

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement  
Supérieur et de la Recherche  
Scientifique  
Université Mouloud MAMMERY  
De Tizi Ouzou  
Faculté de Médecine  
Département de Pharmacie



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
جامعة مولود معمري تيزي وزو  
كلية الطب

## MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

N°D'ORDRE :FM/DP/2019

Présenté et soutenu publiquement

Le 15 Juillet 2019

En vue de l'obtention du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

### Thème

**Contribution à l'étude phytochimique et de  
l'activité antimicrobienne de *Pulicaria odora* L.**

Réalisé par :

BELAL Saloua

BENAMEUR Katia

CHALABI Sabrina

### Membres du jury :

DJERBOUA	Toufik	MAHU	UMMTO	Président de jury
BELABBES	Imen	MAHU	U Setif	Examinatrice
CHERIFI	Lynda	AH	CHUTO	Examinatrice
MERABET	Imen	AH	CHUTO	Examinatrice
MOKRANI	Belaid	MAHU	UMMTO	Encadreur

# Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail à ceux qui me sont chers,  
A la mémoire de mon père, qui nous a quitté l'année passée, et qui est toujours présent dans nos cœurs. J'aurais tant aimé avoir à mes côtés en ce moment, j'espère que, du monde qui est le sien maintenant, il apprécie cet humble geste, preuve de reconnaissance de sa petite fille qui a toujours prié pour lui. Que Dieu le tout puissant te garde dans son vaste paradis.*

*A ma chère mère*

*Aucune dédicace ne serait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de déployer depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jours et nuits pour mon éducation et mon bien être, toute cette abnégation dont tu as fait preuve afin que je devienne ce que je suis, je t'en serai éternellement reconnaissante. Que Dieu le tout puissant, te préserve et t'accorde une bonne santé, longue vie et bonheur.*

*A mon cher frère : Mohamed*

*A mes très chères sœurs : Nawal, Djamilia, Nadia, Ratiba, Samira « sousou » pour vous exprimer toute mon affection et ma tendresse.*

*A mes aimables petites nièces : Narimen, Chaima, Maria*

*A mes chers neveux : Fares, Hamza, Housseem, Abdou, Yassino et mon petit prince Rebouh  
A mes fidèles amies : Chanouza, Mina.*

*A mes oncles, en particulier Omar « Dada », Ibrahim, Hmidouch et Mustapha qui n'ont cessé de me soutenir et m'encourager durant mes études.*

*A mes cousines en particulier Ibtü, Chanez, Salima*

*Mes très chères collègues : Wissem, Katia, Rafia, Karima, Sabrina, Yasmine, Samia*

*Tous ceux qui m'ont encouragée pendant la durée de la réalisation de ce travail*

*Tout le personnel et tous mes collègues qui m'ont soutenue tout au long de mes études.*

*SALWA*

## *Dédicaces*

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut et tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, Le respect, la reconnaissance que j'éprouve en ce jour mémorable, je tiens à dédier ce travail à la meilleure maman au monde, pour tous tes sacrifices déployés pour que je puisse arriver à ce que je suis aujourd'hui, ton amour sans équivoque, ta tendresse et ton soutien indéfectible tout au long de mes études.*

*A mes chères sœurs : Kahina, Raïssa, Thinhinene, pour votre encouragement permanent et votre soutien moral.*

*A mes chers frères : Amazigh, Amar, Yennayer, pour votre appui et encouragement.*

*A mon adorable neveu : Lucien, ton sourire me donnait la force d'aller vers l'avant.*

*A mes beaux-frères : Hassan, Meziane, ainsi qu'à ma belle-sœur : Nassima.*

*A mon bien-aimé : Ali, pour ton amour, ta compréhension ainsi que ton soutien impérissable.*

*A mes collègues : Saloua et Sabrina.*

*A la mémoire de mon défunt père, tu étais, tu es, et tu resteras toujours dans mon cœur.*

*Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infaillible,*

*Merci d'être toujours là pour moi.*

*Katia*

## *Dédicace*

*Je dédie sincèrement cette fleur que j'accueillis du jardin de ma vie d'étude à mes tuteurs dans la vie, la source d'amour et le symbole de compassion : Mon cher père Ahmed et ma mignonne mère Lilia, que Dieu les protège ; je les remercie jusqu'à l'infini pour leurs soutiens, leurs encouragements, leurs patiences... et tous les mots ne suffisent pour exprimer ma gratitude. Je suis très reconnaissante et j'espère qu'ils seront fiers de moi.*

*Je dédie du profond de mon cœur :*

*A ceux qui ont attendu ma réussite.*

*A mes gracieux chers frères, qui m'aident, m'encouragent incessamment : Adel, Mohamed, Sidahmed et Ayoub.*

*A celles qui envoient la risette à mon âme, qui ont partagé le goût de vie et m'ont donné de l'espoir, aux fleurs de ma vie, mes chères sœurs : Ryma et Bouchra.*

*A mon cher grand-père Ali, Que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que vous n'avez cessé de formuler dans vos prières. Que Dieu vous préserve santé et longue vie.*

*A mon fiancé : YOUSFI M, qui reçoit à travers ce travail tout mon respect ma gratitude et ma profonde reconnaissance pour son soutien, ses conseils, sa présence dans ma vie.*

*A celles qui m'ont toujours soutenue avec un grand cœur, mes idéales sœurs avant amies : Meriem, Saloua.*

*A mes collègues de ma promotion, particulièrement : Fatma, Samia, Katia, Saloua Ph.*

*A tous ceux qui m'ont aidée de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*Sabrina*

# Remerciements

*Nos louanges et nos gratitude intarissables vont en premier lieu à Dieu, le tout puissant qui nous a prodigué le courage, la volonté et la patience afin d'accomplir ce présent travail.*

*Nous tenons à remercier tout particulièrement notre encadreur D<sup>r</sup>. MOKRANI B. maître assistant à l'U.M.M.T.C, pour avoir accepté de nous encadrer et de nous suivre tout au long de la réalisation de ce mémoire, et par son caractère de noblesse incomparable, pour sa générosité et la grande patience dont il a su faire preuve malgré ses charges académiques et professionnelles.*

*Nos profonds remerciements à D<sup>r</sup>. DJERBOUA J  
Nous sommes honorées que vous ayez accepté d'être président du jury de ce modeste travail, vos compétences scientifiques seront d'une valeur inestimable pour enrichir ce travail. Nous vous en remercions très chaleureusement.*

*Nos remerciements s'adressent également à D<sup>r</sup> CHERIFI L. Médecin assistante en microbiologie, chef de service du laboratoire de microbiologie au CHU unité « Nedir Mohamed » Fizi ouzou, par son esprit scientifique de haut niveau, sa gentillesse de lire et corriger nos questions et nous orienter vers le plus approprié.*

*A toutes les équipes des laboratoires de Microbiologie, Parasitologie du CHU et de Chimie thérapeutique de la faculté de médecine, pour nous avoir accueillies à bras ouverts dans leurs laboratoires. Nous exprimons ici toutes nos reconnaissances, en particulier à D<sup>r</sup> LOUADI, D<sup>r</sup> HADJOU M., D<sup>r</sup> SEKLAOUJ, M<sup>me</sup> BOUAMRA, M<sup>me</sup> LAALAM, M<sup>lle</sup> DJEDDID.*

*Sans oublier les équipes des laboratoires de Microbiologie, d'Hémobiologie de la faculté de Médecine ainsi que la pharmacie du CHU en particulier D<sup>r</sup> AJJR pour l'aide apportée.*

*Nos vives reconnaissances à toutes personnes qui nous ont aidées de près ou de loin pour réaliser ce travail.*



## TABLE DES MATIERES

---

### LISTE DES ABRÉVIATIONS

### LISTE DES TABLEAUX

### LISTE DES FIGURES

### LISTE DES ANNEXES

INTRODUCTION .....	01
--------------------	----

## PARTIE THEORIQUE

### CHAPITRE I : LES HUILES ESSENTIELLES GÉNÉRALITÉS

1. Définitions .....	05
2. Répartition dans le règne végétal.....	05
3. Localisation et rôle des huiles essentielles chez les végétaux .....	06
4. Composition chimique et voies de synthèse des huiles essentielles .....	07
4.1. Composition chimique des huiles essentielles.....	07
4.2. Les voies de synthèse des huiles essentielles .....	08
5. Facteurs influençant la composition chimique des huiles essentielles .....	09
6. Procédés d'extraction des huiles essentielles.....	10
7. Rendement d'extraction des HE .....	14
8. Caractérisation des Huiles essentielles .....	14
8.1. Caractéristiques organoleptiques .....	14
8.2. Caractéristiques physicochimiques .....	15
8.3. Analyse des composés chimiques de l'huile essentielle.....	18
9. Conservation et étiquetage des huiles essentielles .....	21
10. Intérêt des huiles essentielles .....	22
11. Pharmacologie et toxicité des huiles essentielles .....	24
11.1. Pharmacocinétique .....	24
11.2. Toxicité des huiles essentielles .....	28
11.3 Mesures toxicologique.....	29
11.4. Précaution d'utilisation .....	32
12. La réglementation en Algérie.....	32

### CHAPITRE II : Métabolites secondaires

1. Les alcaloïdes .....	35
2. Saponosides.....	35
3. Les polyphénols .....	36
4. Les flavonoïdes .....	36
5. Tanins.....	36
6. Mucilages végétaux .....	37

## TABLE DES MATIERES

---

7. Les terpènes .....	37
8. Anthracénosides .....	37

### CHAPITRE III : ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

1. Définitions .....	39
2. Mode d'action antimicrobien .....	39
2.1. Bactéries .....	39
2.2. Champignons .....	42
2.3. Virus .....	42
2.4. Activité antiparasitaire des HEs .....	44
2.5. Activité antiseptique .....	44
3. Facteurs déterminants le degré d'activité des huiles essentielles .....	44

### CHAPITRE IV : MATERIEL ET METHODE

1. Matériel d'étude.....	48
1.1. Matériel biologique .....	48
1.2. Matériel non biologique .....	49
2. Méthode.....	51
2.1. Etude botanique (Monographie de la plante).....	52
2.1.1. Description morphologique (organographie) .....	52
2.1.2. Etude histo-anatomique .....	52
2.2. Etude phytochimique des feuilles .....	55
2.3. Préparation des différents extraits de la plante .....	59
2.3.1. Extraction de l'huile essentielle des feuilles sèches de <i>Pulicaria. odora</i> ...	59
2.3.2. Extrait brute des feuilles fraîches .....	60
2.3.3. Extrait brut des racines .....	60
2.3.4. Extrait hydro-méthanolique.....	61
2.3.5. Extrait méthanolique .....	62
2.4. Evaluation qualitative de l'activité antimicrobienne des différents extraits et de l'HE de <i>P. odora</i> .....	62
2.4.1. Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits .....	65
2.4.2. L'évaluation de l'activité antifongique .....	66
2.4.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de <i>P. odora</i> (Aromatogramme).....	67

## TABLE DES MATIERES

---

### CHAPITRE V : Résultats et Discussion

<b>1. Etude botanique (Monographie de la plante) .....</b>	<b>70</b>
<b>1.1. Description morphologique (organographie) .....</b>	<b>70</b>
1.1.1. Appareil végétatif (port, racine, tige, feuilles).....	70
1.1.2. Appareil reproducteur (étude florale) .....	70
<b>1.2. Etude histo-anatomique .....</b>	<b>74</b>
a. Etude de la coupe transversale de la racine.....	74
b. Etude de la coupe transversale de la tige .....	78
c. Etude de la coupe transversale de la feuille. ....	81
<b>1.3. Conclusion systématique (clé d'identification) .....</b>	<b>85</b>
<b>1.4. Classification .....</b>	<b>86</b>
<b>1.5. Noms vernaculaires .....</b>	<b>87</b>
<b>1.6. Répartition géographique .....</b>	<b>87</b>
<b>1.7. Usages traditionnels.....</b>	<b>87</b>
<b>2. Etude Phytochimique .....</b>	<b>88</b>
<b>3. Préparation des différents extraits de la plante <i>Pulicaria odora</i>.....</b>	<b>90</b>
3.1. 3.1. Extraction de l'huile essentielle .....	90
3.2. 3.2. Extraits alcooliques .....	91
<b>4. Activité antimicrobienne des différents extraits et de l'HE de <i>P. odora</i> .....</b>	<b>91</b>
4.1. Activité antibactérienne .....	92
4.2. Activité antifongique.....	94
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>99</b>

### ANNEXES

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

**C °** : degré Celsius

**µl** : microlitre

**µm** : micromètre

**AFNOR** : Agence Française de Normalisation

**ANSM**: Agence Nationale de Sécurité des Médicaments

**APG III**: AngiospermPhylogeny Group III

**ATB** : antibiotique

**ATCC**:American Type Culture Collection

**CHU** : Centre Hospitalo-Universitaire

**cm** : centimètre

**CMI** : concentration minimale inhibitrice.

**DL50** : dose létale 50

**DMSO**:diméthylsulfoxyde

**EBF** : extrait brut des feuilles

**EBR** : extrait brut des racines

**EHMF** : extrait hydrométhanolique des feuilles

**EMF** : extrait méthanolique des feuilles

**g** : gramme

**G** : grossissement

**h** : heure

**HEs** : huiles essentielles

**Kg** : kilogramme

**l** : litre

**L** : Linné

**MF** : Mac Farland

**mg**:milligramme

**MH** : Muller Hinton

**min** :minute

**mm**:millimètre

**ORL** :Oto-rhino-laryngologie

**R%** : Rendement

**Rchb** : Heinrich Gottlieb Reichenbach

**T-** :témoin négatif

**T+** : témoin positif

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

**UFC** : Unité Faisant Colonie

**UMMTO** : Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou

**A. niger** : *Aspergillus niger*

**C. albicans** : *Candida albicans*

**E. coli** : *Escherichia coli*

**K. pneumoniae** : *Klebsiella pneumoniae*

**P. aeruginosa** : *Pseudomonas aeruginosa*

**S. aureus** : *Staphylococcus aureus*

**AK** : Amikacine

**AMP** : Ampicilline

**C** : Chloramphénicol

**CD** : Clindamycine

**CL** : Colistine

**CX** : Céfoxitine

**CZ** : Céfazoline

**DO** : Doxycycline

**EI** : Erythromycine

**FAD** : Acide fusidique

**KMN** : Kanamycine

**LE** : Lévofloxacine

**NA** : Acide nalidixique

**OX** : Oxacilline

**P** : Penicilline

**PIR** : Pipéracilline

**R** : Rifampicine

**RP** : Pristinamycine

**TEI** : Teicoplanine

**TOB** : Tobramycine

**VA** : Vancomycine

## LISTE DES TABLEAUX

---

<b>Tableau I</b> : Échelle de Hodge et Sterner .....	30
<b>Tableau II</b> : Exemples de NOAELs de quelques molécules aromatiques .....	31
<b>Tableau III</b> : Micro-organismes testés.....	49
<b>Tableau IV</b> : Milieux de culture utilisés .....	49
<b>Tableau V</b> : Colorants, réactifs, verreries et appareils utilisés.....	49
<b>Tableau VI</b> : Les antibiotiques testés sur les différentes souches bactériennes selon les recommandations du CLSI.....	50
<b>Tableau VII</b> : Les disques de témoins positifs et de témoins négatifs utilisés dans l'évaluation de l'activité antimicrobienne de la plante étudiée .....	51
<b>Tableau VIII</b> : Mise en évidence des saponosides .....	57
<b>Tableau IX</b> : Classification de <i>Pulicaria odora</i> selon Cronquist (1981).....	86
<b>Tableau X</b> : Classification de <i>Pulicaria odora</i> selon APG III (2009) .....	86
<b>Tableau XI</b> : Résultats du screening phytochimique .....	88
<b>Tableau XII</b> : Couleur et rendement des différents extraits de <i>Pulicaria odora</i> .....	91
<b>Tableau XIII</b> : Résultats du contrôle de qualité des antibiotiques sur les souches testées.....	91
<b>Tableau XVI</b> : Résultats de l'activité antibactérienne des différents extraits et de l'HE de <i>P. odora</i> .....	92

