

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Djilali Bounaama - Khemis Miliana



Faculté des Sciences et de la Technologie
Département de la Technologie

Mémoire du Projet de Fin d'Etudes
Pour l'obtention du diplôme

Master

En

« Génie des procédé »

Option :

«Génie pharmaceutique»

Titre

**Contribution à l'étude des polyphénols et l'huiles essentielles
des plantes médicinales « *Inula viscosa* » et « *Rosmarinus
officinales* » et évaluations de leurs activités antimicrobiennes.**

Réalisé par :

- ❖ Bel kacem kourmi zahia
- ❖ Djazairi fatima zohra

Encadré par :

HACHAMA KAMEL

Année Universitaire 2015/2016

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier ALLAH EL KARIM et le tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qui nous a donné durant toutes les années d'études.

Nous rendons hommage à notre promoteur Mr HACHAMA KAMEL, pour nous avoir aidés à réaliser ce travail sous sa direction, et pour ses très précieux conseils et les encouragements qu'il n'a pas cessé de nous prodiguer tout au long de ce travail.

Nous exprimons tous nos remerciements à messieurs les membres du jury, pour avoir bien voulu accepter de juger ce travail.

Nous remercions tous les enseignants de département " de technologie " l'université de Djilali Bounaama Khemis Miliana qui nous ont aidé de près ou loin pendant toutes les années d'études.

Nos cordiaux remerciements vont au personnel du laboratoire de chimie, et des laboratoires de génie des procédés, ainsi que le personnel du laboratoire de microbiologie de universitaire de Djilali Bounaama, et de laboratoire médicale privé d'Ain Deffla.

Nous profitons aussi de cet occasion pour adresser nos remerciements à nos parents pour leur sacrifices et à toutes les familles qui nous ont toujours encouragé et soutenu tout au long des années d'étude.

Nous remercions toute personne qui de près ou de loin a contribué à faire avancer ce travail.

Nos remerciements vont aussi à la promotion de master 2 en génie pharmaceutique de 2016 de l'université de Djilali Bounaama Khemis Miliana.

DEDICACES

*Avec un grand respect je tiens à dédier ce modeste travail :
A ceux que j'aime le plus au monde mes très chers parents pour leurs
affections, leurs souffrances et leur sacrifice, et leurs
encouragements.*

*A la lumière de ma vie, mon **mari** pour leur Dévouement, qui a
partagé mes souffrances, toujours à été présente dans les moments
les plus difficiles.*

A mon frère et leurs familles

A tout mes sœurs et sons familles

A parents de mon mari et leurs familles

*A mon binôme zahia avec qui j'ai partage les bons et
les durs moments.*

A tout mes amis.



Fatima Zohra

Avec beaucoup de tendresse



Dédicace

*Je dédie ce modeste travail qui est le fruit de mes efforts
A ceux que j 'aime le plus au monde mes très chers parents,
leurs sacrifices et leurs encouragements toute ma vie, je ne
saurais jamais comment exprimer mes sentiments pour avoir
veillé sur mon éducation, jamais je ne peux les remercier
assez de m'avoir donner le meilleur.*

A mes chers frères :

*Zohra,Djilali,Rabiaa,Souhila,Nadjat,Fattima,Soumia,Moham
med,Abd elrazak .et le fic démon frère Zahra qui s'appel
Yaakoub et Maroi.*

A tout mes amis,Fatima Zohra,Aziza,Radia,Houria .

A mon binôme Fatima Zohra .

*A toute ma famille et a tout ce qui me
connaissent je vous aime.*

Zahia



الملخص

في بداية الأمر قمنا باستخلاص متعدد الفينونات من نبات المقرمان عن طريق تقنية التحليل بالمذيبات و استخلاص الزيوت الطيارة من نبات اكليل الجبل عن طريق تقنية التقطير البخار, و بعد ذلك أجرينا بعض الفحوصات للمادة المستخلصة من أجل تحديد خصائصها و مراقبة مردودها اعتمادا على فترة الحصاد, علما انه تم الحصاد من منطقة الماين (ولاية عين الدفلى – الجزائر)

سمح التحليل الكروماتوجرافي الغازي المزوج مع مطيافية الكتلة (MS/CG) بتحديد ستة مركبات اساسية , المتمثلة في (13,96) eucalyptol , (14,07) 2-pinen-7-one , (4,42) isopulegol , (11,10) one,5- , Caryophyllène (3,66 %), bicyclo[3.1.0]hexan-2- (1-methylethyl)- , كما قمنا بدراسة ميكروبيولوجية نوعية و كمية لمعرفة مدى تأثير مستخلص نبات المقرمان على نوعين من البكتيريا (ستافيلوكوكيس و اشيريشيا كولي) و نوع واحد من الخمائر (كنديدا البيكان) ومنها استنتجنا أن هذا المستخلص له تأثير كبير على ستافيلوكوكيس (30%) و الخميرة المجرب عليها (22,22%) . و عدم تأثيره على اشيريشيا كولي.

تقييم تأثير الزيت الاساسية لنبات اكليل الجبل على البكتيريا , ستافيلوكوكيس (36,66%) اشيريشيا كولي (13,33%) و كنديدا البيكان (22,22%) . تبين انه لها تأثير على كل من البكتيريا و الخميرة المستعملة لكن بنسب متفاوتة.

كلمات المفتاح : المقرمان , اكليل الجبل , الاستخلاص , بوليفينول , الزيوت الاساسية , فعالية ضد البكتيرية.

Résumé

Nous avons réalisé dans un premier temps une extraction des polyphénols d'*Inula Viscosa* à partir de l'extraction par solvant et l'extraction d'huiles essentielles d'*rosmarinus officinalis* par hydro distillation, pour savoir ses caractères et de suivre son rendement selon la période de la récolte. Sachant que les deux plantes étaient récoltées à ElMayan (Région d'Ain Defla-Algérie).

L'analyse par la chromatographie en phase gazeuse couplé a la spectrométrie de masse (CG/SM) a permet d'identifier six composés majoritaires de l'HE des feuilles de *Rosmarinus Officinalis* obtenue par HD sont : eucalyptol (13,96) , 2-pinen-7-one (14,07) , isopulegol (4,42) , bicyclo[3.1.0]hexan-2-one,5-(1-methylethyl)- (11,10) , Caryophyllène (3,66 %) et viridiflorol (3,83).

Les tests quantitatifs et qualitatifs de l'extraits éthanoïque obtenue sur deux bactérie *Staphylococcus Aureus* (30%), *Escherichia coli* (0 %) et une levure *Candida albican*

(22,22%). ont montré que ces dernières sont sensible sauf *Escherichia coli* et la concentration minimale inhibitrices (CMI) a été déterminée.

L'application d'huiles essentielles des feuilles d'*rosmarinuse officinalise* sur les souches bactériennes : *Staphylococcus Aureus* (36,66%), *Escherichia coli* (13,33%) ,et la levure *Candida albican* (22,22%). ont montre que ces dernières sont sensible, et la concentration minimale inhibitrices a été déterminée.

Mots Clés : *Inula Viscosa*, *rosmarinuse officinalise*, Extraction, polyphénols, huile essentielles, activité antibactériennes.

Abstract

Initilly, we corried ont the extraction of inula viscosa, polyphenols from solvent extraction and extraction of essential oils rosmarinuse officinalise by hydro distillation, to know its character and follow its yield arwding to the corp period. Knowing at the two plants were harvested in Elmayan (region Ain Defla, Algeria).

The analysis by gas chromatography coupled to the spectrometry of masee (GC / MS) to identify six major compounds of HE Rosmarinus officinalis sheets obtained by HD are: eucalyptol (13.96) and 2 -pinen-7-one (14.07) isopulegol and (4.42) and bicyclo [3.1.0] hexan-2-one, 5- (1-methylethyl) - (11,10) and Caryophyllene (3.66 %) and viridiflorol (3.83).

The quantitative and qualitative tests of ethanoic extracts obtained bacteria, *Staphylococcus aureus* (30%) and a yeast *Candida albicans* (22.22%). shows that the latter are sensitive except *Escherichia coli* and the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined.

The application of essential oils of *rosmarinuse officinalise* leaves on bacterial strains: *Staphylococcus aureus* (36.66%) and *Escherichia coli* (13.33%) and the leueur *Candida albicans* (22.22%). showed that these lesters are sensitive, and the minimum inhibitory concentration was determined.

Keywords: *Inula Viscose*, *rosmarinuse officinalise*, Extraction, ethanoic, essential oil extracts, antibacterial activity.

Liste des tableaux

Tableau. I.1. Taxonomie *d'Inula viscosa*

Tableau .I.2. Taxonomie *d'rosmarinus officinalis*

Tableau .I.3. Prix (\$ US/ pound) de l'huile essentielle du romarin importée par les Etats-Unis

Tableau .I.4. Importation (en US \$) de l'HE de romarin par les Etats-Unis durant la période 1998-2002

Tableau. II.1. Les souches bactériennes testées.

Tableau. II.2. Les milieux de culture des microorganismes utilisés

Tableau.III.1. Taux d'humidité *d'Inula Viscosa*

Tableau.III.2. Résultat de test de colorations

Tableau.III.3. Comportement chromatographique des phases d'*Inula Viscosa* dans le système solvant

Tableau.III.4. Les composant Résultant à partir CCM

Tableau.III.5.Taux d'humidité de *Rosmarinus Officinalis*

Tableau.III.6. Rendements des huiles essentielles des deux plantes sèche et fraîche

Tableau .III.7. Evolution du rendement d'extraction des HE des feuilles *Rosmarinus Officinalis* par HD dans la région de Elmayen en fonction du temps au mois de (mars et avril)2016.

Tableau.III.8. Composition chimique de l'HE de *Rosmarinus officinalis*

Tableau.III.9. Les compositions chimiques majoritaire de l'HE de *Rosmarinus Officinalis* dans déférant région

Tableau.III.10. Propriétés organoleptiques d'huiles essentielles extraites de la plante *Rosmarinus Officinalis*

Liste des tableaux

Tableau.III.11. Résultats des caractéristiques physico-chimiques de deux huiles essentielles

Extraits à partir de deux plantes.

Tablea .III.12. Diamètre et le pourcentage d'inhibition des souches bactériennes de l'extrais pure des feuilles *d'Inula viscosa*

Tableau.III.13. Diamètres des zones et des pourcentages d'inhibition par la déférente concentration de l'Extrais *d'Inula viscosa*

Tableau.III.14. Concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'Extrais *d'Inula viscosa*

Tableau.III.15. Diamètre et le pourcentage d'inhibition des souches bactériennes de l'HE pure des feuilles *d'Rosmarinus Officinalis*

Tableau.III.16. Diamètres des zones et des pourcentages d'inhibition par la déférente concentration de l'HE *d'Rosmarinus Officinalis*

Tableau.III.17. Concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'HE de *Rosmarinus Officinalis*

Liste des figures

Figure.I.1. Photos représentant *d'inula viscosa*

Figure.I.2. Les photos représentant quelque type *d'inula viscosa*

Figure.I.3. Photos représentant Fleurs et Fruits *d'inula viscosa*

Figure.I.4. Photo représentant *rosmarinus officinalise*

Figure.I.5. Provenance des huiles essentielles en fonction des différentes parties de plantes

Figure.II.1. Photos représentant l'appareil de soxhlet

Figure.II.2. Photos représentant l'évaporateur rotatif

Figure.II.3. les étapes de fractionnement de l'extrait brut

Figure.II.4. Photos représentant l'appareil d'hydrodistillation (Clevenger)

Figure.III.1. Photo représentant le résultat de test de Scibata

Figure.III.2. Photo représentant le résultat de test de CCM

Figure.III.3. Les structure chimique de les composes majoritaire de l'HE de *Rosmarinus officinalis*

Figure.III.4. Photo représentant l'effet antibactérienne l'Extrais *d'lnula viscosa* pur sur différente souche et levure

Figure.III.5. Photo représentant l'effet antibactérienne des dilutions de l'Extrais *d'lnula viscosa* sur différentes souches et levures

Figure.III.6. Photo représentant l'effet antibactérienne d'HE de *Rosmarinus Officinalis* pur sur différente souche et levure.

Figure.III.7. Photo représentant l'effet antibactérienne des dilutions de l'HE de *Rosmarinus Officinalis* sur différentes souches et levures.

Liste des abréviations

HE : Huile essentielle

RO : *Rosmarinuse officinalise*

CG/MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée au spectromètre de masse

CCM: Chromatographie sur couche mince

Ia : Indice d'acide

I_s : indice de saponification

Ie : Indice d'ester

CMI : Concentration minimale inhibitrice

DMSO : diméthyle sulfoxyde

C : Concentration

°C : Degré Celsius

g : Gramme

H (%) : Taux d'humidité

HCl : Acide chlorhydrique

HD : Hydrodistillation

KOH : Hydroxyde de potassium

MHE : Masse en huile essentielle

ml : Millilitre

MS : Matière végétale sèche

MV : Matière végétale

nm : Nanomètre

pH : Potentiel d'Hydrogène

R(%) : Rendement (%)

RHE : rendement d'extraction d'huile essentielle

T : Température

V : Volume

L.A.M.Z : laboratoire d'analyse médicale privée de Dr.Zibouche

SOMMAIRE

Introduction	1
Chapitre I : étude bibliographique	
I.1. Généralités sur les plantes médicinales.....	3
I.1.1. Historique.....	3
I.1.2. Définition.....	3
I.1.3. Phytothérapie des plantes médicinales.....	3
I.1.4. Efficacité thérapeutique des plantes entières.....	4
I.1.5. Place des plantes médicinales dans la médecine traditionnelle.....	4
I.2. Plantes sélectionnée.....	5
I.2.1. <i>Inula viscosa</i>	5
I.2.1.1. Définition.....	5
I.2.1.2. Types d' <i>inula viscosa</i>	5
I.2.1.3. Taxonomie.....	6
I.2.1.4. Culture et entretien de <i>l'inule visqueuse</i>	7
I.2.1.5. Milieux Séant d' <i>l'inule visqueuse</i>	7
I.2.1.6. Floraison et Fruits.....	8
I.2.1.7. Aspects phytochimiques.....	8
I.2.1.8. Aspects pharmacologiques.....	9
I.2.1.9. Utilisation des <i>inula viscosa</i>	10
I.2.1.10. Activités biologiques de la plante <i>inula viscosa</i>	11
I.2.2. <i>Rosmarinuse officinalis</i>	12
I.2.2.1. Définition.....	12
I.2.2.2. Taxonomie.....	13
I.2.2.3. Répartition géographique.....	13
I.2.2.4. Description botanique.....	14

SOMMAIRE

I.2.2.5. Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques du <i>rosmarinuse</i> <i>Officinalise</i>	14
I.2.2.6. Aspect économique.....	15
I.2.2.7. Domaine d'utilisation de la plante	15
I.3. Polyphénols.....	16
I.3.1. Propriétés biologiques des polyphénols.....	17
I.4. Huiles essentielles	18
I.4.1. Localisation des huiles essentielles dans la plante.....	19
I.4.2. Composition chimique des huiles essentielles.....	19
I.4.3. Procédé d'extraction des huiles essentielles	20
I.5. l'activité antibactérienne.....	21
Chapitre II : Partie expérimentales	
II.1. Matériel	22
II.1.1. Matériel végétal.....	22
II.1.2. Zone d'étude.....	22
II.1.3. Équipements	22
II.1.4. Les souches bactériennes	23
II.1.5. Conservation des souches.....	23
II.1.6. Milieux de culture	23
II.2. Méthodes.....	24
II.2.1. <i>Inula viscosa</i>	24
II.2.1.1. Détermination du taux l'humidité pour les deux plantes.....	24
II.2.1.2. Polyphénols	25
II.2.1.3. Détermination du rendement en extrait brut (des polyphénols).....	27
II.2.1.4. Analyses qualitatives	27

SOMMAIRE

II.2.1.4.1. Test préliminaire : « La réaction de Shibata ».....	27
II.2.1.4.2. Séparation des polyphénols par chromatographie sur couche mince (CCM).....	28
II.2.1.5. Propriétés organoleptiques pour les deux plantes.....	29
II.2.2. <i>Rosmarinuse officinalise</i>	30
II.2.2.1. Huiles essentielles	30
II.2.2.2. Calcul du rendement	31
II.2.2.3. Influence de la durée d'extraction sur le rendement.....	31
II.2.2.4. Analyses	31
II.2.2.4.1. Identification et composition chimique.....	32
II.2.2.4.2. Étude des propriétés physique et chimique.....	32
II.2.3. L'Activité antimicrobienne.....	35
II.2.3.1. Préparation des pré-cultures.....	35
II.2.3.2. Évaluation qualitative de l'activité antibactérienne des deux plantes.....	36
II.2.3.3. Évaluation quantitative de l'activité antibactérienne de l'extrait de <i>inula viscosa</i> et l'huile essentiel de <i>rosmarinuse officinalise</i>	37
Chapitre.III: Résultats et discussions.....	38
Conclusion Générale	55
Références bibliographique.....	56

Annexes

Introduction

Générale

Introduction générale

Actuellement, plusieurs questions se sont soulevées concernant la sécurité et l'efficacité des produits chimiques utilisés en médecine. En effet, durant les 20 dernières années, il a été prouvé que l'efficacité des antibiotiques a fortement diminué. Les bactéries en sont devenues de plus en plus résistantes [1].

L'usage généralisé des antibiotiques et la prescription à grande échelle parfois inappropriée de ces agents ont entraîné la forte adaptabilité des souches bactériennes et la sélection des souches multi-résistantes, En effet, les processus de résistance bactérienne aux antibiotiques peuvent être groupés en trois grands mécanismes : modification de l'antibiotique, modification de la cible et de la concentration intracellulaire de l'antibiotique (défaut d'accumulation) [2].

