microbial species: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Fusarium Oxysporum*

Key words: *Pituranthos chloranthus*, essential oils, antimicrobial activity.

الملخص:

تملك الزيوت الاساسية نشاطية ضد ميكروبية مهمة و تستطيع تعوض بنجاح المضادات الحيوية التي اثبتت عدمفعاليتها ضد البكتيريا المقاومة للشيء الني حثنا على اجراء الدراسة ضد ميكروبية.

تم استخلاص بواسطة التقطير المائي و درسنا الاثر الضد الميكروبي بواسطة طريقة الانتشار على الوسط الصلب

ابدى زيت نبات *Pituranthos chloranthus* مقاومة ضد البكتيريا ما عدى

Bacillus cereus, *Salmonella typhimurim*, *Aspergillus Fflavus* و *Candida IP*

مع

Candida albicans 10 مناطق تثبيط تتراوح بين 15-100 مم لها نشاط عالي

بينما ليست نشطة ضد الاعفان.

الكلمات المفتاحية :

Pituranthos chloranthus, الزيت الاساسي, النشاطية ضد الميكروبي .

Sommaire

	Page
Liste des abréviations	I
Liste des figures.....	II
Introduction	02
Synthèse bibliographique	
I. Présentation de la plante	05
I.1. Le genre Pituranthos	05
I.2. Systématique de la plante	05
I.3. Répartition géographique de la plante	06
I.4. Usages traditionnels... ..	06
I.5. Toxicité	06
I.6. Travaux antérieurs sur le genre Pituranthos	06
II. Les huiles essentielles	12
II.1. Définition	12
II.2. Composition chimique des huiles essentielles	12
II.2.1. Les terpènes... ..	12
II.2.1.1. Définition des terpènes	12
II.2.1.2. Historique sur les terpènes	13
II.2.1.3. Les différentes classes de terpènes.....	14
a. Monoterpènes	14
b. Sesquiterpènes.....	16
c. Diterpènes	16
-d- Les composés aromatiques	17
II.2.1.4. Synthèse des squelettes terpéniques.....	17
II.3. Utilisation des huiles essentielles	19
II.4. Toxicité des huiles essentielles.....	19
II.5. Facteurs intervenant dans la qualité des huiles essentielles... ..	20
II.6. Méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	21
II.6.1. Distillation	21
-a- Hydrodistillation :	21

-b- Extraction par entraînement à la vapeur d'eau	22
II.6.2. Extraction à froid	23
II.6.3. Extraction assistée par micro- onde	23
II.6.4. Extraction par solvants organique.....	23
II.7. Activité biologique des huiles essentielles.....	24
II.7.1. Méthode de détermination de l'activité antimicrobienne.....	25
-a- Aromatogramme (Méthode de diffusion en milieu gélosé)	25
-b- Méthode de micro-atmosphère	26

Matériel et méthodes.....

I. Provenance de la plante.....	28
II. Extraction des huiles essentielles	28
III. Calcul du rendement	29
IV. Etude de l'activité antimicrobienne	29
IV.1. Les souches étudiées	29
IV.2. Méthodes d'étude de l'activité antimicrobienne	30
IV.2.1. Aromatogramme (méthode de diffusion sur disque)	30
IV.2.2. Préparation de l'inoculum	31
IV.2.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI)	32
IV.2.3.1. Etude du pouvoir antifongique	32
IV.2.3.2. Méthode utilisé	32

Résultats et discussion.....

I. Calcul les rendements en huiles essentielles.....	35
II. Etude de l'activité antimicrobienne	35
II.1. Méthode de diffusion sur disque	36
II.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice(CMI)	38
II.2.1. Etude du pouvoir antifongique	39

Conclusion

Références bibliographiques.....

Annexe

De tout les temps, le règne végétal a offert à l'homme des ressources essentielles à son alimentation, à son hygiène et sa santé. Depuis les temps les plus anciens, les parfums de ces mêmes végétaux sont associés à des rites mystiques, artistiques et esthétiques.

Aujourd'hui encore, diverses maladies sont traitées uniquement par les seules thérapies naturelles qui font appel non seulement aux plantes aromatiques, mais aussi à leurs huiles essentielles obtenues généralement par hydrodistillation.

Il existe un grand nombre d'huiles essentielles connues dans le monde et plusieurs milliers d'entre elles ont été caractérisées. Cependant, de ce nombre, une faible proportion seulement présente un intérêt commercial. Cela s'explique par la composition chimique des huiles, les différentes utilisations possibles et leur coût de production.

On évalue qu'environ 300 produits naturels servent de matières premières pour l'industrie des parfums et des arômes. La demande mondiale a été estimée à 18,4 milliards de dollars US en 2004, qu'elle était de 8,3 milliards de dollars US en 1999.

La flore algérienne est caractérisée par sa diversité florale : Méditerranéenne, Saharienne et une flore Paléo-Tropicale, estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques. Ces espèces sont pour la plupart spontanées avec un nombre non négligeable (15%) d'espèces endémiques. Ce qui a donné à la pharmacopée traditionnelle une richesse inestimable. Les objectifs fixés sont l'inventaire ainsi que l'évaluation chimique et pharmaceutique des plantes médicinales algériennes dans le double but de valoriser et de rationaliser leur usage traditionnel et d'isoler des composés d'intérêt thérapeutique potentiel (Benkiki, 2006).

Les molécules du métabolisme secondaire des plantes appartiennent à des familles chimiques très diverses telles que les huiles essentielles, les alcaloïdes, les phénols, les flavonoïdes, les stéroïdes.

Les huiles essentielles ont, à toutes époques une place importante dans la vie quotidienne des hommes qui les utilisaient autant pour se parfumer aromatiser, la nourriture ou même se soigner.

A l'heure actuelle, la recherche de nouveaux médicaments d'origine naturelle passe par l'inventaire des plantes et l'examen systématique de leur activité biologique. Un des guides

du chimiste dans la problématique d'une recherche phytochimique est la recherche à l'empirisme et plus particulièrement aux usages traditionnels liés aux activités humaines.

Pour cela, notre laboratoire et particulièrement notre équipe s'intéresse à la chimie et aux activités biologiques (antimicrobiennes et antioxydantes), (Belarbi et al., 2007; Atik Bekkara et al., 2008 ; Benhammou et al., 2008; Bendimered et al., 2009; Bekhechi et al., 2011) des extraits végétaux des plantes médicinales dans le but d'élargir les perspectives de valorisation des produits naturels.

Dans le cadre de nos travaux relatifs aux plantes aromatiques et médicinales, nous sommes intéressés à l'étude de pouvoir antimicrobienne d'huile essentielle de *Pituranthos chloranthus*, poussant spontanément dans la région de Biskra. De plus, le peu de travaux effectués sur cette espèce, nous a encouragés à étudier le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles isolées de cette plante afin d'enrichir les connaissances sur les activités biologiques de cette plante.

Dans la première partie, nous aborderons, l'état des connaissances bibliographiques incluant une présentation botanique de la famille des Apiacées, de l'espèce *Pituranthos chloranthus* et son usage thérapeutique. Nous étudierons également, les généralités sur les huiles essentielles. Cette étude inclus: la définition et la classification de ces derniers, leurs activités biologiques ainsi que leur biosynthèse.

Dans la deuxième partie, qui est la partie expérimentale, nous appliquerons les méthodes utilisées pour :

- ✓ L'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation ;
- ✓ La détermination des rendements en huiles essentielles ;
- ✓ L'étude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles par la méthode de diffusion sur disque et par la méthode de contact direct.

Dans la troisième partie, nous discuterons les résultats obtenus lors de cette étude.

I. Présentation de la plante:

I.1. Le genre *Pituranthos* :

Les Ombellifères sahariennes sont différentes les unes des autres et leur détermination n'offre pas de grandes difficultés. Exclusivement, la distinction entre les espèces de *Pituranthos* est souvent difficile (**Ozenda, 1958**).

En effet, elles ne se distinguent les unes des autres que par la couleur des fleurs et la taille de leur pédoncule (**Haba, 2002**).

Le genre *Pituranthos* possède plus de vingt espèces dont certaines sont spécifiques à l'Afrique du nord (**Quézel, et Santa, 1962; Kaabeche, 1990**), et sont souvent rencontrées dans les régions arides ou désertiques.

Le potentiel floristique algérien de ce genre comporte les espèces suivantes:

- *Pituranthos chloranthus*,
- *Pituranthos scoparius* : espèce abondante dans les Aurès.
- *Pituranthos battandieri* (Maire): endémique au Sahara marocain et l'oranie (**Bellakhdar, 1997**).

Quézel et Santa(1962) ont décrit le genre *Pituranthos* comme une plante vivace, totalement aphyllé, à tige très ramifiées, portant des ombelles à involucre et involucelles polyphylles est des pericarpes ovoïdes à six bandelettes.

L'espèce *Pituranthos chloranthus*(Coss. et Dur.) Benth. &Hook., est une plante dont les tiges sont ramifiées dès la base, plus ou moins dichotomes et portant des ombelles longuement pédonculées; pétales verdâtres à nervures dorsales pubescentes et larges, fruits poilus(**Ozenda, 1958**).

I.2. Systématique de la plante :

Cette espèce est classée selon l'APG III, d'après **Dupont et Guignard (2007)**, comme suit :

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Eudicots

Sous classe : Euastéridées II

Ordre : Apiales

Famille : Apiacées

Genre : *Pituranthos*

Espèce : *Pituranthos chloranthus*(Coss. et Dur.) Benth. & Hook.

❖ **Nom vernaculaire :**

En Arabe: Gouzah(Maiza et al., 1993)

I.3. Répartition géographique de la plante :

L'espèce *Pituranthos chloranthus* est commune dans tout le Sahara septentrional et occidental jusqu'à EL Goléa et au Tademaït au sud(Ozenda, 1958).

I.4. Usages traditionnels :

Le genre *Pituranthos* possède plusieurs effets thérapeutiques. En effet, Les espèces *P. triradiatus* et *P. tartuosus*, sont utilisées par la population bédouine contre les douleurs d'estomac, les parasites intestinaux ou comme agent régulateur de la menstruation chez les femmes (Novak et al.,1966).Les huiles obtenues des tiges et des graines du *Pituranthos scoparius* sont largement utilisées comme remède contre le rhumatisme et la fièvre (Al kadi,1989).

L'espèce *Pituranthos chloranthus* appelée localement Guezzeh, est employée en cataplasme sur la tête contre les céphalées (Bellakhdar, 1997).

I.5. Toxicité :

Les nomades connaissent le haut pouvoir allergisant des plantes du genre *Pituranthos* pour les animaux, en période de leur floraison.En effet, le pollen des espèces *P. chloranthus* et *P. scoparius* engendrent des ophtalmies graves, quand il pénètre dans les yeux des animaux. Le dromadaire en particulier y est très sensible. Très allergisant, ce pollen rend les animaux aveugles pendant plusieurs jours. Les nomades traitent ces ophtalmies en instillant dans les yeux du dromadaire, du jus de tabac ou en introduisant du sel sous les paupières. (Bellakhdar, 1997).

I.6. Travaux antérieurs sur le genre *Pituranthos* :

Une recherche bibliographique faite sur les espèces du genre *Pituranthos*, nous a permis de constater que ces plantes sont peu étudiées et que leur composition chimique reste à déterminer.

L'étude effectuée par Singab et ses collaborateurs (1998) sur l'espèce *Pituranthos tortuosus* a permis d'isoler un flavonoïde glucoside nouveau. Il s'agit du glucopyranosyloxy-3trihydroxy-4',5,7 méthoxy-3` flavone,2"-O-β-D-apiofuranosyl 6"-O-α-L- rhamnopyranosyl (figure 01).

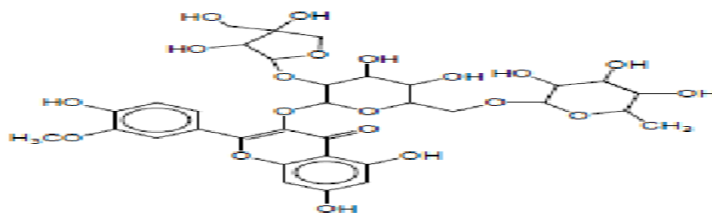
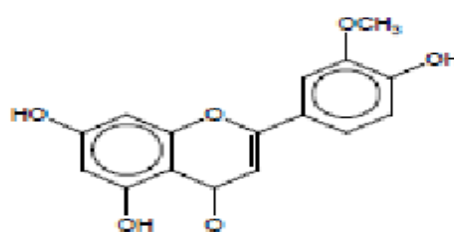
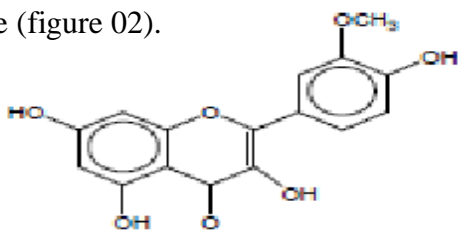
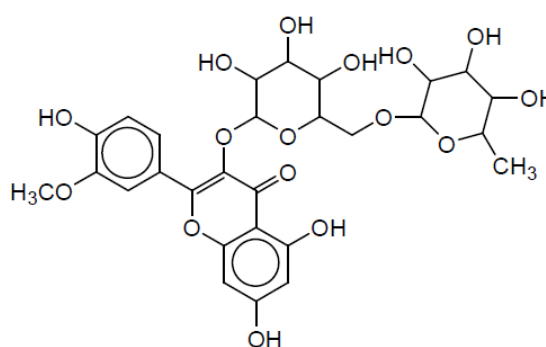
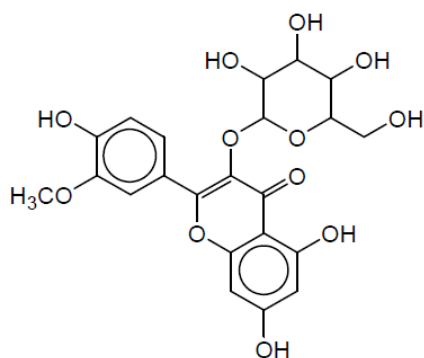


Figure 01 : Structure chimique du flavonoïde glucoside

La même étude a également permis d'identifier quatre composés flavoniques connus. Ces composés sont: isorhamnetine, chrysoériol, isorhamnetine3-O-glucosideet isorhamnetine3-O-rutinoside (figure 02).



isorhamnetinechrysoériol



isorhamnetine3-O-glucoside

isorhamnetine3-O-rutinoside

Figure 02 : Structure chimique de quelques composés flavoniques

Diverses fractions de l'extrait de cette plante, de même que les composés isolés, ont fait l'objet de tests biologiques relatifs à l'activité anti-tumorale. Ces tests ont montré que le chrysoériol et l'isorhamnetine sont actifs alors que l'isorhamnetine-3-O-glucosideest faiblement actif. L'isorhamnetine-3- O-rutinoside et glucopyranosyloxy-3 trihydroxy-4', 5, 7methoxy-3'flavone; 2"-O- β-D-apiofuranosyl6"-O- α-L-rhamnopyranosyl sont rarement actifs.

