



Remerciement

Nos remerciements tout d'abord DIEU le tout puissant de nous avoir donné la santé, la volonté et le courage d'effectuer ce modeste de fin d'étude.

Nos remerciements à **M^{me} TALEB TOUDERT KARIMA**, qui nous guidé et orienté tout au long de la réalisation de nous travail.

Nous remerciements vont aussi à **M^r MEDJBEUR DJAMEL**, pour l'attention qu'il à bien voulu présider le jury. On est particulièrement honorée par sa participation à ce jury.

Nous remerciements vont aussi à **M^{me} KHERROUBI SAMIA**, qu'elle a bien voulu porter ce travail, en qualité d'examinatrice. On est particulièrement honorée par votre participation à ce jury.

Nous remerciements à tous nous profs du cycle primaire jusqu'au jury.

Nous remerciements vont aussi à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à réalisation de ce modeste travail.



Dédicaces

Avec l'aide de DIEU, tout puissant qui m'a donné le courage et la volonté pour achever ce modeste travail

que je dédie :

A ceux qui ont donné un sens pour mon existence, à ceux qui ont été toujours un synonyme de sacrifices, confiance, d'aide et compréhension, à la lumière de mes yeux, « **Mon père** et **Ma mère** ».

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous.

A mon cher grand frère **Amrane**, Je tiens à te remercier pour ton soutien permanent et je te souhaiter une vie pleine de santé et de bonheur.

A ma chère petite sœur **Feriel**, Que dieu te donne une longue et joyeuse vie.

A la mémoire de ma chère grande tante **Sadia**, Que Allah lui accorde sa grâce sa clémence et sa sainte miséricorde et l'accueille dans son vaste paradis nchallah.

A mon fiancé **ALI**, qui était toujours à mes côtés.

A tous les membres de ma famille paternelle et maternelle, je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, santé et de réussite.

A mon cher binôme **Nassima**, et sa famille. À qui je souhaite une vie pleine de réussites.

A tout ce qui m'aiment et A tout ce que j'aime.

Sihem



Dédicace

Je dédie ce mémoire à mes parents, qui ont toujours cru en moi et qui m'ont soutenu tout au long de mon parcours académique. Votre amour inconditionnel et votre soutien ont été une source d'inspiration pour moi. Je suis reconnaissante pour tout ce que vous avez fait pour moi.

À ma sœur et mes frères, qui ont été mes compagnons de vie et mes meilleurs amis. Votre amour, votre soutien et votre encouragement ont été une source d'inspiration pour moi.

À mes amis, qui m'ont soutenu tout au long de ce parcours académique. Votre soutien moral et vos encouragements ont été une source de motivation pour moi. Je suis reconnaissante pour votre amitié.

À tous ceux qui ont contribué à ma réussite académique. Votre soutien, votre encouragement et vos conseils ont été une source d'inspiration pour moi.

À mon binôme Sihem, qui a été mon partenaire tout au long de ce projet. Votre contribution, votre soutien et votre travail acharné ont été essentiels pour mener à bien ce travail. Je suis reconnaissante pour tout ce que nous avons accompli ensemble.

Nassima

Sommaire

Introduction	1
--------------------	---

Chapitre 1 Généralité sur les huiles essentielles

1. Définition	3
2. Composition chimique d'huile essentielle	3
2.1. Terpènes.....	3
2.2. Monoterpènes	4
2.3. Triterpènes	4
2.4. Sesquiterpènes	4
2.5. Les composés aromatiques	4
2.6. Composés d'origines diverses	4
3. Structures productrices des huiles essentielles.....	4
3.1. Trichomes glandulaire.....	4
3.2. Cavités sécrétrices	5
3.3. Cellules sécrétrices	5
3.4. Canaux sécréteurs	5
4. Méthodes d'extractions des huiles essentielles	6
4.1. Hydrodistillation	6
4.2. Extractions par entraînement à la vapeur d'eau.....	6
4.3. Expression à froid.....	7
4.4. Extraction par solvant organique	7
5. Rôles des huiles essentielles	7
6. Principaux domaines d'application des huiles essentiels.....	8
7. Activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	8

Chapitre 2 monographies des plantes étudiées

1. Le Pin d'Alep	10
1.1. Généralité.....	10
1.2. La classification de Pin d'Alep.....	10
1.3. Caractéristiques botaniques.....	10
1.4. répartition de pin d'Alep En Algérie.....	11
2. Géranium.....	12
2.1. Présentation de la famille des Géraniacées (Geraniaceae).....	12
2.2. Caractéristique botanique.....	12

2.3.Repartition En Algérie	13
2.4.Classification phylogénétiques	13

Chapitre 3 Matériel et méthode

1. localisation de la zone d'étude.....	14
2. Réalisation des coupes anatomiques pour l'étude de la structure sécrétrices des huiles essentielles à la microscopie optique	14
2.1.Réalisation des coupes anatomiques.....	14
2.2.La double coloration.....	15
3. Extraction des huiles essenteiles à partir des fleur de prlargonium roseum et des pseudophylles de pinus halepensis.....	15
3.1. Détiemination de taux d' humidité du matériel végétale.....	17
3.2. Calcule du rendemen en huiles essenteielles.....	18
4. Evaluation de l'effet des huiles essentielles sur la croissance de pseudomonas aeruginosa et bacillus cereus	18
4.1.Souches bactériennes.....	18
4.2.Revivification microbiologique des souches microbiennes	18
4.3.Repiquage sur les milieux sélectifs	18
4.4.Préparation de la suspension bactérienne (l'inoculum).....	18
4.5.Méthode de diffusion.....	19
4.6.Détermination de la CMI par la méthode de microplaque	20

Chapitre 4 Résultats et discussion

1.Rendement en huiles essentielles	21
2.Étude histoanatomoqie	21
2.1. la feuille de géranium roseum	21
2.2. la tige de géranium roseum.....	22
2.3. Structures sécrétrices de géranium roseum.....	24
2.4. la tige de pin d'alep	24
3. l'activité antimicrobienne des huiles essentielles	25
3.1.Technique de l'antibioaromatogramme.....	25
3.2Détermination de la concentration minimale inhibitrice.....	28
Discussion.....	29

Annex

Liste de référence

Liste des abréviations

%	pourcentage.
°C	degré Celsius.
µl	Microlitre.
AB	Antibiotique.
AFNOR	Association Française de Normalisation.
ANOVA	Analysis of variance.
<i>B cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i> .
BHIB	Brain Heart Infusion Broth.
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice.
ED	Eau distillée.
G	Gramme.
G-	Gramme négative.
G+	Gramme positive.
H	Heures.
H	Taux d'humidité.
HE	Huile essentielle.
Kg	Kilogramme
M	Masse de matériel végétal.
M	Mètre
Min	Minutes.
ML	Millilitre.
MM	Millimètres.
MS	Matière Sèche.
O2	Oxygène.
OMS	L'organisation mondiale de la santé.
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
PAM	Plantes aromatiques et médicinales.
R %	Rendement en huile essentielle en pourcentage (%).
V	Volume d'eau.
V	Volume de l'huile.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Taux d'humidité et des rendements en huiles essentielles.

Tableau 2 : activité antimicrobienne des huiles essentielles de géranium et pin d'Alep exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition en mm.

Tableau 3 : Détermination des CMI des huiles essentielles de géranium et pin d'Alep.

Liste des figures

Figure 1 : canal sécréteur au niveau d'une pseudophylle de Pin maritime (Anonyme).	5
Figure 2 : principe schématique de hydrodistillation (HD) (Ferhat, 2010).	6
Figure 3 : principe schématique Extractions par entrainement à la vapeur d'eau	7
Figure 4 : Caractéristiques de <i>Pinus halepensis</i> (originelle 2023).	11
Figure 5 : Géranium rosat (originelle 2023).	14
Figure 6 : localisation du site de prélèvement des plantes étudiées (Google).	14
Figure 7 : Extracteur pilot (Taleb, 2015).	15
Figure 8 : les huiles essentielles de pin d'Alep (originelle 2023).	16
Figure 9 : les huiles essentielles de géranium rosat (originelle 2023).	17
Figure 10 : méthode des aromatogrammes sur boîte de Pétri (OUAAR, 2018).	19
Figure 11 : Coupe transversale de la feuille de pelargonium roseum (G10 ×10).	22
Figure 12 : Coupe transversale de la tige de pelargonium roseum (MO: G 10 ×40).	23
Figure 13 : Observation optique de poil secreteur (MO: G 10 ×40).	24
Figure 14 : Coupe transversale de la feuille de pin d'Alep (MO: G 10 ×40).	24
Figure 15 A : Effet des huiles essentielles de <i>Pinus halepensis</i> sur la croissance de <i>P. aeruginosa</i>	26
Figure 15 B : Effet des huiles essentielles de <i>Pelargonium roseum</i> sur la croissance de <i>B. cereus</i>	26
Figure 15 C : Effet des huiles essentielles de géranium roseum sur la croissance de <i>B. cereus</i>	26
Figure 15 D : Effet des huiles essentielles de géranium roseum sur la croissance de <i>P. aeruginosa</i>	26
Figure 16 : Résultat de la CIM.	28

Introduction générale

Les plantes médicinales ont été utilisées pour traiter les maladies depuis des milliers d'années, mais elles ont été largement remplacées par la médecine moderne. Cependant, de nombreuses plantes médicinales ont des propriétés curatives prouvées scientifiquement et peuvent être utilisées en complément ou en alternative aux traitements médicaux traditionnels **(OMS, 2021)**.

Le recours à la phytothérapie et à l'aromathérapie qui se fait généralement par le biais des huiles essentielles, malgré l'ancienneté de sa naissance, a été toujours d'un brûlant intérêt qui ne cesse jamais d'occuper la une des actualités du développement exponentiel des biotechnologies végétales. Les nouveaux progrès de la science contribuent massivement à la naissance de nouveaux principes actifs et de nouvelles propriétés pharmacologiques qui permettent de transformer les plantes aromatiques et médicinales (PAM) en authentiques médicaments **(Brunetton, 1999)**.

Les huiles essentielles présentent une très grande richesse de molécules. Leur criblage permettrait de découvrir de nouveaux antibactériens, qui pourraient constituer une alternative à l'usage des antibiotiques conventionnels devenus inefficaces **(Ouissam, 2014)**.

face à la perte d'efficacité de l'antibiothérapie, mise en péril par l'émergence des agents microbiens multirésistants la découverte de nouvelles molécules s'avère être une nécessité absolue.

Les huiles essentielles sont alternative prometteuse aux antibiotiques car elles ont un mode d'action différent et peuvent cibler plusieurs voies métaboliques des bactéries **(Bakkali et al., 2008)**, de plus les huiles essentielles sont souvent considérées comme des produits naturels et sans danger pour l'environnement, ce qui en fait un choix attrayant pour les applications industrielles **(Brut, 2004)**.

Les huiles essentielles de géranium rosat et pin d'Alep sont particulièrement intéressantes en raison de leur large spectre d'activité contre les bactéries **(Zouari-ben Bechir et al., 2017)**.

Bacillus cereus et *Pseudomonas aeruginosa* sont deux bactéries couramment associées à des infections alimentaires et hospitalières **(Bottone, 2010)**. La résistance croissante des bactéries aux antibiotiques traditionnels est un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale **(Ventola, 2015)**.