Face aux limites thérapeutiques, des antibiotiques classiques ont poussé les scientifiques à orienter les recherches vers des nouvelles voies et surtout l'utilisation des principes actifs des plantes (composés phénoliques, alcaloïdes, huiles essentielles...) comme agents antibactériens.

L'activité antibactérienne d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) ou ceux susceptibles d'être actifs. Mais, il est probable que cette activité dépende aussi de composés minoritaires qui agissent d'une manière synergique [3].

Les molécules réputées d'être actives sont des terpénoïdes, car les hydrocarbures saturés et les acétates ioniques sont inactifs, par la nature même de leur faible capacité de liaisons hydrogène et de leur faible solubilité. Les composés chimiques de plus grande efficacité et à plus large spectre sont les phénols (thymol, carvacrol et eugénol), des alcools, des aldéhydes et des cétones [1].

Dans le cadre de la valorisation des espèces végétales algériennes, et compte tenu des vertus thérapeutiques que représentent les *Verbenaceae*, nous sommes intéressés à l'extraction des huiles essentielles d'*inula viscosa* et *rosmarinus officinalis* provenant de la région de W. Ain-Defla. La verveine *inula viscosa* et *rosmarinus officinalis*, herbe aromatique de la famille respectivement (Astéracées et Lamiacées), appréciée pour ses

propriétés aromatiques, antioxydants , antimicrobiennes, antibactérienne, largement utilisée dans les produits pharmaceutiques et en médecine traditionnelle. Il nous semble donc, intéressant d'inscrire notre travail dans ce contexte de recherche [4].

Notre choix est porté sur les deux plantes aromatiques, car ils est très répandues en Algérie et largement utilisée en médecine traditionnelle. Notre étude est présentée en trois chapitres. Le premier chapitre est réservé à la présentation de la matière végétale : *inula viscosa* et *rosmarinus officinalis*.

Dans le second chapitre nous présentons le matériel et les méthodes utilisées pour la réalisation de ce travail. Pour le Troisième chapitre nous présenterons les différents résultats obtenus et leurs discussions. Nous terminerons par une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus.

Chapitre I

I.1. Généralités sur les plantes médicinales

I.1.1. Historique

Des plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeur thérapeutique. Récemment, l'acceptation de la médecine traditionnelle comme forme alternative de santé et le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques disponibles a mené des auteurs à étudier l'activité antimicrobienne des plantes médicinales et en raison d'une conscience croissante des effets secondaires négatifs infligés par les drogues modernes, beaucoup cherchent les remèdes normaux sans effets secondaires et bien sûr coût élevé de médecine conventionnelle [2].

Depuis toujours les plantes ont constitué la source majeure de médicaments grâce à la richesse de ce qu'on appelle le métabolisme secondaire. Cependant, l'homme n'a découvert les vertus bénéfiques des plantes que par une approche progressive, facilitée par l'organisation des rapports sociaux, en particulier à partir du néolithique (8000 ans av. J.C.). L'observation liée à l'expérience et la transmission des informations glanées au cours du temps font que certains hommes deviennent capables de poser un diagnostic, de retrouver la plante qui soigne et finalement de guérir le malade [4].

I.1.2. Définition

La définition d'une plante médicinale est très simple. En fait il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains. Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne [5].

I.1.3. La phytothérapie des plantes médicinales

L'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend de la composition des plantes, depuis XVIIIème siècle, au cours duquel des savants ont commencé à extraire et à isoler les substances chimiques qu'elles contiennent. On considère les plantes et leurs effets en

fonction de leurs principes actifs. La recherche des principes actifs extraits des plantes est d'une importance capitale car elle a permis la mise au point de médicaments essentiels.

Aujourd'hui les plantes sont de plus en plus utilisées par l'industrie pharmaceutique, il est impossible d'imaginer le monde sans la quinine qui est employée contre la malaria ou sans la digoxine qui soigne le cœur, ou encore l'éphédrine que l'on retrouve dans de nombreuses Prescriptions contre les rhumes [5].

I.1.4.Efficacité thérapeutique des plantes entières

La phytothérapie à la différence de la médecine classique, recommande d'utiliser la plante entière, appelée aussi "totum" plutôt que des extraits obtenus en laboratoire. Une plante entière est plus efficace que la somme de ses composants, les plantes contiennent des centaines voire des milliers de substances chimiques actives [5].

I.1.5. Place des plantes médicinales dans la médecine traditionnelle

Au Maroc, les plantes occupent une place importante et jouent un rôle très important dans la médecine traditionnelle, qui elle même est largement employée dans divers problèmes de santé. Certaines remèdes sont spécifiques d'une seule affection par contre d'autres peuvent traiter plusieurs maladies tels que le diabète, les rhumatismes, les cancers, etc. Les enquêtes ethnopharmacologiques menées dans les différentes régions marocaines ont permis d'inventorier plusieurs recettes utilisées pour soigner différentes pathologies [4].

Le continent africain regorge de plantes médicinales très diversifiées. En effet, sur les 300 espèces végétales recensées sur la planète plus de 200.000 espèces vivent dans les pays tropicaux d'Afrique et ont des vertus médicinales. La position géographique du Maroc à l'extrême nord-ouest de l'Afrique et la grande diversité de son climat et son écologie ; notamment des montagnes, littoral, et des zones désertiques, ont favorisé le développement d'une flore très riche qui est estimée à 4200 plantes et 1500 espèces introduites [6].

I.2. Les plantes sélectionnée

Sur la base d'une recherche bibliographique et d'une enquête au près de quelques herboristes au Algérie, nous avons sélectionné deux plantes utilisées en médecine traditionnelle : *Inula viscosa* (L) et *rosmarinus officinalis* [6].

I.2.1. *Inula viscosa*

I.2.1.1. Définition

Inula viscosa (L) est une plante annuelle, herbacée, visqueuse et glanduleuse, à odeur forte qui appartient à la famille des Astéracées (Composées). Elle peut atteindre 50 cm à 1 m de hauteur et présente des capitules à fleurs jaunes très nombreuses au sommet de la tige. Les feuilles sont entières ou dentées, aiguës, sinuées, les caulinaires amplexicaules, plus largement lancéolées, les capitules assez gros en longues grappes pyramidales .C'est une plante largement répandue dans le nord de l'Algérie et dans tout le pourtour méditerranéen. On la trouve dans les rocailles, les garrigues, les terrains argileux un peu humides et sur les bords des routes.

Son histoire thérapeutique est très diversifiée et connue depuis longtemps dans les médications traditionnelles [7].



Figure.I.1. Photos reprisent d'*inula viscosa* [7].

I.2.1.2. Types d'*inula*

On englobe sous le nom populaire d'*inules* diverses plantes appartenant à la famille des astéracées (ou composées), dont ce qu'on appelle "fleur" est en fait un

capitule de fleurons reposant sur un involucre de bractées. Les inules font partie soit du genre *Inula*, soit du genre *Dittrichia*, soit encore du genre *Jasonia*.

❖ Genre *Inula*



Inula helenioides DC



Inula conyza DC



Inula helenium L

❖ Genre *Dittrichia*



Dittrichia graveolens

❖ Genre *Jasonia*



Jasonia tuberosa (L.) DC

Figure.I.2. Les photos représentent quelque type d'*inula* [5]

I.2.1.3.Taxonomie

Inula viendrait du grec : Inula qui signifie-je purge. (Allusion à une propriété thérapeutique de la plante). *Viscosa* veut dire visqueuse : Aunée visqueuse [8].

Tableau.I.1 : Taxonomie d'*Inula viscosa* [7].

Embranchement	SPERMAPHYTES
Sous-embranchement	ANGIOSPERMES
Classe	DICOTYLEDONES
Sous Classe	GAMOPETALES
Ordre	CAMPUNULALES
Famille	COMPOSITAE
Genre	INULA
Espèce	VISCOSA - L - AIT
Synonymie	DITTRICHIA VISCOSA L
Nom commun	INULE, AUNEE VISQUEUSE
Noms vernaculaires (Quezel eT Santa 1963)	MAGRAMANE ou AMAGRAMANE. (En Afrique du Nord)

I.2.1.4.Culture et entretien de *l'inule visqueuse*

Arrosez régulièrement et en profondeur le temps de la reprise. Au besoin, créez une cuvette d'arrosage autour de l'inule. Si vous avez planté en automne, arrosez une fois par mois en période froide et trois fois en période chaude jusqu'à la fin de l'été suivant. Si vous avez planté au printemps, arrosez une à deux fois par semaine jusqu'en fin d'été. Ensuite, l'inule visqueuse se passe d'arrosages [9].

Répandue dans tout le bassin méditerranéen, sur les sols salés, les prairies humides et les bords de cours d'eau, largement répandue en Algérie dans les rocailles et les terrains argileux [8].

La Répartition : Espagne, Italie, Orient, Afrique septentrionale [9].

I.2.1.5. Milieux Séant *d'inula viscosa*

L'inula viscosa se rencontre dans les lieux incultes surtout en région méditerranéenne : bords de chemins, décombres, terrains abandonnés, jachères, arrière dunes ou garrigues bien ouvertes. Elle affectionne les milieux fraîchement perturbés par des travaux ou le passage du feu. Elle se rencontre autant sur sols argileux que sableux [10].

I.2.1.6. Floraison et Fruits

D'août à novembre, elle prend une importance considérable pour les abeilles en septembre-octobre, où la diversité floricole est plus faible en Méditerranée. Chaque capitule contient plusieurs centaines de fleurs, un pied *d'inula viscosa* offrant ainsi aux abeilles plusieurs milliers de fleurs [11].

Comme chez toutes les Asteracées, les Abeilles et les fleurs sont regroupées en capitules (d'environ 10-20 mm de diamètre), entourées par un involucre de bractées, qui peuvent être en partie membraneuses et ciliées. Chez l'inule, on trouve deux types de fleurs : des fleurs à pétales soudés en languettes jaunes (fleurs ligulées), à l'extérieur du capitule, et des fleurs en tubes (fleurs tubulées), jaune orangé, au centre du capitule [12].

Les fruits sont des akènes de un à 2 mm de long. Ils sont rassemblés sur le réceptacle du capitule. Après la fécondation, l'ovaire infère se développe pour donner une graine hirsute surmontée d'un Pappus (une aigrette de poils rigides et rugueux en une seule rangée) [11].



Figure I.3. Photo represent les Fleurs et les Fruits *d'inula viscosa* [11].

I.2.1.7. Aspects phytochimiques [8]

Les travaux de rapportent que les parties aériennes de *Inula viscosa* contiennent des Flavonoïdes, des acides sesquiterpéniques et des triterpènes esters. Les racines contiennent de nombreux composés :

- L'Inuline
- L'Helénine ou camphre d'Aunée
- de la Paraffine
- 3 sesquiterpènes essentiels : l'Alantole, l'Alantolactone et l'Acide Allantique.

La plante contient d'autres substances dites mineures comportant des résines et des pectines constituant une matière noirâtre.

I.2.1.8. Aspects pharmacologiques

L'inula viscosa est une plante très anciennement connue, elle a été utilisée au moyen âge jusqu'à nos jours pour ses vertus médicinales variées.

Au niveau de l'appareil respiratoire, elle agit comme sédatif de la toux et des spasmes bronchiques c'est un antiseptique certain de l'arbre respiratoire.

Comme c'est le cas pour toutes les plantes aromatiques, l'Inule corrige l'atonie de l'estomac et de l'intestin, elle améliore l'appétit et elle est antiémétique.

Rapporté par Harmonic et Parrissot ont mis en évidence son action dans le traitement des leucorrhées et sa propriété antiseptique au niveau de l'appareil génital et des voies urinaires [10].

Dans le Nord de l'Afrique et le pourtour méditerranéen, *l'Inula viscosa* est connue pour ses propriétés anthélmintiques donc vermifuge et occupe une place appréciable dans les médicaments traditionnelles. Il a été rapporté aussi que la poudre *d'Inula viscosa* est utilisée dans le traitement des mycoses cutanées.

Yaniz (1987) montre l'action hypoglycémiante d'*Inula viscosa* absorbée en infusion chez l'homme diabétique [11].

Tripalli (1981) rapportée par met en évidence l'activité antibactérienne des Flavonoïdes *d'Inula viscosa* qui en applications locales créent un foyer aseptique.

En Algérie, *l'Inula viscosa* est utilisée dans la médecine populaire comme antipyrétique en tisanes ou en bains dans la lutte contre le paludisme.

En 1988 Abdellah et coll par des essais «in vivo » sur le cochon nain, démontrent l'action spasmodique de l'extrait aqueux d'*Inula viscosa* sur les fibres lisses intestinales et bronchiques en prouvant l'inhibition de l'action de la l'Acetylcholine [8].

Dans la médecine traditionnelle en Italie, Lauro et Rolih (1990), rapportent et reconnaissent à *Inula viscosa* des propriétés balsamiques, antipyrétiques, antiphlogistiques et antiseptiques.

Les travaux de Chari et Hamdi Pacha en (1999) attribuent à l'Inule un pouvoir cicatrisant certain d'après les essais de traitement des brûlures expérimentales réalisées sur des lapins. Cette propriété cicatrisante a été mise en évidence en utilisant une préparation galénique contenant 45 % d'huile d'amande douce, 45 % de glycérine et 10 % d'extrait alcoolique d'*Inula viscosa*. Les résultats obtenus avec la préparation galénique ont été comparés à ceux obtenus en utilisant un placebo. Il a été noté une accélération nette du processus de cicatrisation 19 à 21 jours pour les brûlures traitées avec la préparation d'Inule et 31 jours pour les brûlures traitées avec le placebo. Enfin, il a été possible de conclure que *Inula viscosa* aurait agit en stimulant la synthèse de callogène et en créant un foyer aseptique favorisant ainsi la réparation tissulaire [8].

I.2.1.9. Les utilisation des *inula viscosa*

Inula viscosa (L.) Aiton (= *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter), Asteraceae, est une plante herbacée vivace topique utilisée dans la médecine traditionnelle comme anti-gale, antiinflammatoire, elle est connue pour ses propriétés antiseptiques et son efficacité contre les inflammations de la peau, antilytique rénal, diurétique, Antihypertensive. *L'inula viscosa* est un désinfectant, un cicatrisant, et un déodorant de premier ordre. Elle est également employée contre les affections pulmonaires et les maux de tête.

Chez *Vinula helenium* (elecampane, en anglais), l'alantolactone et son isomère, constituants majeurs de l'huile essentielle, ont des propriétés antibactériennes notamment contre *mycobacterium tuberculosis*, anti-protozoaires contre *Entamoeba histolytica*, qui cause des amibiases et antifongiques contre des pathogènes opportunistes comme certains dermatophytes [13].

Les feuilles d'*inula viscosa* sécrètent un mélange de résines tout en long de la durée de vie des feuilles. Ces exsudats se composent de plusieurs flavonoïdes aglycones, ainsi que de nombreux terpenoïdes. Ils montrent une forte activité allélopathique ainsi que

contre l'effet inhibiteur des micro-organismes phytopathogènes [7].

Les parties aériennes de la plante sont employées comme décoction dans le traitement du diabète, de l'hypertension et des maladies rénales, dans le secteur méditerranéen. Elle a été employée dans la médecine traditionnelle pour ses activités antipyrétiques, antiseptiques anti-inflammatoires [7].

❖ **Emploi [7]**

Cataplasme :

- La plante écrasée est appliquée directement sur la plaie.
- Contre les maux de tête et les affections pulmonaires : chauffer la plante dans un couscoussier, l'asperger d'huile d'olive et l'appliquer, enroulée dans un linge, sur les parties à traiter (tête, poitrine).
- Contre les odeurs des pieds, étaler quelques feuilles à l'intérieur des chaussures avant de les mettre.
- Mastication des feuilles : Analgésique dentaire.

I.2.1.10. Activités biologiques de la plante *inula viscosa*

L'huile essentielle de la partie fleurie d'*Inula Viscosa* de la région de Tlemcen possède un pouvoir antifongique puissant contre cinq moisissures étudiées. Cette efficacité se traduit par la présence de concentrations fortes des sesquiterpènes et plus particulièrement les carboxydes madienes contenus dans les feuilles de cette plante. Cette caractéristique peut être exploitée dans l'industrie agro-alimentaire afin d'augmenter la durée de vie d'un grand nombre de produits alimentaires en particulier les corps gras, dans l'industrie pharmaceutique et thérapeutiques pour prévenir et traiter diverses maladies humaines (maladies cancérigènes) [14].

Une étude a été faite sur *Dittrichia Viscosa* d'origine Marocaine; une activité antibactérienne des différents extraits des feuilles et des fleurs vis-à-vis de trois souches bactériennes *d'Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* a été confirmé. Les résultats montrent que les activités antibactériennes sont en relation avec l'origine de l'extrait (feuille ou fleur), la nature du solvant et la souche testée. En effet, les extraits au méthanol sont les plus actifs, suivis par ceux à l'éthanol, puis ceux à l'acétone.

La souche *Escherichia coli* a montré la plus grande sensibilité aux différents extraits, suivie par les deux *staphylocoques*.

Une étude a été faite dans la Flore Espagnole sur l'activité biocide de l'extrait méthanolique d'*Inula Viscosa* contre l'attaque des insectes. Ainsi la plante contient beaucoup de métabolites secondaires qui jouent un rôle principal dans la défense contre l'attaque d'insectes, de croissance des insectes et un rôle fongicide.

Le tritriacontane a été isolé et caractérisé comme composé principal dans la plante. Cet hydrocarbure a été rapporté comme un composant important des extraits cuticulaires de lipides de quelques espèces d'insectes [15].

