



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

UNIVERSITE LARBI BEN M'HIDI -OUM EI BOUAGHI-
FACULTE DES SCIENCES EXACTES ET DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

N° d'ordre :.....

N° de série :.....

MEMOIRE présenté pour l'obtention du diplôme de
Magister

En

BIOCHIMIE APPLIQUEE

Option: Biochimie des produits naturels d'origine végétale

Thème :

**Extraction des métabolites secondaires de plantes
médicinales: *Pulicaria arabica* (L.) Cass. et *Rhanterium
adpressum* Coss. & Durieu. Et evaluation de leurs
propriétés bioactives**

Présenté par : Djermane Nadia

Soutenu le 30 juin 2014 devant le jury :

Président: Pr. Snoussi M^{ed} Mourad

UNIVERSITE LARBI BEN M'HIDI-OEB

Rapporteur: Pr. Gherraf Noureddine

UNIVERSITE LARBI BEN M'HIDI-OEB

Examineur: Pr. Zellagui Amar

UNIVERSITE LARBI BEN M'HIDI-OEB

Examineur: Dr. Arhab Rabeh

UNIVERSITE LARBI BEN M'HIDI-OEB

Année universitaire 2013-2014

SOMMAIRE

REMERCIEMENT-DEDICACE.....	I
LISTE DES ABRUVIATIONS.....	II
LISTE DES TABLEAUX.....	III
LISTE DES FIGURES.....	VI
INTRODUCTION.....	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Les métabolites secondaires.....	3
I.1.Introduction.....	3
I.2.Classification.....	4
I.2.1.Les Composés phénoliques.....	4
I.2.1.1.Définition.....	4
I.2.1.2.Classification.....	4
I.2.1.2.1.Les flavonoïdes.....	4
I.2.1.2.2.Les tanins.....	5
I.2.1.2.3.Les acides phénoliques.....	7
I.2.1.2.4.Les stilbènes.....	9
I.2.1.2.5.Les lignanes.....	12
I.2.2.Les alcaloïdes.....	12
I.2.2.1.Définition.....	13
I.2.2.2.Classification.....	13
II. Les huiles essentielles.....	13
II.1.Définition.....	13
II.2.Répartition systématique et localisation.....	15
II.3.Toxicité des composants des huiles essentielle.....	15
II.4.Caractéristiques physico-chimiques.....	15
II.4.1.propriétés physiques.....	16
II.4.2.Composition chimique.....	17
II.5.Méthodes d'extraction.....	17
II.5.1.Distillation.....	17
II.5.2.L'expression.....	23
II.5.3.Extraction par des solvants.....	23
II.5.4.Extraction par fluide supercritique.....	24
II.5.5.Extraction par micro-ondes.....	25
II.6.Méthodes d'identification chimiques.....	26
II.6.1.La chromatographie en phase gazeuse.....	27
II.6.2.La spectrométrie de masse.....	27
II.6.3.Couplage CPG/MS.....	27
II.7.Propriétés.....	27
II.7.1.Activité antimicrobienne.....	28
II.7.1.1.Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne.....	29
II.7.1.1.1.Aromatogramme.....	29
II.7.1.1.2.Méthode de diffusion en puits.....	30
II.7.1.1.3.Méthode de dilution.....	32
II.7.1.1.4.Méthode en microatmosphère.....	32
II.7.2.Activité antioxydante.....	32
II.7.2.1.Définition des radicaux libres.....	33

II.7.2.2. Définition des antioxydants.....	33
II.7.2.3. Types d'antioxydants.....	34
II.7.2.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante.....	34
II.7.2.4.1. Test de DPPH.....	34
II.7.2.4.2. Test de décoloration du β -carotène.....	35
II.7.2.4.3. Test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	35
III. Les plantes médicinales sélectionnées.....	37
III.1. La famille Astéragées.....	37
III.1.1. Etymologie.....	37
III.1.2. Classification systématique.....	37
III.1.3. Répartition géographique.....	37
III.1.4. Caractéristiques générales.....	37
III.1.5. Place des Astéragées dans la médecine traditionnelle.....	38
III.2. La plante <i>Rhanterium adpressum</i>.....	39
III.2.1. Description.....	39
III.2.2. Position systématique.....	40
III.2.3. Répartition géographique.....	40
III.2.4. Utilisation en médecine traditionnelle.....	41
III.2.5. Travaux phytochimiques antérieurs.....	41
III.2.5.1. Sur le genre.....	41
III.2.5.2. Sur l'espèce.....	42
III.1.3. La plante <i>Pulicaria arabica</i>.....	45
III.1.3.1. Description.....	45
III.1.3.2. Position systématique.....	46
III.1.3.3. Répartition géographique.....	46
III.1.3.4. Utilisation en médecine traditionnelle.....	47
III.1.3.5. Travaux phytochimiques antérieurs.....	47
III.1.3.5.1. Sur le genre.....	47
III.1.3.5.1. Sur l'espèce.....	48
ETUDE EXPERIMENTALE	
IV. Matériels et méthodes.....	51
IV.1. Matériels.....	51
IV. 1.1. Choix du matériel végétal.....	51
IV.1.2. Appareillage et produits chimiques.....	51
IV.1.3. Origine et choix des souches microbiennes.....	51
IV.1.4. Choix des milieux de culture.....	51
IV.2. Méthodes.....	52
IV.2.1. Extraction de l'huile essentielle des plantes.....	53
IV.2.1.1. Procédé d'extraction.....	53
IV.2.1.2. Conservation des huiles essentielles obtenues.....	53
IV.2.1.3. Détermination du rendement d'extraction.....	53
IV.2.1.4. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles par CG/SM.....	54
IV.2.2. Préparation des extraits bruts des plantes.....	54
IV.2.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	55
IV.2.3.1. Préparation des dilutions.....	55
IV.2.3.2. Préparation des disques.....	55

IV.2.3.3.Evaluation de l'activité antibactérienne.....	56
IV.2.3.3.1.Identification des souches étudiées.....	56
IV.2.3.3.2.Préparation des suspensions bactériennes.....	59
IV.2.3.3.3.Tests de l'activité antibactérienne.....	60
IV.2.3.4.Evaluation de l'activité antifongique.....	61
IV.2.4.Evaluation de l'activité antioxydante.....	61
IV.2.4.1.Test au DPPH.....	61
V .Résultats et discussion.....	62
V.1.Rendement d'extraction.....	62
V.1.1.Les huiles essentielles.....	62
V.1.2.Les extraits organiques.....	63
V.2.Résultat d'analyse des huiles essentielles.....	64
V.2.1.La plante <i>Pulicaria arabica</i>	64
V.3.Résultats du test du pouvoir antimicrobien.....	68
V.3.1.L' activité antibactérienne.....	68
V.3.1.1.Identification des souches étudiées.....	68
V.3.1.1.1.Caractères morphologiques et culturaux.....	68
V.3.1.1.2.Identification biochimiques.....	69
V.3.1.1.3.Antibiogramme.....	71
V.3.1.2.Tests de l'activité antibactérienne.....	74
V.3.1.2.1.Control négatif.....	74
V.3.1.2.2.Les extraits de <i>Rhanterium adpressum</i>	75
V.3.1.2.3.Les extraits de <i>Pulicaria arabica</i>	83
V.3 .2.L' activité antifongique.....	94
V.4.Résultats du test du pouvoir antioxydant.....	96
V.4.1.Acide ascorbique.....	97
V.4.2.Les extraits de la plante <i>Rhanterium adpressum</i>	98
V.4.3.Les extraits de la plante <i>Pulicaria arabica</i>	102
CONCLUSION.....	108
REFERENCES BIBLIOGRAPHYQUE.....	110
ANNEXE	
GLOSSAIRE	
RESUME	

REMERCIEMENTS

Je remercie DIEU tout puissant, maître des cieux et de la terre, qui m'a permis de mener à bien ce travail.

Tout d'abord je tiens surtout à adresser mes plus vifs remerciements à mon encadreur de thèse, Monsieur Gherraf Noureddine, Professeur et vice-recteur à l'université LARBI BEN M'HIDI-O.E.B, qui m'a fait l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction, pour sa grande patience, pour sa disponibilité et ses conseils judicieux.

Je tiens à remercier aussi Monsieur Snoussi Mohamed Mourad, Professeur à l'université LARBI BEN M'HIDI-O.E.B, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.

Merci également à Monsieur Zellagui Amar professeur à l'université LARBI BEN M'HIDI-O.E.B et Monsieur Arhab Rabeh Maître de conférences à l'université LARBI BEN M'HIDI- O.E.B, pour leurs participation à ce jury.

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail spécialement:

A mes très chers parents

A mes très chers frères: Samir, wahib et walid

A mes très chères sœurs:

Sara et son époux Abdelghani

Nawel et son époux Bouzid

Soumia et son époux Charif

Je n'oublie pas les petits: Heithem, Neissan kahina, Aymen et Assala Rawen

A ma cousine Linda

A mes collègues:

Ghania, Nousha, Safia, Radhia, Dounia, Rimel, kamilia, Leila, Soumia, Zineb, Khadidja,

Wafa, Fatiha, Faysal.

LISTE DES ABREVIATIONS

AFNOR	Association Française de N ormalisation
ATB	A ntibiotiques
ATCC	American Type Culture C ollection
CG	Chromatographie en phase g azeuse
CG/SM	Chromatographie en phase g azeuse couplée à la spectrométrie de m asse
CMB	Concentration M inimale B actéricide
CMI	Concentration M inimale B actéricide
CHU	Centre H ospitalo- U niversitaire
DMSO	D imethylsulfoxide
DPPH	2,2- d iphényle-1- p icrylhydrazyl
DL50	D ose L étale à 50%
DO	D ensité O ptique
EtOH	E thanol
EHex	Extrait H exanique
EMeOH	Extrait M ethanolique
EDCM	Extrait C hloroformique ou D ichlorométhane
FID	Flamme Ionisation D etector
FRAP	F erric R educing A ntioxidant P ower
FeCl₃	C hlorure f errique
GN	G élose n utritive
HEs	H uiles e ssentielles
MH	Agar de M ueller H inton
MeOH	M éthanol
M	M olaire
Mn	M inute
NIST	N ational I nstitut of S tandard and T echnology
SS	Gélose S almonella S higuella
SOD	S uperoxydedismutase
UFC /ML	U nités F ormant C olonie par M illilitre

LISTE DES TABLEAUX

N°	Tableau	Page
1	Organes végétaux, sources d'huiles essentielles.	16
2	Classification des terpènes.	18
3	Activité biologique de l'huile essentielle selon sa composition chimique.	30
4	Les principales espèces oxydantes.	33
5	Exemples de quelques plantes médicinales appartenant à la famille astéracée et leurs usages	39
6	valeurs nutritives du <i>Rhanterium suaveolens</i> .	41
7	Différents métabolites secondaires extraits du genre <i>Pulicaria</i>	48
8	Diamètres critiques des antibiotiques utilisés.	58
9	Rendement en huile essentielle des deux plantes.	62
10	Rendement de différents extraits bruts des deux plantes.	63
11	Résultat d'analyse de l'huile essentielle de <i>Pulicaria arabica</i> de l'Algérie.	65
12	Aspect des colonies des souches sur les milieux de culture.	69
13	La coloration de Gram des souches testées.	69
14	Caractéristiques biochimiques des bactéries identifiées par système Api 20E.	71
15	Résultat d'antibiogramme chez les bactéries à Gram(-).	72
16	Résultat d'antibiogramme chez les bactéries à Gram(+).	73
17	Diamètres des zones d'inhibitions de l'HE de <i>Rhanterium adpressum</i> .	77
18	Diamètres des zones d'inhibitions de l'EMeOH de <i>Rhanterium adpressum</i> .	79
19	Diamètres des zones d'inhibitions de l'En-hex de <i>Rhanterium adpressum</i> .	81
20	Diamètres des zones d'inhibitions de l'EDCM de <i>Rhanterium adpressum</i> .	83
21	Diamètres des zones d'inhibitions de l'HE <i>Pulicaria arabica</i> .	85
22	Diamètres des zones d'inhibitions de l'EMeOH de <i>Pulicaria arabica</i> .	88
23	Diamètres des zones d'inhibitions de l'En-hex de <i>Pulicaria arabica</i> .	90
24	Diamètres des zones d'inhibitions de l'EDCM de <i>Pulicaria arabica</i> .	92
25	Activité antibactérienne des extraits des deux plantes exprimée en CMI (mg/ml).	93
26	Diamètres des zones d'inhibitions des extraits de <i>Rhanterium adpressum</i> .	94
27	Diamètres des zones d'inhibitions des extraits de <i>Pulicaria arabica</i>	95
28	Pourcentage d'inhibition de DPPH par les divers extraits de <i>Rhanterium adpressum</i>	97
29	Pourcentage d'inhibition de DPPH par les divers extraits de <i>Pulicaria arabica</i>	97

LISTE DES FIGURES

N°	Figure	Page
1	Différentes familles de polyphénols.	5
2	Structure moléculaire de base des flavonoides (benzo- α -pyrone) avec la numérotation classique.	6
3	Les principales classes de flavonoïdes. Un(ou deux) exemple(s) précis a été donné dans chacun des cas.	6
4	Deux exemples de tannins hydrolysables.	8
5	Exemple de structure d'un tannin condensé.	9
6	Exemples d'acides hydroxybenzoïques.	10
7	Structures chimiques de quelques acides hydroxycinnamiques(C6-C3).	11
8	Structure chimique de coumarine benzo α -pyrone.	11
9	Structure de quelques coumarines.	12
10	Structure de base des stilbènes.	12
11	Structure de base des lignanes.	13
12	Classes et exemples d'alcaloïdes.	14
13	Structure chimique de quelques composés monoterpéniques.	19
14	Structure chimique de quelques composés sesquiterpéniques.	20
15	Structure de 2-méthyl-1,3-butadiène (isoprène).	20
16	Structure de diphosphate d'isopentényle (isoprène actif).	21
17	Vue d'ensemble de la synthèse des terpènes à partir de l'isopentényl diphosphate.	22
18	Schéma d'un appareil de distillation des huiles essentielles par l'entraînement à la vapeur d'eau.	25
19	Schéma de procédé d'une unité d'extraction par CO ₂ .	26
20	Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes.	27
21	Schéma d'une chromatographie en phase gazeuse.	28
22	Réaction du DPPH• avec un antioxydant.	35
23	Position systématique de la plante <i>Rhanterium adpressum</i> .	40
24	Répartition géographique de la plante <i>Rhanterium adpressum</i> .	41
25	Les principaux constituants de l'huile essentielle de <i>Rhanterium epapposum</i> .	42
26	Structure de composé d'un extrait butanolique de <i>Rhanterium adpressum</i> (3, 5, 7,4'-tetrahydroxyflavonol (kaempferol).	43
27	Structure des composés d'un extrait chloroformique de <i>Rhanterium adpressum</i> .	43
28	Structure des composés majoritaires de la partie aérienne l'HE de <i>R.adpressum</i>	44
29	Structure des composés majoritaires de l'HE et de l'extrait lipidique des fleurs de <i>R.adpressum</i>	45
30	Position systématique de la plante <i>Pulicaria arabica</i> .	46
31	Répartition géographique de la plante <i>Pulicaria arabica</i> .	47
32	Structure des composés flavonoïques extraits de <i>Pulicaria arabica</i> .	49
33	Structure des sésqui-et tri-terpènes extraits de <i>Pulicaria arabica</i> .	49
34	Structure des Flavonols extraits de <i>Pulicaria arabica</i> .	50
35	Les Composés majoritaires des HEs de différentes parties de <i>P. arabica</i> de la Tunisie.	50
36	Montage de l'hydrodistillation.	53
37	Photo de rotavapeur utilisé pour concentrer sous vide les différents extraits bruts des deux plantes.	54
38	Préparation des dilutions des extraits des plantes.	55
39	Pourcentage en HE des deux plantes obtenus par l'hydrodistillation.	62
40	Pourcentage des extraits bruts des deux plantes.	63
41	Profil chromatographique de l'huile essentielle de <i>Pulicaria arabica</i> .	64
42	Les composés en formules topologiques identifiés dans l'huile essentielle de <i>Pulicaria arabica</i> de l'Algérie.	66

43	Résultat de la galerie Api 20E de <i>Kleibseilla pneumoniae</i> .	69
44	Résultat de la galerie Api 20E de <i>Salmonella typhi</i>	70
45	Résultat de la galerie Api 20E d' <i>Escherichia coli</i> .	70
46	Résultat de la galerie Api 20E d' <i>Enterobacter.sp.</i>	70
47	Résultat de la galerie Api 20E de <i>Citrobacter freundii</i> .	70
48	Effet des ATB sur la croissance des bactéries à Gram négatif.	72
49	Effet des ATB sur la croissance des bactéries à Gram positif.	73
50	Effet de DMSO sur les souches bactériennes étudiées.	75
51	Effet de l'HE de <i>Rhanterium adpressum</i> sur les souches bactériennes étudiées.	76
52	Effet de l'EMeOH de <i>Rhanterium adpressum</i> sur les souches bactériennes testées.	78
53	Effet de l'En-hex de <i>Rhanterium adpressum</i> sur les souches bactériennes étudiées.	80
54	Effet de L'EDCM de <i>Rhanterium adpressum</i> sur les souches bactériennes étudiées.	82
55	Effet de l'HE de <i>Pulicaria arabica</i> sur les souches bactériennes étudiées.	84
56	Effet de l'EMeOH de <i>Pulicaria arabica</i> sur les souches bactériennes étudiées.	87
57	Effet de l'En-hex de <i>Pulicaria arabica</i> sur les souches bactériennes étudiées.	89
58	Effet de l'EDCM de <i>Pulicaria arabica</i> sur les souches bactériennes étudiées.	91
59	Effet de différents extraits de plante <i>Rhanterium adpressum</i> sur la croissance de la levure <i>Candida albicans</i> .	94
60	Effet de différents extraits de plante <i>Pulicaria arabica</i> sur la croissance de la levure <i>Candida albicans</i> .	95
61	Activité anti-oxydante relative des extraits de <i>Rhanterium adpressum</i> et acide ascorbique	97
62	Activité anti-oxydante relative des extraits de <i>Pulicaria arabica</i> et acide ascorbique.	98

INTRODUCTION

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. De nos jours ces plantes à parfum occupent une place prépondérante dans la découverte de nouvelles substances thérapeutiques.

On estime que près de 50% des agents thérapeutiques utilisés actuellement proviennent de sources naturelles, alors que moins de 10% des espèces ont été étudiées pour leurs activités biologiques. Ces chiffres indiquent qu'il subsiste encore une grande marge de progression et que l'étude approfondie de la « biomasse » ou des espèces végétales pourrait mener à la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques (Boukhatem et al., 2011).

Les PAM dans les pays en voie de développement d'Asie, d'Afrique et d'Amérique latine, jouent un rôle important dans la pharmacopée traditionnelle et l'alimentation. Au cours de la dernière décennie. Les PAM ont vu un regain dans les pays développés: États-Unis, Union Européenne, Australie et Canada. Ainsi le marché global des PAM a été estimé au 30 milliards de dollars en l'an 2000. L'Europe détient le plus grand marché, suivie par l'Asie, l'Amérique du Nord et le Japon. Les États-Unis constituent le marché qui évolue le plus rapidement (Ghanmi et al., 2010).

L'Algérie, de par sa position géographique jouit de plusieurs facteurs de pédogénèse et de grande variation climatiques à laquelle s'ajoutent les ressources hydriques, tous favorables au développement de cultures adaptées aux PAM (Boukhatem et al., 2011).

Parmi les PAM algériennes, On a choisi deux plantes du Sahara; *Rhanterium adpressum* et *Pulicaria arabica*. Le choix de la plante *Rhanterium adpressum* n'a pas été fait d'une manière fortuite puisqu'elle est endémique et utilisée dans la médecine populaire. Le choix de la plante *Pulicaria arabica* est basé sur des critères chimiques et biologiques. Sur le plan chimique, le genre *Pulicaria* est riche en différents métabolites secondaires et sur le plan biologique ce genre est connu par ses propriétés médicales et pharmaceutiques.

Dans cette étude La revue bibliographique est articulée en trois chapitres. Le premier chapitre expose des généralités sur les métabolites secondaires. Le deuxième chapitre traite les huiles essentielles, leurs méthodes d'extraction et d'identification et les méthodes d'évaluation des activités antimicrobiennes et anti- oxydantes. Le troisième chapitre est consacré à une présentation botanique de la famille Asteraceae, aux plantes médicinales sélectionnées et aux travaux phytochimiques antérieurs de ces plante. Cet aperçu bibliographique nous a apparu un appui à la partie expérimentale et à l'interprétation des résultats.

Dans ce présent travail, nous avons fixé les objectifs suivants:

- ❖ Extraction et détermination de la composition chimique des huiles essentielles des deux plantes, en utilisant la technique de CG/SM.
- ❖ Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des différents extraits bruts des deux plantes, en utilisant la méthode de diffusion en milieu gélosé.
- ❖ Etude de l'activité antiradicalaire des huiles essentielles et des différents extraits bruts des deux plantes, en utilisant le test au DPPH.

Etude bibliographique

I. Les métabolites secondaires.

I.1.Introduction.

On désigne par « métabolite secondaire » toute substance présente chez un organisme et qui ne participe pas directement aux processus de base de la cellule vivante. Ce concept est historiquement attribué à Kossel 1891 qui l'introduisit par opposition à celui de métabolites primaires, ces derniers étant directement impliqués dans les grandes voies du métabolisme basal de la cellule. Chez les végétaux, ces composés secondaires regroupent plusieurs dizaines de milliers de molécules différentes, généralement rassemblés en superfamilles chimiques tel que les polyphénols, les terpènes et stérols, les alcaloïdes, etc. Ces métabolites secondaires se caractérisent généralement par de faibles concentrations dans les tissus végétaux (Bourgaud, 2013).

Les métabolites secondaires ont une répartition limitée, dans la plante elle-même comme parmi les différentes espèces de végétaux, Ils sont typiquement produits dans un organe, tissu ou type cellulaire spécifique à des stades particuliers du développement (par exemple durant le développement de la fleur, du fruit, de la graine ou de la plantule).

Les métabolites secondaires sont produit à différents endroits de la cellule et emmagasinés surtout dans les vacuoles .Il sont souvent synthétisés dans une partie de la plante et stockés dans une autre .En outre, leur concentration dans la plante varie souvent dans de grandes proportions au cours d'une période de 24 heures (Raven et al., 2003).

Pour ce qui concerne leurs fonctions chez les plantes, les métabolites secondaires exercent un rôle majeur dans l'adaptation des végétaux à leur environnement. Ils assurent des fonctions clés dans la résistance aux contraintes biotiques (phytopathogènes, herbivores, etc.) et abiotiques (UV, température, etc.). Sur le plan agronomique, le rôle de ces composés dans la protection des cultures est connu (résistance aux maladies cryptogamiques, aux infections bactériennes, à certains insectes), mais a été relativement peu exploité pour ce qui concerne le développement de variétés résistantes. Ces métabolites secondaires constituent, aujourd'hui, un des leviers d'une possible intensification écologique de l'agriculture, en substituant notamment l'usage d'intrants chimiques par des mécanismes de défense naturelle des plantes.

D'un point de vue pharmacologique, les métabolites secondaires constituent la fraction la plus active des composés chimiques présents chez les végétaux et on estime

aujourd'hui qu'environ 1/3 des médicaments actuellement sur le marché contiennent au moins une telle substance végétale. Cette efficacité pharmacologique des métabolites secondaires s'est traduite par le développement de médicaments majeurs sur les 30 dernières années, tel que le Taxotère ou la Vinorelbine, utilisés dans le traitement de certains cancers (Bourgaud, 2013).

I.2. Classification.

Il y a trois classes principales de métabolites secondaires chez les plantes: les substances phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes (Raven et al., 2003).

I.2.1. Les composés phénoliques.

I.2.1.1. Définition.

L'appellation « polyphénols » ou « composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de plus de 8000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun: la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (Hennebelle et al., 2004).

Les polyphénols sont les antioxydants les plus présents dans la nature et aussi dans nos assiettes. Ils permettent aux plantes de se défendre contre les phénomènes d'oxydation, certaines agressions extérieures et contre le pourrissement (Menat, 2006).

I.2.1.2. Classification.

Les composés phénoliques (ou polyphénols) représentent un groupe de métabolites secondaires complexe comportant plusieurs familles: dérivés des acides benzoïque et cinnamique, flavonols, flavones, isoflavanones, flavanes, flavanones, chalcones, auronés et stilbène. Certains sont des précurseurs de polymères pariétaux, comme la lignine et la subérine. D'autres sont des polymères intracellulaires tels que les tanins condensés et les tanins hydrolysables (Regnault-Roger et al., 2008).

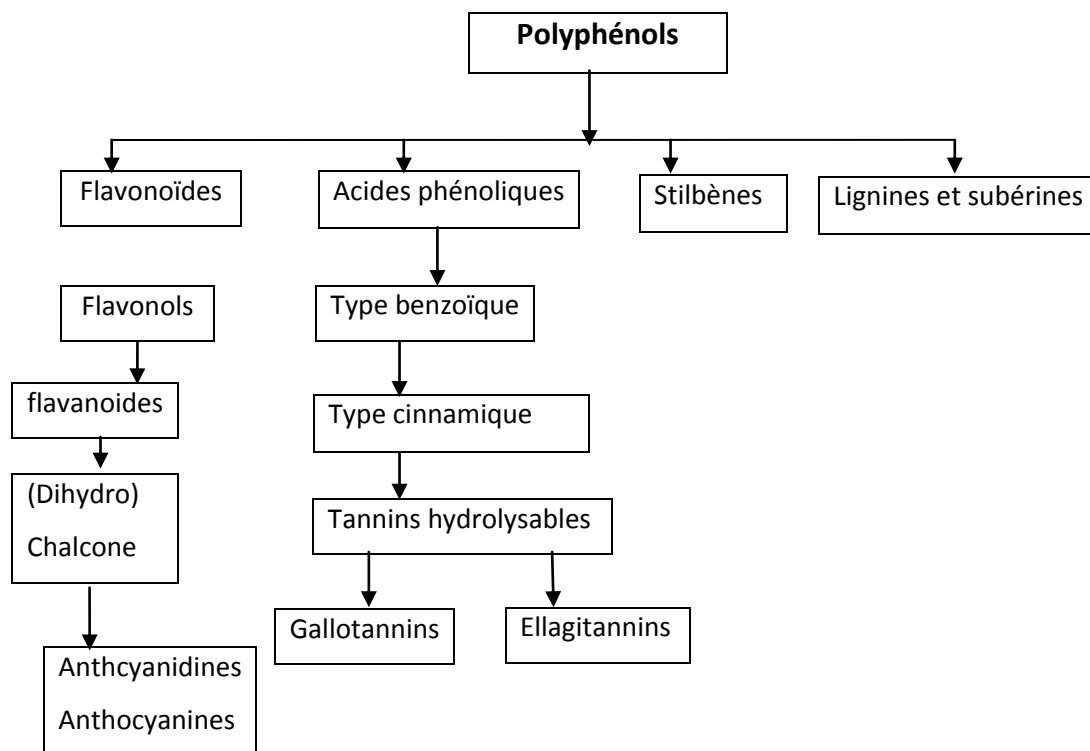


Figure 1: Différentes familles de polyphénols (Collin et Crouzet, 2011).

I.2.1.2.1. Les flavonoïdes (C₆-C₃-C₆).

A. Définition.

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires ; Ils constituent des pigments responsables des colorations jaunes, oranges et rouges de différents organes végétaux. Les flavonoïdes sont rencontrés dans les fruits (notamment du genre Citrus où ils représentent jusqu'à 1% des fruits frais) et les légumes, des boissons telles que le vin rouge, le thé, le café et la bière en contiennent également des quantités importantes. Ils sont retrouvés également dans plusieurs plantes médicinales (Derbel et Ghedire, 2005).

B. Structure et classification.

Les flavonoïdes sont constitués de cycles benzoïques présentant plusieurs groupements hydroxyles et sont pour cette raison également nommés polyphénols (Descheemaeker et Provoost, 1999).

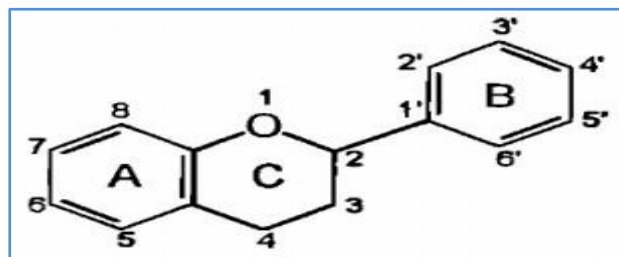


Figure 2: Structure moléculaire de base des flavonoïdes (benzo- α -pyrone) avec la numérotation classique (Collin et Crouzet, 2011).

Les flavonoïdes peuvent être classés selon la nature des différents substituants présents sur les cycles de la molécule et du degré de saturation du squelette benzo- α -pyrone (Derbel et Ghedire, 2005).

<p>FLAVONES</p> <p>Apigénine (R=H, R'=H) Lutéoline (R=H, R'=OH)</p>	<p>FLAVAN-3-OLS</p> <p>Catéchine (R=H, R'=H) Epicatechine (R=H, R'=H)</p>
<p>AURONES</p> <p>Aureusidine (R=H, R'=OH)</p>	<p>ANTHOCYANIDINES</p> <p>Pélagonidine (R=H, R'=H) Cyanidine (R=H, R'=OH)</p>
<p>ISOFLAVONES</p> <p>Génistéine (R=H, R'=H)</p>	<p>FLAVONONES</p> <p>Naringénine (R=H, R'=H) Eriodictyol (R=H, R'=OH)</p>
<p>CHALCONES</p> <p>Butéine (R=OH, R'=H)</p>	<p>FLAVONOLS</p> <p>Kaempférol (R=H, R'=H) Quercétine (R=H, R'=OH)</p>

Figure 3: Les principales classes de flavonoïdes (Neal et al., 2012). Un (ou deux) exemple(s) précis a été donné dans chacun des cas (Macheix et al., 2005).

I.2.1.2.2. Les tanins.

A. Définition.

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structures variées, ayant en commun la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible. Ces substances ont en effet la propriété de se combiner aux protéines, ce qui explique leur pouvoir tannant.

Ils sont très répandus dans le règne végétal, ils peuvent exister dans divers organes, mais on note une accumulation plus particulièrement dans les tissus âgés ou d'origine pathologique. Ils sont localisés dans les vacuoles, quelque fois combinés aux protéines et aux alcaloïdes (Catier et Roux, 2007).

B. Classification.

Les tanins sont classés en deux grandes catégories, les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Jacob et Pignal, 1972).

B.1. Les tanins hydrolysables.

Les tanins hydrolysables sont abondants chez les Dicotylédones et certains arbres en sont des sources industrielles: tanins de chêne, de châtaignier, tanin de Chine ou de Turquie extraits respectivement d'un arbuste du genre *Rhus* ou de *Quercus tinctoria*. Ils sont d'abord caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique (alcaline ou acide) ou enzymatique. Ils libèrent alors une partie non phénoliques (souvent du glucose ou de l'acide quinique) et une partie phénolique qui peut être soit de l'acide gallique (cas des gallotannins comme le tannin de Chine, quelquefois appelé « acide ellagique ») soit un dimère de la même acide, l'acide ellagique (cas des tanins ellagiques ou ellagitannins comme ceux du châtaignier). Une forme simple de tanins hydrolysables est le pentagalloylglucose, molécule très réactive qui est à l'origine de la plupart des formes complexes, par exemple la castalagine chez le châtaignier ou le chêne.

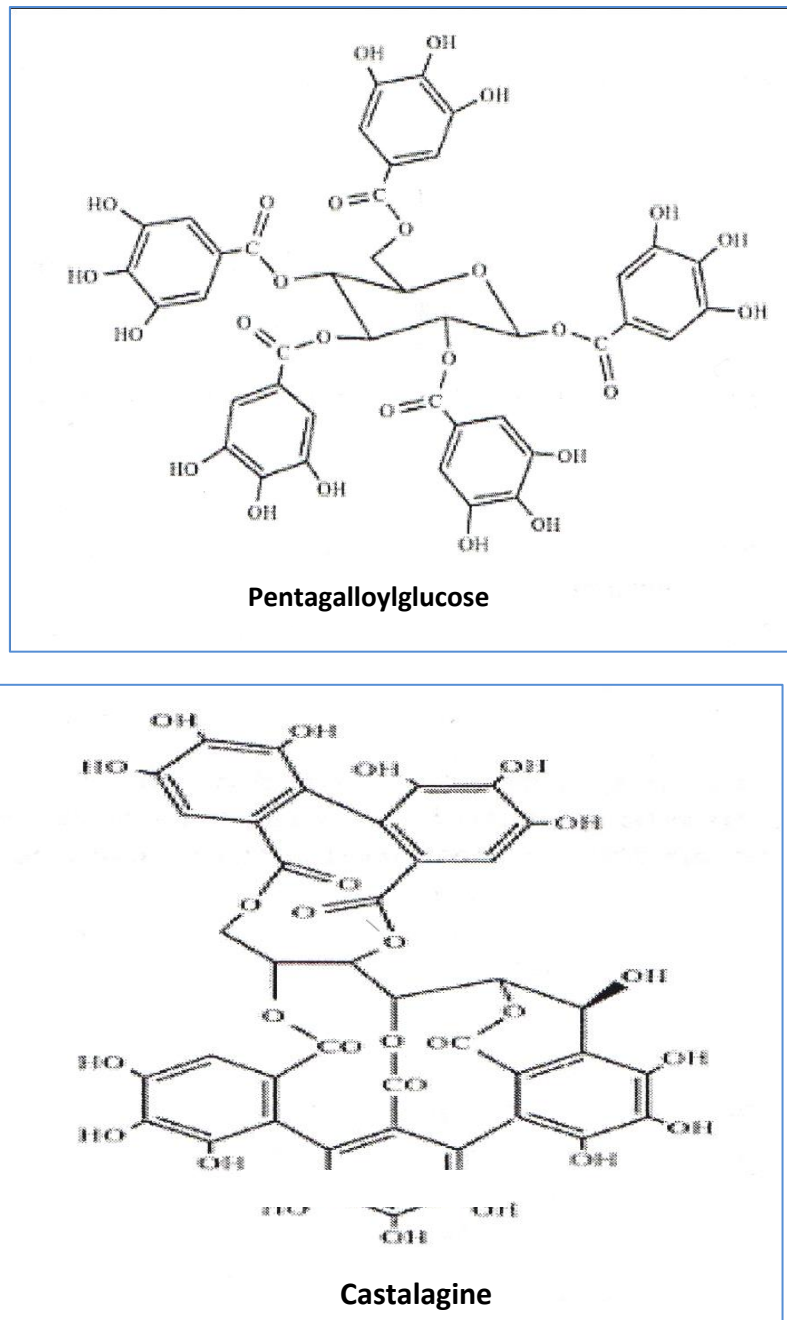


Figure 4: Deux exemples de tannins hydrolysables (Macheix et al., 2005).

B.2. Les tannins condensés.

Les tannins condensés sont des oligomères ou des polymères de flavane-3-ols (éventuellement de flavane-3,4-diols) dérivés de la catéchine ou de ses nombreux isomères. Contrairement aux tannins hydrolysables, ils sont résistants à l'hydrolyse et seules des attaques chimiques fortes permettent de les dégrader. Ainsi, par traitement acide à chaud, ils se transforment en pigments rouges et, pour cette raison, les formes dimères et oligomères sont dénommées « proanthocyanidines ». Les proanthocyanidines dimères présentent déjà

une affinité pour les protéines et des propriétés tannantes mais ces deux paramètres augmentent avec la taille moléculaire des polymères qui sont formés par adjonction de nouveaux monomères aux dimères initiaux. L'enchaînement des différentes unités constitutives se fait soit de manière linéaire grâce à des liaisons C-C soit par des ramifications grâce à des liaisons C-O-C conduisant à des structures de plus en plus complexes qui cependant solubles dans l'eau des vacuoles.

Les tannins condensés sont très abondants dans certains organes végétaux consommés ou utilisés par l'homme, par exemple de nombreux fruits (pomme, prune, fraise ...) ou des boissons fermentées ou non (thé, vin, cidre. On peut également trouver chez certains mutants de maïs des pigments rougeâtres ou phlobaphènes qui sont des formes polymérisées proches des tannins condensés mais qui dérivent dans ce cas de flavane-4-ols (Macheix et al., 2005).

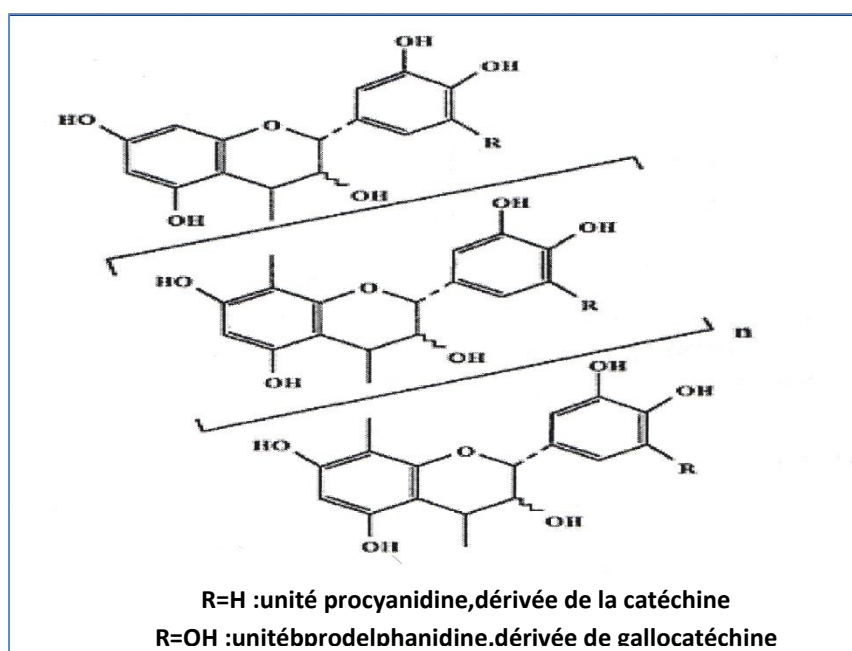


Figure 5: Exemple de structure d'un tannin condensé (Macheix et al., 2005).

I.2.1.2.3. Les acides phénoliques.

Trois catégories de corps entrent dans ce groupe: les acides benzoïques, les acides cinnamiques et les coumarines (Charnay et Tourmeau, 2006).

A. Les acides benzoïques.

Les acides benzoïques sont les plus connus, ils sont très répandus dans le règne végétal (Charnay et Tourmeau, 2006), leurs structures varient comme l'illustre la figure 6, suivant les hydroxylations et les méthylation sur le cycle phénolique aromatique (Collin et Crouzet, 2011).

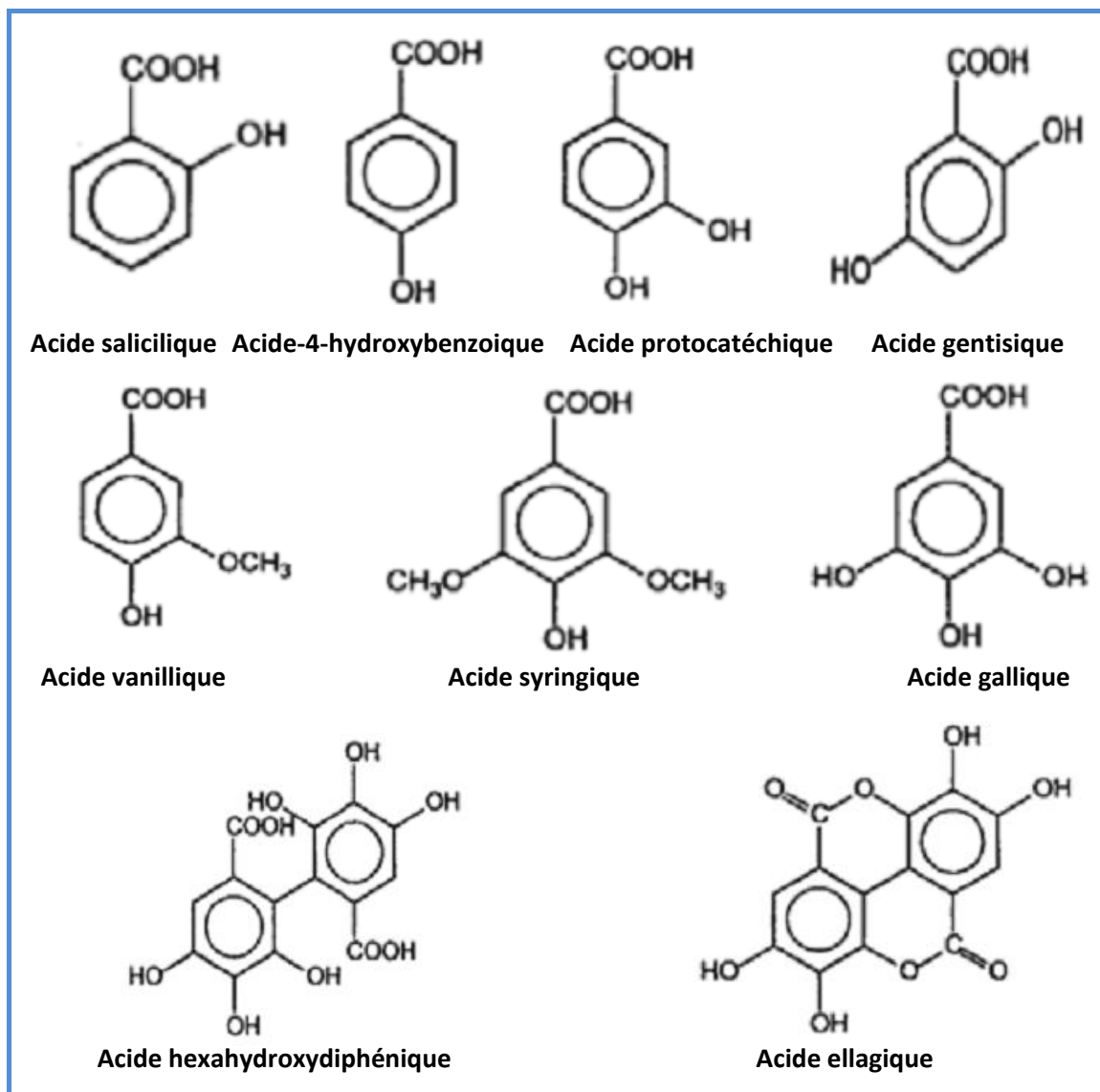
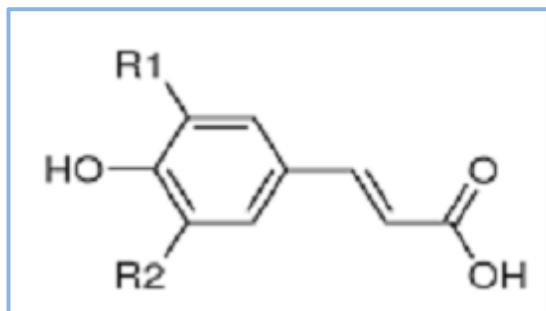


Figure 6: Exemples d'acides hydroxybenzoïques (Collin et Crouzet, 2011).