Les composés cités dans la figure 03, ont été caractérisés aussi dans les huiles végétales de l'espèce *Pituranthostortuosus* (Singab,1998).

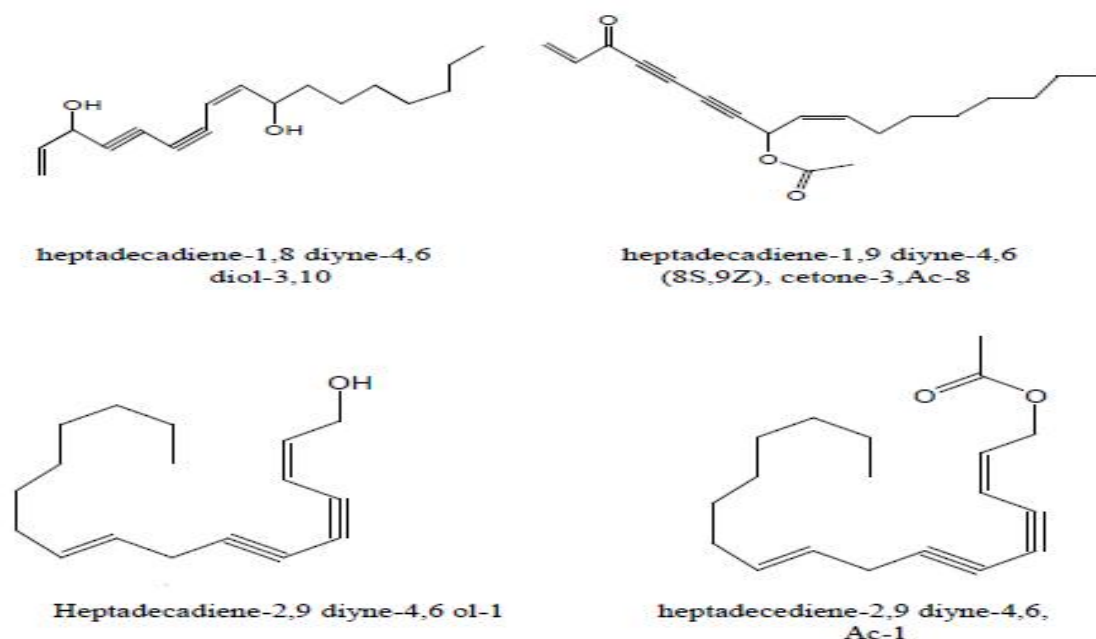
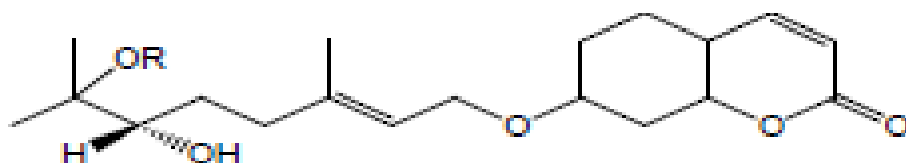


Figure 03 : Structure chimique de quelques composés des huiles végétales identifiés dans l'espèce *Pituranthostortuosus*

Une autre étude a été réalisée sur la composition chimique de l'huile essentielle extraite des parties aériennes de l'espèce *P. tortuosus* (Abdelwahed et al., 2006). L'analyse chimique par CG et CG-MS de cette huile essentielle a permis d'identifier les composés suivants : myrténol (26.2%), sabinène (11.0%), limonène (10.9%), *p*-cymène (7.0%), α -pinène (5.5%) qui sont majoritaires au mois de novembre, par contre cette même huile essentielle est très riche en de terpinène-4-ol (39.6%) au mois d'Avril.

Une étude chimique sur les jeunes pousses du *Pituranthostriradiatus*, a été réalisée par Halim et ses collaborateurs en 1995. Celle-ci a abouti à l'isolement et l'identification de deux monoterpénoidescoumariniques nouveaux: (-)-*S*-trans-marmine (1) et pituranthoside(-)-*s*-trans-marmine-7'-O- β -D-glucopyranoside (2) (figure 04).



(1) : R = H

(2) : R = β -D-Glc

Figure 04 : Structure chimique de deux monoterpénoidescoumariniques identifiés dans l'espèce *Pituranthostriradiatus*

A l'issue de ces travaux, trois furocoumarines et une coumarine connues (figure 5), ont été également isolées et identifiées (Halim et al., 1995).

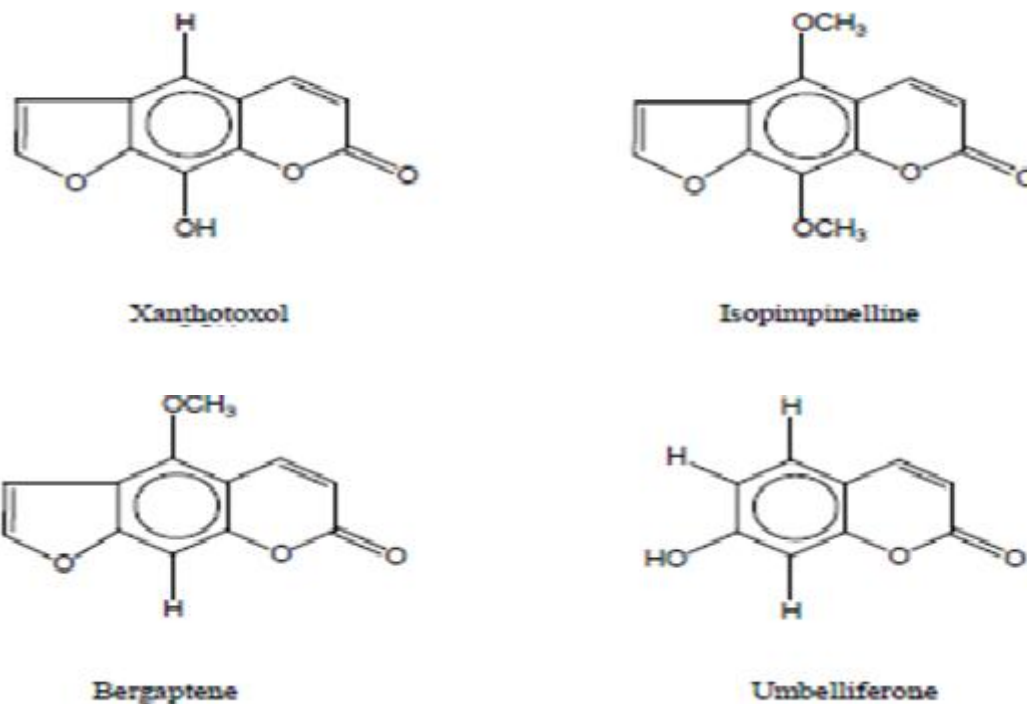


Figure 05 : Structure chimique demonoterpénoïdescoumariniques

D'autres études phytochimiques (Halim, et al. 1989 ; Halim, 1991) effectuées antérieurement par les mêmes chercheurs sur les racines du *P. triradiatus*, ont permis d'isoler d'autres composés coumariniques (figure 06) suivants:

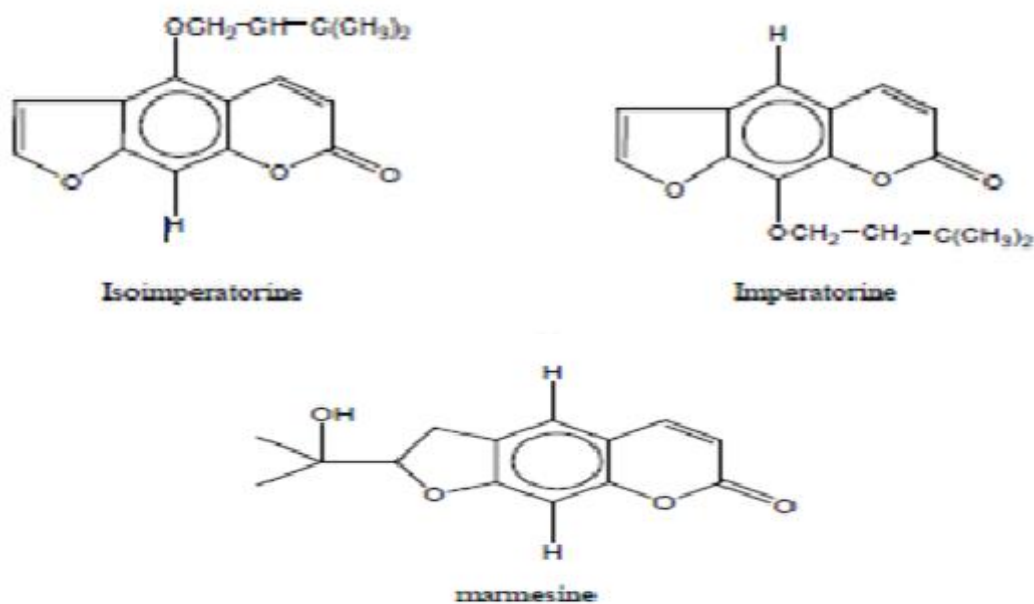


Figure 06 : Structure chimique des composés coumariniques

Par ailleurs, les composés furocoumariniques cités précédemment ainsi que la cnidiline (figure 07) ont été isolés, à partir des pousses de cette même plante (Ashkenazy et al.,1983).

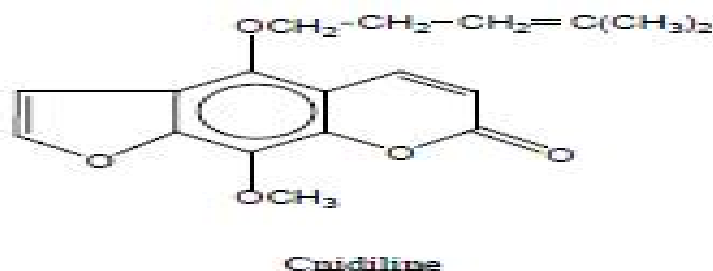
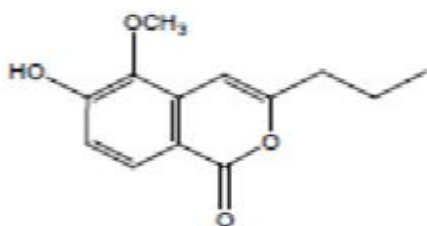
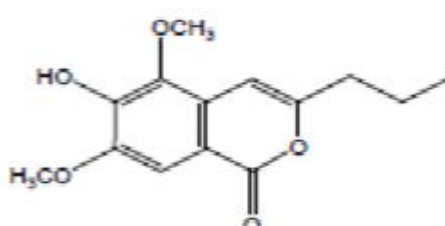


Figure 07 : Structure chimique de cnidiline

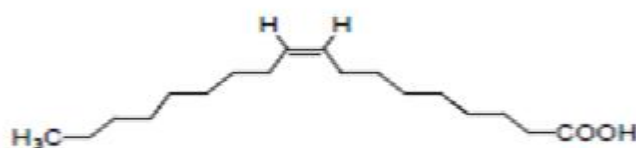
Une autre étude effectuée sur les racines de l'espèce *Pituranthos scoparius* (Habaet al., 2004), a permis d'isoler deux nouveaux composés isocoumariniques : hydroxy-6-méthoxy-5-propyl-3-isocoumarine et diméthoxy-5,7-hydroxy-6-propyl-3-isocoumarine et un acide gras: l'acide oléique (figure 08).



Hydroxy-6-méthoxy-5-propyl-3-isocoumarine



Diméthoxy-5,7-hydroxy-6-propyl-3-isocoumarine



Acide oléique

Figure 08 : Structure chimique des composés isocoumariniques

L'analyse chimique des huiles essentielles extraites des graines et des tiges de l'espèce *Pituranthos scoparius* a permis de mettre en évidence les composés suivants : l' α -pinène, l'apiol, le bornyl-acétate, des dérivés phénoliques et des sesquiterpènes (Vernin et al.,1999).

Par ailleurs, les huiles essentielles obtenues par distillation des graines et des tiges du *Pituranthos scoparius* ont été analysées par CG-MS. (Verninet al., 1999 ; Vérité et al., 2004 ; Boutaghane et al.,2004). L'analyse chimique de ces huiles essentielles des tiges a permis

d'identifier l' α -pinène (34%) et l'apiol (15%) comme composés majoritaires, alors que les graines sont très riches en apiol (52%), suivi d'acétate de bornyl(21%) et enfin l' α -pinène présent à seulement 11% (figure 09)

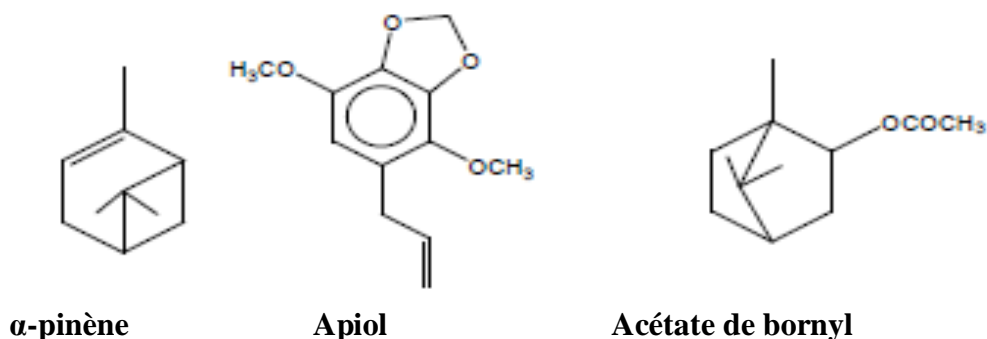


Figure 09 : Structure chimique des composés identifiés dans l'huile essentielle de l'espèce *P.scoparius*

Concernant l'espèce *Pituranthos chloranthus*, une étude réalisée sur les parties aériennes de cette plante récoltée dans la région d'El Hoggar, a été effectuée par **Touilet** ses collaborateurs en **2006**. Ces auteurs ont identifiés quatre flavonoïdes glucosidiques dans l'extrait n-butanolique.

Les composés isorhamnetine-3-O-glucoside et isorhamnetine-3-O-rutinoside ont été isolés chez les espèces *Pituranthos triraditus* et *Pituranthos torluosus*. (**Singab,1998 ; Shalaby, 1998**), par contre les composés suivants : apigenin-6,8-di-O-glucoside (vicenin-2)(**Almani et al.,1998**) et tamarixetin-3-O-glucoside (**Benakcha,2001**) sont identifiés pour la première fois dans le genre *Pituranthos*.