Les extraits d'éther de pétrole (EP) et méthanolique de neuf espèces des plantes Libanaises sauvages ont été examinés in vitro pour leur activité antimycosique contre huit mycètes phytopathogéniques. L'efficacité des extraits d'EP contre tous les microbes pathogènes examinés était plus haute que celle des extraits méthanoliques. *Inula Viscosa* était fortement efficace (> 88%) dans des essais de germination de spore contre cinq mycètes parmi les six examinés. Cette étude a montré qu'*Inula Viscosa* possédait une meilleure activité antimycosique in vitro [16].

La partie aérienne de la plante a fait l'objet d'une autre recherche qui a pu évaluer l'activité hypoglycémique et hypolipidémique d'extrait aqueux (*Inula viscosa* chez le glucose de sang, plasma le cholestérol et les taux de triglycérides chez les rats normaux et diabétiques. L'étude conclue que l'extrait aqueux d'*Inula Viscosa*, à une dose de 20 mg/kg possédait une activité hypoglycémique chez les rats normaux et diabétiques. Cependant, aucune activité hypolipidémique n'a été observée. Des administrations par voie orale simples et répétées ont été employées dans cette étude [17].

Une autre étude a été faite sur l'exsudat epicuticulaire de feuille de *Dittrichia Viscosa* rudéral méditerranéen qui est hydrosoluble et facilement écoulé au sol par la pluie. En conséquence, le sol enrichi avec ce matériel est inhibiteur pour la germination de graine de la *Laitue*, alors que la germination du *Maritima* de *Malcolmia* (des espèces se trouvent avec le *Dittrichia Viscosa* dans le même habitat) est considérablement retardée [18].

I.2.2. *Rosmarinus officinalis*

I.2.2.1. Définition

Rosmarinus officinalis est un arbrisseau touffu toujours vert de 0.5 à 1.5 m de

hauteur, de la famille de *Lamiaceas*. Ses tiges ligneuses sont pourvues de feuilles persistantes, sessiles, coriaces, étroites à bords enroulés, d'un vert sombre brillant à la face supérieure, blanchâtres tomenteuses et mates à la face inférieure. Les fleurs d'une bleue pale, d'environ 1 cm, sont réunies en petites grappes serrées à l'aisselle des feuilles. Le romarin est un ornement des collines, des coteaux et des basses montagnes, surtout calcaires. Originaire des régions Méditerranéennes, on le trouve dans tout le sol Algérien [19].



Figure.I.4. Photo représentant d' *rosmarinus officinalise* [19]

I.2.2.2. Taxonomie

Plante célèbre de la médecine populaire surtout dans Algérien. Sa taxonomie est configurée dans le tableau (I.2).

Tableau.I.2. Taxonomie d' *rosmarinus officinalis* [20].

Règne	Plante
Sous-Règne	Tracheobionta
Superdivision	Spermatophyta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Astéridées
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae (labiée)

Sous-famille	Nepetoideae
Genre	Rosmarinus
Espèce	Rosmarinus officinalis

I.2.2.3. Répartition géographique

Le romarin est originaire du bassin méditerranéen, On le trouve principalement dans les terrains arides et ensoleillés, comme les garrigues, les maquis et les rocailles. Il n'apprécie pas une sécheresse trop importante mais se contente de l'humidité du littoral, d'où il pourrait tenir son nom (« rosée de mer » en latin).

Il est répandu entre le niveau de la mer et 650 mètres, parfois jusqu'à 1 500 mètres d'altitude [21].

I.2.2.4. Description botanique

Le romarin est un arbrisseau de la famille des labiées, peut atteindre jusqu'à 1,5 mètre de hauteur, il est facilement reconnaissable en toute saison à ses feuilles persistantes sans pétiole, coriaces beaucoup plus longues que larges, aux bords légèrement enroulés, vert sombre luisant sur le dessus, blanchâtres en dessous. La floraison commence dès le mois de février (Ou janvier parfois) et se poursuit jusqu'au avril – mai. La couleur des fleurs varie du bleu pâle au violet (on trouve plus rarement la variété à fleurs blanches *Rosmarinus officinalis albiflorus*). Le calice velu à dents bordées de blanc, elles portent deux étamines ayant une petite dent vers leur base. Comme pour la plupart des Lamiacées, le fruit est un tétramère (de couleur brune) [5].

I.2.2.5. Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques du *rosmarinuse officinalise* [5]

Cette plante est utilisée en médecine en raison de ses différentes propriétés :

- Anti spasmodiques, diurétiques, hépatoprotectrices, soulagement des désordres respiratoires.
- Antibactériennes, antimutagéniques, antioxydants, chémopréventives.
- Anti-inflammatoires, anti métastatiques.

- Inhibition de la genèse des tumeurs mammaires et la prolifération des tumeurs cutanées.
- D'autres études montrent que les composants du romarin inhibent les phases d'initiation et de promotion de cancérogénèse.
- Carnosol du romarin possède une activité antivirale contre le virus du SIDA (HIV) alors que l'acide carnosique a un effet inhibiteur très puissant contre la protéase de HIV-1.

I.2.2.6. Aspect économique

Le romarin est la seule plante épice commercialement disponible pour une utilisation comme antioxydant naturel dans les différentes industries en Europe et aux Etats-Unis. Les Etats-Unis sont l'un des principaux importateurs d'HE au monde. Parmi les HE importées, comme le romarin ne pousse pas naturellement sur son sol, ce pays s'approvisionne à partir des pays du bassin méditerranéen (Maroc, Espagne et Turquie), pour des prix portés dans le Tableau (I.3).

Tableau I.3. Prix (\$ US/ pound) de l'huile essentielle du romarin importée par les Etats-Unis [22].

Année Provenance	2005	2006	2007
Maroc/Turquie	0,56	0,59	0,60
Espagne	0,85	0,85	0,85

Les importations des Etats-Unis en huile essentielle de romarin entre 1998 et 2002 sont illustrées comme suit dans le Tableau (I.4).

Tableau I.4. Importation (en US \$) de l'HE de romarin par les Etats-Unis durant la période 1998-2002 [22].

Année \ HE	1998	1999	2000	2001	2002
HE de Romarin (\$ US)	1 503 000	1 307 000	1 105 000	1 568 000	1 635 000

Durant l'an 2003 la somme d'argent dépensée par les Etats-Unis uniquement pour l'importation des huiles essentielle a atteint la somme de 1,3 milliard de dollars américains (USDA, 2007) ce qui montre clairement que la part de l'HE de romarin représente 0,12 % du total de ses importations en HE [22].

I.2.2.7. Domaine d'utilisation de la plante

❖ Industrie agro-alimentaire

Les extraits végétaux de *Romarin* présentent un pouvoir antioxydant important et peuvent être appliqués à la conservation des aliments et des huiles lipidiques, ces propriétés sont dues aux acides poly phénoliques (rosmarinique, caféique) [23].

❖ Alimentation

Les deux, l'épice et l'huile sont largement utilisés en alimentation, l'épice est utilisé dans les boissons alcoolisées, les aliments cuits, viande et produits de viande, condiment et assaisonnement, les aliments industriels, casse-croûte, sauces et autres, avec le niveau maximum utilisé est d'environ 0.41% (4.098 ppm) dans les aliments cuits. L'huile est utilisée dans les boissons alcoolisées et non, les desserts glacés, confiseries, aliments cuits, gélamines et pouding, viande et produits de viande, condiments et assaisonnement, entre autres, avec le niveau maximum utilisé est d'environ 0.003 % (26.2 ppm) , Alimentation diététique, Tisanes herbales des infusions, des poudre, extraits sec ou autres préparations galéniques pour usage interne et externe, principalement contre les douleurs d'estomac [22].

❖ Industrie cosmétique et parfumerie

À l'19eme siècle l'essence de *Rosmarinus officinalise* servait à la préparation de la très célèbre eau de Cologne de la reine de Hongrie. Aujourd'hui elle rentre dans la composition, de savonnerie, détergents, crèmes et la plupart des eaux de Cologne ; le taux

d'utilisation maximum est rapporté à 1% dans la dernière catégorie [21].

I.3. Les polyphénols

Les polyphénols ou composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement. A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolés et identifiés. Selon leurs caractéristiques structurales, ils se répartissent 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). Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000 [24].

Ils sont divisés en plusieurs catégories : anthocyanes, coumarines, lignines, flavonoïdes, Tannins, quinones, acides phénols, xanthomes et autres phloroglucinols où les flavonoïdes représentent le groupe le plus commun et largement distribué. La grande diversité structurale des composés phénoliques rend difficile une présentation globale des méthodes qui permettent leur extraction et leur isolement, des processus mis en jeu au cours de leur biosynthèse, de leurs propriétés physico-chimiques et biologiques [25].

Les poly phénols sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux. Les principales sources alimentaires sont les fruits et légumes, les boissons (vin rouge, thé, café, jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs.

Les fruits et légumes contribuent environ pour moitié à notre apport en poly phénols, les boissons telles que jus de fruits et surtout café, thé ou vin apportant le reste [24].

I.3.1. Propriétés biologiques des polyphénols

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs divers propriétés physiologiques comme les activités antiallergique, anti-atherogénique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardioprotective et vasodilatatoire. Ces actions sont attribuées à leur effet antioxydant qui est due à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la destruction oxydative par

la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène, ou décomposition des peroxydes [25].

Les effets bénéfiques des polyphénols intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie et l'hygiène alimentaire [26]. D'après les études multiples attestant de l'impact positif de la consommation de polyphénols sur la santé et la prévention des maladies, les industriels commercialisent maintenant des aliments enrichis en polyphénols ou des suppléments alimentaires. De plus, leur activité antioxydante assure une meilleure conservation des denrées alimentaires en empêchant la peroxydation lipidique. Dans l'industrie cosmétique, les composés phénoliques trouvent leur application pratique en luttant contre la production des radicaux libres néfastes dans la santé et la beauté de la peau. En phytothérapie, même si certaines indications sont communes à plusieurs classes (les propriétés vasculoprotectrices, sont par exemple aussi bien attribuées aux flavonoïdes qu'aux anthocyanes, tanins et autres coumarines), chaque classe chimique semble être utilisée pour des bénéfices spécifiques [27].

En ce qui concerne les flavonoïdes, ces composés peuvent empêcher les dommages oxydatifs par différents mécanismes d'actions : soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxydes et peroxydes ; soit par chélation des métaux (le fer et le cuivre) qui sont d'importance majeure dans l'initiation des réactions radicalaires ; soit l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres. Ils jouent un rôle très important dans le traitement du diabète (inhibant l'aldose réductase), de la goutte (inhibant la xanthine oxydase), des inflammations (inhibant la lipoxigénase, la phospholipase et la cyclooxygénase), des hépatites, des tumeurs, de l'hypertension (quercétine), des thromboses (flavonols), des allergies et des affections bactériennes et virales (anti-HIV) . Mais, on attribue également aux flavonoïdes des propriétés neurosédatives, antispasmodiques, diurétiques, anti-oestrogènes (isoflavones), contre la sénescence cérébrale et ses conséquences telle l'altération de la mémoire et la confusion. D'autres part, les citroflavonoïdes (flavonoïdes provenant de divers *Citrus*) et la fragilité capillaire (insuffisance veino-lymphatique, crise hémorroïdaire) [28].

I.4. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatiles, isolées des plantes par hydro distillation ou par expression

mécanique. Elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs, de brindilles, d'herbes, d'écorces, de bois, de racines ou de fruits, mais également à partir des gommés qui s'écoulent du tronc des arbres. L'hydrodistillation reste le moyen le plus employé pour produire les huiles essentielles, en particulier à des fins commerciales [29]. Les métabolites secondaires sont extraits des plantes par un entraînement à la vapeur d'eau. Le volume d'huile essentielle récupéré dépend du rendement de distillation, qui est variable, chez une même plante, en fonction de la saison. Les huiles essentielles peuvent aussi être obtenues par expression à froid, comme pour les agrumes. De nouvelles techniques, permettant d'augmenter le rendement de production, ont été développées, comme l'extraction au moyen de dioxyde de carbone liquide à basse température et sous haute pression ou l'extraction assistée par ultrasons ou micro-ondes [30].

I.4.1. Localisation des huiles essentielles dans la plante

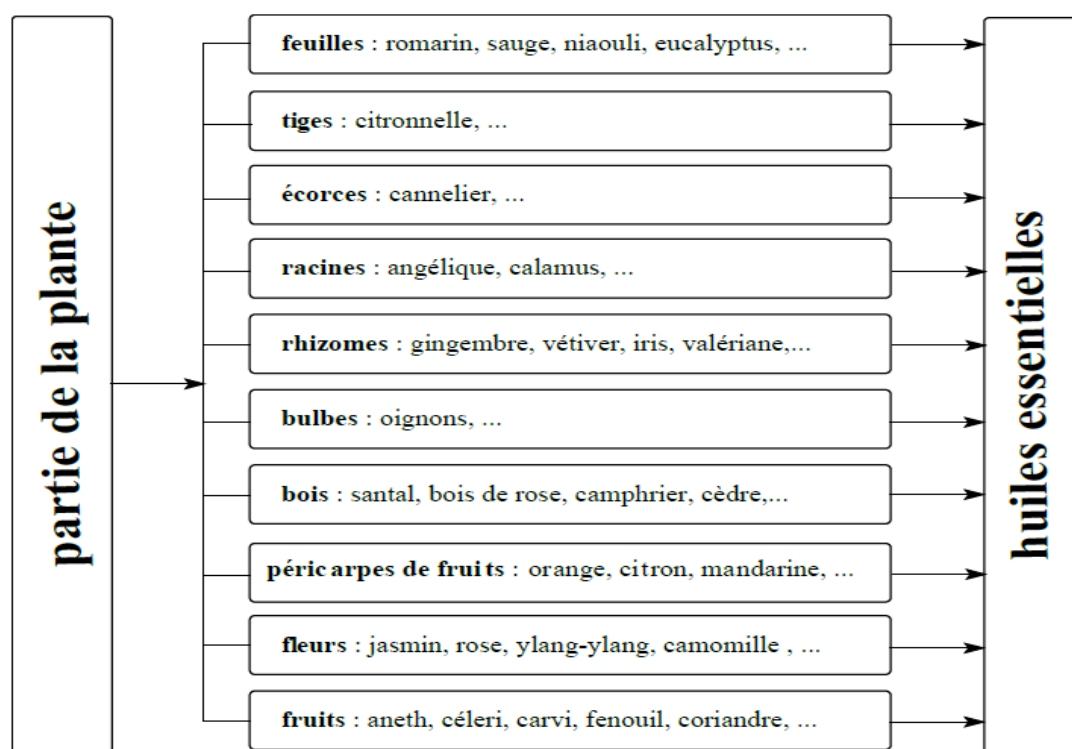


Figure.I.5. Provenance des huiles essentielles en fonction des différentes parties de plantes

[29,31].

I.4.2. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes pouvant contenir plus de 300 composés différents. Ces composés sont des molécules volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes, Seuls les terpènes les plus volatils, c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée, y sont rencontrés soit, les mono terpènes (myrcène, α -pinène, γ -terpinène, sabinene, etc.) et les sesquiterpènes (P-caryophyllène, α -humulène, P-bisabolène, etc).

Rappelons ici que les terpènes sont des composés issus du couplage de plusieurs unités "isopréniques" (C_5H_8), soit deux unités pour les monoterpènes et trois unités pour les sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$). Ils ont la même origine métabolique. Ces composants majeurs déterminent les propriétés biologiques des huiles essentielles [32].

Exceptionnellement, quelques diterpènes ($C_{20}H_{32}$) peuvent se retrouver dans les huiles essentielles La réactivité des cations intermédiaires obtenus lors du processus biosynthétique des mono- et sesquiterpènes explique l'existence d'un grand nombre de molécules dérivées fonctionnalisées telles que des alcools (géraniol, α - bisabolol), des cétones (menthone, P-vétivone), des aldéhydes (citronellal, sinensal), des esters (acétate d' α -terpinyle, acétate de cédryle), des phénols (thymol), etc [33].

Plus de 22.000 composés isopréniques ont été répertoriés, mais seul un petit pourcentage d'entre eux a été étudié dans la perspective d'évaluer leurs rôles fonctionnels, Une autre classe de composés volatils fréquemment rencontrés est celle des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, qui empruntent une voie biosynthétique différente de celle des terpènes. Cette classe comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole, et bien d'autres. Ils sont davantage fréquents dans les huiles essentielles d'Apiaceae (persil, anis, fenouil, etc.) et sont caractéristiques de celles du clou de girofle, la vanille, la cannelle, le basilic, l'estragon, etc.

Les dérivés phénylpropanoïques et les terpénoïdes sont associés en nombre et en proportions très variables de telle sorte que le produit est hétérogène et complexe sur le plan chimique. Ils sont biosynthétisés au sein des mêmes organes sécréteurs où ils forment l'essence naturelle.

Enfin, il existe un nombre non négligeable de composés volatils issus de la dégradation, de terpènes non volatils (c'est le cas par exemple des ionones qui proviennent de l'auto-oxydation des carotènes) et d'acides gras (les petites odorantes, comme par

exemple le (3Z)-hexén-1-ol ou le décanal, qui sont obtenues à partir des acides linoléique et a-linolénique) [34,29].