B. Les acides cinnamiques.

Les acides cinnamiques sont très répandus dans les végétaux, On signale en particulier: l'acide p-coumarique, l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide sinapique et l'acide 3, 4, 5 trihydroxycinnamique (Charnay et Tourmeau, 2006).



Acides hydroxycinnamiques	R ₁	R ₂
Acide p-coumarique	H	H
Acide caféique	OH	H
l'acide 3, 4,5trihydroxycinnamique	OH	OH
l'acide férulique	OCH ₃	H
l'acide sinapique	OCH ₃	OCH ₃

Figure 7 : Structures chimiques de quelques acides hydroxycinnamiques (C₆-C₃) (Collin et Crouzet, 2011).

C. Les coumarines (C₆-C₃).

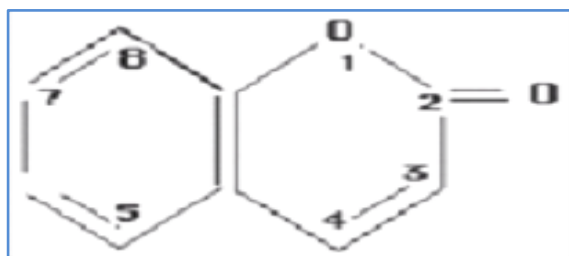
C.1. Définition.

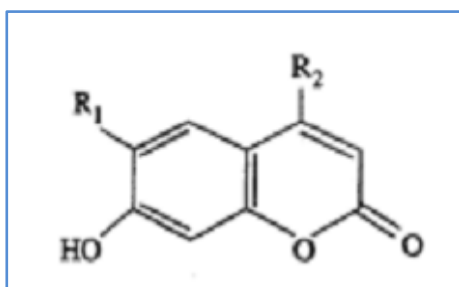
Coumarine vient de « coumarou », nom sud-américain de la graine du *Dipterix odorata* ou fève tonca, dont ce composé fut retiré pour la première fois. Elle a été retrouvée à l'état libre ou sous forme de glucoside de l'acide orthohydroxycinnamique chez divers végétaux.

Les coumarines sont des composés phénoliques non volatils, sont très répandues chez les végétaux, notamment dans les racines et les écorces; d'odeurs agréables, certaines servent en parfumerie ou pour aromatiser le tabac; d'autre sont très toxiques telles que les aflatoxines des champignons inférieurs (Garabeth et al., 2007).

C.2. Structure.

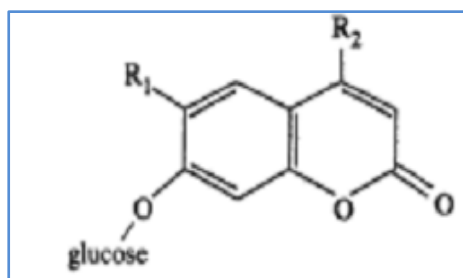
Les coumarines sont des composés hétérocycliques oxygénés dérivant des cétones (de l' α -pyrone). Il s'agit d'une lactone de l'acide orthohydroxycinnamique.





Coumarines	R ₁	R ₂
Umbelliférone (hydroxy-7-coumarine)	H	H
Aescullétine (hydroxy-6,7-coumarine)	OH	H
Scopolétine (hydroxy-7-méthoxy-6-coumarine)	OCH ₃	H
Méthyl-4-Umbelliférone	OH	OCH ₃

Figure 8: Structure chimique de coumarine benzo α -pyrone (Garabeth et al., 2007).



Coumarines	R ₁	R ₂
Skimmine (hydroxy-7-coumarine- β -D-monoglucoside)	H	H
Aesculine-dihydroxy-6,7-coumarine- β -D-monoglucoside	OH	H
Scopoline (hydroxy-7-méthoxy-6-coumarine- β -D-monoglucoside)	OCH ₃	H
Hydroxy-7-méthoxy-4-coumarine- β -D-monoglucoside	OH	OCH ₃

Figure 9 : Structure de quelques coumarines (Collin et Crouzet, 2011).

I.2.1.2.4. Les stilbènes (C₆-C₂-C₆).

Plus de 30 stilbènes et glucosides de stilbènes sont présents naturellement dans le règne végétal, la structure chimique de base des stilbènes est composée de deux cycles aromatiques joints par un pont méthylène comme l'illustre la figure 10, (Collin et Crouzet ,2011).

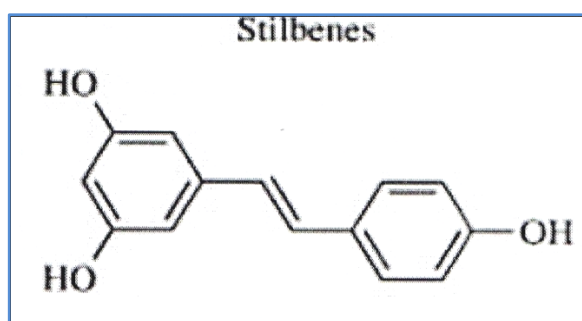


Figure 10: Structure de base des stilbènes (Neal et al., 2012).

I.2.1.2.5. Les lignanes (C₆-C₃)₂

Les lignanes proviennent de la composition initiale de deux molécules phénoliques de type monolignol comme l'alcool coniférilique. Diverses oxydations, réductions ou alkylations conduisent ensuite aux lignanes présents chez les végétaux (Macheix et al., 2005). Ils sont

très répandus dans les plantes, autant les gymnospermes que les angiospermes, mais plus fréquents dans les pinacées, les podophyllacées, les rutacées et les lauracées, ils sont moins abondants chez les Astéracées (Regnault-Roger, 2008).

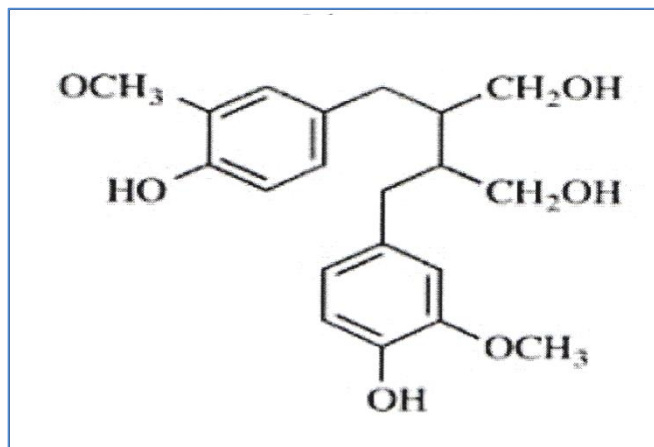


Figure 11: Structure de base des lignanes (Neal et al., 2012).

I.2.2. Les alcaloïdes.

I.2.2.1. Définition.

Un alcaloïde est un composé d'origine naturelle (le plus souvent végétal), azoté plus ou moins basique, de distribution restreinte et doué, à faible dose. L'appartenance aux alcaloïdes est confirmée par les réactions communes de précipitations avec les réactifs généraux des alcaloïdes (ex: réactif de Dragendorff) (Merghem, 2009).

Les alcaloïdes figurent parmi les principes actifs les plus importants en pharmacologie et en médecine. L'intérêt qu'on leur porte reposait traditionnellement sur leur action physiologique et psychologique et particulièrement violente chez l'homme (William, 2003).

I.2.2.2. Classification.

On distingue :

Les pseudo-alcaloïdes: Ne possèdent pas d'azote intra cyclique et l'incorporation de l'azote dans la structure se fait en phase finale: exemple la coniine.

Les proto-alcaloïdes: L'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique. Ils sont élaborés à partir d'acides aminés: exemples mescaline, hordénine, colchicine.

Les alcaloïdes vrais que l'on classe suivant de leur cycle. L'atome d'azote est inclus dans un hétérocycle; biosynthétiquement formés à partir d'acides aminés; possèdent une activité pharmacologique marquée (Merghem, 2009).

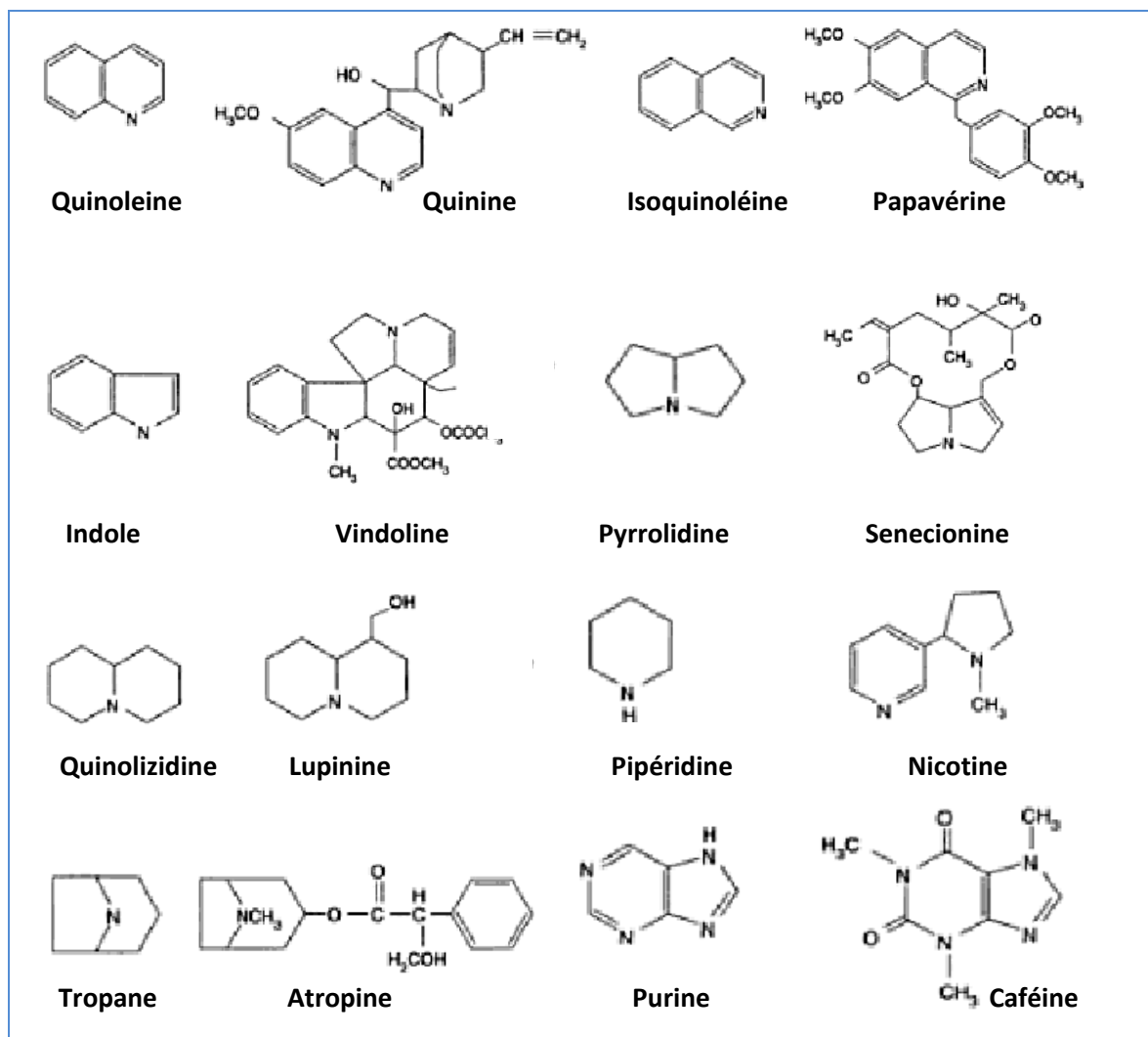


Figure 12: Classes et exemples d'alcoïdes (William, 2003).

II. Les huiles essentielles.

II.1.Définition.

Chaque fois qu'après avoir écrasé un pétale de fleur, une feuille, une branchette, ou une quelconque partie d'une plante, un parfum se dégage, cela signifie qu'une huile essentielle s'est libérée.

Les huiles essentielles appelées aussi essences, sont des mélanges des substances aromatiques produites par de nombreuses plantes et présentes sous forme de minuscules gouttelettes dans les feuilles, la peau des fruits, la résine, les branches, les bois. Elles sont présentes en petites quantités par rapport à la masse du végétal : elles sont odorantes et très volatiles, c'est-à-dire qu'elles s'évaporent rapidement dans l'air (Padrini et Lucheroni, 1996).

Selon L'Afnor (Association française de normalisation) : une huile essentielle est « un produit obtenu à partir d'une matière végétale par entraînement à la vapeur, procédés mécaniques ou distillation à sec » (Festy, 2012b; Grosjean, 2010).

II.2.Répartition systématique et localisation.

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs 500.000 plantes sur terre : 10.000 d'entre elles, environ, possèdent des propriétés médicinales (Bekheche et Abdelouahid, 2010).

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : fleurs (bergamotier, tubéreuse), mais aussi feuilles (citronnelle, eucalyptus...) bien que cela soit moins habituel dans les écorces (canalier), des bois (bois de rose), des racines (vétivier), des rhizomes (gingembre), des fruits (anis, badiane), des graines (muscade).

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structure, histologique spécialisées souvent localisées sur ou à la proximité de la surface de la plante : cellules à huiles essentielles des Lauraceae ou des Zingibéraceae, poils sécréteur des Lamiaceae, poches sécrétrices des Myrtaceae ou des Rutaceae, canaux sécréteurs des Apiaceae ou des Asteraceae (Bruneton, 1999).

Les principales familles végétales susceptibles de donner des huiles essentielles sont: les Abiétacées, les Cupressacées, les Lamiacées, les Myrtacées, les Lauracées, les Rutacée, les Ericacées, les Asteracées, les Poacées et les Rosacées (Milpied, 2009).

Tableau 1: Organes végétaux, sources d'huiles essentielles (Festy, 2011).

Huiles essentielles de ...	Extraite de ...
Ail, vanille	Gousses broyées
Oignon	Bulbes
Clou de girofle	Boutons séchés
Pin, sapin	Aiguilles
Cannelle	Ecorce, feuilles
Bois de rose, cade, cédre, épinette bois noire, genévrier, sassafras, santal	Bois
Angélique, livèche, vétivier	Racines
Myrrhe, galbanum	Gomme
Bouleau	Ecorce
Gingembre	Rhizome
Bergamote, bigarade, citron, mandarine, orange, pamplemousse	Ecorce, feuilles et zestes
Aneth, cardamome, carotte, carvi, céleri, coriandre, cumin, fenouil, pesil	Graines
Genièvre	Baies
Muscade, poivre, anis, cubébe	Fruits (épices)
Cajepout, petit grain, romarin	Tiges et feuilles
Cyprès	Branches et feuilles
Citronnelle, géranium	Plante entière non fleurie
Armoise, estragon, hysope, menthe, origan, sarriette, thym, verveine	Plante fleurie
Marjolaine, camomille allemande, sauge	Tiges fleuries
Eucalyptus, laurier noble, limon grasse, mélisse, Niaouli, thuya	Feuilles

II.3.Toxicité des composants des huiles essentielles.

Les huiles essentielles sont très riches en composés à spécificité intrinsèque. Les composants biochimiques des huiles essentielles qui définissent leurs caractéristiques exigent certaines précaution d'emploi, c'est par la synergie moléculaire des huiles essentielles véritables, c'est -à-dire non reconstituées synthétiquement, que la toxicité de ces molécules s'avère toute relative car les effets des uns compensent et équilibrent les effets des autres.

-Toxicité des phénols: elles sont dermatotoxiques et hépatotoxiques. Elles brûlent la peau et détruisent les cellules hépatiques. En cas d'utilisation, elles doivent toujours être accompagnées d'un protecteur hépatique tel que le chardon marie, l'artichaut, le desmodium ou le curcuma.

-Toxicité des cétones: elles sont neurotoxiques épilptisantes car elles détruisent les graines de myéline. Leur toxicité se manifeste par effet cumulatif, elles sont abortives. Elles sont très toxiques par voie orale. Toutefois leur toxicité décroît par voie anale et vaginale.

-**Toxicité des lactones:** comme les cétones elles sont neurotoxiques par voie orale. De plus elles sont irritantes par voie cutanée.

-**Toxicité des terpènes:** elles sont irritantes pour la peau et néphrotoxiques.

-**Toxicité des aldéhydes:** elles sont irritantes pour la peau et les muqueuses (Hilant et al., 2009).

II.4.Caractéristiques physico-chimiques.

II.4.1.propriétés physiques.

Selon (Brunton, 1999; Bekheche et Abdelouahid, 2010; Catier et Roux, 2007), Les huiles essentielles possèdent en commun un certain nombre de propriétés malgré leurs différences de constitution:

- Elles sont généralement liquides à température ordinaire;
- Elles sont volatiles et entraînable à la vapeur d'eau;
- Elles sont solubles dans l'alcool, l'éther, le chloroforme, les huiles fixes, les émulsifiant et dans la plupart des solvants organiques;
- Elles sont peut solubles dans l'eau mais lui communiquent leur odeur; Leur point d'ébullition varie de 160 à 240 C°;
- Leur densité est en général inférieure de l'eau, elle varie de 0,75 à 0,99 (les huiles essentielles de girofle ou de cannelle constituent des exceptions);
- Elles ont un indice de réfraction élevé.
- Elles dissolvent les graisses, l'iode, le soufre, le phosphore et réduisent certains sels;
- Elles sont très altérables et sensibles à l'oxydation;
- Elles sont généralement incolores ou jaunes pales, il existe, cependant, quelques exceptions, exemple: huiles essentielles à azulène de coloration bleue ;
- Ce sont des produits stimulants, employés à l'intérieur, comme à l'extérieur du corps, quelque fois purs, généralement en dissolution dans l'alcool ou un solvant adapté.

II.4.2.Composition chimique.

La détermination de la composition chimique a intéressée de nombreux chercheurs, les méthodes d'analyse chimique de plus en plus sophistiquées ont permis d'identifier un très grand nombre de constituants des huiles essentielles (Bekheche et Abdelouahid, 2010).

Les constituants des huiles essentielles appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogéniques distinctes: le groupe des terpènes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents. Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils (Bruenton, 1999).

II.4.2.1. Les composés terpéniques (C_5H_8)_n.

Le nom terpène vient à l'origine de la térébenthine, l'huile volatile des pins qui est utilisée pour la peinture à l'huile et dont le constituant principal est l' α -pinène. Ce terme a été utilisé de façon plutôt imprécise pour tous les composés huileux volatils insolubles dans l'eau et ayant en général une odeur de résine végétale. Les huiles distillées à partir des plantes, qui contiennent souvent des produits parfumés et odorants et qui sont appelées huiles essentielles, contiennent également des terpènes (Clayden et al., 2002). La caractéristique chimique commune aux terpènes réside dans leurs structures: ce sont des multiples d'une unité de cinq atomes ayant pour base un diène conjugué dont le nom commun est isoprène (Johnson, 2003).

Selon le nombre d'entités isoprène les terpènes sont subdivisés en hemiterpènes, monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes, triterpènes, tetraterpènes et polyterpènes comme il désigne le tableau 2 (Vollhardt, 2004).

Tableau 2: Classification des terpènes (Rebstein et Soerensen, 2011).

Classe	Nombre d'atomes de (C)	Nombre d'unités isoprène
Hémiterpènes	5	1
monoterpènes	10	2
sesquiterpènes	15	3
diterpènes	20	4
triterpènes	30	6
tétraterpènes	40	8
polyterpènes	>500	>100

Dans le cas des huiles essentielles, seuls seront rencontrés les terpènes les plus volatils : mono et sesquiterpènes (Bekheche et Abdelouahid, 2010).

II.4.2.1.1. Les monoterpènes.

Les monoterpènes présentent des structures relativement simples et sont généralement très volatils, sont les principaux constituants des huiles essentielles (représentent plus de 90%). En raison du faible nombre de carbones et du nombre restreint de combinaisons des liaisons (Collet, 2002), ils sont issus du couplage de deux unités d'isoprène (C₁₀), les variations structurales justifient l'existence de nombreuses molécules : alcool, phénols, aldéhydes, cétone, esters, éthers (Bruenton, 1999; Bekheche et Abdelouahid, 2010; Bakkali et al., 2008).

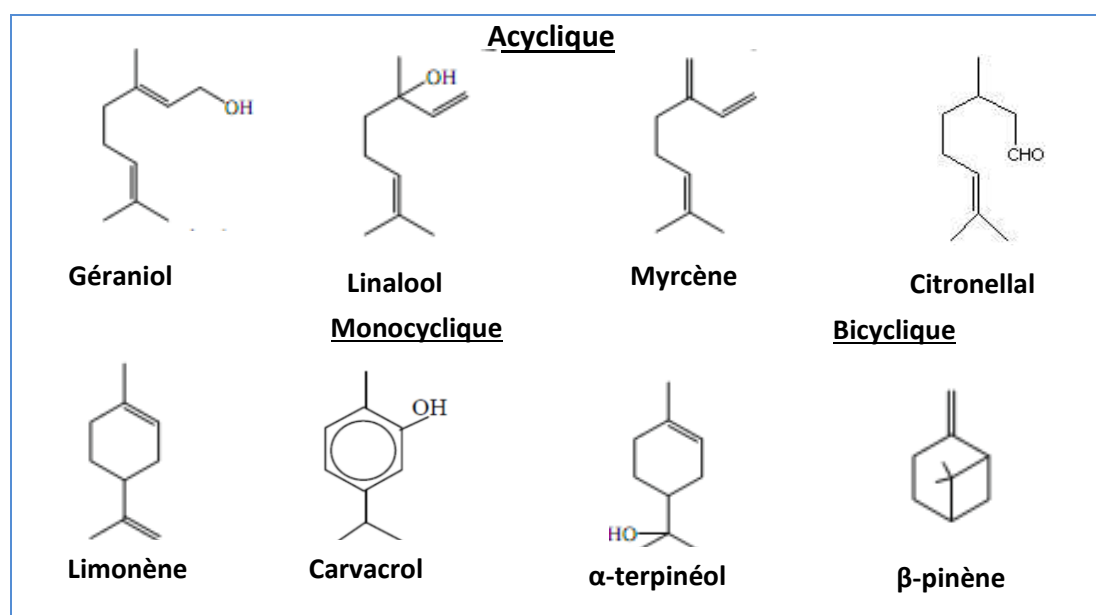


Figure 13: Structures chimiques de quelques composés monoterpéniques (Benchouhra et al., 2011; Degenhardt et al., 2009).

II.4.2.1.2. Les sesquiterpènes.

Les sesquiterpènes sont l'objet de nombreuses cyclisations, de réarrangements, d'oxydation conduisant à un très grand nombre de structures. Celles-ci peuvent se présenter sous forme de lactones (Milpied, 2009).

Les lactones sesquiterpéniques sont surtout connus chez les Asteraceae (où ces lactones sont diversifiées et utiles pour la taxonomie), mais on les trouve aussi dans quelques autres familles, comme les Apiaceae, les Magnoliaceae et les Lauraceae (Judd et al., 2002).

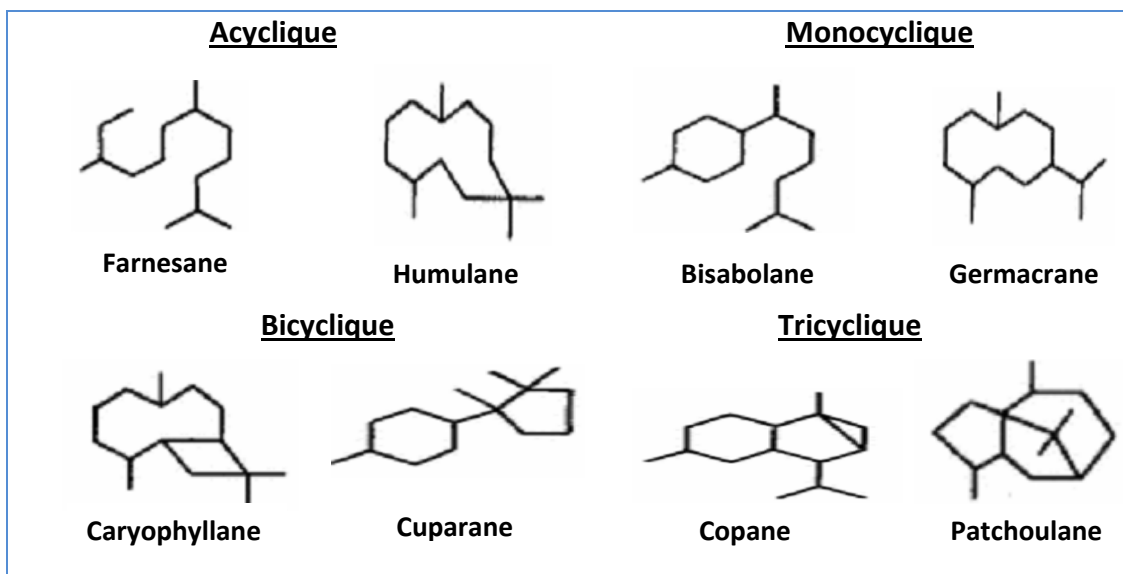


Figure 14 : Structures chimiques de quelques composés sesquiterpéniques (Sorm, 1961).

II.4.2.1.3. La biogenèse des terpènes.

Malgré leur diversité, tous les terpènes ainsi que leurs diversités, possèdent en commun une voie de biosynthèse appelée, voie de l'acide mévalonate.

En raison de l'importance considérable des composés terpéniques, la voie de l'acide mévalonique est un aspect du métabolisme végétal qui mérite une attention particulière. Les composés et les dérivés terpéniques peuvent être considérés en tant que polymères du 5-carbone, 2-méthyl-1,3-butadiène ou **isoprène**.

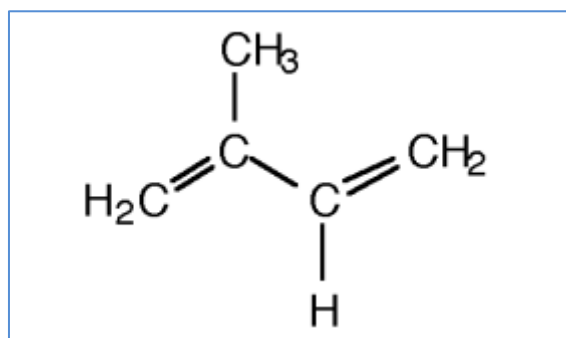


Figure 15: Structure de 2-méthyl-1,3-butadiène (isoprène) (Lamarti et al., 1994).

Par conséquent les composés terpéniques sont souvent désignés par le terme de composés isopréniques. Les plantes produisent de grandes quantités d'isoprène et comme il est volatil, elles en émettent des quantités importantes dans l'atmosphère où il contribue à la pollution de l'air. Il est particulièrement responsable de la brume qui s'accroche au-dessus des Blue Ridge Mountains et des Blue Mountains d'Australie (Johnson, 2002). En fait les

unités qui constituent les composés terpéniques ne sont cependant pas de vrais isoprènes, mais de dérivés phosphorylés appelés (**isopentényl- diphosphate** ou « isoprène actif ») et son isomère (**diméthylallyldiphosphate**) (Hopkins ,2003).

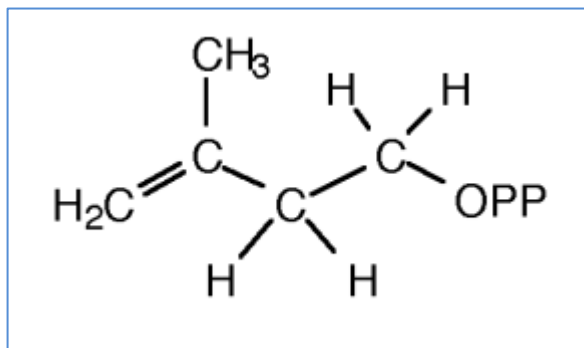


Figure 16 : Structure de diphosphate d'isopentényle (isoprène actif) (Lamarti et al., 1994).

La transformation de l'isopentényl diphosphate (IPP) en terpène débute par une isomérisation en diméthylallyldiphosphate (aussi nommé diméthylallyl pyrophosphate ou DMAPP). Ces deux molécules à cinq atomes de carbones se combinent ensuite pour former un produit en C10, le géranyldiphosphate (GPP). Ce dernier peut réagir avec une nouvelle molécule d'IPP pour conduire au farnésyldiphosphate (FPP) en C15 et ainsi de suite jusqu'à C25. Les triterpènes (C30) et les tétraterpènes (C40) sont synthétisés par dimérisation d'unités en C15 ou en C20 respectivement (McMurry et Begley, 2006).

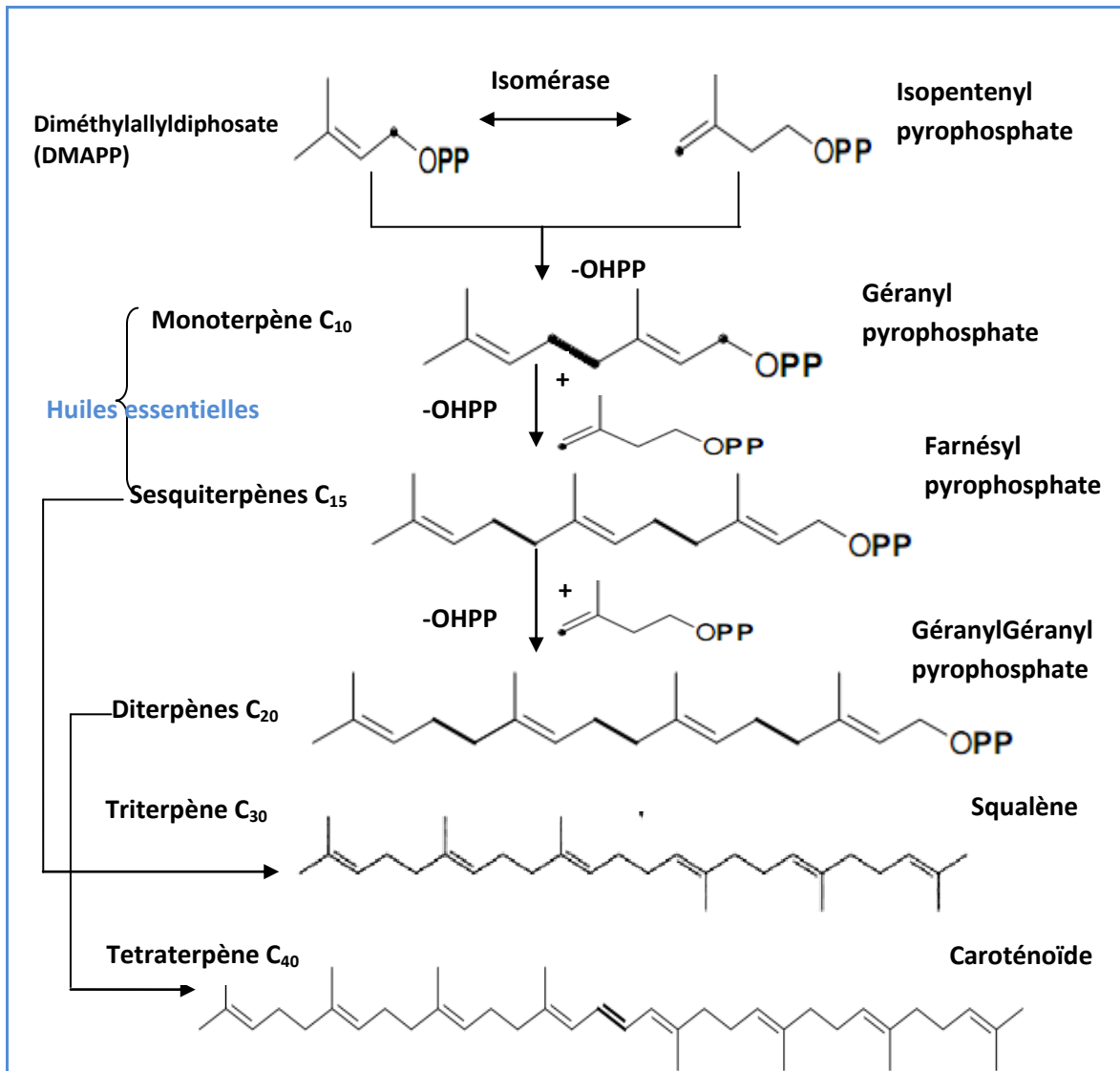


Figure 17: Vue d'ensemble de la synthèse des terpènes à partir de l'isopentényldiphosphate (McMurry et Begley , 2006; Breitmaier, 2006; Breitmaier, 1999).

II.4.2.2. Les composés aromatiques.

Les composés aromatiques sont des composés biosynthétisés à partir de l'acide shikimique (isolé la première fois du *shikimi* ou *illicium anisatum* ou badiane japonaise) qui donnent des dérivés du phénylpropane (C₆-C₃) (Milpied, 2009). Ils sont moins fréquents que les terpénoïdes. Ce sont très souvent des allyles- et des propénylphénols, parfois des aldéhydes (Bruenton, 1999; Bekheche et Abdelouahid, 2010; Catier et Roux, 2007).

II.4.2.3. Les composés divers.

Lors de la distillation ,certains composés aliphatiques sont entrainés par exemple, Eugenol, Isoeugenol, Safrol methylchavicol (**PHENOLS**), Aldehyde benzoïque, Aldehyde anisique, Aldehyde cinnamique (**ALDEHYDES**),Camphre, Carvone, Pulegone (**CETONES**), Acide benzoïque, Acide cinnamique ,Acide Salicylique, Acide cumique (**ACIDES**), Acetate de cinnalyle, Geranyle ,Benzoate de benzyle, Cinnamate de benzyle (**ESTERS**), Menthol, Geraniol, Santalol, Citronnellol (**ALCOOLS**) (Machado, 2009).

II.4.2.4. Facteurs influençant la composition chimique.

La composition d'une plante en HE va être variable en fonction de très nombreux facteurs parmi lesquels ,la localisation de la plante, les conditions de culture et d'ensoleillement, le sol et les conditions de distillation et conservation de l'HE , il n'est pas rare de constater des variations qualitatives et quantitatives importantes en fonction de ces critères (Petitet, 2012).

II.5. Méthodes d'extraction.

Depuis les temps les plus reculés, les hommes se sont ingéniés à trouver des techniques d'extraction des essences des plantes afin de pouvoir les utiliser pour en faire des médicaments ,des cosmétiques et des parfums (Padrini et Lucheroni, 1996).

L'extraction des huiles essentielles est une opération capitale qui doit permettre d'obtenir des produits volatils, particulièrement fragiles, sans en altérer la qualité (Chaumont et al., 2008).

Le choix du type d'extraction doit permettre de :

Retirer des végétaux des essences aromatiques avec le rendement le plus élevé. Conserver aussi intact que possible les parfums les plus délicats (Bekheche et Abdelouahid, 2010).

II.5.1. Distillation.

La distillation est de loin le procédé le plus répandu, car il convient à la majorité des plantes .les huiles essentielles sont insolubles dans l'eau (ce sont des huiles !).En revanche la vapeur d'eau que l'on projette sur la plante se charge au passage des huiles dans un appareil spécial, la vapeur d'eau ainsi lestée de ces essences est envoyée dans un compartiment pour y refroidir .Là, la vapeur redevient donc liquide et les huiles sont désolidarisent (elles flottent à la surface).On les récupère alors par décantation (Festy, 2008,2011).

Selon (Bekheche et Abdelouahid, 2010), Il existe trois grands modes de distillation: Hydrodistillation, Entraînement à la vapeur d'eau et hydrodiffusion.

II.5.1.1.Hydrodistillation.

L'hydrodistillation c'est la technique la plus utilisée pour la production d'huile essentielle et elle reste sans doute la plus rentable. Le procédé correspond à une distillation hétérogène, et consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition, généralement à pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement du lieu de sécrétion et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau un mélange azéotropique. Les vapeurs hétérogènes sont condensées urface froide sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité (Bruneton, 1999; Ferhat et al., 2010 ; Bekheche et Abdelouahid, 2010).

II.5.1.2.Entraînement à la vapeur d'eau.

Les plantes entières, ou broyées lorsqu'il s'agit d'organes durs (racine, écorce), sont disposées dans un alambic traversé par un courant de vapeur d'eau (Chaumont et al., 2008 ; Catier et Roux, 2007).l'eau se transforme en vapeur qui, sous basse pression, traverse alors la cuve remplie de plantes aromatiques. La vapeur d'eau, qui a volatilisé et entraîné l'huile essentielle, se condense ensuite dans le serpentín du réfrigérant. A la sortie de l'alambic, un essencier autrefois nommé « vaste florentin » permet de séparer l'eau de distillation, nommée eau florale ou hydrolat du principe aromatique et nommé l'huile essentielle (Lemesle ,2011 ; Chaumont et al., 2008) grâce à la différence de densité des deux liquides. La plupart des huiles essentielles plus légères que l'eau flottent à sa surface. L'ydrolat renferme les composés aromatiques les plus hydrophiles des huiles essentielles correspondantes, en quantité inférieure à 5%. La distillation doit être complète pour que l'on récupère tous les constituants aromatiques de l'huile essentielle, ce qui implique souvent une durée relativement longue, variable selon les organes distillés (de 1 à 24 heures avec, éventuellement, un arrêt intermédiaire (Chaumont et al., 2008).

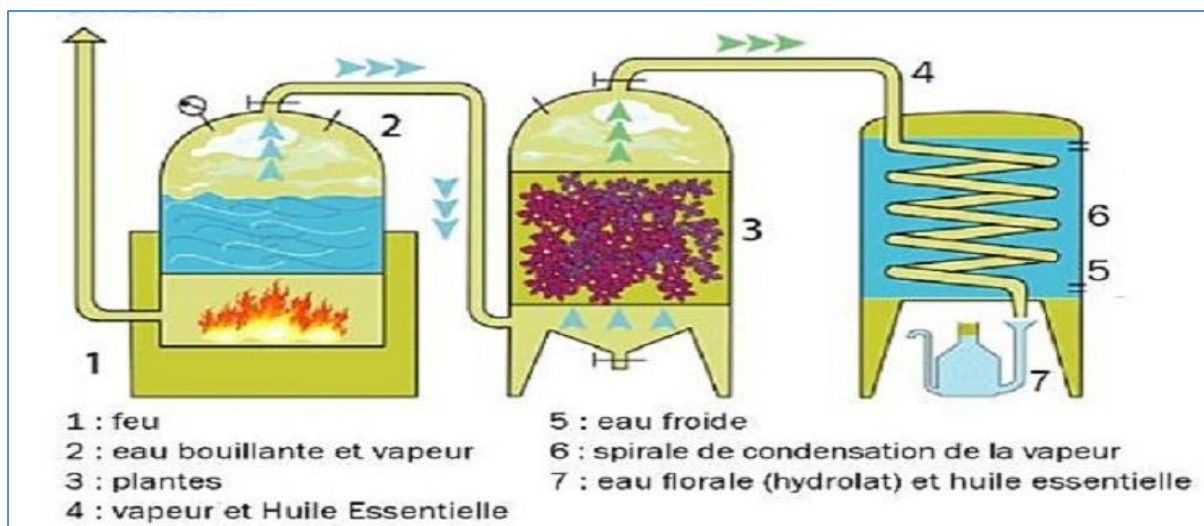


Figure 18: Schéma d'un appareil de distillation des huiles essentielles par l'entraînement à la vapeur d'eau (Bouffers, 2005; Chaumont et al., 2008).

II.5.1.3. Hydrodiffusion.

L'hydrodiffusion est utilisée par certains producteurs. Le principe de l'extraction est basé sur l'action descendante d'un flux de vapeur qui traverse le végétal, ce qui permet globalement un gain de temps d'extraction, et donc une économie d'énergie par rapport à la technique précédente où le courant de vapeur est ascendant (Sutour, 2010). Cette technique par l'entraînement à la vapeur d'eau présente différents avantages. On peut recueillir les essences de manière fractionnée en récupérant et séparant régulièrement les huiles essentielles pendant l'extraction. Ceci est très important pour les huiles essentielles ayant une valeur marchande différente selon qu'elles proviennent du début ou de la fin de la distillation (Ferhat et al., 2010).

II.5.2. L'expression.

Technique consiste comme son nom l'indique : à presser la partie de la plante concernée pour en récupérer les essences .c'est exactement ce que vous faites lorsque vous presser entre vos doigts une épiluchure de clémentine ou d'orange, de mandarine. . .) (Festy, 2008). Elle est réservée aux fruits de la famille de Rutaceae (Hespéridées: citron, orange, bergamote. . .); cette technique fait généralement appel à un procédé mécanique sans chauffage (pressage, abrasion...) qui provoque l'éclatement des poches à essence et implique l'expression de l'huile essentielle du péricarpe (ou zeste), suivie d'une séparation par un procédé physique (Aiache et al., 2011). Cette technique limite l'oxydation car elle conserve les antioxydants naturels contenus dans la fraction non volatile de l'essence. Le

produit ainsi obtenu porte le nom d'essence (car il n'a subi aucune modification chimique) (Chaumont et al., 2008).

II.5.3.Extraction par des solvants.

Technique consiste à dissoudre les essences dans un solvant volatile (et non dans l'eau). Le résultat s'appelle « l'absolue », presque similaire à l'huile essentielle (Festy, 2008). Les solvants de l'extraction peuvent être des solvants usuels utilisés en chimie organique (hexane, éther de pétrole) mais aussi des graisses, des huiles (absorption des composés volatils lipophiles par des corps gras) ou même encore des gaz. Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras et bien d'autres (Piochon, 2008).

II.6.4.Extraction par fluide supercritique.