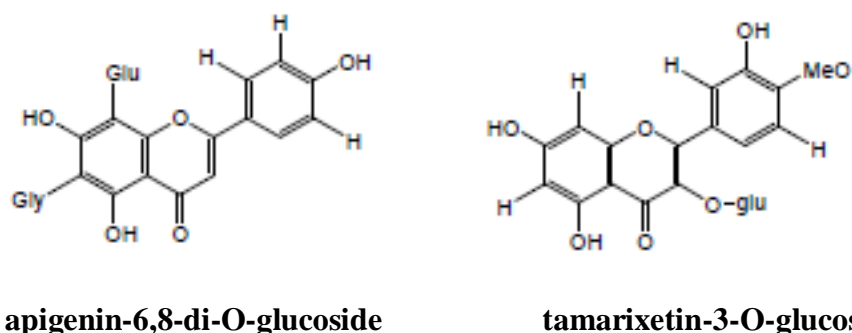


Figure 10 : Structure chimique des flavonoïdes glucosidiques identifiés dans l'espèce *Pituranthos chloranthus*

II. Leshuiles essentielles :

II.1. Définition:

Les huiles essentielles (=essences = huiles volatiles) sont : «des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation» (**Bruneton, 1993; Cavalli 2002; Chemat et al., 2007**).

Plus récemment, la norme AFNOR NF T 75-006 (**octobre1987**) a donné la définition suivante d'une huile essentielle : «Produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur (**Lucchesi et al., 2004**), soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus, soit par distillation à sec» (**Bruneton, 1993**).

Les huiles essentielles sont des liquides huileux aromatiques très concentrés renfermant des mélanges complexes de substances volatils constitués de plusieurs dizaines de composés. (**Bourrel,1993 ; Raul et Ochoa, 2005; Tigrine-Kordjaniet al., 2006**).Elles se retrouvent dans toutes les parties de la plante (écorces, racines, feuilles, fleurs et fruits) et dans toutes les régions climatiques du globe. Les facteurs environnementaux comme la température, l'irradiante et la photopériode peuvent jouer un rôle primordial sur la qualité et la quantité de l'huileessentielle (**Népomuscène, 1995**).

II.2.Composition chimique des huiles essentielles :

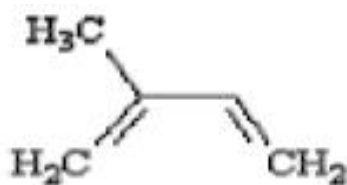
Sur le plan chimique, les huiles essentielles sont des mélanges de structure extrêmement complexe, pouvant contenir plus de 300 composés différents. Ces substances sont des molécules très volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes comme les monoterpènes (mycrène, β -pinène, γ -terpinène) et les sesquiterpènes (β -caryophyllène, α -humulène, β -bisaboléne) (**Croteau et al.,2000**).

II.2.1. Les terpènes:

Selon le nombre des unités d'isoprène, les terpènes sont classés en monoterpènes à 10 carbones, sesquiterpènes à 15 carbones, diterpènes à 20 carbones(**Bottin, 2006**).

II.2.1.1. Définition des terpènes

Les terpènes sont des molécules très volatiles fréquentes dans la nature, surtout dans les plantes où ce sont les principaux constituants des huiles essentielles. Les terpènes sont issus du couplage d'au moins 2 sous-unités isopréniques à 5 carbones (figure 11)(**Bottin,2006**).



L'isoprène (2-méthylbuta-1,3-diène).

Figure 11: Structure de l'unité isoprénique

II.2.1.2. Historique sur les terpènes :

Les substances monoterpéniques étaient parfaitement connues au début du XXe siècle. Par ailleurs, ce n'est qu'en **1910** que **Semler** détermine la structure correcte du premier composé sesquiterpénique; le β -santalène. Il faut attendre ensuite trois ans pour que **Keschbaum** en **1913** établisse la structure du trans-2-trans-6-farnésol; (figure 12). C'est la deuxième structure sesquiterpénique décrite avec précision et depuis, le nombre des terpènes naturels connus est actuellement voisin de 5000, compte-tenu des mono, sesqui, di, tri, et polyterpéniques (Teisseire, 1991).

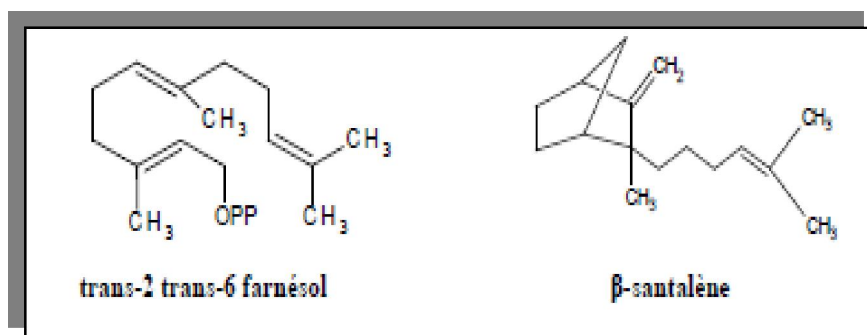


Figure 12: Structure de deux composés sesquiterpéniques

En ce qui concerne les monoterpènes, on en dénombre actuellement environ 200, répartis en une quinzaine de squelettes différents. De ce nombre est, en réalité, exclu un groupe de composés tout à fait particulier, celui des « iridoides », présentant un enchaînement carboné cyclopentanique et initialement isolés comme substances de défense dans certaines espèces de fourmis.

Pour ce qui est des sesquiterpènes, il y a environ 20 ans, 30 composés seulement étaient connus, répartis en une quinzaine de squelettes. Dix ans plus tard on en connaissait environ 300 répartis en 40 squelettes. Actuellement, près de 200 squelettes sont connus constituant un groupe d'environ 1000 composés.

Cet accroissement quasi exponentiel de nos connaissances au développement considérable des méthodes d'analyses immédiate au cours des 20 dernières années, notamment celui des méthodes de chromatographie sous toutes leurs formes et plus particulièrement de la chromatographie gazeuse, bien adaptée à l'analyse des substances volatiles odorantes.

II.2.1.3. Les différentes classes de terpènes:

Les terpènes constituent le plus grand ensemble des métabolites secondaires des végétaux (**Bruneton, 1993**). Les huiles essentielles qui n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs qui sont stockées dans toutes les parties des végétaux (fleurs, feuilles, écorces, racines, rhizomes, fruits et graines), sont principalement composées de terpènes. Si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une huile essentielle, la composition de cette dernière peut varier selon sa localisation. Les huiles essentielles non seulement sont des mélanges complexes de constituants hétérogènes, elles appartiennent de façon exclusive à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes, le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe aromatique et aliphatique (alcane, alcène, alcénol, phénol etc...). Dans chaque groupe de terpènes, un précurseur unique conduit aux différents constituants connus, par une succession de réactions classiques (**Kurt, 1983**). Les plus connus de ces produits sont les monoterpènes qui répondent à la formule brute de $(C_{10}H_{16})$, les sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$) et les diterpènes ($C_{20}H_{32}$). Les monoterpènes et les sesquiterpènes se retrouvent presque toujours dans les huiles essentielles sous forme acyclique, monocyclique ou bicyclique avec l'existence de nombreuses molécules fonctionnalisées (alcools, aldéhydes, cétones, esters, éthers, peroxydes).

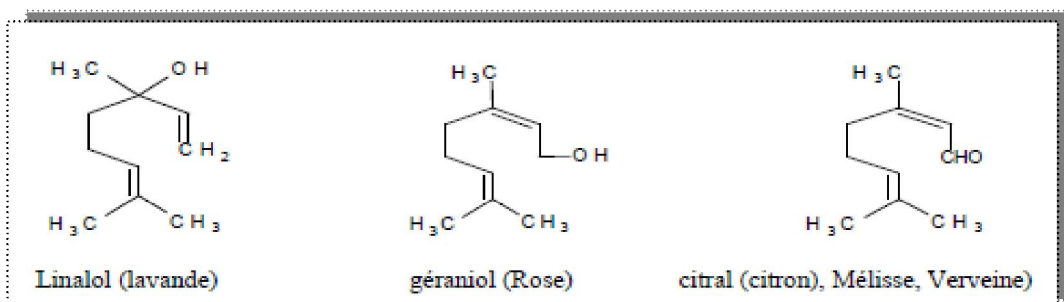
-a- Monoterpènes

Ces composés contiennent deux unités de l'isoprène. Ils sont largement distribués dans la nature, en particulier dans les huiles essentielles (figure 13). Ils sont importants dans l'industrie des parfums (**Chemat et al., 2007**)

a- Monoterpènes acycliques

Alcools

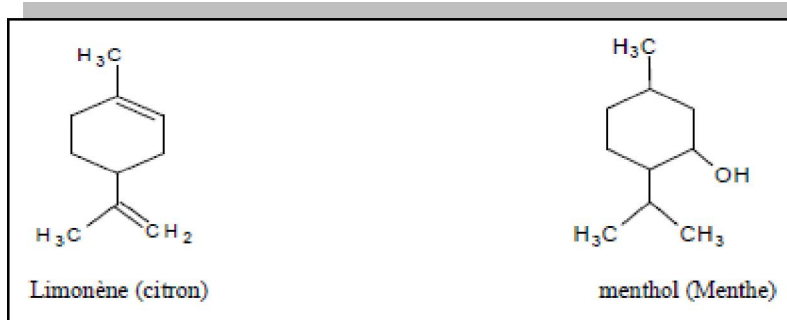
Aldéhydes



b- Monoterpènes monocycliques

Carbures

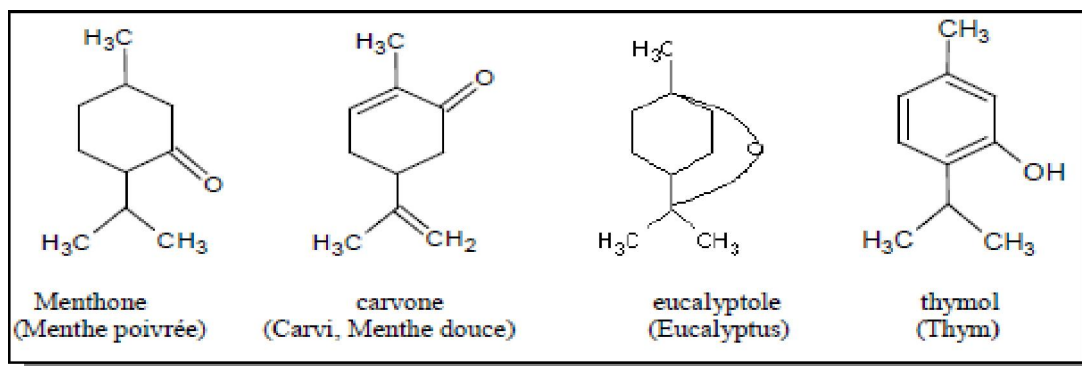
Alcools



Cétones

Ether-oxydes

Phénols



c- Monoterpènes bicycliques

Carbures

Cétones

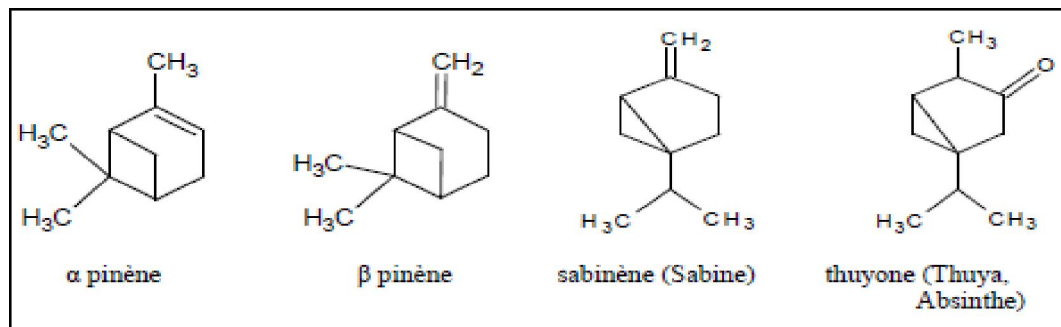
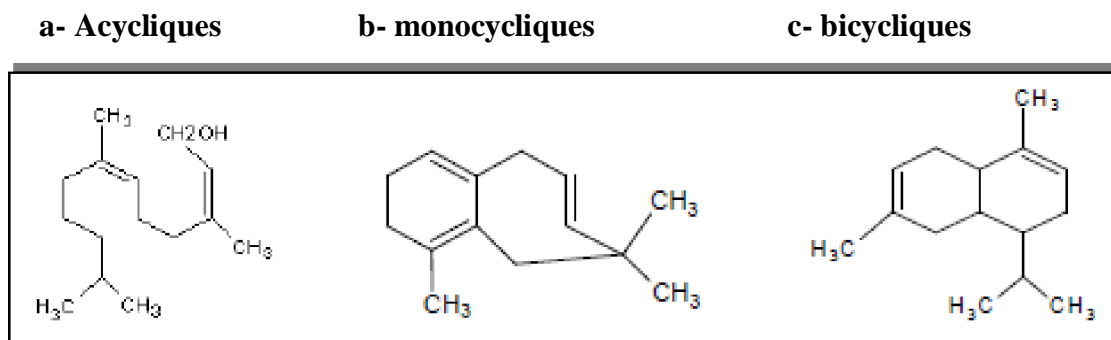


Figure 13: Exemples de quelques monoterpènes

-b- Sesquiterpènes:

Ils contiennent trois unités de l'isoprène (figure 14). Ils sont trouvés dans beaucoup de systèmes vivants mais en particulier dans les plantes supérieures (**Bottin,2006**).



Farnésol(Tilleul)

Humulène(Houblon)

Cadinène(Goudron de Cade)

Figure 14: Exemples de quelques sesquiterpènes

-c- Diterpènes:

Contiennent 20 atomes du carbone dans leurs squelettes de base. Ils sont composés de quatre unités de l'isoprène. Ils existent dans presque tout le règne végétal et appartiennent à plus que 20 types structuraux (figure 15) (**Chematet al.,2007**).