I.4.3. Procédé d'extraction des huiles essentielles

Le procédé d'obtention d'une essence végétale intervient de façon déterminante dans la nature des produits d'extraction. Plusieurs procédés d'extraction des principes végétaux sont connus et utilisés à ce jour, dont l'expression à froid, l'extraction par solvant organique volatil, l'extraction à l'eau surchauffée, l'extraction au CCL supercritique, par micro ondes, par ultrasons, par l'entraînement à la vapeur d'eau et par l'hydrodistillation. De tous ces procédés, ces deux derniers sont les plus employés à l'échelle industrielle pour la production d'huiles essentielles. L'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation sont les deux procédés utilisés pour l'extraction des huiles essentielles auxquelles nous intéressons [35,36].

❖ Hydrodistillation

Elle se produit dans l'appareil de Clevenger et consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (entier, coupé ou éventuellement broyé) dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite portée à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide. En effet, les vapeurs ascendantes provenant de l'alambic ou du réacteur progressent dans la partie A puis se condensent dans la partie B. Le condensat est récupéré dans la partie C où l'huile se sépare de la phase aqueuse. L'eau en excès retourne dans l'alambic par la partie D. Dans une variante du procédé, le matériel végétal est broyé in situ [37].

I.5. L'activité antibactérienne

I.5.1. Mécanismes d'action antibactérienne

Les mécanismes par lesquels les H.Es exercent leur activité antibactérienne sont mal connus. Du fait de la complexité de leur composition chimique, il est difficile de donner

une idée précise sur le mode d'action des H.Es. Il est probable que leur activité antibactérienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire [38].

BURT (2004a) a avancé que la caractéristique importante des H.Es est attribuée à l'hydrophobicité de certains de ces composants qui leur permet de traverser facilement la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire en altérant sa perméabilité et entraînant des pertes anormales d'ions, voire même des macromolécules.

Suggère que, l'action des H.Es sur la prolifération microbienne se fait à travers l'altération de la perméabilité membranaire des bactéries en perturbant les systèmes de transport ionique, le transport des électrons et la production d'énergie.

Le mode d'action des H.Es dépend du type de microorganismes. En général, les bactéries Gram négatives sont plus résistantes que les bactéries Gram positives grâce à la structure de leur membrane externe. Ainsi, la membrane extérieure des Gram négatifs est plus riche en lipo-polysaccharides (LPS) la rendant plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer [39].

Chapitre II

Cette partie est consacrée à l'extraction des polyphénols et des huiles essentielles de deux plantes médicinales afin de les tester sur des souches bactériennes telles que : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et une levure telle que : *Candida albicans*.

II.1. Matériel végétal

Le choix de deux plantes est basé sur une enquête ethno pharmacologique auprès de la population ayant connaissance de leur usage en médecine traditionnelle. Dont nous allons étudier les différentes étapes de sa culture ci- dessous.

Les feuilles d'*Inula viscosa* et les parties aériennes de *rosmarinus officinalis* ont été cueillies durant Mars, Avril 2016. Les plantes utilisés dans cette étude ont été identifiés au niveau de l'université **Khemis Miliana** par un spécialiste en botanique M^r : Docteur **kouache Ben moussa** comme étant *Inula viscosa* (L) et *rosminus officinalis*.

II.1.1. Zone d'étude

Les plantes étudiées *inula viscosa* et *rosminus officinalis* appartenant à la famille des astéracées et lamiaceae respectivement. Elles ont été récoltées au niveau de la Elmayen ,W. Ain Defla

II.1.2. Équipements

II.1.2.1. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)

Le couplage a été effectué sur un appareil Hewlett-Packard de type 5970, équipé d'une colonne capillaire en silice fondue de 30 m x 0.25 mm de type DB1 (30 m x 0.25 mm), opérant sous pression d'hélium avec un débit de 0.6 ml/min, et muni d'un détecteur sélectif quadripolaire, dans lequel le potentiel d'ionisation est fixé à 70 eV. La programmation de température va de 80 à 250 °C, avec un gradient de 10 °C/min. Les températures d'injection et de détection sont respectivement de 180 et 210 °C.

La combinaison de ces deux techniques d'analyse CPG/SM permet de séparer les composants de l'échantillon et d'identifier chaque composant, donc de faire une analyse complète aussi bien qualitative que quantitative du produit à analyser [40].

II.1.2.2. Les souches bactériennes

Les germes qui ont été testés pour déceler l'activité antibactérienne de l'extrait *d'inula viscosa* et l'huile essentielle de *rosmarinus officinalis* sont les suivants :

- deux souches bactériennes provenant du laboratoire de microbiologie du laboratoire microbiologique de l'université de Djilali Bounama: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.
- Nous avons utilisé un seul type de levure de référence, à savoir *Candida albicans*. Il été fournis par le laboratoire de microbiologie, laboratoire médical privé à Ain Defla. Les souches bactériennes et la levure sont représentant dans le tableau (II.1).

Tableau.II.1. Les souches microbiennes testées [41].

Souches	Gram	Famille	Source
<i>Escherichia coli</i>	-	<i>Enterobacteriaceae</i>	L.A.M.Z
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	<i>Micrococcaceae</i>	L.A.M.Z
<i>Candida albicans</i>	/	<i>Saccharomycetaceae</i>	L.A.M.Z

II.1.3. Conservation des souches

Les souches sont conservées à 5°C dans des tubes stériles contenant 10 ml de milieu de culture incliné (gélose nutritive) [41].

II.1.4. Milieux de culture

Suivants la méthode employée dans le tableau (II.2), et selon les souches choisies nous avons utilisé les milieux de cultures suivants :

Tableau.II.2. Les milieux de culture des microorganismes utilisés [42]

Milieux de culture	Microorganismes
Gélose nutritive, gélose de Mueller Hinton et gélose de conservation	- <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> - <i>Escherichia. Coli.</i>
Sabouraud bouillon	- <i>Candida Albicans</i>

❖ La composition des milieux de culture [43]

✓ **Gélose nutritive**

- Extrait de bœuf.....3 g
- Peptone.....5 g
- Gélose.....15 g
- Eau distillée.....1L

✓ **Sabouraud (Dextrose Broth)**

- Caséine.....10 g
- Dextrose.....20 g
- Gélose.....15 g
- Eau distillée.....1 L

II.2. Méthodes

II.2.1. *Inula viscosa*

II.2.1.1. La détermination du taux l’humidité pour les deux plantes [19]

Le contenu en humidité des plants à été déterminé après le séchage

$$H\% = [(poids P_f - poids P_s) / P_f] \times 100 \quad (II.1)$$

P_f: poids de l’échantillon « plant fraîche »

P_s: poids de l’échantillon « plant sèche »

H%: Taux d’humidité exprimé en pourcentage

II.2.1.2. Les polyphénols

A. Extraction

Nous avons réalisé l'extraction des polyphénols à partir des feuilles sèches de la plante de *Inula viscosa*, qui sont hachées en très petits fragments au moyen d'un mixeur. Le solvant (Ethanol 96%) est placé dans un ballon et la matière végétale dans une cartouche poreux. En chauffant, l'éthanol s'évapore entraînant le lit de solide. En passant dans un réfrigérant, les vapeurs se condensent. Quand le liquide atteint le niveau de débordement, un siphon aspire la solution de la cartouche et la décharge de nouveau dans le ballon à distiller, portant les corps dissous extraits dans le liquide en bloc. Dans le ballon, le corps dissous (soluté) est séparé du solvant par distillation. Le soluté reste dans le ballon et le solvant frais passe de nouveau dans le lit de solide. L'opération est répétée jusqu'à ce que l'extraction complète soit réalisée. L'extrait éthanolique obtenu est évaporés presque à sec au moyen d'un évaporateur rotatif. Le résidu sec est repris dans 10ml d'eau distillée bouillante (l'intérêt de l'utilisation de l'eau distillée bouillante c'est pour assurer la récupération des composés restés accolés à la paroi du ballon d'évaporation) [24].



Figure.II.1. photo représentant l'appareil de soxhlet

B.Elimination du solvant

L'éther de pétrole est par la suite évaporer à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le principe de cet appareil est basé sur l'abaissement du point d'ébullition sous pression réduite. Comme le montre la Figure. II.2.

- l'extrait résultant est considéré comme étant la fraction d'éther de pétrole [25].



Figure.II.2. photo représentant évaporateur rotatif

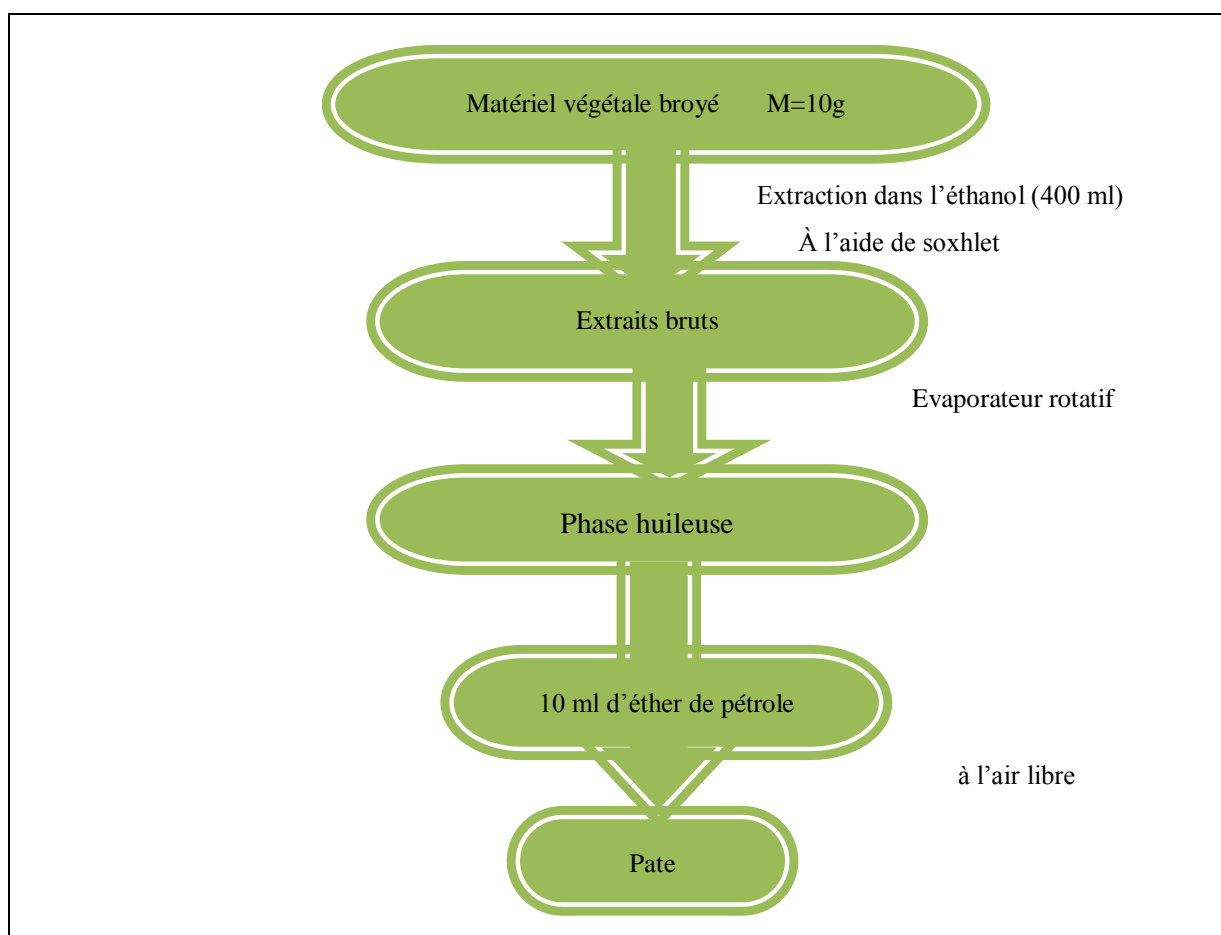


Figure.II.3.Etapes de fractionnement de l'extrait brut.

C. Condition opératoires

-La masse de la matière végétale sèches bien broyée : $m_{vs} = 10g$.

-Le volume de l'éthanol : $V_{eth} = 400ml$.

-chauffage à la température d'ébullition d'éthanol [27].

II.2.1.3. Détermination du rendement en extrait brut (des polyphénols)

➤ Le rendement d'extrait brut (R) est exprimé par la relation suivante [24]

$$R(\%) = \frac{m_{EB}}{m_{MV}} \times 100 \quad (II.2)$$

m_{EB} : la masse d'Extrait brut récupérée.

m_{MV} : la masse de matière végétale

II.2.1.4. Analyses qualitatives

Cette étude permet de mettre en évidence la présence de quelques groupes chimiques (poly phénols) dans nos extraits. Les essais de caractérisation en tube permettent une recherche grossière des composants chimiques; les résultats peuvent être difficilement interprétables. La CCM confirme les tests en tube [28].

II.2.1.4.1. Test préliminaire : « La réaction de Shibata »

La présence des flavonoïdes dans l'extrait a été mise en évidence par la réaction à la cyanidine. En effet, les flavonoïdes sont responsables d'un dégagement d'hydrogène et de l'apparition d'une coloration allant de jaune orange au rouge pourpre, en présence d'acide chlorhydrique concentré et de magnésium.

➤ Mode opératoire

Ajouter à 1ml de l'extrait brut et de chaque phase, quelques gouttes d'HCl concentré (2N) et environ 0,5g de magnésium métallique. Laisser agir 3 min et regarder le changement de couleur.

➤ Expression des résultats

La présence des flavonoïdes aglycones dans les extraits est indiquée par le virement de la couleur vers l'orange ou le rouge brique [26].

II.2.1.4.2. Séparation des polyphénols par chromatographie sur couche mince « CCM »**➤ Principe**

La CCM est une technique analytique simple, rapide et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et de l'identification des métabolites. Elle repose principalement sur les phénomènes d'adsorption et de partage, où les molécules à séparer s'adsorbent à la surface d'un support (phase stationnaire) et seront entraînées à travers ce dernier par un éluant (phase mobile), donc la séparation est fonction des différences d'adsorption des composants de l'échantillon sur la phase stationnaire et des différences de leur solubilité dans la phase mobile [28].

➤ Mode opératoire

La mise en œuvre de la CCM nécessite plusieurs étapes :

La chromatographie sur couche mince a été réalisée sur des plaques pré-étalées de gel de silice

➤ Préparation de la phase mobile

La phase mobile est constituée par un mélange de solvants organiques. Pour cela, nous avons réalisé plusieurs essais et choisis comme phase mobile un mélange de deux solvant « Ethanol et Ether de pétrole » de volume (60 /40) (V /V).

Les systèmes solvants choisis sont utilisés comme des éluant de phase stationnaire (silice), leurs vapeurs doivent saturer l'atmosphère de la cuve ceci impose d'utiliser une cuve bien fermée.

➤ Le dépôt

Le dépôt se fait à l'aide d'une micropipette d'une façon perpendiculaire et linéairement. L'extrait doit être déposée en solution diluée dans l'éther de pétrole, on peut effectuer un dépôt de l'analyte (l'extrait) en même endroit, cette pratique permet de concentrer l'analyte (l'extrait).

➤ **Développement des plaques**

Chaque plaque est déposée en position verticale ou légèrement inclinée dans la cuve préalablement saturée par les vapeurs du système solvant approprié, Le bord de la plaque où a été effectué le dépôt est trempé dans du solvant approprié, en prenant soin d'éviter tout contact entre le dépôt de l'échantillon et le mélange de solvant. Les différents constituants de l'échantillon déposé migrent avec des vitesses différentes. Vers le haut de la plaque [24].

➤ **Identification des polyphénols**

Le comportement d'une molécule particulière dans un système est donné par son R_f (le rapport de la distance parcourue par cette molécule sur celle parcourue par la phase mobile c'est à dire le front du solvant) qui est compris entre 0 et 1.

Structure - R_f

La distance de migration des substances dépend essentiellement de leur polarité

- Les polyhydroxyflavones ont des valeurs de R_f (0,00-0,25)
- Les oligohydroxy et les oligométhoxyflavones ont des valeurs de R_f comprises entre (0,3-0,5)
- Les flavanones, les flavonols, méthoxyflavones ont les valeurs les plus élevées par rapport aux valeurs précédentes de R_f (0,5-0,75) [25,26].

II.2.1.5. Propriétés organoleptiques pour les deux plantes

Chaque huile essentielle est caractérisée par ces caractères organoleptiques tels que : l'odeur, l'aspect physique et la couleur.

➤ **L'odeur**

L'odorat est un sens chimique très sensible et l'habileté des parfumeurs à classer et caractériser des substances chimiques parvient à doser les produits naturels et leur perception peut aller jusqu'à dix millièmes de grammes par litre d'air [44].

➤ **La couleur**

La couleur de l'huile essentielle peut être déterminée à l'œil nu, sauf en présence d'une solution étalon, on peut l'utiliser pour évaluer le degré de ressemblance entre la couleur du produit étalon et celle de l'huile essentielle [45].

II.2.2. *Rosmarinuse Officinalise*

II.2.2.1. Les huiles essentielles

A. Extraction

L'extraction des huiles essentielles est effectuée par hydro distillation par un appareil de type Clevenger, Une quantité de 100 g de matière végétale est transvasée dans un ballon de un litre auquel un volume de 500 ml d'eau distillée est ajouté et l'hydro distillation se fait pendant trois heures. L'eau est portée à ébullition, la vapeur d'eau entraîne les molécules volatiles qui se condensent dans un réfrigérant et le mélange eau-huile est recueilli dans un ballon de 50 ml. La décantation se fait dans une ampoule à décanter d'un litre dans laquelle le mélange se sépare en deux phases non miscibles par la différence de leur densité. Une phase aqueuse (inférieure) et une phase huileuse (supérieure). Les huiles essentielles ainsi récupérées sont traitées avec quelques cristaux de sulfates de magnésium anhydre afin d'éliminer l'eau susceptible d'avoir été retenue dans la phase organique. Elles sont conservées au réfrigérateur à 4°C dans des flacons sombres à l'abri de la lumière et de la chaleur. Trois distillations sont réalisées pour chaque échantillon [1].