La technique se base sur la solubilité des constituants dans le CO₂ et de son état physique, grâce à cette propriété, il permet l'extraction dans le domaine supercritique et la séparation dans le domaine gazeux. Le CO₂ est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie, ensuite il est injecté dans l'extracteur contenant le matériel végétal, après le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant (Benayed, 2008). En général, l'efficacité de l'extraction augmente avec la pression et à la température, à condition que la pression est supérieure à 345 bar (Hierro et Santa-María, 1992).

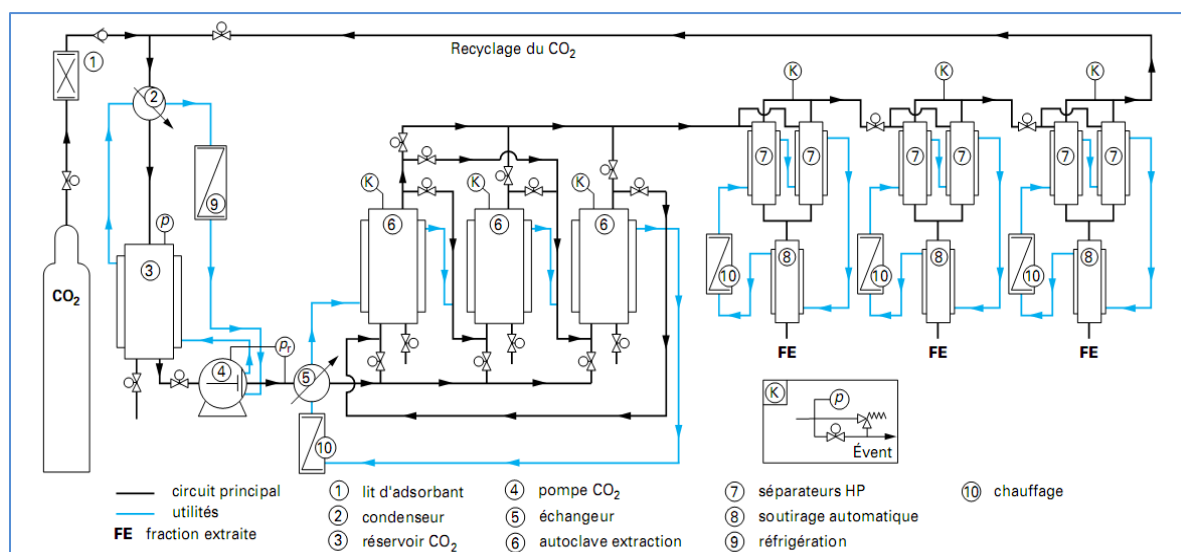


Figure 19: Schéma de procédé d'une unité d'extraction par CO₂ (Perrut, 1999).

II.5.5.Extraction par micro-ondes.

Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation. Ce procédé permet un gain de temps (temps d'extraction divisé par 5 à 10) et d'énergie (température plus basse) considérable. La composition de l'huile essentielle obtenue par ce procédé est bien souvent semblable à celle obtenue avec un procédé d'entraînement à la vapeur traditionnel. Toutefois, une plus grande proportion de composés oxygénés est généralement observée dans les huiles essentielles extraites par micro-ondes. Ceci est dû à la faible quantité d'eau présente dans le système et à la rapidité du processus de chauffage. Ainsi, les dégradations thermiques et hydrolytiques des composés oxygénés sont limitées. Cette technique présente donc beaucoup d'avantages: technologie verte, économie d'énergie et de temps, investissement initial réduit et dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées (Piochon, 2008).

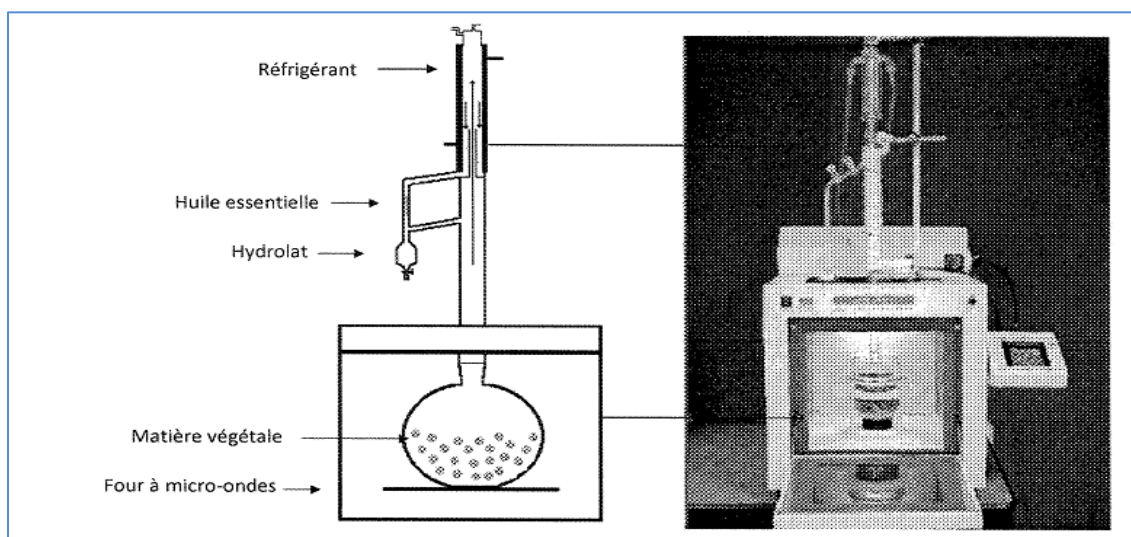


Figure 20: Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes (Piochon, 2008).

II.6.Méthodes d'identification chimiques.

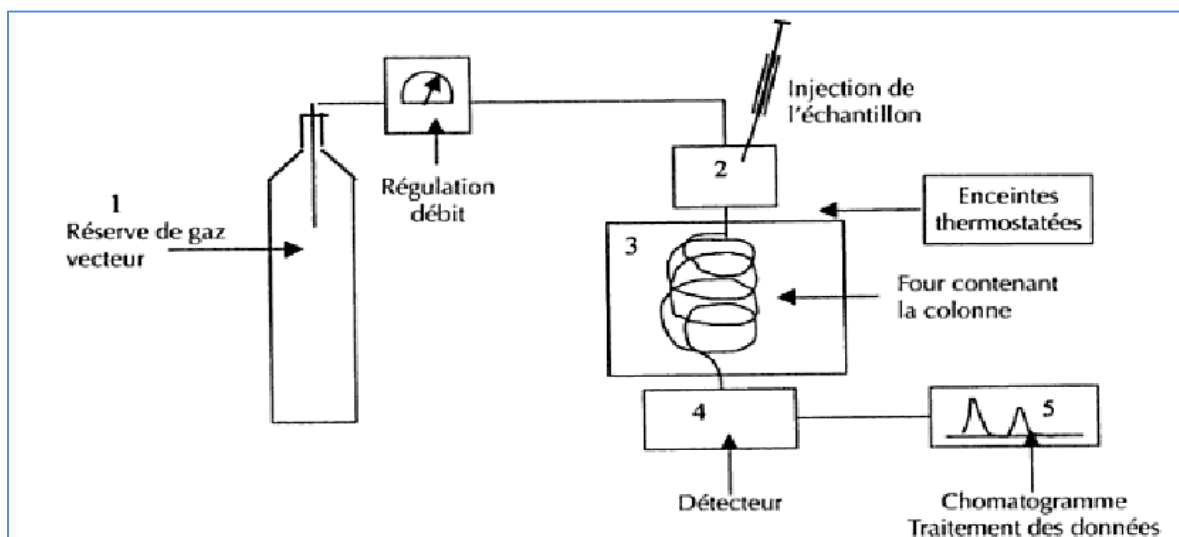
II.6.1.La chromatographie en phase gazeuse.

La CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. C'est la technique de séparation la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles, car elle

permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme. Les progrès technologiques réalisés dans le domaine des colonnes capillaires, des phases stationnaires et des détecteurs (FID) ont contribué à rendre la CPG incontournable pour l'analyse des huiles essentielles. Chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcanes ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts) ou en programmation de température (indices de rétention). Les temps de rétention, bien que spécifiques d'un composé, ont tendance à varier d'une analyse à l'autre, notamment du fait du vieillissement des colonnes.

Les indices de rétention polaire ($I_r p$) et apolaire ($I_r a$) sont comparés à ceux d'échantillons authentiques contenus dans des bibliothèques de référence élaborées au laboratoire, dans des bibliothèques commerciales ou répertoriés dans la littérature.

Cependant, une reproductibilité parfaite des indices de rétention est difficile à obtenir et ne peut être observée que sur des chromatogrammes réalisés sur une période courte avec des conditions expérimentales rigoureusement identiques. Les variations les plus importantes sont observées lorsqu'on compare les indices de rétention obtenus au laboratoire avec ceux de la littérature (Paolini, 2005).



Figures 23: Schéma d'une chromatographie en phase gazeuse (Vaubourdolle et Schore, 2005).

II.6.2. La spectrométrie de masse.

Quand des échantillons, même purs ne comportant qu'un seul constituant, sont introduits directement, les résultats peuvent rarement être considérés comme quantitatifs,

quel que soit le modèle de spectrométrie de masse utilisé. Cela est dû à la forte sensibilité de la technique (généralement quelque microgramme suffisent) et au fait que certaines sources d'ions n'ont pas toujours un rendement d'ionisation constant. Il s'avère donc que la spectrométrie de masse est surtout a priori une technique puissante d'identification des substances. Néanmoins, si l'on place un spectrométrie de masse en sortie d'un appareil de chromatographie en phase gazeuse (CPG) ou de chromatographie en phase liquide à haute performances (CLHP), par exemple, il fonctionne en tant que détecteur chromatographique. Des analyses quantitatives sont alors possibles lorsqu'on introduit dans le spectromètre de masse des quantités faibles mais reproductibles d'échantillons, à mesure qu'elles sortent la colonne (Mendham et al., 2005).

II.6.3. Couplage CPG/MS.

L'intérêt de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS) en analyse métabiologique repose à la fois sur sa sensibilité, sa robustesse et sur l'existence de bases de données regroupant plus de 100 000 composés (celle du *National Institute of Standards and Technology*, par exemple) facilitant le travail d'identification.

Cependant l'analyse par GC/MS nécessite une étape de modification chimique afin de rendre les molécules volatiles et n'est pas applicable aux composés thermolabiles. Par ailleurs, le couplage GC/MS repose sur l'utilisation de sources à impact électronique, qui souvent ne permettent pas d'observer la masse du composé intact, mais seulement des ions issus de sa fragmentation, ce qui rend délicate toute identification de composés inconnus, ou non décrits dans les bases de données. Tous ces éléments ont justifié le développement de méthodes de couplages entre la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse (Garnier et al., 2009).

II.7. Propriétés.

Les huiles essentielles ont de nombreuses propriétés : antiseptiques (contre les infections), anti-inflammatoires (pour les tissus soumis à une réaction inflammatoire due à une défense immunitaire), antihistaminique (contre les réactions allergiques), circulatoires (pour l'aide à la circulation du sang), antihématomes (contre les coups), cicatrisantes (pour les plaies), antalgiques (contre la douleur), relaxantes...etc. (Amand et Langlois, 2009).

L'activité biologique d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et à leurs effets synergiques (Zhiri, 2006).

Tableau 3 : Activité biologique de l'huile essentielle selon sa composition chimique (Festy, 2012).

Les composés...	Ça sert quoi ?	On les trouve par exemple dans quelles huiles essentielles ?
Phénols	Les plus puissants antibactériens, antiviraux, antifongique, antiparasitaires, immunostimulants. Tuent les virus, les moisissures et les germes, Toniques, stimulants.	Giroflier, thym à thymol, sarriette, origan compact, cannelles (feuilles).
Alcools	Antidouleur, neuromodulateurs, Antispasmodiques, Tuent les virus, les moisissures.	Thym à linalol, à thujanol, Bois de rose, bois de hôte, palma rosa, arbre à thé, lavande.
Aldéhydes aromatiques	Super-anti-infectieux, Toniques, Immunostimulants.	Cannelles (écorces).
Aldéhydes terpéniques	Très anti-inflammatoires, insectifuges, anti-infectieux, sédatifs, nerveux,	Verveine citronnée, Mélisse, officinale, eucalyptus citronné, citronnelle.
Cétones	Mucolytiques gynécologiques et respiratoires, Brûle graisses, désclérosantes, antivirales.	Menthe poivrée, romarin à verbénone, thuya, sauge officinale, eucalyptus à cryptone.
Esters	Super-antistress, favorisent le sommeil. Antispasmodiques nerveux, anti-inflammatoires, antidouleur. Non toxiques.	Lavande vraie, ylang-ylang, camomille romaine, gaulthérie couchée.
Ethers -Phénol méthyl-éthers -Anéthol	Super-antispasmodiques nerveux et musculaires, antidouleur, antiallergiques.	Estragon, basilic. Anis vert, fenouil.
Oxydes terpéniques	Super-antispasmodiques nerveux. Assainissent l'air ambiant et soignent les voies respiratoires (maladies de l'hiver), plutôt tonifiants, expectorants, immunomodulants.	Eucalyptus radié, eucalyptus globuleux, laurier noble, niaouli, romarin à cinéole, ravintsara.
Terpènes	Super-tonifiants, expectorants, balsamiques (aident à respirer), assainissant de l'air ambiant.	Pins, sapins, genévrier, cyprès, tous agrumes, (citron, orange, mandarine, pamplemousse...).

II.7.1. Activité antimicrobienne.

Des études récentes ont montré que les huiles essentielles et leurs constituants présentes un potentiel important en tant qu'agent antimicrobiens et dans plusieurs domaines industriels et médicaux (Amarti et al., 2008).

La plus spécifique des propriétés des huiles essentielles est celle qui concerne l'amplitude du spectre antimicrobien vis-à-vis des virus, des mycoplasmes et chlamydiae, des bactéries, des champignons y compris leurs spores, les protozoaires, les mites et les insectes.

Il a été spécifiquement noté la forte activité sur les champignons filamenteux, les protozoaires et les mites en comparaison de celle qui est exercée vis-à-vis des bactéries et des levures (Inoye et Abe, 2007).

- **Les actifs antibactériens.**

Lorsque l'on parle d'activité antimicrobienne, on distingue deux sortes d'effets : une activité létale ou bactéricide et une inhibition de la croissance ou activité bactériostatique le plus souvent l'action des huiles essentielles est assimilée à un effet bactériostatique. Cependant, certains de leurs constituants chimiques semblent avoir des propriétés bactéricides.

Les composés avec la plus grande efficacité antibactérienne et le plus large spectre sont des phénols: thymol, carvacrol et eugénol. Les alcools avec 10 atomes de carbone (ou monoterpénols) viennent immédiatement après les phénols, en terme d'activité, avec les géraniol, linalool, thujanol, myrcénol, terpinéol, menthol et pipéritol pour les plus connus, molécules à large spectre, elles sont utiles dans de nombreuses infections bactériennes. Les aldéhydes sont également quelque peu bactéricides. Les plus couramment utilisés sont le néral et le géraniol (des citrals), le citronnellal et le cuminal (Zhiri, 2006).

Plusieurs huiles essentielles présentent un pouvoir antibactérien élevé : Origan d'Espagne, Thym (*Thymus vulgaris*), Cannelle (*Cinnamomum zeylanicum*), sarriette (*Satureia montana*), girofle (*Eugenia caryophyllata*), par rapport au d'autre qui ont une activité moyenne: Pin (*Pinus sylvestris*), Cajeput (*Mélaleuca leucadendron*), Eucalyptus (*Eucalyptus globulus*), Lavande (*Lavandula officinalis*), Myrthe (*Myrtus communis*), Géranium rosat (*Pelargonium graveolens*) (Kaloustian et al., 2008).

- **Les actifs antifongiques.**

Les groupes moléculaires avec les plus puissantes actions antibactériennes sont également des antifongiques efficaces mais ils doivent être utilisés sur de plus longues périodes. Des études fondamentales ont également montré que les alcools et les lactones sesquiterpéniques avaient une activité antifongique (Zhiri, 2006).

II.7.1.1.Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne.

Des nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, chaque méthode est basée sur tel principe.

II.7.1.1.1.Aromatogramme.

L'aromatogramme est une méthode inspirée de l'antibiogramme qui permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance des huiles essentielles par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque de cellulose imprégné d'huile essentielle. Une suspension de chaque germe est préparée en eau distillée stérile. Chaque suspension est étalée sur une boîte de pétri. La surface des boîtes est séchée sous haute à flux laminaire avec le couvercle des boîtes légèrement ouvert. Des disques de papier buvard stériles sont ensuite déposés sur les géloses. Ils sont imprégnés d'huile essentielle. La lecture des diamètres d'inhibition D se fait après 24h d'incubation à l'étuve à 37°C. Les résultats sont exprimés selon trois niveaux d'activité : résistant ($D < 6\text{mm}$), intermédiaire ($6\text{ mm} < D < 13\text{ mm}$) et sensible ($D > 13\text{mm}$) (De Billerbeck, 2003).

II.7.1.1.2.Méthode de diffusion en puits.

Méthode proposée par Cooper et Woodman en 1946 et reprise par Shroeder et Messing en 1949, Elle assure une diffusion radiale de l'HE à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire facilement mesurable. La méthode consiste à découper un trou circulaire dans la gélose et y verser une solution de l'HE de concentration connue. L'HE diffuse radialement en donnant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablement ensemencée avec la suspension bactérienne (Eymard, 2003).

II.7.1.1.3.Méthode de dilution.

La méthode de dilution ou méthode de Kirby-Bauer 1960 c'est une méthode consiste à préparer une série de tubes de bouillon Mueller-Hinton contenant des concentrations d'huile essentielle connues et on inocule avec une population de l'organisme à tester. La concentration la plus faible de l'huile essentielle inhibant toute croissance visible à l'œil nu après 16 à 20 heures d'incubation à 37°C est la concentration minimale inhibitrice notée CMI.

On détermine la concentration minimale bactéricide ou CMB en ensemencant un échantillon des tubes ne présentant pas de croissance sur la gélose de Mueller-Hinton. La

concentration d'huile essentielle la plus faible à laquelle 99,99% des bactéries sont tuées, après 24 heures d'incubation à 37°C correspond à la CMB (Bassole et al., 2001).

II.7.1.1.4.Méthode en micro-atmosphère.

Cette méthode consiste à cultiver les microorganismes à tester dans les boîtes de pétri sur milieu de culture approprié. La différence réside principalement dans la position du disque imprégné d'HE qui est déposé au centre du couvercle de la boîte de pétri, renversée après fixation de l'HE 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).

II.7.2.Activité antioxydante.

II.7.2.1.Définition des radicaux libres.

Les radicaux libres sont des composés instables surtout formés d'oxygène. Ils sont générés au cours du fonctionnement normal, mais leur production peut être augmentée par la pollution, la fumée de cigarettes ou une exposition prolongée au soleil, par exemple. Leur structure chimique fait qu'ils endommagent les autres atomes en les « oxydant ». Ils sont toutefois plus ou moins tenus en échec par les antioxydants naturels de l'organisme. Certains facteurs peuvent toutefois rompre cet équilibre. Si les radicaux libres en viennent à excéder la capacité de l'organisme à les neutraliser, ils peuvent contribuer à l'apparition de plusieurs maladies, dont les maladies cardiovasculaires, certains types de cancers et d'autres maladies associées au vieillissement (Baribeau, 2010).

Tableau 4 : Les principales espèces oxydantes (Mercan, 2010).

Radicals		Non-radicals	
Hydroxyl	•OH	Peroxynitrite	ONOO ⁻
Alkoxy	L(R)O•	Hypochlorite	⁻ OCl
Hydroperoxy ^a	HOO•	Hydroperoxide ^b	L(R)OOH
Peroxy	L(R)OO•	Singlet oxygen	¹ ΔO ₂
Nitric oxide ^c	NO•	Hydrogen peroxide ^d	H ₂ O ₂
Superoxide ^d	O ₂ ^{•-}		

II.7.2.2.Définition des antioxydants

Un antioxydant est une substance capable de prévenir, réduire ou réparer des dégâts occasionnés par les radicaux libres. Il peut diminuer ou empêcher l'oxydation cellulaire

(Edeas, 2005). Chaque antioxydant ne peut réagir qu'avec un seul radical libre (Camilleri et Snoussi, 2012). Une bonne santé résulte d'un bon équilibre entre la production inéluctable de radicaux libres et l'action des antioxydants. Si un déséquilibre intervient, il aura des conséquences plus au moins graves sur la santé (Edeas, 2005).

II.7.2.3.Types d'antioxydants.

II.7.2.3.1.Les antioxydants primaires.

Sont fabriqués par notre organisme : il peut s'agir de facteurs spécifiques comme le glutathion (un puissant détoxifiant cellulaire), l'acide alpha-lipoïque, l'acide urique, la coenzyme Q10, mais ce sont aussi des enzymes (catalase, glutathion réductases, superoxyde dismutase) qui ont besoin pour être activées d'être mises en présence de minéraux issus des aliments : fer pour la catalase, zinc et cuivre pour la super-oxyde dismutase (SOD), sélénium pour les glutathion-peroxydase (Causse, 2005).

II.7.2.3.2.Les antioxydants secondaires.

Ils sont présents dans notre assiette. Ce sont : certaines vitamines : C, E, mais aussi B2 (riboflavine) ; Des oligo-éléments : zinc, cuivre, sélénium, fer nécessaires pour activer des enzymes protecteurs ; Des composés des fruits et légumes : caroténoïdes, polyphénols, isothiocyanates (dans le chou et les crucifères); Des composés des épices et aromates : terpènes (Causse, 2005).

II.7.2.4.Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante.

Des nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou la décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Selon la bibliographie, les méthodes les plus utilisées sont celles de la réduction du 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH•), de la chélation des métaux et de blanchiment du β -carotène dans l'acide linoléique.

II.7.2.4.1.Test de DPPH.

Le principe de cette méthode est basé sur la mesure du piégeage des radicaux libres de DPPH, le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl ou le α -diphényl- β -picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre stable, de couleur violet foncé avec une absorption maximale autour de 520 nm.

Lorsqu'il est en présence d'une substance pourvoyeuse d'atome d'hydrogène, il se réduit et devient jaune. Le changement de la coloration du violet au jaune est proportionnel à l'activité antioxydante.

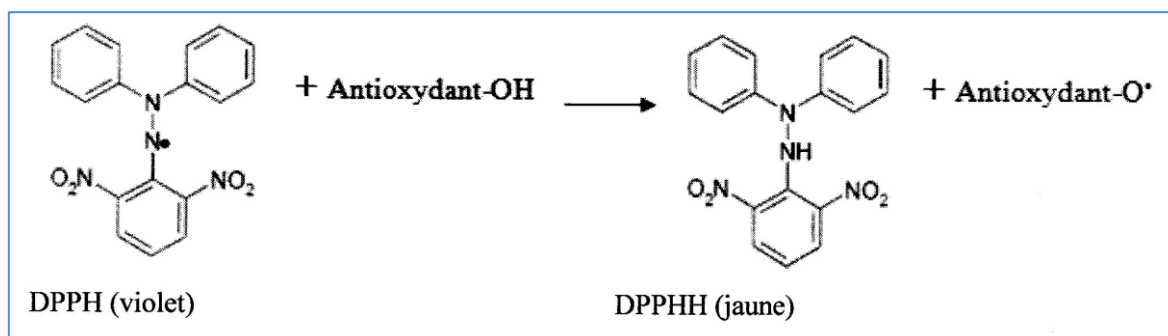


Figure 22: Réaction du DPPH• avec un antioxydant (Kouamé et al., 2009).

Les résultats de l'activité antioxydante peuvent être exprimés en :

Pourcentage d'inhibition : Pourcentage d'inhibition du DPPH (I%) est calculé de la manière suivante :

$$I\% = (A \text{ blanc} - A \text{ échantillon}) \times 100 / A \text{ blanc}$$

A blanc : Absorbance du blanc (DPPH dans le méthanol ou éthanol)

A échantillon : Absorbance du composé d'essai.

- **IC50** : Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration initiale de 50%, il est inversement lié à la capacité antioxydante.

-**TC50** : C'est le temps atteint avec une concentration d'antioxydant égale à IC50.

–**Efficacité anti radicalaire EA**: $A = 1 / IC50 \times TC 50$. Cette méthode a été utilisée par plusieurs d'auteurs pour déterminer la puissance de réduction des huiles essentielles et aussi des différents extraits végétaux (Laib, 2012; Mansouri et al., 2011; Mohammedi et Atik, 2012; Athamena et al., 2010, Tayeb et al., 2012; Abdellaoui et al., 2013).

II.7.2.4.2. Test de décoloration du β -carotène.

Cette technique de spectrophotométrie dans l'ultraviolet consiste à mesurer, à 470 nm, la décoloration du β -carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique. L'addition d'antioxydants purs ou sous forme d'extraits végétaux induit un retard de la cinétique de décoloration du β -carotène.

II.7.2.4.3. Test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).

La méthode de chélation des métaux est employée pour déterminer la puissance de réduction des huiles essentielles où les réductants (huiles essentielles) ramènent le complexe de Fe³⁺/ferricyanide [FeCl₃/K₃Fe (NC)₆] à la forme (Fe²⁺) ferreuse. Par conséquent, selon la puissance de réduction des huiles essentielles, la couleur jaune de la solution d'essai change en vert ou en bleu (Bourkhiss et al., [2010](#)).

III. Les plantes médicinales sélectionnées.

III.1. La famille Astéracée.

III.1.1. Etymologie.

Astéraceae: du genre type aster, lui même issu du latin aster, étoile, en référence à la forme des fleurs (Philippe, 2008).

III.1.2. Classification systématique.

Division: Spermatophytes

Sous-division: Angiospermes

Classe: Dicotylédones

Sous classe: Astéridae

Ordre: Asterales (Philippe, 2008).

III.1.3. Répartition géographique.

La Famille astéracée est une famille très vaste avec environ 25000 espèces réparties dans plus de 1000 genres (Philippe, 2008), répandu dans le monde entier, principalement dans les régions tempérées, mais rare en forêts tropicales humides (Beltram, 2007).

III.1.4. Caractéristiques générales.

Plantes herbacées érigées ou grimpantes, annuelles ou vivaces, parfois arbustes, voire très rarement arbres, à canaux résinifères ou lactifères (Sève blanche) (Philippe, 2008; Spichiger et al., 2004).

Feuilles: alternes, opposées ou verticillées, simples, par fois profondément lobées ou découpées, à bords entiers à diversement dentés, à nervation généralement pennée ou palmée, pas de stipule (Judd et al., 2002).

Inflorescence: en capitule formée de petites fleurs individuelles, d'un involucre de petites bractéoles vertes et parfois d'un involucre secondaire de bractées colorées (Philippe, 2008).

On a suivant le type de fleur composant le capitule les inflorescences suivantes:

-Tubuliflores: composées uniquement de fleurs actinomorphes, tubuleuse (*Centaurea*);

-Liguliflores: composées uniquement de fleurs zygomorphes ligulées à cinq dents (*Lactuca*);

-Labiatiflores: composées uniquement de fleurs zygomorphes bilabieés (*Mutisia*);

-Radiées: fleurs zygomorphes ligulées à trois dent à la périphérie, fleurs actinomorphes tubuleuses au centre (*Senécio*) (Spichiger et al., 2004).

Fleurs: appelées aussi fleurons de type floral 5s/5p/5st/2c (Spichiger et al., 2004; Guignard et Dupont, 2004 ; Beltrame, 2007), sont caractérisées par:

- Sépales profondément modifiés, formant un pappus composé de 2 à nombreuses écailles, arêtes ou soies, persistantes, parfois soudées, pouvant être capillaires, velues, courtement barbues ou plumeuses.
- Pétales au nombre de cinq, sont soudés entre eux et à l'ovaire, formant soit une corolle actinomorphe et tubulaire (fleur tubulée), soit une corolle zygomorphes bilabée (fleur rayonnante ou périphérique), soit une corolle zygomorphe allongée en languette se terminant par cinq petites dents (fleur ligulée) (Judd et al., 2002) ;
- Etamines réduites à cinq et généralement soudées, d'une part, à la corolle, par la base de leur filet (adnées) et d'autre part, entre elles par leurs anthères (Raven et al., 2003; Guignard et Dupont, 2004) ;
- Ovaire infère, à placentation basale ; branches du style², à surfaces stigmatiques couvrant la face interne ou réduites à 2 bandes marginales (Judd et al., 2002).

Fruit: akène généralement surmonté d'un pappus prévenant du développement du calice à près fécondation.

Graine à embryon droit, sans albumen (Spichiger et al., 2004).

III.1.5.Place des Astéracées dans la médecine traditionnelle.

Les Astéracées sont bien utilisées dans la médecine traditionnelle du fait de leur abondance et de leur diversité dans le règne végétal. Quelques utilisations d'espèces de cette famille sont présentées dans le tableau 5.

Tableau 5: Exemples de quelques plantes médicinales appartenant à la famille astéracée et leurs usages.

Nom scientifique	Utilisation traditionnelle	Références
<i>Cynara cardunculus</i>	diurétique, cholérétique, cardiotonique, antihémorrhodial, traitement de dyspepsie et antidiabétique.	Zellagui et al., 2012a.
<i>Chrysanthemum.sp</i>	C. indicum : antibactérienne et antivirale, traiter plusieurs maladies infectieuses telles que la pneumonie, la colite, la stomatite, anthrax et fièvre. utilisé comme thé pour traiter certaines maladies oculaires en chinois. C. coronarium : insecticide et antiparasitaire C. cinerariaefolium : insecticide. C. trifurcatum : traiter la constipation.	Ben Sassi et al., 2008.
<i>Santolina africana</i>	antispasmodique, antiseptique, anti-inflammatoire, antihelminthique et insecticide	Derouiche et al., 2013.
<i>Inula viscosa</i>	Traiter de diverses affections ou maladies telles que les bronchites, le diabète, les blessures...etc	Bssaibis et al., 2009.
<i>Artemisia herba halba</i>	Vermifuge, emménagogue, tonique, stomachique, diurétique.	Mhirit et Philippe, 1999.
<i>Senecio vulgaris</i>	Emménagogue, régule la circulation veineuse.	Spichiger et al., 2004.
<i>Vernonia colorata</i>	Traiter la bilharziose, la dysenterie amibienne, les éruptions cutanées et le diabète.	SyGy et al., 2008.
<i>Bidens pilosa L.</i>	Anti-poison, affections grippales, fièvres, les hémorroïdes, les hépatites, anti-diarrhéiques et anti-inflammatoires.	Léandre et al., 2008.

III.2. La plante *Rhanterium adpressum* Coss. & Durieu.

III.2.1. Description.

Sous arbrisseaux saharien multicaules, à petites feuilles alternes, entières et dentées, à rameaux monocéphales, droits, nombreux, serrés en touffes, capitules hétérogames, radiés, petits, à fleurs jaunes; Ligules femelles, tridentées; fleurons hermaphrodites à 5 dents; à écailles imbriquées; achaines cylindriques, étroits, à 4-5 côtes, les rangs externes à l'aisselle de paillettes; anthères sagittées, longuement appendiculées à la base, à caudicules connés. (Quezel et Santa, 1963; Bttandier et Trabut, 1888, 1902).

III.2.2. Position systématique.



Embrenchement: Spermatophyte

Sous-embrenchement: Angiosperme

Classe: Dicotylédone

Sous-classe: Gamopétale



Série: Epigone

Sous-série: Isostemome

Ordre: Asterales

Famille: Asteraceae (Compositae)



Sous-famille: Tubuliflore

Tribus: Inulée

Genre: *Rhanterium*

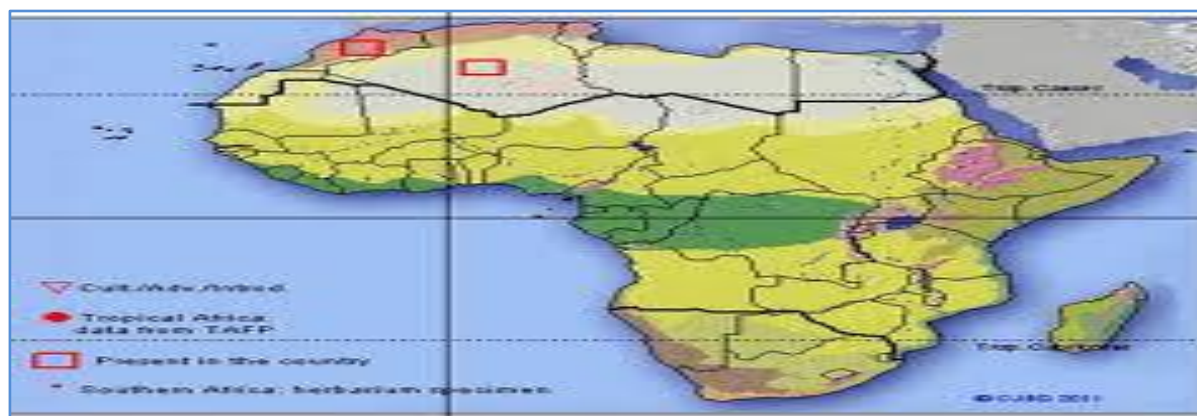
Espèce: *R. adpressum*

Figure 23: Position systématique de la plante *Rhanterium adpressum* (Tela botanica).

III.2.3. Répartition géographique.

Le genre *Rhanterium* renferme sept espèces *R. adpressum*, *R. apressum*, *R. epapposum*, *R. eppapposum*, *R. incrassatum*, *R. squarrosus* et *R. suaveolens*, Une autre espèce *R. intermedium* Coss. & Durieu ex Pomel est considéré comme un hybride entre *R. adpressum* et *R. suaveolens*, ils sont distribués au nord-ouest de L'Afrique, Péninsule, Iraq et Iran (Kala et al., 2009).

Selon Tela Botanica l'espèce *Rhanterium adpressum* est une plante endémique de l'Algérie et du Maroc.



Sefra, Mzab, Laghouat, Bou-Saûda et Biskra (Bttandier et Trabut, 1888).

III.2.4. Utilisation en médecine traditionnelle.

La plante *Rhanterium adpressum* (Arfedj) est utilisée traditionnellement avec une autre plante appelée *Haplophyllum tuberculatum* (Alfidjel) pour traiter les douleurs de l'estomac, elle est utilisée également par la population locale dans la production du fromage et comme un antidiurétique (Hameurlaine, 2009, Kala et al., 2009 ; Bouheroum et al., 2007a).

III.2.5. Travaux phytochimiques antérieurs.

III.2.5.1. Sur le genre.

Une recherche bibliographique exhaustive a permis de relever que des études phytochimiques ont été réalisées seulement sur trois espèces du genre *Rhanterium*; *R. suaveolens*, *R. epapposum* et *R. adpressum*.

Une étude chimique sur l'espèce *Rhanterium suaveolens* a abouti des valeurs nutritives comme il désigne le tableau ci-dessous (Boussaid, 1998).

Tableau 6: valeurs nutritives du *Rhanterium suaveolens*.

Espèce	% MS				Ext. n. az.	P	Ca	K	Na	MAD g/kg MS	MS UF/Kg
	MM	MC	MA	MG							
<i>Rhanterium Suaveolens</i>	11,3	32,1	8,7	2,4	45,5	0,13	11,39	1,99	0,08	42	0,28

MS: matière sèche; **MM:** matière minérale; **MC:** matière cellulosique; **MA:** matière azotée ; **MG:** matière grasse; **MAD:** matière azotée digestible; **UF:** unité fourragère ; **Ext.n.az. :** Extrait nom azoté; **P:** phosphore; **Ca:** Calcium; **K:** Potassium; **Na:** Sodium.

Une étude publiée sur l'espèce *Rhanterium epapposum* Oliv. a montrée d'isolement des huiles essentielles qui ont été identifiées par CCM, chromatographie liquide-solide, GLC, et GLC-MS. Cette huile contient 107 composants volatils dont Les principaux constituants sont α -phellandrène, linalol, géraniol, bulnesol, et β -phellandrène représentant 55,6% de l'huile total, des composés aliphatiques et aromatiques ont été également détectés (Yaghmai et Kolbadipour, 1987).

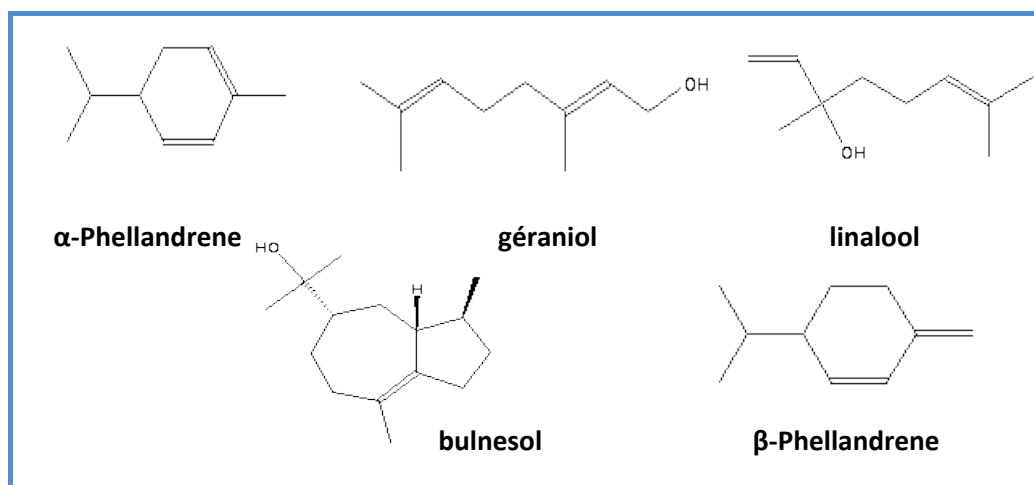


Figure 25: Les principaux constituants de l'huile essentielle de *Rhanterium epapposum* (Nist)

III.2.5.2. Sur l'espèce.

Des recherches phytochimiques sont réalisées sur l'espèce *R. adpressum*, ont permis d'isoler et d'identifier des métabolites secondaires à base des terpènes et des flavonoïdes.

L'étude phytochimique réalisée sur la partie aérienne de l'espèce *R. adpressum* a montré à partir d'un extrait chloroformique d'isolement de sept composés terpéniques dont six sont identifiés: (+)- 3[3'-(nona-1''-ene-3'',5'',7''-trynyl)oxyran-2'-yl]propan-1-ol, 16 β -Hydroxy Lupeolyl-3-Hexadecanoate, β -eudesmol et spathuléol (deux sesquiterpènes), B-sitostérol et stigmastérol (deux stérols) (Bouheroum et al., 2007a; Bouheroum, 2007b).

Une deuxième étude qui a été réalisée sur la partie aérienne de *R. adpressum* a révélée la présence des deux composés flavonoïques à partir d'un extrait butanolique, dont l'un d'entre eux a été identifié comme: 3, 5, 7, 4'-

tetrahydroxyflavonol (kaempferol) (Bouheroum, 2007b).

Les structures des composés isolés ont été déterminées en se basant sur les analyses spectroscopiques telles que RMN¹H, RMN C¹³ et la spectrométrie de masse

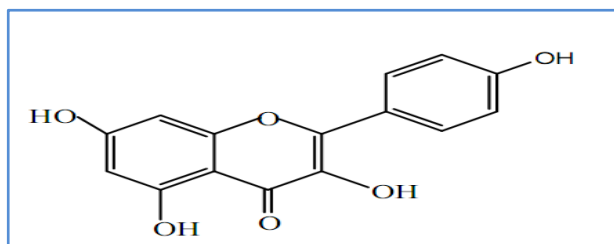


Figure 26: Structure de composé d'un extrait butanolique de *Rhanterium adpressum* (3, 5, 7, 4' - tetrahydroxyflavonol (kaempferol)).

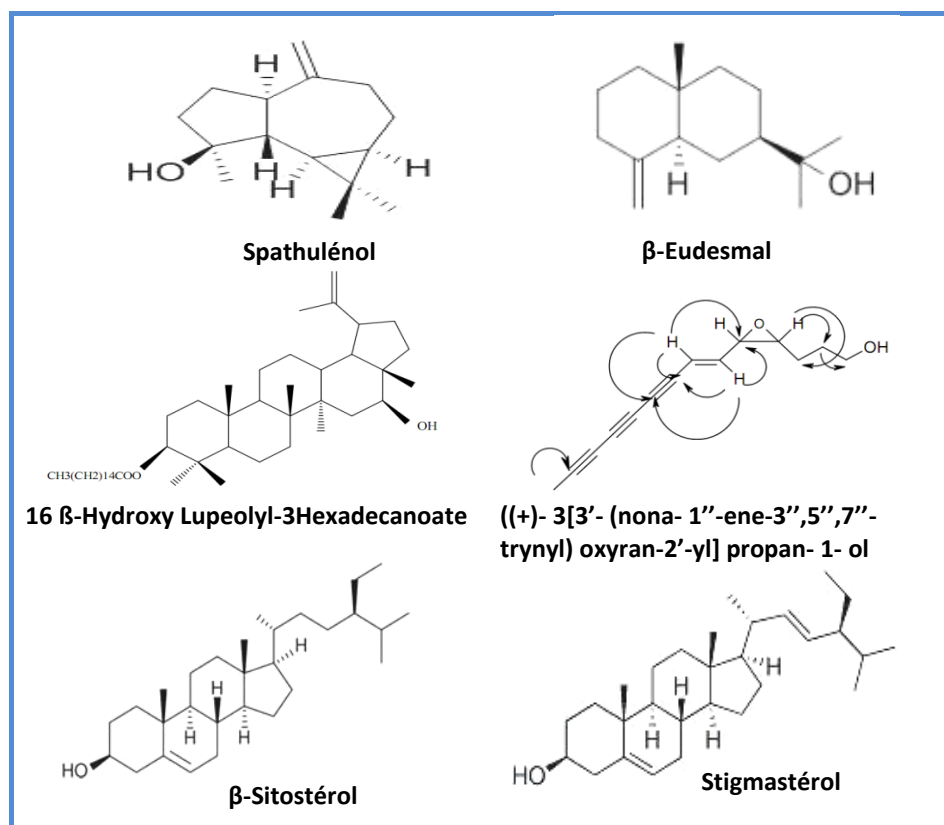


Figure 27: Structure des composés d'un extrait chloroformique de *Rhanterium adpressum*.