Object de ce travail est de déterminer *in-vitro* l'activité antibactérienne des huiles essentielles de géranium et pin d'Alep vis-à-vis de *P. aeruginosa* et *B. cereus* dont :

La première partie de ce manuscrit propose une mise au point bibliographique sur les huiles essentielles, et la présentation du géranium rosat et pin d'alep.

La seconde partie expose la procédure expérimentale et la troisième partie développe les résultats et discussion.

Enfin notre travail se clôturé par une conclusion ainsi que les perspectives d'étude.

Chapitre I
Généralités sur les huiles
essentiels

1. Définition

Une huile essentielle est définie comme les métabolites secondaires odorantes ou huiles volatils obtenu d'une plante ou certaines parties de celle-ci (fleurs, tiges, racines, feuilles, herbes, bois, graines, bourgeons, fruits, écorce) par expression, fermentation, extraction. La méthode de l'entraînement à la vapeur d'eau est la plus utilisée pour la production commerciale. Ce sont des liquides huileux aromatiques, caractérisés par une forte odeur, leur couleur s'arrange dans la gamme de couleur s'étalant le plus souvent de l'incolore au jaune et possible jusqu'à le jaune verdâtre. Néanmoins la présence de certains composés spécifiques affecte la couleur de ces dernières comme par exemple le cham azulène donne du bleu pour l'huile essentielle de la camomille romaine (**Bakkali et al., 2008**).

Ils peuvent être synthétisés par tout organe végétal et stockés dans des cellules sécrétoires, des cavités, des canaux, des cellules épidermiques ou des trichomes glandulaires (**Burt, 2004**).

2. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes contenant plusieurs composés singuliers qui sont des dérivés terpéniques et leurs composés oxygénés. Il s'agit alors de deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes :

- Composés terpéniques.
- Composés aromatiques dérivés du phenylpropane.

Les huiles essentielles peuvent également renfermer divers produits issus de processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils. Bien qu'elles ne représentent qu'une petite fraction de la composition de la plante néanmoins, elles confèrent les caractéristiques par lesquelles les plantes aromatiques sont utilisées dans l'alimentation, le domaine de la cosmétologie et les industries pharmaceutiques (**Pourmortazaviet al., 2007**).

2.1. Terpènes

Constitués principalement de carbone et d'hydrogène, ce sont les molécules les plus répandues dans l'huile essentielle. Leur structure chimique les empêche de se cristalliser, par contre, ils se polymérisent facilement. Ces hydrocarbures sont responsables en partie, de l'odeur dégagée par les plantes et les fleurs et trouvent leurs utilisations en parfumerie (**Berigaud, 2002**).

2.2. Monterpènes

On les rencontre comme constituants odorants des essences végétales. La plupart de ces composés possèdent des centres asymétriques et sont donc optiquement actifs. Dans la nature, on ne retrouve fréquemment qu'un seul des stéréoisomères. Les monoterpènes s'associent pour former des diterpènes (C₂₀H₃₂), triterpènes (C₃₀H₄₈), tétraterpènes (C₄₀H₅₆) et les polyterpènes (C₁₀H₁₆) n..., de structures chimiques variées, ils peuvent être acyclique (linéaire), monocyclique, bicyclique ou même tricyclique (**Pourmortazavi et al., 2007**).

2.3. Triterpènes

Ce sont des composés en C₃₀ (six molécules isopréniques) aliphatique ou polycycliques. On les utilise dans l'industrie des parfums. Il y'a aussi les tétraterpènes et polyterpènes qui sont des composés importants du point de vue biochimique. Ils contiennent des chaînes à plusieurs doubles liaisons conjuguées, responsables de leurs couleurs. La coloration de ces hydrocarbures tétra et polyterpènes est facilement explicable par le nombre important de doubles liaisons conjuguées (Bruneton, 1993).

2.4. Sesquiterpènes

Ce sont des composés moins volatils de formule moléculaire (Trois molécules isopréniques disposées). On trouve quelques exemples de sesquiterpènes caractéristiques des HE: Alcools, Cétones, Aldéhydes et Esters (**Bruneton, 1993**).

2.5. Les composés aromatiques

Les dérivées du phénylpropane (C₆ - C₃) sont beaucoup moins fréquentes, qui eux aussi existent sous différentes formes moléculaires fonctionnalisées. Ce sont très souvent des alkyles propénylphénols, parfois aldéhydes caractéristiques de certaine huile essentielles. On peut également rencontrer dans les huiles essentielles des composée en C₆-C₁ Comme la vanilline (assez fréquente) ou l'anthranilate de méthyle .Les lactones dérivées des acides cinnamiques (c-à-d. les coumarines) étant, au moins pour les plus simple d'entre elle, entraînés aussi par la vapeur d'eau

2.. Composés d'origines diverses

Il s'agit là de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles .Ces composés contribuent souvent aux arômes de fruit compte de leur mode de préparation, les concrètes et les absolues peuvent en refermer (**Brunetton, 1999**).

3. Structures productrices des huiles essentielles

3.1. Trichomes glandulaire

Les espèces appartenant à la famille des lamiacées sont caractérisé par la présence des trichomes glandulaires qui sont reconnus comme étant le site de biosynthèse, de sécrétion et d'accumulation des huiles essentielles (**Gersbach, 2002**).

3.2. Cavités sécrétrices

Leur présences est bien établie comme étant caractéristique des Myrtacées et des rutacées. On les trouves par exemple dans les feuilles et les fleurs de *Myrtus communis* (**Ciccarelli et al., 2008**).

3.3. Cellules sécrétrices

Ce sont des cellules généralement de grande taille pouvant avoir une cuticule lignifiée. C'est la plus simple des structures sécrétrices. On la rencontre dans différents tissus végétaux, comme le cortex du gingembre (*Zingiber officinale*) et l'endosperme de la noix de muscade (*Myristica frarans*).

3.4. Canaux sécréteurs

Les canaux ou conduits sécréteurs sont des cavités ovales qui se joignent souvent pour créer un réseau s'étendant des racines, passant par la tige, aux feuilles, aux fleurs et aux fruits. On les retrouve chez les espèces de la famille des Apiacées comprenant le cumin, le fenouil et l'anis (**Gersbach et Reddy, 2002**) figure 1.

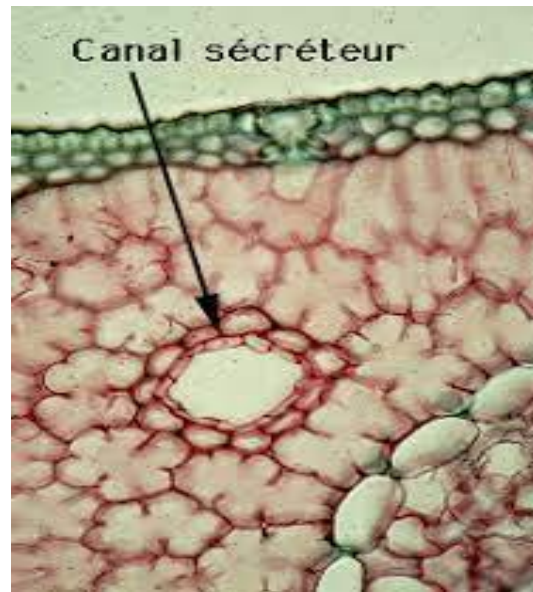


Figure 1 : canal sécréteur au niveau d'une pseudophylle de Pin maritime (Anonyme).

4. Méthodes d'extractions des huiles essentielles

Il existe plusieurs méthodes d'extraction, choisies en fonction de la partie de la plante où se trouve l'huile essentielle. Ainsi que de la qualité de la valeur thérapeutique de chaque procédé résulte un produit différent.

4.1. Hydrodistillation

Elle consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau et l'ensemble est porté à ébullition. Elle est généralement conduite à la pression atmosphérique. La distillation peut s'effectuer avec ou sans cohobage des eaux aromatiques obtenues lors de la décantation. (Ferhat, 2010).

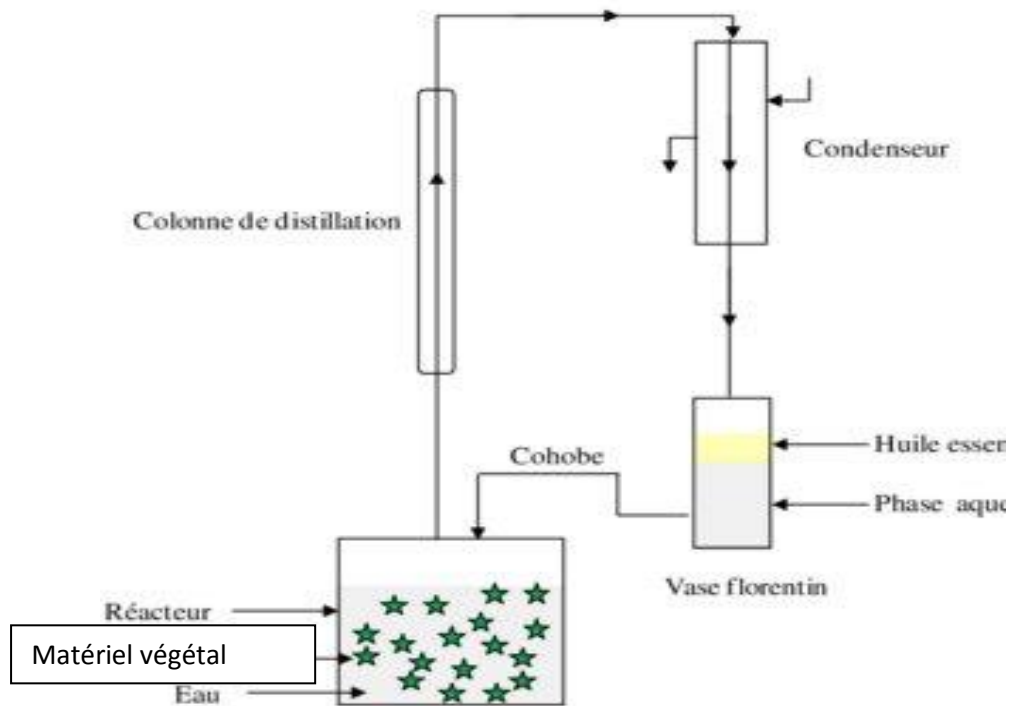


Figure 2: principe schématique de hydrodistillation (HD) (Ferhat, 2010).

4.2. Extractions par entrainement à la vapeur d'eau

Dans ce système d'extraction le matériel végétal subit l'action d'un flux de vapeur sans macération préalable, les vapeurs saturées en composés volatils sont condensées puis décantées dans l'essence, avant la séparation en phase aqueuses et en phase organique (Raaman, 2006).