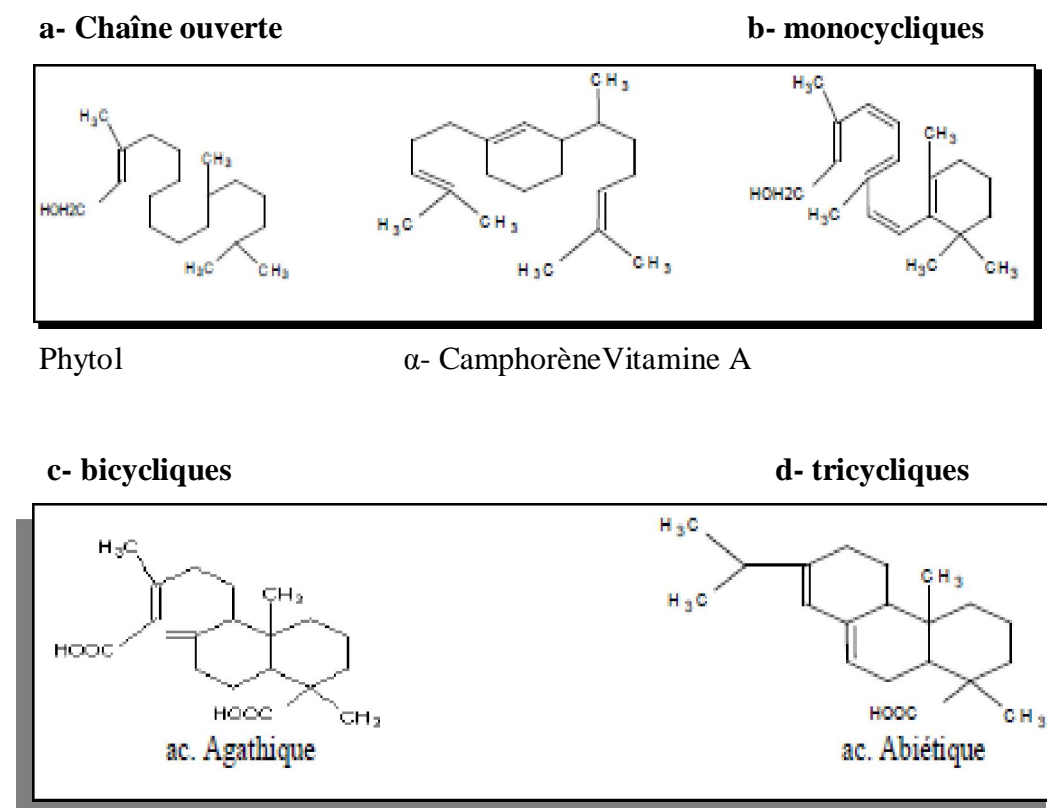


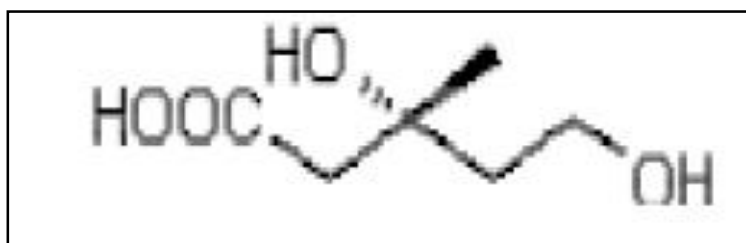
Figure 15: Exemples de quelques diterpènes

-d- Les composés aromatiques

Les dérivés du phénylpropane sont moins abondant que les terpénoïdes. Cette classe comprend des composés odorants comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole et bien d'autres. Ils sont plus fréquents dans les huiles essentielles d'Apiacées (anis, fenouil, cannelle, basilic).

II.2.1.4. Synthèse des squelettes terpéniques:

La biosynthèse des terpènes est initialisée par la formation des unités à cinq atomes de carbones (C5) ou isoprènes actifs (figure 16), la formation de l'acéto-acétate et la condensation aldolique avec une molécule d'acétyl-coenzyme A. La réaction se produit en présence du coenzyme A synthase et du CoA réductase, pour former l'acide 3R(+) mévalonique (MVA). La conversion de MVA en structures hémiterpéniques est réalisée en trois phosphorylations successives, permettant d'introduire le groupe pyrophosphate, dont l'élimination conduit à la formation du pyrophosphate d'isopentényle (IPP) et du pyrophosphate de diméthylallyle (DMAPP), deux isomères. La condensation de ces deux unités aboutit à la formation du pyrophosphate de géranyle, le précurseur le plus probable des monoterpènes acycliques, tandis que son isomère cis, le pyrophosphate de néryle aboutit aux monoterpènes cycliques (figure 17). La condensation du pyrophosphate de géranyle avec une molécule de pyrophosphate d'isopentényle permet d'obtenir le pyrophosphate de trans-farnésyle, qui est le précurseur des sesquiterpènes (figure 18). Les réactions se terminent soit par formation d'hydrocarbures soit par addition d'un nucléophile tel que l'eau et donc formation d'un alcool. L'oxydation et l'estérification de ce dernier donnent naissance aux multiples cétones et acétates connus dans la gamme d'huiles essentielles.



**Figure 16: Structure de l'Acide mévalonique
(acide 3,5 dihydroxy-3-méthylpentanoïque)**

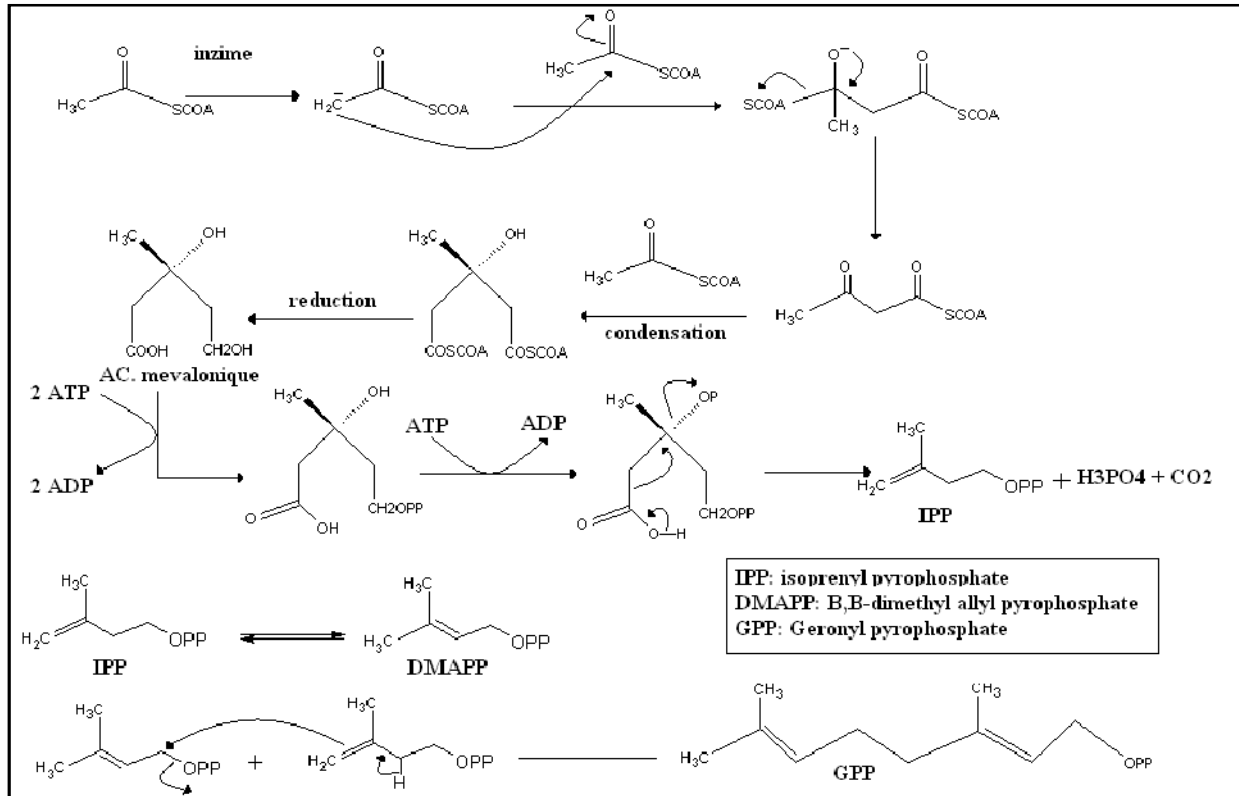


Figure 17: Synthèse des monoterpènes

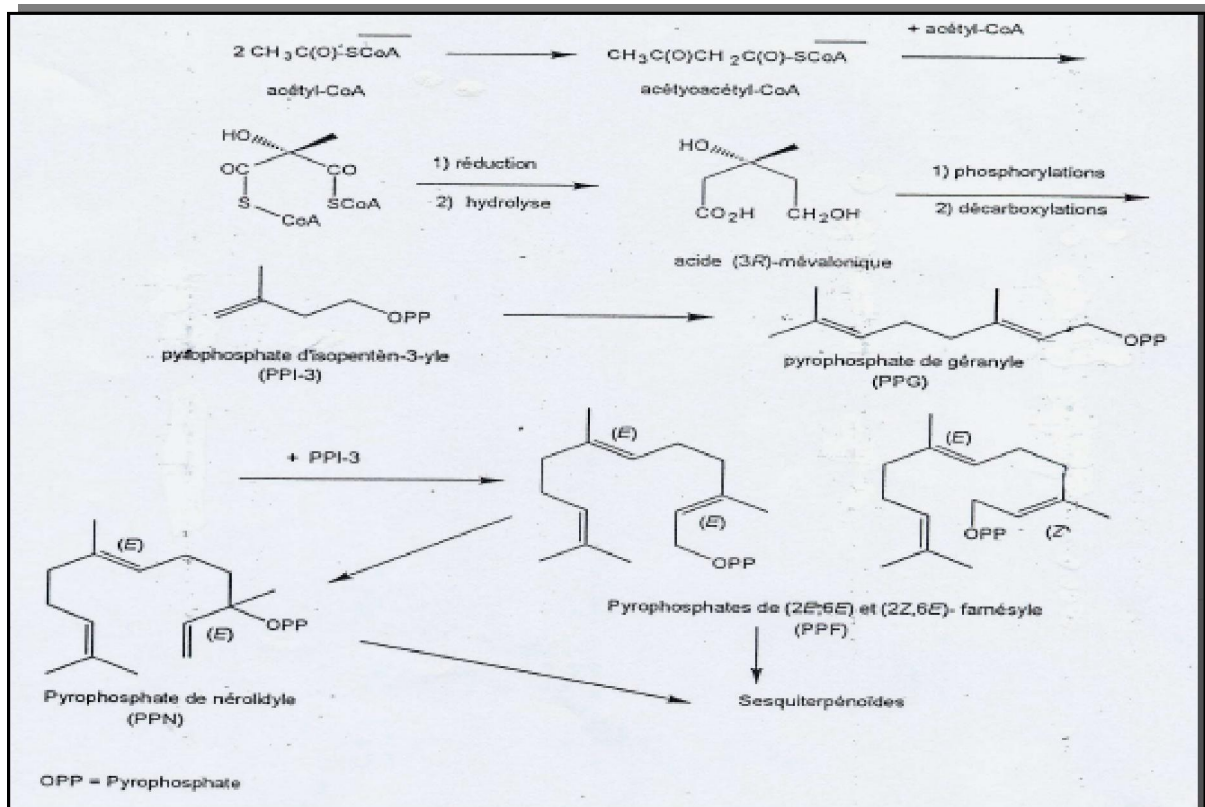


Figure 18: Synthèse des sesquiterpènes

II.3. Utilisation des huiles essentielles :

Ces produits naturels présentent un grand intérêt comme matière première destinée à différents secteurs d'activité (Cavalli,2002) tels que:

➤ **En pharmacie:**

Les huiles essentielles peuvent être utilisées dans :

-l'aromatisation des médicaments destinés à la voie orale(Ziming Wang,2006)

- pour leurs actions physiologiques (Menthes, Verveine, Camomille)(Hurabielle,1981)

➤ **Dans l'industrie:**

-Parfumerie et cosmétologie:De nombreux parfums sont toujours d'origine naturelle et certaines huiles essentielles constituent des bases des parfums.

Exemples: Rose, Jasmin, Vétiver, Ylang-ylang, etc... (Hurabielle,1981)

- Alimentation:Les huiles essentielles (huile de citron, de menthe, de girofle) sont très utilisées dans l'aromatisation des aliments (jus de fruits, pâtisserie) (Ziming Wang et al.,2006 ; Hurabielle,1981).

II.4. Toxicité des huiles essentielles:

Cet aspect de la connaissance des huiles essentielles est d'autant plus important que le développement thérapeutique telles que l'aromathérapie (définie comme le traitement des maladies par les essences de plantes ainsi que la connotation " produit naturel" attaché à ces produits conduit à une utilisation souvent abusive.

La toxicité chronique des huiles essentielles est assez mal connue; on manque aussi des données sur leurs éventuelles propriétés mutagènes, tératogènes ou cancérogènes.

On connaît par contre beaucoup mieux le risque de toxicité aigue lie à une ingestion massive, en particulier la neurotoxicité des huiles essentielles à thuyone (thuya, absinthe, sauge officinale) ou à pinocamphone (hysope). Ces cétones induisent des crises épileptiformes et tétaniformes, des troubles psychiques et sensoriels nécessitant l'hospitalisation.

De telles intoxications ne sont pas exceptionnelles. D'autres monoterpènes sont également toxiques à doses fortes, exemples: camphre, menthol (qui entraînent un risque de spasme de glotte chez le jeune enfant), cinéole, E-anéthol. Cette toxicité non négligeable conduit à adopter une attitude prudente face aux pratiques telles que l'aromathérapie lorsqu'elles utilisent des huiles essentielles -pures et à fortes doses - par voie orale et, à fortiori, en mélange(Bruneton,1993).

II.5. Facteurs intervenant dans la qualité des huiles essentielles:

Les facteurs prédominants dans la qualité des huiles essentielles peuvent avoir deux types, d'origines:

- Technologique ;
- Naturel.

De profondes modifications de l'huile essentielle peuvent intervenir lors de l'exploitation des végétaux depuis leur collecte jusqu'à leur transformation industrielle.

Le mode de récolte, les conditions de transport (**Yayi et al.,2004**), le séchage et le stockage peuvent générer des dégradations enzymatiques (**Bruneton,1993**). Les changements les plus importants interviennent pendant l'hydrodistillation sous l'influence des conditions opératoires, notamment du milieu (l'acidité, température) et de la durée d'extraction(**Lagunez Rivera,2006 ;Chematet al.,2007**). D'autres facteurs tels que les traitements auxquels on peut procéder avant ou pendant l'hydrodistillation (broyage, dilacération, dégradation chimique ou enzymatique, pression, agitation) contribuent à la variation du rendement et de la qualité de l'huile essentielle (**Lagunez Rivera, 2006**).

Au cours de l'hydrodistillation, le milieu aqueux résultant de l'immersion du matériel végétal atteint des pH compris entre 4 et 7 et occasionnellement, des valeurs inférieures à 4 pour certains fruits(**Lagunez Rivera,2006**).Les constituants de l'essence native sont soumis aux effets combinés de l'acidité et de la chaleur et peuvent subir des modifications chimiques. L'huile essentielle récupérée est un produit qui diffère sensiblement de l'essence originelle, d'autant plus que l'ébullition est longue et le pH est faible (**Morin et Richard,1985**).