Une troisième étude phytochimique sur la partie aérienne de la plante *R.adpressum* a permis d'isoler des huiles essentielles par l'hydrodistillation, dont la composition chimique a été déterminée par CG /SM. Les constituants dominants sont : spathulenol (19,6 %) , β - Eudesmol (15,2%) , Bicyclo [4.4.0] déc -1-ène 2- isopropyl- 5 -méthyl- 9 - méthylène (12,9%) , et β - Cadinol (11,3%) (Kala et al., 2009; Hameurlaine, 2009).

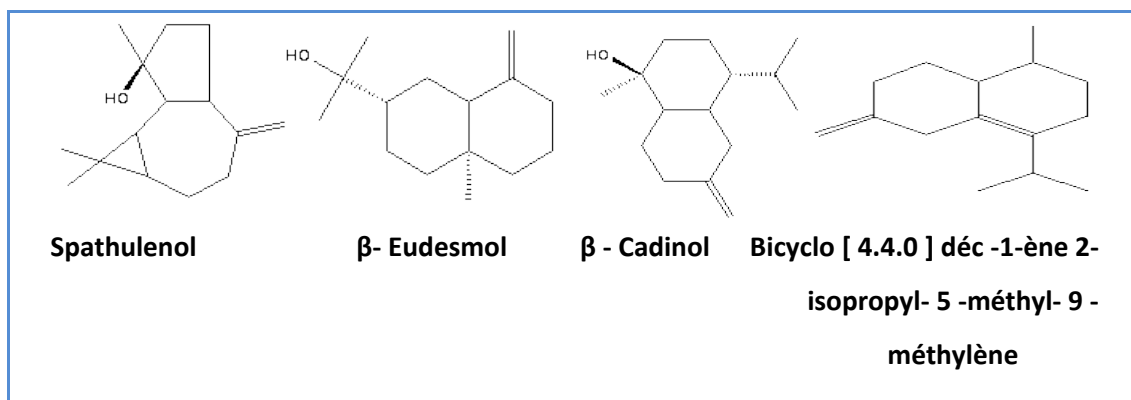


Figure 28: Structure des composés majoritaires de la partie aérienne de l'HE de *R.adpressum* (Nist).

Une quatrième étude faite sur les pièces fleuries de cette plante a permis d'isoler des acides gras et des huiles essentielles :

L'extrait de l'huile essentielle obtenue par l'hydrodistillation a révélé la présence de 25 composés dont les monoterpènes occupent un pourcentage élevé (83,8%). Les principaux composants identifiés étaient les monoterpènes hydrocarbonés: camphène (21,8 %), myrcène (19,3%) et alpha- pinène (17,4%).

L'extrait lipidique obtenu par macération dans le n-hexane a abouti d'isoler des acides gras dont les principaux étaient : acide palmitique (47,4%), acide oléique (12,9%) et acide stéarique (10.6%) (Hamia et al., 2013).

Les structures des deux extraits ont été identifiées par CG et CG/MS (voir figure29)

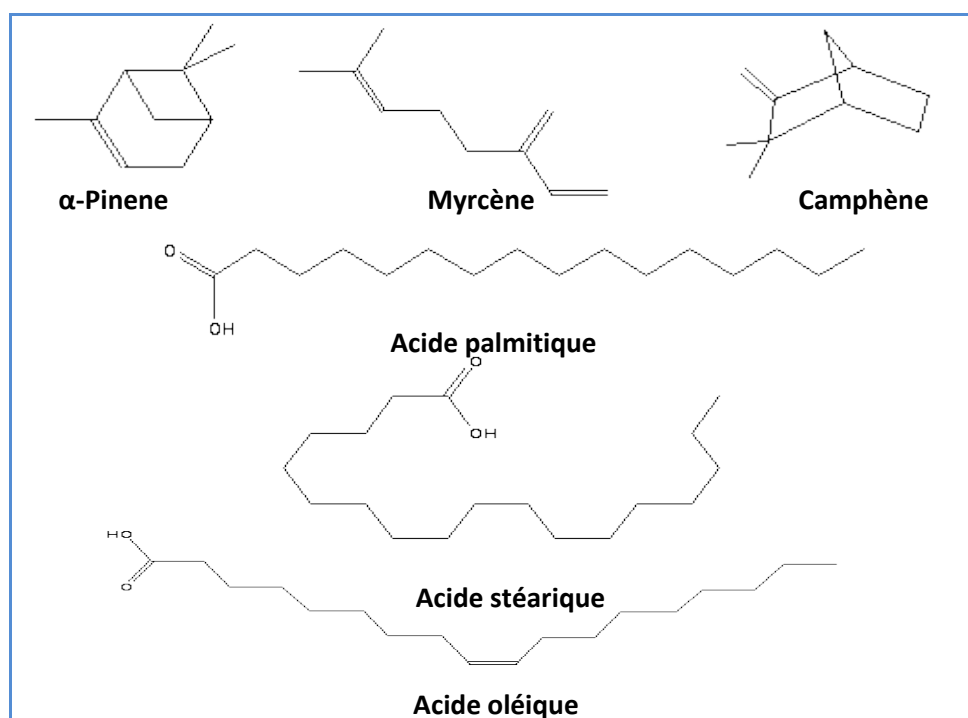


Figure 29: Structure des composés majoritaires de l'HE et de l'extrait lipidique des fleurs de *R.adpressum* (Nist).

III.3.La plante *Pulicaria arabica* (L.) Cass.

III.3.1.Description.

Pulicaire arabe est une plante odorante, à tiges longs d'un pied et demi ,plus ou moins dressées ou étalées ,très rameuses, à rameaux très-longs, étalés, divergens, pubescens; Les feuilles sont alternes, sessiles, se amplexicaules, oblongues, molles, très-pubescentes sur les deux faces, d'un vert pale, recourbées, pliées en gouttière, point crépues ni ondulées, à base élargie et échancrée en cœur , à bords très entiers ;Les calathides sont terminales, paniculées ,larges d'environ quatre à cinq lignes, hautes de trois à quatre lignes, courtement radiées, composées de fleurs jaunes ;Au-dessous de chaque calathide terminale naissent un ou plusieurs rameaux, qui se terminent par des calathides plus tardives, et se ramifient ensuite de la même manière; L'ensemble de tout cela forme la panicule ;La panicule, hérissé de longs poils blancs, est campanulé, un peu supérieur aux fleurs du disque, formé de squame nombreuses, inégales, plurisériées, imbriquées, linéaires-subulées, à partie inférieure appliquée, linéaire, subcoriace, à partie supérieure appendiciforme, inappliquées, mais dressée, subulée, foliacée; Les corolles de la couronne ont le tube long, et la languette plus courte que le tube, oblongue, tridentée au sommet; les anthères ont de longs appendices basilaires membraneux, lacinéés ou divisés en longs filets piliformes; L'aigrette extérieure est cupiliforme, dentée supérieurement; L'intérieure est composée de squamellules peu nombreuses, unisériées ,distancées ,filiformes, paroissent nues, c'est-à-dire non barbellulées, parce que les barbellules qui garnissent les bords sont réduites à des crénelures si peu saillantes, qui ne sont visibles qu'à l'aide d'une très-forte loupe (Cuvier, 1826).

III.3.2. Position systématique.




	<p>Ordre: Asterales Famille: Asteraceae Sous-famille: Tubuliflore</p>
<p>Embranchement : Spermatophyte Sous-embranchement: Angiospermes Classe: Dicotylédones</p>	
	<p>Tribu: Inulée Genre: <i>Pulicaria</i> Espèce: <i>P.arabica</i></p>

Figure 30: Position systématique de la plante *Pulicaria arabica* (Tela botanica).

III.3.3. Répartition géographique.

Pulicaria est le troisième genre le plus important de la tribu Inuleae, il renferme 85 espèces (arbustes, massifs arbustes et herbes), ils sont distribués en Europe, nord d'Afrique, l'Arabes et l'Asie (Coutinbo et al., 2011).

Pulicaria arabica est une espèce saharo-arabique commune dans tout le sahara (Cuvier, 1826).

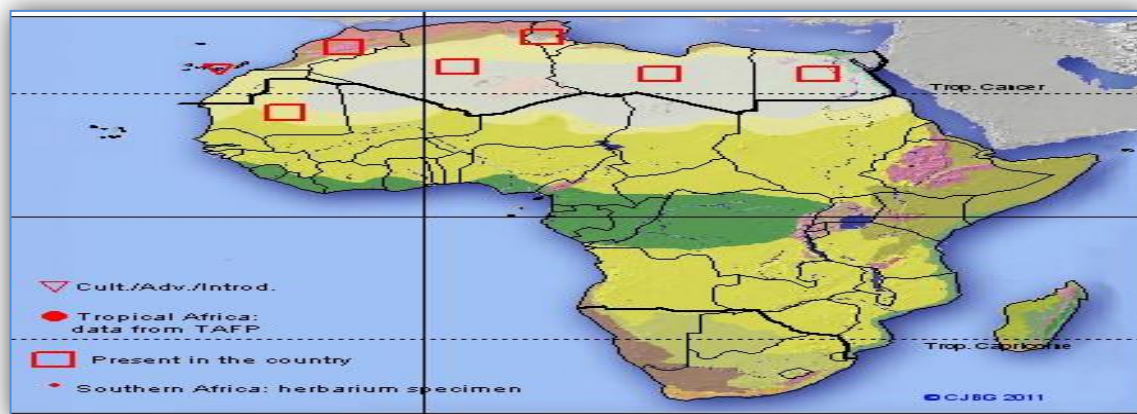


Figure 31: Répartition géographique de la plante *Pulicaria arabica* (Tela botanica).

III.3.4. Utilisation en médecine traditionnelle.

Les espèces du genre *Pulicaria* ont été utilisées comme une plante médicinale dans nombreux pays.

Pulicaria arabica : utilisée en médecine pour traiter les gonflements et les furoncles douloureux (El-Abed et al., 2010).

Pulicaria undulata : utilisée comme inhalateur pour soulager la congestion nasale et bronchique associée avec le rhume (El-Abed et al., 2010 ; Ould Mohamed vall, 2009).

Pulicaria crispa : utilisée comme carminatives et pour le traitement du rhume et les coliques, utilisée par les gens du sud de l'Egypte et de l'Arabie Saoudite pour traiter l'inflammation et aussi comme un insectifuge et également utilisé comme une tisane, elle est utilisée aussi contre fièvre, enflure, maux de tête, complications respiratoires en Mauritanie (El-Abed et al., 2010 ; Ould Mohamed vall, 2009).

Pulicaria dysenterica : utilisée en Perse comme astringent et contre la diarrhée, elle est surtout utilisée dans la dysenterie, la gale et d'autres troubles cutanés (El-Abed et al., 2010 ; Ould Mohamed all, 2009).

Pulicaria jauberti : utilisée traditionnellement en Yemen comme diurétique et pour soigner la fièvre, certaines investigations ont montrées que cette espèce a une propriété antibactérienne, antifongique, antipaludique et insecticide (Algabr et al., 2010).

Pulicaria incisa : utilisés pendant nombreuses années dans la médecine traditionnelle pour le traitement des maladies du cœur et comme un agent hypoglycémiant et hypocholestérolémiant (Elmann et al., 2012).

Pulicaria odora : en Maroc, les racines de cette plante ont utilisées traditionnellement comme un agent anti-inflammatoire (Hanbali et al., 2005).

III.3.5. Travaux phytochimiques antérieurs.

III.3.5.1. Sur le genre.

Des études phytochimiques qui sont réalisées sur les plantes du genre *Pulicaria* a permis d'isoler et d'identifier de différentes métabolites secondaires: monoterpènes, diterpènes, triterpènes, sésquiterpènes lactoniques, dérivés caryophyllène et des flavonoïdes (Abdel-Mogib, 1990; Dendougui et al., 2000; Rizk et al., 1993).

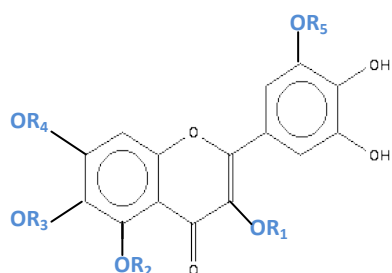
Tableau 7: Différents métabolites secondaires extraits du genre *Pulicaria*.

Les métabolites secondaires	Espèces	Références
Les huiles essentielles	<i>Pulicaria odora</i> <i>Pulicaria laciniata</i> <i>Pulicaria undulata</i> <i>Pulicaria jauberti</i> <i>Pulicaria mouritanica</i> <i>Pulicaria gnaphalodes</i> <i>Pulicaria glutinosa</i>	Hanbali et al., 2005. Hichri et al., 2009. Hashim EL-Kamali et al., 2009. Fawzy, 2013. Cristofari, 2011. Khani et Asghari, 2012. Al Yousuf et al., 2001.
Les flavonoïdes	<i>Pulicaria incisa</i> <i>Pulicaria uliginosa</i> <i>Pulicaria jauberti</i> <i>Pulicaria dysenterica</i> <i>Pulicaria crispa</i> <i>Pulicaria wightiana</i> <i>Pulicaria somalensis</i> <i>Pulicaria salviifolia</i> <i>Pulicaria undulata</i>	Mansour et al., 1990. Eshbakova et al., 1996. Algabr et al., 2010. Williams et al., 2000, Pares, 1981. Rizk et al., 1993. MaheshKumar et al., 2012. Al-Hazimi et Alkhatlan, 1993. Sagitdinova et al., 1992. Bishay et al., 1982, Abdel-Mogib, 1989.
Triterpènes	<i>P. salviifolia</i> , <i>P. gnophaloides</i> , <i>P. uliginosa</i>	Eshbakova et Saidkhodzhaev, 2001.
stérols	<i>Pulicaria incisa</i> <i>P. salviifolia</i> , <i>P. gnophaloides</i> , <i>P. uliginosa</i>	Ramadan et al., 2009 ; AbdEl-Gleel et Hassanien, 2012. Eshbakova et Saidkhodzhaev, 2001.
Sésquiterpènes	<i>Pulicaria wightiana</i> <i>Pulicaria paludosa</i>	MaheshKumar et al., 2012. Feliciano et al., 1989.
Sésquiterpènes lactoniques	<i>Pulicaria laciniata</i>	Ghouila et al., 2009. Hichri et al., 2009.
Diterpènes	<i>Pulicaria wightiana</i> <i>Pulicaria somalensis</i>	MaheshKumar et al., 2012. Al-Hazimi et Alkhatlan, 1993.
Alcaloïdes et tanins	<i>Pulicaria wightiana</i>	MaheshKumar et al., 2012.

III.3.5.2. Sur l'espèce.

Des recherches bibliographiques réalisées sur l'espèce *Pulicaria arabica* ont montré l'existence des études antérieures.

Une investigation phytochimique qui a été effectuée par El-Negoumy (El-Negoumy et al., 1982) sur les feuilles et les fleurs de la plante *Pulicaria arabica* a permis d'identifier des composés flavonoïques : trois de Quercetage tin méthyl éther (Quercetage tin 3,7-diméthyl éther, Quercetage tin 3,5,7-triméthyl éther, Quercetage tin 3,5,7,3'-tetraméthyl éther), Quercitain 3-glucoside, Quercitain-3-glucuronide et des traces de flavonoïde sulfaté. Leurs structures sont représentées ci-dessous.



composés	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Quercetage tin 3,7-diméthyl éther	Me	H	H	Me	H
Quercetage tin 3,5,7-triméthyl éther	Me	Me	H	Me	H
Quercetage tin 3,5,7,3'-tetraméthyl éther	Me	Me	H	Me	Me
Quercetain 3-glucoside	Glu	H	H	H	H
Quercetain-3-glucuronide	Gluc	H	H	H	H

Figure 32 : Structure des composés flavonoïques extraits de *Pulicaria arabica*.

Une deuxième étude qui a été effectuée par Hafez (Hafez et al., 1987) a permis d'isoler à partir de la partie aérienne de la plante des composés terpéniques, leurs structures sont représentées ci-dessous.

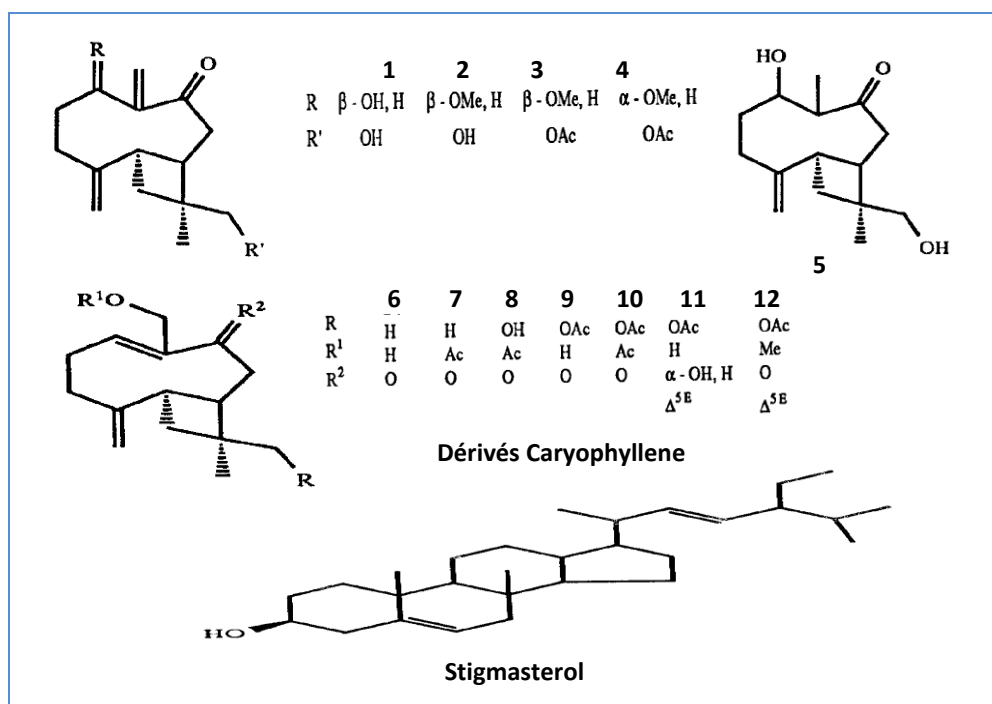
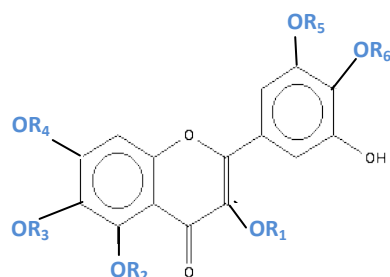


Figure 33: Structure des sésqui- et tri-terpènes extraits de *Pulicaria arabica* (Al-Hazimi, 1992).

Une troisième étude qui a été réalisée par Malek (Malek et al.,1988) a permis d'isoler à partir de la partie aérienne de la plante des flavonols méthylés: Quercetagein 3',4'-diméthyléther, Quercetagein 3,5,6,7,3'-pentaméthylether et Quercetagein 3,5,6,7,4' pentaméthylether, leurs structures sont représentées ci-dessous.



Composés	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Quercetagein 3',4'-diméthyl éther	H	H	H	H	Me	Me
Quercetagein 3, 5, 6, 7,3'-pentaméthylether	Me	Me	Me	Me	Me	H
Quercetagein 3,5,6,7,4'-pentaméthylether	Me	Me	Me	Me	H	Me

Figure 34: Structure des Flavonols extraits de *Pulicaria arabica*.

Une quatrième étude sur cette espèce qui a été réalisée par El-Abed (El-Abed et al.,2010) a permis d'isoler des huiles essentielles des différents organes de la plante par l'hydrodistillation qui ont été analysés par CG/SM, 32 composés ont été identifiés pour les tiges, 38 pour les fleurs, 61 pour les feuilles et 33 pour les racines représentant 52.60, 53.43, 59.17 et 40.54 % de l'essence total. Les composés majoritaires de ces huiles étaient γ -cadinène (11.75 %), δ -cadinène (9.55 %), α -Cadinol (8.59), Valencène (3.50) chez les fleurs ; α -Cadinol (10.31), τ -Cadinol (8.04), δ -Cadinène (7.89) chez les feuilles, Thymol (15.22), δ -Cadinène (9.12), τ -Cadinol (6.65) pour les tiges et α -Cadinol (2.90), Thymol (2.45).

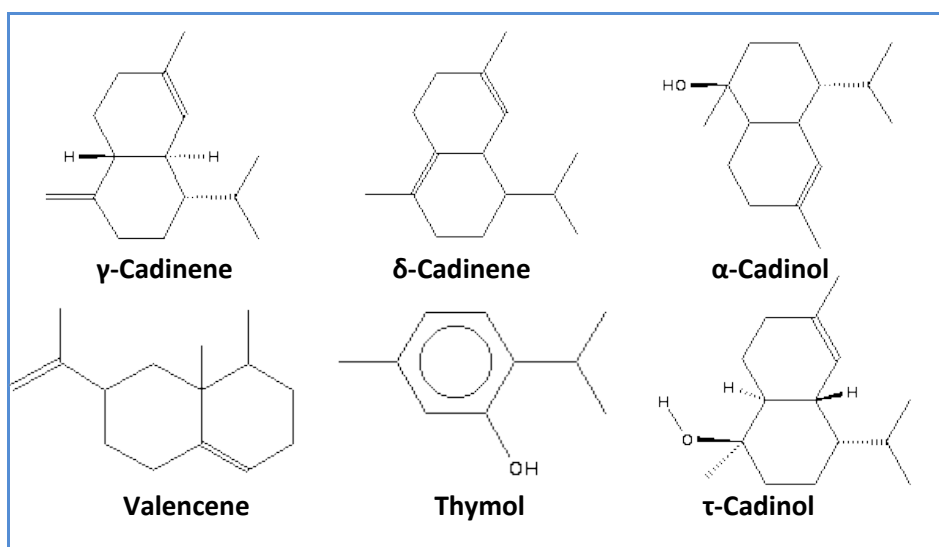


Figure 35: Les Composés majoritaires des HES de différentes parties de *P. arabica* de la Tunisie (Nist).

Etude expérimentale

IV. Matériels et méthodes.

La partie expérimentale concernant la préparation des extraits des plantes et l'évaluation de leurs activités antioxydantes a été réalisée au niveau de laboratoire de recherche de biomolécules végétales et amélioration des plantes et laboratoire pédagogique de chimie à l'université l'Arbi ben M'hidi d'O.E.B, alors que l'activité antimicrobienne a été réalisée au niveau de laboratoire de bactériologie de l'hôpital Mohammed Boudiaf d'O.E.B. L'analyse par CG/MS des huiles essentielles de *Pulicaria arabica* a été réalisée aux niveaux de laboratoire de l'école des sciences médicales appliquées à l'université jordanienne allemande à Amman, Jordanie.

IV.1. Matériels.

IV. 1.1. Choix du matériel végétal.

Le matériel végétal choisi dans la présente étude est représenté par deux plantes médicinales du sud de l'Algérie : *Rhanterium adpressum* et *Pulicaria arabica*. la récolte de la plante *R. adpressum* a été réalisée en 5 Avril 2013 dans la région de Biskra alors que la la plante *P. arabica* a été récoltée en 7 juillet 2011 dans la région de M'sila et identifiée par le Dr. Rebbasse Khallef à l'université de M'sila. Les deux plantes fraîchement récoltées, ont été séchées pendant plusieurs jours à l'ombre dans un endroit sec et aéré puis broyées en poudre fine.

IV.1.2. Appareillage et produits chimiques.

Il s'agit de: Distillateur, Balance de précision (0,0001g), Rotavapeur, Spectrophotomètre UV-Vis (SHIMATZU), Vortex, L'étuve, L'autoclave, Chloroforme, Ethanol 96%, Méthanol, n-hexane, DMSO, DPPH, Acide ascorbique.

IV.1.3. Origine et choix des souches microbiennes.

Les souches ont été choisies pour leur résistance naturelle à divers types d'agents antimicrobiens, pour leur fréquence élevée à contaminer les denrées alimentaires et pour leur pathogénicité.

Nous avons sélectionné onze souches microbiennes, dont dix bactériennes et une fongique.

Les souches bactériennes sont réparties en deux groupes :

- **Bactéries à Gram négatif :**

E. coli ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebseilla pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Citrobacter freundii* et *Enterobacter.sp.*

- **Bactéries à Gram positif :**

Staphylococcus aureus ATCC 43300, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylocoque doré*, *Streptococcus groupe D.*

La souche fongique: *Candida albicans*.

Ces souches nous ont été fournies par le laboratoire de bactériologie de l'hôpital Mohammed Boudiaf d'O.E.B (les souches d'isolement clinique) et par le laboratoire de microbiologie de centre hospitalier universitaire (CHU) de Constantine (les souches de référence).

IV.1.4.Choix des milieux de culture.

Selon les souches sélectionnées, nous avons utilisé les milieux de culture suivants :
-L'eau physiologique stérile /L'eau distillé stérile pour préparer les suspensions microbiennes.

-Bouillon nutritif cœur et cervelle pour la réactivation des souches conservées.

-Gélose Muller Hinton pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux différents extraits de plantes.

-Gélose nutritive pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes.

-Gélose au sang pour l'étude de la sensibilité de streptococcus aux différents extraits de plantes.

-Milieux pour l'isolement: gélose Chapman pour les Staphylocoques, gélose Hecktoen pour *E.coli*, *Entérobacter*, *Klebseilla* et *Citrobacter*, gélose SS pour *Salmonella*, gélose Sabouraud pour la levure *Candida*, gélose nutritive pour *Streptococcus* et *pseudomonas aeruginosa*. La composition de ces milieux est décrite dans l'annexe.

IV.2.Méthodes.

IV.2.1.Extraction de l'huile essentielle des plantes.

IV.2.1.1.Procédé d'extraction.

Les huiles essentielles des deux plantes sont extraites par l'hydro-distillation, 100 g de poudre de la partie aérienne de chaque plante sont introduits dans un ballon de 2 litres et imprégnés d'eau distillée, l'ensemble est porté à l'ébullition pendant 3 heures, les vapeurs chargées de substances volatiles traversent le réfrigérant se condensent puis elles sont récupérées dans une ampoule à décanter, l'eau et l'huile sont séparés par différence de densité.

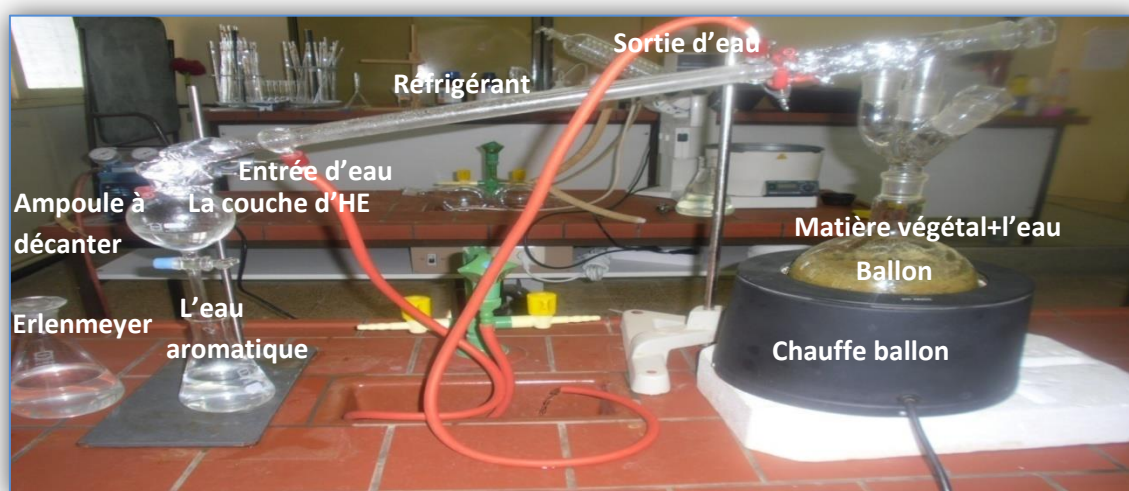


Figure 36 : Montage de l'hydrodistillation

V.2.1.2. Conservation des huiles essentielles.

Les huiles essentielles extraites sont conservées à une température de 4°C, dans des flacons en verre fumé, fermés hermétiquement pour les conserver de l'air, de la lumière et des variations de température qui sont des principaux agents de dégradation, une huile altérée perd son activité biologique.

IV.2.1.3.Détermination du rendement d'extraction.

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids sec de la plante à traiter. Le rendement exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante:

R: Rendement de l'huile en pourcentage.

$$R(\%) = (P_x / P_y) \cdot 100$$

P_x : Poids de l'huile en gramme.

P_y : Poids de la plante en gramme (Kolai et al., 2012).

IV.2.1.4. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles par CG/SM.

L'étude analytique de l'huile essentielle de la plante *Pulicaria arabica* à été effectuée par la technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse type (Hewlett Packard Model 5890 séries), équipée par un détecteur de type (mass HP 5972), la colonne utilisée est une colonne capillaire de type HP5-MS de dimensions (30 m x 0.32 mm), le gaz vecteur utilisé est l'hydrogène (H₂). La température de l'injecteur est 280 C° et la température de détecteur est 300 C°. Le volume injecté est 1 μ l.

IV.2.2. Préparation des extraits bruts des plantes.

La préparation des extraits bruts est effectuée par macération du matériel végétal par trois solvants à polarités croissantes : n-hexane, dichlorométhane et méthanol. La poudre de la partie aérienne (20g) de chacune des deux espèces sélectionnées est mise à macérer dans 200 ml de chaque solvant pendant trois jours à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'extrait est ensuite filtré puis évaporé sous pression réduite à sec ($T^{\circ}=40\text{à}50^{\circ}\text{C}$) par un évaporateur rotatif.



Figure 37: Photo de rotavapeur utilisé pour concentrer sous vide les différents extraits bruts des deux plantes.

IV.2.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne.

IV.2.3.1. Préparation des dilutions.

Les dilutions des huiles essentielles et de différents extraits bruts des deux plantes ont été préparées selon Zellagui et al., 2012b:

On Pèse 8mg de chaque extrait par une balance analytique et on l'Introduit dans un tube à essai contenant 1ml de DMSO, on obtient alors une solution mère(8mg/ml), ensuite, on Introduit 200 μ l, 100 μ l, 50 μ l, 25 μ l , 12,5 de la solution mère dans des tubes contenant 200 μ L 300 μ l, 375 μ l, 387,5 μ l de DMSO pour obtenir les dilutions (4mg/ml) , (2 mg /ml) , (1mg/ml) , (0,5 mg/ml) et (0,25 mg/ml) respectivement.

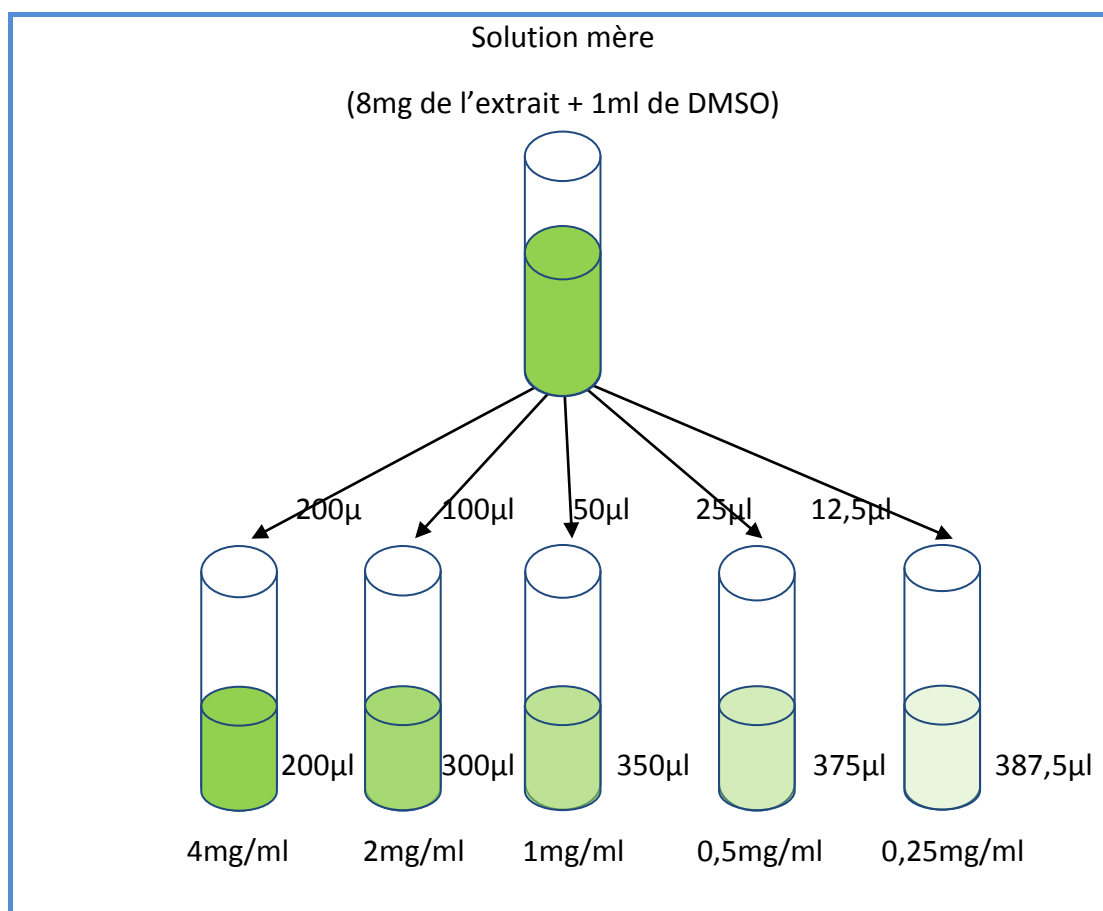


Figure 38: Préparation des dilutions des extraits des plantes.

IV.2.3.2. Préparation des disques.

Les disques sont fabriqués à partir du papier Wattman N°4 à l'aide de l'emporte-pièce avec un diamètre de 6 mm selon les mesures des disques d'antibiotiques actuelles , ensuite ils sont imprégnés par quelques millilitres de l'eau distillé stérile et stérilisés dans un tube à vis ou une boîte de pétri en verre à l'autoclave à une température de 134°C pendant 20 min.

IV.2.3.3. Evaluation de l'activité antibactérienne.

IV.2.3.3.1. Identification des souches étudiées.

L'identification des différentes espèces de bactéries a été réalisée au moyen de tests morphologiques (types de colonies, coloration de Gram) ainsi que les tests biochimiques en utilisant les systèmes Api 20E.

A. Etude microscopique.

L'étude des caractères morphologiques des bactéries est réalisée par une préparation des frottis des souches, une coloration de Gram et un examen microscopique au grossissement x100.

- Préparation des frottis des souches.

Elle est nécessaire d'avoir un frottis fixé, en effectuant une fixation simple à l'eau et à la flamme selon les indications suivantes : sur une lame déposer une goutte d'eau stérile. Ajouter à l'anse de platine stérilisée une goutte de la colonie isolée. Etaler et fixer à la chaleur pendant 10 à 15 min.

- Coloration de Gram.

La coloration de Gram se déroule en trois temps :

-le frottis de la souche, séché et fixé, est recouvert de violet de gentiane (pendant 1min). Toutes les bactéries prennent ce colorant. On recouvre alors de réactif de lugol (iode et iodure de potassium) (pendant 1min) qui joue le rôle de mordant ;

-Dans un deuxième temps, le frottis est soumis à l'action de l'éthanol 95° pendant 30s. L'éthanol dissolvant le violet de gentiane permet la décoloration de certaines bactéries dites à Gram(-). Les bactéries à Gram(+) restent violettes ;

-Après lavage à l'eau, la préparation est recouverte d'un deuxième colorant (fuchsine basique phénolées) (pendant 1à2 min) qui recoloré en rose les bactéries précédemment décolorées.

Au terme de ce processus, les bactéries à Gram (-) apparaissent roses et les bactéries à Gram (+) violettes.

- Examen microscopique.

-Ajouter une goutte de l'huile de cèdre.

-Observation au microscope optique à l'objectif x100 à l'immersion.

B. Tests biochimiques.

Nous avons utilisé le système de galerie API 20E pour l'identification des entérobactéries (*E. coli*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebseilla*).

- Principe du système de galerie API 20 E.

La galerie API 20 E est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

Inoculation de la galerie :

-Réaliser une suspension bactérienne à partir des colonies de 18 à 24 heures sur milieu solide dans 1,5 ml d'eau distillée (La suspension bactérienne doit avoir une turbidité égale à 0,5 sur l'échelle Mac Farland).

-Remplir tubes et cupules pour les tests CIT, VP et GEL, avec la suspension bactérienne en utilisant la pipette pasteur.

-Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres testes.

-Créer une anaérobiose pour les testes ADH, ODC, LDC, H₂S, URE, en remplissant leurs cupules d'huile de vaseline.

-Incuber à 37°C pendant 18 à 24h.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de lecture (voir annexe), et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique (API 20 E ,2007).

C. Antibiogramme.

Nous avons réalisé le test d'antibiogramme afin de valider nos souches bactériennes et de comparer la sensibilité de ces dernières vis-à-vis les ATB à leur sensibilité vis-à-vis les extraits de nos plantes.

- **Disques d'antibiotiques.**

Le choix des disques d'antibiotiques a été fait en fonction des bactéries sélectionnées et la disponibilité, On a utilisé les ATB représentés dans le tableau 7.

Tableau 8: Diamètres critiques des antibiotiques utilisés (Jehl, 2013).

Antibiotique	Sigle de disque	Charge du disque	Diamètres critiques (mm)	
			S	R
Amoxicilline	AML	25µg	≥ 21	<16
Amoxicilline+ac.clavunamique	AMC	30µg	≥ 21	<16
Amikacine	AK	30µg	≥17	<15
Cotrimoxazole	SXT	25µg	≥16	<13
Cefazoline	KZ	30µg	≥21	<15
Céfotaxime	CTX	30µg	≥21	<15
Gentamycine	CN	10µg	≥16	<14
Pristinamicyne	PT	15µg	≥22	<19
Pénicilline	P	10µg	≥ 29	< 8
Lincomycine	L	10µg	≥21	<17
Vancomycine	VA	30µg	≥17	-
Oxacilline	OX	5µg	≥20	<20
Céfoxitine	FOX	30µg	≥22	<15

On a utilisé AML, AMC, AK, SXT, KZ, CTX, CN pour les Gram(-) et PT, P, L, VA, OX, FOX, GN pour les Gram(+).

- **Protocole expérimentale.**

L'évaluation de l'antibiogramme a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé (ou méthode des disques), La méthode appliquée est celle décrite par (Aboun et al., 2008).

Milieu:

- Gélose Mueller Hinton (MH), coulée en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4mm.
- Les géloses sont séchées avant l'emploi.

Inoculum :

A partir d'une culture pure de 18 H sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.

- Décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland.
- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

-L'ensemencement doit se faire dans les 15 mn qui suivent la préparation de la suspension.

Ensemencement :

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

Application des disques d'antibiotiques :

- Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24mm, centre à centre.
- Tester la liste des antibiotiques indiqués selon la bactérie isolée.
- Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de pinces bactériologiques stériles pour s'assurer de son application. Une fois appliqué le disque ne doit pas être déplacé.

Incubation : à 37°C pendant 24h.

Lecture :

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'une règle (en mm), à l'extérieur de la boîte fermée.
- Comparer ces résultats aux valeurs critiques figurant dans le tableau 8.
- Classer la bactérie dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire ou Résistante.

IV.2.3.3.2.Préparation des suspensions bactériennes.

Les différentes souches sont inoculées dans un bouillon nutritif (cœur et cervelle) et incubées pendant 24 heures à 37°C afin d'enrichissement, ensuite un deuxième repiquage est réalisé dans des boites de pétri contenant de la gélose nutritive, puis incubées pendant 18h à 37 °C afin d'obtention des cultures jeunes. À partir de ces cultures jeunes, on prélève à

l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques et on les décharge dans 9ml de l'eau physiologique 0,9% ou de l'eau distillée stérile, puis on agite au vortex pendant quelque seconde, la densité de la suspension obtenue doit être équivalente de la solution 0,5 Mac Farland (DO correspond à une concentration de 10^6 germes /ml).

IV.2.3.3.3. Tests de l'activité antibactérienne.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits bruts des deux plantes est réalisée par la méthode de diffusion des disques, en raison de sa simplicité et son efficacité pour tester la sensibilité des bactéries. Nous avons utilisé la même méthode pour déterminer la CMI.

- Le milieu de culture gélosé Muller Hinton est coulé aseptiquement dans des boites de pétri à une épaisseur de 4mm par boite, puis laissé refroidir et solidifier sur la paillasse pendant 15 min.
- Les boites de pétri contenant de la gélose MH séché sont inoculées par écouvillonnage en prenant à l'aide d'un écouvillon stérile 100 μ l de chaque suspension bactérienne de concentration d'environ 10^6 UFC/ml préparé à partir d'une culture jeune de 18 h et en étalant à la surface par des stries sérés.
- Les disques du papier Wattman N° 4 (6 mm de diamètre) sont déposés aseptiquement à l'aide d'une pince stérile sur la gélose inoculée (6 disques par boite), puis imprégnés à l'aide d'une micropipette par 10 μ l de chaque concentration (8mg/ml, 4mg/ml, 2mg/ml, 1mg/ml, 0,5mg/ml et 0,25mg/ml) de chaque extrait.
- Les boites de pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 30min, puis incubées à l'étuve à une température de 37°C pendant 24h. L'expérience est répétée trois fois pour chaque extrait et pour chaque souche bactérienne pour minimiser les erreurs expérimentales.
- Dans les boites de contrôle, des disques trempés de DMSO sont utilisés comme contrôle négatif et des disques standards d'antibiotiques sont utilisés comme contrôle positif.
- La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition déterminé par les différentes concentrations des différents extraits autour des disques à l'aide d'une règle en mm. D'après (De Billerbeck, 2007), les résultats sont

exprimés selon trois niveaux d'activité :

- résistant(-) ($D < 6\text{mm}$).
- intermédiaire(+) ($6\text{mm} < D < 13\text{mm}$).
- sensible (++) ($D > 13\text{mm}$).

IV.2.3.4.Evaluation de l'activité antifongique.