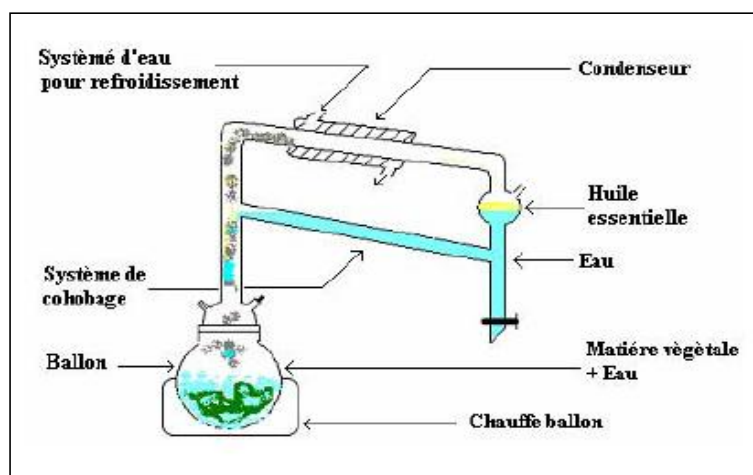


Figure.II.4. photo représentant l'Appareil d'hydro distillation (Clevenger)

[44]

B. Conditions opératoire d'extraction

- ❖ La masse de la matière végétale fraîche $m_f=100g$.
- ❖ La masse de la matière végétale sèche $m_s=100g$.
- ❖ Le volume de l'eau distillée : $V= 500ml$.
- ❖ chauffage à la température d'ébullition d'eau [40].

II.2.2.2.Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la biomasse végétale à traiter. Le rendement est exprimé en pourcentage (%) et calculé par la formule suivante [19].

$$R_{HE} (\%) = (M_{HE}/M_V) \times 100 \quad (II.3)$$

R_{HE} : Le rendement en huile essentielle en (%).

M_{HE} : Quantité de l'extrait récupéré exprimée en g.

M_v : Quantité de la matière végétale utilisée pour l'extraction exprimée en g.

II.2.2.3. Influence de la durée d'extraction sur le rendement

Pour étudier l'influence de la durée d'extraction sur le rendement en huile essentielle, Nous avons choisi les durées d'extraction allant de 20 à 180 min avec un pas de 20 min.

II.2.2.4.Analyses

Deux types d'analyse ont été réalisés

- Les premiers servent à identifier les différents constituants d'une huile essentielle, afin de connaître la composition chimique, la nature et la proportion des divers constituants.
- La deuxième série d'analyses a pour objet de déterminer les caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles (PH, indice d'acide, indice d'ester, etc).

Ces caractéristiques sont propres à chaque essence et peuvent décrire l'huile essentielle. Elles permettent d'obtenir les critères de qualité nécessaire à la commercialisation [40].

II.2.2.4.1. Identification et composition chimique

L'identification des constituants de deux échantillons a été faite sur la base de la comparaison de leurs indices de rétention et spectres de masse avec ceux des composés de référence de la littérature, en utilisant la CG/SM [40].

II.2.2.4.2. Étude des propriétés physique-chimiques

A. Propriétés physique

➤ Détermination du pH

Le pH exprimé par une valeur numérique, indique si une solution est acide ou basique, il Représente aussi la concentration en ions hydrogène d'une solution aqueuse. La détermination du pH est effectuée à l'aide d'un papier pH au lieu d'un pH-mètre en raison de l'insuffisance du produit (huile essentielle).

➤ Indice de réfraction

L'indice de réfraction d'une substance est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux monochromatique (raie D du sodium) qui traverse la substance à une température constante de 20°C [40].

$$I_{20} = I_T + 0,00045 (T - 20 \text{ } ^\circ\text{C}) \quad (\text{II.4})$$

I₂₀: indice à 20 °C.

I_T: indice à la température ambiante.

T : température ambiante.

• Mode opératoire

On détermine l'indice de réfraction par la lecture directe sur un réfractomètre d'Abbe classique.

Après nettoyage des surfaces du prisme et étalonnage de l'appareil, on dépose à l'aide d'une pipette 2 gouttes d'huile essentielle au milieu du prisme.

On observe dans l'oculaire 2 plages, une sombre et une claire séparée par une bande

plus au moins irisée ; l'intersection du réticule sur la ligne de séparation est amenée par le bouton de droite, puis les irisations sont supprimées. La valeur est indiquée par l'échelle de lecture [40].

B. Propriétés chimique

➤ L'indice d'acide

L'indice d'acide (I_a) est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1 g d'huile essentielle.

❖ L'indice d'acide est calculé par l'expression :

$$I_A = 5.61 (v / m) \quad (II.5)$$

V : volume versé de la solution éthanolique (en ml).

m : masse en gramme de l'huile essentielle.

➤ Mode opératoire

On introduit 2 g de l'huile essentielle dans un ballon de 100 ml. On ajoute 5 ml de la solution éthanolique de potasse neutralisé et 5 gouttes au maximum d'indicateur, soit la solution de phénol phtaléine. On titrer le liquide avec la solution d'hydroxyde de potassium contenue dans la burette. Poursuivre l'addition jusqu'à obtention du virage de la solution persistant pendant 30 sec. On note le volume de solution d'hydroxyde de potassium utilisé. Mettre en réserve le ballon et son contenu pour la détermination de l'indice d'ester [45].

• Préparation de la solution éthanolique de potasse

On dissout 3g de potasse dans 5ml d'eau et on complète à 100ml avec de l'alcool exempt d'aldéhyde. On laisse la solution se décanter.

➤ l'indice de saponification

L'indice de saponification (I_s), est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres et la saponification des esters présents dans un gramme d'huile essentielle.

•Principe

On hydrolyse les esters par chauffage, dans des conditions définies, en présence d'une solution éthanolique titrée d'hydroxyde de potassium, et le dosage de l'excès d'alcalin par une solution titrée d'acide chlorhydrique.

- **Réactifs**

- Solution provenant de la détermination de l'indice d'acide.
- Hydroxyde de potassium (0.5 mol/L).
- Phénolphtaléine (indicateur coloré), à 2 g/L dans l'éthanol.
- Acide chlorhydrique (0.5 mol/L).
- L'eau distillée.

- **Détermination**

Dans un ballon, on introduit la solution provenant de la détermination de l'indice d'acide, on ajoute 25 mL de la solution d'hydroxyde de potassium (0.5 mol/L). On adapte le tube en verre ou un réfrigérant et on place le ballon sur le bain d'eau bouillant et on les laisse pendant 1 h. On laisse refroidie puis on démonte le tube et on ajoute 20ml d'eau puis 5 gouttes de la solution de phénolphtaléine. On titre l'excès d'hydroxyde de potassium avec la solution d'acide chlorhydrique. L'indice de saponification I_s est donné par la formule suivante:

$$I_s = 28.05 \times ((v_0 - v_1) / m) \quad (\text{II.6})$$

v_0 : volume (mL) de la solution d'acide chlorhydrique utilisé pour l'essai à blanc

v_1 : volume (mL) de la solution d'acide chlorhydrique utilisé

m : masse (g) de la prise d'essai .

➤ **Indice d'ester**

L'indice d'ester (I_e) exprime le nombre de milligrammes de potasse (KOH) nécessaire pour neutraliser les acides libérés, par l'hydrolyse, en milieu basique des esters contenus dans 1g d'huile essentielle [19].

❖ L'indice d'ester est calculé à partir de les relations suivant [45] :

$$I_e = I_s - I_a \quad (\text{II.7})$$

$$I_e = \frac{28,5}{m} (V_0 - V_1) \cdot I_a \quad (\text{II.8})$$

V₀ : volume de la solution HCl versée pour l'essai à blanc.

V_i : volume de la solution HCl versée pour calculer l'indice d'acide,

m : masse en gramme de l'huile essentielle utilisée.

I_a : indice d'acide déjà calculé.

- **Mode opératoire**

Cette détermination est effectuée sur la solution provenant de la détermination de l'indice d'acide. On ajoute 25 ml de la solution d'hydroxyde de potassium ainsi que des fragments de pierre ponce dans le ballon provenant de la détermination de l'indice d'acide. On adapte le réfrigérant à reflux au ballon, et on le place ensuite sur le manteau chauffant. On maintient le ballon sur le manteau chauffant pendant une heure en position. On laisse refroidir le ballon et démonter le tube. On ajoute 20 ml d'eau, puis cinq gouttes de solution de phénol phtaléine. On titre l'excès d'hydroxyde de potassium avec la solution d'acide chlorhydrique. Un essai à blanc est effectué au même temps [19].

II.2.3. l'Activité antimicrobienne

Les huiles essentielles ont un spectre d'action antibactérienne très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celles des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne et antifongique est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs. Ce qui nous a amené à évaluer l'activité de l'extrait de *inula viscosa* et notre huile essentielle de *rosmarinuse officinalise* [45].

II.2.3.1. Préparation des pré-cultures

Les souches bactériennes à tester ont été cultivées dans des boîtes de pétri contenant de la gélose nutritive. Après 18h d'incubation à 37°C pour chaque microorganisme, des suspensions microbiennes d'une densité optique de 1 McFarland ont été préparées, pour chaque microorganisme dans 10 ml d'une solution saline d'eau physiologique stérile (0.9% NaCl) [19].

II.2.3.2. Evaluation qualitative de l'activité antibactérienne des deux plantes

La technique utilisée, pour évaluer l'activité antibactérienne de notre HE, est l'aromatogramme ou la méthode de diffusion en milieu gélosé [19]. Cette méthode permet d'évaluer 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 ou l'extrais éthanoïque.

La gélose appropriée est coulée dans des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre.

Chaque souche a étéensemencée par inondation sur ces boîtes pétris contenant le milieu Mueller-Hinton (M.H.A) pour les bactéries et Sabouraud pour les levures.

La surface des boîtes est séchée sous l'aire libre avec le couvercle des boîtes légèrement ouvertes.

Des disques de papier Whatman stérilisé de 9 mm de diamètre sont imprégnés de 20 ml de l'extrais de inula viscosa ou d'huile essentielle de *rosmarénuse officinalise*, puis déposés à la surface des gélosesensemencées avec les différentes souches bactériennes, l'ensemble est incubé à 37°C pendant 24 heures [45].

Dès l'application des disques imprégnés, l'extrait diffuse de manière uniforme et après 24 h d'incubation, la présence autour des disques d'une zone d'inhibition circulaire dans laquelle il n'y a pas de croissance de micro-organismes dénote la sensibilité de ceux-ci à cet extrait. Plus la zone d'inhibition mesurée est grande, plus le germe est sensible.

Le pourcentage d'inhibition de la croissance fongique est calculé par la formule suivante:

$$\% \text{ Inhibition} = (D_{\text{test}} / D_{\text{control}}) \times 100 \quad (\text{II.9})$$

D_{test} : diamètre de la zone d'inhibition.

D_{control} : diamètre de la boîte de pétri.

II.2.3.3.Évaluation quantitative de l'activité antibactérienne de l'extrait de *inula viscosa* et l'huile essentielle de *rosmarinuse officinalise*

Cette méthode permet la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) à partir d'une gamme de concentrations d'extrait dans un solvant. 1g de l'extrait est diluée dans 10 ml de DMSO et 500 ml d'huile essentielle est diluée dans 500 ml de DMSO, puis une série de dilutions est réalisée extemporanément en DMSO, à partir de la solution-mère. La gamme de concentrations finales ainsi obtenue correspond à: $C_{1/2}$ - $C_{1/4}$ - $C_{1/8}$. Des disques de papier Whatman stérile de 9 mm de diamètre sont imprégnés de 20 ml des différentes dilutions, puis déposés à la surface des gélosesensemencées avec les différentes souches bactériennes, l'ensemble est incubé à 37°C pendant 24 heures. Pour cette méthode, la CMI est définie comme la plus petite concentration d'extrait pour laquelle, il peut avoir un effet.

➤ **Lecture**

Les diamètres des zones d'inhibitions sont mesurés à l'aide d'une règle, à l'extérieur de la boîte fermée [45].

Chapitre III

Dans cette partie, l'extraction des polyphénols de *Inula Viscosa* et des huiles essentielles de *Rosmarinus Officinalis*, leurs caractérisations organoleptiques, physico-chimiques ainsi que l'examen de leurs propriétés antimicrobiennes, ont fait l'objet de discussion.

III.1. *Inula Viscosa*

III.1.1. Taux d'humidité

Les végétaux sont riches en eau, les plantes fraîches renferment 60 à 80 % d'eau. Pour assurer une bonne conservation, la teneur en eau doit être inférieure ou égale à 10 % [45].

Après 6 jours de séchage, le poids se fixe à 20,5 g. Les valeurs prises chaque jour sont présentées dans le tableau (III.1).

Tableau.III.1. Taux d'humidité d'*Inula Viscosa*

Durée(j)	0	1	2	3	4	5	6	7	8
M _{mv} (g)	100	88	73,2	59,6	37,1	25,3	20,5	20,5	20,5
H %	/	12	26,8	40,4	62,9	74,7	79,5	79,5	79,5

Les résultats d'analyse de notre échantillon ont révélé que la teneur de l'humidité des feuilles d'*Inula Viscosa* est très importante, elle est de 79,5 %. Cela signifie que plus de la moitié du poids de la plante fraîche est constituée d'eau ce que nous constatons selon la figure .III.1. *Inula Viscosa* est riche en eau et, ceci influe négativement sur leur bonne conservation, sur la durée d'extraction et donc sur le rendement.

III.1.2. Le Rendement

Le calcul de rendements des polyphénols de la plante est :

$$R = 11\% \quad (\text{III.1})$$

La masse de matière végétale = 10 g

La masse d'Extrait brut récupérée = 1,1g

D'après le calcul du rendement on a trouvé (11%) c'est à dire ces plante donne un bon rendement

III.1.3. Analyses qualitatives des flavonoïdes

A. Test préliminaire « La réaction de Shibata »

Le test de recherche des flavonoïdes dans l'extrait de *Inula Viscosa* a donné des réactions positives. Les résultats de cette étude photochimiques sont reportés dans le tableau (III.2).

Tableau.III.2. Résultat de test de colorations

Extrait	Couleur
Ether de pétrole	Marron

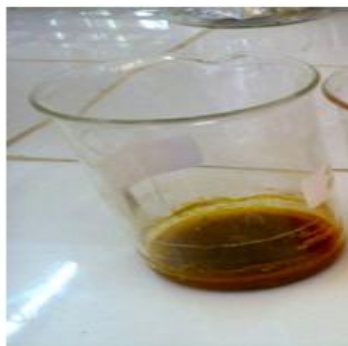


Figure.III.1. Photo représentant le résultat de test préliminaire

D'après le résultat, le test préliminaire montre la présence des flavonoïdes aglycones dans l'extrait de notre plante. Nous avons remarqué que l'extrait a donné une couleur marron qui indique la richesse d'*Inula Viscosa* en Flavonoïdes.

B. Séparation des flavonoïdes par chromatographie sur couche mince : « CCM »

Pour avoir les empreintes flavoniques de notre extrait, et savoir une idée sur leurs

Compositions chimiques, une chromatographie analytique sur couche mince a été réalisée en utilisant un système solvant (éther de pétrole). On observe l'apparition de cinq taches principales. On peut calculer leur Rf. Le tableau (III.3) exprime les résultats obtenus.

Tableau.III.3. Comportement chromatographique des phases d'*Inula Viscosa* dans le système solvant

point	1	2	3	4	5
Rf	0,76	0,41	0,35	0,25	0,21



Figure.III.2. Photo représentant le résultat de test de (CCM)

Après la révélation de la plaque CCM on observe cinq taches principales. Pour l'extrait d'éther de pétrole les valeurs de Rf dans le tableau (III.4) sont :

Tableau.III.4. Les composés Résultant à partir CCM

Rf	Les composés
0,76	Flavanones, flavonols, méthoxyflavones
0,41	oligohydroxy
0,35	oligométhoxyflavones
0,25	polyhydroxyflavons
0,21	polyhydroxyflavons

Donc cet extrait est riche en flavanones, flavonols , méthoxyflavone et oligohydroxy et les oligométhoxyflavones, Polyhydroxyflavons.

III.2. *Rosmarinus Officinalis*

III.2.1. Taux d'humidité

Après 5 jours de séchage, le poids se fixe à 31g. Les valeurs prises chaque jour sont présentées dans le tableau (III.5).

Tableau.III.5. Taux d'humidité de *Rosmarinus Officinalis*

Durée (j)	0	1	2	3	4	5	8	9
M _{mv} (g)	100	78	61	45	38	31	31	31
H %	/	13	23,7	39,9	49	69	69	69

Les résultats d'analyse de notre échantillon ont révélé que la teneur de l'humidité des feuilles de *Rosmarinus Officinalis* est très importante, elle est de 69 %. Cela signifie que plus de la moitié du poids de la plante fraîche est constituée d'eau ce que nous constatons selon la figure (III.4) d'*Rosmarinus Officinalis* est riche en eau et, ceci influe négativement sur leur bonne conservation, sur la durée d'extraction et donc sur le rendement.

III.2.2. Rendement

a-Rendement : Le calcul de rendements des huiles essentielles de la plante et en deux états : un état sec et un état frais sont rapportés dans le tableau (III.6).

Tableau.III.6. Rendements des huiles essentielles des deux plantes sèche et fraîche.