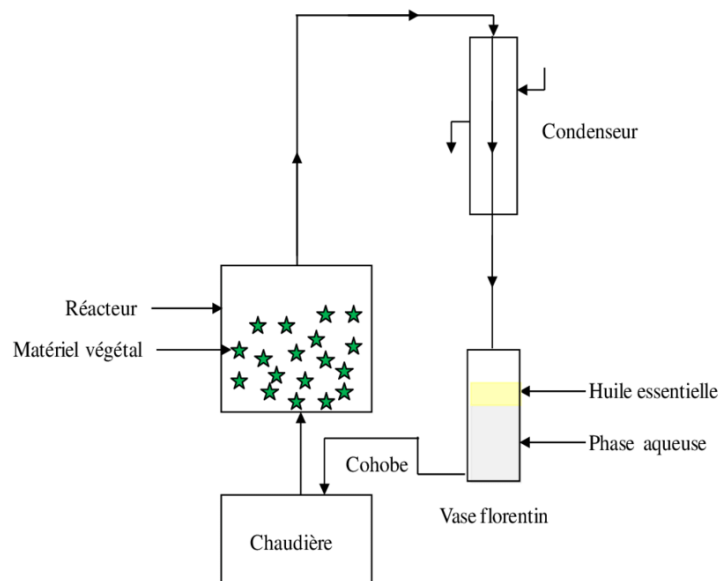


Figure 3: principe schématique Extractions par entraînement à la vapeur d'eau (**Ferhat, 2010**).

4.3. Expression à froid

La technique est réservée à l'extraction des essences volatiles contenues dans les péricarpes d'agrumes en déchirant ces dernières par un traitement mécanique, celui-ci sont traités mécaniquement. Il consiste à casser ou à dégrader les parois des sacs oléifères contenus dans l'écorce du fruit l'épicarpe, pour recueillir les contenus qui n'ont pas été modifiés (**Ferhat et al., 2016**).

4.4. Extraction par solvant organique

Les solvants organiques le plus utilisées actuellement sont l'hexane, cyclohexane, l'éthol, moins souvent le dichlorométhane et l'acétone. Le solvant choisi, en plus d'être autorisé, doit présenter une certaine stabilité contre la chaleur, la lumière et l'oxygène. L'extraction se fait avec une machine soxhlet (**Hubert, 1992**).

5. Rôles des huiles essentielles

Le rôle exact que jouent les huiles essentielles dans la physiologie des plantes productrices est encore mal compris.

Cependant, il existe diverses théories sur son identité. Nous définissons les huiles essentielles comme des signaux moléculaires qui répondent aux interactions écologiques entre les plantes et leur environnement.

En effet, la complexité de ces produits leur permet de Communiquer différents messages biologiques spécifiques. Parce que les composants des huiles essentielles sont volatils, ils peuvent influencer les organismes à une certaine distance de la plante productrice.

Leur lipophile leur confère une certaine persistance dans la biosphère majoritairement aqueuse. les huiles essentielles ont été comme ayant démontrées des effets attractifs sur les animaux qui servent à la pollinisation (**Ciccarelli et al., 2008**) et la dispersion des graines.

D'autre part, une répulsion contre les herbivores a également été observée (**Isman, 2000**).

Les plantes aromatiques utilisent également les huiles essentielles pour inhiber la germination et le développement d'autres espèces végétales dans l'environnement : un effet allélopathique (**De Feo et al. 2002**).

C'est le cas, par exemple, de *Salvia leucophila*, qui libère dans l'atmosphère des substances telles que le camphre et le 1,8-cinéole, inhibant la germination et le développement d'autres espèces concurrentes (**Nishida et al., 2005**).

De plus, les huiles essentielles sont un remède C'est une défense naturelle contre les insectes prédateurs et les micro-organismes, et les plantes de production résistent à de multiples pathologies communes aux autres familles de plantes. Dans ce dernier cas, les substances libérées sont appelées "phytoalexines". Ce type de toxine n'entre pas dans la composition des huiles essentielles des plantes saines, car elle n'est produite qu'en cas d'infection (**Mann, 1987**).

6. Principaux domaines d'application des huiles essentielles

En raison de leurs diverses propriétés, les huiles essentielles sont devenues une matière d'importance économique considérable avec un marché en constante croissance. En effet, elles sont commercialisées et présentent un grand intérêt dans divers secteurs industriels comme en pharmacie par leurs pouvoirs antiseptique, analgésique, antispasmodique, apéritif, antidiabétique..., en alimentation par leur activité anti-oxydante et leur effet aromatisant, en parfumerie et en cosmétique par leur propriété odoriférante (**Ouis, 2015**).

7. Activités antimicrobienne des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont une activité à plus ou moins large spectre contre les gram positif et gram négatif et les entérocoques. Dans les secteurs de la protection des cultures et de l'agro-alimentaire, il est utilisé comme agent de protection contre les champignons, le virus et micro-

organismes envahissants des aliments. Ils présentent un grand intérêt pour le traitement des maladies d'origine virale et des infections respiratoires (**Valnet, 2005**).

Chapitre II

Monographies des plantes étudiées

1. Le Pin d'Alep

1.1. Généralité

Quzel et santa (1963), ont décrit le pin d'Alep comme colonisant les forêts des montagnes comme à Tikjda dans le Djurdjura. Les feuilles sont d'un vert foncé, de 10 à 16 cm de longueur plus ou moins raides. Les jeunes pousses sont jaune, oranges, les cônes ont 5 à 7 cm de longueur, écailles à apophyse bombée, à carène transversales aigues. Les graines sont brunes, mouchetées de noir.

1.2. La classification de Pin d'Alep

Le Pin d'Alep est une espèce du genre *Pinus*, et du sous-groupe *halepensis*. Ce groupe est essentiellement représenté par deux espèces *Pinus halepensis* Mill et *Pinus brutia* Ten appartenant exclusivement au circumméditerranéen (**Quézel et Médail, 2003**).

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Gymnospermes

Classe : Pinopsida

Ordre : Coniferales

Famille : Pinaceae

Sous-famille : Pinoideae

Genre : *Pinus*

Espèce : *Pinus halepensis* (Miller, 1968) Subsp. *Halepensis*

1.3. Caractéristiques botaniques

Le Pin d'Alep est un arbre toujours vert, d'une hauteur d'environ 20 à 30 m, souvent penché et peu droit, à cime claire, écrasée et irrégulière.

Le système racinaire des jeunes plantules est pivotant présentant de nombreuses radicules, dites chevelues, à croissance rapide. Et chez les adultes la racine pivot disparaît peu à peu. Les racines sont souvent mycorhizées.

L'écorce des jeunes plantules est lisse et gris argenté, et chez les adultes elle présente des gerçures en écailles sombres.

Les branches sont légèrement étalées. Les rameaux sont fins, de couleur vert clair puis gris clair. Les feuilles sont sous forme d'aiguilles de 1 mm d'épaisseur et d'environ 6 à 10 cm de longueur. Elles sont groupées par deux, de couleur vert grisâtre et persistantes 2 à 3 ans sur l'arbre (figure 4)

Le Pin d'Alep est une espèce monoïque, portant deux types d'inflorescence : des cônes mâles de couleur jaune teintée de rouge et des cônes femelles pédonculés roses et violacés. C'est un arbre qui fructifie très tôt ; à partir de 10 à 12 ans, mais les graines ne sont fertiles qu'à partir de 18 à 20 ans. La fructification a lieu en été et en automne de l'année suivante après fécondation (**Rameau et al., 2008**)



Figure 4 : Caractéristiques de *Pinus halpensis* (originelle 2023).

1.4. Répartition de pin d'Alep En Algérie

Le Pin d'Alep occupe 35% de la surface boisée (**Mezali, 2003**). Il est présent dans toutes les variantes bioclimatiques avec une prédominance dans l'étage semi-aride. Il est abondant à l'ouest d'Alger, dans les hauts plateaux et l'Atlas saharien (**Kadik, 1983**). Il existe naturellement dans les forêts des monts de Tébessa, des monts de Saida et Mascara. Il est aussi la première espèce de reboisement ; il est utilisé dans presque tous les projets de reboisement notamment dans le barrage vert (**Bentouati, 2006**).

2. Géranium

2.1. Présentation de la famille des Géraniacées (Geraniaceae)

La famille des Geraniaceae (communément appelées Géraniacées) est une famille de plantes dicotylédones vraies qui comprennent 5–7 genres et 650–800 espèces.

Les genres Géranium et Pélargonium sont classés dans la famille des Geraniaceae et possèdent un fruit allongé similaire, composé de 5 méricarpes, chacun contenant une seule graine (Miller, 2002).

2.4. Classification phylogénétique

Classification de phylogénétique du géranium selon **Ceonquist (1981)** est comme suit

Règne : Plantae (Plantes)

Sous-règne : Tracheobionta (Trachéophytes)

Super division : Spermatophyta (plantes à graines)

Division : Magnoliophyta (ou angiospermes), plantes à fleurs

Classe : Magnoliopsida (ou dicotylédones)

Sous-classe : Rosidae

Ordre : Geraniales

Famille : Geraniaceae

Genre : Pelargonium

Espèce : *Pelargonium graveolens*

2.2. Caractéristiques botaniques

Sous-arbrisseau à port érigé, très ramifiant, formant une touffe pouvant atteindre 1,3 m de hauteur et 1 m de diamètre.

Tige herbacée verte, brunissant et se lignifiant avec l'âge. Ramifications axillaires élancées ou étalées, donnant à la plante une allure générale de touffe compacte.

Les Feuilles sont vertes, plutôt douces au toucher, à indument comportant toujours de nombreux poils, opposées, odorantes, et découpées en 5 à 7 lobes.

L'inflorescence est terminale et constituée de 3 à 10 semi-ombelles de couleur rose. Ses fleurs roses, à cinq pétales sont souvent veinées d'une coloration plus foncée (Demarne, 1992) (figure 5).



Figure 5 : Géranium rosat (originelle 2023).

2.3. Répartition en Algérie

P. graveolens est introduit en Algérie au 19ème siècle .Elle est cultivée en Algérie, principalement dans la plaine de Mitidja, dans les jardins et dans les cimetières (**Boukhatem et al, 2011**).

Chapitre III
Matériel et méthodes

1. Localisation de la zone d'étude

Les feuilles et les tiges de *Pelargonium roseum* et du pinus *halpensis* ont été prélevées dans le village Oumaden qui se trouve dans la commun d'Ath Zmenzer situé à 11 km de Tiziouzou et a une altitude de 510 m dans la Wilaya de Tizi-Ouzou (figure 6).