L'activité antifongique des différents extraits des deux plantes a été réalisée contre une seule souche fongique qui est la levure *Candida albicans* en utilisant la méthode de diffusion des disques. Même opération décrit auparavant mais dans ce cas La souche est inoculée sur gélose saboraud. Après incubation de 18 à 24 heures à 37°C, un inoculum est préparé dans l'eau physiologique, jusqu'à une densité de 10^6 UFC/ml, puis l'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur des boîtes de pétri coulés par le Mueller-Hinton. La lecture est faite après 48 h d'incubation à 37°C en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition, déterminé par les différentes concentrations des différents extraits.

IV.2.4.Evaluation de l'activité antioxydante.

IV.2.4.1.Test au DPPH.

La capacité antioxydante des extraits des deux plantes est déterminée selon la méthode de Zellagui et al.,[2012b](#), avec quelques modifications, 10 μl de chaque dilution de ces extraits, (1M, 10^{-1}M , 10^{-2}M , 10^{-3}M , 10^{-4}M et 10^{-5}M), est ajouté à 1ml de solution éthanolique de DPPH (0.004%), La mesure de la variation de l'absorbance a été faite 5 min pendant l'introduction des cuves dans le spectrophotomètre UV-Visible (SHIMATZU) à 517 nm contre un blanc qui contient de l'éthanol pur. Répéter les mêmes opérations en remplaçant Les extraits par l'acide ascorbique (control positif). Les valeurs obtenues sont transformées ensuite en pourcentages d'inhibition en utilisant la formule suivante

$$\text{I\%} = \frac{[\text{Abs contrôle} - \text{Abs test}]}{\text{Abs contrôle}} \times 10$$

V. Résultats et discussion.

V.1.Rendement d'extraction.

V.1.1.Les huiles essentielles.

L'extraction des huiles essentielles des deux plantes a été réalisée par l'hydrodistillation en utilisant la plante entière et pendant la période de floraison. Nous avons obtenu une huile de couleur jaune chez la plante *Pulicaria arabica* et une huile de couleur verte chez la plante *Rhanterium adpressum* avec une odeur caractéristique des deux plantes. Les rendements en huile essentielle ont été calculés en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne de la plante, le tableau 9 et la figure 39 représentent les rendements obtenus.

Tableau 9: Rendement en huile essentielle des deux plantes.

Huile essentielle	<i>Rhanterium adpressum</i> Coss. & Durieu	<i>Pulicaria arabica</i> (L.) Cass
Rendement %	0,16	0,30

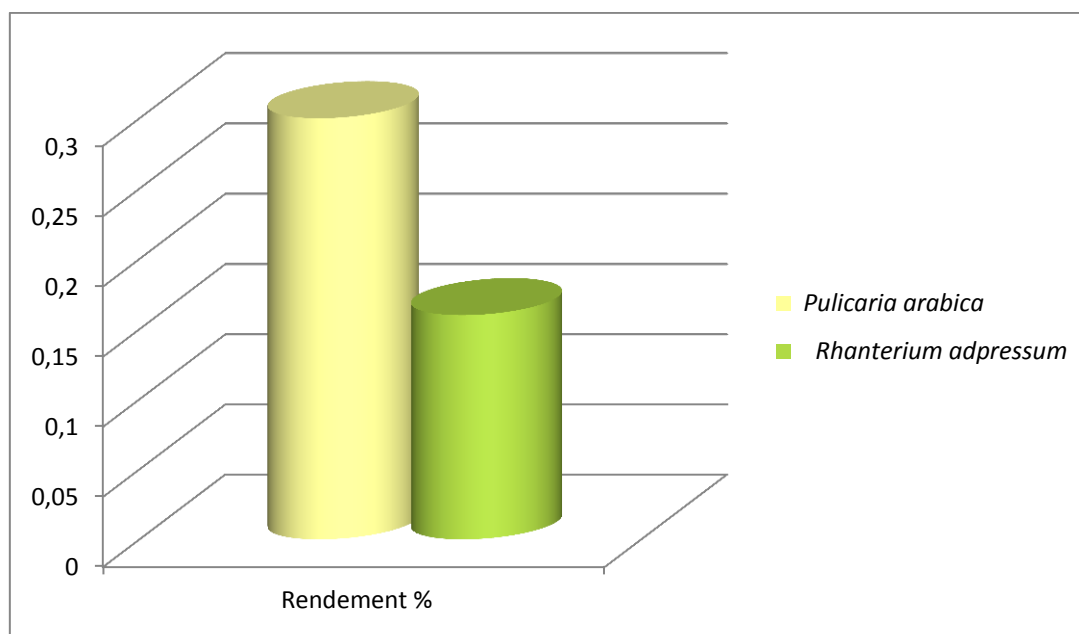


Figure 39 : Pourcentage en HE des deux plantes obtenus par l'hydrodistillation.

Selon la figure 39, La plante *Pulicaria arabica* a fourni un rendement d'environ 0,30% plus élevé que celui obtenu à partir de la plante *Rhanterium adpressum* qui est de 0,16% pour le même poids de la matière sèche (100g) et la même méthode d'extraction

(l'hydrodistillation) ce qui signifie que les rendements dépendent avant tout de type des plantes misent en ouvres.

Comparativement aux données de la littérature (Kala et al.,2009) et le résultat de notre travail concernant le rendement en huile essentielle de la même espèce (*Rhanterium adpressum*), On a remarqué que ce dernier est différent sachant que la récolte des deux échantillons de la plante à été réalisée dans la même période (mois d'avril et pendant la floraison) dans deux régions différentes (Ghardaïa et Biskra) et l'extraction a été réalisé par deux procédés l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation, ce qui confirme que la région influence sur la sécrétion en huile d'une plante aromatique ainsi que les procédés d'extraction.

Il faut noter que le rendement des HEs dépendent de plusieurs facteurs à savoir l'espèce, le milieu de récolte, la période de récolte, les pratiques culturales et la technique d'extraction (Benayad, 2008).

V.1.1.2.Les extraits organiques.

Chaque extrait organique a été caractérisé par son rendement. Les résultats sont présentés dans le Tableau 10 et la figure 40.

Tableau 10: Rendement de différents extraits bruts des deux plantes.

Extrait	Rendement %	
	<i>Pulicaria arabica</i> (L.) Cass	<i>Rhanterium adpressum</i> Coss.& Durieu
EMeOH	8.50	7.90
EDCM	2.52	1.24
En-hex	1.64	1.12

EMeOH : Extrait méthanolique, **EDCM**: Extrait chloroformique, **En-hex**: Extrait n- hexanique.

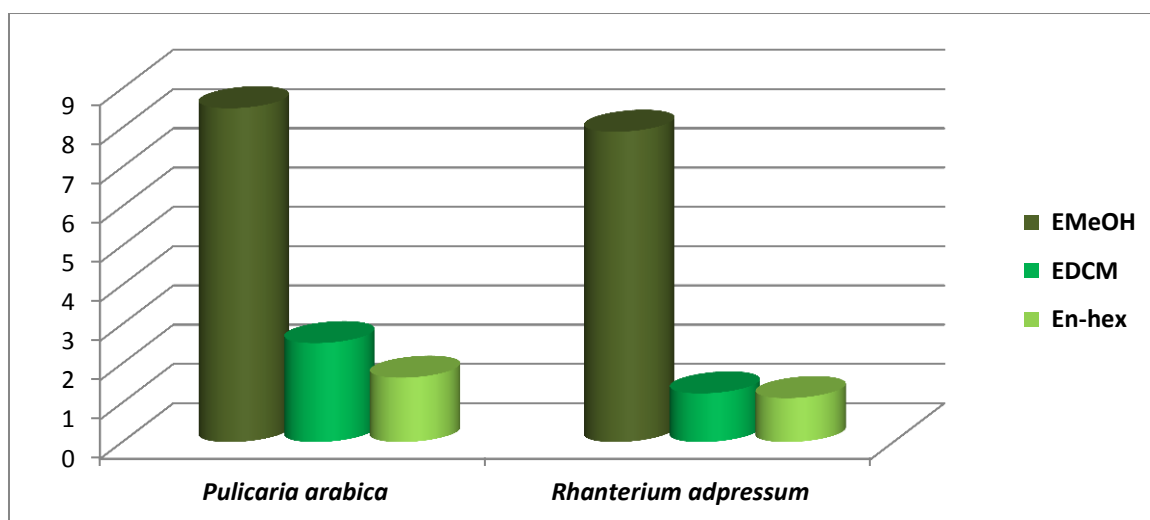


Figure 40 : Pourcentage des extraits bruts des deux plantes.

Le rendement de l'extraction méthanolique (8.50%, 7,90%) de *Pulicaria arabica* et *Rhanterium adpressum* respectivement est supérieur à celui de l'extraction chloroformique et n-hexanique des deux plantes ce qui signifie que l'extraction avec les solvants polaires donne un rendement plus important que l'extraction avec les solvants apolaires, Les solvants alcooliques sont capables d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires en facilitant l'extraction d'un plus grand nombre de molécules polaires, de moyenne et de faible polarité (Seidel, 2005).

D'une manière générale, les teneurs en extraits varient non seulement d'une plante à une autre de la même famille mais également en fonction du solvant d'extraction utilisé.

V.2.Résultat d'analyse des huiles essentielles.

V.2.1.La plante *Pulicaria arabica*.

Le résultat d'analyse par CG/SM de l'huile essentielle extraite à partir de la partie aérienne sèche de *Pulicaria arabica* (L.) Cass est présenté dans la figure 41 et le tableau 11.

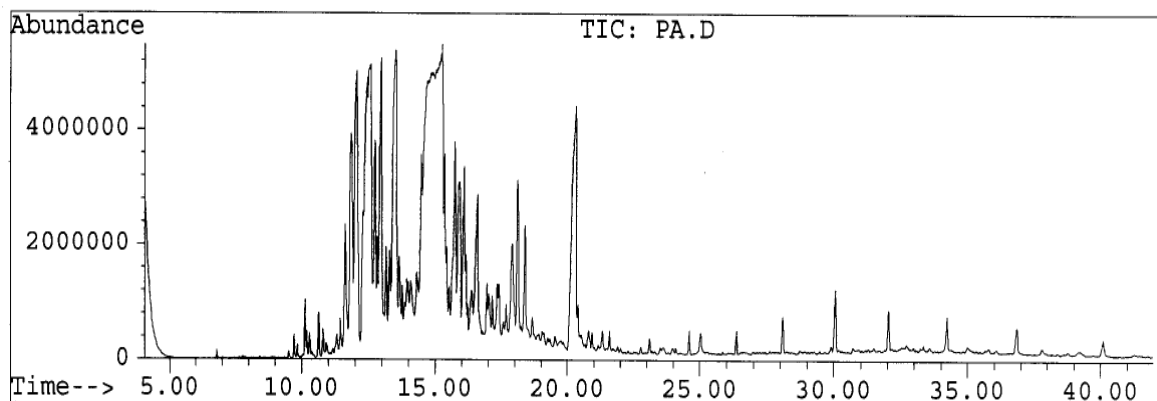


Figure 41: Profil chromatographique de l'huile essentielle de *Pulicaria arabica*(L.) Cass.

Tableau 11: Résultat d'analyse de l'huile essentielle de *Pulicaria arabica* de l'Algérie.

N°	T.R (min)	Composés	Famille	Formule	%
1	10,13	α -Copaene	Sesquiterpène hydrocarboné	$C_{15}H_{24}$	0,22
2	11,64	1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-Naphthalene	Monoterpène hydrocarboné	$C_{10}H_{16}$	1,88
3	11,86	β -Cubebene	Sesquiterpène hydrocarboné	$C_{15}H_{24}$	4,04
4	12,05	α -Muurolene	Sesquiterpène hydrocarboné	$C_{15}H_{24}$	5,94
5	12,57	Δ -Cadinene	Sesquiterpène hydrocarboné	$C_{15}H_{24}$	13,00
6	12,75	Naphthalene,1,2,4a,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-	Sesquiterpène hydrocarboné	$C_{15}H_{24}$	2,36
7	12,97	Ethyl-Cyclohexane	Alcane	C_8H_{16}	4,42
8	13,16	Naphtalène,1, 2,Dihydro-1,1,6-Trimethyl-	Hydrocarbure aromatique	$C_{13}H_{16}$	0,97
9	13,29	Valencene	Sesquiterpène hydrocarboné	$C_{15}H_{24}$	1,01
10	13,52	β -Bourbonene	Sesquiterpène hydrocarboné	$C_{15}H_{24}$	7,34
11	13,65	1-Dodecen-3-yne	Alkyne	$C_{12}H_{20}$	1,04
12	14,49	1-Naphtalenol,Decahydroxy-4a-méthyl-	Sésquiterpène oxygéné (alcool)	$C_{15}H_{26}O$	2,63
13	14,90	Bicyclo (4,4,0) Dec-1-ene,2-Isopropyl-5-methyl-9-methylene	Sésquiterpène hydrocarboné	$C_{15}H_{24}$	17,23
14	15,27	1H-Indene ,1-ethylideneoctahydro-	Hydrocarbure aromatique	$C_{11}H_{18}$	13,24
15	15,35	1-phenyl-Bicyclo(3.3.1)nonane	Hydrocarbure aromatique	$C_{15}H_{20}$	1,93
16	15,75	Trans-Caryophyllene	Sesquiterpène hydrocarboné	$C_{15}H_{24}$	3,40
17	15,94	β -Ionone	Cétone	$C_{13}H_{20}O$	3,09
18	16,10	(3S-(3.alpha.,3a.alpha.,6.alpha.,8a.alpha.))-octahydro-7,7-dimethyl-8-methylene-1H-3A,6-methanoazulene-3-carboxylic acid	Sésquiterpène oxygéné (acide)	$C_{15}H_{22}O_2$	2,38
19	16,59	2-ethyl-4,5-dimetylPhenol	Monoterpène	$C_{10}H_{14}O$	2,59

			oxygéné (phénol)		
20	17,92	1-(2,3,4)trimethylphenyl,Ethanone	Cétone	C ₁₁ H ₁₄ O	1,75
21	18,13	4a(2H)-Naphthalene carboxaldehyde	Aldéhyde	C ₁₁ H ₈ O	1,62
22	18,41	Bicyclo(3.1.1)heptane,6-méthyl-2-méthylène-6-(4-méthyl-3-pentenyl)-,(1S,5S,6R)	Sesquiterpène hydrocarboné	C ₁₅ H ₂₄	1,40
23	20,32	3,7-diméthyl-1,3,6-octatriène (β-Ocimène)	Monoterpène hydrocarboné	C ₁₀ H ₁₆	5,89
24	30,07	Pentacosane	Alcane	C ₂₅ H ₅₂	0,62
				Total	99,99

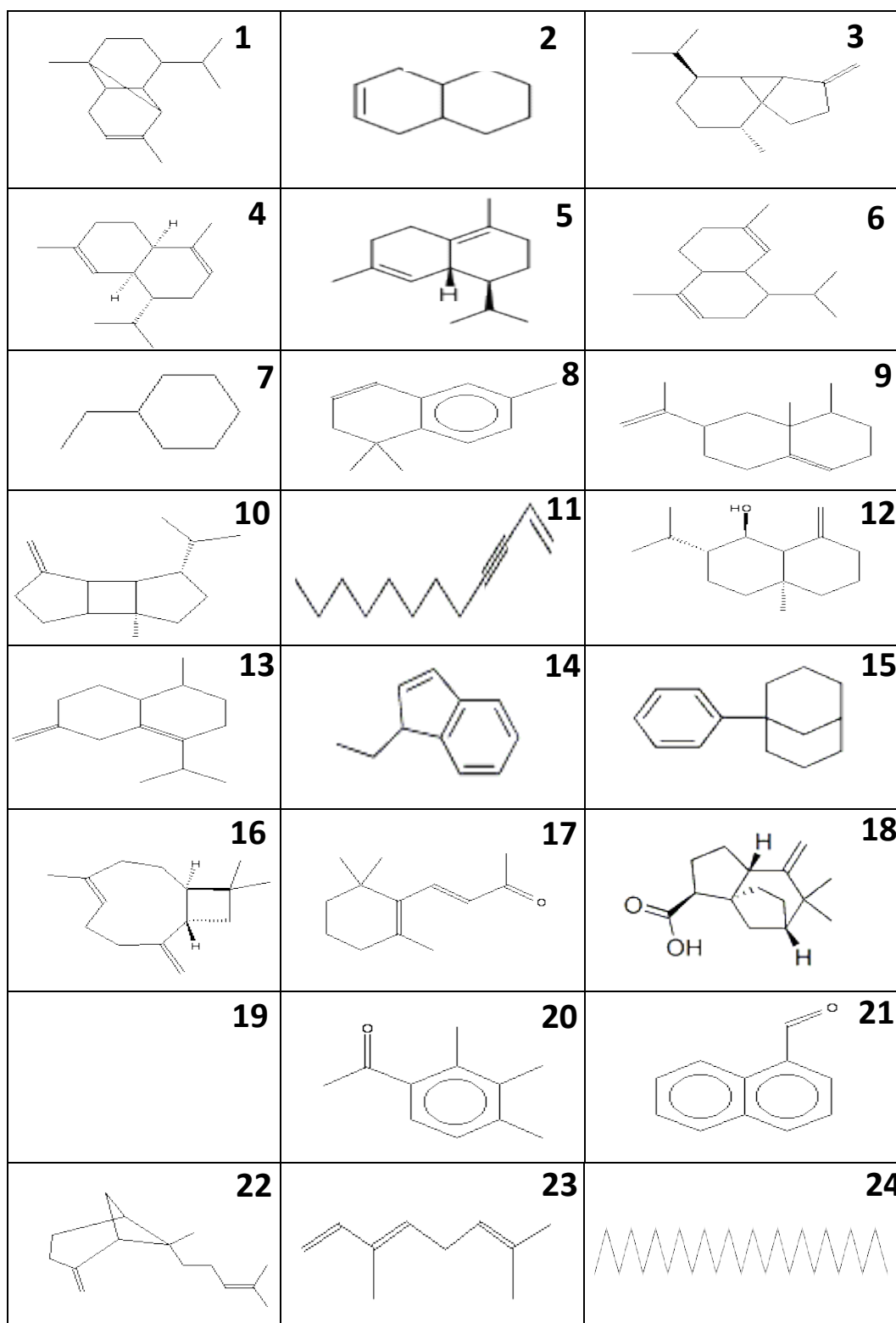


Figure 42: Les composés en formules topologiques identifiés dans l'huile essentielle de *Pulicaria arabica* de l'Algérie(NIST).

L'huile essentielle obtenue par l'hydrodistillation de la partie aérienne sèche de l'astéracée algérienne *Pulicaria arabica* (L.) Cass est analysée par CG/SM, le résultat d'analyse révèle la présence de vingt quatre composés sont identifiés par comparaison de leurs données spectrales et leurs temps de rétention avec ceux des composés de référence et les banques de données (Weily138.L ; NIST), représentant 99,99% de l'hydodistillat. Ces composés sont surtout des sesquiterpènes hydrocarbonés (55,94%), Ceci s'accorde avec les résultats antérieurs de Mossa et al., 1987; El-Abed et al.,2010, dont les sesquiterpène hydrocarbonés occupent un pourcentage élevé de l'huile totale. L'huile essentielle de *P.arabica* de notre étude est composée principalement de Bicyclo (4,4,0) Dec-1-ene,2-Isopropyl-5-methyl-9-methylene(17,23%), 1-ethylideneoctahydro, 1H-Indene (13,24%), Δ -Cadinene (13%), β -Bourbonene (7,34%), α -Muurolene (5,94%) et β - Ocimene (5.89).

Les résultats précédemment publiés par El-Abed (El-Abed et al., 2010) sur l'analyse des huiles essentielles extraites à partir des différentes parties fraîches(racines, tiges, feuilles et fleurs) de l'astéracée tunisienne *P.arabica*, ont permis d'identifier de 95 composants, une composition différente quantitativement et qualitativement de notre essence , à l'exception de la présence de quatre composées communes, α -Muurolene, Valencene, Trans-caryophyllene, β -Cubebene et avec des pourcentages différents de la notre, les principaux constituants des huiles essentielles de *P.arabica* de la Tunisie étaient : γ -cadinene (11.75 %), δ -cadinene (9.55 %), α -Cadinol (8.59%), Valencene (3.50%) chez les fleurs ; thymol (15.22 %), δ -cadinene (9.12 %), τ -cadinol (6.65 %) chez les tiges ; α -Cadinol (10.31%), τ -Cadinol (8.04%) δ -Cadinene (7.89%) chez les feuilles; α -cadinol (2.9%), thymol (2.45%) chez les racines. Ces résultats prouvent que la composition chimique de l'huile essentielle de la même espèce varie selon l'origine géographique. On peut constater également que l'effet de période du séchage de la matière végétale de *P.arabica* a une influence sur la composition chimique de l'huile essentielle. Le phénomène de variation de la composition chimique en fonction du séchage a été signalé la première fois par Baritoux et al., 1992 sur *Ocimum basilicum* de la France. Les auteurs ont montré, que le séchage des feuilles provoquait la diminution des taux d'eugénol et de méthylchavicol, par contre ceux de linalol et de 1,8-cinéole augmentait dans le même temps. D'autre étude rapportée par Dabire et al., 2011 sur *Ocimum basilicum* du Burkina Faso a montrée une modification de la composition chimique de l'huile essentielle des feuilles, Cette modification était

remarquable au niveau des deux composés majoritaires (linalol et eugénol) de l'huile essentielle : le taux linalol augmentait et passait de 48% à 80% tandis que celui de l'eugénol baissait de 27% à 0,6% après 23 jours de séchage à l'abri du soleil.

Le genre *Pulicaria* englobe nombreuse espèces se caractérisent par la différence de la composition chimique de leurs huiles essentielles, les données de la littérature confirment cette différence, *P. odora* du Maroc se caractérise par la dominance des monoterpènes oxygénés, Thymol (47.83%), isobyrate thymol (30.05%) (Hanbali et al., 2005); pour *P. jaubertii* croissant au yemen, les composés majoritaires sont carvotanacetone (63.69%), 1-méthyl-1,2-propanedione (5,89%), acide hexadecanoïque (3.99%), 2,5-dimethoxy-para-cymene (30,31%) et Ar-curcumene (3,28%) (Algabr et al., 2012), *P. laciniata* de la Tunisie, Les composés les plus représentatifs sont α -pinène (36,9%), terpinène-4-ol (31,1%), (E)-caryophyllène (7,7%) et 4,6,9-triméthyldec-8-en-3, 5 – dione (6,3%) (Hichri et al., 2009), En Soudan ,l'huile essentielle de *P. undulata* est riche en monoterpènes oxygénés qui constituent 68,28% dans laquelle (+)-carvotanacetone (55,87%) est le principal constituant (El Kamali et al, 2009) ,*P. gnaphalodes* de Iran, les composés majoritaires de son huile essentielle sont chrysanthenylacetate (22.38%), 2L -4L-dihydroxy eicosane (18.5%), verbenol (16.59%),dehydroaromadendrene (12.54%), β -pinene (6.43%),et 1,8 cineol (5.6%) (Khani et Asghari ,2012),

Les variations rencontrées dans la composition chimique des huiles essentielles, du point de vue qualitatif et quantitatif, peuvent être dues à certains facteurs écologiques, à la partie de la plante utilisée, à l'âge de la plante et à la période du cycle végétatif, au séchage, au lieu de séchage, ou même à des facteurs génétiques (Amarti et al., 2009, Svoboda et Hampson, 1999).

V.3. Résultats du test du pouvoir antimicrobien.

V.3.1. L'activité antibactérienne.

V.3.1.1. Identification des souches étudiées.

L'étape de caractérisation des bactéries n'est pas l'objectif de ce présent travail, mais on trouve que c'est important de contrôler la pureté des souches utilisées et donc d'assurer une activité correcte.

V.3.1.1.1. Caractères morphologique et culturaux.

L'ensemencement des souches bactériennes sur leurs milieux sélectifs donne les observations notées dans le tableau 12:

Tableau 12: Aspect des colonies des souches sur le milieu de culture.

Souches bactériennes	Milieux de cultures	Aspect macroscopique des colonies
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Gélose Hecktoen	Des colonies jaunes
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Gélose Nutritive	Des colonies vertes
<i>Klebseilla pneumoniae</i>	Gélose Hécktoen	Des colonies brillantes
<i>Salmonella typhi</i>	Gélose SS	Un tapie Jaune
<i>Citrobacter freundii</i>	Gélose Hecktoen	Des colonies jaunes
<i>Enterobacter.sp</i>	Gélose Hecktoen	Des colonies jaunes
<i>S.aureus</i> ATCC 43300 et ATCC 25923	Gélose Chapman	Des colonies jaunes doré
<i>Staphylocoque dore</i>	Gélose Chapman	Des colonies dorées
<i>Streptococcus groupe D</i>	Gélose Nutritive	Des petites colonies jaunes

Les résultats de coloration de Gram sont représentés dans le tableau 13.

Tableau 13: La coloration de Gram des souches testées.

Souches bactériennes	Coloration de Gram	Forme des cellules
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Rose → Négatif	Coccobacilles
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Rose → Négatif	Bacilles
<i>Klebseilla pneumoniae</i>	Rose → Négatif	Coccobacilles
<i>Salmonella typhi</i>	Rose → Négatif	Coccobacilles
<i>Citrobacter freundii</i>	Rose → Négatif	Bacilles
<i>Enterobacter.sp</i>	Rose → Négatif	Bacilles
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	Violet → Positif	Cocci en grappe de raisin
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	Violet → Positif	Cocci en grappe de raisin
<i>Staphylocoque doré</i>	Violet → Positif	Cocci en grappe de raisin
<i>Streptococcus groupe D</i>	Violet → Positif	Cocci en chaînette

V.3.1.1.2. Identification biochimiques.

Les résultats de glerie Api 20E pour l'identification biochimiques des entérobactéries: *Kleibseilla pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *E.coli*, *Citrobacter freundii* et *Enterobacter.sp* sont représentés dans les figures 43-47 et le tableau 14:

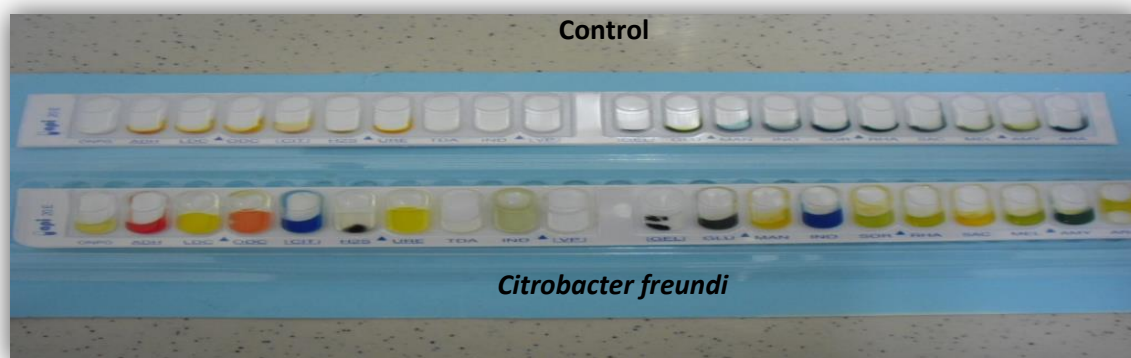


Figure 47: Résultat de la galerie Api 20E de *Citrobacter freundii*.

Tableau 14: Caractéristiques biochimiques des bactéries identifiées par système Api 20E.

	ONP G	AD H	LD C	OD C	CI T	H2 S	UR E	TD A	IN D	V P	GE L	GL U	MA N	IN O	SO R	RH A	SA C	M EL	AM Y	AR A
1	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
2	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
3	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
5	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+

Légende.1. *Escherichia coli* ATCC 25922 ; 2. *Salmonella typhi* ; 3. *Klebsilla pneumoniae*. 4. *Enterobacter.sp* ; 5. *Citrobacter freundii*. (+) : réponse positive au test ; (-) réponse négative au test ; ONPG: ortho-nitro-B-D-galactopyranoside ; ADH: arginine ; LDC: lysine ; ODC: ornithine ; CIT: citrate de sodium ; H2S: thiosulfate de sodium ; URE: urée ; TDA: tryptophane ; IND: tryptophane ; VP: créatine pyruvate de sodium ; GEL: gélatine de Kohn, GLU: glucose ; MAN: mannitol ; INO: inositol ; SOR: sorbitol ; RHA: rhamnose ; SAC: saccharose ; MEL: melibiose ; AMY: amygdaline ; ARA: arabinose. ATCC : American Type Culture Collection.

V.3.1.1.3. AntibioGramme.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des différents antibiotiques testés, nous a permis de mettre en évidence différents niveaux d'activité de ces composés sur les souches bactériennes. Les résultats obtenus sont rapportés dans les tableaux 15,16 et les figures 48,49.

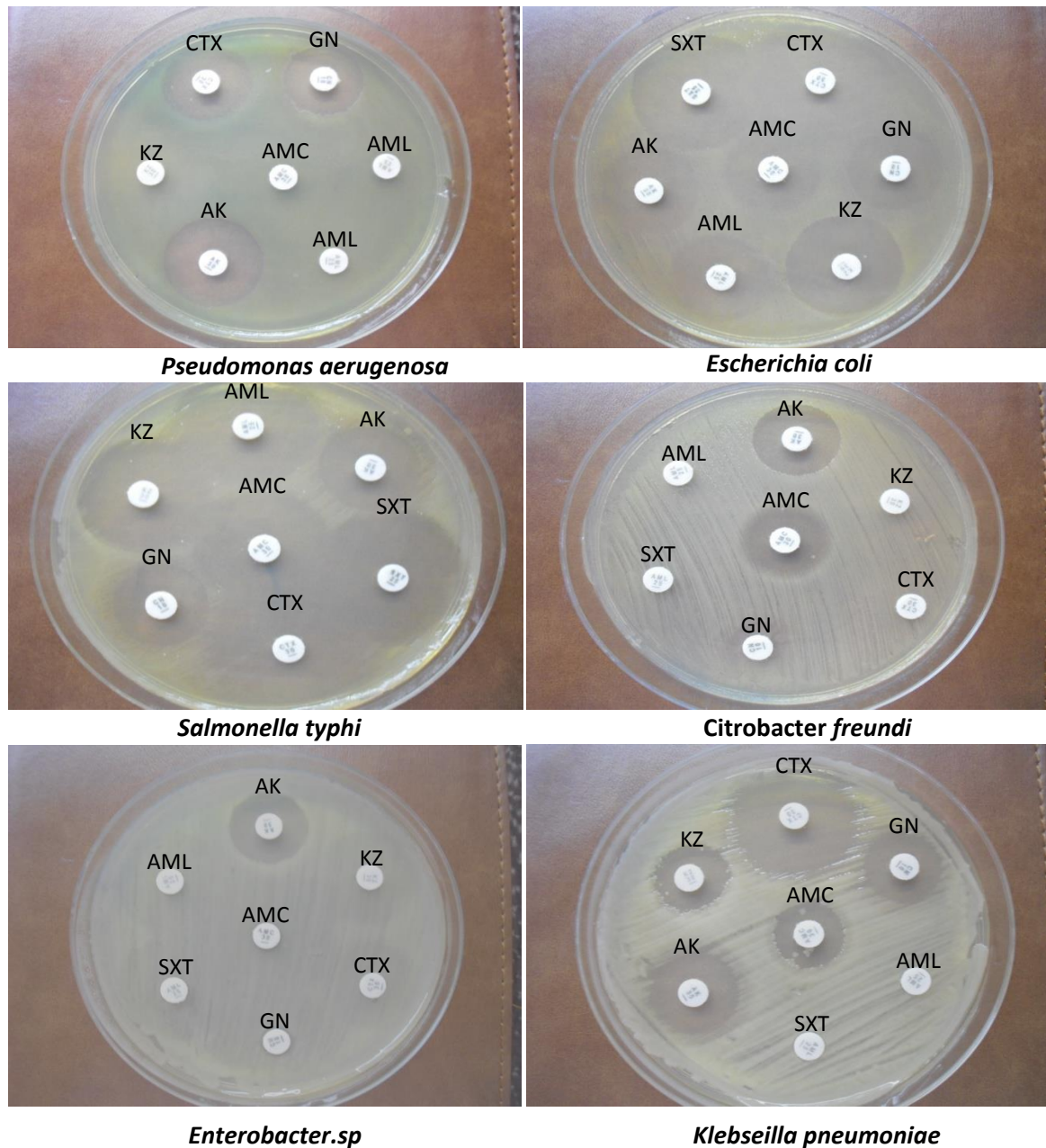


Figure 48: Effet des ATB sur la croissance des bactéries à Gram négatif.

Tableau 15: Résultats d'antibiogramme chez les bactéries à Gram(-).

Souches testées	Diamètre de la zone d'inhibition en mm													
	Antibiotiques													
	AML	AMC	AK	SXT	KZ	CTX	GN	AML	AMC	AK	SXT	GN		
<i>E. coli</i> ATCC 25922	21	S	22	S	21	S	29	S	25	S	30	S	20	S
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0	R	0	R	22	S	0	R	0	S	18	I	18	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	R	15	I	19	S	0	R	15	I	28	S	16	S
<i>Salmonella typhi</i>	29	S	26	S	21	S	34	S	29	S	35	S	20	S
<i>Citrobacterfreundii</i>	6	R	19	I	19	S	6	R	6	R	6	R	14	I
<i>Enterobacter.sp</i>	6	R	6	R	18	S	6	R	6	R	6	R	6	R

Légende : S :sensible ;R :résistante ;AML: Amoxicilline ;AMC : Augmentin; AK : Amikacine ; SXT :Cotrimoxazole;KZ :Cefazoline ;CTX :Céfotaxime ;GN :Gentamycine;S:Sensible ;R :Resistante ;I :in termediaire .

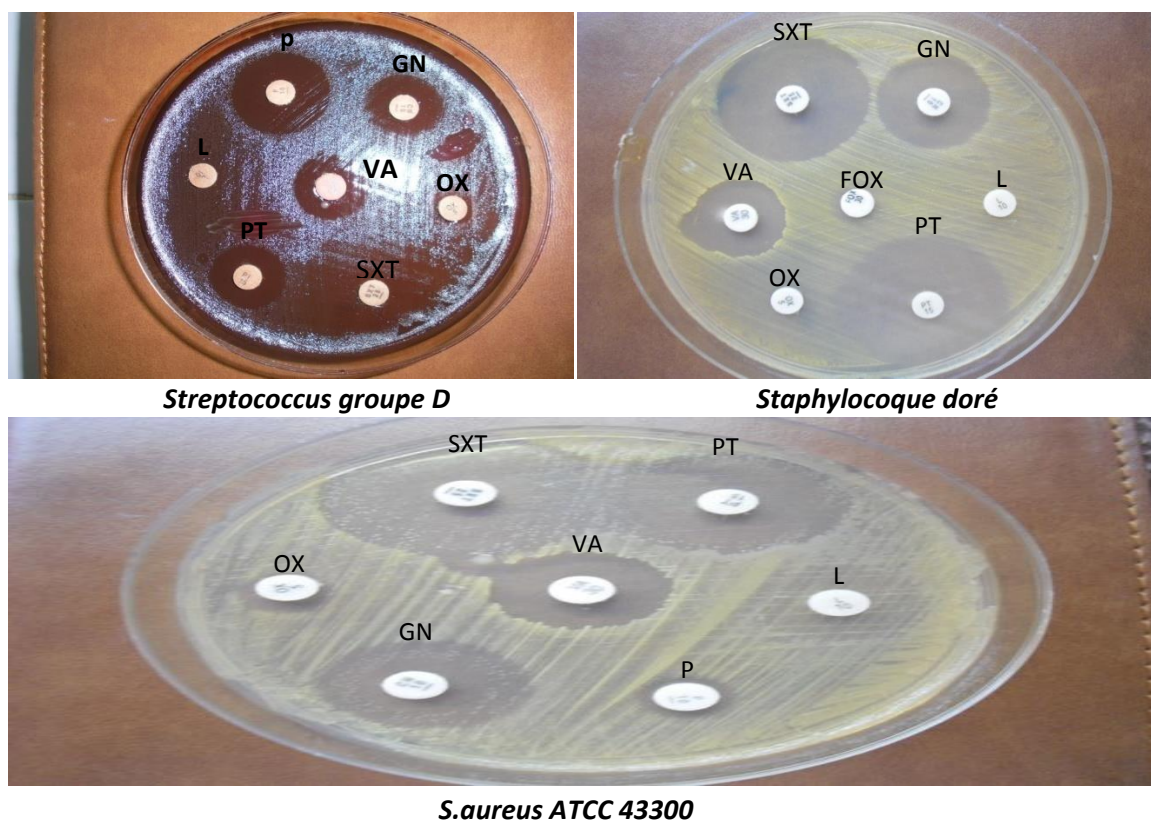


Figure 49: Effet des ATB sur la croissance des bactéries à Gram positif.

Tableau 16: Résultat d’antibiogramme chez les bactéries à Gram(+).

Souches testées	Diamètre de la zone d’inhibition en mm															
	Antibiotiques															
	PT		P		L		VA		GN		OX		FOX		SXT	
<i>S.aureus ATCC 43300</i>	29	S	6	R	6	R	18	S	20	S	6	R	NT	NT	32	S
<i>S.aureus ATCC 25923</i>	29	S	6	R	6	R	18	S	20	S	6	R	NT	NT	32	S
<i>Staphylocoque doré</i>	33	S	NT	NT	6	R	27	S	22	S	6	R	6	R	30	S
<i>Streptococcus groupe D</i>	17	R	22	I	6	R	15	I	17	S	6	R	NT	NT	6	R

Légende : S :sensible ;R :résistante ;PT :Pristinamicyne ;P:Pénicilline ;L:Lincomycine ;VA :Vancomycine ;GN :Gentamycine ;OX :Oxacilline ;FOX :Céfoxitine ;SXT :Cotrimoxazole,NT :Non traité.

On observe que les différentes souches de bactéries étudiées réagissent différemment aux antibiotiques testés. Parmi les souches étudiées *Pseudomonas*, *Enterobacter* et *Citrobacter* se révèlent multirésistantes.

❖ Bactéries à Gram (-) :

Si l'on considère l'ensemble de ces résultats, il ressort que parmi les antibiotiques actifs : l'amikacine, la gentamycine, céfotaxime agit sur la plupart des souches, par contre, l'amoxicilline, est moins actif par rapport les autres antibiotiques.

En ce qui concerne la réactivité des espèces, on constate une grande sensibilité de *Salmonella* et d'*E.coli* à la plupart des antibiotiques, par contre les souches *Enterobacter*, *Pseudomonas* et *citrobacter* se révèlent très résistantes, tandis que la souche *Klebseilla* est uniformément intermédiaire vis-à-vis des antibiotiques testé.

❖ Bactéries à Gram (+) :

Selon nos résultats on a remarqué que, les staphylocoques sont sensibles au gentamycine, vancomycine et pristinamycine et résistes à l'oxacilline.

V.3.1.2. Tests de l'activité antibactérienne.

V.3.1.2.1. Control négatif.

Si les extraits doivent être soumis aux essais biologiques, la toxicité du solvant peut également être critique car même en traces, le solvant ne devrait pas empêcher le procédé biologique. L'attention devrait également être prêtée aux interactions possibles entre le solvant et les corps dissous pendant que le solvant peut réagir avec certains composés pour produire des complexes ou pour causer la décomposition, la déshydratation, ou l'isomérisation de ces composés (Yrjöen, 2004). Les résultats de la figure 50 montrent que le DMSO est un solvant approprié et ne présente aucun effet sur la croissance normale des souches microbiennes.

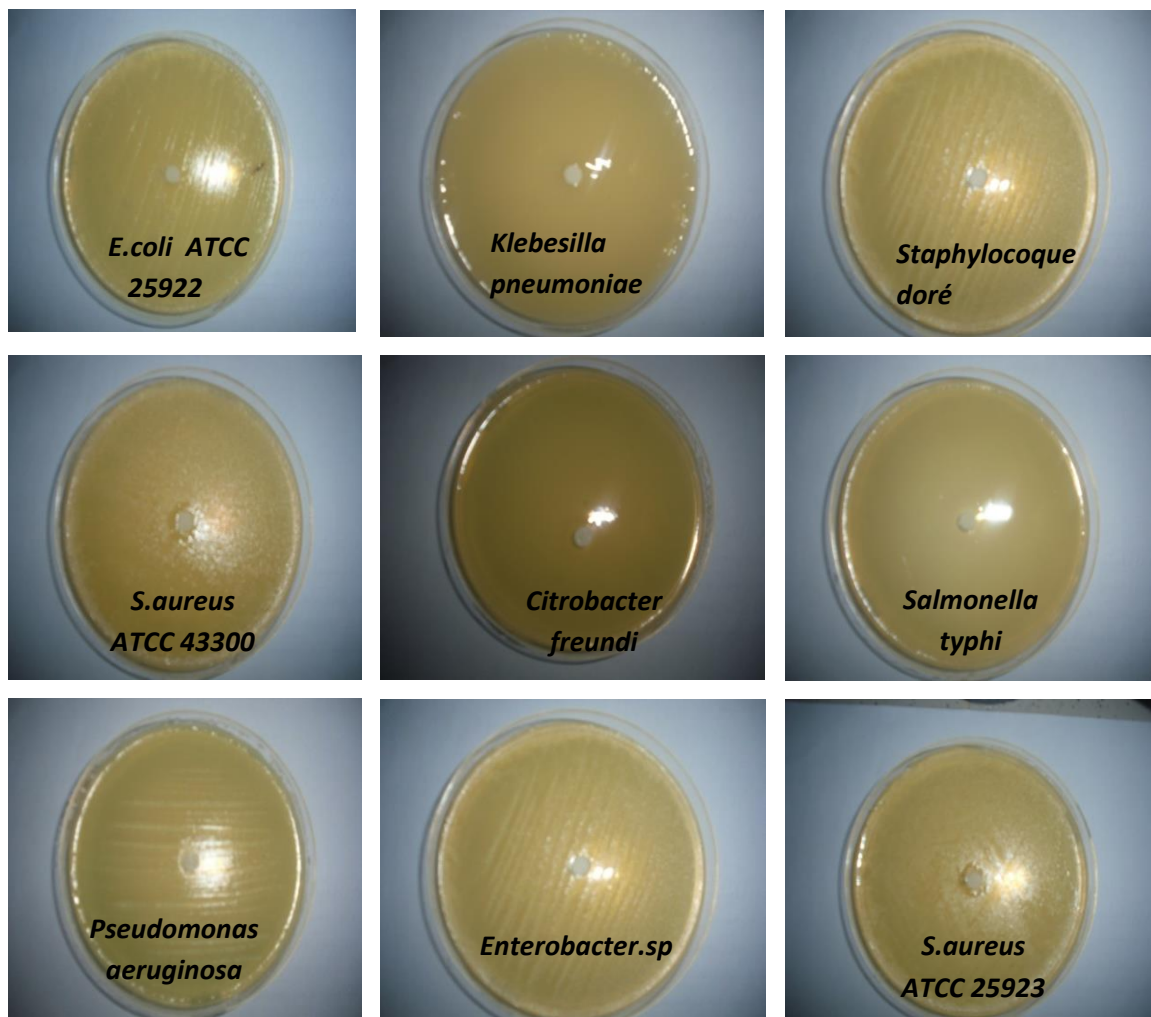


Figure 50 : Effet de DMSO sur les souches bactériennes étudiées.