## LISTE DES FIGURES

---

<b>Figure 1</b> : Entraînement à la vapeur d'eau .....	11
<b>Figure 2</b> : Schéma de l'hydrodrodiffusion .....	12
<b>Figure 3</b> : Structure schématique d'une bactérie .....	40
<b>Figure 4</b> : Structure schématique d'un virus .....	43
<b>Figure 5</b> : Réalisation des coupes de <i>Pulicaria odora</i> .....	53
<b>Figure 6</b> : Technique de la double coloration.....	54
<b>Figure 7</b> : Coupes colorées conservées dans de l'eau .....	57
<b>Figure 8</b> : Clevenger en schéma .....	59
<b>Figure 9</b> : Photo originale du Clevenger prise au laboratoire de botanique médicale, 2019. ...	59
<b>Figure 10</b> : Préparation de l'EBF .....	60
<b>Figure 11</b> : Préparation de l'EBR.....	61
<b>Figure 12</b> : Préparation de l'Ehmf des feuilles de <i>P. odora</i> .....	61
<b>Figure 13</b> : Préparation des cultures jeunes .....	63
<b>Figure 14</b> : Préparation de la suspension microbienne .....	63
<b>Figure 15</b> : Ensemencement de la suspension microbienne.....	64
<b>Figure 16</b> : Dépôt des disques d'antibiotiques pour le contrôle de qualité.....	65
<b>Figure 17</b> : Dépôt des disques et les extraits de <i>P. odora</i> .....	66
<b>Figure 17'</b> : Préparation de l'antifongigramme pour <i>Candida albicans</i> .....	67
<b>Figure 18</b> : <i>Pulicaria odora</i> dans son biotope.....	72
<b>Figure 19</b> : Différentes parties de l'appareil végétatif de <i>Pulicaria odora</i> .....	72
<b>Figure 20</b> : Inflorescence de <i>Pulicaria odora</i> .....	73
<b>Figure 21</b> : Fleur de <i>Pulicaria odora</i> observée à la loupe .....	73
<b>Figure 22</b> : Photographie d'une coupe transversale de la racine de <i>Pulicaria odora</i> observée au microscope optique (G.10×4).....	76
<b>Figure 23</b> : Détails de l'écorce observée au G. 10x10 .....	76
<b>Figure 24</b> : Détails du cylindre central observé au G. 10x10 .....	76
<b>Figure 25</b> : Détails d'une poche sécrétrice observée au G 10×40.....	76
<b>Figure 26</b> : Schéma en figurés conventionnels d'une coupe transversale de racine de <i>Pulicaria odora</i> .....	77
<b>Figure 27</b> : Photographie d'une coupe transversale de tige de <i>Pulicaria odora</i> observée au microscope optique (G 10×4) .....	79
<b>Figure 28</b> : Détails de la tige observée au G 10x10 .....	79
<b>Figure 29</b> : Détails d'un poil sécréteur observé au G 10x40 .....	79

## LISTE DES FIGURES

---

<b>Figure 30</b> : Schéma en figurés conventionnels d'une coupe transversale de tige de <i>Pulicaria odora</i> .....	80
<b>Figure 31</b> : Coupe transversale de feuille de <i>Pulicaria odora</i> observée au microscope optique G. 10 x4 .....	83
<b>Figure 32</b> : Détails du limbe observé au G. 10 x10.....	83
<b>Figure 33</b> : Détails de la nervure principale observée au G. 10 x40 .....	83
<b>Figure 34</b> : Détails d'un poil sécréteur observé au G. 10 x40 .....	83
<b>Figure 35</b> : Schéma en figurés conventionnels d'une coupe transversale de la feuille de <i>Pulicaria dora</i> .....	84
<b>Figure 36</b> : Photographie de l'HE de <i>P. odora</i> .....	90
<b>Figure 37</b> : Représentation graphique des diamètres d'inhibition générés par l'EMF sur les souches testées.....	95
<b>Figure 38</b> : Résultat de l'EMF testé sur <i>P. aeruginosa</i> .....	95
<b>Figure 39</b> : Résultat de l'EMF testé sur <i>K. pneumoniae</i> .....	95
<b>Figure 40</b> : Résultat de l'EMF testé sur <i>E. coli</i> .....	96
<b>Figure 41</b> : Résultat de l'EMF testé sur <i>S. aureus</i> .....	96
<b>Figure 42</b> : Représentation graphique des diamètres d'inhibition générés par l'Ehmf sur les souches testées .....	96
<b>Figure 43</b> : Résultat de l'Ehmf testé sur <i>K. pneumoniae</i> .....	96
<b>Figure 44</b> : Résultat de l'Ehmf testé sur <i>E. coli</i> .....	96
<b>Figure 45</b> : Résultat de l'Ehmf testé sur <i>S. aureus</i> .....	97
<b>Figure 46</b> : Résultat de l'Ehmf testé sur <i>P. aeruginosa</i> .....	97
<b>Figure 47</b> : Résultat de l'EBR testé sur <i>K. pneumoniae</i> .....	97
<b>Figure 48</b> : Résultat de l'EBR testé sur <i>P. aeruginosa</i> .....	97
<b>Figure 49</b> : Résultat de l'EBF testé sur <i>P. aeruginosa</i> .....	97

# **INTRODUCTION**

# INTRODUCTION

---

L'augmentation de la fréquence des infections microbiennes au cours des dernières années ainsi que l'émergence des résistances aux antibiotiques et aux antifongiques de synthèse, posent à l'heure actuelle de très sérieux problèmes pour les scientifiques et les cliniciens. En effet, les maladies causées par les microorganismes sont de plus en plus difficiles à traiter par les médicaments existants, d'où la nécessité d'orienter la recherche vers de nouvelles molécules, entre autre vers les substances d'origine végétale.

Les plantes aromatiques sont considérées comme étant un réservoir inépuisable de composés bioactifs du fait de leurs richesses en composés phytochimiques ainsi que des huiles essentielles présentant un effet inhibiteur considérable vis-à-vis des bactéries, des champignons, des parasites et des virus. L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 80% de la population mondiale a recours aux préparations traditionnelles à base de plantes. [1]

Les Astéracées sont très distribuées dans la région méditerranéenne où elles sont généralement utilisées parfois comme aromates ou *épices* en cuisine ou alors comme des médicaments grâce à leurs richesses en métabolites secondaires. *Pulicaria* est un genre appartenant aux Astéracées.

*Pulicaria odora* est une espèce possédant des propriétés biologiques et médicinales très importantes telle que l'activité antibactérienne [2], antioxydante [3] et cicatrisante [4]. Dans certaines régions de la Kabylie, les feuilles de *Pulicaria odora* sont utilisées sous forme fraîche pour soigner des affections cutanées (plaies, brûlures, écorchures...) ou encore par voie interne pour soigner certaines pathologies digestives (ulcère gastrique, gastrite...).

Dans cette optique, et afin de contribuer à la valorisation de ladite plante (*Pulicaria odora*) provenant des régions d'*Ath Mendes* et *Ath Zmenzer* de la wilaya de Tizi-Ouzou, notre modeste travail a pour principaux objectifs l'évaluation de son pouvoir antibactérien et antifongique (de l'huile essentielle et de quelques extraits) et la mise en évidence des principaux groupes de métabolites qu'elle renferme.

D'autres objectifs secondaires sont visés : étude de la structure histo-anatomique de la plante avec localisation et identification d'éventuels tissus sécréteurs et évaluation de sa teneur en HE à travers la technique d'hydrodistillation.

## INTRODUCTION

---

Notre étude sera donc scindée en deux parties : une recherche bibliographique comprenant deux chapitres, où le premier donnera un aperçu sur les huiles essentielles et les autres principes actifs constituant une plante, tandis que le second sera consacré à l'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.

La partie pratique, quant à elle comprend une identification de l'espèce ; une étape importante et indispensable pour initier toute recherche scientifique sur les plantes médicinales et qui est basée sur la description botanique : morphologique et anatomique de l'échantillon végétal. Elle est suivie d'un screening phytochimique de la drogue (feuilles séchées), puis d'une préparation de quelques extraits (à savoir l'huile essentielle des feuilles obtenue par hydrodistillation, les extraits brut, méthanolique et hydrométhanolique) lesquels feront l'objet de l'étude du pouvoir antimicrobien effectuée sur quelques souches bactériennes et fongiques fréquentes en infectiologie et microbiologie humaines.

Les résultats obtenus des différentes étapes du travail sont présentés, analysés, discutés et comparés aux références issues d'une recherche bibliographiques (travaux antérieurs).

Enfin, une conclusion générale résumant l'ensemble des résultats obtenus et dégageant les principales perspectives.

# **PARTIE THEORIQUE**

# I. LES HUILES ESSENTIELLES GENERALITES



# LES HUILES ESSENTIELLES GÉNÉRALITÉS

---

## 1. Définitions

L'Agence nationale française de sécurité du médicament (ANSM) reprend, pour les huiles essentielles, la définition adoptée par la Commission de la pharmacopée européenne (CPE) : "Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition". [5]

Les HEs sont composées de molécules volatiles, majoritairement issues de la famille des terpénoïdes, et qui s'accumulent dans des glandes et tissus spécialisés des végétaux : cellules épidermiques des pétales chez les Rosaceae ou les Oleaceae, glandes épidermiques des Labiaceae, poches sécrétrices des Rutaceae ou canaux sécréteurs des Apiaceae (anciennement Umbelliferae). [6]

Actuellement, près de 3 000 huiles essentielles sont décrites, parmi lesquelles environ 300 présentent une importance commerciale dans le cadre d'applications pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires, agronomiques ou dans le domaine de la parfumerie. [7] [8]

## 2. Répartition dans le règne végétal

Les HEs n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs : il y aurait, selon Lawrence 17 500 espèces aromatiques. Les genres capables d'élaborer des constituants qui composent les huiles essentielles sont répartis dans un nombre limité de familles, exemple : Myrtacéae, Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Cupressaceae, Poaceae, Zingiberaceae, Piperaceae, etc.

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux :

- Des sommités fleuries (lavande, tubéreuse, camomille) ;
- Des racines ou rhizomes (vétiver, angélique, gingembre) ;
- Des écorces (orange, bergamote, cannelle) ;
- Du bois (bois de cèdre, de santal, bois de rose) ;
- Des fruits (toute-épice, anis, badiane) ;

# LES HUILES ESSENTIELLES GÉNÉRALITÉS

---

- Des graines (cardamomes, coriandre, fenouil, muscade) ;
- Des feuilles (eucalyptus, citronnelle, laurier noble).

Si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une HE, la composition de cette dernière peut varier selon sa localisation. Ainsi, dans le cas de l'oranger amer (*C. aurantium* L. ssp. *aurantium*, Rutaceae), le « zeste », c'est-à-dire le péricarpe frais du fruit, fournit l'HE d'organe amère ou « essence du curaçao », la fleur fournit « essence de Néroli » et l'hydrodistillation de la feuille, des ramilles et des petits fruits conduit à « essence de petit grain bigaradier ». La composition de ces trois HEs est différente.

Quantitativement, les teneurs en HE sont plutôt faibles. Assez souvent inférieures à 10 ml/kg. Des teneurs fortes comme celle du bouton floral de giroflier (150 ml/kg et plus dans la drogue sèche) sont exceptionnelles. [9]

### 3. Localisation et rôle des huiles essentielles chez les végétaux

La teneur des plantes en huiles essentielles est généralement faible, de l'ordre de 1 %. [10]

La synthèse et l'accumulation des HEs sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante : cellule à HEs des Lauraceae ou des zingiberaceae, poils sécréteurs des Lamiaceae, poches sécréteurs des Myrtaceae ou des Rutaceae, canaux sécréteurs des Apiaceae ou des Asteraceae. [9]

Les HEs permettent aux plantes de s'adapter à leurs environnements et à assurer leurs défenses, En effet, étant fixées au sol elles n'ont que les composés chimiques issus du métabolisme secondaire, stockés à l'endroit où ils seront le plus utile comme arme de défense contre les parasites et les déprédateurs, les plantes qui possèdent ces composés toxiques, qualifiés de phagodétendants ou d'inappétants, sont moins consommées. [11] D'une façon générale, les terpénoïdes jouent un rôle fondamental dans les interactions entre les organismes vivants, permettant par exemple à une plante d'attirer les pollinisateurs, les prédateurs, les parasitoïdes des herbivores venant l'attaquer. [12] [13]

# LES HUILES ESSENTIELLES GÉNÉRALITÉS

---

C'est en particulier ce dernier rôle qui donne toute son importance à une stratégie bio-inspirée de recherche de composés antifongiques, antibactériens ou bio-insecticides parmi les métabolites secondaires, et en particulier les huiles essentielles. [14]

## 4. Composition chimique et voies de synthèse des huiles essentielles

### 4.1. Composition chimique des huiles essentielles

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles révèle qu'il s'agit de mélanges complexes et variables de constituants appartenant exclusivement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : les terpénoïdes et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane. [15]

#### ❖ Les terpénoïdes

Le terme terpène rappelle la toute première extraction de ce type de composé dans l'essence de térébenthine. Dans le cas des huiles essentielles, seuls les terpènes les plus volatils, c'est à dire, ceux dont la masse moléculaire n'est pas élevée sont observés, ils répondent dans la plupart des cas à la formule générale  $(C_5H_8)_n$ .

Suivant les valeurs de  $n$ , on a les hémiterpènes ( $n=1$ ), les monoterpènes ( $n=2$ ), les sesquiterpènes ( $n=3$ ), les triterpènes ( $n=6$ ), les tétraterpènes ( $n=8$ ) et les polyterpènes.

Les constituants des huiles essentielles sont très variés, on y trouve en plus de terpènes : des hydrocarbures, des esters, des lactones, des aldéhydes, des alcools, des acides, des cétones, des phénols, des oxydes et autres. [15]

#### ❖ Les composés aromatiques

Contrairement aux dérivés terpéniques, les composés aromatiques sont moins fréquents dans les huiles essentielles, très souvent, il s'agit d'allyle et de propénylphénol. Ces composés aromatiques constituent un ensemble important car ils sont généralement responsables des caractères organoleptiques des huiles essentielles. Nous pouvons citer en exemple l'eugénol qui est responsable de l'odeur du clou du girofle. [15]

#### ❖ Les composés d'origines diverses

# LES HUILES ESSENTIELLES GÉNÉRALITÉS

---

Compte tenu de leur mode d'extraction, les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire, entraînés lors de l'hydro distillation. Ces produits peuvent être azotés ou soufrés. [15]

- ✓ Alcools : menthol, géraniol, linalol, ...
- ✓ Aldéhydes : géraniol, citronellal, ...
- ✓ Cétones : camphre, pipéritone, ...
- ✓ Phénols : thymol, carvacrol, ...
- ✓ Esters : acétate de géranyle, ...
- ✓ Acides : acide gérannique, ...
- ✓ Oxydes : 1,8-cinéole,...
- ✓ Phénylpropanoïdes : eugénol,...
- ✓ Autres : éthers, composés soufrés, composés azotés,...

## 4.2. Les voies de synthèse des huiles essentielles

La biosynthèse des huiles essentielles se fait suivant deux principales voies [16] :

### ❖ Voie des Terpenoïdes

Le matériau de base est l'IPP (isopentenylpyrophosphate), molécule à cinq atomes de carbones ayant une structure semi- alvéolaire, il est dérivé de l'AcétylCoA (carrefour important), lui-même issu du PEP (phosphoenolpyruvate) provenant directement du fructose.

La construction des squelettes hydrocarbonés a lieu de la même manière par la juxtaposition "tête à queue" d'unités isopréniques, unités penta-carbonés ramifiées assemblées via une enzyme, ainsi on trouve des squelettes hydrocarbonés à dix carbones (monoterpènes), puis à quinze carbones (sesquiterpènes) et plus rarement, à vingt carbones (diterpènes), le processus peut se poursuivre mais dans d'autres buts que la synthèse des essences.

### ❖ Voie des Phénylpropanoïdes

La synthèse des huiles essentielles par la voie des phénylpropanoïdes commence par un métabolite du fructose, le PEP (phosphoenolpyruvate), elle aboutit à un très grand nombre de

# LES HUILES ESSENTIELLES GÉNÉRALITÉS

---

substances aromatiques, via une série d'acides, dont l'acide shikimique (d'où son nom, voie shikimique) et l'acide cinnamique.

Les métabolites terminaux, importants en thérapeutique, sont les acides aromatiques suivants : acides salicylique, cinnamique et benzoïque et leurs esters dont le salicylate de méthyle, les cinnamates, les benzoates, certains phénols (eugénol) ainsi que les coumarines.