La matière végétale est l'objet de réactions chimiques diverses : hydrolyses, déprotonations, hydratations et cyclisations (**Morin et Richard, 1985**), pouvant être catalysées par des métaux présents à l'état de trace dans la plante ou provenant des équipements de récolte et d'extraction provoquant des transformations chimiques des constituants. L'hydrolyse d'esters est souvent la première réaction qui se produit (**Bruneton,1993**).Elle conduit à la formation d'acides organiques qui, à leur tour, catalysent les réactions de cyclisation et de déshydratation(**Lagunez Rivera,2006**)

II.6. Méthodes d'extraction des huiles essentielles:

Les huiles essentielles sont des produits obtenus soit à partir des matières premières naturelles par distillation à l'eau, soit à partir des fruits de citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques (AFNOR, 1992).

Les huiles essentielles sont extraites principalement par les méthodes suivantes:

- ❖ Distillation
- ❖ Extraction à froid
- ❖ Extraction assistée par micro-onde.
- ❖ Extraction par des solvants organiques (Soxhlet).

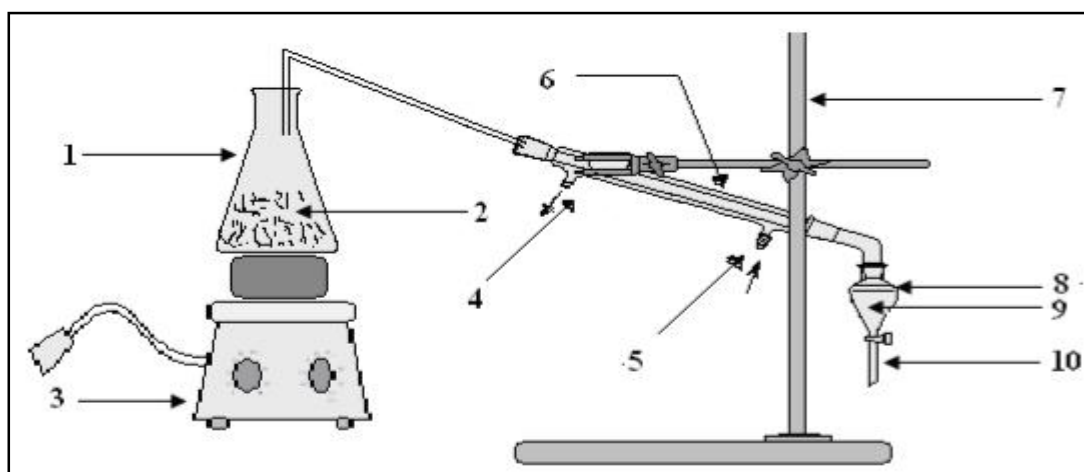
II.6.1. Distillation

Selon **Piochon (2008)**, il existe deux différents procédés utilisant le principe de la distillation : l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur d'eau.

-a- Hydrodistillation :

L'hydrodistillation proprement dite est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle, ainsi que pour le contrôle de qualité (AFNOR, 1992).

Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique (figure 19) (**Lagunez Rivera, 2006**).



- | | | |
|------------------------|--------------------|--------------------------------|
| 1- Erlenmeyer | 4- Sortie de l'eau | 7- Support du réfrigérant |
| 2- L'eau et la plante | 5- Entrée de l'eau | 8- L'huile essentielle |
| 3- Chauffe-ballon | 6- Réfrigérant | 9- L'eau aromatique (Hydrolat) |
| 10- Ampoule à décanter | | |

Figure 19: Montage de l'hydrodistillation

La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures (8h) (**Lucchesi et al.,2004**),selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'extrait (**Lucchesi,2005**).Les principales raisons de cette préférence sont liées à la facilité de mise en œuvre du procédé, son sélectivité et donc la qualité des produits obtenus.

Cependant l'hydrodistillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre une détérioration de certains végétaux et la dégradation de certaines molécules aromatiques.C'est ainsi que pour certains végétaux fragiles, comme par exemple les pétales de fleurs, une technique d'extraction plus appropriée est utilisée. Il s'agit de la « distillation dite sèche ». Cette technique ancestrale, utilisée autrefois par les alchimistes arabes. (**French,1651**),consiste à extraire les huiles essentielles de plantes fragiles à l'aide d'un alambic par l'effet de la chaleur du soleil. Plus récemment, en Herzégovine (**Kapetanovic et al.,1984**), une technique toute proche a permis l'extraction d'une huile essentielle de rose de très grande qualité, cependant cette technique, possède elle aussi ses limites. En effet, technique écologique par excellence, le chauffage par les rayons du soleil est très faiblement productif car plusieurs jours sont nécessaires pour extraire les précieuses gouttelettes d'essences de rose.

-b- Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles des plantes aromatiques. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter (**LegunezRivera,2006**).La vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique (l'huile essentielle). L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile(**Lucchesi, 2005**).

II.6.2. Extraction à froid

Elle constitue le plus simple des procédés, mais ne s'implique qu'aux agrumes dont l'écorce des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences. Ce procédé consiste à broyer, à l'aide de presses, les zestes frais pour détruire les poches afin de libérer l'essence (**Roux, 2008**).

II.6.3. Extraction assistée par micro-onde :

Le mécanisme du chauffage diélectrique repose sur le fait que les molécules polaires, telles que l'eau, ont des extrémités négatives et positives : ce sont des dipôles.

En l'absence de champ électrique, les dipôles d'un milieu diélectrique se trouvent orientés au hasard sous l'effet de l'agitation thermique du milieu. Sous l'effet d'un champ électrique continu, les molécules tendent à s'orienter dans la direction du champ électrique. Plus le champ électrique est intense, moins l'agitation thermique qui tend à désorganiser l'alignement a d'importance. Lorsque toutes les molécules sont orientées, il apparaît un moment dipolaire global induit. Sous l'effet d'un champ électrique alternatif de fréquence, les dipôles s'orientent dans la direction du champ sur une demi alternance, se désorientent lorsque le champ s'annule et se réorientent dans l'autre sens pendant la seconde demi alternance : c'est la rotation dipolaire. L'énergie électrique est convertie en énergie cinétique par la rotation des dipôles. L'énergie cinétique est transformée partiellement en chaleur : l'alignement des dipôles par rapport au champ électrique est contrarié par les forces d'interactions entre molécules. Ces forces peuvent être assimilées à des forces de frottement internes qui existent dans les contacts solide-solide. Elles s'opposent ainsi à la libre rotation des molécules. De la friction produite, naît le dégagement de chaleur (**Lucchesi, 2005**). Cette chaleur dilate les glandes qui éclatent. Ce processus donc libère les huiles essentielles (**Lucchesi et al., 2004**).

II.6.4. Extraction par solvants organique (Soxhlet):

La technique d'extraction « classique » par solvant, consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique (**Lucchesi, 2005**). Les rendements sont généralement plus importants par rapport à la distillation et cette technique évite l'action hydrolysant de l'eau ou de la vapeur d'eau (**Lucchesi, 2005**).

Le solvant choisi, en plus d'être autorisé devra posséder une forte solubilité de l'huile (**Jonhson, 1983**), certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène, sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra

pas réagir chimiquement avec l'extrait (**Bottin,2006**),et ne doit pas être toxique pour les applications alimentaires (**Wan,1995**).Les solvants les plus utilisés sont des carbures aliphatiques (pentane, hexane) (**Kartika, 2005 ; Bergognoux,2005**), ou des carbures aromatiques (benzène). On opère le plus souvent à la température ordinaire (**Hurabielle, 1981**). De nombreux solvants ont ainsi été étudiés pour l'extraction des huiles végétales, y compris des biosolvants. En dehors des alcanes, des cycloalcanes et des hydrocarbures aromatiques (**Abu-Arabi et al.,2000**). Les principaux solvants préconisés sont :

- ✓ Les halogéno-alcanes comme le dichlorométhane, qui est très efficace, moins inflammables, mais qui posent le problème de la compatibilité alimentaire et des rejets dans l'atmosphère.
- ✓ Les éthers, mais qui imposent des contraintes de mise en œuvre très importantes en raison de leur inflammabilité et des risques d'explosion.
- ✓ Les cétones, et en particulier l'acétone, mais dont l'affinité pour l'eau et l'odeur ont pénalisé la mise en œuvre dans la filière alimentaire.
- ✓ Les alcools, et en particulier l'éthanol, et l'isopropanol, qui sont des solvants compatibles avec l'alimentaire, mais dont l'affinité pour l'eau impose des contraintes fortes de séchage des graines, et limite la solubilité de l'huile (**Kartika,2005**).

L'extraction par l'appareil de Soxhletconsiste à faire passer à travers la matière à traiter contenue dans une cartouche de cellulose, un flux descendant de solvant toujours neuf puisqu'il est distillé à chaque cycle(**Lucchesi,2005**).

II.7. Activité biologique des huiles essentielles:

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques (**Ziming Wang et al.,2006**).En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, par exemple contre les bactéries endocanaliaires (**Pellecuer et al.,1980**),ou au niveau de la microflore vaginale (**Viollon et Chaumont,1994**) et d'origine fongique contre les dermatophytes (**Chaumont et Leger,1989**).Cependant, elles possèdent également, des propriétés cytotoxiques (**Sivropoulou et al.,1996**), qui les rapprochent donc des antiseptiques et des désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre.

Par exemple dans des préparations pharmaceutiques, les terpènes phénoliques, comme le thymol et le carvacrol, sont souvent utilisés comme des antiseptiques, des antibactériens et des antifongiques(**Agnihotriet al.,2003**). Le thymol est très irritant, astringent et caustique. La

dose de thymol applicable sur la peau et les muqueuses est de 0,5%. Ingéré à la dose de 2 g ou à plus fortes doses, il est responsable de gastralgies avec nausées(Zambonelli et al., 2004).

Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques appartiennent à la famille des lamiacées: thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge... etc. L'essence de thym est souvent rapportée comme étant parmi les huiles essentielles les plus actives(Agnihotri et al.,2003).

L'activité des huiles essentielles est en corrélation avec leur fonction chimique. Les travaux de **Zakarya et ses collaborateurs(1993)**ont montré l'importance de la spécification du genre et de l'espèce, ainsi que de la variété de la plante d'où provient l'extrait. En effet, l'activité biologique d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique, aux groupements fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, aldéhydes et cétones). Les composés minoritaires jouent aussi un rôle important dans l'activité des huiles essentielles et semblent agir en synergie avec les composés principaux (**Zhiri, 2006**).

Les composés chimiques qui ont plus d'efficacité et, à large spectre sont d'abord les phénols (thymol, carvacrol, eugénol), ensuite les alcools (α - terpinéol, terpinèn-4-ol, linalol), les aldéhydes et dans une faible mesureles cétones (**Dorman etDeans, 2000**).

II.7.1. Méthode de détermination de l'activité antimicrobienne:

L'examen des données bibliographiques fait apparaître la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, *in vitro*. Le choix de la méthode est conditionné par l'insolubilité des huiles essentielles dans les milieux aqueux, leur volatilité, et la nécessité de les tester à de faibles concentrations.

-a- Aromatogramme (Méthode de diffusion en milieu gélosé):

L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale appelé antibiogramme ou méthode de disque ou méthode par diffusion en milieu gélosé(Figure 20). La technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différentes substances à tester, puis déposés à la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec une suspension de la souche microbienne à étudier. Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones vierges autour des disques appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de la zone d'inhibition est grand, plus la souche est sensible à la substance testée, plus il est petit plus la souche microbienne est résistante. On

peut exprimer cette activité soit en indiquant directement le diamètre de la zone d'inhibition en millimètre, soit en traduisant en croix le degré d'activité (**Guerin-FaubleetCarret, 1999**).

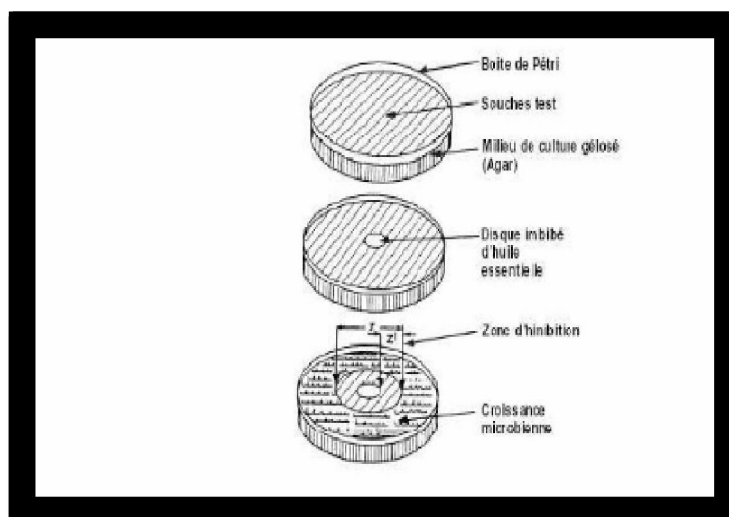


Figure 20: Schéma illustrant la méthode des aromatochromes
(www.memoireonline.com)

-b- Méthode de micro-atmosphère :

Cette technique consiste à cultiver les microorganismes à tester dans les boîtes de pétri sur milieu de culture approprié (Figure 21). La différence réside principalement dans la position du disque imprégné d'huile essentielle qui est déposé au centre du couvercle de la boîte de pétri, renversée après fixation de l'huile essentielle sur le disque. Celui-ci n'est donc pas en contact avec le milieu gélosé. L'huile s'évapore dans l'atmosphère de la boîte, elle peut exercer son effet inhibiteur sur les microorganismes testés (**Pibiri, 2005**).

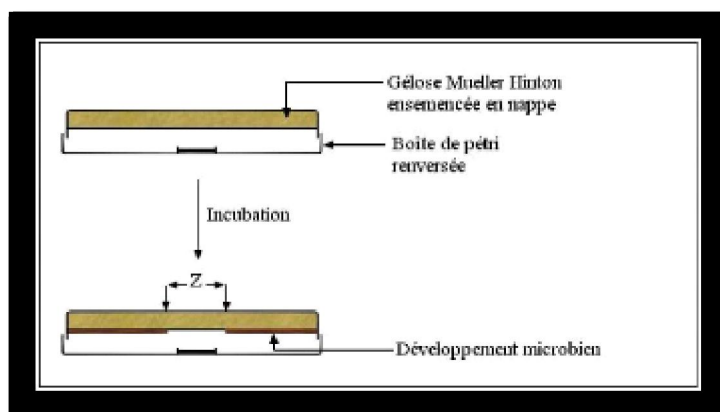


Figure 21 : Schéma illustrant la méthode de micro-atmosphère (Bousbia, 2004)

Matériel et Méthodes

I. Provenance de la plante

La récolte de la plante de *Pituranthos chloranthus* a eu lieu en pleine floraison au mois d'octobre 2012, dans la région d'El Kantara (Wilaya de Biskra) (Figure 22).