V.3.1.2.2. Les extraits de *Rhanterium adpressum*.

Les résultats de l'activité antibactérienne des différents extraits de la plante *Rhanterium adpressum* obtenue par mesure des diamètres d'inhibition de la croissance des bactéries sont reportés dans les tableaux 17-20 et les figures 51-54.

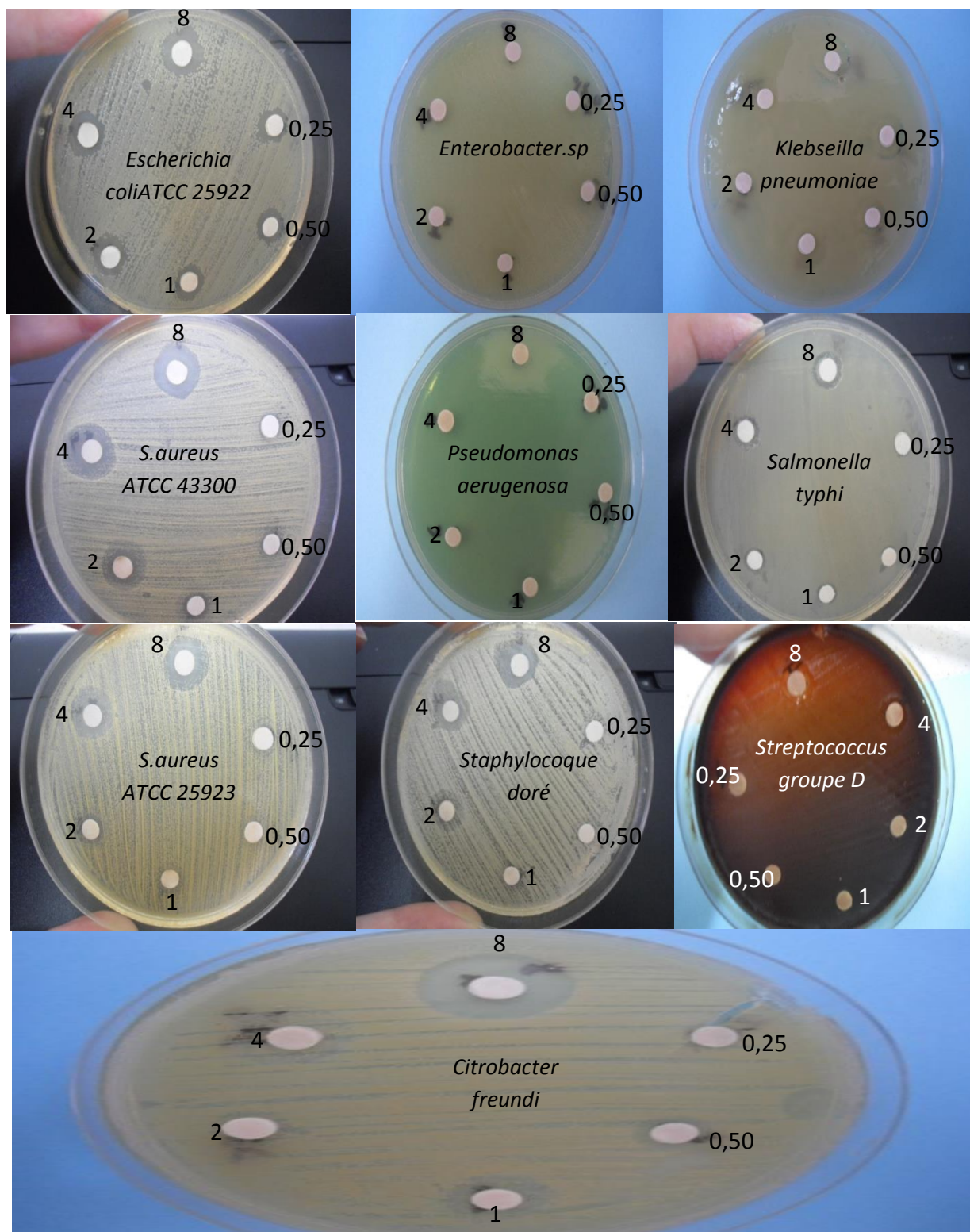


Figure 51: Effet de l'huile essentielle de *Rhanterium adpressum* sur les souches bactériennes étudiées.

Tableau 17: Diamètres des zones d'inhibitions de l'HE de *Rhanterium adpressum*.

Souches bactériennes	Diamètre de la zone d'inhibition en mm					
	Dilutions de l'HE de la plante <i>Rhanterium adpressum</i>					
	8	4	2	1	0,50	0,25
<i>E. coli</i> ATCC 25922	12,00±1,00	10,66±0,58	10,50±0,50	10,33±0,57	10,33±0,57	10,33±0,57
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-
<i>Klebseilla pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	9,33±0,58	8,33±0,58	-	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	16,66±0,76	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter.sp</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S.aureus</i> ATCC 43300	14,00±1,00	13,33±1,53	12,33±0,58	7,66±0,58	7,00±00	7,00±00
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	12,66±1,15	12,33±0,58	-	-	-	-
<i>Staphylocoque doré</i>	13,33±1,53	12,00±2,00	10,33±0,58	-	-	-
<i>Streptococcus groupe D</i>	12,00±1,00	10,00±0,00	-	-	-	-

(-) : pas d'inhibition. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± écart-type (SD).

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de la plante *Rhanterium adpressum* obtenus à l'aide de la méthode de diffusion sur milieu gélosé (aromatogramme) ont montré que l'HE a une activité contre sept souches bactériennes sur dix testés.

L'activité la plus élevée a été remarquée sur la souche *Citrobacter* dont la valeur de l'halo d'inhibition a été de 16,66 mm malgré sa grande résistance aux antibiotiques, suivie de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 avec 14 mm et *Staphylocoque doré* avec 13,33 mm ;

Une activité intermédiaire a été enregistrée avec, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (12,66 mm), *Streptococcus* groupe D (12 mm) et *Esherichia coli* (12 mm) ; Une activité faible a été remarquée avec la souche *Salmonella typhi* (9,33 mm) ;

Aucune activité n'a été observée vis-à-vis de la *Klebseilla pneumoniae*, *Enterobacter.sp* et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, ces deux souches dernières sont multirésistantes aux antibiotiques.

Nous avons remarqué aussi que quelque soit la souche bactérienne, l'activité inhibitrice est plus élevée quand l'extrait est concentré, et elle est diminuée quand il est dilué, donc l'activité est proportionnelle à la concentration.

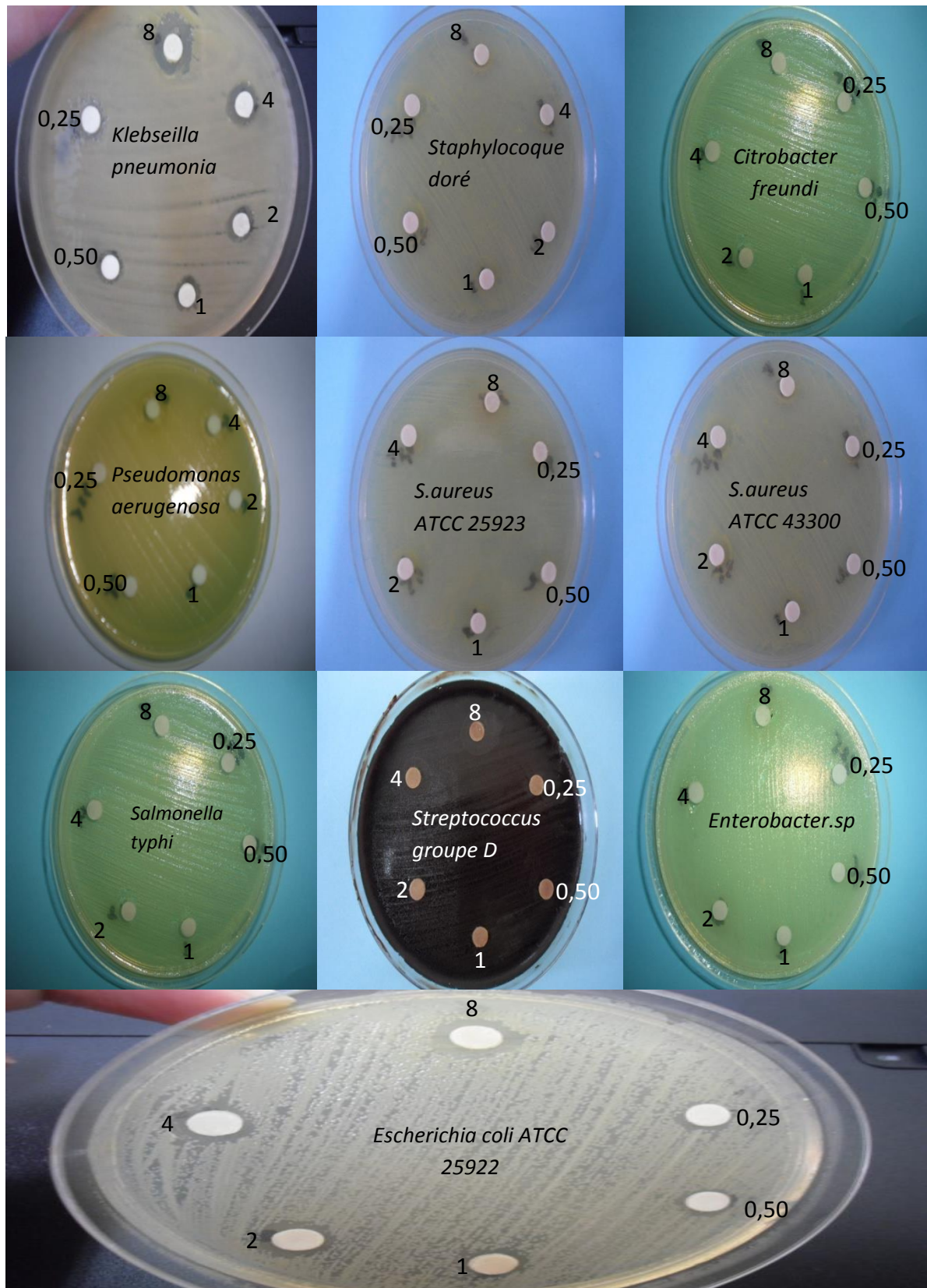


Figure 52: Effet de l'EMeOH de *Rhanterium adpressum* sur les souches bactériennes testées.

Tableau 18: Diamètres des zones d'inhibitions de l'EMeOH de *Rhanterium adpressum*.

Souches bactériennes	Diamètre de la zone d'inhibition en mm					
	Dilutions de l'EMeOH de la plante <i>Rhanterium adpressum</i>					
	8	4	2	1	0,50	0,25
<i>E. coli</i> ATCC 25922	10,00±0,00	9,33±0,58	9,00±1,00	-	-	-
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-
<i>Klebseilla pneumoniae</i>	12,66±0,58	9,66±0,58	8,66±0,58	8,00±1,00	7,33±0,58	7,00±0,00
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobactersp</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S.aureus</i> ATCC 43300	-	-	-	-	-	-
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylocoque doré</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus groupe D</i>	-	-	-	-	-	-

(-) : pas d'inhibition. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± écart-type(SD).

L'extrait méthanolique de *Rhanterium adpressum* s'est révélé actif sur seulement deux souches bactériennes à Gram négatif qui sont *E.coli* et *Klebseilla pneumoniae* avec des diamètres des zones d'inhibitions de 10,00 et 12,66 respectivement.

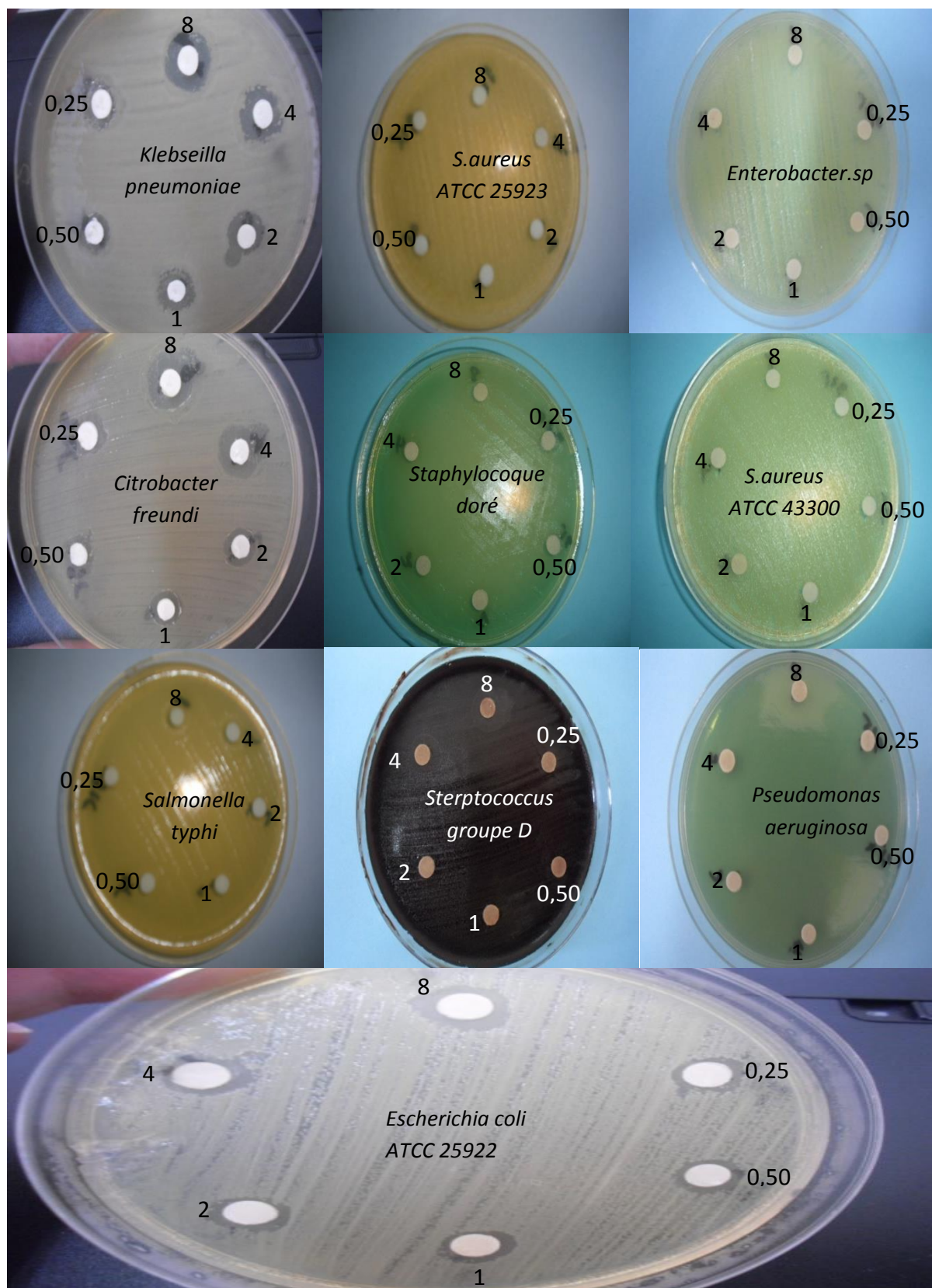


Figure 53: Effet de l'En-hex de *Rhanterium adpressum* sur les souches bactériennes étudiées.

Tableau 19: Diamètres des zones d'inhibitions de l'En-hex de *Rhanterium adpressum*.

Souches bactériennes	Diamètre de la zone d'inhibition en mm					
	Dilutions de l'En-hex de la plante <i>Rhanterium adpressum</i>					
	8	4	2	1	0,50	0,25
<i>E. coli</i> ATCC 25922	10,00±1,00	9,00±1,00	8,83±0,76	8,33±0,58	8,16±0,29	7,66±1,15
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-
<i>Klebseilla pneumoniae</i>	11,66±0,58	10,66±0,58	10,00±0,00	9,66±0,58	8,33±0,58	7,33±0,58
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	12,33±0,58	11,00±1,00	9,00±1,00	8,33±1,53	7,33±0,58	7,00±0,00
<i>Enterobactersp</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S.aureus</i> ATCC 43300	-	-	-	-	-	-
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylocoque doré</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus groupe D</i>	-	-	-	-	-	-

(-) : pas d'inhibition. Chaque valeur représente la moyennede trois essais ± écart-type(SD).

L'extrait n-hexanique de *Rhanterium adpressum* montre une activité inhibitrice contre trois souches à Gram négatif : *E.coli*, *Klebseilla pneumoniae* et *Citrobacter freundii* avec des diamètres des zones d'inhibitions de 10 ,11,66 et 12,33 respectivement.

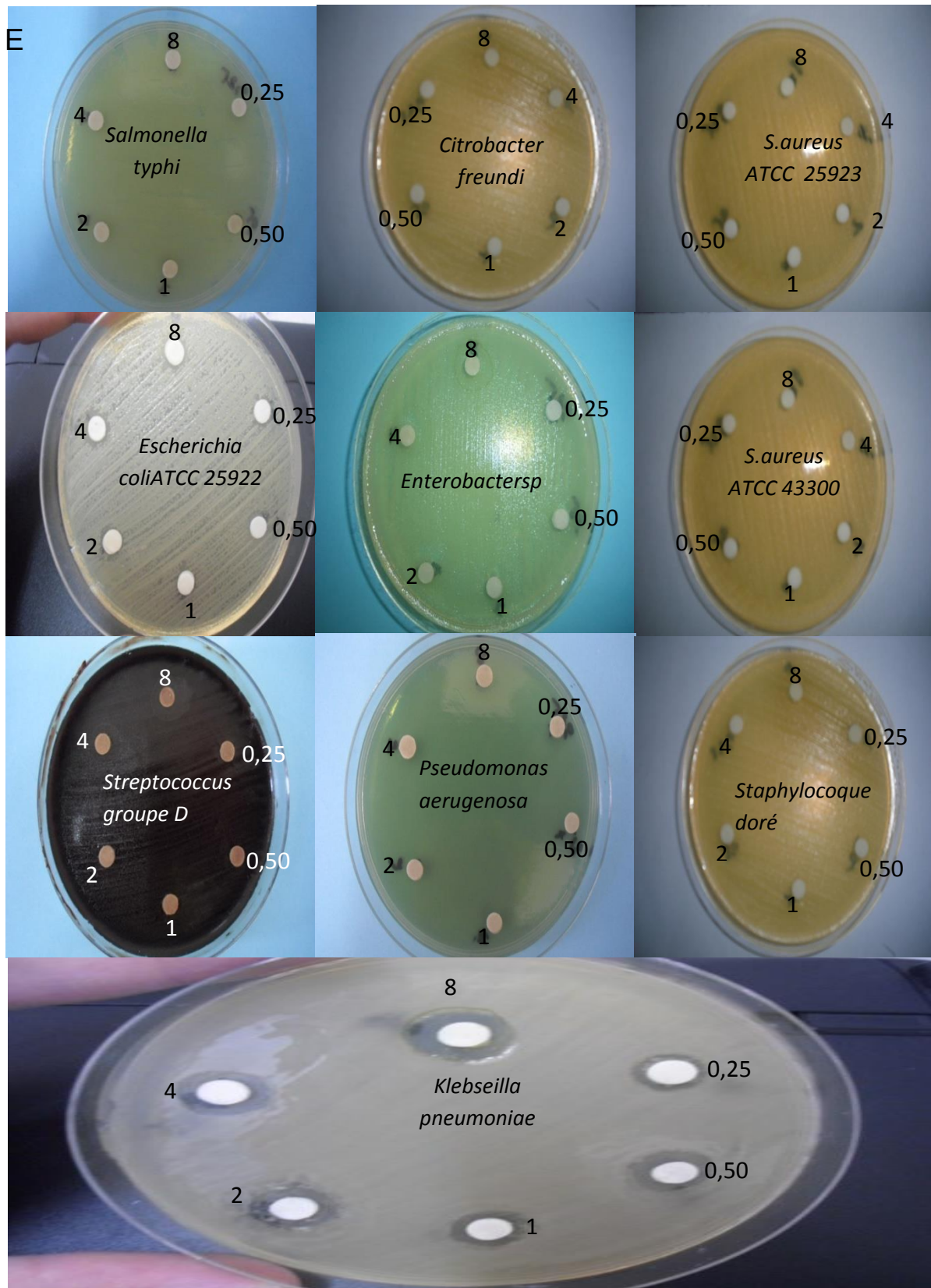


Figure 54: Effet de L'EDCM de *Rhanterium adpressum* sur les souches bactériennes étudiées.

Tableau 20: Diamètres des zones d'inhibitions de l'EDCM de *Rhanterium adpressum*.

Souches bactériennes	Diamètre de la zone d'inhibition en mm					
	Dilutions de l'EDCM de la plante <i>Rhanterium adpressum</i>					
	8	4	2	1	0,50	0,25
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-
<i>Klebseilla pneumoniae</i>	11,66±0,58	10,00±0,00	9,66±0,58	8,66±0,58	8,33±1,15	8,00±0,00
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacterfreundi</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobactersp</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S.aureus</i> ATCC 43300	-	-	-	-	-	-
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylocoque doré</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus groupe D</i>	-	-	-	-	-	-

(-) : pas d'inhibition. Chaque valeur représente la moyennede trois essais ± écart-type(SD).

L'extrait chloroformique de *Rhanterium adpressum* s'est révélé actif sur une seule souche bactérienne de Gram négatif qui est *Klebseilla pneumoniae* et la zone d'inhibition mesurée est de 11,66 avec une dose de 8mg/ml,

V.3.1.2.3. Les extraits de *Pulicaria arabica*.

Les résultats de l'activité antibactérienne des différents extraits de la plante *Pulicaria arabica* obtenue par mesure des diamètres d'inhibition de la croissance des bactéries sont reportés dans les tableaux 21-24 et les figures 55-58.

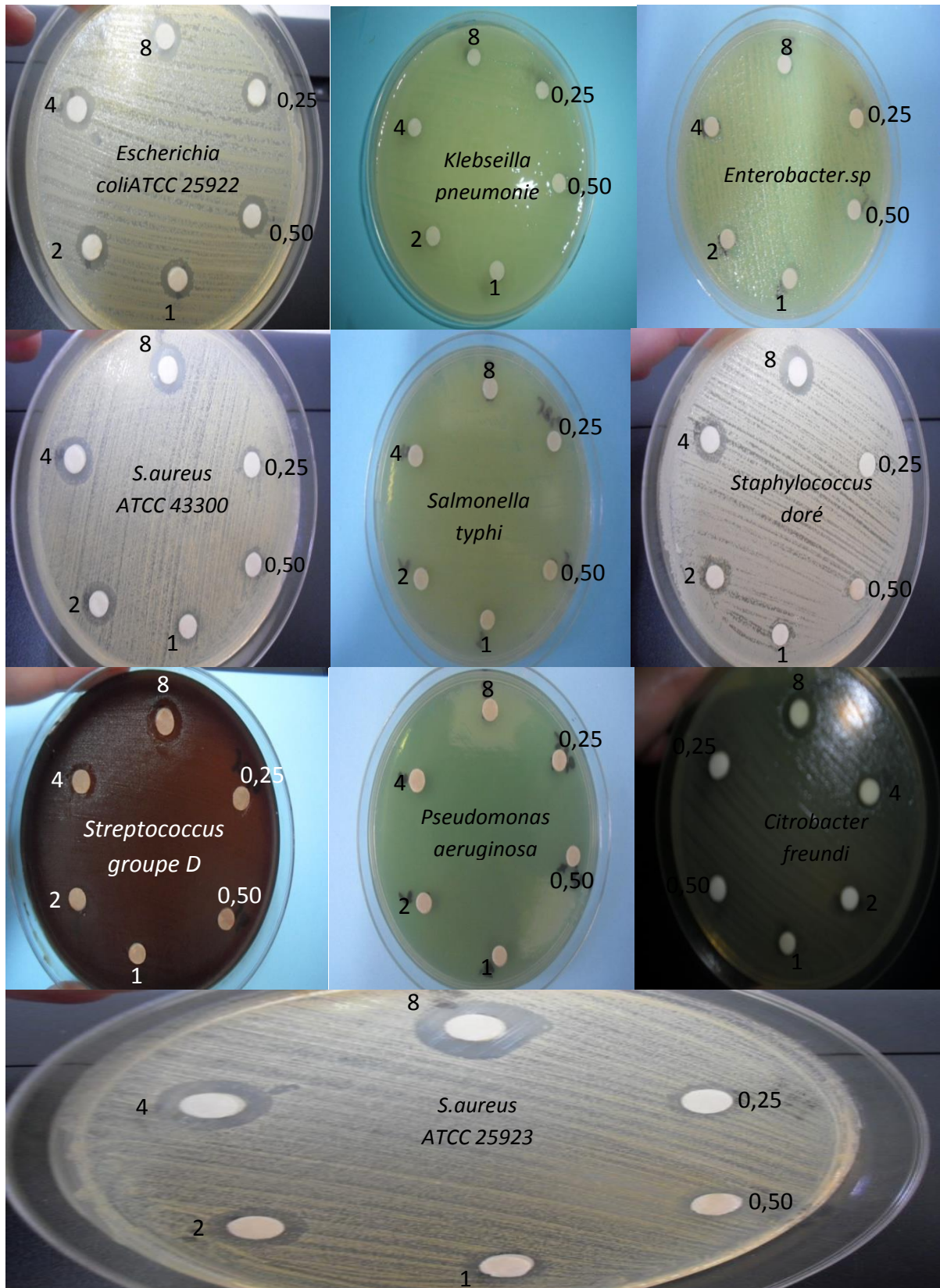


Figure 55: Effet de l'HE de *Pulicaria arabica* sur les souches bactériennes étudiées.

Tableau 21: Diamètres des zones d'inhibitions de l'HE *Pulicaria arabica*.

Souches bactériennes	Diamètre de la zone d'inhibition en mm					
	Dilutions de l'HE de la plante <i>Pulicaria arabica</i>					
	8	4	2	1	0,50	0,25
<i>E.coli</i> ATCC 25922	11,66±0,58	10,00±0,00	9,33±0,58	9,33±0,58	9,00±0,00	9,00±0,00
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-
<i>Klebseilla pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	11,66±0,58	10,33±0,58	9,66±0,58	-	-	-
<i>Enterobacter.sp</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S.aureus</i> ATCC 43300	11,66±0,58	10,00±0,00	9,66±0,58	-	-	-
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	13,00±1,00	10,66±0,58	-	-	-	-
<i>Staphylocoque doré</i>	11,33±0,58	9,66±0,58	9,00±1,00	-	-	-
<i>Streptococcus groupe D</i>	11,00±0,00	9,00±0,00	-	-	-	-

(-) : pas d'inhibition. Chaque valeur représente la moyennede trois essais ± écart-type(SD).

L'huile essentielle de la plante, *Pulicaria arabica* testée sur les différentes bactéries Gram positif et Gram négatif a présenté une action inhibitrice contre deux bactéries sur sept testés à Gram (-) qui sont *Escherichia coli* et *Citrobacter freundii* avec un diamètre d'inhibition de 11,66mm et quatre bactéries sur quatre germes testés à Gram (+)qui sont *S.aureus* ATCC 25923 ,*S.aureus* ATCC 43300,*Staphylocoque doré*, *Streptococcus groupe D* avec des diamètres d'inhibition de 13, 11,66, 11,33 et 11mm respectivement. Ce qui signifie que l'huile a montrée une activité contre les Gram(+) importante que les Gram(-) et ça que nous avons remarqué aussi chez l'huile de la plante *Rhanterium adpressum*. Ceci est expliqué, du fait que les bactéries Gram négatif sont dotées d'une couche de peptidoglycane coincé entre la membrane plasmique et une assise externe constituée de lipopolysaccharides et de protéines. Cette structure peut empêcher la prise d'huile ou protéger la couche peptidoglycane vis-à-vis des huiles. La membrane externe de LPS des bactéries gram négatif constitue une barrière à la perméabilité des substances hydrophobes, qui en entrant, empêchaient la croissance des bactéries gram négatif. Dans le cas précis des bactéries à Gram(+), la couche peptidoglycane se situe à l'extérieur, permettant ainsi à ces bactéries d'être plus disponibles à entrer en contact avec les huiles (Ferhat et al.,2010).il a été suggéré que les huiles essentielles actives contre les bactéries à Gram négatif contiennent des composants de métabolites secondaires qui ont assez petits pour passer à travers les protéines dans les récepteurs de la membrane externe et ainsi de pouvoir accéder à la membrane cytoplasmique par exemple le thymol et le carvacrol peuvent adhérer à ces bactéries par fixation aux protéines et aux lipopolysaccharides membranaires grâce à leurs

groupes fonctionnels (OH) et atteindre ainsi la membrane intérieure plus vulnérable (Doman et Deans, 2000).

On peut expliquer aussi la résistance de certaines bactéries aux HEs par la biodégradation des terpènes. Ces bactéries aérobies ainsi qu'anaérobies utilisent les terpènes comme une source de carbone et d'énergie (Malecky, 2007).

L'activité antimicrobienne d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et à leurs effets synergiques. Mais, il est probable que cette activité dépende aussi de composés minoritaires qui agissent d'une manière synergique. Les composés avec la plus grande efficacité antibactérienne et le plus large spectre sont des phénols, Les phénols entraînent notamment des lésions irréversibles sur les membranes et sont utiles dans les infections bactériennes, virales et parasitaires. Le thymol et l'eugénol sont responsables des activités fongicides et bactéricides des huiles essentielles qui en contiennent. La molécule de thymol exerce un effet inhibiteur et létal sur différentes souches et, parmi elles, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, sur les quelles elle provoque des fuites d'ions potassium. Par contre, elle n'est pas active sur *Pseudomonas aeruginosa*. Les alcools avec 10 atomes de carbone (ou monoterpénols) viennent immédiatement après les phénols, géraniol, linalool, thujanol, myrcénol, terpinéol, menthol et pipéritol sont les plus connus. Ce sont des molécules à large spectre, utiles dans de nombreuses infections bactériennes. Les aldéhydes sont également quelque peu bactéricides. Les plus couramment connus sont le néral, le géraniol, le citronnellal et le cuminal. Les composés de structure chimique semblables (hydrocarbures) sont aussi présentent un rôle important que les composés oxygénés sur l'activité antimicrobienne (Zhiri, 2006, Amaral et al., 1998, Kheyar et al., 2014). Ces composés sont présents dans l'huile essentielle de *P.arabica*, ce qui explique l'activité de cette dernière, 2-ethyl-4,5-dimethyl phenol (phénol), 4a(2H)Naphthalene carboxaldehyde (aldéhyde), 1(2,3,4) trimethylphenyl, Ethanone, β -Ionone (cétone), 1-Naphtalenol, Decahydroxy-4a-méthyl-(Alcool), Bicyclo (4,4,0) Dec-1-ene, 2-Isopropyl-5-methyl-9-methylene, Δ -Cadinene, β -Bourbonene, α -Muuroolene, β -Ocimene... ect (hydrocarbures). L'huile essentielle de *P.arabica* est ainsi attribuée au phénomène de synergie entre tous les constituants volatils. Les interactions synergiques

entre les différents composés peuvent être l'origine d'une activité beaucoup plus prononcée que celle prévisible pour les composés majoritaires.

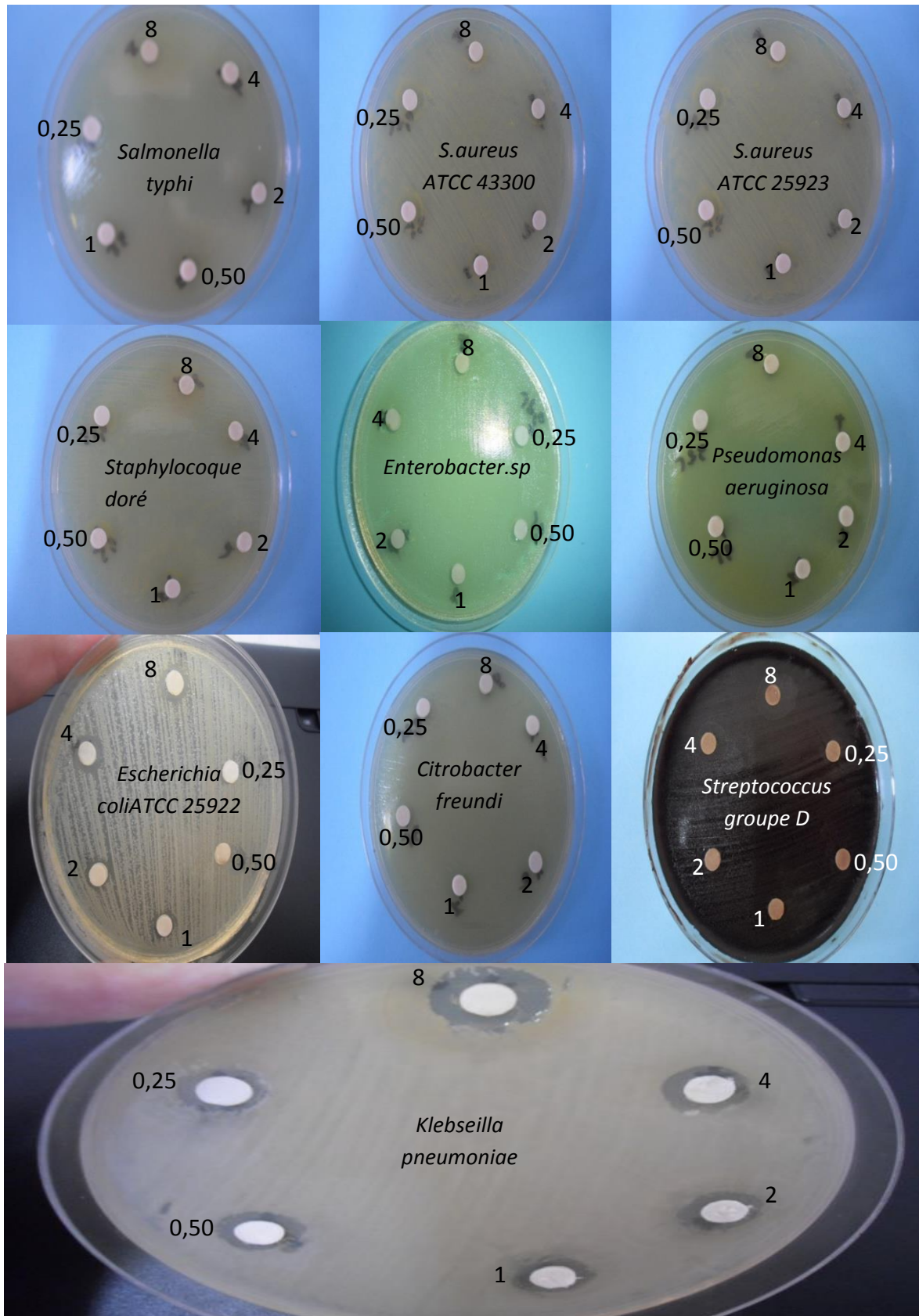


Figure 56: Effet de l'EMeOH de *Pulicaria arabica* sur les souches bactériennes étudiées.

Tableau 22: Diamètres des zones d'inhibitions de l'EMeOH de *Pulicaria arabica*.

Souches bactériennes	Diamètre de la zone d'inhibition en mm					
	Dilutions de l'EMeOH de la plante <i>Pulicaria arabica</i>					
	8	4	2	1	0,50	0,25
<i>E. coli</i> ATCC 25922	10,00±0,00	9,66±0,58	8,00±0,00	7,33±0,58	-	-
<i>P.aeruginosa</i> ATCC27853	-	-	-	-	-	-
<i>Klebseilla pneumoniae</i>	12,00±1,00	10,00±0,00	9,66±0,58	9,00±1,00	8,66±0,58	8,00±1,00
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter.sp</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S.aureus</i> ATCC 43300	-	-	-	-	-	-
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus groupe D</i>	-	-	-	-	-	-

(-) : pas d'inhibition. Chaque valeur représente la moyennede trois essais ± écart-type(SD).

Ce tableau présente la repense des bactéries en présence de l'extrait méthanolique de la plante *Pulicaria arabica* qui a une activité antibactérienne sur *E. coli* et *Klebseilla pneumoniae* et les autres souches sont avérées résistantes.

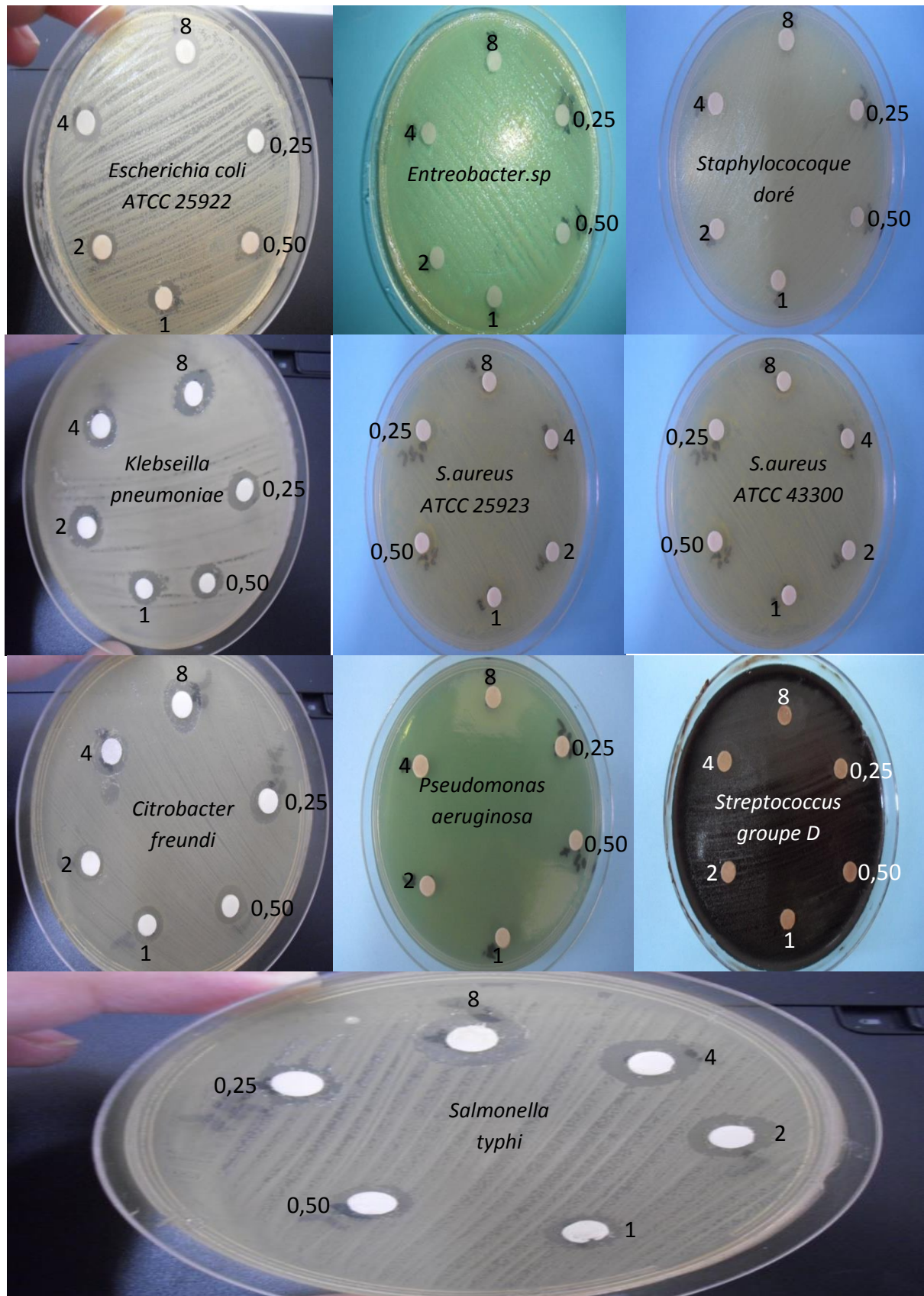


Figure 57: Effet de l'En-hex de *Pulicaria arabica* sur les souches bactériennes étudiées.

Tableau 23: Diamètres des zones d'inhibitions de l'En-hex de *Pulicaria arabica*.

Souches bactériennes	Diamètre de la zone d'inhibition en mm					
	Dilutions de l'En-hex de la plante <i>Pulicaria arabica</i>					
	8	4	2	1	0,50	0,25
<i>E. coli</i> ATCC 25922	11,00±0,00	10,00±0,00	09,66±0,58	09,50±0,50	09,33±0,58	09,00±0,00
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-
<i>Klebseilla pneumoniae</i>	11,66±1,15	11,00±0,00	10,66±0,58	10,33±0,58	10,00±0,00	09,66±0,58
<i>Salmonella typhi</i>	12,50±0,50	11,66±0,58	11,33±0,58	09,33±0,58	09,00±0,00	08,33±0,58
<i>Citrobacter freundii</i>	10,33±0,58	10,00±0,00	09,66±0,58	09,33±0,58	09,33±0,58	09,33±0,58
<i>Enterobacter.sp</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S.aureus</i> ATCC 43300	-	-	-	-	-	-
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	-
<i>Stphylocoque doré</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus groupeD</i>	-	-	-	-	-	-

(-) : pas d'inhibition. Chaque valeur représente la moyennede trois essais ± écart-type(SD).