Quelques grandes familles chimiques de molécules non volatiles, comme les tannoïdes et les flavonoïdes, se trouvent incluses dans cette voie. [17]

## **5. Facteurs influençant la composition chimique des huiles essentielles**

Les compositions chimiques de nombreuses huiles essentielles ont été décrites. Elles varient en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte. [18, 19,20]

La composition chimique des huiles essentielles pourra fortement varier selon la plante productrice de l'essence, des facteurs environnementaux (altitude, ensoleillement, température, humidité, ...), le mode d'extraction, le savoir-faire de manipulateur.

### **Les chémotypes**

La connaissance des chémotypes d'une huile essentielle et leur comportement est fondamentale car elle permet d'envisager l'activité pharmacologique, de prévoir aussi la pharmacocinétique et la biodisponibilité.

Pour une même espèce botanique, la composition chimique de l'huile essentielle n'est pas immuable. Les huiles essentielles sont élaborées par les plantes aromatiques au sein des cellules sécrétrices. Leur élaboration est totalement tributaire du rayonnement solaire en l'absence duquel le rendement en produits aromatiques et leur nature sont affectés. En sa présence, et tout particulièrement en fonction de la présence de tel ou tel rayonnement, les types de composants pourront varier considérablement au sein d'une même espèce. Par exemple, le basilic cultivé en pleine lumière à Madagascar a un taux de chavicol de 57% alors que la même plante cultivée à l'abri de la lumière en contient 74%. [21]

# LES HUILES ESSENTIELLES GÉNÉRALITÉS

---

Cette variabilité peut être influencée également par la composition du sol et la position géographique ; le *Lippiamutiflora* récoltée au Togo a révélé les chémotypes à citral, à thymol (acétate de thymyle), à para-cymène, à 1 -8 cinéole. [22]

## 6. Procédés d'extraction des huiles essentielles

Il existe trois méthodes pour extraire les huiles essentielles. Les principales sont basées sur l'hydrodistillation, distillation à vapeur saturée, hydrodiffusion. Le choix de la méthode la mieux adaptée se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, des caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire, de l'usage de l'extrait et de l'arôme de départ au cours de l'extraction. [23]

### 6.1. Hydrodistillation

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée, c'est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle, ainsi que pour le contrôle de qualité. [24]

Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène (distillation des mélanges binaires non miscibles) qui consiste à immerger la matière première végétale dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel rempli d'eau placé sur une source de chaleur, le tout est ensuite porté à l'ébullition. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité. Au laboratoire, le système équipé d'une cohobe généralement utilisé pour l'extraction des huiles essentielles est le Clevenger. Les eaux aromatiques ainsi prélevées sont ensuite recyclées dans l'hydrodistillateur afin de maintenir le rapport plante/eau à son niveau initial.

La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. [25]

# LES HUILES ESSENTIELLES GÉNÉRALITÉS

---

## 6.2. Entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. [25]

Le principe consiste à faire passer la vapeur d'eau à travers la plante à une température adéquate pour détruire les cellules végétales, libérer les molécules aromatiques et les entraîner dans un serpentin de refroidissement. Là, les vapeurs refroidies retournent à l'état liquide formant un mélange «eau + huile essentielle». Recueillies dans un essencier, l'huile essentielle et l'eau florale se séparent par simple différence de densité. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile. [27]

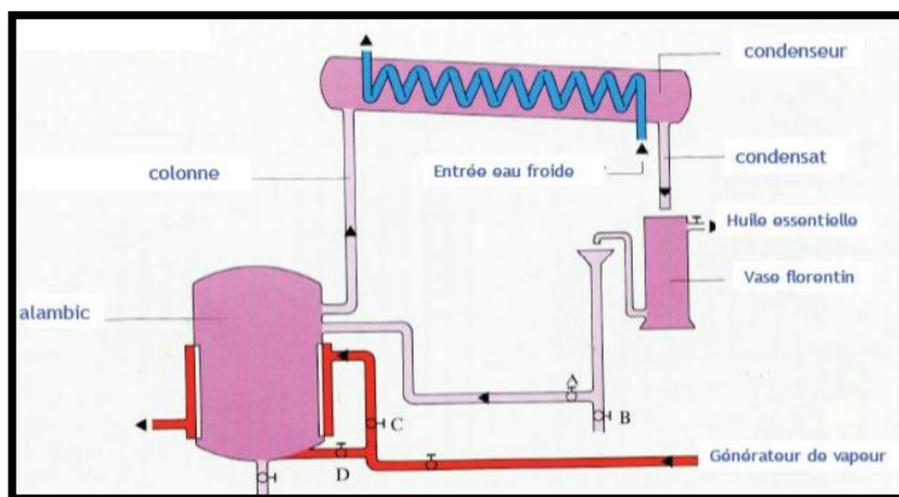


Figure 1 : Entraînement à la vapeur d'eau. [28]

## 6.3. Hydrodiffusion

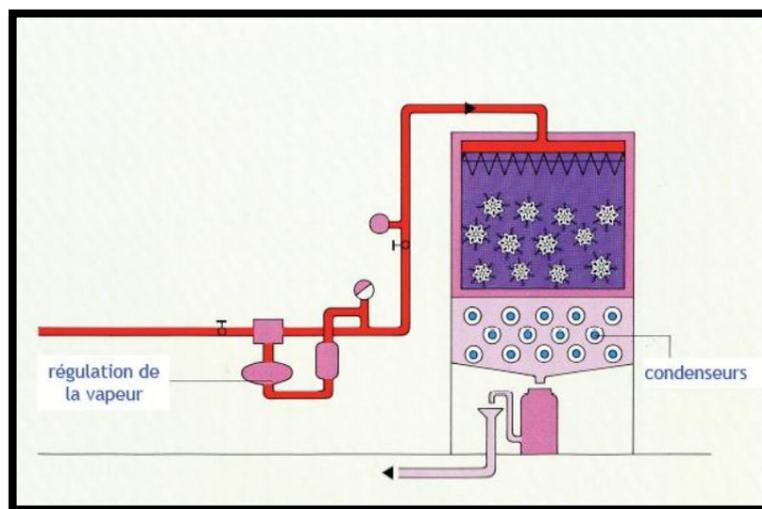
L'hydrodiffusion est une variante de distillation à vapeur saturée. Cette technique relativement récente et particulière. Elle exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale.

L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils, et de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau. De plus,

## LES HUILES ESSENTIELLES GÉNÉRALITÉS

---

l'hydrodiffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur. [25]



**Figure 2 :** Schéma de l'hydrodiffusion. [28]

### 6.4. La distillation à vapeur saturée

Dans cette variante, la matière végétale n'est pas en contact avec l'eau. La vapeur d'eau est injectée au travers de la masse végétale disposée sur des plaques perforées. La distillation à vapeur saturée est la méthode la plus utilisée à l'heure actuelle dans l'industrie pour l'obtention des huiles essentielles à partir de plantes aromatiques ou médicinales. En général, elle est pratiquée à la pression atmosphérique ou à son voisinage et à 100°C, température d'ébullition d'eau. Son avantage est que les altérations de l'huile essentielle recueillie sont minimisées. [23]

### 6.5. Distillation sèche

La distillation « sèche », aussi appelée distillation destructive, est utilisée pour la séparation des produits chimiques liquides contenus dans des matériaux solides. [24]

Elle est réalisée, de préférence, sur le bois ou les écorces. Elle n'utilise pas l'eau ou la vapeur d'eau ajoutée au végétal, contrairement à l'entraînement par la vapeur ou l'hydrodistillation. La distillation sèche conduit à un distillat ayant souvent l'apparence d'un goudron (liquide visqueux noirâtre). Ce mode de distillation est très peu utilisé. Des critiques sur l'éventuelle

## LES HUILES ESSENTIELLES GÉNÉRALITÉS

---

cancérogénicité de ce goudron ont conduit les industriels à raffiner l'huile, par des distillations fractionnées, afin d'éliminer les produits toxiques. [27]

### 6.6. Expression à froid

Cette technique est utilisée pour extraire les huiles essentielles des agrumes de la famille des Rutacées (citron, orange, mandarine). C'est une méthode assez simple qui consiste à briser mécaniquement les poches à essence (souvent au niveau de l'écorce ou péricarpe du fruit) pour recueillir un mélange d'essences odorantes et d'eau. Dans le cas des agrumes, on parle d'essence et non d'huile essentielle car aucune modification chimique liée à des solvants ou à la vapeur n'a lieu (contrairement à l'hydrodistillation ou à l'extraction par solvants volatils où cette modification est possible). [27]

### 6.7. Extraction par solvant organique volatil

Cette technique est la plus pratiquée avec l'hydrodistillation. Elle consiste à épuiser la matière première de ses constituants odorants au moyen d'un solvant, puis à chasser celui-ci de l'extrait par évaporation sous vide. Il existe deux cas particuliers, les hydrolats (extraction par solvant en présence d'eau) et les alcoolats (extraction avec de l'éthanol dilué) pour lesquels on récupère les composés odorants conjointement avec le solvant lors de la distillation pratiquée pour éliminer l'eau présente dans les isolats. Le choix du solvant dépend de nombreux paramètres techniques et économiques, notamment : La sélectivité, la température d'ébullition, la miscibilité dans l'eau, la facilité de recyclage.

Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont surtout des hydrocarbures aliphatiques (hexane, éther de pétrole), des hydrocarbures aromatiques (toluène), des alcools ou des solvants carbonylés, et moins fréquemment des hydrocarbures halogénés (dichlorométhane).

La méthode d'extraction mise en œuvre dépend aussi de la nature de la matière première végétale. On peut extraire soit à chaud, c'est-à-dire à température proche de la température d'ébullition du solvant, soit à température ambiante. On travaille, en général, dans un extracteur statique afin d'éviter la dégradation de la matrice végétale et la solubilisation concomitante de composés indésirables. [29,30]

# LES HUILES ESSENTIELLES GÉNÉRALITÉS

---

Les solutions aromatiques obtenues sont évaporées sous vide, à Température la plus basse possible afin d'éviter la dégradation des molécules odorantes. Le solvant organique extrait également des composés indésirables, en particulier des matières grasses (huile, cires, etc...). Un traitement secondaire est donc nécessaire pour séparer les fractions aromatique et grasse. Il consiste à entraîner, à l'éthanol, les composés aromatiques. Cette opération est pratiquée à basse température (environ 20°C). On obtient, après évaporation de l'éthanol, un produit appelé «absolue» qui comporte la majorité des composés volatils. [31]

## 7. Rendement d'extraction des HE

Selon l'AFNOR 2000, le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse de l'HE obtenue et la masse du matériel végétal utilisé pour cent [27]. Son calcul se fait comme suit :

$$Rdt \% = (m_{HE} / m_{végétal}) \times 100$$

**Rdt %** : rendement en HE en g pour 100 g de la matière végétale ;

**m<sub>HE</sub>** : masse d'HE récupérée en grammes (g) ;

**m<sub>végétal</sub>** : masse du matériel végétal utilisé en grammes (g)

Le rendement peut aussi être exprimé en ml/kg de matière végétale.

Quantitativement, les teneurs en HE des végétaux sont plutôt faible, assez souvent inférieures à 10 ml /kg. Des teneurs fortes comme celle du bouton floral de girofliers (150 ml /kg et plus dans la plante sèche) sont exceptionnelles. Déterminer la bonne période de récolte est primordial en termes de rendement et de qualité. Ainsi, il ne faut pas négliger l'impact du climat sur le rendement et la qualité, mais aussi celui de la zone géographique ainsi que la période de récolte et le moment du traitement. [33]

## 8. Caractérisation des Huiles essentielles

### 8.1. Caractéristiques organoleptiques

- a) **Aspect** : liquides à température ambiante, rarement visqueuses, certaines cristallisent partiellement ou totalement à plus faible température (anis, menthe des champs, thym saturéioïde), de même qu'à basse température (eucalyptus), elles

# LES HUILES ESSENTIELLES GÉNÉRALITÉS

---

n'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes, limpides et ou mobiles. [34, 35,36]

**b) Couleur :** rarement colorées, lorsqu'elles viennent d'être préparées, leurs teintes est généralement comprise dans une gamme allant de l'incolore, à jaune pâle. Il existe toutefois quelques exceptions, comme l'huile essentielle de camomille romaine (*Anthemis nobilis*) qui possède une coloration bleu clair due à la présence du chamazulène. [41]

**c) Odeur :** agréable, aromatique. [38,39]

**d) Saveur :** douce, piquante, caractéristique, fruitée, fraîche, etc. [36]

Les caractéristiques organoleptiques étaient autrefois les seules indications permettant d'évaluer la qualité d'une huile essentielle, mais comme ces propriétés ne donnent que des informations très limitées sur ces essences, il est nécessaire de faire appel à d'autres techniques de caractérisation plus précises. La qualité d'une huile essentielle et sa valeur commerciale sont définies par des normes admises et portant sur les indices physicochimiques. [40]

## 8.2. Caractéristiques physicochimiques

### 8.2.1. Propriétés physiques

Les HEs sont très inflammables, facilement altérables et oxydables.

#### A- Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire est caractéristique des molécules énantiomères (chirales). Lorsqu'une molécule présentant une isomérisation optique est traversée par un faisceau de lumière polarisée, le plan de polarisation est dévié, soit vers la gauche (molécule lévogyre) c'est un pouvoir rotatoire négatif, soit vers la droite (molécule dextrogyre) c'est un pouvoir rotatoire positif. Cet angle de rotation du plan de polarisation est exprimé en degré (°) et il peut être mesuré avec un polarimètre. Il dépend de plusieurs facteurs (la température de l'échantillon analysé, la longueur d'onde de la lumière, l'intervalle de concentration, la nature du solvant). [26]

# LES HUILES ESSENTIELLES GÉNÉRALITÉS

---

Les HE sont douées de pouvoir rotatoire puisque constituées de molécules asymétriques. [41]

## **B- Densité relative**

La densité relative est le rapport de la masse d'un volume de liquide par la masse du même volume d'eau. La densité n'a pas d'unité, elle varie avec la température. [26]

La plupart des HE ont une densité inférieure à celle de l'eau ; il existe, cependant, des exceptions telles que les huiles essentielles de Safran, de Girofle et de Cannelle dont la densité est supérieure à celle de l'eau. [42]

On peut mesurer la densité relative à 20°C avec un pycnomètre. [43]

## **C- Indice de réfraction**

L'indice de réfraction d'un milieu est le rapport entre la vitesse de la lumière dans le vide et dans la substance à analyser, c'est une grandeur sans dimension.