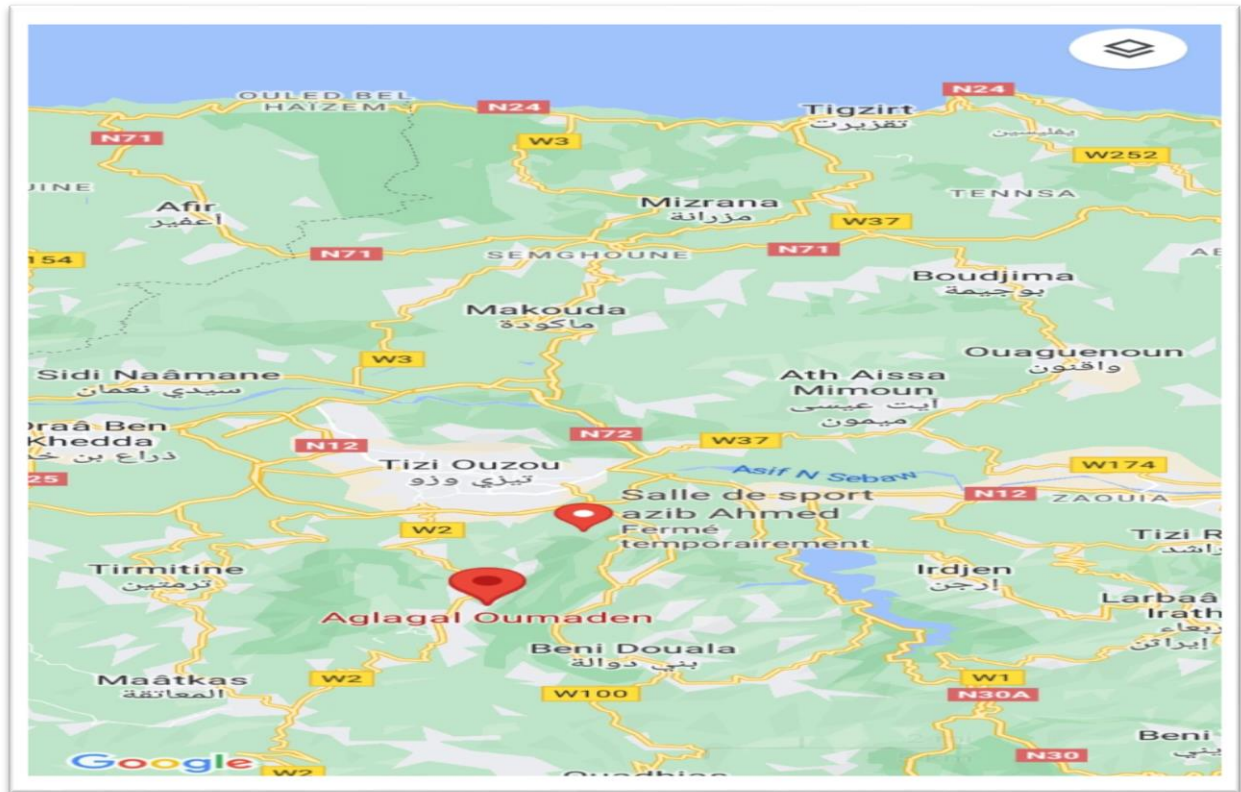


Figure 6 : localisation du site de prélèvement des plantes étudiées (wikipédia).

2. Réalisation de coupes anatomiques pour l'étude des structures sécrétrices d'huiles essentielles à la microscopie optique

L'étude histologique de deux espèces à porter sur la réalisation de coupe anatomiques au niveau d'organes telle que les feuilles les tiges conformément a la technique préconisée par **Deyson (1954)**.

2.1. Réalisation des coupes anatomiques

Pour réaliser des coupes anatomiques fines, nous avons utilisé l'organe frais (feuille et tiges) de chacune de plante considérées. Ce dernier est pris entre deux morceaux de polystyrène a fin grains à l'aide d'une lame gillette, des coupes sont rapidement réalisées

perpendiculairement à l'axe de l'organe. Les coupes sont ensuite récupérées dans une boîte de pétri contenant de l'eau distillée.

2.2. La double coloration

Placer les coupes 10 à 20 minutes dans l'hypochlorite de sodium (l'eau de javel) afin de vider les cellules de leurs contenus, suivit d'un lavage abondant à l'eau.

Elles sont ensuite rincées rapidement dans l'acide acétique dilué à fin de neutraliser l'excès d'eau de javel puis rincé avec l'eau distillée. Elles sont ensuite soumis à l'action de rouge Congo 15 à 20 min, rinçage, suivi d'un bain de vert de méthyle 10 à 15 min. Rinçage à l'eau puis observation au microscope optique.

3. Extraction des huiles essentielles à partir des fleurs de *Pelargonium roseum* et des pseudophylles de *Pinus halepensis*

Dans un premier temps, l'extraction a porté sur 2 kg de fleurs de *Pelargonium roseum* ont été introduites dans un extracteur pilote (alambic) (figure 7). L'extraction à partir des pseudophylles de pin d'Alep a été effectuée dans un deuxième temps.

L'Alambic est formé :

- ✓ D'une chaudière
- ✓ D'une corbeille
- ✓ D'une réfrigérant
- ✓ Un essencier (platine)

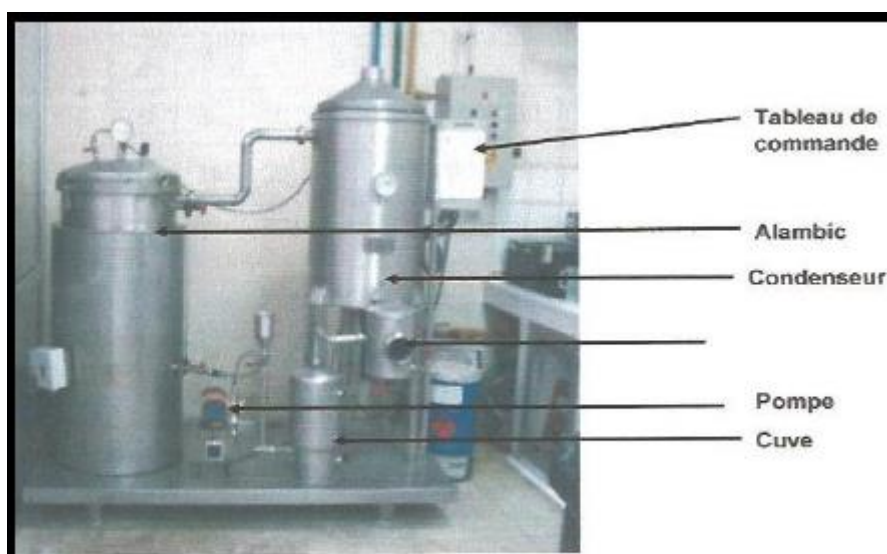


Figure 7 : Extracteur pilote (Taleb, 2015).

La chaudière est conçue pour recevoir la corbeille dans laquelle est mise la matière végétale à distiller.

Après avoir ajouté l'eau de la chaudière la matière végétale est introduite dans la corbeille la température de l'extracteur est à 100 C° pour favoriser l'évaporation d'eau et l'entraînement des molécules d'HE sous forme gazeuse (vapeur).

La vapeur ainsi formée quitte la chaudière vers le réfrigérant dans un tube en métal inoxydable qui se raccorde au serpentín du réfrigérant rempli d'eau dont la température avoisine les 12-13C° qui entraîne la condensation de la vapeur en gouttelettes récupérées, dans l'essencier. L'huile essentielle généralement moins dense que l'eau.

L'eau est ensuite évacuée en ouvrant le robinet de l'essencier. L'huile essentielle et le peu d'eau restante sont récupère dans une ampoule à décanter. Cette opération a nécessité 2 heures environ. L'huile est ensuite récupérée dans un flacon en verre foncé et rangée au réfrigérateur 4□ (figure 8 et 9).



Figure 8 : les huiles essentielles de pin d'Alep (originelle 2023).

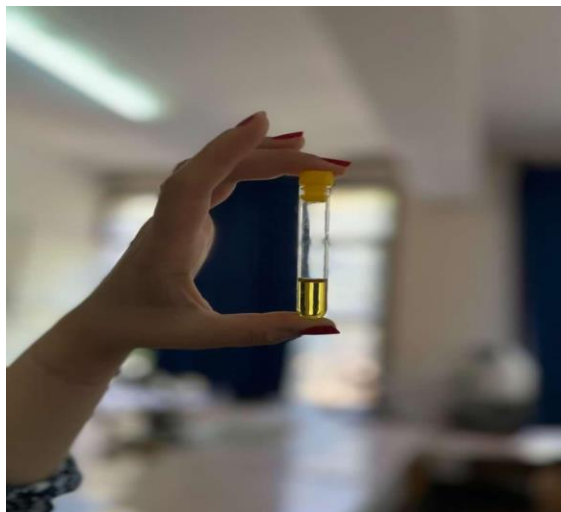


Figure 9 : les huiles essentielles de géranium rosat (originelle 2023).

3.1. Détermination du taux d'humidité du matériel végétal

Le taux d'humidité est la quantité d'eau contenue dans le végétal frais. L'appareil de DEAN et STARK a été utilisé à cette fin.

Il est formé d'un ballon en verre de ml relié par un tube de raccordement à un tube cylindrique gradué le tube cylindrique est surmonté d'un réfrigérant Le ballon est placé sur le chauffe ballon.

Le principe est de quantifier l'eau contenue dans le végétal en le mettant en contact d'un solvant (le toluène), le tout est porté à ébullition.

Dans le ballon, un poids P de matière végétale est mélangé à un volume (100 ml) de toluène. Sous l'effet du chauffage le solvant ainsi que l'eau dans le végétal s'évaporent Une fois dans le réfrigérant, les vapeurs se condensent en gouttelettes qui s'accumulent dans le tube gradué (eau à la base, le solvant en haut) L'opération dure jusqu'au moment où le niveau d'eau dans le tube gradué devient stable et le solvant limpide.

A la fin de l'opération, l'intensité de chauffage est augmentée afin de récupérer toutes les gouttelettes d'eau déposées sur les parois du réfrigérant.

Après refroidissement le volume d'eau est lu sur le tube gradué et le taux d'humidité est calculé selon la formule suivante :

$$H = \frac{M}{V} \times 100$$

Avec :

H : taux d'humidité.

V : le volume d'eau

M : masse de matériel végétal.

3.2. Calcul du rendement en huile essentielle

Le rendement est la quantité maximale d'huile essentielle que fournit une masse donnée de végétal pendant une période donnée. Le rendement est calculé par la formule :

$$R(\%) = \frac{V}{MS} \times 100$$

Avec :

R : Rendement en huile essentielle en pourcentage (%)

V : volume de l'huile (ml) recueilli

MS : Matière Sèche (g)

4. Evaluation de l'effet des huiles essentielles sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Bacillus cereus*

4.1. Souches bactériennes

Dans cette étude deux souches bactériennes ont été choisies dont une à gram positif qui est *Bacillus cereus* et l'autre à gram négatif qui est *pseudomonas aeruginosa* issu de la collection des souches référencées du laboratoire de microbiologie de département biologie d'UMMTO.

4.2. Revivification microbiologique des souches microbiennes

Afin de pouvoir utiliser les souches bactériennes testées, elles ont été revivifiées dans le milieu de culture (BHIB) ; pour cela un repiquage, dans de tubes contenant du BHIB à été effectué à partir des milieux de conservation des souches, ces tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 24h.

4.3. Repiquage sur les milieux sélectifs

Les souches bactériennes testées ont été repiquées à partir des cultures contenues dans le BHIB sur les milieux sélectifs, suivies d'une incubation à 37°C pendant 24h.

4.4. Préparation de la suspension bactérienne (l'inoculum)

à l'aide d'une anse platine stérile Prélever 3 à 4 colonies bactériennes bien isolées de chaque espèce étudiées à partir des boîtes de Pétriensemencées précédemment puis déposer les colonies dans 9ml d'eau physiologique stérile (0,9% chlorure de sodium (Na Cl)), ces tubes ensuite vortexés pendant quelques secondes, une suspension bactériennes de densité équivalente au standard 0,5W de MC Ferland (10^8 UFC.ml⁻¹) est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620 nm et la densité optique est ajustée à

0,08 – 0,10. L'ajustement de l'inoculum bactérien se fait en fonction de la charge : Soit par ajout de la culture si la DO est faible ou de l'eau physiologique stérile s'il est trop chargé.