L'extrait n-hexanique de la plante *Pulicaria arabica* n'a exercé aucune activité inhibitrice sur les bactéries à Gram (+), une activité antibactérienne a été enregistré sur les bactéries gram négative; *E. coli*, *Klebseilla pneumoniae*, *Salmonella typhi* et *Citrobacter freundii* avec des diamètres d'inhibition de 11, 11, 66, 12,5 et 10,33 mm respectivement.

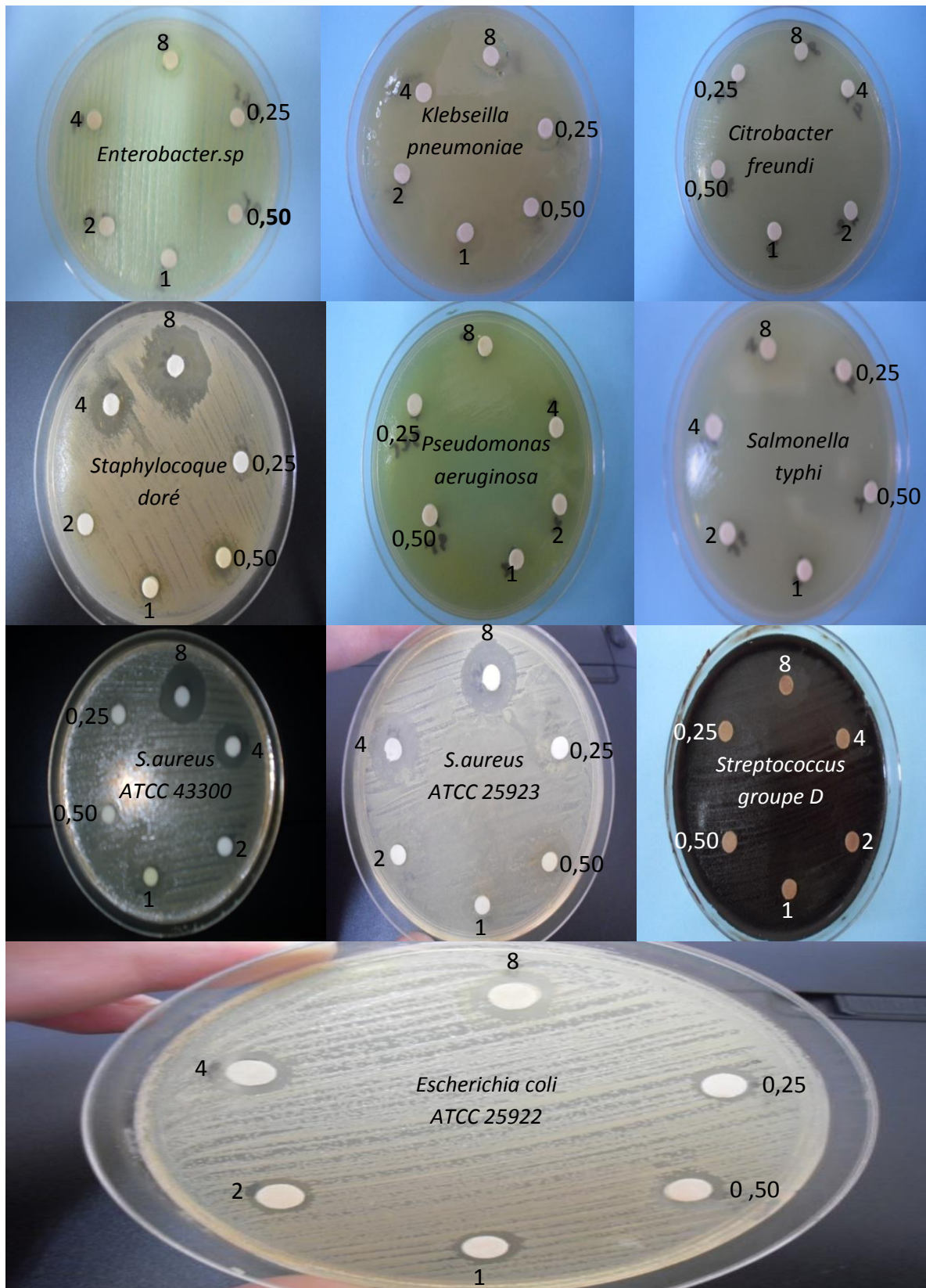


Figure 58: Effet de l'EDCM de *Pulicaria arabica* sur les souches bactériennes étudiées.

Tableau 24: Diamètres des zones d'inhibitions de l'EDCM de *Pulicaria arabica*.

Souches bactériennes	Diamètre de la zone d'inhibition en mm					
	Dilutions de l'EDCM de la plante <i>Pulicaria arabica</i>					
	8	4	2	1	0,50	0,25
<i>E. coli</i> ATCC 25922	11,33±0,58	10,33±0,58	09,33±0,58	09,33±0,58	09,00±0,00	08,66±0,28
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-
<i>Klebseilla pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter.sp</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S.aureus</i> ATCC 43300	19,33±1,15	14,00±0,00	-	-	-	-
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	17,00±1,73	15,66±0,58	-	-	-	-
Staphylocoque doré	21,66±0,58	15,66±1,15	-	-	-	-
<i>Streptococcus</i> groupe D	-	-	-	-	-	-

(-) : pas d'inhibition. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm écart-type(SD).

D'après le tableau L'extrait chloroformique de *Pulicaria arabica* montre une activité vis-à-vis des bactéries à Gram positifs que les Gram négatifs. Nous avons enregistré la plus grande valeur de diamètre avec Staphylocoque doré (21,66mm) suivie par *S.aureus* ATCC 43300(19,33mm) puis *S.aureus* ATCC 25923(17,00mm).

En générale, La résistance des souches de *Ps.aeruginosa* aux l'huiles testées et aux différents extraits bruts des deux plantes n'est pas surprenante. En fait, cette bactérie possède une résistance intrinsèque aux agents biocides qui est en relation avec la nature de sa membrane externe. Cette dernière est composée de lipopolysaccharides qui forment une barrière imperméable aux composés hydrophobes. En présence d'agents perméabilisant de la membrane externe, des substances inactives contre *Ps.aeruginosa* deviennent actives (Bouhdid et al., 2004).

L'hypersensibilité de la souche Staphylococcus aureus peut s'expliquer par la probabilité de la sensibilité des bactéries Gram (+) aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH, et les extraits naturels due à l'absence de la membrane externe (Athmena et al., 2010).

Streptocoque une bactérie Gram (+), s'est révélée résistante aux plupart des extraits testés.

Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre, d'un extrait à un autre et d'une concentration à une autre. La variation de l'activité antibactérienne des extraits explique les variations de leurs compositions chimiques. Toutefois il faut indiquer

que la différence d'activité entre ces extraits est également liée à la concentration du principe actif.

On constate généralement que les zones d'inhibition étaient inférieures à celles des antibiotiques, qui ont montré des zones d'inhibition larges par rapport à celles obtenues en testant les huiles essentielles et les extraits bruts des deux plantes. Divers paramètres contribuent à expliquer cette différence d'efficacité entre les antibiotiques et les différents extraits:

- la concentration (peut être plus élevée dans les disques) ;
- le degré de pureté;
- la toxicité.

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des différents extraits des deux plantes sur les dix germes étudiés ont été alors déterminées et regroupées dans le Tableau 25. Nous notons que Les valeurs de CMI varient d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre.

Tableau 25: Activité antibactérienne des extraits des deux plantes exprimée en (CMI) concentration minimale inhibitrice (mg/ml).

Souches	CM (mg/ml)							
	<i>Rhanterium adpressum</i>				<i>Pulicaria arabica</i>			
	HE	EMeOH	EDCM	En-hex	HE	EMeOH	EDCM	En-hex
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,25	2	-	0,25	0,25	1	0,25	0,25
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsella pneumoniae</i>	-	0,25	0,25	0,25	-	0,25	-	0,25
<i>Salmonella typhi</i>	4	-	-	-	-	-	-	0,25
<i>Citrobacter freundii</i>	8	-	-	0,25	2	-	-	0,25
<i>Enterobacter.sp</i>	0,25	-	-	-	-	-	-	-
<i>S.aureus</i> ATCC 43300	4	-	-	-	2	-	4	-
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	2	-	-	-	4	-	4	-
<i>Staphylocoque doré</i>	4	-	-	-	2	-	4	-
<i>Streptococcus groupe D</i>	4	-	-	-	4	-	-	-

(-) : pas d'inhibition, CMI : plus petite concentration de l'extrait pour laquelle aucune croissance n'est visible à l'oeil nu (Agban et al., 2013).

V.3.2.L' activité antifongique.

L'activité antifongique de divers extraits huileux, hexaniques, méthanoliques et chloroformiques des deux plantes est étudiée sur la levure *Candida albicans* et les résultats sont représentés dans les figures 59,60 et les tableaux 26,27.

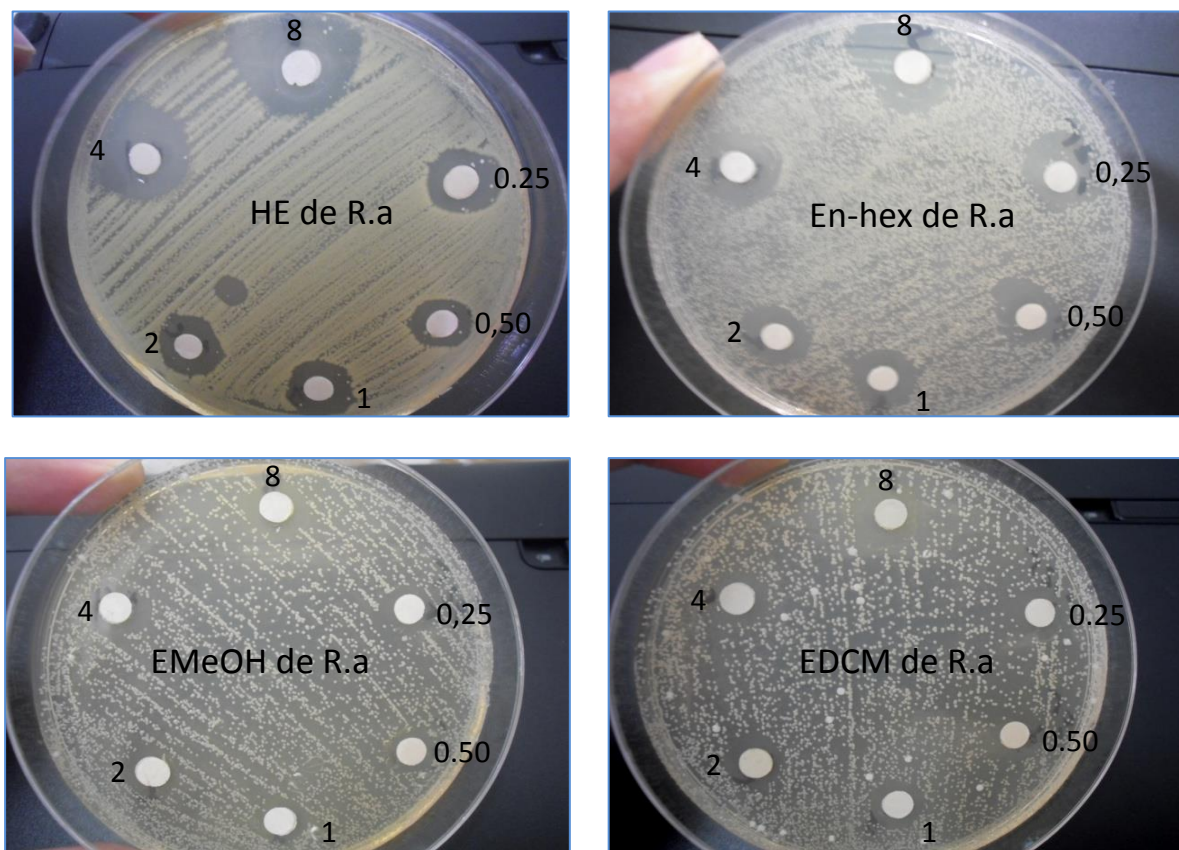


Figure 59: Effet de différents extraits de plante *Rhanterium adpressum* sur la croissance de la levure *Candida albicans*

Tableau 26: Diamètres des zones d'inhibitions des extraits de *Rhanterium adpressum*.

Souche	Extraits	Diamètre de la zone d'inhibition en mm					
		Dilutions des extraits de la plante <i>Rhanterium adpressum</i>					
		8	4	2	1	0,50	0,25
<i>Candida albicans</i>	HE	19,00 ±2,00	18,00±1,73	13,00±2,00	12,66±0,57	10,00± 1,00	10,00 ±1,00
	En-hex	13,66±2,08	12,33±0,57	10,66±0,57	10,66±0,57	10,33± 0,57	9,00 ±1,73
	EMeOH	11,66±2,08	10,33±0,57	9,66±0,57	9,33± 0,57	9,00± 0,00	9,00± 0,00
	EDCM	13,66±1,52	10,66±0,57	10,66±0,57	10,66±0,57	10,33±0,57	9,66±0,57

Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± écart-type(SD).

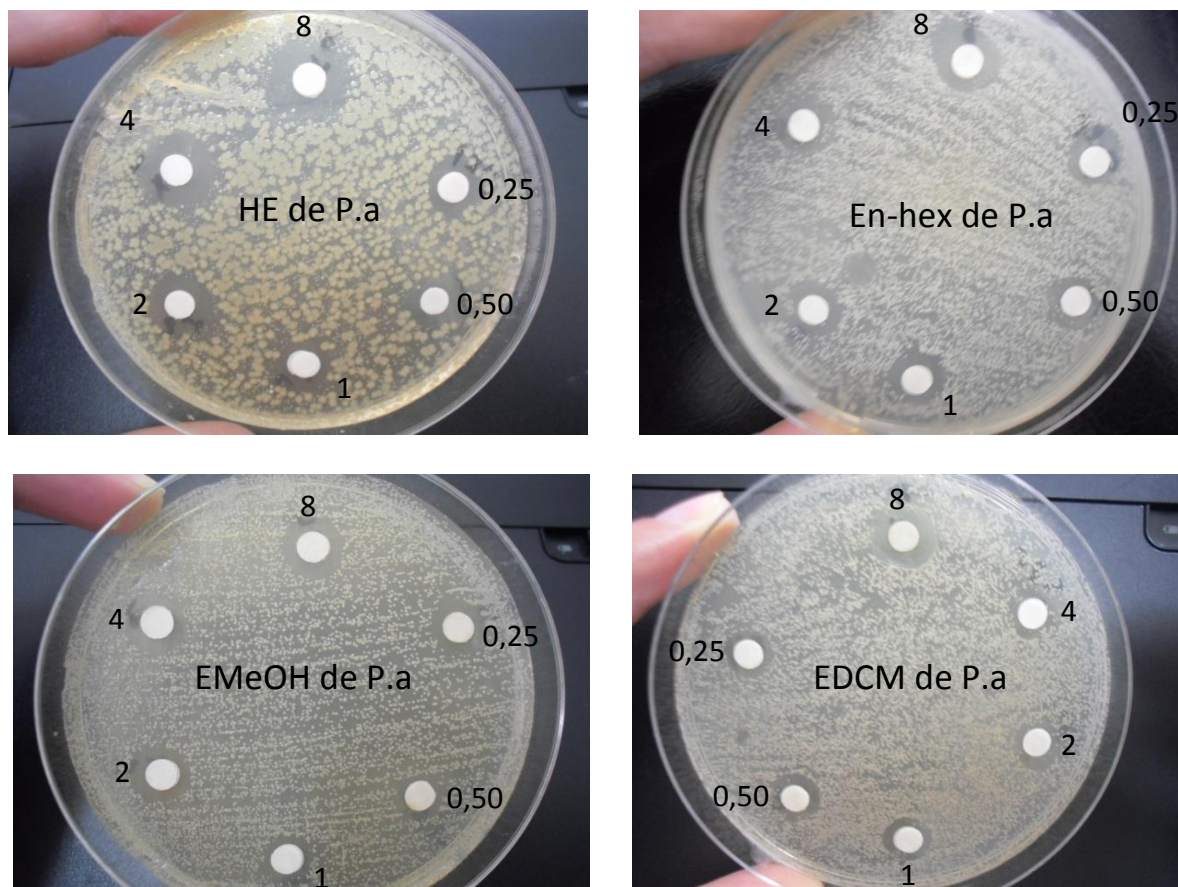


Figure 60: Effet de différents extraits de plante *Pulicaria arabica* sur la croissance de la levure *Candida albicans*.

Tableau 27: Diamètres des zones d'inhibitions des extraits de *Pulicaria arabica*.

Souche	Extraits	Diamètre de la zone d'inhibition en mm					
		Dilutions des extraits de la plante <i>Pulicaria arabica</i>					
		8	4	2	1	0,50	0,25
<i>Candida albicans</i>	HE	16,33±2,30	14,33±0,57	13,33±1,52	12,33±1,15	12,00± 1,00	10,33 ±1,15
	En-hex	11,66±0,57	10,00±0,00	10,00±0,00	9,66± 0,57	9,00±1,00	9,00±1,00
	EMeOH	10,66±1,15	10,33±0,57	9,66± 0,57	9,33± 0,57	9,33± 1,52	9,33±0,57
	EDCM	11,66±0,57	10,00±1,00	9,33± 0,57	9,00±1,00	8,66± 0,57	8,66±0,57

Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± écart-type(SD).

Les résultats de l'activité antifongique obtenus révèlent que les huiles essentielles des deux plantes dotées d'un pouvoir anti-*Candida albicans* très élevé que ceux des différents extraits organiques. On a enregistré la plus grande valeur (d=19mm de diamètre) avec l'huile essentielle de la plante *Rhanterium adpressum* suivie d'une valeur (d=16,33mm de diamètre) avec l'huile essentielle de la plante *Pulicaria arabica*.

Des résultats antérieurs publiés par El-Abed et al.,[2010](#) , ont montré une activité antifongique des huiles essentielles extraites à partir des différents parties de l'astéracée tunisienne *Pulicaria arabica*, contre *Fusarium solani f.sp. cucurbitae*, *F. oxysporum f.sp. lycopersici*, *F. oxysporum f.sp.niveum*, *Phytophthora cactorum*, *Alternaria solani* et *Rhizoctonia solani*.

Selon Ferhat (Ferhat et al., [2010](#)), le mode potentiel de l'action des huiles essentielles contre les levures pourrait être dû à l'affaiblissement des processus enzymatiques impliqués dans la production énergétique et la synthèse des composantes structurales.

Selon (Giordani et Kaloustian, [2006](#)), l'action antifongique des huiles et due a une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci entraînant une fuite du contenus cytoplasmique et donc la more de la levure. En effet, les composés terpéniques des huiles essentielles et plus précisément leurs groupements fonctionnels tels que les phénols et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires et dégrade la membrane plasmique des levures.

En ce qui concerne les extraits bruts organiques, les extraits apolaires exercent une activité antifongique plus que ceux des extraits polaires, ce qui indique que l'activité antifongique dépend du solvant utilisé pour l'extraction. Du façon générale tous les extraits exercent une activité antifongique concentration dépendante. La plus forte activité a été obtenue avec la concentration de 8mg/ml.

V.4.Résultats du test du pouvoir antioxydant.

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits des deux plantes a été réalisée par la technique chimique « le piégeage du radical libre DPPH », la mesure de l'absorbance (ou densité optique DO) a été effectuée par spectrophotométrie à 517 nm. A partir des valeurs obtenues, nous avons calculé les pourcentages d'inhibition en utilisant la formule donnée auparavant.

V.4.1.Acide ascorbique.

Les valeurs de l'absorbance et le pourcentage d'inhibition de DPPH par l'acide ascorbique sont représentées dans les tableaux 27,28 et les figures 61,62.

V.4.2. Les extraits de la plante *Rhanterium adpressum*.

Les valeurs de l'absorbance et le pourcentage d'inhibition de DPPH par les extraits méthanolique, n-hexanique et chloroformique et huileux de la plante *Rhanterium adpressum* sont représentées dans le tableau 27 et la figure 61.

Tableau 27: Pourcentage d'inhibition de DPPH par les divers extraits de *Rhanterium adpressum*

Concentration	A.ascorbique	EMeOH	En-hex	EDCM	HE
1	87.52	76.91	10.58	30.86	14.7
1/10	83.93	72.60	3.68	9.85	3.72
1/100	49.29	19.50	2.42	7.88	3.22
1/1000	24.74	5.67	1.53	2.25	1.72
1/10000	6.46	1.73	1.08	1.95	1.21
1/100000	3.80	1.28	0.63	1.29	0.92

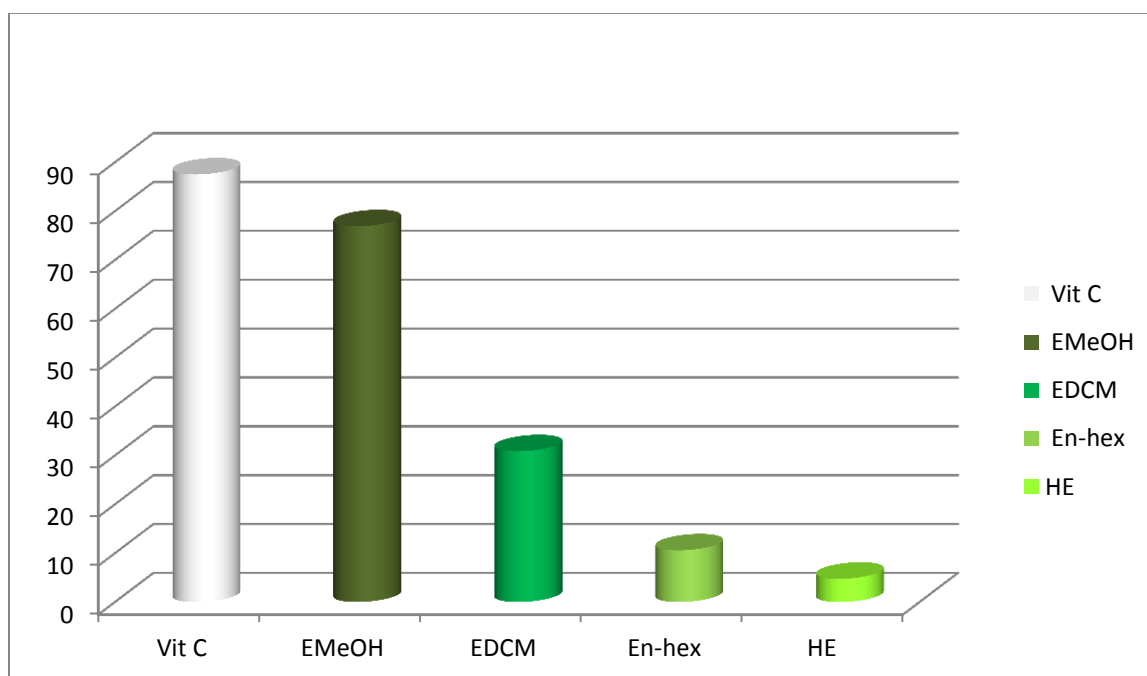


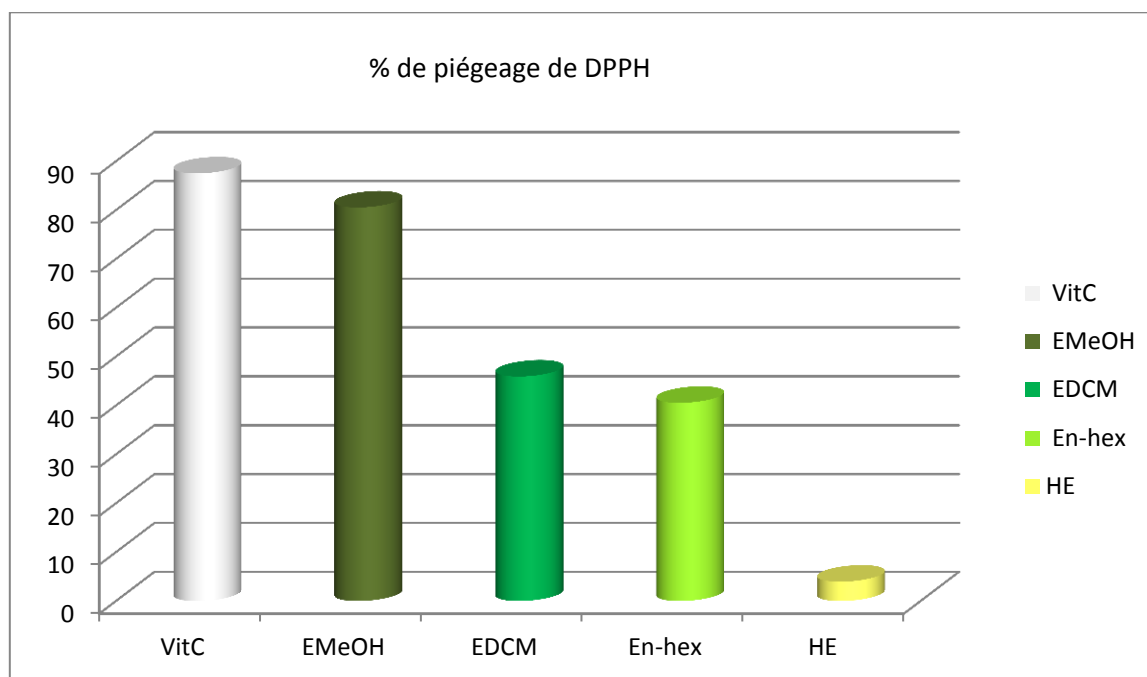
Figure 61: Activité anti-oxydante relative des extraits de *Rhanterium adpressum* et acide ascorbique.

V.4.3. Les extraits de la plante *Pulicaria arabica*.

Les valeurs de l'absorbance et le pourcentage d'inhibition de DPPH par les extraits méthanolique, n-hexanique et chloroformique et huileux de la plante *Pulicaria arabica* sont représentées dans le tableau 28 et la figure 62

Tableau28: Pourcentage d'inhibition de DPPH par les divers extraits de *Pulicaria arabica*.

Concentration	A.ascorbique	EMeOH	En-hex	EDCM	HE
1	87.52	80.91	40.54	45.93	3.97
1/10	83.93	78.38	9.75	43.41	3.07
1/100	49.9	45.70	3.26	20.76	2.59
1/1000	24.74	8.83	2.59	4.80	1.44
1/10000	6.46	2.20	1.29	1.76	1.35
1/100000	3.80	2.15	1.18	1.69	1.16

Figure 62: Activité anti-oxydante relative des extraits de *Pulicaria arabica* et acide ascorbique..

L'activité antioxydante des différents extraits des deux plantes et de l'antioxydant standard (acide ascorbique) vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH•) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 517nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances antiradicalaires.

Il a été démontré que les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique, tocophérol, flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène (Bougandoura et Bendimerad, 2012).

D'une manière générale, tous les extraits testés des deux plantes, huileux, méthanoliques, chloroformiques, et n-hexaniques ont provoqué une diminution plus ou moins importante de l'absorbance à 517 nm selon leurs concentrations. Cela signifie que le pouvoir réducteur du DPPH par les extraits est dose dépendante (concentration dépendante).

Les résultats montrent que tous les extraits des deux plantes présentent une activité antiradicalaire différente. L'extrait méthanolique de la plante *Pulicaria arabica* possède la meilleure capacité antiradicalaire de l'ordre de 80,91% envers le radical DPPH à une concentration de 8mg/ml, en comparaison avec les autres extraits suivis par l'extrait méthanolique de la plante *Rhanterium adpressum* de l'ordre de 76.91%. Cette activité pourrait être liée à la richesse de l'extrait méthanolique en polyphénols.

Selon (Falleh et al., 2008), L'extrait méthanolique est plus riche en polyphénols, ce qui réfère le plus probable à la solubilité relative des polyphénols présents dans les deux plantes dans le méthanol. Pour une plus haute récupération de polyphénols, le méthanol est le solvant approprié .

Selon Bidie (Bidie et al., 2011), les composés phénoliques sont largement distribués dans les tissus des plantes parmi lesquels se retrouvent de nombreuses molécules antiradicalaires et antioxydantes.les groupements fonctionnels présents dans les composés phénoliques en général peuvent céder facilement un électron ou un proton pour neutraliser les radicaux libres.

Des extraits méthanoliques de quelque plantes médicinales tels que *Cynara cardunculus*, *Tagetes minuta* et *Galinsoga parviflora* , appartenant à la même famille des deux plantes que nous avons étudié ont montré qu'il existe une corrélation très significative entre la teneur en polyphénols et l'activité scavenger des radicaux DPPH (Falleh et al., 2008 ; Ranilla et al., 2010).

Les extraits chloroformiques et n-hexaniques de la partie aérienne des deux plantes sont dotés d'un effet antioxydant considérable, en comparaison avec l'effet de l'antioxydant standard l'acide ascorbique. Par ailleurs Les huiles essentielles affichent une activité très faible, ces résultats sont liés directement à la diversité quantitative et/ou qualitative des composés présents dans ces extraits.

On constate également que la polarité des extraits influence sur le pouvoir antioxydant des deux plantes, les extraits qui contiennent des molécules polaires montrent une activité antioxydante élevée par rapport aux extraits apolaires, en effet le pouvoir antioxydant de EMeOH > EDCM > En-hex > HEs. Des résultats rapportés par (Algabr et al., 2010) sur l'activité antioxydante des extraits aux solvants de l'espèce *Pulicaria jauberti* ont montré que l'activité de piégeage des radicaux DPPH était en ordre en fonction de polarité de l'extrait, l'extrait AcOEt (96,87%) > l'extrait n-BuOH (63,62%) > l'extrait CHCl₃ (33,78%). D'autre étude a été réalisée sur la même espèce de notre étude (*Rhanterium adpressum*), a montré que l'activité antioxydante et aussi liée à la polarité de l'extrait, le pouvoir antioxydant de l'extrait lipidique (hexanique) était très élevée par rapport au pouvoir antioxydant de l'huile essentielle (Hamia et al., 2013).

Les extraits aux solvants contiennent plusieurs familles de composés (flavonoïdes, tanins, saponosides, pigments, terpènes, etc.) alors que l'huile essentielle est constituée uniquement de molécules terpéniques dont la plupart ont peu d'activité antioxydante (Bruneton, 1999).

CONCLUSION

Notre travail qui est une contribution à l'étude des propriétés bioactives de la partie aérienne des deux astéracées algériennes *Pulicaria arabica* et *Rhanterium adpressum*, nous a permis de corroborer que les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques.

Nous avons réalisé l'extraction des huiles essentielles par l'hydrodistillation, les résultats obtenus ont montrés une rentabilité de (0,30%) chez la plante *Pulicaria arabica* et (0,16%) chez la plante *Rhanterium adpressum*.

L'extraction par des solvants de polarité différente a montré un rendement important par le méthanol par rapport aux autres solvants pour les deux plantes.

Nous avons aussi caractérisé l'huile essentielle de la plante *Pulicaria arabica*. Nous avons réalisé une étude de la composition chimique de cette huile essentielle par la technique analytique CG/SM; nous avons ainsi identifié vingt quatre constituants représentant 99,99% de la composition chimique de l'huile total. Les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle de *Pulicaria arabica* se distingue par une forte abondance en sesquiterpènes hydrocarbonés.

En ce qui concerne L'activité antiradicalaire des différents extraits des deux plantes a été déterminé par la méthode de DPPH dont les résultats montrent que les extraits méthanoliques possèdent une bonne activité, L'efficacité in vitro pourrait être expliquée par la richesse de ces plantes en composés phénolique, donc ces plantes contiennent des molécules qui sont considérées comme des agents antioxydants peuvent être employées pour des applications thérapeutiques, sachant que les antioxydants contribuent de manière très efficace à la prévention des maladies telles que le cancer, et les maladies cardiovasculaires.

Au cours de cette étude nous avons réalisé également un test antimicrobien vis-à-vis dix bactéries et une levure, les résultats microbiologiques ont montré que les huiles essentielles des deux plantes ont une activité surtout sur la levure et sur les Gram (+), Par contre les extraits organiques ont une activité surtout pour les Gram (-).

Nous avons noté aussi que quelque soit le type de l'activité biologique réalisé est concentration dépendante.

Cette étude peut être considérée aussi comme une source importante d'informations sur les propriétés chimique, antimicrobienne et antioxydante des deux astéracées de l'Algérie.

En fin, l'ensemble de ces résultats obtenus in vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche des substances de source naturelle biologiquement active. Des essais complémentaires seront nécessaires et devront pouvoir confirmer les performances mises en évidence.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-  **bdel-Gleel.W.; Hassanien.M.F.R.:** Antioxdant properties and lipid profile of *Diplotaxisharra*, *Pulicaria incisa* and *Avicennia marina*, *Acta Alimentaria*, Vol. 41 (2), pp. 143–151,(2012).
- Abdel-Mogib.M.; Dawidar.A.M.; Metwally.M.A ; Abou-Elzahab.M.:**Flavonols of *Pulicaria undulata*, *Pharmazie*, 44(11)801,(1989).
- Abdel-Mogib.M.;Jakupovic.J.;Dawidar.A.M.;Metwally.M.A.;Abou-Elzahab.M.:**Sesquiterpènes lactones and kaurane glycosides from *Francoeuria crispa* *Phytochemistry*, 29(8): 2581-2584,(1990).
- Abdellaoui.D.;El-Hassouni.H.;Elhani.S. ;Bengueddour.R.:**Activité antioxydante et antibactérienne des extraits de Rhodophycées: *Grateloupia doryphora* et *Gymnogongrus patens*, *Science Lib Editions Mersenne : Volume 5, N ° 130607*, (2013).
- Aboun.A.; Ammarir.H.;Belouni.R.; Benslimani.A.; Missoum.M.F.K.; Rahal.R. ;Talimaar. H. :**Standarisation de l’antibiogramme en médecine vétérinaire a l’échelle nationale selon les recommandations de l’OMS, Ed,(2008).
- Agban.A. ; Gbogbo.K.A.; Hoekou.Y.P.; Atchou.K. ;Tchacondo.T. ;Batawila.K. ; Souza.C. ; Gbeassor.M. :** Évaluation de l’activité antifongique des extraits de *Cassia alata L.* et de *Piliostigma thonningii* (Schumach.) Milne Redh. (Fabaceae) sur *Candida albicans*, *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 7(3): 1041-1047, June (2013).
- Aiache.J.M. ;Carnat.A.P. ;Coudert.P. ;Teulade.J.C. :**Sources actuelles et futures du médicament, *Chimie du médicament*. Ed, Elsevier Health Sciences, (2011).
- Algabr.M.N. ; Benayache.F.; Mekkiou.R. ; Ameddah.S. ; Menad.A. ; Boumaza.O. ; Seghiri.R. ; Benayache.S. :** Antioxydant activities from the aerial parts of *Pulicaria jaubertii*, *Advances in Natural and Applied Sciences*, 4(1): 63-70, (2010).
- Algabr.M.N.;Ameddah.S.;Menad.A.;Mekkiou.R.;Chalchat.J.C.;Benayache.S.;Benayache.F.:** Essential oil composition of *Pulicaria jaubertii* from yemen, *Int.J.Med, Arom plants*, ISSN 2249-4340,Vol.2,N.4.pp.688-690,(2012).
- Al-Hazimi.H.M.G.;Al-khathlan.H.Z.:** Chemisrtry of Various *Pulicaria* Species (Asteraceae), *Jour.Chem.Soc.Pak.Vol.14,N°3,p 233-240*, (1992).
- Al-Hazimi.H.M.G.;Alkhathlan.H.Z. :** A new diterpene and flavonoids from *Pulicaria somalensis*,*J.King Saud Uni.,Vol.5,Science(2),pp.141-146*,(1993).
- Al Yousuf.M. ;Bashir.A.Mathé.I. ;Blunden.B. :**Essential oil of *Pulicaria glutinisa Jaud*.From the United Arab Emirates,*journal of essential oil Research*,Vol.13,(2001).
- Amaral.J.A. ;Ekins.A. ;Richards.S.R. ;Knowles.R. :**Effect of Selected Monoterpenes on Methane Oxidation, Denitrification, and Aerobic Metabolism by Bacteria in Pure Culture. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 520-525, (1998).
- Amand.L. ; Langlois.N. :** Agriculture biologique : Les grands principes de production et l’environnement professionnel, *Educagri Editions*, p142, (2009).
- Amarti.F. ; Satrani.B. ;Aafi.A. ; Ghanmi.M. ; Farah.A. ; Aberchane.M. ; Ajjouri.M. ; Antry.S.El. ; Chaouch.A. :** Composition chimique et activité des huiles essentielles de *Thymus capitatus* et de *Thymus bleicherianus* du Maroc, *Phytothérapie*, 6:342-347, (2008).

Amarti.F. ;Satrani.B. ; Ghanmi.M. ; Abdellah.j.F. ; Aafi.A. ; Aarab.L. ; El.Ajjouri.M.; Chaouch.A.: Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. Et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc, Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement, (2009).

API 20 E : Système d'identification des entérobactéries *Bio Merieux S.A.*, France, (2007).

Athamena.S. ; Chalghem.I. ; Kassah.L.;Laroui.S.;Khebri.S. : Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum*, Lebanese Science Journal, Vol. 11, No. 1, (2010).

Bakkali.F. ;Averbek.S. ;Averbek.D . ;Idaomar.M.: Biological effects of essential oils-A review, Food and Chemical Toxicology, Volume 46, Issue 2,pages 446-475, (2008).

Baribeau.H : Pouvoir antioxydant, Ed, Passeport Santé.net, (2010).

Baritoux.O. ;Richard.H. ;Touche.J. ;Derbesy.M. :Effects of Drying and Storage ofHerbs and Spices on the Essential Oil.Part I. Basil, *Ocimum basilicum* L,*Flavour Fragr. J.*, 7: 267-271, (1992).

Bassole.H.N. ;Kabore.Z.H. ;Traore.A.S.:Etude des profils bactériostatiques et bactéricides d'extrait végétal vis-à-vis de germe pathogènes impliqués dans la contamination des denrées alimentaires d'origine animal. pharm .Med .Trad. Afr. Vol.11. pp113-122, (2001).

Battandier.J.A. ;Trabut.L. : Flore de l'Algérie. Librairie F.SAVY. Paris, Volume1, p 432, (1888).

Battandier.J.A.;Trabut.L.: Flore Analytique et Synoptique de l'Algérie et de la Tunisie .Imprimeur-Ed. Alger, p175, (1902).

Bekheche.CH. ;Abdelouahid.D.:Les huiles essentielles, Ed, Office des publications universitaires, p14,17,18,(2012).

Beltrame.C : Problèmes posés par le concept d'espèce en biologie de la conservation, Exemples des centaurees de la section Maculosae dans les régions méditerranéenne et alpine de l'Europe occidentale, thèse de doctorat, université Pierre &Marie curie, paris, p25, (2007).

Benayed.N. : Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines :Moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées , Laboratoire des Substances Naturelles et Thermolyse Eclair,Département de Chimie, Faculté des Sciences de Rabat,(2008).

Benchouhra.H. A.;Hamel L.; Bendimred.F.Z.;Benchouhra.M. : Composition chimique des huiles essentielles de *L'Inula viscosa*, ScienceLib Editions Mersenne : Volume 3, N ° 111110, p 4, 5, (2011).

Ben Sassi.A . ; Harzallah-Skhiri F.; Bourgougnon N. ;Aouni M. :Antimicrobial activities of four Tunisian Chrysanthemum species, Indian J Med Res 127,pp 183-192, (2008).

Bidie.A.Ph. ;N'Guessan.B.B. ;YapoA.F. ;N'Gussan.J.D. ;Djaman.A.J.:Activité antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sciences &Nature* Vol. 8N°1: 1 - 11 (2011).

Bishay.D.W. ;Gomaa.C.S. ;Assaf.M.H. :Flavonoids from *Pulicaria undulate* L.Kostel grouping in Egypt. Bull.Pharm.Sci.,AssiutUniv.5,65-71,(1982).

Boufflers B. : Soins naturels des dents, Editeur, Cheops Publication Sarl, p28, (2005).

Bougabdoura.N. ;Bendimerad.D. :Effet antifongique des extraits aqueux et methanolique de *Saturejas.sp.*(*Nepta*) briq, Revue de Bio Ressources, Vol N1jun,(2012).

Bouhdid.S.Idaomar M. ;Zhiri.A.;Baudour.D. ;Senhaji.S.N. ;Abrini.J. : L'effet antibactérien de l'huile essentielle d *Origum compactum* vis-à-vis de souches cliniques ; Nouvelles tendances dans l'ingénierie biomédicale, (2004).

Bouheroum.M. :Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes: *Rhanterium adpressum* et *Ononisan gustissima*,thèse de doctorat d'état, université Mentouti de Constantine, p84-124,(2007a).

Bouheroum.M.;Benayache.S.;Benayache.F.;Zaiter.L.;Barrera.J.M.;Francisco.L.: Terpenoids and Triynepoxide from the aerial part from *Rhanterium adpressum*, Chemistry of Natural Compounds,Vol,43,N,1,(2007b).

Boukhatem.M.N;Saidi.F;Hamaidi.M.S;Hakim.Y;Mekarnia.M.:Culture et exploitation industrielle du géranium roast (*Pelargonium graveolans*) en Algerie:etat des lieux et perspectives,Phytothérapie 9:304-309,(2011).

Bourgaud.F. : Les questions et travaux de recherche nécessaires au développement de la filière ; Exemple de l'apport des sciences cognitives à la production/valorisation des métabolites secondaires d'intérêt, Unité Mixte de Recherche 1121 Université de Lorraine-INRA, Nancy-Colmar), Fondateur de la société Plant Advanced Technologies, Nancy,(2013).

Bourkhiss.M.;Hnach.M. ; Paolini.J ; Costa.J .;Farah.A. ; Satrani.B. : Propriétés anti - oxydantes et anti inflammatoires des huiles essentielles des différentes parties de *Tetraclinia sarticulata*(VAHL) Masters du Maroc, Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, Vol. 79, p141 -154, (2010).

Boussaid.M.;BenFadhel.N.; Ben M'hamed.M.:«Structure of vegetation in Northern and Central Tunisia and Protective Measures». Cah. Opt. Mediter,Vol.38, 295-302.(1998).

Breitmaier.E. :Terpene :Aromen,Dufte,Pharmaka,Pheromone,Teubner Studien bucher Chimie,p14.15,(1999).

Breitmaier.E. :Terpenes, Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, ISBN:3-527-31786-4.p4.5,(2006).