L'indice de réfraction est largement supérieur à 1 pour les HE. L'appareil le plus couramment utilisé pour mesurer l'indice de réfraction est le réfractomètre d'Abbe. [26]

## **D- Solubilité des huiles essentielles**

Les HEs, de caractère lipophile, sont solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques courants et elles sont peu solubles dans l'eau. [26,41]

## **E- Point d'ébullition**

Le point d'ébullition des HE est relativement haut (150°C-300°C) cependant, elles sont extrêmement volatiles à température ambiante. [36]

## **F- Point de solidification**

Le point de solidification (cristallisation) correspond à la température maximale observée lorsque le liquide se solidifie au cours du refroidissement. Cette température de cristallisation augmente en fonction de la teneur en 1,8-cinéole qui est dosé par des techniques chromatographiques. [26]

## 8.2.2. Propriétés chimiques

### a. Indice d'Acide (IA)

L'indice d'acide d'une huile essentielle est défini comme étant le nombre de milligrammes de potasse (KOH) nécessaire pour la neutralisation des acides libres contenus dans un gramme d'huile essentielle. [40]

Selon la réaction suivante :



### b. Indice d'ester

L'indice d'ester (IE) est le nombre de mg de potasse nécessaire pour saponifier les esters présents dans 1,00 g d'huile essentielle, d'après la réaction :



### c. Indice de Saponification

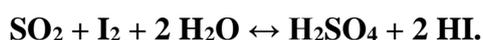
L'indice de saponification (IS) est le nombre de mg de potasse nécessaire pour neutraliser les acides libres et saponifier les esters présents dans 1,00 g d'huile essentielle. [26]

### d. Indice de peroxyde

L'indice de peroxyde (IP) est le nombre qui exprime, en milliéquivalents d'oxygène actif, la quantité de peroxyde contenue, dans 1 000 g de l'huile essentielle. [26]

### e. Eau dans les huiles essentielles

Dans la méthode par entraînement à la vapeur, l'HE, non soluble dans l'eau est séparée de l'hydrolat par décantation. De ce fait, de faibles quantités d'eau peuvent être présentes dans les HE, surtout si ces dernières sont constituées de composants très polaires. Pour la recherche de ces traces d'eau on fait appel à la méthode de Karl Fisher qui est très efficace pour doser la teneur en eau des HE [23], elle se base sur l'oxydation du dioxyde de soufre en présence d'eau :



Or, cette équation est réversible, l'eau n'est donc pas consommée entièrement et son dosage ne peut pas être quantitatif. Pour remédier à cela, il faut ajouter une base : l'imidazole. Celle-ci va capter toute l'acidité formée lors de la réaction (HI et H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) et permettre de déplacer la réaction vers la droite, cette dernière pourra ainsi être utilisée quantitativement. [44]

### **f. Recherche des esters étrangers, huiles grasses et huiles essentielles résinifiées**

Cette recherche est réalisée dans le cas de suspicion de fraudes. Les esters étrangers peuvent s'hydrolyser à chaud avec la potasse alcoolique ; les huiles grasses et les huiles essentielles résinifiées ne sont pas volatilisables au bout de 24 heures. [26]

### **8.3. Analyse des composés chimiques de l'huile essentielle**

Il existe différentes méthodes analytiques pour le contrôle des huiles essentielles, on peut citer : la spectroscopie infrarouge, la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), la chromatographie sur couche mince et la chromatographie en phase gazeuse (CPG ou GC) qui est la méthode la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles. [45]

#### **8.3.1. Spectroscopie infrarouge**

La spectroscopie infrarouge (IR – Infra Red) est une des techniques les plus efficaces et les plus communes pour l'identification des groupements fonctionnels caractéristiques des molécules organiques et inorganiques à partir de leurs propriétés vibrationnelles. En effet, le rayonnement infrarouge excite des modes de vibration spécifiques des liaisons chimiques (déformation, élongation). La comparaison entre le rayonnement incident et le rayonnement transmis à travers l'échantillon suffit par conséquent à déterminer les principales fonctions chimiques présentes dans un échantillon. [46]

Les nouvelles techniques telles que la spectroscopie infrarouge à réflexion atténuée ou la NIR-FT remnan spectroscopy, ouvrent une nouvelle voie d'analyse des huiles essentielles puisque l'on peut identifier les composants des huiles essentielles en utilisant des références spectrographiques de composés chimiques purs. L'avantage certain de ces techniques réside dans la facilité de contrôle de qualité des HE avec en prime la possibilité de quantifier et analyser les composants d'une HE *in-situ*, c'est-à-dire sur du matériel végétal vivant (sans isolation préalable). [47]

## 8.3.2. Contrôle chromatographique des huiles essentielles

Les techniques chromatographiques peuvent être définies comme regroupant les techniques de séparation d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification qui impliquent un transfert de matière entre des phases stationnaires et des phases mobiles. [46,48]

### 1) Chromatographie sur couche mince (CCM)

Il s'agit de la première et plus utilisée des techniques chromatographiques, elle fournit des informations simples quant aux caractères physicochimiques des composants d'un mélange. De nombreuses pharmacopées préconisent l'utilisation de cette technique vue sa simplicité pour la caractérisation des huiles essentielles en test de routine.

Cependant cette technique est à indiquer pour la détermination rapide des différentes voies et/ou familles chimiques présentes dans une huile essentielle donnée. [47]

#### Principe

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption, la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant. Après la migration, le repérage des molécules s'effectue soit par ultra-violet (UV), soit par un colorant spécifique ou encore par exposition aux vapeurs d'iode. La distance de migration des composés est ensuite mesurée et comparée à celle du front de la phase mobile, ceci permet de définir la référence frontale  $R_f$  caractéristique de chaque composé. [42]

### 2) Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Il s'agit d'une technique de chimie analytique qui permet de séparer des composés volatils ou volatilisables sans dégradation (non-thermolabiles) soit par partage soit par adsorption, C'est une migration différentielle des constituants du mélange à analyser à travers un substrat choisi.

Son pouvoir de séparation dépasse celui de toutes les autres techniques, du moins pour les huiles essentielles. [47]

## Principe

La phase mobile est alors un gaz (hélium, azote, argon ou hydrogène), appelé gaz vecteur qui balaie en permanence la colonne. Cette dernière placée dans un four thermostaté, est un tube de faible section enroulé sur lui-même et contenant la phase stationnaire. Un grand choix des détecteurs permet l'analyse sélective et parfois l'identification de mélange très complexe comme dans le cas des huiles essentielles. Si la phase stationnaire est un liquide non ou peu volatil, possédant des propriétés de solvant vis à vis des composés à séparer, on parle de chromatographie gaz-liquide ou chromatographie de partage ; si la phase stationnaire est un solide adsorbant (silice, alumine,), c'est la chromatographie gaz- solide ou chromatographie d'adsorption. [23]

### 3) Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La chromatographie en phase liquide a permis de réaliser des analyses qui n'étaient auparavant pas possible avec les techniques sur couche mince ou en phase gazeuse. [48]

## Principe

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique.

Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme. [48]

# LES HUILES ESSENTIELLES GÉNÉRALITÉS

---

## 4) Couplage chromatographique en phase gazeuse/spectrométrie de masse (CPG/SM)

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse (CPG-MS) est une technique d'analyse qui possède plusieurs atouts :

-La chromatographie en phase gazeuse permet de séparer avec une très bonne résolution les constituants des mélanges tels que les huiles essentielles.

-Le spectromètre de masse associée permet d'obtenir le spectre de masse de chacun des constituants et donc de les identifier.

-La chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse possèdent des limites de sensibilité voisines. Leur association permet de disposer d'un outil analytique très performant. L'identification de produits est réalisable pour des quantités de l'ordre du nanogramme, la détection par fragmentométrie est possible jusqu'au picogramme. [47]

### Principe

Le principe de cette méthode consiste à transférer par le gaz vecteur (phase mobile) les composés séparés par chromatographie en phase gazeuse dans le spectromètre de masse au niveau duquel, ils vont être fragmentés en ions de masse variables dont la séparation sera en fonction de leur masse. La comparaison informatique du spectre d'un pic inconnu avec une ou plusieurs bibliothèques de référence permet son identification à condition que la similitude des spectres, inconnus et référence, soit suffisante et que les indices de rétention soient identiques, dans des conditions opératoires comparables. [42]

## 9. Conservation et étiquetage des huiles essentielles

### 9.1. Conservation des huiles essentielles

A cause de leur évaporation rapide, leur sensibilité à l'air et à la lumière, les huiles essentielles doivent être conservées dans des flacons opaques en acier ou en verre et fermés hermétiquement. [49]

### 9.2. Etiquetage

Selon les différentes législations, l'étiquetage des HEs doit comporter les informations suivantes :

# LES HUILES ESSENTIELLES GÉNÉRALITÉS

---

- Le nom scientifique de la matière première végétale utilisée, ainsi que le nom vernaculaire pour une meilleure identification ;
- La partie de la plante utilisée ;
- Le nom de l'huile essentielle et/ou le chémotype ;
- La méthode de production ;
- Les symboles et indications de danger équivalant à la classification ;
- Mentions : HE 100% pure, Tenir hors de la portée des enfants ;
- La quantité de remplissage lorsqu'il s'agit de substances et de préparations accessibles au grand public ;
- La désignation chimique des substances dangereuses s'il s'agit d'une préparation (mélange d'huiles essentielles), qui doit être conforme à une nomenclature internationale reconnue ;
- Numéro de lot, date de production et date de péremption ;
- Nom, adresse et numéro de téléphone du fournisseur. [38,50]

## 10. Intérêt des huiles essentielles

En raison de leurs diverses propriétés, les HEs 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.

### 10.1. Intérêt physiologique des huiles essentielles pour la plante

Le rôle biologique des HEs dans l'écologie est évident, par leur odeur, elles interviennent dans la pollinisation ; ainsi, elles jouent un rôle attractif ou répulsif vis-à-vis des prédateurs (herbivores, insectes...). [51]

Elles peuvent paralyser les muscles masticateurs des agresseurs par les propriétés toxiques et inappétentes des substances qu'elles contiennent. [52]

Elles protègent les cultures en inhibant la multiplication des bactéries et des champignons ; Elles empêchent la dessiccation de la plante (perte d'eau) par évaporation excessive et protègent la plante contre la lumière soit par diminution ou concentration ;

Par ailleurs leurs composés interviennent dans les réactions d'oxydoréduction, comme donneurs d'hydrogène. [53]

# LES HUILES ESSENTIELLES GÉNÉRALITÉS

---

## **10.2. Intérêt des huiles essentielles en aromathérapie**

L'aromathérapie est une forme de médecine alternative dans laquelle les HEs ont une grande importance car elles induisent de nombreux effets curatifs. Ainsi elles s'utilisent de plus en plus dans diverses spécialités médicales telles que : la podologie, l'acupuncture, la masso-kinésithérapie, l'ostéopathie, la rhumatologie ainsi que dans l'esthétique. [54]

## **10.3. Intérêt des huiles essentielles en agro-alimentaire**

En vertu de leurs propriétés antiseptiques et aromatisantes, les HEs sont employées quotidiennement dans les préparations culinaires (ail, laurier, thym,).

Elles sont également très prisées en liquoristerie (boissons anisées, kummel) et en confiserie (bonbons, chocolat,). Leur pouvoir antioxydant leur permet de conserver les aliments en évitant les moisissures, conservation du smen par exemple par le thym et le romarin. [55, 56,57]

## **10.4. Intérêt des huiles essentielles en cosmétologie et parfumerie**

Les HEs sont recherchées dans l'industrie des parfums et des cosmétiques en raison de leurs propriétés odoriférantes ; l'industrie de la parfumerie consomme d'importants tonnages d'essences (60%) en particulier celles de rose, de jasmin, de violette, de verveine, ...

Les HEs sont aussi consommées en cosmétologie pour parfumer les produits cosmétiques : les dentifrices, les shampoings, les crèmes solaires, les rouges à lèvres, les savons, etc... [58]

Les produits d'hygiène, détergents et lessives par exemple, consomment eux aussi beaucoup d'HEs pour masquer les odeurs (souvent peu agréables) des produits purs.

## **10.5. Intérêt des huiles essentielles en pharmacie**

Les essences issues des plantes sont utilisées en grande partie dans la préparation d'infusion (menthe, verveine, thym,) et sous la forme de préparations galéniques plus de 40% de médicaments sont à base de composants actifs de plantes ; par exemple gastralgine est un digestif anti-acide qui se compose d'HE de carvi. [59]

# LES HUILES ESSENTIELLES GÉNÉRALITÉS

---

De même, elles permettent par leurs propriétés aromatisantes de masquer l'odeur désagréable de médicaments absorbés par voie orale ; Aussi beaucoup de médicaments vendus en pharmacie sont à base d'HE comme par exemple les collyres, les crèmes, les élixirs. [60]

## 11. Pharmacologie et toxicité des huiles essentielles

### 11.1. Pharmacocinétique

Les huiles essentielles étant par définition des produits de composition complexe, les études de pharmacocinétique sont peu nombreuses ; ce sont souvent quelques composés isolés qui ont été étudiés. Généralement ; l'action d'une huile essentielle est réduite à celle du ou des composés principaux alors que l'on admet que même les molécules présentes sous forme de traces participent aux propriétés de celle-ci.

On peut toutefois décrire les règles générales régissant la cinétique d'absorption des huiles essentielles :

#### 11.1.1. Absorption

Le choix de la voie d'administration a une influence importante sur la biodisponibilité d'une HE ;

La biodisponibilité est définie comme étant la fraction de la dose administrée qui atteint la circulation sanguine sous forme inchangée ; Elle dépend :

- De la substance administrée
- Du mode d'administration
- Du sujet

Le passage de molécules dans l'organisme est principalement réalisé par diffusion passive ; Les caractéristiques de la diffusion passive : sans énergie ; non saturable ; non spécifique et fonction d'un gradient allant de la zone la plus concentrée vers la moins concentrée.

##### 11.1.1.1. La voie cutanée

La voie cutanée est certainement celle la plus couramment utilisée en thérapeutique aromatique de par la praticité de son mode d'utilisation ; Elle constitue en effet une très bonne voie d'administration pour une activité topique, mais aussi pour des indications plus

# LES HUILES ESSENTIELLES GÉNÉRALITÉS

---

systémiques ; Il convient de prêter attention à une possible toxicité systémique, bien qu'elle soit rare.

L'absorption cutanée est un phénomène impliquant 2 étapes :

1. Une phase de pénétration qui se réalise de manière passive, soit par passage au niveau des espaces intercellulaires, soit directement au travers des cellules de la couche cornée, agissant comme une barrière lipophile. Ce passage peut aussi se produire au niveau des follicules pileux pour les substances lipophiles. [61]
2. Une phase de résorption par la circulation sanguine ou lymphatique après accumulation des molécules aromatiques dans le *stratum corneum*

## ❖ Facteurs influençant l'absorption

- L'épaisseur du derme est en toute logique un facteur majeur influençant l'absorption des composés aromatiques ; la paume des mains ou la plante des pieds sont ainsi des zones de perméabilité faible tandis que les zones de plis (poignets, coudes, aisselles) permettent une meilleure pénétration des molécules aromatiques ; cependant ; à épaisseurs de peau comparables ; on observe des différences d'absorption significatives entre certains composés.
- Les caractéristiques physico-chimiques des molécules ; la couche cornée dotée d'une structure hydrolipidique laisse ainsi mieux passer les molécules amphiphiles ; ce qui est d'ailleurs le cas de la plupart des molécules contenues dans les huiles essentielles à l'exception des hydrocarbures terpéniques.
- Le poids moléculaire des substances aromatiques : plus il est faible, la pénétration est meilleure ;
- La température améliore la pénétration ;
- La circulation cutanée : la vasodilatation des capillaires favorise l'absorption (on comprend mieux alors que l'administration d'huiles essentielles en massage augmente sa pénétration en stimulant la circulation sanguine et en augmentant localement la température par friction) ;
- L'état de la peau : une brèche dans la barrière cutanée (plaie, brûlure) augmente l'absorption ;
- L'hydratation augmente aussi l'absorption ;
- L'âge est en fin un facteur limitant. [62]

### 11.1.1.2. Voie respiratoire

Cette voie est d'un grand intérêt dans le traitement des affections ORL. [63]

## LES HUILES ESSENTIELLES GÉNÉRALITÉS

---

Cependant en raison de l'excellente diffusion des HEs ; on peut également appliquer cette voie pour d'autres pathologies ; deux méthodes sont utilisées pour cette voie : l'inhalation et l'aérosolisation ; il convient de préciser que cette seconde méthode nécessite l'utilisation d'un appareillage adapté constitué d'une source d'air comprimé et d'un pulvérisateur dispersant le liquide), cette bonne absorption nécessite donc une grande prudence pour éviter d'éventuels effets indésirables.

### 11.1.1.3. Voie orale

La voie orale est considérée comme plus pratique pour les patients, elle permet en outre au thérapeute de se montrer plus précis en matière de dosage ; L'utilisation de cette voie implique la mise en contact des huiles essentielles avec de nombreuses zones du tractus digestif. Dans le cas d'une administration d'huile essentielle en gouttes, pures ou diluées ; la muqueuse buccale est déjà mise à contribution pour l'absorption de l'HE. Sa paroi est en effet particulièrement fine et sa vascularisation très importante ; notamment sous la langue dont le réseau capillaire rejoint la veine jugulaire externe ; l'absorption se poursuit ensuite au niveau des parois stomacales et intestinales. [64]

### 11.1.2 Distribution

La distribution des composés formant les huiles essentielles est très peu évoquée dans la littérature et les études sur ce sujet très rares. [65]

De façon générale la distribution tissulaire d'une substance dépend de certains facteurs

- Les caractéristiques physicochimiques de la substance aromatique ;

Les molécules liposolubles ont une forte affinité pour les organes riches en lipides comme le foie ou le cerveau dans lesquels elles se fixeront rapidement ; elles seront à l'inverse ; distribuées plus lentement mais avec une affinité importante dans le tissu adipeux ; faisant de ce dernier le site de stockage privilégié des molécules aromatiques sous forme inchangée ;

- La fraction libre de la substance présente dans le sang : plus celle-ci est élevée ; meilleur sera le passage de la molécule dans les autres compartiments.
- La liaison aux protéines plasmatiques ; de nombreuses protéines plasmatiques peuvent fixer en effet les molécules en circulation dans le sang ; notamment l'albumine qui est la plus représentée des protéines plasmatiques ; l' $\alpha$  1-glycoprotéine acide ; les globulines ; et les cellules sanguines.