4.5. Méthode de diffusion

La méthode des aromatogrammes est la technique choisie pour déterminer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle testée. Cette méthode consiste à déposer un disque stérile inhibé d'HE sur un milieu solide à l'intérieur d'une boîte de pétri. Elle permet de mettre en évidence l'effet antibactérien d'HE sur les bactéries, ainsi que la détermination de la résistance ou la sensibilité de ces bactéries vis à vis à cette HE.

La méthode de diffusion sur disque appliquée est celle décrite par **Hayes et Markovic (2002)**. Environ 20 ml de Muller Hinton en surfusion sont coulés dans des boîtes de pétri, après solidification de milieu de culture, la suspension bactérienne (10^8 UFC/ml⁻¹) testées est étalée en surface. Dans des conditions aseptique et à l'aide d'une pince stérile, 4 disques de papier filtre stérile de 6mm de diamètre sont déposés sur l'agar, dont 2 disques imprégnés avec des concentrations variées d'HE (5µl, 10µl et 12,5 µl) pour chaque boîte sont réalisés, et 2 disques témoins sont réalisés ; un témoin positif par dépôt de disque antibiotique (Gentamycine) et un témoin négatif imprégnés avec 5ml d'eau physiologique stérile, nous avons fait deux répétitions pour chaque boîte, les boîtes ont été incubées dans une étuve à 37°C pendant 24h.

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque en millimètre.

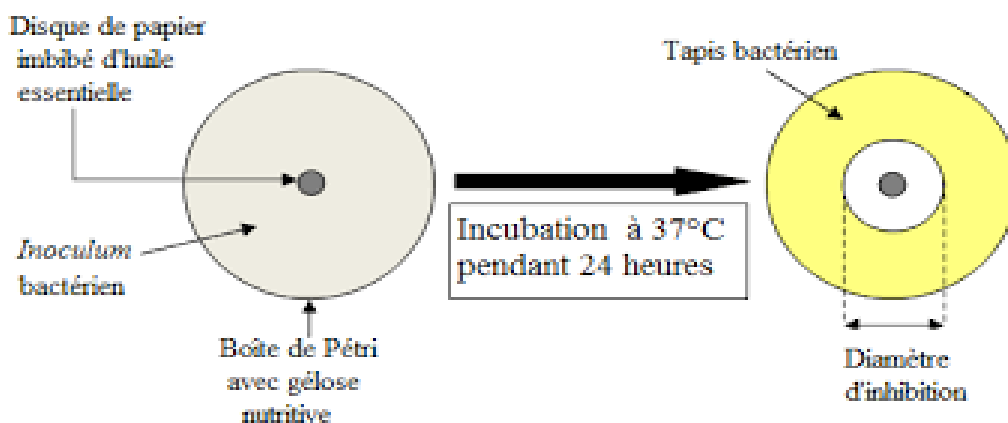


Figure 10 : méthode des aromatogrammes sur boîte de Pétri (OUAAR, 2018).

4.6. Détermination de la CMI par la méthode de microplaque à 96 puits

Cette étape a été réalisée par l'utilisation d'une galerie à 96 puits. Cette technique consiste à incuber par un inoculum standardisés une gamme de 11 concentration décroissantes d'HE, dans chaque puits est introduit 40ml de bouillon Muller Hinton, dans le premier puits de chaque rangée sont rajoutés 15ml d'HE des dilutions successives de raison $\frac{1}{2}$ sont ensuite réalisées du premier puits au 11eme puits de chaque ranger à l'exception du 12 éme puits, puis ajoutés pour chaque puits 5ml de suspension bactériennes a (10^8 UFC/ml⁻¹). La galerie ainsi réalisée est portée à l'étuve pour incubation pendant 18 à 24h. Observation de la gamme permet d'accéder à la concentration minimale inhibitrice qui correspondant à la plus faible concentration en HE capable d'inhiber la croissance bactérienne.

Chapitre VI
Résultats et discussion

1. Rendement en huiles essentielle

Le rendement moyen en huile essentielle a été calculé en fonction de la matière végétale fraîche de la partie aérienne de la plante.

Les taux d'humidité ainsi que les rendements obtenus pour les deux espèces de plantes étudiées sont rassemblés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Taux d'humidité et des rendements en huiles essentielles.

Espèces	Masse utilisée (g)	Taux d'humidité (%)	Rendement (ml)
<i>Pinus halepensis</i>	30,3212	3,29	0,5
<i>Pelargonium roseum</i>	12,0015	8,16	0,6

2. Étude histoanatomique

L'observation des coupes histoanatomiques réalisées à partir des feuilles, tiges de *Pelargonium roseum* et *pseudophylles de pinus halepensis* a permis de localiser les sites sécréteurs des essences végétales.

2.1. La feuille de *Pelargonium roseum*

L'observation au microscope optique de la coupe transversale de la feuille de *Pelargonium roseum* montre la présence de tous les caractères d'une feuille de Dicotylédones comme le montre la figure 11.

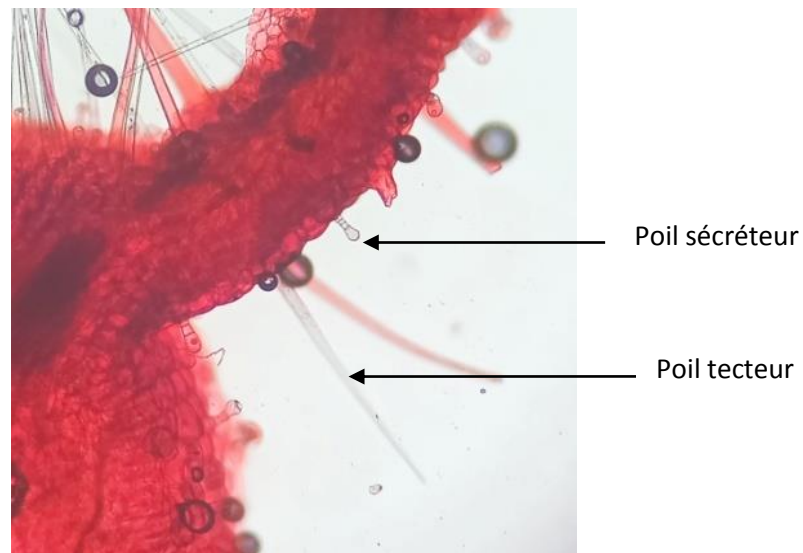


Figure 11 : Coupe transversale de la feuille de *Pelargonium roseum* (G 10X10) (originelle 2023).

Nous avons observé au niveau de cette coupe la présence de poils tecteurs variés : unicellulaires, bicellulaires et tricellulaires à extrémités effilées et fines de taille variable (courte, moyenne et longue), et La présence de poils sécréteurs à tête pluricellulaire et pied unicellulaire

2.2. La tige de *Peargonium roseum*

La coupe transversale réalisée au niveau de la tige de *Pélargonium roseum* (Figure 12), possède les mêmes caractères des tiges des Dicotylédones avec la présence des poils tecteurs et sécréteurs mais avec un nombre réduit par rapport à celui des feuilles.

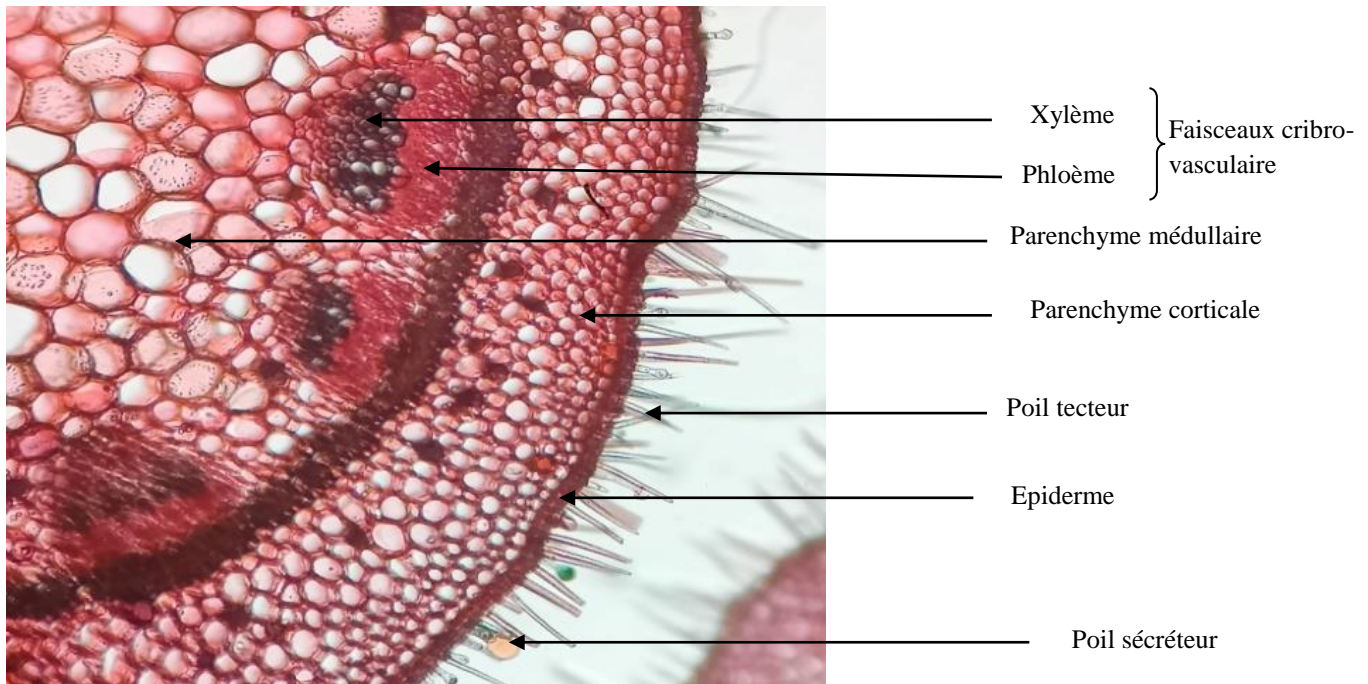


Figure 12 : Coupe anatomique de la tige de *pelargonium roseum* (MO : Gx400) (originelle 2023)

De plus, on distingue également :

- Epiderme : représenté par une seule assise de petites cellules cellulosiques allongées.
- Parenchyme cortical : formé par plusieurs couches de cellules à paroi mince et pectocellulosiques allongées.
- Xylème : situées vers l'intérieur, ces cellules sont mortes, leur paroi est partiellement lignifiée, elles sont superposées par rapport au phloème, comportant des vaisseaux de différents types. Leur rôle principal est la conduction de la sève brute.
- Une structure secondaire : xylème et phloème secondaires.
- Parenchyme médullaire formé de cellules à paroi mince et de forme très variable. Il est situé profondément dans l'organe.