La plante	<i>Rosmarinus Officinalis</i>	
L'état du plant	Fraiche	sèche
mars	0,5%	1%
avril	0,6%	1,8%

Les résultats ont montré que les huiles extraites à partir des organes de la plante sèche ont donné de meilleurs rendements par rapport à celles extraites à partir de la plante fraîche. Et avril le mois qui donné de meilleurs rendements que mars.

La plante présente un rendement en huile essentielle très faible. Il a fallu plusieurs hydro distillations pour obtenir une quantité à analyser. Cette faible teneur serait probablement due à l'âge de la plante, au mode d'extraction, à la période et à l'endroit de récolte sans négliger la nature même de ces plantes aromatiques.

❖ Il est très nécessaire de savoir d'où provient la rentabilité d'une huile essentielle. Ceci ne peut se faire que par une analyse chromatographique très détaillée de leurs différents constituants.

III.2.3. Etude de l'influence du temps d'extraction et la période de récolte en HE sur le rendement

Nous avons suivi la cinétique d'extraction en fonction du temps. Théoriquement la durée D'extraction est le temps nécessaire a la récupération de la totalité de l'huile contenue dans la matière végétale. Or en pratique, il est difficile de récupérer toute l'huile. Ce temps correspond alors au moment pour lequel nous n'observons plus d'huile dans le distillat. Il détermine la fin du processus. Un suivi cinétique a été réalisé sur l'extraction de l'HE de *Rosmarinus Officinalis* en fonction de la durée d'extraction et de la période de récolte, selon la nature de la plante et du mode d'extraction. Ce résultat représenté dans le tableau (III.7).

Tableau.III.7. Evolution du rendement d'extraction des HE des feuilles *Rosmarinus Officinalis* par HD dans la région de Elmayen en fonction du temps au mois de (mars et avril)2016.

T (min)	0	20	40	60	80	100	120	140
R(%) Mars	0	0,04	0,09	0,7	0,9	1	1	1
R(%) Avril	0	0,07	0,46	0,96	1,4	1,6	1,8	1,8

L'étude de l'évolution du rendement de l'HE des feuilles de *Rosmarinus Officinalis*, en fonction du temps d'extraction, montre que le rendement augmente progressivement en fonction du temps, jusqu'à atteindre un palier où le rendement est constant (1% pour l'HE de Mars 2016 et 1,8% pour l'HE de avril 2016). La durée optimale d'extraction a été déterminée par deux heures ; au-delà de cette durée, on peut estimer l'épuisement total de la matière végétale. L'HE des feuilles de *Rosmarinus Officinalis* récoltés en Avril 2016 présente un rendement supérieur à celui en Mars 2016 et cela peut montrer l'effet de la période de récolte sur le rendement. Donc le rendement varie en fonction de la durée de vie de la plante c'est-à-dire que le rendement des HE est proportionnel au développement métabolique de l'espèce ainsi que la saison de récolte; le meilleur rendement de l'HE d'Avril 2016 représente l'année la plus rentable ($R_{HE}=1,8\%$).

III.2.4. Composition chimique par CG/MS des huiles essentielles de la plante

Rosmarinus Officinalis

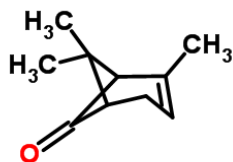
Les résultats de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) d'HE de *Rosmarinus Officinalis* sont regroupés dans le tableau (III.8) qui met en relief le temps de rétention, l'identification des différents composants et leur teneur. 27 composés sont identifiés. six composés majoritaires de l'HE des feuilles de *Rosmarinus Officinalis* obtenue par HD sont : eucalyptol (13,96) et 2-pinen-7-one (14,07) et isopulegol (4,42) et bicyclo[3.1.0]hexan-2-one,5-(1-methylethyl)- (11,10) et Caryophyllène (3,66 %) et viridiflorol (3,83). Ces résultats concordent aux ceux trouver dans le tableau (III.8).

Tableau.III.8. Composition chimique de l'HE de *Rosmarinus officinalis*

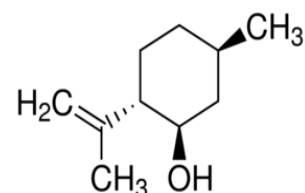
composés	pourcentage	T R
<u>Eucalyptol</u>	13,96	8,130
<u>2-pinen-7-one</u>	14,07	11,785
<u>isopulegol 1</u>	4,42	12,745
<u>bicyclo[3.1.0]hexan-2-one, 5-(1-methylethyl)-</u>	11,10	14,155
Levomenthol	2,04	14,480
phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-	2,55	15,075
2-(4-methyl-3-cyclohexen-1-yl)-2-propanol	1,78	15,515
dihydrocarveol isomer	1,58	16,930
<u>caryophyllene < β -></u>	3,66	23,180
cyclosativene	1,14	25,240
Gamma - muurolene	1,09	25,920
neryl butanoate	1,71	26,460
1h-indene, 2,3,3a,4-tetrahydro-3,3a,6-trimethyl-1-(1-methylethyl)-	2,15	32,790
cyperene	1,55	34,850
Selina-3,7(11)-diene	1,16	35,785
ChemSpider	2,37	37,090
<u>Viridiflorol</u>	3,83	39,475



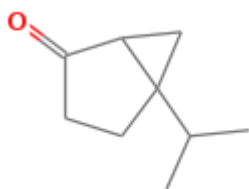
Eucalyptol



2-pinen-7-one

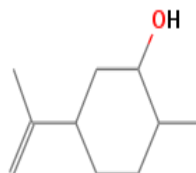


isopulegol 1

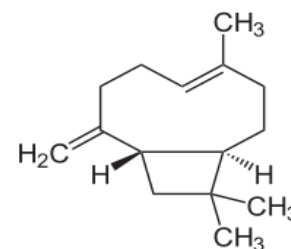


bicyclo[3.1.0]hexan-2-one,

5-(1- methylethyl)-



caryophyllene β ->



Viridiflorol

Figure.III.3. Les structure chimique et les composes majoritaire de l'HE de *Rosmarinus officinalis*

Tableau.III.9. Les compositions chimiques majoritaire de l'HE de *Rosmarinus Officinalis* dans différent région

Composes majoritaires	Nos Résultats (%)	Cuba (%) [46]	Brazil (%) [47]	Italia (%) [48]
Eucalyptol	13,96	11,00	11,5	53,7
2-pinen-7-one	14,07	-	-	-
isopulegol 1	04,42	-	t	-
bicyclo[3.1.0]hexan-2-one, 5-(1-methylethyl)-	11,10	5,06	0,1	-
caryophyllene β ->	03,66	0,88	1,4	1,2
Viridiflorol	03,83	-	-	-

Cette différence de composition est due probablement à diverses conditions notamment l'environnement, l'origine géographique, la période de récolte, le lieu de séchage, la température et la durée de séchage, les parasites et la méthode d'extraction.

III.2.5. Les Propriétés

La plante *Rosmarinus Officinalis* est aromatique donc contient des huiles essentielles. Le contrôle de l'utilité de ces huiles essentielles dans la pharmacopée et leur conformité aux normes internationales est indispensable. Il est donc très intéressant de faire ce contrôle et de vérifier leurs propriétés.

A. propriétés organoleptiques

Les résultats des différentes propriétés organoleptiques sont regroupés dans le tableau (III.10).

Tableau.III.10. Propriétés organoleptiques d'huiles essentielles extraites de la plante *Rosmarinus Officinalis*

Plantes	Aspect	Couleur	Odeur
<i>Rosmarinus Officinalis</i>	liquide limpide, fluide et mobile	incolore à jaune	Agréable, attirant et persistant

B. Propriétés physico-chimiques

Les résultats des différentes propriétés physico-chimiques sont regroupés dans le tableau (III.11).

Tableau.III.11. Résultats des caractéristiques physico-chimiques de l'extrait phénolique et l'huiles essentielles extraites à partir de deux plantes.

Caractéristiques Physico-chimiques	<i>Rosmarinus officinalis</i>
pH	6
Indice de réfraction	1,4690
Indice de l'acide	31,16
Indice de saponification	80,49
Indice d'ester	49,33

- Le pH obtenu indique que notre huile extraite presque neutre.
- L'indice de réfraction est une grandeur qui nous permet d'identifier l'HE, aussi de contrôler sa pureté, en effet un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés.
- Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé.
- Pour les constantes chimiques, l'indice d'acide donne une idée sur le taux d'acides libres, ce paramètre peut nous aider à savoir la qualité de notre produit.

I_a de l'HE extraite d'*Rosmarisus officinalis* est de 31,16 un produit a un indice d'acidité très fort est un produit de faible qualité, c.à.d. qu'il présente une forte concentration en acide gras.

Quant à l'indice d'ester de notre HE il est de 49,33 très élevé.

III.3.Résultats microbienne

1. L'évaluation qualitative

L'évaluation qualitative de l'activité antimicrobienne de notre huile essentielle de *Rosmarisus officinalis* a été faite sur deux bactéries et levure provenant de la collection du laboratoire Microbiologique de l'université de djilali bouaama khemis miliana a été faite par la méthode des aromatogrammes. Le pouvoir antimicrobien est obtenu par la mesure des diamètres des zones d'inhibition (mm).

L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par Mutai et al (2009). Ils ont classé les diamètres des zones d'inhibition (D) de la croissance microbienne en 5 classes [45] :

- Très fortement inhibitrice: $D \geq 30$ mm.
- Fortement inhibitrice: $21 \text{ mm} \leq D \leq 29$ mm.
- Modérément inhibitrice: $16 \text{ mm} \leq D \leq 20$ mm.
- Légèrement inhibitrice: $11 \text{ mm} \leq D \leq 16$ mm.
- Non inhibitrice: $D < 10$ mm.

Le diamètre de la zone d'inhibition observée autour des disques imprègne l'extrait éthanolique et d'HE pure, et leurs dilutions après 24 heures d'incubation à 37°C ainsi que leurs pourcentages d'inhibitions sont résumés dans les tableaux .III.12, III.13, III.15, III.16.

III.3.1. *Inula viscosa*

A. L'évaluation qualitative

Les résultats de Diamètre et le pourcentage d'inhibition sont regroupés dans le tableau (III.12).

Tableau.III.12. Diamètre et le pourcentage d'inhibition des souches bactériennes de l'extrait pure des feuilles *d'Inula viscosa*.

Nom de la souche	Gram	Diamètre d'inhibition mm	Pourcentage d'inhibition %
<i>Escherichia Coli</i>	-	0	0
<i>Staphylococcus Aureus</i>	+	27	30
<i>Candida Albicans</i>	/	20	22,22

Selon l'échelle citée par Mutai et al (2009), les résultats montrent que l'Extrait *d'Inula viscosa* pure possède une activité antimicrobienne importante sur *Staphylococcus Aureus* et *Candida Albicans* et résistance sur *Escherichia Coli*, et fortement inhibitrice sur *Staphylococcus Aureus* (27 mm) et Modérément inhibitrice sur *Candida Albicans* (20 mm). Le pourcentage d'inhibition de *Staphylococcus Aureus* ; *Candida Albicans* ; *Escherichia Coli* respectivement de 30 ; 22,22 ; 0, Les diamètres d'inhibition varient de 0 mm à 30 mm. Le diamètre d'inhibition le plus élevé est obtenu avec *Staphylococcus Aureus* (27 mm).

Les résultats obtenus montrent alors que l'Extrait *d'Inula viscosa* possède un spectre d'activité antibactérienne élevé sur les bactéries gram(+) que sur les gram (-). Les bactéries à gram positif sont sensibles par contre les bactéries à gram négatif sont résistance. L'Extrait *d'Inula viscosa* possède également une activité Modérément inhibitrice sur la levure utilisée *Candida Albicans* dont la zone d'inhibition est de 20 mm de diamètres. Elle réduit également la croissance mycélienne de la *Candida Albicans* de 22,22 %.

Les résultats obtenus sont aussi présentés sur la figure suivante :

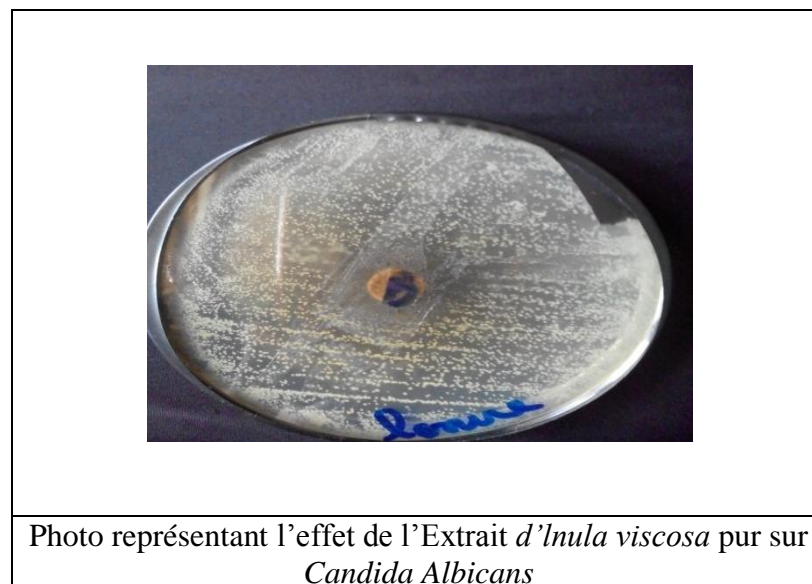
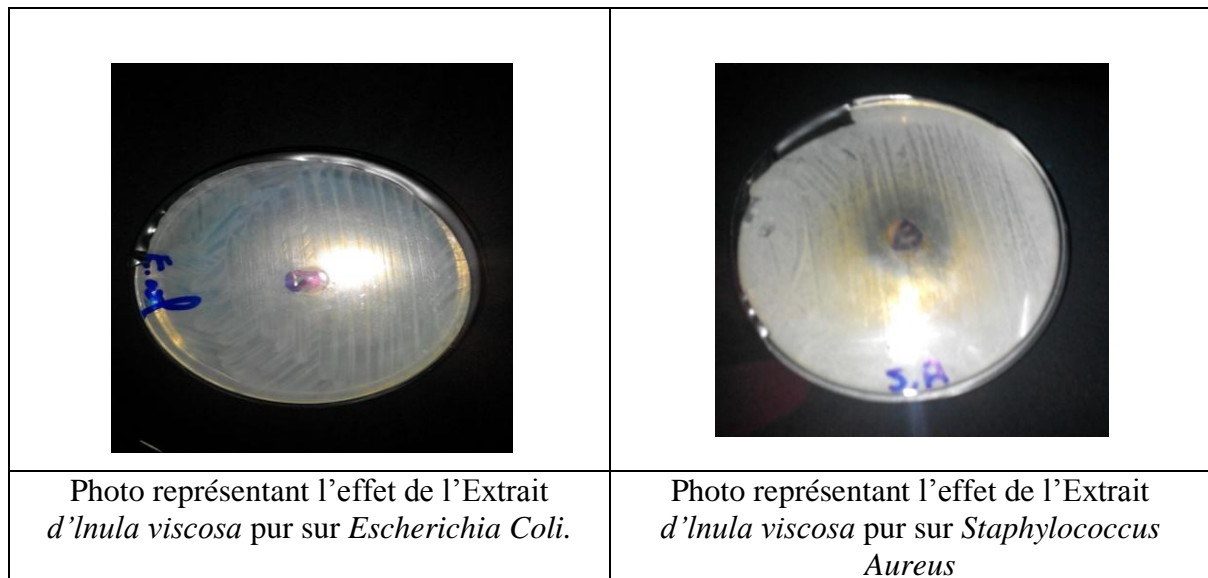


Figure.III.4. Photo représentant l'effet antibactérienne l'Extrait *d'Inula viscosa* pur sur différente souche et levure.

B. Evaluation quantitative

Les résultats des dilutions sur l'activité antibactérienne de l'Extrais *d'Inula viscosa* sont représentés dans le tableau (III.13) qui porte les diamètres d'inhibitions en mm et les pourcentages d'inhibitions pour chaque souche de bactérie et levure.

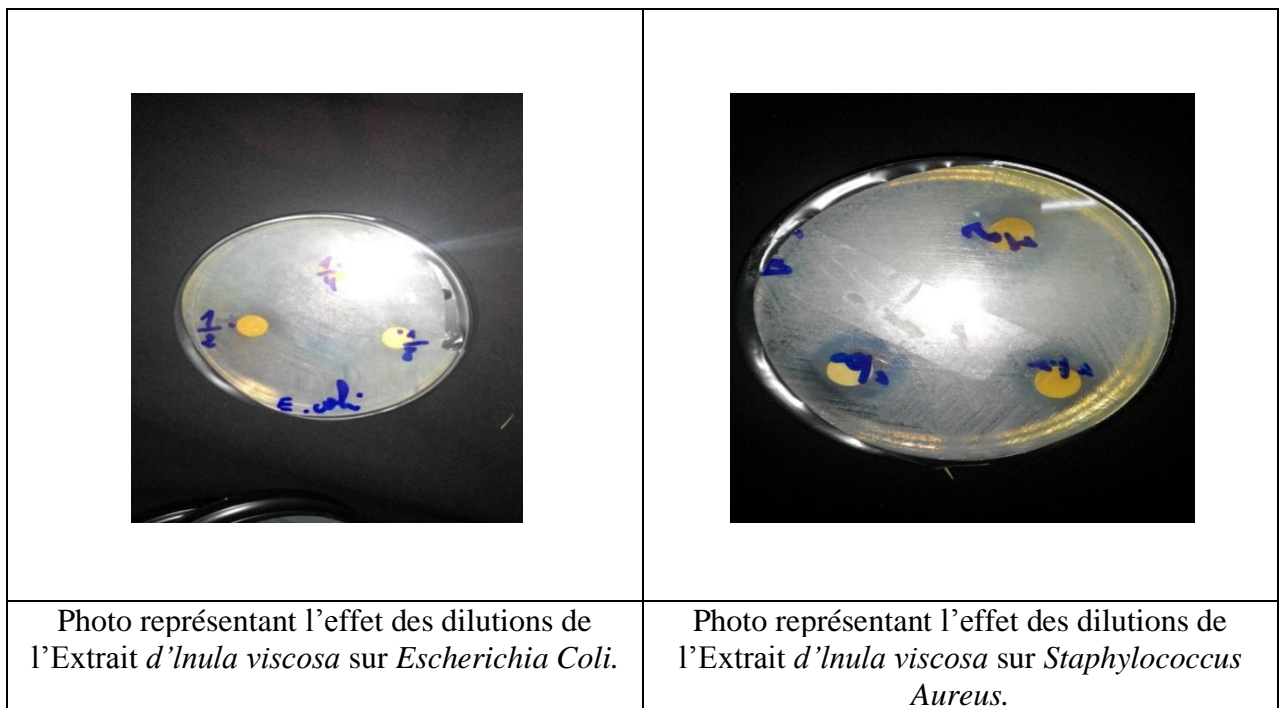
Tableau.III.13. Diamètres des zones et des pourcentages d'inhibition par la déférente concentration de l'Extrais *d'Inula viscosa*.