## LES HUILES ESSENTIELLES GÉNÉRALITÉS

---

- La variation du taux de protéines sériques (valeurs usuelles comprises entre 65 et 80 g/l) entraîne une variation de la fraction libre des molécules aromatiques

Autre critère important à prendre en considération : la vascularisation ; Plus un organe recevra de sang ; plus il sera susceptible d'être touché par les molécules que ce dernier contient. ; sont ainsi principalement concernés : les reins, les poumons, le foie, le cerveau et les muscles squelettiques. [66]

- Accumulation dans les tissus ; les substances lipophiles comme les mono et les sesquiterpènes vont rapidement passer de la circulation sanguine vers les organes ; les muscles ; et après un certain temps seront stockées dans le tissu adipeux, de fait ; une administration de doses répétées peut entraîner une toxicité par accumulation. [67]

La faible vascularisation du tissu adipeux ralentit en effet les échanges, les substances aromatiques pouvant être stockées sur de longues périodes, elles seront par contre plus rapidement libérées dans la circulation générale à la faveur d'une diminution de la masse grasseuse, ce qui peut arriver lors d'une dénutrition et conduire à une intoxication.

### 11.1.3 Métabolisme

Une fois absorbées, les molécules aromatiques vont subir des biotransformations dont le but final est de rendre ces substances plus hydrophiles et accélérer ainsi leur élimination au niveau rénal. Si la plupart des organes sont capables de métaboliser les xénobiotiques, l'organe majeur du métabolisme reste le foie. Suivent les reins, la muqueuse intestinale, les poumons... De nombreuses réactions de biotransformation sont possibles selon la molécule envisagée.

En effet chaque molécule peut conduire par plusieurs chaînes de réactions à des métabolites différents ; il n'existe pas de métabolite final commun à toutes les substances exogènes, les réactions de biotransformation sont divisées en 2 phases :

- Les réactions de phase I qui permettent de rendre la molécule plus hydrophile ; en lui adjoignant des groupements polaires ou en faisant apparaître des fonctions cachées ; on retrouve dans cette phase les réactions d'hydrolyse (les esters donneront ainsi des alcools et des acides carboxyliques), d'oxydation (qui entraîne l'addition d'atomes d'oxygène, d'azote ou de soufre) et de réduction.

## LES HUILES ESSENTIELLES GÉNÉRALITÉS

---

Les réactions d'oxydation sont principalement assurées par un groupe d'enzymes appelées les Cytochromes P450, présents en quantité élevée dans les microsomes au niveau hépatique ; Il en existe une grande variété ;

- Les réactions de phase II sont dites de conjugaison ; les substances métabolisées vont être fixées sur des molécules endogènes très polaires ce qui va rendre l'ensemble suffisamment hydrophile pour pouvoir être éliminé ; ces molécules, au nombre desquelles figurent l'acide glucuronique, la glycine et le sulfate donneront respectivement des réactions de glucuroconjugaison, de glycoconjugaison et de sulfoconjugaison. [68]

### 11.1.4. Elimination

L'élimination des substances exogènes se fait principalement par les reins, le foie, les poumons et la peau ; mais on retient surtout la part importante que représentent les reins dans cette fonction.

L'élimination est aussi caractérisée par le temps mis pour épurer ces substances ; on utilise alors la notion de demi-vie ; elle définit en effet le temps nécessaire pour que la moitié d'un composant étudié soit éliminé.

On peut citer pour exemple de demi-vie :

- Le 1,8 cinéole inhalé :  $T_{1/2} = 2,95$  h chez la femme et 0,5 h chez l'homme. Selon l'étude, cet écart serait dû à la différence de tissu adipeux entre l'homme et la femme. [69]
- Il est ainsi possible de conclure que l'élimination des composés aromatiques est rapide et principalement rénale en dépit d'une importante affinité pour les tissus adipeux.

### 11.2. Toxicité des huiles essentielles

Les HEs sont des substances puissantes et très actives. Elles représentent une source inépuisable de remèdes naturels. Néanmoins, il est important de souligner que l'automédication fréquente et abusive surtout en ce qui concerne le dosage, ainsi que le mode d'application interne ou externe par les essences est nocive. Elle engendre de graves effets secondaires. Principalement chez les populations sensibles (enfants, femmes enceintes et allaitantes, personnes âgées ou allergiques) [70]. Parmi ces effets, citons :

## LES HUILES ESSENTIELLES GÉNÉRALITÉS

---

- Des allergisants : les molécules les plus souvent mises en causes sont des lactones sesquiterpéniques contenues par exemple dans le laurier noble (*Laurusnobilis*), ainsi que l'isoeugénol contenu dans l'HE de clous de girofle (*Syzygium aromaticum*) ;
- Hypersensibilisants, photosensibilisants ; dus aux furocoumarines, et aux pyrocomarines ; cet effet est principalement provoqué par les essences de citrus (bergamote, citron et pamplemousse), ainsi que par les HEs de cumin et de persil frisé, se manifeste plusieurs heures après l'exposition ;
- Neurotoxiques dus aux cétones, comme le camphre, la thuyone (Thuya, Absinthe, Sauge officinale) et la pinocamphone (Hysope) car elles possèdent une forte affinité pour les lipides cérébraux ;
- Néphrotoxiques dus aux terpènes majoritaires dans l'huile essentielle de Térébenthine et des rameaux de Genévrier ;
- Hépatotoxiques dus aux phénols comme l'eugénol (l'un des constituants du Thym) ; le thymol ou le carvacrol ;

Il a été démontré que le linalol, l'un des constituants d'une autre espèce de thym, est cytotoxique pour les cellules de la peau humaine. [71]

En règle générale, les huiles essentielles ont une toxicité aiguë par voie orale faible ou très faible : la majorité des huiles qui sont couramment utilisées ont une dose létale (DL50) comprise entre 2 et 5 g/kg (Anis, Eucalyptus, Girofle...etc.) ou, ce qui est le plus fréquent, supérieure à 5 g/kg (Camomille, Lavande...etc.). D'autres, une quinzaine, ont une DL50 comprise entre 1 et 2 g/kg : Basilic, Estragon, Hysope (1,5ml/kg). Les plus toxiques sont les huiles essentielles de Boldo (0,13 g/kg ; convulsions apparaissant dès 0,07 g/kg), de Chénopode (0,25 g/kg), de Thuya (0,83 g/kg), ainsi que l'essence de moutarde (0,34 g/kg). [09]

### 11.3. Mesures toxicologique

Paracelse écrivait :

*« Toutes les choses sont poisons ; et rien n'est sans poison ; seule la dose détermine ce qui n'est pas un poison. »*

Toute substance serait donc potentiellement toxique ; et cette toxicité serait liée à la dose administrée, la véracité de ce raisonnement dépend toutefois de la dose arrivant à un

## LES HUILES ESSENTIELLES GÉNÉRALITÉS

---

organe donné ; c'est-à-dire de son profil toxico-cinétique (devenir de la substance dans l'organisme) et toxico-dynamique (action sur sa cible) ; ce résultat est la combinaison de ;

-La dose et la concentration utilisées ;

-La voie d'administration ;

-Le mode d'administration ;

-La biodisponibilité ;

-Le mécanisme toxicologique ;

Pour évaluer le degré de toxicité d'une substance ; il convient enfin de prendre en considération les facteurs propres au sujet exposé comme l'âge ; le poids ; le sexe ; l'état physiologique...Ainsi que des facteurs environnementaux.

### A . DL50

Pour apprécier la capacité toxique d'une substance, et notamment lorsqu'il s'agit de toxicité aigüe, on utilise la valeur de DL50 (dose létale 50) ; cette valeur représente la dose pour laquelle la substance entraîne la moitié de décès dans un lot de sujets définis, plus cette valeur est élevée, plus la substance est sûre.

Inversement, une DL50 faible est le reflet d'un toxique puissant. En s'appuyant sur cette DL50, il sera possible de classer les molécules par niveau de toxicité. L'échelle de Hodge et Sterner permet ainsi de classer les toxicités en fonction des DL50orale mesurées chez le rat (Tableau1).

**Tableau I** : échelle de Hodge et Sterner. [72]

DL50 orale (rat)	Indice de toxicité
Jusqu'à 1mg /kg	1= extrêmement toxique
De 1 à 50 mg/kg	2= hautement toxique
De 50 à 500 mg/kg	3= modérément toxique
De 500 à 5000 mg/kg	4= légèrement toxique
De 5000 à 15000 mg /kg	5= presque pas toxique
Plus de 15000 mg/kg	6= relativement toxique

## LES HUILES ESSENTIELLES GÉNÉRALITÉS

---

Selon ce tableau, aucune huile essentielle n'appartient actuellement aux 2 premières catégories. Avec une DL50 de 130 mg/kg, l'huile essentielle de Boldo (*Peumus boldus*) est la première HE à y faire son entrée.

Il faut noter que des convulsions ont été observées chez le rat à une dose de 70 mg/kg. [72]

On trouve ensuite l'huile de Chénopode vermifuge (*Chenopodium ambrosioides*) avec une DL50 chez le rat de 255 mg/kg. Quatre cas d'intoxication mortelle chez l'enfant ayant été recensés, il a été établi que la dose fatale chez l'homme était comprise entre 10 et 40 mg/kg. [73]

C'est pourquoi cette huile essentielle est règlementée par le Code de la Santé publique français. Enfin, l'huile essentielle de Thuya (*Thuja occidentalis*) elle aussi règlementée, possède une DL50 de 830 mg/kg. [74]

### B. NOAEL

Une autre valeur est utilisée en toxicologie : la NOAEL (Non Observed Adverse Effect Level), cette valeur détermine la dose la plus élevée pour laquelle aucun effet nocif n'a été rencontré. La pulégone contenue en forte proportion (67,6 -86,7%) dans l'HE de Menthe pouliot (*Mentha pulegium*) possède par exemple une NOAEL de 20mg/kg ; cela signifie qu'en dessous de ce seuil, le risque d'observer un effet nocif est nul. Par comparaison ; la DL50 orale de la pulegone est de 500 mg/kg chez le rat. [74,75]

**Tableau II** : Exemple de NOAELs de quelques molécules aromatiques [74,75]

Molécules	NOAEL (5mg/kg)
Alpha-pinène	300
d-limonène	300
Bornéol	15
Citronellal	51
Cinnamaldéhyde	205
Camphre	75
Pulégone	20
Eucalyptol	32

# LES HUILES ESSENTIELLES GÉNÉRALITÉS

---

## 11.4. Précaution d'utilisation

- 1- Les HEs doivent toujours être diluées dans des huiles de porteuse comme l'huile d'amande ou d'olive, elles sont trop actives pour être appliquées sur la peau dans leur forme pure ;
- 2- Garder les HEs hors de la portée des enfants et des animaux de compagnie ;
- 3- N'employer pas les HEs sur des bébés ou des enfants ;
- 4- Toujours faire un test pour vérifier la sensibilité ou une réaction allergique avant l'utilisation d'un produit d'HEs sur la peau sensible ;
- 5- Ne pas placer les gouttes d'HEs dans les oreilles, les yeux, le nez ou la bouche ou dans autres ouvertures de corps ;
- 6- Cesser d'employer n'importe quelle HE si l'irritation ou la sensibilité de la peau se développe ;
- 7- Les HEs de bois de cèdre, la sauge sclarée, la basilique, la marjolaine, le clou de girofle, le fenouil, le jasmin, le genévrier, le citron, la myrrhe, la verveine citron ou romarin ne doivent pas être employées pendant la grossesse ;
- 8- Éviter d'employer les HEs d'agrumes photosensibles comme la bergamote, le citron, la mandarine, l'orange, la verveine citron et d'autres quand vous vous exposez au soleil ;
- 9- Ne jamais injecter l'HE par voies intramusculaire ou intra veineuse ;
- 10- L'HE de menthe poivrée ne doit jamais être appliquée sur une zone cutanée étendue (réaction glacée). [76]

## 12. La réglementation en Algérie

Selon sa composition et la présentation qui en est faite, une HE destinée au consommateur pourra être considérée comme un médicament, un cosmétique ou une denrée alimentaire. [77]

### ❖ Huiles essentielles et médicaments

Selon la définition du médicament, donné par l'article 170 de la loi no 85-05 du 16 février 1985 relative à la protection et à la promotion de la santé « On entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques ».

## LES HUILES ESSENTIELLES GÉNÉRALITÉS

---

Donc une HE qui présente une quelconque allégation thérapeutique sur son conditionnement sera considérée comme médicament ;

Le statut d'une HE est ainsi déterminé par son usage et par son activité pharmacologique. [78]

Les spécialités pharmaceutiques à base d'HE répondent à la définition des médicaments à base de plantes, par conséquent ils doivent être conformes à la réglementation régissant les médicaments et faire l'objet d'une demande d'autorisation de mise sur le marché ;

La loi no85-05 précise dans l'article 171 « sont également assimilés à des médicaments :

-Les produits d'hygiène et produits cosmétiques contenant des substances vénéneuses à des doses et concentrations supérieures à celles fixées par arrêté du ministre chargé de la santé ;

-Les produits diététiques ou destinés à l'alimentation animale qui renferment des substances non alimentaires leur conférant des propriétés sur la santé humaine ». [78]

En effet, un grand nombre de produits cosmétiques comprennent dans leur composition des huiles essentielles, il est donc nécessaire de prendre en considération les risques que ces substances peuvent faire courir à la santé des consommateurs ;

Les HEs utilisées comme aromatisants sont aussi susceptibles de présenter un danger sur la santé publique, leur usage doit donc être limité dans les denrées alimentaires ;

Par ailleurs, il existe des bonnes pratiques de fabrication des médicaments à base de plantes, elles regroupent les spécifications concernant les matières premières et les locaux (zones de stockage, zone de production), les instructions relatives au traitement des plantes (séchage, concassage, durée et température d'extraction ...) ainsi que le contrôle de la qualité. [79]

### ❖ Huiles essentielles et vente en l'état

Le code de la santé publique précise dans l'article 190 de la loi n°85-05 du 16 février 1985 relative à la protection et la promotion de la santé que « La production, le transport, l'importation, l'exportation, la détention, l'offre, la cession, l'acquisition, l'emploi de substances ou plantes vénéneuses stupéfiantes et non stupéfiantes ainsi que la culture de ces plantes, sont fixées par voie réglementaire ».

Par conséquent les HEs et les produits à base d'HE répondant aux critères cités ci-dessus entrent dans le champ de cette directive. [78]

## **II. METABOLITES SECONDAIRES**

# METABOLITES SECONDAIRES

---

## Etude phytochimique d'une plante

Les métabolites primaires interviennent dans différentes fonctions de la vie : la division cellulaire, la croissance, la respiration, stockage des substances et la reproduction. Ces métabolites s'opposent aux métabolites secondaires [94], qui sont des espèces spécifiques, qui ne sont pas directement impliquées dans le cycle de vie normal des plantes [95].

Ce sont des substances naturelles produites en faible quantité dans les plantes [96] et les microorganismes comme les bactéries et les champignons [97] dont le rôle écologique le plus important est lié à la fonction reproductrice qui garantit le succès évolutif de toutes les espèces vivantes, les pigments et les composés volatils de ces métabolites peuvent attirer les pollinisateurs et ainsi favoriser la dispersion des graines et la fécondation .[98]

### 1. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes forment l'un des groupes de principe actif les plus importants de la matière médicale. Ce sont des bases azotées généralement hétérocycliques, douées d'une activité pharmacodynamique marquée. La plus part se sont des poisons végétaux dotés d'une action spécifique.

Certain ont une action médicale sur l'appareil digestif tel que l'aescine d'*Aesculus hippocastanum* qui possède une action antihémorroïdaire. [99,100]

### 2. Saponosides

Principaux constituants de nombreuses plantes médicinales, sont fortement moussants et constituent d'excellents émulsifiants.