2.3. Structures sécrétrices de *Pelargonium roseum*

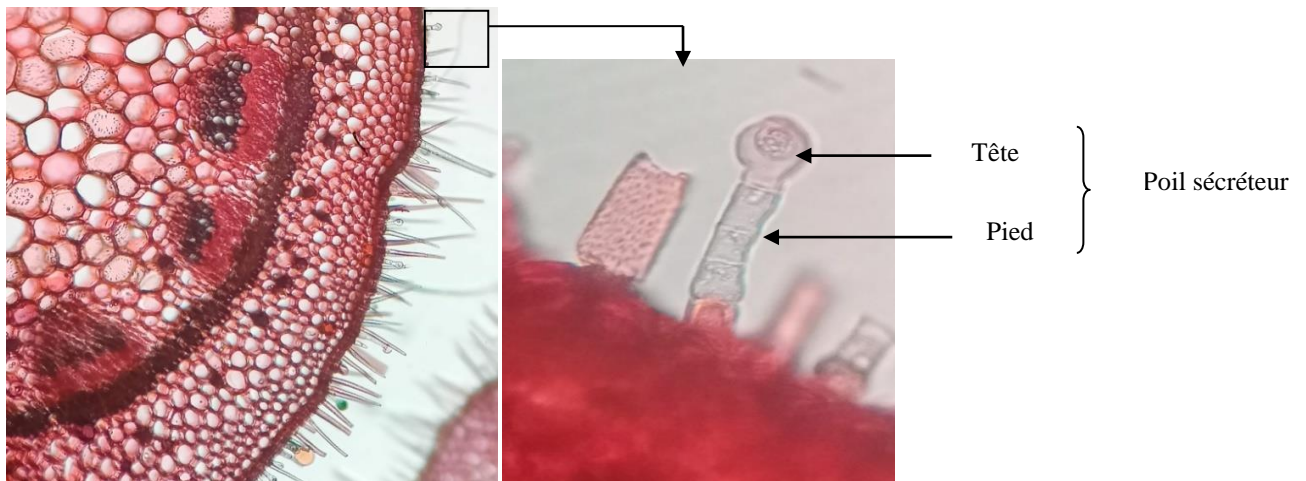


Figure 13 : Observation microscopique d'un poil sécréteur (M.O : Gx400) (originelle 2023).

Chez *pélargonium roseum*, l'huile essentielle est stockée dans des poils sécréteurs (Figure 13) aussi bien au niveau de la feuille que de la tige. Comme tous les poils sécréteurs, on note une tête arrondie dans laquelle s'accumule l'essence et un pied qui la relie à l'épiderme.

2.4. Pseudophylles de *Pinus halepensis*

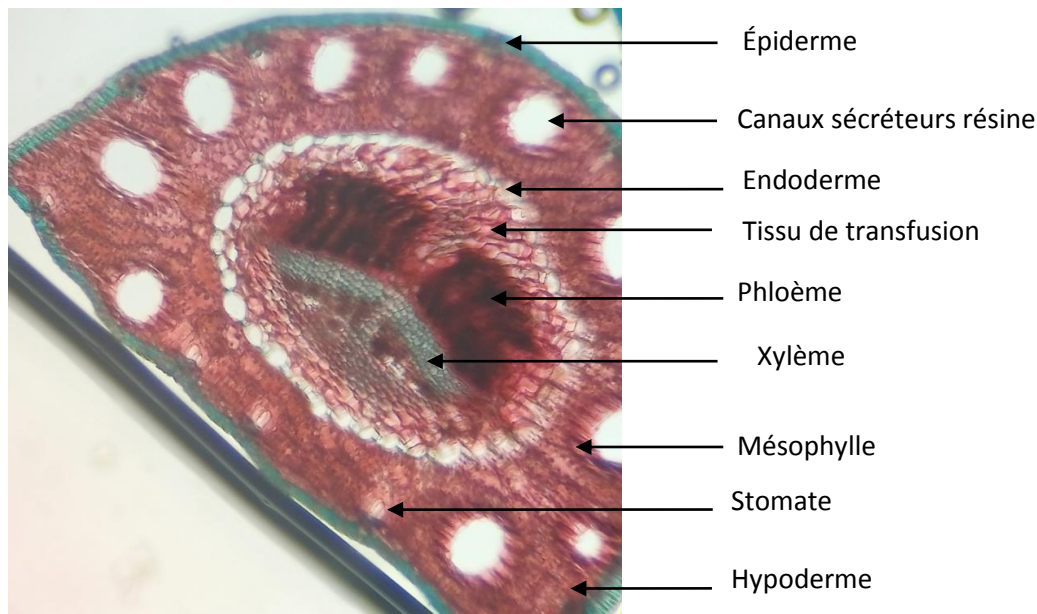


Figure 14 : coupe transversale de la feuille de *Pinus halepensis* (MO : G×10).

Dans la coupe transversale d'une pseudophylle (Figure 14.), nous avons observé une structure normale avec : une assise épidermique continu, un mésophylle (parenchyme chlorophyllien) présentant de la chlorophylle sur toute sa surface, une assise de cellules formant une gaine protectrice, des stomates, des canaux résinifères et des faisceaux libéro-ligneux.

3. Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

3.1. Technique de l'antibioaromatogramme

Le pouvoir antibactérien des HEs de *Pinus halepensis* et *Pelargonium roseum* vis-à-vis des bactéries *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa* à été évalué par la présence ou l'absence des zones d'inhibition après 24h d'incubation à 37 °C, les résultats sont présentés d'abord dans la figure 15 puis tableau 3 :

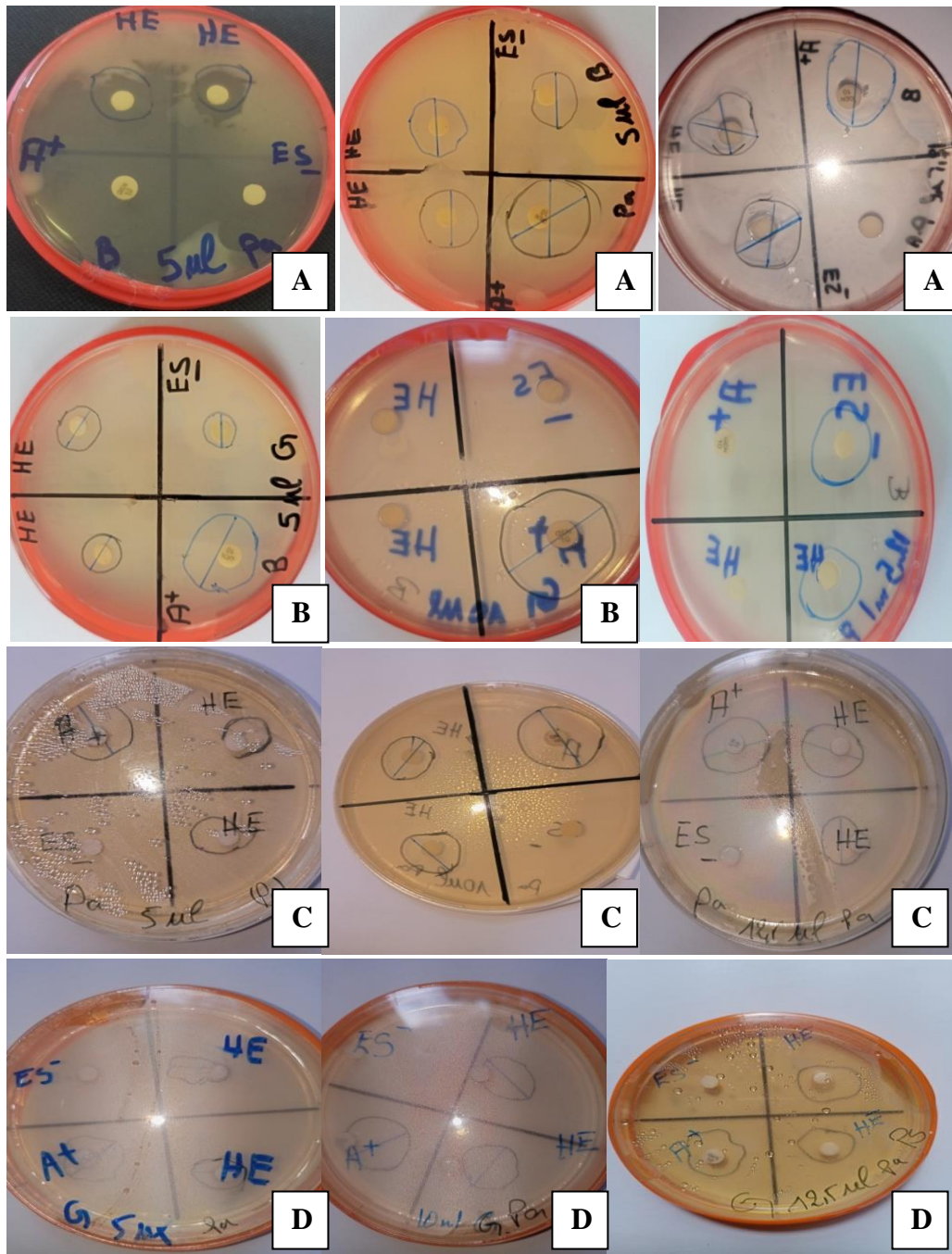


Figure 15 : effet des huiles essentielles sur la croissance bactérienne.

A : Effet des huiles essentielles de *Pinus halepensis* sur la croissance de *B. cereus*.

B : Effet des huiles essentielles de *Pelargonium roseum* sur la croissance de *B. cereus*.

C : Effet des huiles essentielles de *Pinus halepensis* sur la croissance de *P. aeruginosa*.

D : Effet des huiles essentielles de *Pelargonium roseum* sur la croissance de *P. aeruginosa*.

Les diamètres des zones d'inhibition révélées par la présence des HEs et obtenu après 24h d'incubation sont consignés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Pelargonium roseum* et *Pinus halepensis* et pin d'Alep exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition en mm.

Huile	Souche bactérienne	Dose en μl			
		SUS	5 μL	10 μL	12,5 μL
Pin d'alep	<i>B cereus</i>	HE (R1)	1,6	1,95	2,35
		HE (R2)	1,6	1,95	2
		AB	2,3	2,3	2,3
		AB	2,5	2,4	2,3
		ED	0	0	0
		ED	0	0	0
	<i>P aeruginosa</i>	HE (R1)	1,3	1,75	1,8
		HE (R2)	1,4	1,6	2,2
		AB	2,6	2,9	2,5
		AB	2	NA	2,4
		ED	0	0	0
		ED	0	0	0
Géranium rosat	<i>B cereus</i>	HE (R1)	1,25	1,6	2,2
		HE (R2)	1,25	1,5	2
		AB	2,5	2,4	2,6
		AB	2,5	2,3	2,4
		ED	0	0	0
		ED	0	0	0
	<i>P aeruginosa</i>	HE (R1)	1,3	1,85	2,2
		ED	0	0	0
		HE (R2)	1,5	1,7	1,9
		AB	2,5	2,5	2,4
		AB	2,6	2,5	2,6
ED	0	0	0		

3.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles (CMI)

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles de géranium roseum et pin d'Alep été effectuée sur *B.cereus* et *P. aeruginosa*. Les résultats de la CMI sont lus sur la microplaque à 96 puits représentés dans la figure 16 et le tableau 3.