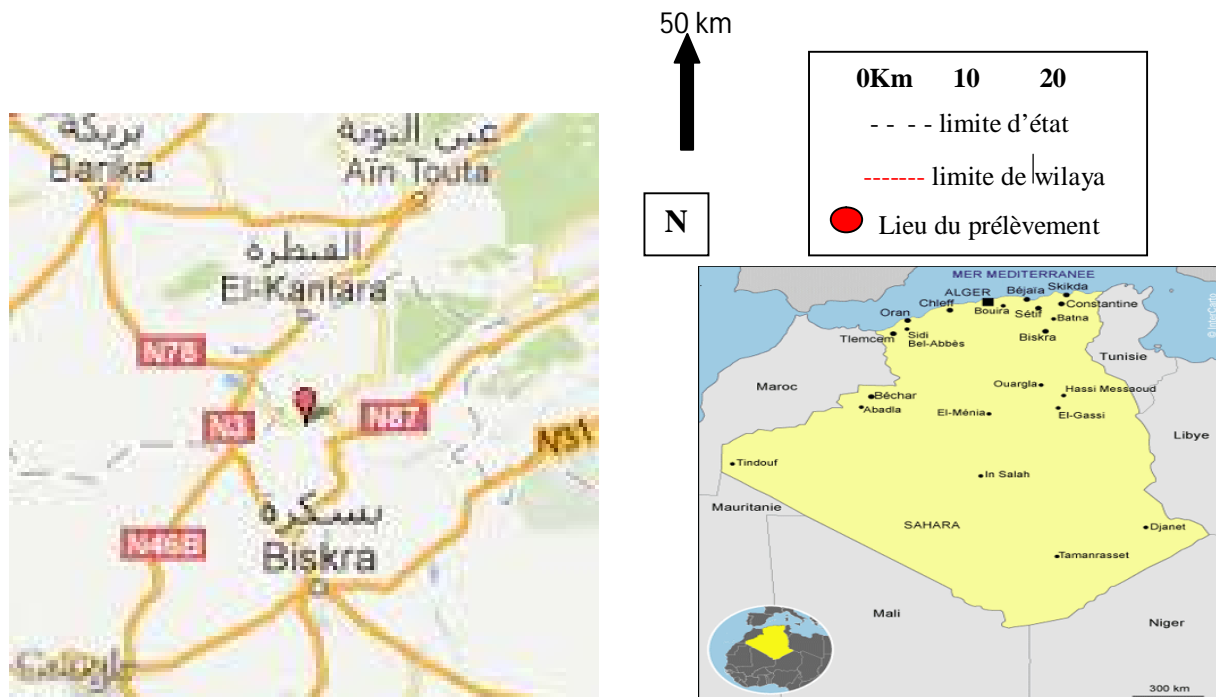


Figure 22 : Carte géographique du lieu du prélèvement

L'espèce a été identifiée par Docteur HASSANI F., membre du laboratoire d'Ecologie et de Gestion des Ecosystèmes Naturels. La plante a été classée dans le laboratoire des Produits Naturels et a été enregistrée sous la référence suivante :

- A. 1943 pour *Pituranthos chloranthus* (Coss. et Dur) Benth. & Hook.

II. Extraction des huiles essentielles :

L'extraction des huiles essentielles de la partie aérienne de *Pituranthos chloranthus* (Coss. et Dur) Benth. & Hook. a été réalisée par hydrodistillation. La plante séchée est introduite dans un ballon, et imprégnée d'eau, l'ensemble est portée à ébullition pendant 3 heures. Les vapeurs d'eau chargées d'huile essentielle, traversant le réfrigérant, se condensent et chutent dans une ampoule à décanter, l'eau et l'huile se séparent par différence de densité.



Figure 23 : Montage d'hydrodistillation

III. Calcul du rendement : Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle et la masse végétale sèche à traiter. Il est déterminé par la formule suivante:

$$R = P_H / P_p \times 100$$

R : Rendement en huile essentielle (%)

P_H : poids de l'huile essentielle extraite en g

P_p : poids de la plante traitée en g

IV. Etude de l'activité antimicrobienne :

Aujourd'hui, les traitements par les plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tel que les antifongiques et en particulier les antibiotiques décroît. Pour cela, nous avons jugés intéressant de tester ces huiles essentielles vis-à-vis de souches bactériennes et fongiques, et de comparer leur activité à celle des antibiotiques et antifongique utilisés.

IV.1. Les souches étudiées : L'huile essentielle de *Pituranthos chloranthus* a été testée contre les souches microbiennes mentionnées dans le tableau suivant (Tableau 01) :

Tableau 01: Souches microbiennes testées

Souches utilisés			Référence	
Bactéries	A Gram positif	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876	
		<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	
	A Gram négatif	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	
		<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311	
		<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047	
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603	
		<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	
	Levures		<i>Candida albicans</i>	ATCC 26790
			<i>Candida albicans</i>	IP 444
Moisissures		<i>Aspergillus flavus</i>	MNHN 994294	
		<i>Aspergillus fumigatus</i>	MNHN 566	
		<i>Fusarium oxysporum</i>	MNHN 963917	

Institut Pasteur

IV.2. Méthodes d'étude de l'activité antimicrobienne :

IV.2.1. Aromatogramme (méthode de diffusion sur disque) :

En parallèle, nous avons utilisé un disque témoin négatif imbibé par 20µl de DMSO. Après incubation à 37°±1° C pendant 24 h pour les bactéries ; à 30°±1° C pendant 48h pour la levure et à 25°±1°C pendant 48h pour les champignons filamenteux, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition en mm (disque inclus).

Afin de tester l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, nous avons utilisé la méthode de diffusion sur disque.

Des disques de papier filtre de 6 mm de diamètre imprégnés de 15 µl d'huile essentielle et 5 µl de DMSO, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé (Mueller – Hinton pour les bactéries, Sabouraud pour la levure et PDA pour les champignons), en boîte de pétri, préalablement ensemencées en surface en nappe avec 1 ml d'inoculum et l'excédant est éliminé par aspiration.

En parallèle, nous avons utilisé un disque témoin négatif imbibé par le DMSO (20 µl) et des témoins positifs (Céfotaxime (CTX : 30µg/disque), Amikacine (AK : 30µg/disque), Ceffazidine (CAZ : 30µg/disque et nystatine 30µg/disque). Après incubation à 37°±1° C pendant 24 h pour les bactéries, à 37°±1° C pendant 24 h pour la levure et 25°±1° C pendant 48h pour les champignons, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition en mm, disque inclus.

IV.2.2. Préparation de l'inoculum :

a. Pour les bactéries :

Les souches, conservées sur gélose nutritive inclinée à 4°C, sont revivifiées dans du bouillon nutritif à 37° C ±1° C pendant 24 h, puis ensemencées sur boîtes contenant de la gélose nutritive pour vérifier leur pureté.

Après 24h d'incubation à 37°C, les souches bactériennes sont ensemencées sur bouillon nutritif puis remettre en incubation à 37° ± 1° C pendant 18 h.

De cette dernière culture, on prélève quelques gouttes et on les mets dans 9 ml d'eau physiologique stérile à 0.9. La suspension bactérienne est bien homogénéisée, et la densité optique lue à 625 nm est justifiée à 0.08 à 0.10, soit environ 10⁸UFC/ml (**Pessini et al., 2003**).

La suspension bactérienne est ensuite diluée à 1/10 pour les staphylocoques et à 1/100 pour les autres souches bactériennes.

b. Pour les levures :

Les levures sont revivifiées dans du bouillon nutritif à 30° ±1° C pendant 48 h, puis cultivées sur boîte contenant du milieu de Sabouraud pendant 24 h à 48 h (pour vérifier leur pureté), ensuite, elles sont cultivées dans du bouillon nutritif pendant 24 à 48 h.

Après incubation, un certain volume de cette culture est dilué dans de l'eau physiologique pour avoir une densité optique entre 0.08 et 0.1 à 530 nm, soit environ 1 à 5×10⁶ UFC/ml (**Pfaller et al., 1988**).

c. Pour les moisissures :

La suspension de spores a été préparée dans l'eau physiologique et la concentration a été ajustée à 10^6 spores/ml ce qui correspond à une transmittance de 0.68 à 0.82% lue à 530 nm (Pfäller *et al.*, 2000 ; Sala *et al.*, 2003). Ces spores proviennent d'une culture de 7 jours en boîtes de pétri.

IV.2.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la plus faible concentration capable d'inhiber toute croissance visible du germe. Pour déterminer la CMI, l'huile essentielle est disposée dans chaque boîte afin d'effectuer une gamme de concentration de 2 à 4 μ l/ml avec pour chacune, son équivalent en DMSO. Puis, 20ml de gélose (PDA pour les moisissures et Sabouraud pour les levures) stériles en surfusion sont ajoutés. Le mélange est alors bien homogénéisé et laissé solidifier.

IV.2.3.1. Etude du pouvoir antifongique :

Pour les champignons filamenteux, il est habituel d'utiliser des suspensions des spores et du mycélium. Or, les études *in vitro* ont montré que les résultats diffèrent selon que l'on utilise des spores ou des filaments. L'agent pathogène est souvent sous forme de filaments chez le malade, il devient délicat d'interpréter un résultat obtenu *in vitro* avec des spores (Ouraini *et al.*, 2007).

IV.2.3.2. Méthode utilisé :

L'essai antifongique contre les moisissures a été estimé par la méthode de contact direct (Fandohan *et al.*, 2004).

a. Pour les Mycélium:

Un disque mycélium de 6 mm de diamètre a été déposé au centre de la boîte de pétri, le milieu de culture sans huile essentielle a servi de témoin. Les souches ont été incubées à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 3 à 5 jours.

Des mesures de diamètre des colonies ont été faites après la fin de l'incubation l'action antifongique a été déterminée par la mesure de l'inhibition de la croissance de la colonie fongique, en utilisant la formule d'Ebbot (Motiejūnaitė et Peičlytė, 2004).

$$T = (D_k - D_0) \times 100 / D_k$$

T : taux d'inhibition de la croissance du mycélium en pourcentage.

D_k : diamètre de la colonie mycélienne dans l'expérience (en mm)

D_0 : diamètre de la colonie mycélienne du témoin (en cm)

En parallèle, nous avons utilisé des témoins, comportant de DMSO, afin de vérifier la croissance des différentes souches fongiques.

b. Pour les Spores:

Nous avonsensemencées 1 ml de suspension fongiques contenant 10^4 spores. Après incubation à $25^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 48 h, on procède à la lecture des résultats par évaluation de la présence ou l'absence de la croissance fongique.

Résultats et discussion :

I. Calcul les rendements en huiles essentielles

Les extractions des huiles essentielles de « *Pituranthos chloranthus* » ont été réalisées en utilisant la méthode d'hydrodistillation. Les rendements moyens obtenus, sont représentés dans la figure 24.

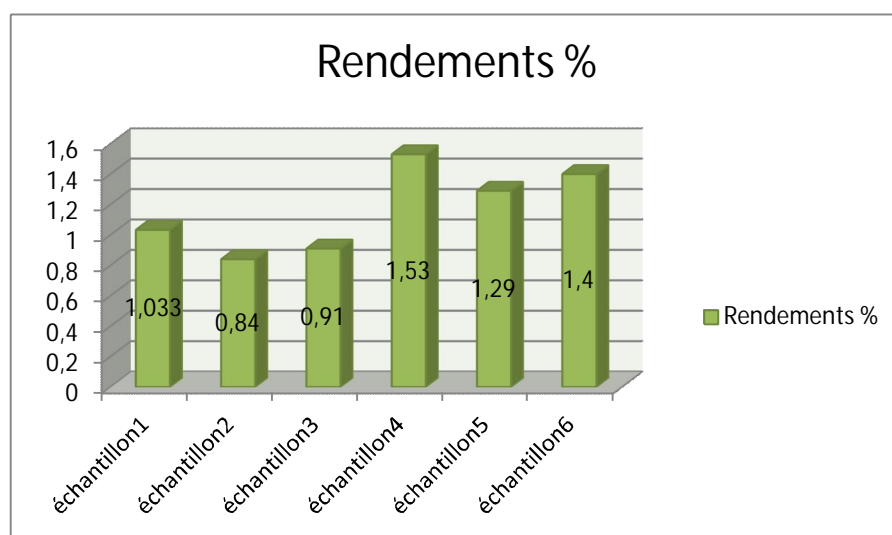


Figure 24: Rendements moyens en huiles essentielles de *Pituranthos chloranthus*

Les résultats obtenus, montrent que les rendements en huiles essentielles de cette espèce végétale sont plus ou moins variables entre les différents échantillons provenant de la même station du prélèvement et de la même période. On remarque également que cette plante est riche en huile essentielle. En effet, les rendements moyens des différents échantillons varient entre 0.84 et 1.53% (P/P).

Nous avons comparé nos résultats avec les travaux antérieurs et nous avons constaté que l'extraction des huiles essentielles de la partie aérienne fraîche de l'espèce *Pituranthos*

tortuosus récoltée en période de fructification en Egypte, a permis d'obtenir des rendements faibles de l'ordre de 0.5% (v/P) (Abdel Ghani et Hafez, 1995).

II. Etude de l'activité antimicrobienne :

Notre étude consiste à la recherche de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Pituranthos chloranthus* vis-à-vis des souches bactériennes. L'étude de cette activité antimicrobienne a été réalisée par la technique de diffusion des disques qui est une technique quantitative basée sur la mesure des diamètres d'inhibitions, en mm. Parallèlement, nous avons testé l'effet de ces huiles essentielles vis-à-vis quelques champignons en utilisant la méthode citée précédemment ainsi que la méthode de contact direct.