Bruneton J. :Pharmacognosie,phytochimie, plantes médicinales,Ed,Tec&Doc, paris, p 487-488,(1999).

Bssaibis.F. ;Gmira.N. ;Meziane.M. :Activité antibactérienne de *Dittrichia viscosa* (L.) w.Greuter,Rev.Microbial.Ind.San et Environn.vol 3,N°1,p :44-55,(2009).

Satier.O. ;Roux.D. :Botanique Pharmacognosie Phytothérapie ,3^{ème} édition, Wolters Kluwer, p74, (2007).

Camilleri.J.P. ;Snoussi.A. :L'éternelle jeunesse :L'art de bien vieillir, Ed, L'Harmattan, p137,(2012).

Causse.C. : Les secrets de santé des antioxydants,Alpen Editions s.a.m . pp16, 17, (2005).

Charnay.P. ;Tourmeau.J. :Le Petit Futé Guide pratique de la Dégustation, Éditeur Nouvelles Editions de l'Université, p203,(2006).

Chaumont J.P. ;Cieur CH. ;Millet J. ;Morel J.M. ;Sitruk D.R. ;Tallec D. :Conseil en aromathérapie,2^{ème} Ed,pro-officina,France,p15,(2008).

Clayden.j. ;Greeves.N . ;Warren.S. ;Wothers.P.:Chimie organique, Ed, De Boeck Supérieur,(2002).

Collet.E.: Progrés en Dermato- Allergologie,Ed. John Libbey Eurotext, Dijon, p26, (2002).

Collin.S ; Crouzet.J . : Polyphénols et procédés,Transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agroalimentaires,Ed,Lavoisier,p6-17,(2011).

Coutinbo.A.P. ;Aguiar .C.F. ;Bandeira.D.S. ;Dinis.A.M. : Comparative pollen morphology of the species of *Pulicaria* (Asteraceae, Inuleae, Inulinae) and ifs taxonomic significance, Plant Syst Evol 297 :171-183,(2011).

Cristofari.G.;Znini.M.;Majidi.L.;Bouyanzer.A.;Al-Deyab.S.S.;Paolini.J.;Hammouti.B. ; Costa.J.: Chemical Composition and Anti-Corrosive Activity of *Pulicaria mauritanica*: Essential Oil Against the Corrosion of Mild Steel in 0.5 M H₂SO₄, Int. J. Electrochem. Sci., 6,6699-6717,(2011).

Cuvier.F: Dictionnaire Des Sciences Naturelles, Éditeur. F. G. Levrault, à STRASBOURG, p 94, (1826), Numérisé (2006).

Dabire.C. ; Nebie.R.H.C. ;Belanger ;A ;Nacro.M. ;Sib.F.S. : Effet du séchage de la matière végétale sur la composition chimique de l'huile essentielle et l'activité antioxydante d'extraits de *Ocimum basilicum* L,Int. J. Biol. Chem. Sci. 5(3): 1082-1095, June (2011).

De Billerbeck.V.G.: Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques, Phytothérapie, 5 :249-253, (2007).

Degenhardt.J. ;Köllner.T. G. ;Gershenzon.J. : Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants, Phytochemistry, 70:1621–1637, (2009).

Dendougui.H.;Benayache.S.;Benayache.F. ;Connoly.G.D.:Sesquiterpene lactone from *Pulicaria crispa*,Fitoterapia,71: 373-378, (2000).

Derbel.S. ;Ghedire.K. : Les phytonutriments et leur impact sur la santé, Phytothérapie, Numéro 1 :28-34, (2005).

Derouiche.k . ; Zellagui.A. ; Gherraf.N. ; Bousetla.A. ; Dehimat.L. ; Rhouati.S.: Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of *Santolina Africana* flowers, endemic in Algeria, ISSN: 1314-6246, J. BioSci. Biotech, 2(3): 201-206, (2013).

Descheemaeker.K. ; Provoost.CH. : L'impact de la nutrition sur la santé,Ed,Louvain-Garant,p95,(1999).

Doman.H.J.D.;Deans.S.G.:Antimicrobial and antioxidant proprieties of some commercial essential oils.Flavor and Fragrans. Journal, Vol 3, P235-244, (2000).

EI-Abed N.; Harzallah-Skhiri F.; Boughalleb N.:Chimical compositon and antifungal activity of the essential of *Pulicaria arabica* (L) Cass.from Tunisia ,Agricultural Segment :1(2) AGS/1530,(2010).

Edeas M. :Les secrets de santé du thé ,c'est naturel,c'est ma santé, Ed,Alpen Editions s.a.m ,p88,(2005).

El-Kamali.H.H;Yousif.M.O.;Ahmed.O.I.;Sabir.S.S.:Phytochemical Analysis of the essential oil from Aerial parts of *Pulicaria undulate*(L.) Kostel from Sudan,Ethnobotanical Leaflets 13:467-71,(2009).


Elmann.A. ;Telerman.A. ; Mordechay.Sh .; Erlank.H ; Ofir.R. : Antioxidant and Astroprotective Effects of a *Pulicaria incise* Infusion, Hindawi Publishing Corporation, Oxidative Medicine and Cellular Longevity , Article ID 157598, 10 pages, (2012).

El-Negoumy.S.I.; Mansour.R.M.A.; Saleh.N.A.M. :Flavononols of *Pulicaria arabica*, Phytochemistry, Volume 21,Issue 4, pp 953-954, (1982).

Eshbakova.K. A. ; Sagitdinova.G. V. ; Malikov.V. M. ; Melibaev.S. :Flavone sorbifolin from *Pulicaria uliginosa*, Chemistry of Natural Compounds, Vol. 32, No. 1,(1996).

Eshbakova.K.A.;Saidkhodzhaev.A.I. : Triterpenoids and sterols from three species of *Pulicaria* ,Chemistry of Natural Compounds, Vol. 37, No. 2,(2001).

Eydward.S.:Mise en évidence et suivi de l'oxidation des lipides au cours de conversation et de la transformation de chinchard (*Trachurus trachurus*),choix des procédés. Thèse de Doctorat en Génie des procédé (Ecole Doctorale en Genie des procédés: Spécialité biochimie, Nante, France, (2003).

 **alleh.H.;Ksouri.R.;Chaieb.K.;Karray-Bouraoui.N.; Trabelsi.N.; Boulaaba.M.; Abdelly. C. :** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. Comptes Rendus Biologies, 331, 372-379, (2008).

Fawzy.GH.A. ;Al-Ati.H.Y. ;EL.Gamal.A.A. :Chemical composition and biological evaluation of essential oils of *Pulicaria jauberti*,Pharmacogn Mag.,Jan-Mar; 9(33): 28-32,(2013).

Feliciano.A.;Medarde.M.;Gordaliza.M.;DelOlma.E.;Del Corral.M.: Sesquiterpenoids and phenolics of *Pulicaria paludosa*.Phytochemistry,28,2717-2721,(1989).


Ferhat.M .A . ;Meklati.B .Y. ;Chemat.F. :Citrus d'algerie,Les huiles essentielles et leurs procédés d'extractions,Ed,Office des publications universitaires,(2010).

Festy.D. : 100 réflexes aromathérapie :je me soigne avec les huiles essentielles. +pratique, + efficaces,+faciles,Ed,Leduc .s, (2008).

Festy.D. : Les Huiles essentielles, ça marche, Ed, Leduc.s, p17-18, (2011).

Festy.D :100 réflexes- Les Huiles essentielles à respirer, Ed, L'educ .s, p14, (2012a).

Festy.D : Je ne sais pas utiliser les huiles essentielles : Découvrir l'aromathérapie, LE guide pour se soigner facilement et sans risque,ED,Leduc.s,p24, 25, (2012b).

 **arabeth.F. ;Bouaoun.D. ;Elyafi-Elzahri.G. :** Etude quantitative des coumarines d'une plante sauvage Prangos asperula Boissier,Phytothérapie,5 :259-263,(2007).

Garnier.J.P.;Brandely.M.-L.;Taburet.A.M.:Actualités en Pharmacie et Biologie Clinique, Maladie d'Alzheimer Accidents Vasculaires cérébraux Protéomique, Métabolique.Ed, john Libbey Eurotext, paris ,p57,(2009).

Ghanmi.M ;Satrani.B ;Aafi A ;Isamili.M.R ;Houti.H ;El Manfalouti.H ; Benchakroun.K.H ; Aberchane.M ;Harki.L.Boukir.A ;Chaouch A ;Charrouf.Z. :Effet de la date de récolte sur le rendement ,la composition chimique et la bioactivité des huiles essentielles de l'armoise blanche (*Artemisia herba-alba*) de la région de Guerçif (Maroc oriental), Phytothérapie,8 :295-301,(2010).

Ghouila.H. ;Beyaoui.A. ; Ben Jannet.H. ;Hamdi.B. ;Ben Salah.A. ;Mighri.Z.: Isolation and structure determination of pulicazine, a new sesquiterpene lactone from the Tunisian *Pulicaria laciniata* (Coss.et Kral.) Thell,TetrahedronLetters ,50 :1563–1565,(2009).

Giordani.R. ;Kaloustian.K . : Action anticandidosique des huiles essentielles : leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques, *Phytothérapie* Numéro 3 :121-124, (2006).

Grosjean.N. :Les Huiles essentielles :Se soigner par l'aromathérapie,Ed ,Eyrolles,p15, 16,(2010).

Guignard.J.L ;Dupont.F :Botanique systématique moléculaire,13^{ème} édition, Masson,paris, p252, (2004).

afez.S, Sarg T.M, El-Domiaty. M.M, Ahmed.A.A, Melek.F.R, Bohlman.F.: Caryophyllene Derivatives from *Pulicaria arabica*. *Phytochemistry(Oxford)* 26, 3356-8, (1987).

Hameurlaine.S. :Mise en évidence des huiles essentielles contenues dans les plantes *Pituranthos scoparius* et *Rhanterium adpressum* de la région de ghardaia, thèse de magister,universiré de Kasdi Merbah-Ouargla,p44,64-66,(2009).

Hanbali.F.E.L.,Akssira.M. ;Ezoubeiri.A. ;Gadhi.Ch.A.;Mellouki.F. ;Benherraf.A. ; Blazquez. A.M. ;Boira.H. :Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Pulicaria odora* L, *Journal of Ethnopharmacology* ,99:399–401,(2005).

Hashim EL-Kamali.H ;Omer Yousif.M. ;Ibrahim Ahmed.O.;Suliman Sabir.S. : Phytochemical Analysis of the Essential Oil from Aerial parts of *Pulicaria undulata*(L.) Kostel from Sudan, *Ethnobotanical Leaflets* 13: 467-71, (2009).

Hennebelle.T. ;Sahpaz.S. ;Bailleul.F. :Polyphénols végétaux ,sources ,utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif.*Phytothérapie* Numéro 1 :3-6,(2004).

Hichiri.F.;Chriaa.J.;Hammami.S.;BenJannet.H. ;Mighri.Z. :Chemical composition and antimicrobial activities of *Pulicarialaciniata*oils,Isolation and structure elucidation of a bioactive sesquiterpene lactone,*Journal de la Société Chimique de Tunisie* ,11,77-81, (2009).

Hierro.M.T.G. ,Santa-María.G : Supercritical fluid extraction of végétale and animal fats with CO₂ –A mini review *Food Chemistry*,Volume 45, Issue 3,Pages 189.(1992).

Hilant C. ;Bouaoun D. ;Aoun J. ;Sfeir R.;GarabethF.:Propriétés antimicrobiennes et toxicité par détermination de la DL50 de l'huile essentielle de Prangos asperula Boissier,*Phytothérapie*,7 :8-14,(2009).

Hopkins.W.G.: Introduction to plant physiology. Francais. Ed,DeBoeck Supérieur, p269,(2003).

Hamia.Ch. ;Gourine.N.Boussoussa.H. ;Saidi.M. ;Gaydou.E.M.;Yousfi.M.:Chemical Composition and Antioxidant Activity of the essential oil and fatty Acids of Flowers of *Rhanterium adpressum*, *Natural Product Communication*,Vol.8,N °8,1171-1174,2013.

noye.S. ;Abe.S. :Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse, *Phytothérapie*, Numéro 1 : 2-4, (2007).

Jacob.F.H. ; Pignal.M.C. : Interactions levures-tanins ,Croissance et survie de diverses levures dans des solutions tannantes, *Mycopathologia et Mycologia applicata* ,vol.48 ,2-3,pag .121-142,(1972).

Jehl.F : Comite de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, Laboratoire de Bactériologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg-Faculté de Médecine 1-3, rue Koeberlé,67000 Strasbourg,(2013).

Johnson.A.W.: Invitation à la chimie organique, Ed, De Boeck Supérieur, p 26, (2003).

Judd.W.S ;Campbel.CH.S;Kellogg.E.A;Steven.P:Botanique systématique:une perspective phylogénétique, p86, 396, (2002).

Kala.A.;Gherraf .N.; Belkacemi.D.; Ladjel.S.; Zellagui.A.; Hameurlain.S.; Chih.S.; Iabed.B.:Composition of the essential oil of *Rhanterium adpressum* Coss and Durieu, from Algeria,Archives of Applied Science Research,1(2)115-118,(2009).

Kaloustian.J. ;Chevalier.J. ;Micail.C. ;Martino.M. ;Abou.L . ;Vergnes.M.F. :Etude de six huiles essentielles :composition chimique et activité antibactérienne,Phytothérapie, 6 :160-164,(2008).

Khani.A.; Asghari.J. :Insecticide activity of essential oils of *Mentha longifolia*, *Pulicaria gnaphalodes* and *Achillea wilhelmsii* against two stored product pests, the flour beetle, *Tribolium castaneum*, and the cowpea weevil,*Callosobruchus maculatus*. Journal of Insect Science 12:73 available online: insectscience.org/12.73, (2012).

Kheyar.N. ;Meridja.D.;Belhamel.K.:Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielle d'*Inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* de la région de Bejaia,Algerian Journal of Natural Products.2(1)18-26,(2014).

Kolai.N. ;Saiah.F. ;Boudia.A. :Effet Inhibiteur in vitro de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* sur deux souches de *Fusarium oxysporum* f. sp. radices-lycopersici, Laboratoire de protection des végétaux, Université Abed El Hamid Ibn Badis Mostaganem , Algérie,vol .2, n°1 :71-76,(2012).

Kouamé.J. ;Gnoula.C. Palé E., ; Bassolé.H. ;,Gussou.I.P. ;,Simpore J. ; Nikiéma J.B . :Etude des propriétés cytotoxiques et antiradicalaires d'extraits de feuilles et de galles de *Gueirasene galensis* J.F.Gmel (Combretaceae),Science et technique, Sciences de la santé. Vol. 32, n°s 1 et 2-Janvier-décembre, (2009).

Laib I. : Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis*: application aux moisissures des légumes secs , Nature& Technologie, p 44-52,(2012).

Lamarti.A.;Badoc.A. ;Deffieux.G.;Carde.J.P. :Biogenèse des monoterpènes, la chaîne isoprénique , Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 133,79-99, (1994).

Léandre.K.K.;Kouakou J-C. A ; Flavien.T. ;Ehouan.E. E . : Effet antihypertensif de BpF2, une fraction d'extrait aqueux de feuilles de *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) chez le lapin,Sciences& Nature Vol. 5 N°1 : 29 – 37, (2008).

Lemesle.S. :Huiles essentielles et Eaux florales de Madagascar, Guide pratique d'une aromathérapie innovante,(2011).

Maachado.A.: Les Huiles essentielles,découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale,Ed,Lanore, (2009).

Macheix.J.J. ;Fleuriet.A. ;Allemand Ch.J. :Les composés phénoliques des végétaux, Ed, Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, p7,12, 13, 14,158, (2005).

Mahesh Kumar.K. ; Nelson Kumar.S. ; Rajaram.C. ; Sreelakshmi.N. ; Ravindreddy. K. :Antiulceractivity of methanolic extract of *Pulicaria wightian* against cold stressinduced

ulceration in Wistar rats, International Journal of Nature Sciences July – Sept, Vol. 1 / Issue. 1 / 23-28, (2012).

Mansour.R.M.A.;Melek.F.;R.;Saleh.N.A.M.: The flavonoids of *Pulicaria incisa*, Fitoterapia. 61, 186-187, (1990).

Mansouri.N. ; Satrani.B. ; Ghanmi.M. ;ElGhadraoui.L. ;Guedira.A. ;Aafi.A. : Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Juniperus communis* du Maroc, Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, Vol. 80, (2011).

Malecky.M. : Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins, thèse de doctorat, INR,UMR 791 Physiologie de la Nutrition et Alimentation, F-75231,Paris,(2007).

Malek.F.R. ;El-Ansari M. ;Hassan A. ;Regaila A. ;Ahmed A.A. ;MabryT.J. : Méthylated flavonoid aglycones from *Pulicaria arabica* ,Rev, Latinoam, Quim. 19, 119,120,(1988).

McMurry.J. ;Begley.T. : Chimie organique des processus biologique, Ed, De Boeck Supérieur, p127,133,139,(2006).

Menat.E. : Les polyphénols de thé, du vin et du cacao, Phytothérapie, Numéro 1 :540-545, (2006).

Mendham.J. ; Denney R.-C.; BarneJ.-D.;Thomas M.J.K.: Analyse chimique quantitatives de Vogel,Ed,De Boeck Supérieur p738,(2005).

Mercan.D.: Le stress oxydatif, Ed, Unilabs, Lausanne, pp14, (2010).

Mergham.R. :Eléments de biochimie végétale,Bahaeddine, Editions,Algérie,2009.

Mhirit.O. ;Philippe.B. :Le grand livre de la forêt marocaine, Editions Mardaga, p204, (1999).

Milpied.H :Progrès en Dermato-Allergologie, Ed, Johnlibbey Eurotext,p126,128, (2009).

Mohammedi.Z. ;Atik.F. : Pouvoir antifongique et antioxydant de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* L,Revue « Nature & Technologie ». n° 06/Janvier (2012).

Mossa.J.S., Hifnawy.M.S., Al-Yahya.M.A., Al-Meshal.I.A.;Mekkawi.A.G. Aromatic plants of Saudi Arabia – GC/MS analysis of essential oils of *Pulicaria arabica* and *P. undulata*. Pharmaceutical Biology,25, 113-119,(1987).

Neal.M.D; Jaime.A.Y ;Basil.R. :Flavonoid Pharmacokinetics :Methods of Analysis ,Preclinical and Clinical ,Pharmacokinetics ,Safety ,and Toxicology.Ed.John Wiley & Sons, (2012).

Sould Mohamed vall.H. A. :Contributions à l'étude des plantes médicinales de Mauritanie , Ann. Univ. Lomé (Togo),série Sciences, Tome XVII : 9-27,(2009).

Tradrini.F. ;Lucheroni.M.T. : Le Grand livre des huiles essentielles .Ed,de Vecchi, (1996).

Paolini.J: Caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG /SM-(IE et IC) et RMN du carbone-13 de *Citrus albus* et de deux Asteraceae endémiques de Corse :*Eupatorium cannabinum* subsp.corsicum et *Doronicum corsicum*, Thèse de doctorat de l'université de Corse p 8,(2005).

Pares.J.O. ;Oksuz.S. ;Ulubelen.A. ;Mabry.T.J.:6-Hydroxy Flavonoids From *Pulicaria dysenterica* (Compositae), Phytochemistry.Vol.20,2057,(1981).

Perrut.M. :Extraction par fluides supercritiques, Techniques de l'ingénieur, Traité de génie des procédés, J-2-770, p.1-12,(1999).

Petit.F :Cartographie de l'espace chimique d'une large collection d'huiles essentielles-Visualisation en réseau,Phytothérapie,10 :44-54,(2012).

Philippe C :Astéraceae Martinov,Encyclopédie des Cactus, plantes grasses et Succulentes, <http://www.Cactus.pro.com/encyclo>,(2008).

Pibiri.M.C. : Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle. Thèse de doctoral.Polytechnique Fédérale de Lausanne, 2005.

Piochon.M. :Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne : Composition chimique, Activités pharmacologiques et Hémisynthèse. Mémoire présenté à l'université du Québec, p 8,9, (2008).

Quezel P. ; Santa S. :Nouvelle flore de l'algerie et des régions désertiques méridionales .CNRS.paris, p859,(1963).

Ragot M. : Produire du lait biologique :conservation et témoignages,Educagri Edition,p196,1981,(2011).

Ranilla.L. G.; Kwon Y. I.; Apostolidis.E.;Shetty.K .:Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresource Technology*, 101, 4676-4689, (2010).

Raven.P.H ; Evert R.F ; Eichhorn.S.E : Biologie végétale, p32,527,(2003).

Regnault-Roger.C. ;Philogene.B.J.R. ;Vincent. CH.: Biopesticides d'origine végétale. Ed. Lavoisier,p259,280,(2008).

Robestein.M. ;Soerensen.Ch. : Chimie avancée :préparation au bac et à la maturité, Ed,PPUR Presses polytechnique ,p102,(2011).

Rizk.A.M.;Hammouda.F.M.;Ismail.S.I.;Hussiney.H.A.:Constituents of plants in Qatar XXII.Flavonoids of *Ranunculus acris*, Qatar.Univ, Sci. J. Vol.13 (1), 51, (1993).

Sagitdinova.G.V.;Eshbakova.K.A. ;Khushbaktova.Z .A. ;Malikov.V .M. ;Olimov.V. Flavonoid pulicarpin from *Pulicaria salviifolia* and its hypolipidemic activity, Institute of Chemistry of Plant Substances, Uzbekistan Academy of Sciences, Tashkent. Translated from *KhimiyaPrirodnikhSoedinenii*, Nos. 3, 4, pp. 328-330, May-August, (1992).

Seidel V.: Initial and Bulk Extraction. In: Sarker S D, Latif Z and Gray A I. Natural products isolation. Humana Press (Totowa), pp: 27-37, (2005).

Sorm F.:Les terpene Moyen-ring, Fortschritt der chemie organischer naturstoffe / Progress in the chemistry of organic natural products/Progrédans la chimie des produits naturels organiques,Ed,Springer Vienne,Volume19,pp1-31,(1961).

Spichiger.R.E . ;Savolainen.V.V ;Figeat.M. ;Jeanmonod.D :Botanique systématique des plantes à fleurs,3^{ème} édition,p348-349,(2004).

Sutour.S. :Etude de la composition chimique d'huile essentielle et d'extraits de menthes de corse et de kumquats, thèse de doctorat, université de corse pascal paoli, p13,(2010).

Svoboda.K.P. ;Hampson.J.B. :Bioactivity of essential oils of selected temperature aromatic plants, antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related.Pharmacological activities. Oral Microbiologie and Immunology.Vol 9,Issue 4,P202-208,(2009).

Sy Gy. ;Barbosa F.S. ;Wele A., Gueye.P.M. ;Gueye.C.D. ;Cisse.A. ;Dieya .M. ;Bassene.E. ; Faye.B.:Activité anti-hyperglycémiant de la fraction F2 de l'extrait total acétonique de feuilles de *Vernonia colorata* (COMPOSEAE),Pharmacopée et Médecine Traditionnelle Africaines,15: 6-10,(2008).

Tela Botanica :Base de Données Nomenclaturale Afrique du Nord par Alain Dobignard BDAFN v1.00,<http://www.tela-botanica.org>.

Teyeb H.;Houya O .;Douki W.;Neffati M.: Composition chimique et activité antioxydante de l'huile essentielle d'*astragalus gombo* collectée à partir de deux sites de la Tunisie, Journal de la Société Chimique de Tunisie, 14, 63-67, (2012).

Taubordolle M. :Toxicologie sciences mathématiques physiques et chimiques. p803,Édition,Wolters Kluwer France,(2007).

Vollardt.P.C. ;Schore N.E. ;Depovere P. :Traité de chimie organique, Ed,de boeck, p148,(2009).

Williams.C.A. ;Harborne.J B.; Greenham.J :Geographical variation in the surface flavonoids of *Pulicaria dysenterica*, Biochemical Systematics and Ecology,28: 679-687 ,(2000).

-William G. H: Physiologie végétale ,Éditeur, De Boeck Supérieur,p282,(2003).

Yrjöen.T. Extraction and Planar Chromatographic Separation Techniques in the Analysis of Natural Products.Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki,p76,(2004).

Yaghmai.M.S. ;Kolbadipour.S. :Volatile components of *Rhanterium epapposum Oliv.* Flavour and Fragrance Journal, 2, 29-32,(1987).

Zellagui.A. ;Derouiche.K. ; Gherraf.N.;Rhouati.S. : Characterisation of Secondary Metabolites and Evaluation of Antibacterial activity of two Algerian species: *Launaea glomerata* (Cass. Hook.F. and *Cynara cardunculus* var. *silvestris* (Lamk.), J. Microbiol.Biotech.Res2(5):736-740,(2012a).

Zellagui.A. ; Gherraf .N.; Akkal.S .:Chemical composition,antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles des parties aériennes de *Enanthevirgata* Poiret, endémique en Afrique du Nord,Int.J.Med .Arom .Plants,ISSN 2249-4340 ,Vol .2 ,N° .2,pp.235-239,june (2012b).

Zhiri.A. : Les huiles essentielles ont un pouvoir antimicrobien avéré, Nutra News Science, Nutrition, Prévention et Santé, Édité par la fondation pour le libre choix, p9,10 ,(2006).

ANNEXE

Annexe1 : Composition de différents milieux de culture utilisés.

Eau physiologique stérile :

Chlorure de sodium (NaCl)	9g
Eau distillée.....	1000ml

Bouillon BrainHeart Infusion(BHIB) :

Protéose-peptone.....	10g
Infusion de cervelle de veau.....	12,5g
Infusion de cœur de bœuf.....	5g
Chlorure de sodium.....	5g
Phosphate disodique.....	2,5g
Glucose.....	2g
Eau distillée.....	1000ml
PH=7,5	

Gélose nutritive (GN) :(en g /l d'eau distillée)

Peptone.....	10g
Extrait de viande.....	3g
Extrait de levure.....	3g
Chlorure de sodium.....	5g
Agar.....	18g
PH=7,4	

Gélose Chapman :(en g /l d'eau distillée)

Extrait de viande	1g
Extrait de levure.....	3g
Tryptone.....	5g
Peptone bactériologique.....	10g
Chlorure de sodium.....	70g
Mannitol.....	10g
Rouge de phénol.....	0,025g
Agar.....	15g
PH=7,4	

Gélose Hecktoen :(en g /l d'eau distillée)

Peptone pepsique de viande.....	15g
Extrait de viande.....	3g
Extrait de levure.....	3g
Lactose.....	12g
Salicine.....	2g
Saccharose.....	12g
Chlorure de sodium.....	5g
Thiosulfate de sodium.....	5g
Citrate de fer ammoniacal.....	1,5g
Sels biliaires.....	4g
Bleu de bromotymol.....	0,064g

Fuchsine acide.....0,1g
 Agar.....13g

PH=7,6

Gélose Salmonella Shigella (SS) : (en g /l d'eau distillée)

Proteose-peptone.....5g
 Extrait de levure.....3g
 Extrait de viande.....5g
 Lactose.....10g
 Sels biliaires.....2g
 Sodium citrate.....8,5g
 Vert brillant.....0,33g
 Rouge neutre.....0,025g
 Agar.....18g

PH=7

Gélose Muller Hinton (MH) :(en g /l d'eau distillée)

Extrait de viande.....3g
 Hydrolysa de caséine.....17,5g
 Amidon.....1,5g
 Agar.....10g

Gélose saboraud :(en g /l d'eau distillée)

Peptone de caséine et de viande.....10g
 Glucose monohydraté.....40g
 Agar.....15g

pH final : 5,6 à 25°C

Gélose au sang :

Muller Hinton

Sang.

pH = 7,3

Annexe 2: Composition de solution MacFarlanc 0,5

Formule approximative par 100 ml d'eau purifiée

Acide sulfurique 0,18M.....99,5ml

Chlorure de barium 0,048M.....0,5ml

Annexe 3 : Tableau de la lecture de galerie API 20E.

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
ONPG	2-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0,223	β-galactosidase (Ortho NitroPhényl-βD-Galactopyranosidase)	incolore	jaune (1)
ADH	L-arginine	1,9	Arginine DiHydrolase	jaune	rouge / orangé (2)
LDC	L-lysine	1,9	Lysine DéCarboxylase	jaune	Rouge /orangé (2)
ODC	L-ornithine	1,9	OrnithineDéCarboxylase	jaune	rouge / orangé (2)
CIT	trisodium citrate	0,756	utilisation du CITrate	vert pâle	Bleu-vert / bleu (3)

				/ jaune	
H2S	sodium thiosulfate	0,075	Hproduction d'H2S	incolore /grisâtre	dépôt noir / fin liseré
URE	urée	0,76	UREase	jaune	rouge / orangé (2)
TDA	L-tryptophane	0,38	Tryptophane DésAminase	TDA / immédiat jaune	marron- rougeâtre
IND	L-tryptophane	0,19	production d'INDole	JAMES / immédiat incolore vert pâle / jaune	rose
VP	sodium pyruvate	1,9	production d'acétoïne (VogesProskauer)	VP 1 + VP 2 / 10 min incolore / rose pâle	rose / rouge(5)
GEL	gélatine (origine bovine)	0,6	Gélatinase (GELatine)	non diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	1,9	fermentation / oxydation (GLUcose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune / jaune gris
MAN	D-mannitol	1,9	fermentation / oxydation (MANnitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
INO	inositol	1,9	fermentation / oxydation (INOsitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
SOR	D-sorbitol	1,9	fermentation / oxydation	bleu / bleu-vert	jaune
RHA	L-rhamnose	1,9	fermentation / oxydation (RHAmnose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
SAC	D-saccharose	1,9	fermentation / oxydation (SACcharose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
MEL	D- melibiose	1,9	fermentation / oxydation (MELibiose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
AMY	amygdaline	0,57	fermentation / oxydation (AMYgdaline) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
ARA	L-arabinose	1,9	fermentation / oxydation (ARAbinose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune

(1) Une très légère couleur jaune est également positive.

(2) Une couleur orange apparaissant après 36-48 H d'incubation doit être considérée négative.

(3) Lecture dans la cupule (zone aérobie).

(4) La fermentation commence dans la partie inférieure des tubes, l'oxydation commence dans la cupule.

(5) Une légère coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être lue négative.

Annexe 4: Les étapes de manipulation.



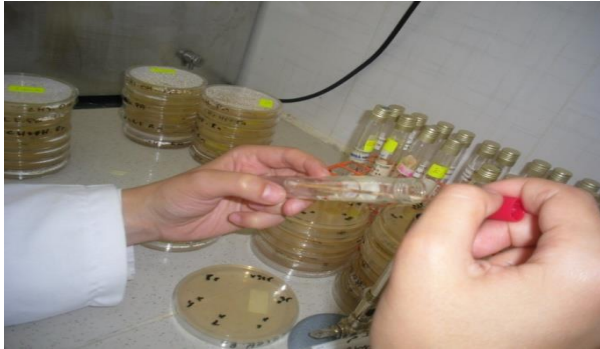
les dilutions de différents extraits



Ecoulement de MH dans les boites de pétri



Repiquage des bactéries sur la GN



Ensemencement des bactéries sur la gélose de MH



Application des différentes dilutions des extraits

Incubation des boîtes dans l'étuve à 37°C

Glossaire

Angiosperme: Sous-embranchement des spermatophytes comprenant les plantes à fleurs dont les graines sont enfermées dans des fruits après fécondation.

Anthère : Partie terminale de l'étamine formée d'un connectif et de deux loges en général, renferme le pollen.

Akène : Fruit sec indéhiscent ne renfermant qu'une seule graine.

Arbrisseau : Végétal ligneux caractérisé par sa taille inférieure à 4 m et sont absence de tronc.

Annuel : Qualifie un végétal réalisant son cycle biologique complet dans l'année puis mourant au terme de celui-ci.

Apical : Qualifie ce qui se situe au sommet d'un organe ou même d'un organisme entier.

Actinomorphe : Qualifie une fleur dont les pièces sont disposées de manière symétrique par rapport à son axe.

Albumen : Tissus nourricier de la graine résultant du développement de la cellule provenant de la fécondation des noyaux accessoires et du second spermatozoïde.

Amplexicaule : Qualifie un organe (pétiole, limbe, stipules) qui entoure complètement l'axe qui les porte.

Bractée: Feuille souvent colorée à la base de laquelle se développe la fleur ou l'inflorescence.

Bilabié : Se dit d'une corolle ou d'un calice partagé en deux lèvres, notamment chez les Lamiacées et les Scrophulariacées.

Corolle: Deuxième enveloppe de la fleur, située entre le calice et les étamines, à divisions libres ou soudées.

Capitule: Inflorescence indéfinie résultant de la juxtaposition de fleurs sessiles ou presque sur un réceptacle commun en général.

Calice: Verticille externe du périanthe d'une fleur, c'est l'ensemble des sépales.

Caudicule : Chez les orchidées petit pédoncule qui unit au niveau de la bursicule les pollinies au gynostème par l'intermédiaire d'une petite glande ou rétinacle.

Cupule: Structure écailleuse ou épineuse en forme de coupe résultant de la fusion de bractées.

Conné : Qualifie des organes semblables soudés par leur base.,On dit aussi perfoliée pour une feuille.

Calathide : Une calathide est synonyme de capitule, c'est à dire en forme de calice.

Dicotylédone: Classe de végétaux supérieurs(angiospermes) dont l'embryon possède deux cotylédons .

Denté : Qualifie un organe dont la marge est munie de dents.

Dressé : Qualifie un élément plus ou moins perpendicuaire au sol.

Endémique: Qualifie un taxon qui est propre à une région géographique nettement circonscrite et limitée.

Etamine: organe mâle des végétaux, composée d'un filet, d'un connectif et d'une anthère.

Entier : Qualifie un organe, en général une feuille, dont la marge n'est ni divisée, ni même dentée.

Embryon : Ensemble de cellule diploïdes, indifférenciées, dérivant d'un zygote et se développant sur le pied mère.

Ecailles: Petites lames minces et coriaces, parfois charnues, qui accompagnent ou protègent certains organes.

Flore : Ensemble des espèces de plantes qui croissent dans une région.

Floraison: Formation et épanouissement de la fleur, puis période durant laquelle cette fleur est épanouie.

Fleuron : Fleur tubulée des astéracées ou composées, régulières et en général hermaphrodites.

Hermaphrodite : Qualifie une fleur possédant à la fois des étamines et des carpelles fonctionnels, c'est à dire portant les organes reproducteurs des deux sexes, mâle et femelle.

Herbacé : En botanique, désigne tout aspect qui est de la nature de l'herbe par opposition à ce qui est ligneux.

Inflorescence : Mode de groupement des fleurs sur une plante, ou l'ensemble de ces fleurs. Les principaux types d'inflorescence : grappe, épi, ombelle, capitule, cyme.

Involucre : Ensemble de bractées axillant une ombelle d'apiacée d'un capitule d'astéracée ou de dipsacacée voire d'une fleur solitaire etc.

Imbriqué: Qualifie un préfloraison ou une estivation dans laquelle un pétale est recouvert par ses voisins, un pétale recouvre ses voisins, les trois autres étant recouvrant et recouverts.(Qualifie des organes insérés comme les tuiles d'un toit).

Lobé : Qualifie un organe bordé de lobes.

Languette ou rangée de poils s'insérant contre la tige et située à la jonction entre le limbe et la gaine de la feuille.

Ligulé: Qualifie les fleurs situées à la périphérie des capitules de certaines astéracées (demi-fleurons).

Ligule: Partie de la feuille dans certaines familles surtout les poacées, petite languette ou rangée de poils s'insérant contre la tige et située à la jonction entre le limbe et la gaine de la feuille.

Limbe : Partie élargie d'une feuille ou d'un pétale.

Milieus sélectifs : empêchent la croissance de certaines bactéries et favorisent la croissance de celles d'intérêt.

marginale : En biologie, voir croissance marginale, En botanique, qui est relatif aux bords, à la marge.

Oblong : De forme plus longue que large et aux extrémités arrondies.

Pubescent : Qualifie un organe densément couvert de poils fins et mous.

Pétale: Chacune des pièces stériles, en général colorées, de la corolle.

Principe actif : est une molécule biologique ,minérale ou organique ou synthétique qui confère au médicament son activité thérapeutique .

Pappus : Couronne membraneuse ou ensemble de soies, ayant valeur de calice (?), qui surmonte l'ovaire, puis l'akène, de nombreuses astéracées et se développant considérablement lors de la fructification.

Panicule: Inflorescence composée, formée d'un racème à axes latéraux ramifiés de manière indéfinie.

Paillette : petite écaille membraneuse plus ou moins translucide caractéristique de l'inflorescence de certaines astéracées; en l'occurrence, de nombreuses paillettes peuvent ainsi être insérées entre les fleurs.

Rameau : En général, axe de nature caulinaire, développé à partir d'un bourgeon et portant ou non des feuilles.

Résinifère: Directement, qui produit de la résine. Se dit de certains spermatophytes.

Résine : Sécrétion plus ou moins liquide, à base de terpénoïdes, en partie dissoute dans des essences.

Réceptacle : Surface d'insertion des pièces florales.

Radiée : Fleur composée, offrant des fleurons au centre et des demi-fleurons à la circonférence : Marguerite, Paquerette, Arnica, Souci.

Sessile : Qualifie un organe ou une structure dépourvue de support, pédoncule, pédicelle ou pétiole.

Stipule : Organe (le plus souvent pair) foliacé ou épineux situé de part et d'autre du pétiole au niveau de sa jonction sur l'axe

Spermatophyte: Embranchement du règne végétal comprenant toutes les plantes à graines

Sépale : Un sépale est un élément constituant le calice de la fleur, qui complètent les pétales; c'est donc l'un des éléments foliacés, généralement verts.

Soie : Poils simple en général raidé et dressé.

Sympétale : Qualifie une corolle dans laquelle les pétales sont soudés entre eux.

Tépale : Désigne une pièce du périanthe quand celui-ci n'est pas différencié en calice et corolle.

Verticille: Ensemble d'organes de même nature insérés en cercle et à un même niveau.

Vivace : Qualifie une plante qui vit plusieurs années et qui à développé des structures particulières dans ce but.

Zygomorphe : Se dit d'une fleur symétrique par rapport à un plan. S'oppose à actinomorphe.

Résumé

Dans le cadre de la recherche appliquée sur les plantes médicinales de la flore algérienne, on s'est intéressé à étudier des deux espèces sahariennes endémiques, *Rhanterium adpressum* Coss. & Durieu et *Pulicaria arabica* (L.) Cass, plantes appartenant à la famille des Asteracées. L'étude a concerné une analyse qualitative et quantitative des huiles essentielles de la plante *Pulicaria arabica* par la méthode de CG/SM, et l'évaluation de l'activité antioxydante par le test de DPPH et l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en milieu gélosé des huiles essentielles et des extraits organiques (EMeOH, EDCM et En-hex) de la partie aérienne des deux plantes.

L'analyse d'huile essentielle de la plante *Pulicaria arabica* a permis d'identifier vingt quatre composants appartenant principalement aux sesquiterpènes hydrocarbonés. Bicyclo (4,4,0) Dec-1-ene,2-Isopropyl-5-methyl-9-methylene (17,23%), 1H-Indene, 1-ethylideneoctahydro(13,24%), β -Bourbonene, (7,34%), α -Muurolene (5,94%)et β -Ocimene(5,89) sont des composés majoritaires. L'évaluation de l'activité antioxydante a révélé un pouvoir antioxydant important surtout pour les extraits méthanoliques (80,91%) pour la plante *Pulicaria arabica* et (76,91%) pour la plante *Rhanterium adpressum*, Ces valeurs sont proches à celles de l'antioxydant standard utilisé (Vit C). Les extraits apolaires (EDCM, En-hex) sont révélés un pouvoir antioxydant considérable, Par ailleurs, les extraits huileux ont montré une très faible activité. Les résultats de l'activité antimicrobienne ont montrés que les extraits huileux sont les plus actifs contre les germes testés suivies par les extraits apolaires puis les extraits polaires contrairement à l'activité antiradicalaire.

Mots clés : *Rhanterium adpressum*, *Pulicaria arabica*, Huiles essentielles, Extraits organiques, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

المخلص

في إطار البحث المطبق على النباتات الطبية الجزائرية، اهتمنا نحن بدراسة نوعين من النباتات الصجراوية ينتميان الى العائلة المركبة وهما نبات *Pulicaria arabica* ونبات *Rhanterium adpressum*، الدراسة تتعلق بتحليل كمي ونوعي للزيوت الاساسية لنبات البوليكاريا بواسطة تقنية الكروماتوغرافيا الغازية المزدوجة بالمقياس الطيفي الكتلي وتقييم النشاط ضد ال DPPH والنشاط ضد الميكروبات بواسطة طريقة الانتشار في وسط الاغار للزيوت الاساسية والمستخلصات العضوية (الميثانولية، الكلوروفورمية والهيكسانية).

تحليل الزيت الاساسي لنبات البوليكاريا سمح بتشخيص اربعة وعشرون مركب تنتمي عموما الى السيسكويتاربيينات الهيدروكاربونية. Bicyclo(4,4,0)Dec-1-ene,2-Isopropyl-5-methyl-9-methylene(17,23%),1H-Indene,1ethylidene Bourbonene(7,34%), α -Muurolene (5,94%) β -octahydro (13,24 %) ، هي المركبات السائدة. ، تقييم النشاط ضد الاكسدة كشف عن فعالية كبيرة خاصة بالنسبة للمستخلصات الميثانولية بنسبة 80,91%بالمنة لنبات البوليكاريا، و 76,91%بالمنة لنبات الرانثيريوم، وهي نسبة قريبة لمضاد الاكسدة المستعمل كشاهد(الفيتامين ج)، المستخلصات غير القطبية الكلوروفورمية والهيكسانية كشفت عن فعالية مضادة للاكسدة معتبرة في حين المستخلصات الزيتية اظهرت فعالية ضعيفة جدا. نتائج النشاط المضاد للميكروبات اظهرت ان المستخلصات الزيتية هي الاكثر فعالية ضد الجراثيم المخابرة تتبعها المستخلصات غير القطبية ثم القطبية وهذا على عكس النشاط المضاد للاكسدة.

الكلمات المفتاحية: *Rhanterium adpressum*, *Pulicaria arabica*، الزيوت الاساسية، المستخلصات العضوية، النشاط المضاد النشاط المضاد للميكروبات.