Figure16 : Résultats de la CMI

Tableau 3 : Détermination des CMI des huiles essentielles de géranium et pin d'Alep.

Huile essentielle	Bactérie	15 μ l	7,5 μ l	3,75 μ l	1,8 μ l	0,94 μ l	0,47 μ l	0,23 μ l	0,12 μ l	0,059 μ l	0,29 μ l	0,015 μ l
<i>Pinus halepensis</i>	<i>B cereus</i>	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>P aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pélargonium roseum</i>	<i>B cereus</i>	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>P aeruginosa</i>	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : croissance

— : absence de croissance

Discussion

D'après **kaloustian et al, (2013)** le taux de l'humidité définit la qualité et la pureté des huiles essentielles. Il peut déterminer les traces d'eau dans une huile essentielle, le taux d'humidité mesurer doit être inférieur à 1 %. Dans notre étude nous avons obtenu un taux d'humidité égale à 0,32 % pour le pin d'Alep (inférieur à 1 %) et pour le géranium égale à 0,81 % (proche de la limite maximale). Ceci pourrait être expliqué par la méthode choisie pour l'extraction d'huile essentielle qui présente l'inconvénient de laisser des traces d'eau, lors de la récupération (**Benhabiles, 1995**).

A partir de la plante fraîche de géranium nous avons obtenu un rendement élevé en huile essentielle (0.6 %) comparé aux résultats des études antérieures et aux normes fixées par AFNOR (0.15%).

Ce rendement est largement supérieur à celui rapportés par (**Boukhatem et al., 2010**) obtenu à partir de géranium rosat issue de la région de Chiffa (w. Blida), en pleine floraison durant le mois de mai 2008 égale à 0,2%.

En comparaison avec d'autres régions, le rendement est remarquablement élevé pour le géranium séché provenant du Maroc récolté en mars 2013 (**wootton-beard et al., 2011**). Il atteint un taux de 0,8%, qui est largement supérieur à notre rendement.

A partir de la plante fraîche de pin d'Alep, nous avons obtenu un rendement avoisinant les 0,05% d'HE. Cependant, ce rendement est relativement faible comparé à celui rapporté par (**Sadou et al., 2015**) obtenu à partir des aiguilles de *P. halepensis* sèches issues de deux sites : le parc national d'El kala et la forêt Zaarouria récoltées en printemps par entraînement à la vapeur d'eau qui sont des rendements respectifs de 0,81% du site 1 et du site 2 qui est de 0,3%.

La variation du rendement est probablement due à l'origine de la plante. Il est aussi tributaire de plusieurs autres facteurs : la température, l'humidité relative, la durée totale d'insolation et le régime des vents exerçant une influence directe, surtout chez les espèces qui possèdent des structures histologiques de stockage superficielles comme les pélargoniums odorants (**Boukhatem et al., 2010**).

Le faible taux de rendement enregistré par entraînement à la vapeur de la plante fraîche de pin d'Alep est dû probablement à l'origine de la plante soumise à l'extraction, La saison de récolte et La fraîcheur de la plante ainsi La méthode d'extraction.

Au regard des résultats d'analyse de la variance obtenus, nous constatons que le traitement par les huiles essentielles a affecté dans une certaine mesure la croissance des pathogènes étudiés. Ils indiquent une différence très hautement significative pour le facteur dose (DDL=2 ; F=43,0483 ; P=0,000°) et un effet significatif pour l'interaction bactéries huile (DDL=1 ; F=8,1208 ; P=0,01). L'expérience menée indique bien qu'elle est la dose dépendante et elle est également fonction de la sensibilité de la bactérie utilisée.

Nos résultats sont en accord avec ceux de **sadou et al., (2015)** qui ont observé une résistance importante chez *P. aeruginosa* vis-à-vis de HE de Pin d'Alep.

D'autres études réalisées par **Pibiri (2006)**, dit que L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Mentha pulegium.L* est totalement nulle contre la souche *Pseudomonas aeruginosa*. **Atailia et Djahoudi (2015)** ont montré que les souches de *Pseudomonas aeruginosa* sont plus résistantes à l'HE de géranium rosat.

D'après **Said (2011)** *Bacillus* sp a été inhibé par l'HE de géranium Bourbon.

Nos résultats montrent que les bactéries Gram négative sont les plus sensibles à l'action des huiles essentielles que les bactéries Gram positif.

L'HE de pin d'Alep qui a eu un effet bactériostatique ou bactéricide sur *B. cereus* la CMI obtenue est de 15µl, mais aucun effet sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Dans le cas de géranium rosat a montré un effet inhibiteur contre *Bacillus cereus* la CMI de cette dernière a été déterminé à 7,5µl, par contre *P aeruginosa* a été la souche la moins sensible, celle-ci n'a pu être inhibée qu'à la concentration de 15µl.

La résistance élevée de *Pseudomonas aeruginosa* est attribuée à la présence d'une membrane externe, imperméable aux composés hydrophobes grâce à son revêtement lipopolysaccharidique L'absence de cette barrière, chez *Bacillus cereus* permet le contact direct des constituants hydrophobes de l'huile essentielle avec la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire, provoquant, une augmentation de la perméabilité des ions et la fuite des constituants intracellulaires vitaux, soit une déficience au niveau du système enzymatique. En plus *Pseudomonas aeruginosa* a une capacité à former un biofilm, une organisation complexe composée de différentes couches, dans laquelle les bactéries se trouvent dans des conditions physiologiques spécifiques à leur situation (**Zarai et al., 2011**).

Selon **Chang et al., (2001)**, le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles est en relation directe avec plusieurs paramètres à savoir la nature des composés majoritaires et la Concentration des ces composés, nature et structure des groupements fonctionnels et l'interaction probable entre les différents constituants.

Oussalah et al., (2007) suppose que les différents effets des huiles essentielles sur les bactéries, se déroulent d'une manière générale en trois phases : attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires ensuit acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure puis destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

Avec des concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles de géranium rosat (7,5 et 15 μ l) et Pin d'Alep (15 μ l) réduit la viabilité cellulaire avec un effet létal obtenu au bout de 18 heures.

Selon **Kalemba et Kunika (2003)** Les composés majoritaires des HE sont souvent responsables de l'activité antibactérienne observée, l'huile essentielle de *Pelargonium roseum* est riche en composés présentant des groupements acétates contribuent à accroître l'activité des molécules antibactériennes. L'acétate de géranyl et plus actif que le géraniol qui est lui-même bioactif contre une pléthore de bactéries à gram positives et gram négatives.

Les huiles essentielles de *P. roseum* et *P. halepensis* n'ont pas agit par lyse irréversible de la membrane plasmique de *P. aeruginosa* et *B. cereus*.

Des résultats analogues ont été obtenus par **Honne et al., (2001)**, avec les HE d'origan, de thym et de bois de rose sur *streptococcus pneumoniae*. En effet, généralement le premier site d'action cible par les HE est la membrane plasmique des bactéries. Ceci pourrait s'expliquer par l'hydrophobicité des molécules qui entrent dans la composition des HE. Cette propriété facilité leur intégration entre les phospholipides membranaires et assure leur solubilisation dans la bicouche lipidique. Il s'ensuit alors une déstabilisation de la structure de la membrane plasmique et une modification de sa perméabilité aux ions autres constituants cellulaires (**Carson et al., 2006**).

Compte tenu de la diversité moléculaire des HE, il semblerait que leur activité antibactérienne résulterait de l'association de plusieurs mécanismes qui s'exercent aussi bien sur les membranes plasmique et la paroi bactérienne.

Les huiles essentielles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs (**Oussalah et al., 2007**).

En phytothérapie, les HE sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses. Les aldéhydes et les terpènes sont réputés pour leurs propriétés désinfectantes et antiseptiques et s'opposent à la prolifération des germes pathogènes (**Benayad, 2008**).

Conclusion générale

L'extraction des huiles essentielles de *Pelargonium roseum* et *Pinus halpensis* par entraînement à la vapeur d'eau à montrer un rendement de 0.6% et 0.05% respectivement avec un taux d'humidité de 8,16% et 3,29% respectivement.

Les résultats de notre étude suggèrent que les huiles essentielles de *Pélargonium roseum* et *Pinus halpensis* ont un potentiel antimicrobien contre les bactéries *bacillus cereus* et *pseudomonase areuginosa*, et constater que les huiles essentielles agissent d'une manière différente chez les souches testées. Dont l'huile essentielle de *Pinus halpensis* à une action inhibitrice sur la croissance de *B. cereus* et *P. aeruginosa* avec des zones d'inhibition qui varient entre 1,6 et 2,35 mm. Tandis que les huiles essentielles de *pélargonium roseum* ont été efficaces sur *B. cereus* et *P. aeruginosa* avec des zones d'inhibition qui varient entre 1,25 et 2,2 mm.

L'expérience menée indique clairement que l'effet dose dépendant et qu'elle dépend également de la bactérie utilisée.

A propos de la concentration minimale inhibitrice *Bacillus cereus* a été plus sensible vis-à-vis d'huile essentielle de géranium rosat avec une CMI de 7,5 µl, suivi par *pseudomonas aeruginosa* dont la croissance à été inhibée à 15 µl. la CMI de la croissance de *B. cereus* par l'HE de pin d'Alep est de 15 µl alors que qu'il n'a eu aucun effet sur *P. aeruginosa*.

Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour évaluer leur efficacité dans des conditions réelles et pour déterminer les mécanismes exacts de leur activité antimicrobienne.les huiles essentielles peuvent offrir une alternative prometteuse aux antibiotiques traditionnels, mais leur utilisation doit être soigneusement évaluée pour éviter tout effet indésirable sur l'enivrement et la santé humaine. En fin de compte, cette étude peut contribuer à la compréhension de l'utilisation potentielle des huiles essentielles dans les applications industrielles et médicales.