C D et PR Les souches	1/2		1/4		1/8	
	D(mm)	PR%	D(mm)	PR%	D(mm)	PR%
<i>Escherichia Coli</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus Aureus</i>	23	25,55	22	24,44	19	21,11
<i>Candida Albicans</i>	14	15,55	13	14,44	12	13,33

Le tableau (III.13) montre clairement que la diminution du diamètre des zones d'inhibition correspondant a une diminution de la concentration de l'extrait appliqué.

La comparaison des diametres d'inhibition montre que de l'Extrais *d'Inula viscosa* Présente une activité antimicrobienne importante sur *Staphylococcus Aureus*, et *Candida Albicans*.

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure suivante :



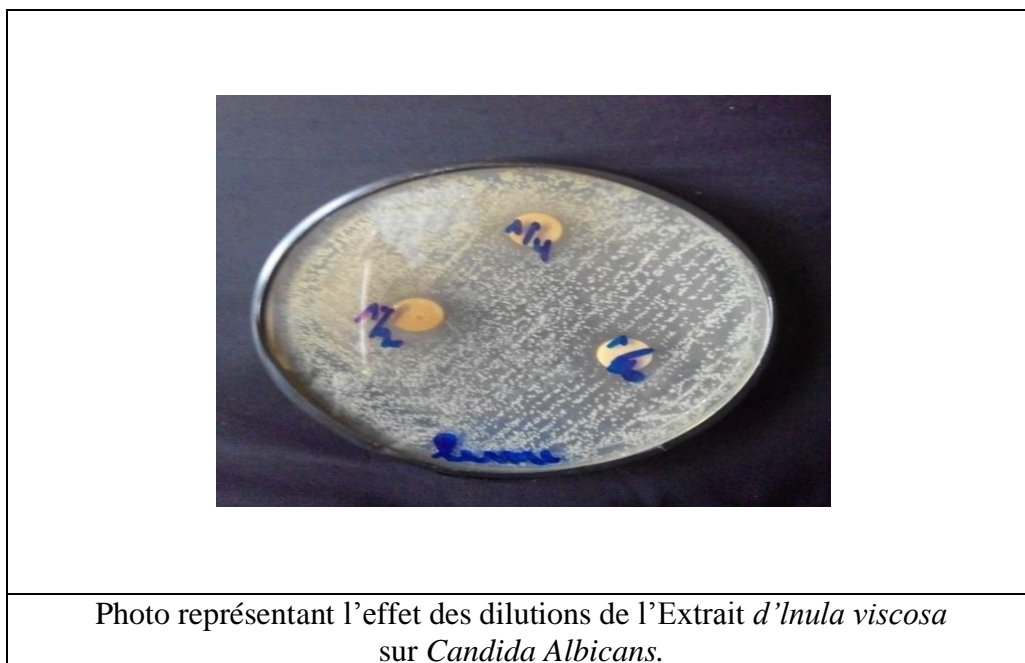


Figure.III.5. Photo représentant l'effet antibactérienne des dilutions de l'Extrait *d'Inula viscosa* sur différentes souches et levures.

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenus sont représentés par le tableau (III.14).

Tableau.III.14. Concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'Extrait *d'Inula viscosa*

Les souches	CMI (v/v)
<i>Escherichia Coli</i>	/
<i>Staphylococcus Aureus</i>	0,125
<i>Candida Albicans</i>	0,125

Les concentrations minimales inhibitrices obtenus de l'Extrais *d'Inula viscosa* est 0,125 ($\mu\text{l}/\mu\text{l}$). l'Extrait *d'Inula viscosa* exerce une importante activité inhibitrice vis-à-vis des bactéries et de levure testées.

Staphylococcus Aureus et *Candida Albicans* sont montrés les sensibles, ils sont inhibés à partir de la concentration minimale de 0,125 %.

III.3.2. *Rosmarinus Officinalis*

A. Evaluation qualitative

Les résultats de Diamètre et le pourcentage d'inhibition sont regroupés dans le tableau (III.15).

Tableau.III.15. Diamètre et le pourcentage d'inhibition des souches bactériennes de l'HE pure des feuilles d'*Rosmarinus Officinalis*

Nom de la souche	Gram	Diamètre d'inhibition mm	Pourcentage d'inhibition %
<i>Escherichia Coli</i>	-	12	13,33
<i>Staphylococcus Aureus</i>	+	33	36,66
<i>Candida Albicans</i>	/	20	22,22

Selon l'échelle citée par Mutai et al (2009), les résultats montrent que l'HE de *Rosmarinus Officinalis* pure possède une activité antimicrobienne importante sur toutes les souches bactériennes testées, très fortement inhibitrice sur *Staphylococcus Aureus* (33 mm) et Modérément inhibitrice sur *Candida Albicans* (20 mm) ; et légèrement inhibitrice sur *Escherichia Coli* (12 mm).

Le pourcentage d'inhibition de *Staphylococcus Aureus* ; *Candida Albicans* ; *Escherichia Coli* respectivement de 36,66 ; 22,22 ; 13,33, Les diamètres d'inhibition varient de 12 mm à 33 mm. Le diamètre d'inhibition le plus élevé est obtenu avec *Staphylococcus Aureus* (33 mm) et le plus faible avec *Escherichia Coli* (12 mm).

Les résultats obtenus montrent alors que l'HE de *Rosmarinus Officinalis* possède un spectre d'activité antibactérienne élevé sur les bactéries gram+ que sur les gram-. Les bactéries à gram positif sont plus sensibles que les bactéries à gram négatif. L'HE de *Rosmarinus Officinalis* possède également une activité Modérément inhibitrice sur la levure utilisée *Candida Albicans* dont la zone d'inhibition est de 20 mm de diamètre. Elle réduit également la croissance mycélienne de la *Candida Albicans* de 22,22 %.

Les résultats obtenus sont aussi présentés sur la figure suivante :

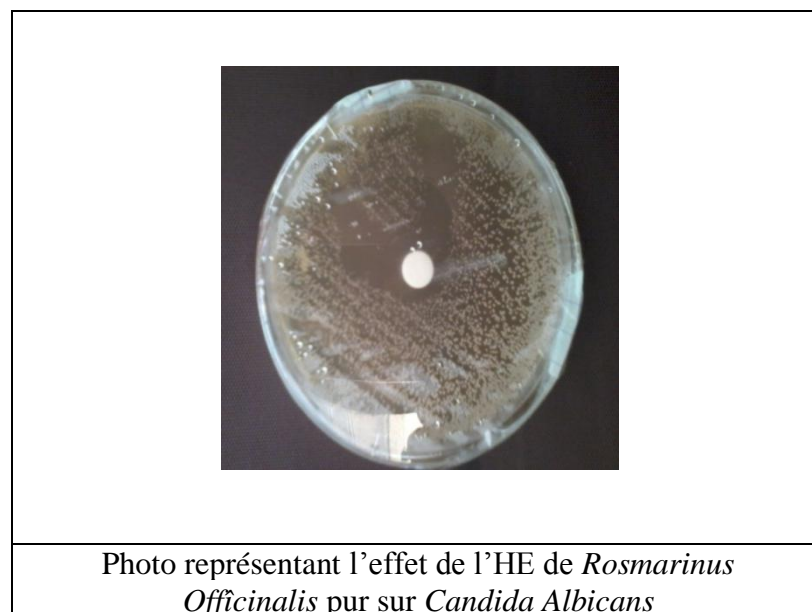
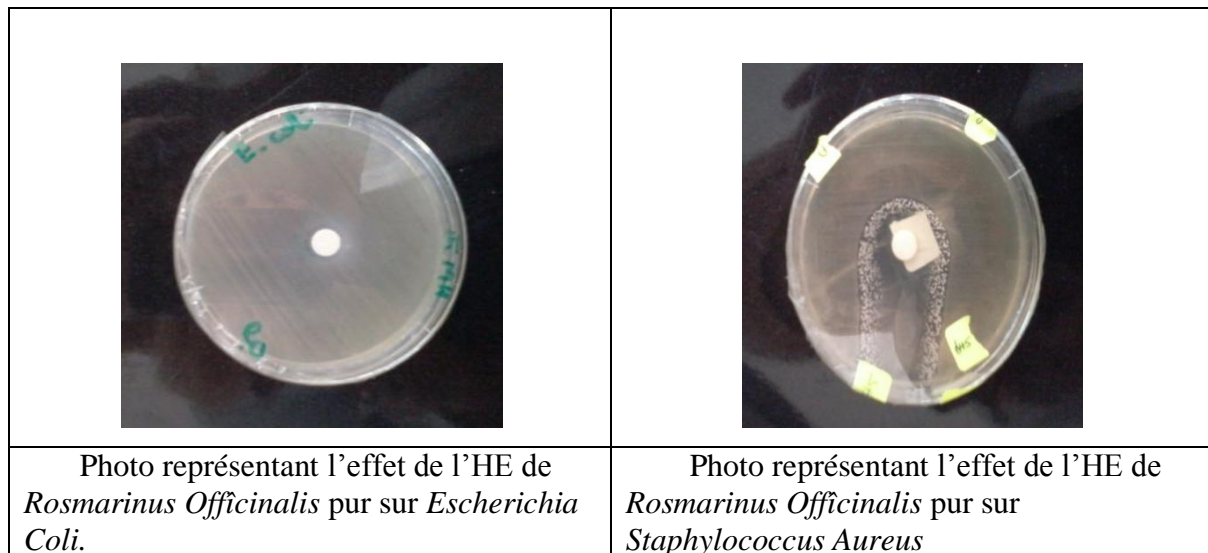


Figure.III.6. Photo représentant l'effet antibactérienne d'HE de *Rosmarinus Officinalis* pur sur différente souche et levure.

B. Evaluation quantitative

Les résultats des dilutions sur l'activité antibactérienne de l'HE de *Rosmarinus Officinalis* sont représentés dans le tableau (III.16), qui donne les diamètres d'inhibitions en mm et les pourcentages d'inhibitions pour chaque souche de bactérie et levure.

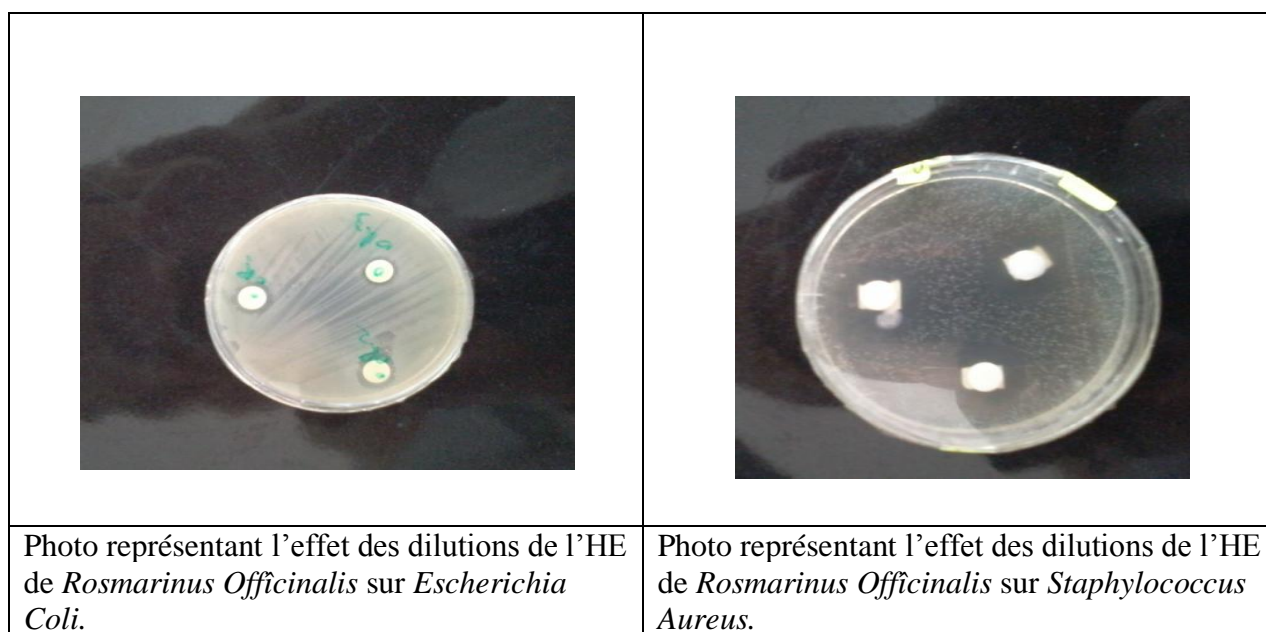
Tableau.III.16. Diamètres des zones et des pourcentages d'inhibition par la différente concentration de l'HE d'*Rosmarinus Officinalis*.

C	1/2		1/4		1/8	
D et PR	D(mm)	PR%	D(mm)	PR%	D(mm)	PR%
Les souches						
<i>Escherichia Coli</i>	13	44,44	12	13,33	11	12,22
<i>Staphylococcus Aureus</i>	24	26,66	22	24,44	21	23,33
<i>Candida Albicans</i>	24	26,66	26	28,88	20	22,22

Le tableau (III.16) montre clairement que la diminution du diamètre des zones d'inhibition correspondant à une diminution de la concentration de l'extrait appliqué sauf *Candida Albicans* malgré l'utilisation de même solvant (DMSO).

La comparaison des diamètres d'inhibition montre que l'HE de *Rosmarinus Officinalis* présente une activité antimicrobienne importante sur *Escherichia Coli*, *Staphylococcus Aureus*, et *Candida Albicans*.

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure suivante :



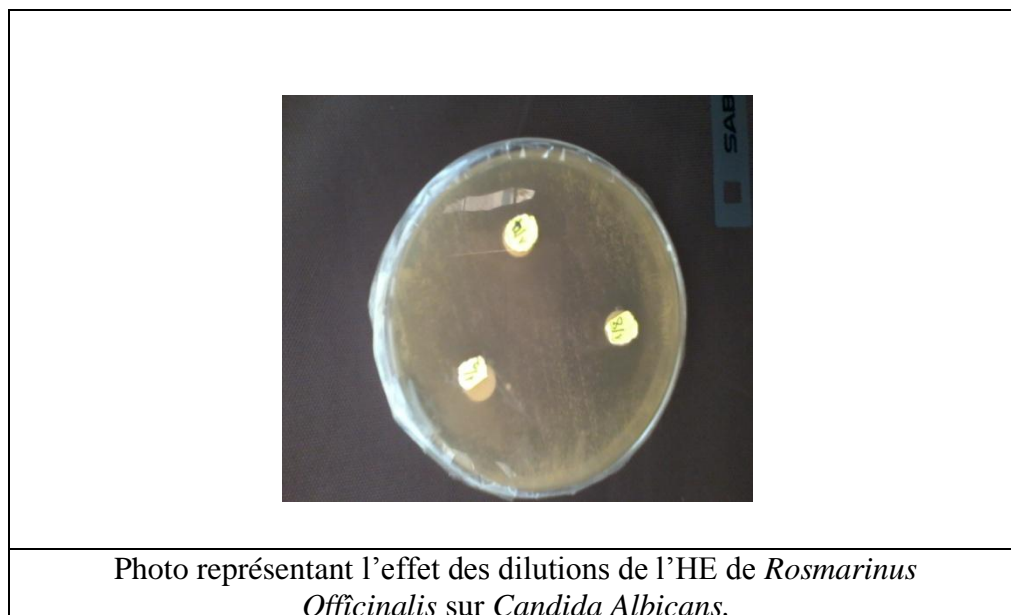


Figure.III.10. Photo représentant l'effet antibactérienne des dilutions de l'HE de *Rosmarinus Officinalis* sur différentes souches et levures.

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenus sont représentés par le tableau (III.17).

Tableau.III.17. Concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'HE de *Rosmarinus Officinalis*

Les souches	CMI (v/v)
<i>Escherichia Coli</i>	0,125
<i>Staphylococcus Aureus</i>	0,125
<i>Candida Albicans</i>	0,125

Les concentrations minimales inhibitrices obtenus de l'HE de *Rosmarinus Officinalis* est 0,125 ($\mu\text{l}/\mu\text{l}$). L'HE de *Rosmarinus Officinalis* exerce une importante activité inhibitrice vis-à-vis des bactéries et de levure testées.