Leur principale propriété c'est de pouvoir transformer les matières fermes en matières fluides. Les saponines existent sous deux formes, les stéroïdes et les triterpénoïde, la structure chimique des stéroïdes est similaire à celle de nombreuses hormones humaines, alors que les saponines tritérpenoïdes, ont une activité hormonale moindre mais elles sont souvent expectorantes et favorisent la digestion, comme pour la glycyrrhizine de la réglisse. [101,102]

### 3. Les polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires synthétisés par l'ensemble des végétaux. Ils sont présents dans les plantes au niveau des tissus superficiels. [103]

Ils sont présents partout dans les racines, tiges, feuilles, fleurs de tous les végétaux. [104]

Les composés phénoliques regroupent plusieurs 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). Il existe de nombreuses classes de ces composés : acides phénoliques, flavonoïdes, coumarines et tanins. [105]

Un très grand nombre de données expérimentales plaide aujourd'hui en faveur de leur implication dans la prévention des maladies dégénératives telles que cancers, maladies cardiovasculaires, ostéoporose ou maladies inflammatoires. [106]

### 4. Les flavonoïdes

sont des pigments polyphénoliques très répandus au royaume des plantes, qui contribuent, entre autre, à colorer les fleurs et les fruits. Ils ont un important champ d'action.

Ils sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne circulation et le contrôle de processus de croissance. Certains, flavonoïdes ont aussi des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, antivirales, spasmolytiques, et des effets protecteurs sur le foie comme le Chardon Marie. [101,102]

### 5. Tanins

Les tanins sont des substances végétales qui se combinent avec les protéines pour donner des composés insolubles, il existe deux types principaux de tanins

- les tanins hydrolysables : qui produisent par hydrolyse un sucre et l'acide gallique, un acide phénol donnant par la suite du pyrogallol.
- les tanins non hydrolysables ou catéchiques, plus répandus que les premiers, produisant du pyrocatechol par distillation sèche. Les plantes renfermant les tanins sont astringente, ce qui peut être utilisé en cas de diarrhée et d'ulcère. [107]

### 6. Mucilages végétaux

Ce sont des polysaccharides que l'on trouve dans toutes les plantes, gonflent au contact de l'eau et produisent une substance visqueuse semblable à la gélatine. Ils exercent une action favorable contre les inflammations des muqueuses. Ils ne sont pas rapidement éliminés par la digestion et forment une couche de protection sur la paroi gastrique enflammée, permettent de lutter contre l'action nocive des acides gastriques et de combattre la constipation, parmi les nombreuses plantes qui contiennent ce principe actif on peut citer le lin. [101,102]

### 7. Les terpènes

Les terpènes (Terpénoïdes) sont des constituants habituels des cellules végétales impliqués ou non dans des fonctions métaboliques essentielles. Ce sont des métabolites secondaires résultant de la condensation d'unités isoprénique à 5 atomes de carbone. [108] Les terpènes sont présents chez tous les êtres vivants et possèdent des structures, des propriétés physiques et chimiques, et des activités biologiques très diverses. Plusieurs d'entre eux sont exploités à l'échelle industrielle (industrie des cosmétiques et des parfums, industrie agroalimentaire pour les arômes et les colorants alimentaires, etc....) [109]. Parmi eux, certains sont des substances odorantes, comme par exemple le menthol et le thymol, provenant d'huiles essentielles. D'après (ODILE-MEYER, 2004) [110].

Ils peuvent aussi jouer un rôle comme agent régulateur de la stabilité, la fluidité et la perméabilité des membranes cellulaires.

### 8. Anthracénosides

Dérivés phénoliques de l'anthracine à divers stades d'oxydation (anthrones, anthranons, anthraquinones). Selon la dose utilisée on observe un effet laxatif ou purgatif voir même drastique. Elles provoquent des contractions des parois intestinales et stimulent les évacuations, et rendent les selles plus liquides, facilitant ainsi le transit intestinal, ce sont des principaux constituants de Séné (*caacia senna*) par exemple. [111]

# **III. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE**

# ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

---

## 1. Définitions

### A. Microbe

Un microbe est une appellation qui englobe tous les micro-organismes, incluant les bactéries, les virus, les levures, les protozoaires; certaines micro-algues, des organismes unicellulaires mais aussi pluricellulaires de taille microscopique.

Le terme "microbe" résume tout être vivant, quel qu'il soit (animal, végétal, champignon, bactérie et virus ; procaryote et eucaryote) de taille microscopique. [80]

### B. Un antimicrobien

Le terme antimicrobien fait référence à un ensemble de composés, qui ont la capacité d'éliminer ou de réduire la prolifération de microbes. Ces derniers visés par un antimicrobien peuvent être des virus, des bactéries, des mycètes ou des parasites.

Les traitements antibiotiques font partie également des antimicrobiens, ils ciblent les champignons ou les bactéries ; les antimicrobiens peuvent être utilisés sur l'homme, les produits alimentaires, ou pour assainir un environnement. [81]

## 2. Mode d'action antimicrobien

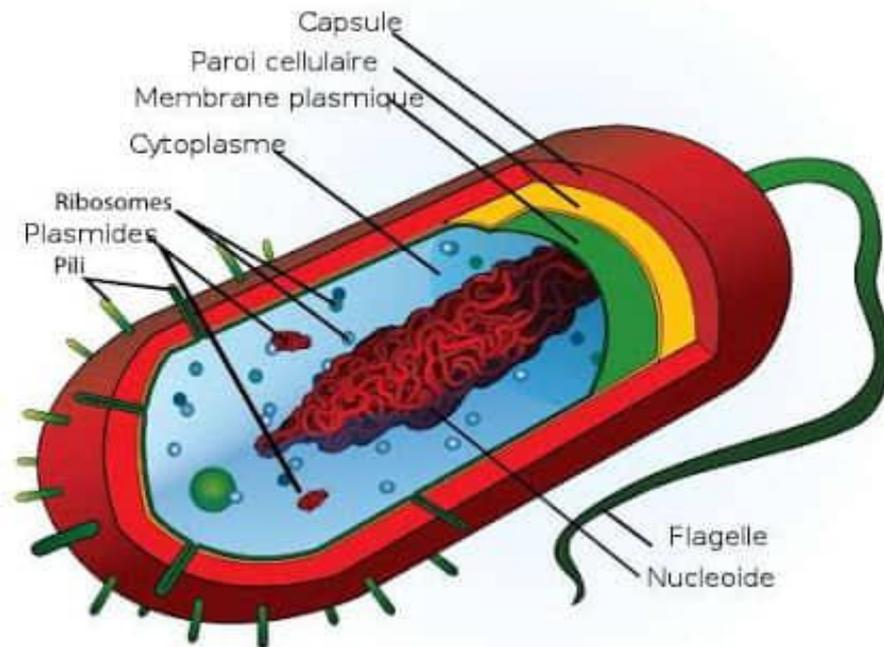
### 1.1. Bactéries

#### a. Définition

Les bactéries sont des organismes unicellulaires microscopiques se distinguant des autres protistes par un certain nombre de caractères cytophysiologiques essentiels : absence de mitochondries intra-cytoplasmiques, appareil nucléaire différent dans sa structure, sans membrane nucléaire et dans sa physiologie, sans mitose.

La cellule bactérienne comprend obligatoirement un cytoplasme avec des inclusions, un appareil nucléaire, une membrane de nature cytoplasmique dite membrane cytoplasmique, une paroi et, facultativement, une spore thermorésistante, des cils, une capsule, et dans certains groupes, des organites de reproduction tels que conidies, microcystes et corpuscules reproducteurs.

Les bactéries sphériques sont appelées « coccus », les bactéries cylindriques allongées sont des « bacilles », et les bactéries en spirales ou hélicoïdales sont des « spirilles ». [80]



**Figure 3 :** Structure schématique d'une bactérie. [82]

### **b. Activité antibactérienne des huiles essentielles**

La structure chimique des constituants des huiles essentielles conditionne leur mode précis d'action antibactérienne. Compte tenu du nombre de différents groupes de composés chimiques présents dans les huiles essentielles, il est probable que leur activité antibactérienne ne soit pas attribuée à un mécanisme spécifique mais qu'il y ait plusieurs cibles dans la cellule. [83]

Les principaux mécanismes et sites d'action des différents constituants des HEs sont :

- L'altération de la paroi cellulaire.
- La dégradation de la membrane cytoplasmique.
- L'altération des protéines membranaires.
- La fuite du contenu cellulaire.
- La coagulation du cytoplasme.
- L'épuisement de la force de mouvement des protons. [83]

Une caractéristique importante des huiles essentielles et de leurs constituants est leur caractère hydrophobe, ce qui leur permet de s'insérer dans les couches lipidiques de la membrane cellulaire bactérienne et des mitochondries, perturbant les structures et les rendant

## ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

---

plus perméables. La fuite des ions et autres constituants de la cellule peut alors se produire. [83]

Les molécules possédant le coefficient antibactérien le plus élevé sont, par ordre décroissant : le carvacrol, le thymol et l'eugénol ; elles appartiennent toutes les trois au groupe des phénols [84] contenus par exemple dans l'huile essentielle de clou de girofle [85]. Une molécule n'appartenant pas au groupe des phénols (mais apparentée : présence d'un noyau benzénique), l'aldéhyde cinnamique (HE du basilic), possède une activité anti-infectieuse comparable à celle des phénols.

Dans la hiérarchie anti-infectieuse, les alcools à dix atomes de carbone (ou monoterpénols) se situent immédiatement après les phénols ; leur liste est plus étendue : géraniol, linalol, thujanol et myrcénol ainsi que terpinéol, menthol et pipéritolsont les plus connus. [83]

Le groupe des aldéhydes manifeste également une certaine puissance antibactérienne : néral et géraniol (qui forment les citrals), citronnellal et cuminal, sont les plus souvent employés.

Le groupe des cétones présente un intérêt dans le traitement des états infectieux mucopurulents (action le plus souvent uniquement indirecte) : thujone, boméone (camphre), menthone.

En ce qui concerne les éthers, leur action antibactérienne est certaine mais irrégulière ; seul l'aromatogramme permet de prévoir avec certitude leur utilité dans des cas précis : estragole et anéthole, sont ici les molécules les plus représentatives de ce groupe. [83]

Les oxydes présentent en général des propriétés anti-infectieuses légères. Enfin, les terpènes peuvent être intéressants, mais leur utilité en ce domaine se révélera plutôt sous forme aérodiffusée (action antiseptique atmosphérique). Les autres groupes moléculaires ne présentent pas d'intérêt dans le cadre de la lutte antibactérienne. [83]

# ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

---

## 1.2. Champignons

### a. Définition

Les mycètes (champignons), véritables eucaryotes, constituent un règne (Fungi) distinct de celui des plantes et du règne animal. Les champignons assurent leur nutrition uniquement par absorption à partir du mycélium (réseau de filaments).

Les micromycètes vivent le plus souvent en saprophytes dans le milieu extérieur à partir de substrats organiques en décomposition. Certains champignons vivent en commensaux de l'Homme et font partie du microbiote normal intestinal, respiratoire et vaginal (par exemple, *Candida sp.*). La plupart des mycètes sont des pathogènes opportunistes, profitant d'un affaiblissement de l'hôte pour provoquer une infection : ce sont, soit des champignons commensaux normalement présents chez l'Homme, soit des champignons présents dans l'environnement (moisissures) qui peuvent pénétrer dans l'organisme (par exemple, *Aspergillus*). D'autres mycètes (dermatophytes) se comportant en parasites obligatoires sont pathogènes quel que soit le statut immunitaire du patient.

On distingue trois types de mycètes : filamenteux, levuriformes et dimorphiques. [86]

### b. Activité antifongique des huiles essentielles

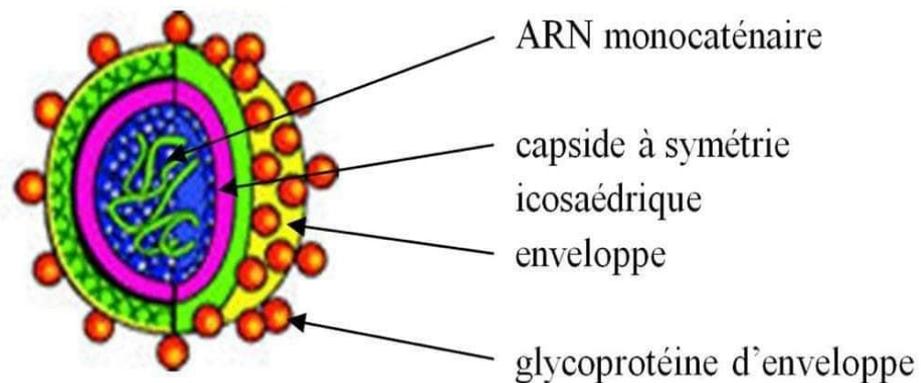
Les HEs sont actives sur les levures, elles agissent sur la biomasse et la production des pseudomyceliums, de même qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation, ainsi que la production de toxines chez les moisissures. [87]

Les huiles essentielles de cannelle, de clou de girofle ou de Niaouli sont des antifongiques. [85]

## 1.3. Virus

### a. Définition d'un virus

Un virus est une particule microscopique infectieuse qui ne peut se répliquer qu'en pénétrant dans une cellule et en utilisant sa machinerie cellulaire. Les virus qui infectent les bactéries sont les bactériophages. Il existe des virus qui infectent des animaux et d'autres, des végétaux. S'ils provoquent des maladies, les virus peuvent être considérés comme des germes pathogènes. [88]



**Figure 4 :** Structure schématique d'un virus. [89]

### **b. Activité antivirale**

Aujourd'hui, les huiles essentielles sont largement étudiées dans les centres de recherches du monde entier : il n'y a pratiquement pas une université qui n'ait une unité consacrée à cette étude. Il apparaît désormais que les remèdes naturels les plus efficaces en cas d'infection virale, sont les huiles essentielles. Certaines d'entre elles possèdent en effet de puissants effets virucides car elles sont extrêmement réactives. Cette vertu impose qu'elles soient maniées avec précaution et parcimonie. [90]

Les virus sont assez sensibles aux molécules aromatiques des huiles essentielles (phénol et monoterpénol), ce qui leur confère la capacité de combattre certaines pathologies virales. Les HE arrêtent le développement des virus et facilitent l'élimination du mucus tout en stimulant le système immunitaire. Plus d'une dizaine d'huiles essentielles possèdent des propriétés antivirales. [85,91]

Beaucoup aussi sont également antibactériennes, ce qui est particulièrement intéressant du fait que les surinfections bactériennes sont une des complications les plus fréquentes des infections virales. [90]

Ces huiles essentielles peuvent être utilisées en unitaires ou en association de plusieurs, ce qui améliore leur performance contre les virus. Il est aussi possible de combiner des huiles essentielles à action antivirale, anti-inflammatoire et antibactérienne afin d'agir aux différents niveaux de l'infections virales et prévenir une éventuelle surinfection. [90]

## 1.4. Activité antiparasitaire des HEs

Les molécules aromatiques possédant des phénols ont une action puissante contre les parasites. Les HE de géranium, de citronnelle, de menthe ou de lavande diffusées dans l'air sont efficaces pour protéger des attaques des insectes, en particulier des moustiques. Elles tiennent à distance tous ces petits indésirables (poux, mites...etc.), mais pour une protection plus sûre, il vaut mieux les appliquer directement sur le corps (elles devront alors être diluées) ou sur les vêtements (elles peuvent être utilisées pures). Certaines huiles essentielles sont reconnues pour leur action sur les vers intestinaux et le principal constituant ayant montré cette activité est l'ascaridole. [85, 91,92]

## 1.5. Activité antiseptique

Les propriétés antiseptiques et désinfectantes sont souvent retrouvées dans les huiles essentielles possédant des fonctions aldéhydes ou des terpènes comme l'huile essentielle d'*Eucalyptus radiata*. [85]

Les essences de sarriette, cannelle, thym, girofle, lavande et eucalyptus sont les plus antiseptiques. Certains de leurs composés tels que le citral, le géraniol, le linalol et le thymol sont en moyenne 7 à 10 fois plus antiseptiques que le phénol. [92]

## 2. Facteurs déterminants le degré d'activité des huiles essentielles

Plusieurs facteurs influencent la détermination de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles ou de leurs composants actifs, tels que la méthode d'évaluation ATB, le type et la structure moléculaire des composants actifs (composition chimique), la dose ajoutée, le type de microorganisme ciblé et leur éventuelle adaptation aux huiles essentielles. [93]

# **PARTIE PRATIQUE**

# **MATERIEL ET METHODES**

## MATERIEL ET METHODE

---

### ❖ Rappel des objectifs de l'étude

#### Objectif principal

Contribution à l'étude phytochimique et de l'activité antimicrobienne de *Pulicaria odora*.