Annexe

1. Analyse d'anova

```
> Anova (AnovaModel.1)
Anova Table (Type II tests)

Response: Effet

      Sum Sq Df F value    Pr(>F)
Bacterie      0.02344  1  1.0870    0.31770
Dose          1.85646  2 43.0483 0.000003351 ***
Huile         0.06510  1  3.0193    0.10785
Bacterie:Dose 0.00812  2  0.1884    0.83068
Bacterie:Huile 0.17510  1  8.1208    0.01463 *
Dose:Huile    0.02521  2  0.5845    0.57247
Bacterie:Dose:Huile 0.03771  2  0.8744    0.44208
Residuals    0.25875 12

---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Références bibliographique

- 1- **Atailia I., Djahoudi A. 2015.** Chemical composition and antibacterial activity of geranium essential oil (*Pelargonium graveolens* L'Hér.) cultivated in Algeria. *Phytothérapie*, 13:156-157.
- 2- **Bakkali, F., Aerbeck, S., Averbek, D., & Idaomar, M. 2008.** Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2),446-475.
- 3- **Benayad N.2008.**Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales Marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées,Mémoire, Université Kasdi Merbah , Ourgla,
- 4- **Benhabiles N.E., 1995.** Comparaison des huiles essentielles de deux espèces algériennes de romarin : extraction et étude analytique. thèse magister, ENP alger.
- 5- **Bentouati Abdallah., 2006 :** Croissance, productivité et aménagement des forêts de pin d'Alep (*Pinus halepensis* M.) du massif d'Ouled Yagoub (Khenchela-Aurès). Thèse de doctorat. Université el hadj lakhdar-Batna. 115p.
- 6- **Berigaud B., 2002.** « Aromathérapie », éd. Parades.
- 7- **Bottone, E.J.2010.***Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *clinical microbiologie reviews*, 23(2), 382-398.
- 8- **Boukhatem, M.N., Hamaidi, M. S., Saidi, F (1), Hakim, Y., Benomier, K. 2010.** Extraction, composition et valorisation de l'eau aromatique de géranium rosat (*Pélargonium graveolens*) dans la dermopharmacie. *Nature et Technologie*° 02, pp.50-55.
- 9- **Boukhatem, M.N., Saidi, F., Hamaidi, M.S., Hakim, Y., Mekarnia, M. 2011.** Culture et exploitation industrielle du géranium rosat (*Pelargonium graveolens*) en Algérie : état des lieux et perspectives. *Phytothérapie*9 : 304–305.
- 10- **Bruneton J., 1993.** *Pharmacognosie : phytochimie , plantes médicinales.* Paris:Tec. et Doc.Lavoisier, 1993, p.623.
- 11- **Bruneton J., 1999.** *pharmacognoise-phytochimie-plantes médicinales.*3eme édition technique & documentation.lavoisier, Paris.
- 12- **Burt S., 2004.** Essential oils: their antibacterial proper ties and potential applications in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 94, 223-253.
- 13- **Chang S.T., P.F. Chen & S.C. Chang, 2001.** Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloem*. *J. Ethnopharmacol.*, 77 (1), 123-127.

- 14- Ciccarelli D., Garbari F. and Pagni A. M., 2008.** The flower of *Myrtus communis* (Myrtaceae) : secretory structures, unicellulair papillae, and their ecological role. *Flora* 203, 85-93.
- 15- Cronquist, A. 1981.** An integrated system of classification of flowering plants. Columbia university press, new york , 248– 250.
- 16- De Feo V., De Simone F. and Snatore F., 2002.** Potential allelochemicals from the essential oils of *Rutagraveolens*. *phytochemistry* 61, 573-578.
- 17- Demarne, F. 1992.** Histoire de la culture botanique et systématique du géranium. In : *Le géranium rosat à la Réunion. APR, CIRAD, Chambre d'agriculture de la Réunion, CAHEB, Réunion-SPV, SAFER-Réunion. Ed. Saint-Denis : 23-25.*
- 18- DEYSON G., 1954.** Eléments d'anatomie des plantes vasculaire ED. SEDES. Pp : 5– 13.
- 19- Farhat, A. 2010.** Vapo-diffusion assistée par micro-ondes: conception, optimisation et application. Thèse de Doctorat en Sciences (option : Sciences des Procédés, Sciences des Aliments), Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse (France) & Ecole Nationale d'Ingénieurs de Gabès (Tunisie).
- 20- Ferhat, M. A., Boukhatem, M. N., Hazzit, M., & Chemat, F. (2016).** Rapid extraction of volatile compounds from Citrus fruits using a microwave dry distillation. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 8(3), 753-781.
- 21- Gerbach P. V., 2002.** The essential oil secretory structures (Lamiaceae). *Ann. Bot.* 89, 255-60.
- 22- Gersbach, P.V. and N. Reddy. 2002.** Noninvasive localisation of Thymol accumulated in *Carrum coticum* (Apiaceae) fruits by chemical shift selective magnetic resonance imaging. *Ann. Bot* 90 : 1-5.
- 23- Hayes A.J. and Markovic B 2002.** Toxicity of Australian essential oil *Backhousiacitriodora* (lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity, *Food and chemical toxicology*, 40, 535 –543.
- 24- Hubert, R. (1992).** Epices et aromates. Edition Tec & Doc, Lavoisier, France.
- 25- Isman M. B., 2000.** Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.* 19, 603- 608.
- 26- Kadik B., 1983.** Etude du Pin d'Alep en Algérie. Thèse de doctorat d'Etat. Université d'Aix-Marseille 3. Marseille. 313 p.

- 27- Kalembe d., et kunucka A., 2003.** Antibacteriel and antifungal properteis of essentiel oils. CURRENT medicinal chemisty 10(10), 813-829.
- 28- Kaloustain J., Hadji Minaglon F.,Vanelle F., 2013.** la connaissance de huile essentielle : qualitolgie et aromathérapie :entre science et traduction pour une application médicale raisonnée. ED. Springer verlag France.226.
- 29- Mann J., 1987.** Secondary metabolism. Clarendon Press, Oxford, 374 p.
- 30- Miller, M. 2002 .** Geranium and Pelargonium. The taxonomy of Geranium species and cultivars, their origins and growth in the wild (Ed) Taylor&Francis. South Bank University, London, UK, 49-79.
- 31- Nishida N., Tarnotsu S., Nagata N., Saito C., and Sakai A., 2005.** Allelopathie effects of volatile monoterpenoids produced by salvia leucophylla:inhibition of cell prolefiration andDNAsynthesis in the root apical meristem of brassica campestris seedlings.J.Chem.Ecol.31,1187-1203
- 32- Ojeniyi B.1994.** Polyagglutinable Pseudomonas aeruginosa from cystic fibrosis patients. A survey. APMIS Suppl;46:1–44.
- 33- OUAAR, Dj., BENALI, A., LOTTE , S., GERARD, J . , TOUMI – BENALI,**
- 34- Ouis, N. 2015.** Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, des fenouils et de persil. Diss. Thèse de doctorat, Université Ahmed Ben Bella-Oran, Alger.
- 35- Ouissam N., 2014.** Composition chimique et effet antimicrobien d’huile essentielle de Pelargonuim graveolens (Géranium rosat), mémoire de Master Sciences et Techniques, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Maroc.
- 36- Oussalah M., Caillet S., Saucier L. et Lacroix M., 2007.** Inhibitory effects of selected plant essential oils on four-pathogen bacteria growth: E. coli O157:H7, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. Food Control. 18 (5), 414-420.
- 37- Pibiri. P, 2006.** Assainissement microbiologie de l’air et de systèmes de ventilation au moyen d’huiles essentielles. Thèse de doctorat : Faculté Environnement Naturel, Architectural et Construit. EPFL (Suisse).
- 38- Pourmortazavi, S.M.,Hajimirsadeghi, S.S. 2007.** Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis.J. Chromatogr. A. 1163, 2-24.
- 39- Quézel P. & Santa S., 1963.** Nouvelle flore de l’Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 1. CNRS. Ed. Paul Le chevalier, Paris. Volume, 1170p.

- 40- Quézel P. et Médail F., 2003.** Ecologie et biogéographie des forêts du bassin méditerranéen. 571p. 6p.
- 41- Raaman, N. 2006.** Phytochemical techniques. New India Publishing, New Delhi, Inde.
- 42- Racha M., Faille C., Kallassy M., Gohar M. 2016.** Bacillus cereus Biofilms same, only different. Frontiers in microbiology.
- 43- Rameau, J.C., Mansion, D., et Dumé, G., 2008.** Flore forestière française: région méditerranéenne (Vol.3). Forêt privée française. 2432P.
- 44- Sadou N., Seridi R., Djahoudi A., Hadeff Y., 2015.** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles des aiguilles Pinus halepensis Mill de nord west algérien. Rev.Sci.Technol.Synthèse 30 :33-39.
- 45- Said O, Hassane S , Badr Satrani , Ghanmi M, Mansouri N, Hayria Mo ,Chaouch A,2011.** Activité antimicrobienne et composition chimique de l'huile essentielle de Plectranthus aromaticus Roxb. de l'Ile de la Grande Comore, Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 15(2), 251-258.
- 46- Seguin .E., Axel. G., Michel .p et Orecchioni .A, 2001.** Le préparateur en pharmacie dossier 2, p : 108 ,143-206 .
- 47- Taleb toudert., 2015.** Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatique provenant de la région de Kabylie (Nord Algérien).Evaluation de leurs effet sur la bruche du niébé *Callosobuchus maculatus* (Coleoptera :bruchidae.Thèse doctorat.univesité Mouloud Mammeri Tizi ouzou.
- 48- VALNET M. 2005 .** Antibacterial activity of 11 essential oils against Bacillus cereus in tyndallized carrot broth Int. J. Food Microbiol.85,p:73-81.
- 49- Ventola CL ., 2015.** The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. P & T: a Peer-Reviewed Journal for Formulary Management 40: 277–283. [PMCID: PMC4378521.
- 50- Wootton beard, P.C.,Ryan L. 2011.** Improving public health: the role of antioxidant rich fruit and vegetable beverages. Food research international, 44(10), 3135–3148
- 51- Zarai Z., Kadri A., Ben Chobba I., Ben Mansour R., Bekir A., Mejdoub A. et Gharsallah N., 2011.** The in-vitro evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of Marrubium vulgare L. essential oil grown in Tunisia, Lipids in Health and Disease, Vol.10, 161.

- 52- Zouari-Ben Bechir, W., Bouzouatia, N., Kachouri,F. 2017.** Chemical composition, antibactériel and antioxidant activities of essential oils from *Pinus halepensis* Mill. growing in tunisia. *Journal of Oleo Science*, 66(1), 86-97.
- 53- Anonyme** (ru.uni-lemans.fr).

Résumé

Les huiles essentielles de *Pelargonium roseum* et *Pinus halpensis* ont été extraites par entraînement à la vapeur d'eau. Les rendements d'extraction obtenus des feuilles fraîches de géranium et des feuilles fraîches de pin d'Alep sont respectivement 0.6% et 0.05%.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode d'aromatogramme à montrer que l'huile essentielle de pin d'Alep à une action inhibitrice sur la croissance *B. cereus* et *P. aeruginosa* avec des zones d'inhibition qui varient entre 1,6 et 2,35 mm avec une CMI de 15 µl. Tandis que les huiles essentielles de géranium ont été efficaces sur *B. cereus* et *P. aeruginosa* avec des zones d'inhibition qui varient entre 1,25 et 2,2 mm et de CMI 7,5 et 15 µl. Ces résultats sont significatifs car ils suggèrent que les huiles essentielle peuvent être utilisées comme alternative naturelle aux antibiotiques sont souvent prescrits pour traiter les infections bactériennes.

Abstract

The essential oils of *Pelargonium roseum* and *Pinus halpensis* were extracted by steam distillation. The extraction yields obtained from fresh geranium leaves and fresh Aleppo pine leaves are 0.6% and 0.05% respectively.

The evaluation of the antimicrobial activity by the aromatogram method showed that the essential oil of Aleppo pine has an inhibitory action on the growth of *B. cereus* and *P. aeruginosa* with zones of inhibition which vary between 1.6 and 2.35 mm with an MIC of 15 µl. While geranium essential oils were effective on *B. cereus* and *P. aeruginosa* with zones of inhibition varying between 1.25 and 2.2 mm and MIC of 7.5 and 15 µl. These results are significant indeed they suggest that essential oils can be used as a natural alternative to the antibiotics often prescribed to treat bacterial infections

Mots clés : Huiles essentielles, *bacillus cereus*, *pseudomonas aeruginosa*, activité antibactérienne.