Escherichia Coli, *Staphylococcus Aureus* et *Candida Albicans* sont montrés les plus sensibles, ils sont inhibés à partir de la concentration minimale de 0,125 %.

Conclusion
Générale

Conclusion générale

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'extraction et à la récupération des polyphénols de *Inula viscosa* par l'extraction en solvant et l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* par hydro distillation, La durée d'extraction en solvant optimale 5h, et pour l'hydro distillation 3h.

Le rendement obtenu par l'extraction en solvant des polyphénols de *Inula viscosa* est 11%. La comparaison de rendement d'HE de *Rosmarinus officinalis* en fonction des mois de récolte noté que le meilleur rendement est obtenu durant la période de floraison (Avril) pour les feuilles sèches (1,8% pour mois de Avril , 1% pour mois de mars) .dans le cas des feuilles fraîches (0,6% pour mois de Avril et 0,5% pour mois de mars).

L'analyse par GC/MS de la composition de l'HE montre qu'elle renferme de six composés dont les principaux sont : eucalyptol (13,96) , 2-pinen-7-one (14,07) , isopulegol (4,42) , bicyclo[3.1.0]hexan-2-one,5-(1-méthylethyl)- (11,10) , Caryophyllène (3,66 %) et viridiflorol (3,83)

L'activité antibactérienne de l'extrait éthanoïque de *Inula viscosa* à été déterminée selon la méthode d'aromatogramme, cette technique montre que notre extrait possède une activité sur *Staphylococcus Aureus* (27mm), la levure *Candida albicans* (20mm). Contrairement la souche *Escherichia coli* est résistante vis -vis l'extrait éthanoïque. On constate que l'extrait éthanoïque de *Inula viscosa* présente une activité Antimicrobienne importante. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues est de (0.125) pour la levure et la bactérie testée.

Les tests microbiologiques des huiles essentielles des feuilles de *Rosmarinus officinalis* par la méthode d'aromatogramme ont donné des résultats acceptables en ce qui concerne l'effet inhibiteur de ces derniers vis-à-vis des souches bactériennes utilisées avec un diamètre d'inhibition qui diffère d'un germe à un autre : *Staphylococcus Aureus* (33mm), *Candida. Albicans* (20 mm) et *Escherichia coli* (12mm).

- [1] Kheyer.N, Blhamel.K, «Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*inula viscosa*, *salvia officinalis* et *laurus nobilis* de la région de Bejaia» Algérien Journal Nationale products,26,18-20 (2014) .
- [2] Hamilton.M,Shah.S «Activity of tea componement epicatechin gallate and analogues against méthicilin resiastance *staphylococcus aureus*» jornal of antimicrobial chemotherapy,46,847-863 (2004).
- [3] Sanchez.M,Iarrauri,J.A and Soura_calixto,F, «Aprocedure to meaur the antiradical efficiency of polyphenols»,journal of the science of food and agriculture,76,270-276 (1998).
- [4] Mouhammedi,Z, «Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoides de quelques plantes de la région de tlemcen»,thèse de magistère,département de biologie laboratoire produits naturels, université Abou bakr belkaid tlemcen, Algérie (2009).
- [5] Zeghad,N, «Etude du contenu poly phénolique de deux plant médicinales d'intérêt économique(*thymus vulgaris*,*Rosmarinus officinalis*)et évaluations de leur activité antibactérienne»,thèse de magistère,(école doctorale),Département de biologie végétale et écologie,universitébmentouri Constantine, Algérie (2009).
- [6] Murghob, N, «Recherche de substance naturelles issues de plantes médicinales marocaines capables d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses du col de l'utérus et études de leurs mécanismes d'action», thèse de doctorat, Biologie, université Mohammed .V, Agdal Maroc (2011).
- [7] Benyache,F,Benyach,M ,Jay, «plantes médicinales et phytothérapie» tome,170_176 (1991).
- [8] Tounsi,L «Etudes « in vitro » de l'effet antibactérien et antifongique de :*Inula viscosa* la *wsonia inermis*_*Asphodelus microcarpus*_*Aloevera*_*Juniperus oxycedrus*»,thèse de Magister,Département vétérinaire, université de constantine, Algérie (2001).
- [9] Benoit Bock, «*Dittirichia viscosa* Subsp.*viscosa*» Articl Tela -Botanica.6,2-3(2015).
- [10] Djedioui.A «Evaluation de l'activité hypoglycémiant et anti-hyperglycémiant de l'extrait aqueux d'*inula viscosa*, une plante de l'Est Algérien »thèse de magister, Département biochimie, université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie (2010).

- [11] Catherine. Reeb, «plantes mellifères. *Inula visquese*» journal abeilles and Fleur,20,19-20 (2010).
- [12] Laouer.H«Contribution a l'étude des plantes médicinales du massif Boutaleb» thèse de Magistère, (2001).
- [13] Michela Ion Scotta , «présentation de *l'inule visquese*»,journal Volet Botanique (2013).
- [14] Peyrin.B et al, Hépatotoxicitéde la phytothérapie : donnes chimiques,biologiques, histologique et mécanisme en cause pour quelques exemples,Gastronterol Clin Biol, (2004).
- [15] Bssaibis.F ,Mira N.G et Meziane,M,Rev, «microbiol,ind. San et Environn».vol,3N1_44_55 (2009).
- [16] Awah.P, «Diabète et médecine traditionnelle en Afrique», Diabètes vol.51,24-26 (2006).
- [17] Wenqiaowang.Y,Bant.D« Extraction of grapes coused by plasmopara viticala»Disease controland pest management (2005).
- [18] levizou.E ,karageorgou.P ,kpsaras.G et Manetas.Y«Flora».J.vol.197,152-157 (2002).
- [19] Boumaza,D , «Séparation et caractérisation chimique de quelque biomolécules actives deux plantes médicinales : *Inula viscosa* , *Rosmarins officinale* de la région d'Oran» ,thèse de magister, département de chimie laboratoire de synthèse organique appliquée, université d'Oran,Algérie (2011).
- [20] Alnamer Rashad.MM, «valorisation pharmaceutique de *Rosmarinus Officinales* :toxicité Aigue, potentiel psychotrope et antibactérienne», thèse de doctorat ,département science de la vie, université Mohammed U_agdal, Maroc (2014).
- [21] Jean-Chaude Rameau et al «flore forestiere francaise méditerranéenne» (2008).
- [22] Bousbia,N, «Extraction des huile essentielles riches en antioxydant a partir de produits naturels et de coproduits agroalimentaires »,thèse de doctorat, Ecole Nationale supérieure agronomique (2011).
- [23] Zoubeidi,CH, «Etude des antioxydants dans le *Rosmarinus officinalis*, labiatea »,thèse de Magister Département de Génie de procédés , université de ouargla, Algérie (2004).

- [24] Adams, M., Plitzko, I., Kaiser, M., Brun, R « HPLC-profiling for antiplasmodial compounds—3-Methoxycarpachromene from *Pistacia atlantica*» *Phytochem.* 2,159–162 (2009).
- [25] Ahmed, A.A., EL-Sayed, N.H., EL-Negoumy, S.I., Mabry, T. «Flavonoids of *Cotula cinerea*». *J. Nat. Prod.*, 50, 519 (1987).
- [26] Blàzquez, M.A. «Chemical composition of the essential oils of *Pistacia atlantica* Desf». *J. Essent. Oil Res.*, 17, 52–54 (2005).
- [27] Barroso, F.G., MartmHnez, T.F., Paz, T., Parra, A., « Tannin content of grazing plants of southern Spanish arid lands». *J. Arid. Environ.*, 49, 301-314 (2001).
- [28] Cowan, M.M. «Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol Re*», 12, 564-582 (1999).
- [29] Mebark,N, «Etude des huile essentielle de thymus fontaines et application a la formation d'une forme médicicamenteuse-antimicrobienne», thèse de Magistère ,département Génie des procédés et pharmaceutique» ,université M'hamed Bougara Boumerdes (2010).
- [30] Guinoiseau,E, «Molécules antibactériennes, issues d'huiles essentielles, séparation, idantification et mode d'action »,thèse de doctorat, Département sciences du vivant. Université de corse (2010).
- [31] Figuredo, G «Etude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (lamiacée) cultivés, issus de graines d'origine méditerranéenne», thèse de doctorat, Département chimie organique, université Blaise Pascal (2012).
- [32] Laib,I «Etude de l'activités antioxydant et antifongique de l'huile essentielle des fleurs séches de la vandula officinalis sur les moisissures des légumes secs »,thèse de Magister ,Département des technologies Alimentaire, université Mentouri constantine, Algérie (2011).
- [33] Hellal,Z , «Contribution a l'etude,des propriété antibactériennes et anti oxydantes de certaines huiles essentielles extraites de citrus, Application sur la sardine(sardine pilchardus)»,thèse Magister en biologie ,Département des sciences Biologiques, université Mouloud Mammeri de Tizi ouzou, Algérie (2011).
- [34] Dorman, H,J et Deans,S ,G, «Antimicrobiol agents form plants :antibacteraql activity of plant volatile oils »;journal of applied Microbiology.vol 88,2.p,308-316 (2000).

- [35] Frédéric.B«the repellency of lemongras oil against tsetse using video tracking»,parasite,vol.20,p21 (2013).
- [36] Mostafa.S ; « Extraction et caractérisation de l'huile essentielle et de quelques métabolites secondaires actifs d'une plante à caractères thérapeutiques , thymus vulgarisL; et étude de quelques activités pharmacologiques » ; thèse de magister ; Blida, Algérie (2011).
- [37] Miquel,B,Niessen,L,R,«Antioxydant evaluation protocols.food quantity or health effects,food Research and technology»,219,561-571 (2004).
- [38] Dormanhf,D,Deans,S,G« antibacterial activity of plant volatil oil»,88,308-316 (2000).
- [39] Robert,D, «méthode de dilution antibiotique et antibiogramme»,131-137montreal-canada (1995).
- [40] W Jennings, T.Shibamoto « Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Capillary Gas Chromatography». Academie Press. New York (1980).
- [41] RP. Adams, «Identification of Essential Oil by Gas ChromatographyI Quadrupole Mass Spectrometry». Allured. Carol Stream, (2001).
- [42] L. Gachkar, D. Yadegari, M. Bagher Rezaei. M.Taghizadeh, S.Alipour Astaneh et I. Rasooli « *Food .Chem* »j .Vol. 102.898-904 (2007).
- [43] M.Blanc, C.Muselli, P.Bradesi« Casanova» J.Vol. 19.314-319 (2004).
- [44] Zenini.M , «Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de trois espèces de menthe: *Mentha spicata* , *Mentha rotundifolia* et *Mentha pulegium* », thèse de master , universités de Khemis –Miliana,Algérie (2012).
- [45] Gulcin.I et Huyut.Z et Elmastas.M ; « Radical scavenging and antioxydant activity of tannic acids », Arabian journal oh chemistry ; vol 3; pp43-53 (2010).
- [46] Jorge.A .Pino,Mirna Estarron and victor Fuentes, «Essential oil of Rosmarinus officinalis L,from cuba » ,Institute de Investigations par la industrie Alimentaire, cuba (2011).
- [47] Alezandare porte, Daise lopes, Helna S «Essential oil of rosmarinus officinalis L from Rio de Janiro,Brazil» Departement de technologie de Aliments ,université Federal Rural de Rio de Janiro (2011).

- [48] C.I.G, Tubero, L. Garau, «Chimical composition of rosmarinus officinalis oils of sardinia» Département de Tossicologia, université de Cayliari, Italy (2011).
- [49] Avril.J.L et Dabernat et Denis.H et Monteil.F.H ; « Bactériologie clinique», 2^{ème} Edition; Paris; pp 9,31,135,152 (1992).
- [50] Chaib bessou.S et Yakhou.A ; « Extraction et caractérisation de l'huile essentielle de Mentha pulegium, évaluation de l'activité anti microbienne », thèse de master ; université de Khemis-Miliana(2012).

Annexe

Les souches bactériennes utilisées

Escherichia coli

Escherichia coli, également appelée colibacille et abrégée en *Escherichia.coli*, est une bactérie intestinale des mammifères, très commune chez l'être humain. En effet, elle compose environ 80% de notre flore intestinale. Découverte en 1885 par Theodor Escherich, dans ces selles de nourrissons, c'est un coliforme fécal généralement commensal. Cependant, certain souches d'*Escherichia.coli* peuvent être pathogènes entraînant alors des gastro-entérites, infection urinaires, méningites, ou septicémies.

Ce genre comprend 5 espèces, mais *Escherichia.coli* est la plus importante. Cette espèce est subdivisée en sérotypes sur la base des antigènes présents.

Escherichia.coli (Gram-), c'est une des bacilles de dimension moyenne 0.5, elle se développe aisément sur milieu ordinaires [49].

Classification

Règne	Bacteria
Embranchement	Proteobacteria
Classe	Gamma proteobacteria
Ordre	Enterobacterales
Famille	Enterobacteriaceae
Genre	Escherichia

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus (Gram+) est l'espèce la plus pathogène du genre *staphylococcus*.

Le réservoir naturel des *staphylocoques* est l'homme et les animaux à sang chaud. Cependant, éliminées dans le milieu extérieur, ces bactéries très résistantes sont fréquemment retrouvées dans l'environnement.

Elle est responsable d'intoxication alimentaires, d'infection localisées suppurées, et dans certains cas extrêmes, de septicémies chez des sujet débilisés (greffe, prothèses cardiaque) [49].

Annexe

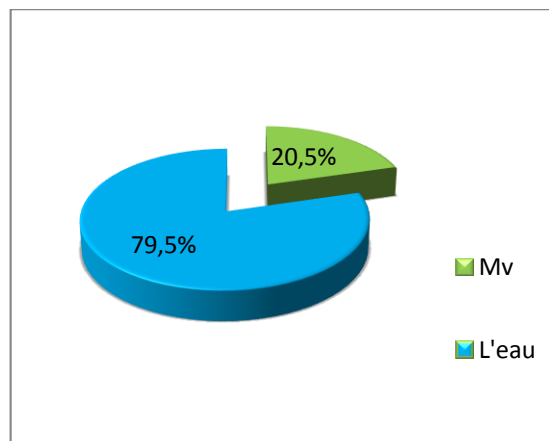
Candida Albicans

Candida est un genre de levures (dont les plus importantes espèces est *candida albicans*) qui est répandu dans tout le monde habité et forme normalement un commensal parfaitement toléré par l'homme sain dans la bouche, sur la peau, dans le système digestif et dans la flore vaginale. Elle devient pathologique et provoque parfois des mycoses (*candidiase* ou *candidose*) chez les humains et d'autres animaux quand l'organisme est affaibli.

Candida albicans (parfois aussi appelé monlia) est un champignon (ou levure) normalement présent sur la peau et dans la bouche, l'intestin, et le vagin. Dans certaines conditions, il se multiplier et envahir la surface de la peau ou les muqueuses. De telles infection sont habituellement mineure, mais des formes plus sérieuses et plus profondes peuvent survenir chez les patients dont la résistance a été affaiblie par les médicaments immunosuppresseurs et des maladies graves comme le sida [50].

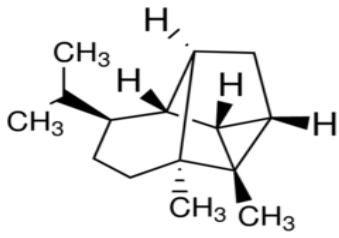
Classification [50]

Règne	Fungi
Division	Ascomycota
Classe	Saccharomycetes
Ordre	Saccharomycetales
Famille	Saccharomycetaceae
Genre	<i>Candida</i>

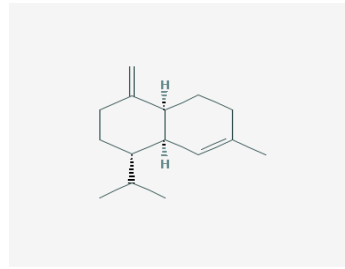


Taux d'humidité *d'Inula Viscosa*

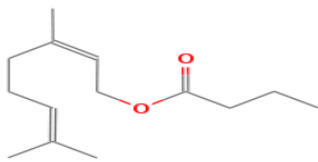
Annexe



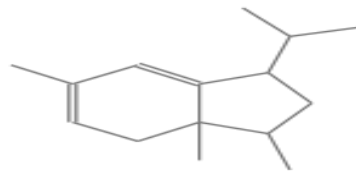
Cyclosativene



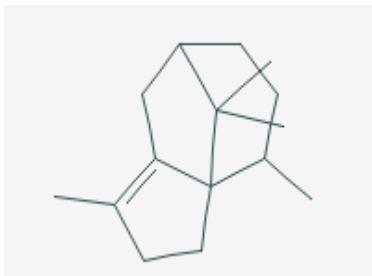
gamma muurolene



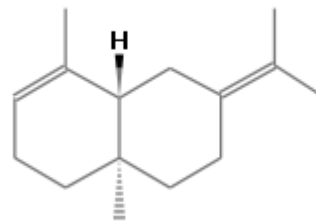
Neryl butanoate



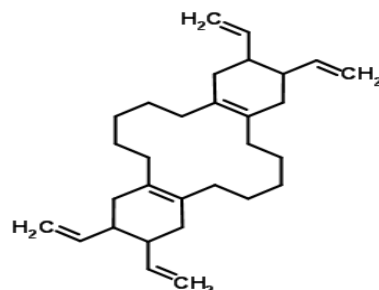
1h-indene, 2,3,3a,4-tetrahydro-3,3a,6-trimethyl-1- (1-methylethyl)-



Cyperene



Selina-3,7(11)-diene



Chem Spider

Quelque structure chimique des composés chimiques présentés dans l'HE de *Rosmarinus officinalis*