II.1. Méthode de diffusion sur disque :

Les résultats du test de sensibilité microbienne aux huiles essentielles sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 02 : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition (en mm) des huiles essentielles de *Pituranthos chloranthus* relatives aux souches microbiennes testées

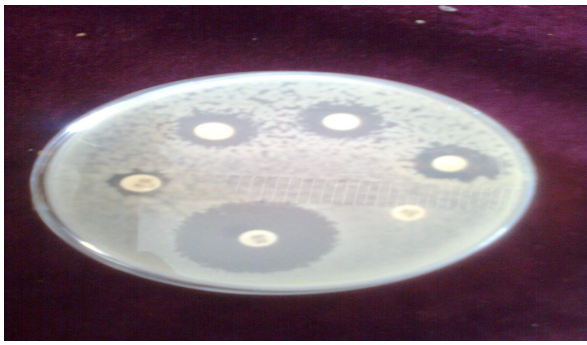
<i>Souches bactériennes</i>	CTX (30µg/disque)	AK (30µg/disque)	CAZ (30µg/disque)	Nystatine (30µg/disque)	Huile essentielle
<i>Bacillus cereus</i>	7.5±0.50	26.5±0.50	6.0±0.00	-	13,3±1,53
<i>Enterococcus faecalis</i>	23.5±1.50	11.5±0.50	6.0±0.00	-	8,3± 2,08
<i>Enterobacter cloacae</i>	25.5±0.50	25.0±0.00	19.0±1.00	-	10.0±0,0
<i>Salmonella typhimurim</i>	32.0±4.00	26.0±0.00	23.5±1.50	-	12,3± 0,58
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22.0±2.00	30.0±0.00	25.0±0.00	-	6,0±0,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20.0±0.00	22.5±0.50	11.5±0.50	-	6,0± 0,0
<i>Escherichia coli</i>	28.5±1.50	25.0±0.00	24.0±2.00	-	9,0 ± 0,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	27.5±1.50	26.0±1.00	14.0±1.00	-	10,6±0,58

<i>Fusarium Oxysporum</i>	-	-	-	16.0±1,0	6,0±0,0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	-	-	33,6 ±1,15	9,3±0,58
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	-	22,3±0,58	15.0±0,58
<i>Candida IP</i>	-	-	-	20.0±0,0	14.0±1,1
<i>Candida 10</i>	-	-	-	16.0±0,0	25.5 ±0.50

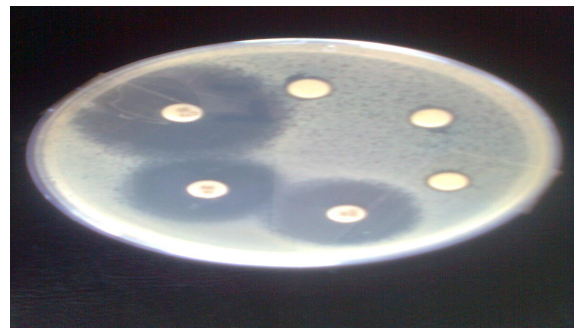
Comme cela a été rapporté dans la littérature, nous avons considéré qu'une huile essentielle a une action bactériostatique si son diamètre d'inhibition est supérieur à 15 mm (Rossi, 2003).

Ainsi, l'huile essentielle de *Pituranthos chloranthus* s'est avérée inactive sur toutes les souches bactériennes testées à l'exception de *Bacillus cereus* (13,33mm), *Salmonella typhimurim* (12,33mm) qui présentent une faible sensibilité. Par contre les champignons se sont révélés sensibles aux huiles essentielles de cette plante. En effet, les diamètres des zones d'inhibition varient entre 14.0 et 25.5mm pour les candidas. Par ailleurs, la moisissure la sensible est *Aspergillus flavus*, avec un diamètre de l'ordre de 15.0mm. On remarque également que toutes les souches microbiennes testées sont sensibles à la majorité des antibiotiques et des antifongiques.

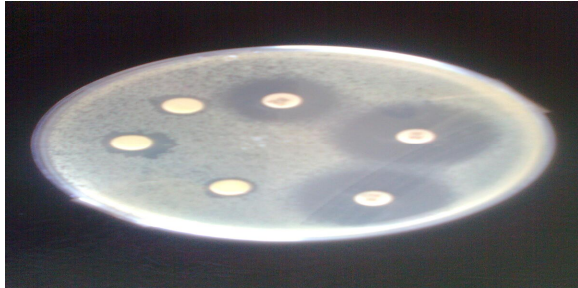
Abdel Ghani et **Hafez** en **1995**, ont testé l'activité de l'huile essentielle de *P. tortuosus* vis-à-vis des souches microbiennes suivantes : *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *C. albicans* et *A. niger*. Ils ont trouvé que cette huile essentielle présente un faible pouvoir antimicrobien. Les diamètres des zones d'inhibition varient entre 10 et 12mm.



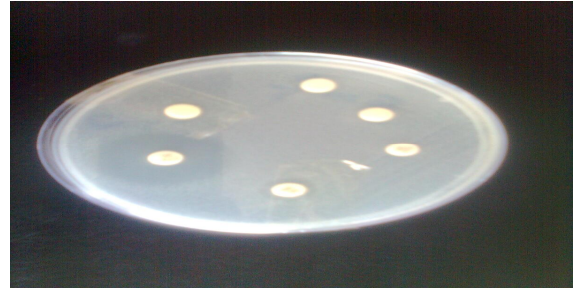
Bacillus cereus



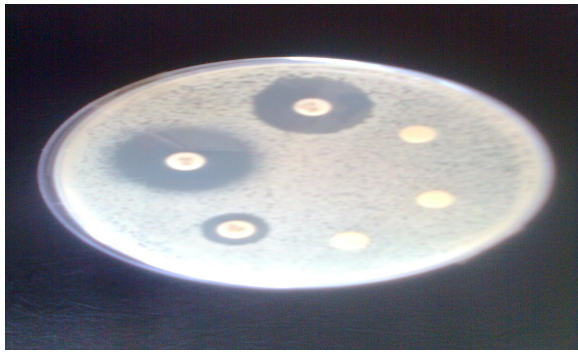
Escherichia coli



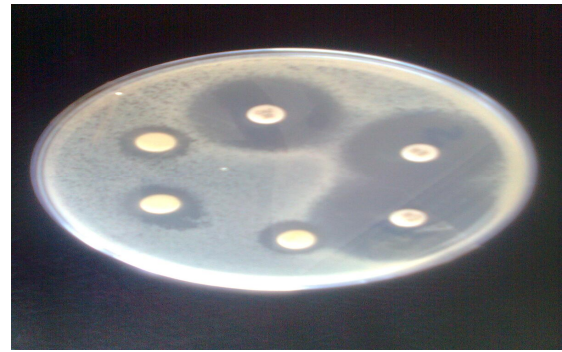
Enterobacter cloacae



Enterococcus faecalis



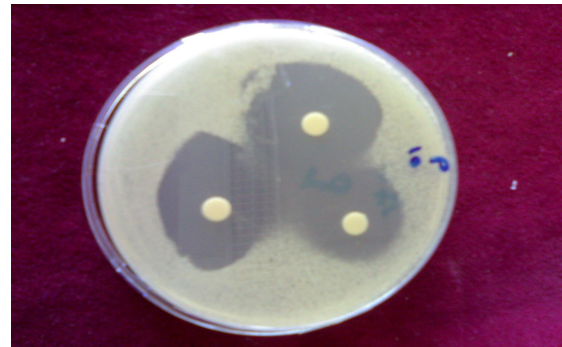
Klebsiella pneumoniae



Salmonella typhimurium



Candida albicans IP



Candida albicans 10

Photo 1 : Sensibilité des souches microbiennes selon la méthode de diffusion sur disque

II.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice(CMI) :

Nous avons déterminé les concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles vis-à vis des champignons ayant des zones d'inhibition supérieures ou égales à 15mm (Tableau 03).

Tableau 03 : Concentrations minimales inhibitrices d'huile essentielle de *Pituranthos chloranthus* vis-à-vis des levures

Concentration (µl /ml)	1	2	3	4
Candida IP	+	+	+	+
Candida 10	+	+	+	-

On remarque que la souche de *Candida albicans* 10 est la plus sensible, inhibée à une concentration en huile essentielle de *Pituranthos chloranthus* de l'ordre de 4µl/ml.

II.2.1. Etude du pouvoir antifongique :

Les pourcentages d'inhibition de la croissance des colonies fongiques à différentes concentration de l'huile essentielle obtenus après 5 jours d'incubation sont reportés dans la figure 25.

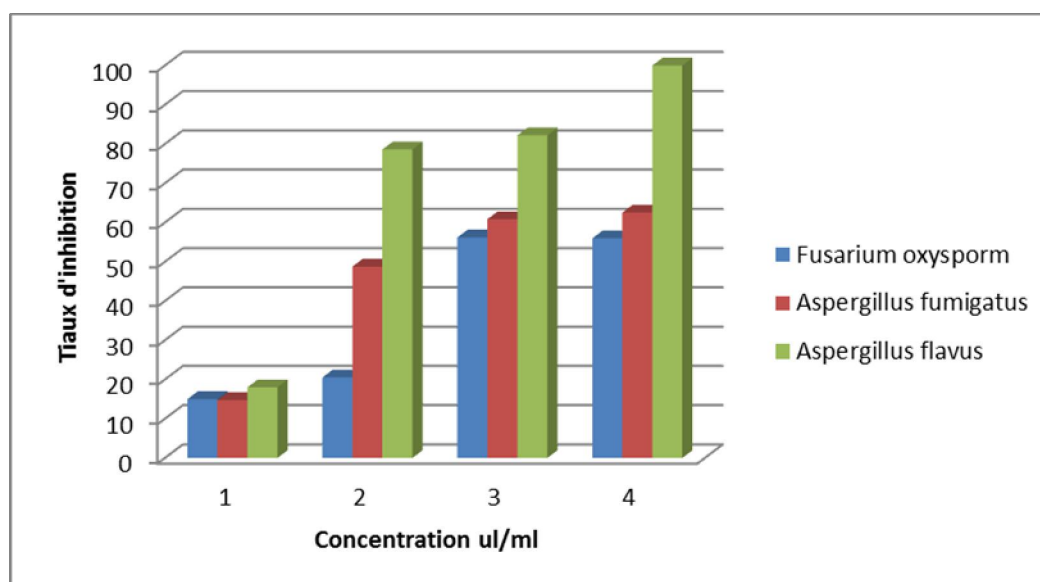


Figure 25 : Taux d'inhibition de la croissance des colonies fongiques

D'après les résultats exprimés dans la figure ci-dessus, les pourcentages d'inhibition de la croissance des colonies des souches fongiques sont proportionnels aux concentrations en huile essentielle.

On remarque que le taux d'inhibition de la croissance d'*Aspergillus flavus* est de 100% et ceci à une concentration de l'ordre de 4 μ l/ml.

Annexes

Tableau : Taux d'inhibition de la croissance des colonies fongiques

Concentration en HE ($\mu\text{l/ml}$)	1	2	3	4
<i>Fusarium Oxysporm</i>	15	20,51	56,19	55,96
<i>Aspergills fumigatus</i>	14,75	48,75	60,83	62,5
<i>Aspergills flavus</i>	18	78,6	82,20	100

Les résultats obtenus au cours de ce travail complètent et confortent une démarche scientifique de plus en plus fréquente à savoir, l'établissement de relations entre l'utilisation empirique de plantes par les populations et la connaissance scientifique et plus particulièrement chimique de ces plantes.

Notre étude réalisée au laboratoire des produits naturels (LAPRONA), nous a permis de déterminer les rendements et d'évaluer le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de *Pituranthos chloranthus* de la région de Biskra.

Dans la première étape, nous avons procédé à plusieurs extractions sélectives de l'huile essentielle par hydrodistillation de cette espèce végétale et le rendement le plus élevé est de l'ordre de 1,5%.

D'autre part, l'étude du pouvoir antimicrobien nous a révélé une faible activité antibactérienne à l'exception de deux souches *Bacillus cereus* et *Salmonella typhimurim* dont la valeur moyenne de l'auréole d'inhibition est de 13,33 et 12,33mm, respectivement.

L'action de l'huile essentielle de notre plante sur les champignons est moyenne. Les souches fongiques les plus sensibles sont : Les deux *Candida albicans* et *Aspergillus flavus* qui présentent une sensibilité avec des diamètres des zones d'inhibition variant entre 14,0 et 29,5mm et avec des CMI de l'ordre 4µl/ml.

Par contre, l'huile essentielle de *Pituranthos chloranthus* présente une très faible activité antifongique vis-à-vis d'*Aspergillus fumigatus* et de *Fusarium oxysporum*, avec un taux d'inhibition variant entre 55 et 62% et ceci à 4µl/ml.

Quelques soient les résultats obtenus cela reste un essai à réaliser, qui demande à être développé.

Nos résultats préliminaires montrent que l'huile essentielle testée témoigne des activités antimicrobiennes. D'autres études approfondies sont nécessaires et se résument dans les points suivants :

- Evaluation de l'activité antimicrobienne vis-à-vis d'autres souches microbiennes ;
- Caractérisation des huiles essentielles de cette espèce végétale par les techniques spectrales et chromatographiques
- Isolement des molécules responsables de cette activité ;
- Réaliser des études in vivo sur les constituants de ces plantes concernant le pouvoir antioxydant;

*E*n définitif, ce travail, s'il fixe des résultats certains, ouvre des perspectives et des pistes de recherches, tant au niveau de la connaissance scientifique, qu'à celui d'une possibilité de valorisation de la matière végétale de nos régions.

Référence bibliographique

A :

Abdel Ghani A., Hafez S.S. (1995).

GC-MS Analysis and antimicrobial activity of volatile oil of *Pituranthos tortuosus* (Desf.).
Qatar Univ. Sci J., **15**, 23-26.

Abdelwahed A., Hayder N., Kilani S., Mahmoud A., Chibani J., Hammami M., Chekir-Gherdira L., Ghedira K. (2006).

Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Tunisian *Pituranthos tortuosus* (Coss.) Maire.
Flavour Fragrance Journal, **21**, 129-13.

AFNOR (1989).

Association Française de Normalisation « huiles essentielles ». Recueil des normes françaises.
3^{ème} Edition AFNOR, Paris.

AFNOR (1992).

Association Française de Normalisation « huiles essentielles ». Recueil des normes françaises.
4^{ème} Edition AFNOR, Paris.

Agnihotri A., Khatoon S., Shanta M. (2003).

Pharmacognostic evaluation of an antioxidant *Plantago rugelii* L.
Nat. Prod. Sci., **9**, 264-269.

Abu-Arabi M.K., Allawzi M.A., Al-Zoubi H.S., Tamimi A. (2000).

Extraction of jojoba oil by pressing and leaching.
Chemical Engineering Journal, **76**, 61-65.

Al kadi A. (1989).

Usage de quelques plantes dans la médecine populaire en Libye.
Vol. 1-2.

Arnaud P. (1985).

Cours de chimie organique.
Bordas, Paris, Pp 441.

Ashkenazy D., Friedman J., Kashman Y. (1983).

Medicinal plants in tropical west africa III.: Anti-infection therapy with higher plant.
Journal of Medicinal Plant Research, **47**, 218-220.

Alonso, Croteau (1991).

Purification and Characterization of the Monoterpene Cyclase γ -Terpinene Synthase from *Thymus vulgaris*.
Arch. Biochem. Biophys., **286**, 511-517.

Almani G., Benayache S., Benayache F., Dendougui H., Jay M. (1998).

Métabolisme flavonique de *Centaurea caenis* All.
J. Soc. Alg. Chim., **8**, 29.