#### Objectifs secondaires

- Identification de l'espèce par une description botanique : morphologique et anatomique de l'échantillon végétal ;
- Screening phytochimique de la drogue (feuilles séchées) ;
- Préparation de quelques extraits (à savoir l'huile essentielle des feuilles obtenue par hydrodistillation, les extraits bruts, méthanolique et hydrométhanolique) ;
- Etude du pouvoir antimicrobien effectué sur quelques souches bactériennes et fongiques.

### ❖ Type de l'étude

Il s'agit d'une étude descriptive prospective, réalisée sur la plante *Pulicaria odora* récoltée dans la wilaya de Tizi-Ouzou.

### ❖ Lieu de l'étude

L'identification botanique a été réalisée au sein du laboratoire de botanique médicale, Département de Pharmacie Faculté de médecine UMMTO.

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie et l'activité antifongique a été réalisée au niveau du laboratoire de parasitologie du CHU de Tizi-Ouzou.

### ❖ Durée de l'étude

L'étude a été réalisée durant la période allant du 27 février au 04 juillet 2019 (5 mois).

# MATERIEL ET METHODE

---

## 1. Matériel d'étude

### 1.1. Matériel biologique

#### 1.1.1 Matériel végétal

Les échantillons constitués de feuilles et de quelques racines de *Pulicaria odora* sont récoltés durant les mois d'Avril, Mai et Juin 2019, à partir des régions d'*Ath Zmenzer* et *Ath Mendes* de la wilaya de Tizi-Ouzou et sont acheminés frais au niveau du laboratoire de botanique médicale de l'UMMTO, puis traités pour servir de matériel végétal aux différents essais et manipulations. Des spécimens entiers et âgés avec appareil végétatif complet et inflorescences sont également cueillis pour identification et étude botanique.

#### 1.1.2 Micro-organismes

L'étude de l'activité antibactérienne des différents extraits et de l'huile essentielle de la plante *Pulicaria odora* a été réalisée au niveau du laboratoire de Microbiologie de CHU Tizi-Ouzou, sur quatre souches bactériennes dont trois bacilles à gram négatif qui sont : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et un cocci à gram positif qui est *Staphylococcus aureus*. (Voir tableau III)

Les deux souches (*Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*) que nous avons utilisées sont des souches de référence qui nous ont été fournies par le laboratoire de microbiologie de l'UMMTO, faculté de Biologie ;

Les deux autres souches (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) nous ont été fournies par le laboratoire de Microbiologie du CHU TO unité « Nedir Mohamed ».

L'étude de l'activité antifongique des différents extraits et de l'huile essentielle de la plante *Pulicaria odora* a été réalisée au niveau du laboratoire de Parasitologie de CHU Tizi Ouzou sur une souche de levure qui est *Candida albicans* et sur un champignon filamenteux qui est *Aspergillus niger*. Ces souches nous ont été fournies par le même laboratoire.

## MATERIEL ET METHODE

---

**Tableau III :** Micro-organismes testés.

Souches	Référence
<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC27853
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC4392
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC43300
<i>Candida albicans</i>	Souche clinique
<i>Aspergillus niger</i>	Souche clinique

### 1.2. Matériel non biologiques

#### 1.2.1 Milieux de culture

**Tableau IV :** Milieux de culture utilisés

Milieu utilisé		Utilisation
Liquide	BHIB(Brain Heart Infusion Broth)	Réactivation des souches bactériennes.
Solide	Gélose Nutritive (GN)	Isolement et l'entretien des souches bactériennes.
	Gélose Mueller- Hinton	Etude de l'activité antibactérienne.
	Sabouraud + chloramphénicole	Croissance des champignons et levures.

#### 1.2.2 Colorants, réactifs, verreries et appareils

**Tableau V :** Colorants, réactifs, verreries et appareils utilisés.

Colorants et réactifs	Verreries et autres matériels	Appareils
Vert de méthyle Rouge Congo Eau de javel (solution d'hypochlorite de sodium) ; Acide acétique ; Eau distillée ; Eau distillée stérile ;	Lame de rasoir ; Lames et lamelles ; Boîtes de Pétri stériles en plastique à 90 mm de diamètre ; Micropipettes réglable 50 µl ; Tubes à essai à vis stériles ;	Microscope photonique à l'objectif10, 40 et 100 ; Loupe Etuve Réfrigérateur ; Etuve 37°C Balance de précision ;

## MATERIEL ET METHODE

<p>Eau physiologique stérile ;          Acide sulfurique 10% ;          Iode ;          iodure de potassium KI ;          Carbonate de bismuth ;          HCL concentré ;          chlorure de mercure HgCL<sub>2</sub> ;          perchlorure ferrique FeCl<sub>3</sub> ;          acide acétique ;          formol 30% ;          acétate de sodium ;          FeCl<sub>3</sub> 10% ;          Ethanol ;          rognures de magnésium ;          eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ;          éther éthylique ;          NaOH ;          anhydride acétique ;          chloroforme ;          acide sulfurique concentré          H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ;          Méthanol ;          Vaseline ;          DMSO.</p>	<p>Tubes à essai ;          Pipettes Pasteur ;          Pipette graduée ;          Barreau magnétique ;          Pinces ;          Epindorff ;          Flacons en verre ambré ;          Cristallisoirs ;          Seringues de 5 ml, 10ml ;          Eprouvettes ;          Fioles jaugées 100 ml ;          Ampoule à décanter ;          Erlenmeyers ;          Entonnoirs ;          Béchers ;          Disques de papier Wattman          N°1 ;          Papier filtre ;          Papier aluminium ;          Ballon à fond rond ;          Tamis ;          Mortier et pilon ;          Tubes secs ;          Ecouvillons stériles ;          Anse de platine ;          Pied à coulisse.</p>	<p>Agitateur magnétique ;          Plaque chauffante          Bain- marie ;          Rotavapeur          Clevenger          Autoclave ;          Chauffe ballon          Bec-Bunsen ;</p>
--	--	---

### 1.2.3 Les disques d'antibiotiques et d'antifongiques utilisés

**Tableau VI** : Les antibiotiques testés sur les différentes souches bactériennes selon les recommandations du Protocole de standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale 7<sup>ème</sup> édition, 2014. [117]

Souche	<i>E.coli</i> / <i>K.pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<b>ATB</b>	CZ 30 µg NA 30 µg C 30 µg AMP 10 µg AK 30 µg	AMP 10 µg CX 30 µg C 30 µg P 10µ AK 30 µg TEI 30 µg VA 30 µg OF 5 µg DO 30 µg OX 5 µg	PIR 100 µg TOB 10 µg LE 5 µg AK 30 µg CL 10 µg

## MATERIEL ET METHODE

		CD 2 µg RP 15 µg E 15 µg R 5 µg FAD 10 µg KMN 30 µg	
--	--	--	--

**Tableau VII :** Les disques de témoins positifs et de témoins négatifs utilisés dans l'évaluation de l'activité antimicrobienne de la plante étudiée.

Souche	Témoin positif (T+)	Témoin négatif (T -)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Clindamycine 2µg	DMSO Disque stérile
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tobramycine 100 µg	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Chloramphénicol 30 µg	
<i>Escherichia coli</i>	Amikacine 30µg ; Acide nalidixique 30µg	
<i>Candida albicans</i>	Fluconazole	

Ces disques d'antibiotiques et d'antifongique nous ont été fournis successivement par les laboratoires de Microbiologie et de parasitologie du CHU de Tizi-Ouzou unité « Nedir Mohamed ».

### 2. Méthode

Le matériel végétal est bien nettoyé à l'eau douce afin d'éliminer toutes matières étrangères suspendues. Les racines ainsi qu'une partie des feuilles sont broyées fraîches pour l'obtention d'un extrait brut (sous forme de jus).

Quant aux feuilles restantes, elles ont été séchées à l'air libre et à l'abri de la lumière pendant une semaine puis à l'étuve à 40°C :

- Une partie de ces feuilles est coupée en petits morceaux, broyée ensuite tamisée afin d'obtenir une poudre de granulométrie inférieure à 200 µm. Cette dernière est conservée dans un flacon opaque pour servir à l'étude phytochimique et à la préparation de l'extrait alcoolique.
- Le reste des feuilles séchées (une grande partie) est destiné à l'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation.

## MATERIEL ET METHODE

---

Les extraits bruts et alcooliques ainsi que l'huile essentielle sont destinés à l'étude de l'activité antimicrobienne de la plante.

### 2.1. Etude botanique (Monographie de la plante)

Dans le but d'identification de notre plante, une étude botanique, morphologique et histo-anatomique a été réalisée sur les différents éléments constituant cette dernière (racines, tiges, feuilles et fleurs).

#### 2.1.1. Description morphologique (organographie)

L'étude morphologique est une étape clé indispensable à l'identification de l'espèce étudiée, basée sur la description externe de l'appareil végétatif et l'analyse florale. Elle a été faite au niveau du laboratoire de botanique comme suit :

- Type végétatif (port, racine, tige, feuilles).
- Inflorescence et caractères floraux. .
- Formule et diagramme floraux.

#### 2.1.2. Etude histo-anatomique

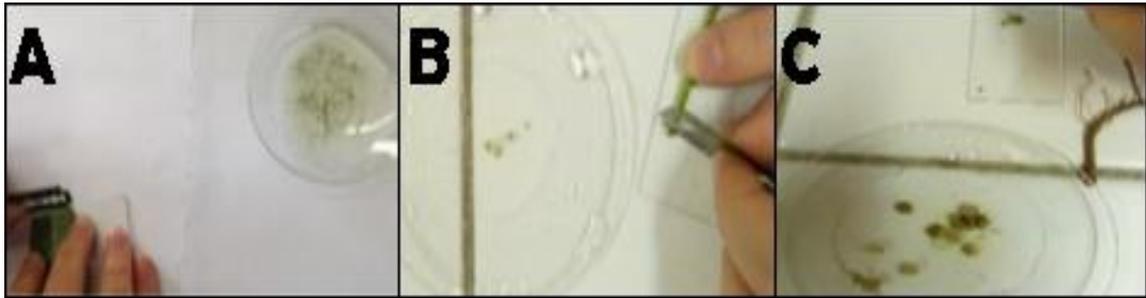
Elle permet de décrire la structure interne de la plante qui peut révéler des critères d'identification complémentaires à côté des critères organographiques externes et permet de déterminer la nature et la localisation des tissus sécrétant des huiles essentielles. Elle consiste à l'observation microscopique et la description des coupes anatomiques des différents organes (racine, tige, feuilles) préparées puis colorées par la technique de double coloration. L'anatomie de chaque organe est ensuite représentée par un schéma général en figurés conventionnels.

##### a. Réalisation des coupes

- Des coupes transversales aussi fines que possible ont été réalisées à l'aide d'une lame de rasoir au niveau de la tige, la feuille et la racine de *Pulicaria odora* (Figure 05).
- Des coupes longitudinales ont été réalisées ultérieurement au niveau de la racine afin de confirmer la nature de quelques tissus observés sur la coupe transversale.
- Les coupes préparées ont été déposées dans des microplines afin de les colorer.

## MATERIEL ET METHODE

---



**Figure 5** : Réalisation des coupes de *Pulicaria odora* au niveau de :

A- la feuille ; B- la tige ; C- la racine.

### **b. Technique de double coloration (rouge Congo – vert de méthyle)**

Les coupes préparées sont colorées afin de permettre une meilleure identification des structures. Cette technique est basée sur la coloration différentielle des parois cellulaires par le rouge Congo et/ou le vert de méthyle : les éléments celluloseux sont colorés en rose, les éléments lignifiés en vert et les structures subérifiées en marron.

### **Matériel**

- L'échantillon à étudier (tige, feuille, racine).
- Acide acétique.
- Hypochlorite de sodium (eau de Javel sans additif).
- Rouge Congo et vert de méthyle.

### **Protocole**

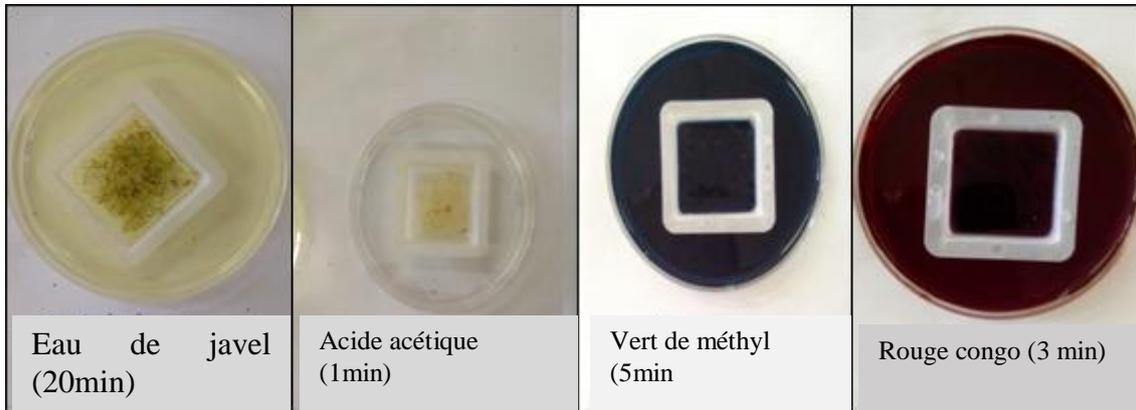
Les coupes ont été traitées comme suit

- Dans une solution d'hypochlorite de sodium (eau de javel) pendant 20 min afin de les vider de leur contenu cellulaire et de ne garder que les parois squelettiques (Figure 6), puis rincées à l'eau du robinet ;
- Dans une solution d'acide acétique pendant 1 min (lavage rapide) pour neutraliser l'effet basique induit par l'hypochlorite de sodium, puis rincées à l'eau du robinet ;
- Dans une solution de vert de méthyle pendant 5 min (Figure 6), puis rincées à l'eau du robinet ;
- Enfin, dans une solution de rouge Congo pendant 3 min (Figure 6), puis rincées à l'eau du robinet.

## MATERIEL ET METHODE

---

Après colorations, les coupes ont été placées dans de l'eau pour éviter leur déshydratation et permettre leur conservation plusieurs jours et quelques-unes d'entre elles (les mieux colorées et les plus fines) ont été sélectionnées pour l'observation microscopique (Figure 7).



**Figure 6 :** Technique de la double coloration



**Figure 7 :** Coupes colorées conservées dans de l'eau.

### 2.2. Etude phytochimique des feuilles

Les tests suivants sont réalisés sur la poudre végétale afin de déterminer de manière préliminaire les classes photochimiques contenues dans notre plante. Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation qui permet la détection de certaines familles de métabolites secondaires : alcaloïdes, hétérosides anthraquinoniques et flavonoïdes.

Les essais phytochimiques ont été menés suivant les méthodes phytochimiques usuelles et décrites pour la plupart par G. FAUGERAS (1965) [112] et J. VERCAUTEREN (2011/2012). [113]

#### 2.2.1. Mise en évidence d'alcaloïdes

Le test de caractérisation est effectué après une extraction acide :

- A 200 mg de poudre végétale, ajouter 10 ml d'acide sulfurique à 10%.
- Agiter pendant 2 min.
- Filtrer sur papier filtre.

Le filtrat (solution aqueuse) contient les alcaloïdes totaux qui donnent avec plusieurs réactifs iodés des précipités colorés caractéristiques :

- Avec le réactif de Bouchardat (solution iodo-iodurée) → précipité brun.
- Avec le réactif de Dragendorff (solution acide d'iodobismuthite de potassium → précipité rouge vermillon.
- Avec le réactif de Mayer (solution acide de mercuri-iodure de potassium) → précipité blanc crème.
- Répartir le filtrat dans 3 tubes à essai.
- Ajouter dans le 1er deux gouttes de réactif de Bouchardat.
- Ajouter dans le 2ème deux gouttes de réactif de Dragendorff.
- Ajouter dans le 3ème deux gouttes de réactif de Mayer.
- Observer les divers précipités

## MATERIEL ET METHODE

---

### 2.2.2. Mise en évidence des polyphénols

Les polyphénols donnent des réactions colorées en présence de réactifs généraux. La réaction de mise en évidence utilisée est le test de détection au perchlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ).