B :

Bellakhdar J. (1997).

Médecine Arabe Ancienne et Savoirs Populaires : La pharmacopée marocaine traditionnelle.
Ibis Press.

BenakchaR. (2001).

Etude phytochimique de deux plantes algériennes : *Centaurea pungens* et *Salsola vermiculata*, activité biologique.

Thèse de magister chimie-Constantine.

Benkaci-Ali F., Baaliouamer A., Meklati B.Y., Chemat F. (2006).

Chemical composition of seed essential oils from Algerian *Nigella sativa* extracted by microwave and hydrodistillation.

Flavour And Fragrance Journal, **22**, 148–153.

Bergognoux V. (2005).

Biosynthèse et sécrétion du parfum chez *Rosa x hybrida* L.

Thèse de Doctorat, Académie de Lyon, France.

Braga F.G., Bouzada M.L.M., Fabri R.L., Matos M.O., Moreira F.O., Scio E., Coimbra E.S., (2007).

Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil.

Journal of Ethnopharmacology, **111**, 396-40.

Bottin I. (2006).

Déterminants de la variation moléculaire et phénotypique d'une espèce forestière en milieu insulaire : cas de *Santalum austrocaledonicum* en Nouvelle-Calédonie.

Thèse de doctorat, Montpellier.

Bruneton J. (1987).

Pharmacognosie, Phytochimie : Plantes médicinales.

Technique et documentation, 1^{ère} Edition Lavoisier, Paris.

Bruneton J. (1993).

Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales

Technique documentation 2^{ème} Edition Lavoisier, Paris, Pp 406, 410.

Bourrel A. (1993).

Analyse chimique, activités biologiques et antioxydantes d'extraits de plantes aromatiques sélectionnées.

Thèse de 3^{ème} cycle, INP, Institut National Polytechnique de Toulouse.

Bousbia N. (2004).

Extraction et identification de quelques huiles essentielles (nigelle, coriandre, origan, thym, romarin), étude de leurs activités antibactériennes.

Thèse de Magister, Option Science Alimentaires, INRA. Algérie.

Boutaghan N., Nacer A., Kabouche Z., Ait-Kaki B. (2004).

Comparative antibacterial activity of the essential oils of stems and seeds of *Pituranthos scoparius* from Algerian, Septentrional Sahara.
Chemistry of Natural Compounds, **40**, 606-607.

C :

Cavalli F., (2002).

Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar.

Thèse de Doctorat, Université de Corse Pascal Paoli.

Chemat F., Abert Vian M., Dangles O. (2007).

Essential oils as antioxidants

International Journal of Essential Oil Therapeutics, **1**,

Croteau R., Kutchan T.M., Lewis N.G. (2000).

Natural products (secondary metabolites). In: **Buchanan B., Grisse W., Jones R. (Eds)**, *Biochemistry and Molecular of plants, American Society of Plant Physiologists*, 1250-1268.

Chaumont J.P., Leger D. (1989).

Propriétés antifongique de quelques phénols et des composés chimiquement très voisins : Relation structure-activité.

Planta Med. Phyto., **23**, 124-126.

D :

Denny E.F.K. (1991).

Field distillation for herbaceous oils.

Denny, McKenzie Associates, Lilydale, Tasmania, Australia.

Dorman H.J.D., Deans S.G. (2000).

Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils.

Journal of Applied Microbiology, **88**, 308-316.

Dupont F., Guignand J.L. (2007).

Botanique : Systématique moléculaire.

14^e éd. *Masson*, Paris France, p: 188.

F :

Fandohan P., Gbenou D.J., Gnonlonfin B., Hell K., Marasas W.F.O., Wingfield M.J. (2004).

Effect of essential oils on the growth of *Fusarium verticillioides* and fumonisin contamination in corn.

J. Agric. Food Chem., **52**, 6824-6829.

Flamini, Tebano M., Luigi Cioni P., Ceccarini L., Ricci A. S., 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, **1143**. 36-40.

French J. (1651).

The Art of Distillation.

Richard Cotes Editions, London.

Ferhat M. A., Tigrine-Kordjani N., Chemat S., Meklati B. Y., Chemat F. (2007).

Rapid Extraction of Volatile Compounds Using a New Simultaneous Microwave Distillation: Solvent Extraction Device

Journal of Chromatography, **65**, 217–222.

Fonteneau J.M., Klusiwciz P. (2008).

Travaux pratique de préparation et de conditionnement des médicaments.

Groupe Liaisons, Bruxelles, Pp 43.

G :

Guerin-Fauble V., Carret G. (1999).

L'antibiogramme, principe, méthodologie, intérêt et limites.

Journées nationales GTV-INRA, Washington, Pp: 5-12.

Guignard J.L., Cosson L., Henry M. (1985).

Abrégé de Phytochimie.

Ed. Masson, Paris, Pp 155.

H :

Haba H., Benkhaled M., Massiot G., Log C., Lavaud C. (2004).

Alkylated isocoumarins from *Pituranthos scoparius*.

Natural Product research, **18**, 409-413.

Halim A.F., Saad H-E.A, Lahloub M.F., Ahmed A.F., (1990).

Phytochemical Study of the Fruits of *Torilis arvensis* (Huds.) Link Growing in Egypt.

Mans. J. Pharm. Sci., **6**, 26-37,

Halim A.F., Saad H-E.A, Lahloub M.F., Ahmed A.F., Mansoura J. (1991).

Coumarins of Roots of Pituranthos triradiatus Growing in Egypt.

Mans. J. Pharrm. Sci., **7**, 402.

Halim A.F., Saad H-E.A., Lahloub M.F., Ahmed A.F. (1995).

Pituranthoside from *Pituranthos triradiatus*

Phytochemistry, **40**, 927-929.

J :

Jonhson L.A. (1983).

Comparison of alternative solvents for oils extractions.

J. Am. OilChem. Soc., **60**, 229-242.

Jirovetz L., Buchbauer G., Shahabi M. (2002).

Comparative investigations of essential oils and their SPME headspace volatiles of *Rosa damascena* from Bulgaria and *Rosa centifolia* from Morocco using GC-FID, GC-MS and olfactometry.

JEOBP,5, 111-121.

K :

Kaabeche M.(1990).

Les Groupements Végétaux de la région de Boussaâda : Contribution à la systématique des groupements steppiques du Maghreb.

Thèse de Doctorat, Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, France.

KapetanovicS., DjugumovicS., RamicR.(1984).

Isolement de l'huile essentielle de rose par distillation sèche.

Parfums, Cosmétiques et ArômesJ., **56**, 77-78.

Kartika A.I. (2005).

Nouveau procédé de fractionnement des graines de tournesol : expression et extraction en extrudeur bi vis, purification par ultrafiltration de l'huile de tournesol.

Thèse doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse, France.

L :

LagunezRivera L. (2006).

Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe. Thèse de l'institut national polytechnique de Toulouse, France.

Langenheim J.H. (1969).

Amber: abotanicalinquiry.

Science,**163**, 1157-1169.

Lucchesi M.E., Chemat F., Smadja J. (2004).

An original solvent free microwave extraction of essential oil from spices.

Flavour and Fragrance Journal, **19**, 134-138.

Lucchesi M.E. (2005).

Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes : Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles.

Thèse de Doctorat en Sciences, discipline : Chimie, Université de la Réunion, Faculté des Sciences et Technologies, Pp19.

M :

Maiza K., Brac De La Perrière R.A., Hammiche V. (1993).

Pharmacopée traditionnelle saharienne : Sahara septentrional.

Médicaments et Aliments : L'approche Ethnopharmacologique, Actes du 2^{ème} Colloque Européen d'Ethnopharmacologie et de la 1^{le} Conférence internationale d'Ethnomédecine, Heidelberg, 24-27 mars 1993, Pp : 169-171.

Meyer-WarnodA. (1984).

Natural essential oils: extraction processes and applications to some major oils.

Perfumer&Flavorist. J., **9**, 93-103.

Morin P., Richard H. (1985).

Thermaldegradation of linalylacetate during steam distillation.

4th Weurman Flav. Res. Symp. Elsevier Science, Publ. B.V. Amsterdam, Pp 563-576.

Motiejūnaitė O., Peičlytė D. (2004).

Fungicidal properties of *Pinus sylvestris* L. for improvement of air quality.

Medicinal (Kaumas), 787-794.

N :

Novak I., Buzas G., Minker E., Kolfai M., Szendrei K. (1966).

Untersuchung der wirkstoffe der *Rutagraveolens* II.

Planta Medica, 14, 57-61.

Népomuscène M.J. (1995).

Caractérisation des huiles essentielles du bleuets nain, *vaccinium angustifolium* Aiton.

Thèse de maîtrise, Université du Québec à Chicoutimi.

O :

Ouraini D., Agoumil A., Ismaili-Alaoui M., Alaoui K., Cherrah Y., Alaoui M., Bellabas M.A. (2007).

Activité antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de *Thymus satureioides* et de *Mentha pulegium* L., comparée aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques.

Phytothérapie, 1, 6-14.

Ozenda P. (1958).

Flore du Sahara.

Ed. CNRS, Paris, France.

P :

Penssini 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. *pallenscens* (C.D.C). Yunk.

Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 98.

Pibiri M.C. (2005).

Assainissement microbiologique de l'air et systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles.

Thèse de doctorat, Polytechniques Fédérale de Lausanne.

Piochon M. (2008).

Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et hémisynthèse.

Mémoire, Université du Québec à Chicoutimi, Canada.

Pfaller M.A., Burmeister L., Bartlett M.S., Rinaldi M.G. (1988).

Multicenter Evaluation of Four Methods of Yeast Inoculum Preparation.

Journal of Clinical Microbiology, 26, 1437-1441.

Pfaller M.A., Messer S.A., Mills K., Bolmström A. (2000).

Susceptibility testing of filamentous fungi: Comparison of test and reference microdilution methods for determining itraconazole MICs.

Journal of Clinical Microbiology, **38**, 3359-3361.

Pellecuer J., Roussel J.L., Andary C.C. (1980).

Recherche du pouvoir antifongique de quelques huiles essentielles.

Rivista Italiana Essenza (EPPOS), **23**, 45-50.

Paris M., Hurabielle M. (1981).

Abrégé de Matière Médicale (Pharmacognosie).

Masson, Tome 1, Paris, Pp 1-3,5-10.

Q :

Quézel P., Santa, S (1962).

Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales.

Ed. CNRS, Vol. 2 Paris France, 1963.

R :

Raul L., OCHOA H. (2005).

Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combine « solvant/actif » d'origine végétale.

Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique De Toulouse.

Rossi P.G. (2003).

Caractérisation et valorisation des produits issus de la biomasse : activité biologique des huiles essentielles.

Thèse de Doctorat, Université de Corse, 2.

Roux D. (2008).

Conseil en aromathérapie.

2^{ème} édition Pro-Officiana, p: 187.

S :

Sala A., Recio M.C., Schinelle G.R. (2003).

Assessment of the inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside.

Eur. J. Pharmacol., **461**, 53-61.

Singab A.N., Khalifa T., Mahran G.H., Okada Y., Matsumaru Y., Nishino H., Okuyama T. (1998).

A New Flavonoid Glycoside from *Pituranthus tortuosus* Desf. Benth & Hook.

Natural Medicines, **52**, 191-194.

Sivropoulou A., Papanikolaou E., Nikolaou C., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M. (1996).

Antimicrobial and cytotoxic activities of *origanum* essential oils.

J. Agric. Food Chem., **44**, 1202-1205.

Shalaby N. (1998).

Modelling, measurement and control, C: Energetics.

Chemistry and Engineering, Earth, Resources, Environment, Biomedical problems, **57**, 17-35.

T :

TouilA., Creche J., Rhouati S.(2006).

Flavonoid glycosids from *Pituranthos chloranthus*.
Chemistry of Natural compounds, 42, 104-105.

Tedder J.M. (1970).

Basic Organicchemistry.
Ed. John Wiley & Sons. New York.

Teisseire P.J.(1991).

Chimie Des Substances Odorantes.
Technique documentation Lavoisier, Paris, Pp 14, 25-30.

Tigrine-Kordjani N.,MeklatiB.Y.,ChematF. (2006).

Microwave'dry'distillation as an useful tool for extraction of edible essential oils.
The International Journal of Aromatherapy, 16, 141–147.

V :

Vernin G., LageotC., Ghiglione C., Dahia M., Parkanyi C. (1999).

GC/MS analysis of the volatile constituents of the essential oils of *Pituranthos scoparius* Coss.
EtDur.. Benth.& Hook. from Algeria.
Journal of Essential Oil Research, 11, 673-676.

ViollonA., ChaumontJ.P. (1994).

Antifungalproperties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*.
Mycopathologia, 128, 151-153.

VéritéP.,NacerA.,KaboucheZ., Segbuin E.(2004).

Composition of seeds and stems essential oils of *Pituranthos scoparius* (Coss.&Dur.) Schinz.
Flavour and fragrance J., 19, 562-564.

Y :

YayiE., Joachin D.,Gbenou, Léon A., Ahoussi M.,Moudachirou J.C.,Chalchat. C. R.(2004).

Ocimum gratissimum L., siège de variations chimiques complexes au cours du développement.
Chimie, 7, 1013–1018.

W :

Wan P.J.,PakarinenD.R., HronR.J. (1995).

Alternative hydrocarbon solvent for cottonseed extraction.
J. Am.OilChem. Soc.,72, 653-659.

Z :

ZambonelliA., D'Aurelio A.Z., Severi A.,Benvenuti E.,MaggiL.,BianchiA. (2004).

Chemical composition and fungicidalactivity of comercial essential oils of *Thymus vulgaris* L.
J. Essent.OilRes., 16, 69-74.

Zakarya A., Fathallah T., Chascrette M. (1993).

Use of multifunctional autocorrelation method to estimate molar volumes of alkanes and oxygenated compounds: Comparison between components of autocorrelation vectors and topological indices.
J. Phys. Org. Chem., **6**, 574-582.

Zarnowski R., Suzuki Y. (2004).

Expedient Soxhlet extraction of resorcinolic lipids from wheat grains.
Journal of Food Composition and analysis, **17**, 649-663.

Zhiri A. (2006).

Les huiles essentielles: un pouvoir antimicrobien avéré.

Natural News. Science, Nutrition, Prévention et Santé, Edité par la Fondation pour le libre choix, 12, p:8.

Ziming Wang, Lan Ding, Tiechun Li, Xin Zhou, Lu Wang, Hanqi Zhang, Li Liu, Ying Li, Zhihong Liu, Hongju Wang, Hong Zeng, Hui H. (2006).

Improved solvent-free microwave extraction of essential oil from dried *Cuminum cyminum* L. and *Zanthoxylum bungeanum* Maxim.

Journal of Chromatography A, **1102**, 11-17.

www.memoireonline.com