- A 200 mg de poudre ajouter un mélange d'eau (2 ml) et d'acide acétique (6 ml)
- Placer le tout dans un bain-marie à  $60^\circ\text{C}$  pendant 5 min, en agitant de temps à autre.
- Filtrer sur papier filtre.
- Au filtrat, ajouter 1 à 2 gouttes de  $\text{FeCl}_3$  à 10%
- Observer la formation ou non d'une coloration noire, en comparant à une solution témoin.
- Ce même filtrat est gardé et nous permettra de rechercher les tannins.

### 2.2.3. Mise en évidence des tannins

#### a. Tannins catéchiqes (condensés, procyanidoliques)

- Au filtrat précédent, ajouter quelques gouttes du réactif de Stiasny.
- Maintenir au bain-marie à  $80^\circ\text{C}$  pendant 30 min.
- Observer la formation ou non de gros flocons blancs.

#### b. Tannins galliques (saponifiables,hydrolysables)

- Un deuxième filtrat est obtenu par élimination des flocons formés avec les tannins catéchiqes.
- Neutraliser ce deuxième filtrat d'acétate de sodium.
- Ajouter 2 gouttes de  $\text{FeCl}_3$  à 10%.
- Observer la formation ou non d'une coloration bleu noirâtre intense.

### 2.2.4. Mise en évidence des flavonoïdes

Réaction à la cyanidine : en présence d'hydrogène naissant produit par action de l'acide chlorhydrique sur du magnésium, plusieurs groupes de flavonoïdes développent des

## MATERIEL ET METHODE

---

colorations variées : rouge cerise dans le cas des flavonols, orange dans le cas des flavones et violacée dans le cas des flavanones, ( réaction exothermique ).

- A 300 mg de poudre, ajouter environ 5 ml d'éthanol.
- Porter le tout au bain-marie à 65°C pendant 10 min.
- Filtrer sur papier filtre.
- Ajouter au filtrat alcoolique 1 ml d'eau distillée, 1 ml d'acide chlorhydrique concentré et quelques rognures de magnésium.
- Observer la coloration formée.

### 2.2.5. Mise en évidence des saponosides

Mesure de l'indice de mousse (IM) :

- Préparer un décocté à 1% : mettre 1g de poudre dans 100 ml d'eau, porter au bain-marie à 95°C pendant 30 min, puis filtrer à chaud sur papier filtre.
- Dans une série de 11 tubes à essai (16cm de hauteur / 16mm de diamètre) numérotés de 1 à 11, répartir le décocté selon le tableau III ci-dessous, puis compléter à 10 ml avec l'eau distillée :

**Tableau VIII** : Mise en évidence des saponosides.

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Décocté(en ml)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Eau (en ml)	10	9,5	9	8,5	8	7,5	7	6,5	6	5,5	5

- Agiter vigoureusement chaque tube dans le sens du longeur du tube pendant 15 secondes et laisser reposer 15 min, sur le portoir.
- L'indice de mousse correspond à l'inverse de la dilution du tube dans lequel la hauteur de la mousse résiduelle est de 1 cm.

## MATERIEL ET METHODE

---

### 2.2.6. Mise en évidence des anthracénosides / Quinones

Réaction de Bornträeger : les anthracénosides sont des hétérosides hydrosolubles. Cette réaction doit se faire obligatoirement sur la génine libre (anthraquinone) lipophile. Deux étapes sont nécessaires :

**1ère étape** : extraction des anthracénosides et leur hydrolyse acide ;

- A 200 mg de poudre, ajouter 5 ml d'acide sulfurique à 10% et 1 ml d'eau oxygénée.
- Porter au bain-marie à 95°C pendant 10 min.
- Filtrer sur papier filtre et laisser refroidir → filtrat contenant les anthracénosides.

**2ème étape** : extraction des génines avec un solvant organique apolaire.

- Au filtrat précédent, ajouter 3 – 4 ml d'éther éthylique.
- Agiter.
- Décanter.
- Extraire la phase organique colorée en jaune.
- Ajouter un volume égale de NaOH à 50 g/L.
- En présence d'anthraquinones, la phase aqueuse se colore en rouge et la phase organique devient incolore.

### 2.2.7 Mise en évidence des stérols et triterpènes

- Introduire dans un tube à essai 1 g de poudre, ajouter 20 ml d'éther.
- Boucher le tube, agiter et laisser au réfrigérateur pendant 24 h.
- Filtrer sur papier filtre et compléter à 20 ml d'éther.
- Evaporer 10 ml de l'extrait étheré dans une capsule.
- Dissoudre le résidu dans 1 ml d'anhydride acétique et 1 ml de chloroforme.
- A l'aide d'une pipette, déposer 1 à 2 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré au fond du tube à essai, ne pas agiter.

## MATERIEL ET METHODE

- Observer à l'interphase des deux liquides la formation ou non d'un anneau rouge brunâtre à violet indiquant la présence de stérols et triterpènes.

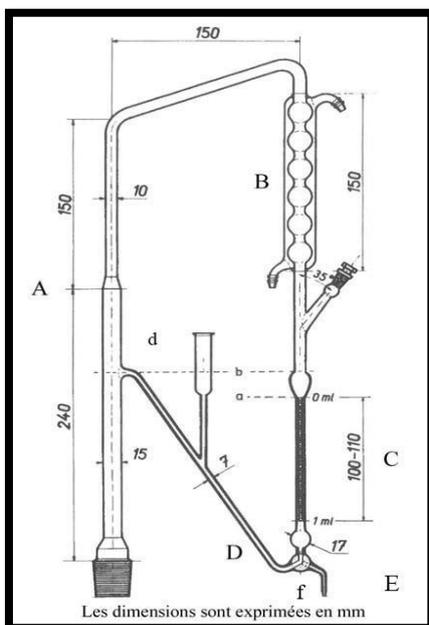
### 2.2.8. Mise en évidence de mucilage

- Préparer un décocté à 10 % de la poudre végétale (10 g de poudre dans 100 ml d'eau).
- A 1ml de ce décocté, ajouter 5ml d'éthanol absolu.
- Après une dizaine de minutes, observer s'il y a obtention d'un précipité floconneux indiquant la présence de mucilages.

### 2.3. Préparation des différents extraits de la plante

#### 2.3.1. Extraction de l'huile essentielle des feuilles sèches de *Pulicaria odora*

Pour extraire l'huile essentielle de *P. odora*, c'est la technique d'hydrodistillation qui a été utilisée, celle-ci se produit dans l'appareil de Clevenger et consiste à porter à ébullition l'eau à laquelle est mélangé le broyat végétal (feuilles sèches) dans un ballon de laboratoire, et ce, grâce à un chauffe-ballon. Les vapeurs hétérogènes ascendantes provenant du ballon progressent dans la partie A puis se condensent sur la surface froide du réfrigérant (partie B). Le condensat est récupéré dans la partie C où l'huile essentielle se sépare de la phase aqueuse grâce à leur différence de densité. L'eau en excès retourne dans le ballon par la partie D qu'un robinet à 3 voies (f) fait communiquer avec la partie C (Figure 8).



**Figure 8 :** Clevenger en schéma.  
[114]



**Figure 9 :** Photo originale du Clevenger prise au laboratoire de botanique médicale, 2019.

## MATERIEL ET METHODE

---

L'extraction dure environ entre 3h30 à 4 heures. Les feuilles sèches utilisées (40 g) sont découpées en petits morceaux pour faciliter leur introduction dans un ballon en verre à fond rond de un litre, additionnée d'environ 400 ml d'eau distillée, l'ensemble est chauffé jusqu'à ébullition, les vapeurs se condensent en passant dans le réfrigérant qui est constamment refroidi par un courant d'eau froide du robinet.

L'HE de *P. odora* a été récupérée à l'aide d'une pipette, déshydratée avec du sulfate de sodium anhydre ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) pour éliminer les traces d'eau, puis conservée dans un flacon en verre hermétique et ombré au réfrigérateur à 4°C.

Cette opération a été répétée 14 fois (utilisant un poids total de feuilles de 560 g) afin d'extraire une quantité suffisante d'HE pour l'étude de son activité biologique.

### 2.3.2. Extrait brute des feuilles fraîches

Quelques feuilles fraîches de la plante étudiée sont broyées à l'aide d'un mortier, puis filtrées sur du papier filtre.

L'extrait est récupéré dans un flacon en verre ambré et conservé dans le réfrigérateur, à l'abri de la lumière.



**Figure 10** : Préparation de l'EBF (laboratoire de botanique médicale, 2019)

### 2.3.3. Extrait brut des racines

Quelques racines de la plante étudiée sont mises dans de l'eau fraîche afin de les rafraîchir, ensuite elles sont broyées à l'aide d'un mortier, puis filtrées.

L'extrait est récupéré dans un tube sec recouvert de papier aluminium et conservé dans le réfrigérateur.

## MATERIEL ET METHODE

---



**Figure 11 :** Préparation de l'EBR. (Laboratoire de botanique médicale, 2019)

### 2.3.4. Extrait hydro-méthanolique

Cet extrait a été préparé par épuisement du matériel végétal selon la méthode de DIALLO (2005) avec quelques modifications. [115]

10 g de poudre de la plante *P. odora* sont macérées dans un mélange méthanol/eau (80:20 V/V), sous agitation douce pendant 24 heures à une température ambiante. Après macération, la solution obtenue a été filtrée plusieurs fois sur papier filtre, la même opération a été répétée 03 fois avec renouvellement du solvant, afin d'avoir une extraction exhaustive, les trois filtrats ont été mélangés, le méthanol est évaporé sous vide à 45° C dans un évaporateur rotatif (Rotavapeur) jusqu'à ce que le poids de l'extrait reste constant.



**Figure 12 :** Préparation de l'EHM des feuilles de *P. odora* (laboratoire de botanique médicale, 2019)

## MATERIEL ET METHODE

---

### 2.3.5. Extrait méthanolique

1 g de matériel végétal est introduit dans 20 ml de méthanol, puis laissé macérer pendant 24 heures. [116]

La solution obtenue a été filtrée et laissée à l'air libre pour que le solvant s'évapore complètement.

#### ❖ Calcul du rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Le taux d'extraction (\%)} = \frac{P1}{P0} \cdot 100$$

**P0** : poids de la poudre avant l'extraction.

**P1** : poids de l'extrait sec après l'extraction.

### 2.4. Evaluation qualitative de l'activité antimicrobienne des différents extraits et de l'HE de *P. odora*

L'objectif de notre travail consiste à évaluer le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle et des différents extraits de la plante étudiée.

A cet effet, nous avons suivi la méthode de diffusion en gélose décrite dans le protocole de standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale 7<sup>ème</sup> édition, 2014. [117]

#### Principe

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide dans une boîte de Pétri, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition, la souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante.

#### Protocole expérimental

##### - Stérilisation du matériel

Les tubes à essai utilisés pour la préparation des solutions ainsi que les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) enrobés dans du papier aluminium ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

## MATERIEL ET METHODE

---

### - Préparation de pré-culture

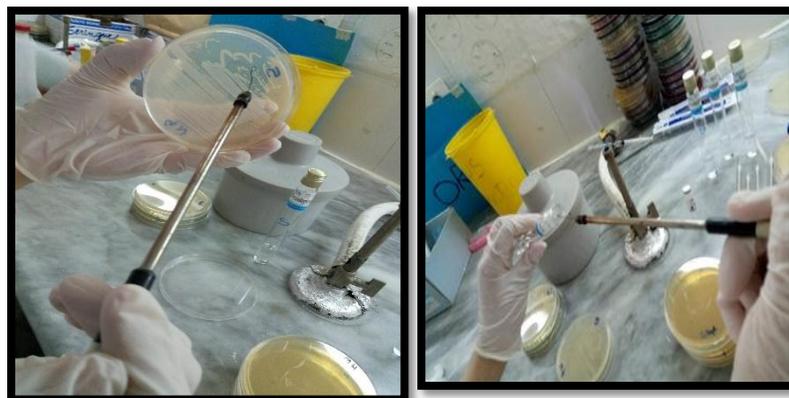
Les tests antimicrobiens sont réalisés à partir des cultures jeunes de 18 à 24 heures en phase exponentielle de croissance. La réactivation des souches est effectuée par l'ensemencement de l'espèce bactérienne dans un milieu liquide BHIB (Brain Heart Infusion Broth). Après incubation 24 heures à 37°C, les souches bactériennes sont repiquées dans la gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 24 heures.



**Figure 13 :** Préparation des cultures jeunes.

### - Préparation de la suspension bactérienne

- A partir d'une culture pure de 18 à 24 h, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Bien décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 MF.



**Figure 14 :** Préparation de la suspension microbienne.

## MATERIEL ET METHODE

---

### - Ensemencement

- Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum. L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.



**Figure 15 :** Ensemencement de la suspension microbienne.

### - Application des disques d'antibiotiques

Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de pinces bactériologiques stériles et ne pas déplacer les disques après application. La liste des antibiotiques à tester selon la bactérie isolée. (Figure 16)

### - Incubation

Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures. [118]

### - Lecture

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.
- Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes.
- Classer la bactérie dans l'une des catégories : Sensible (S), Intermédiaire (I) ou Résistant (R).

## MATERIEL ET METHODE

---

**Remarque :** Un contrôle de qualité a été au préalable effectué sur les différents disques d'antibiotiques, les souches bactériennes ainsi que le milieu de culture en utilisant la méthode de diffusion sur gélose afin de :

- Valider la qualité des souches bactériennes, les milieux de culture utilisés et les disques antibiotiques
- Mesurer la sensibilité d'une souche bactérienne à un ou plusieurs antibiotiques
- Dépister les résistances acquises et de choisir l'antibiotique à utiliser comme témoin positif dans notre étude. [117]



**Figure 16 :** Dépôt des disques d'antibiotiques pour le contrôle de qualité.

### 2.4.1. Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits

Cette activité est évaluée par la technique de contact direct par diffusion sur disque en milieu gélosé en adaptant le protocole de Belhattab, 2007. [119]

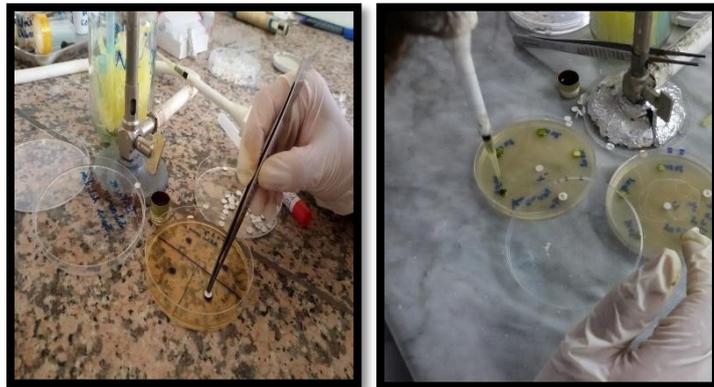
- Préparation des milieux de culture
- Préparation des suspensions
- Ensemencement
- Dépôt des disques : déposer à l'aide d'une pince stérile des disques à la surface de la gélose ensemencée et répartir comme suit :
- Mettre dans chaque boîte de Pétri 4 disques imbibés avec différents volumes des extraits (10, 20, 30 et 50 $\mu$ l), 1 disque imprégné de 10 $\mu$ l de DMSO utilisé comme témoin négatif, le dernier

## MATERIEL ET METHODE

---

est l'antibiotique comme control positif, puis laisser sécher à température ambiante pendant 10 à 15 minutes. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries.

Après incubation, l'évaluation du pouvoir antimicrobien des différents extraits de la plante se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition qui se traduit par un halo clair autour du disque absorbant. Le diamètre des zones d'inhibition est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse déterminant ainsi des zones d'inhibition et les valeurs sont exprimées en mm.



**Figure 17** : Dépôt des disques et les extraits de *P. odora*

### 2.4.1. L'évaluation de l'activité antifongique

Cette activité est évaluée par la même technique décrite précédemment en suivant la méthode de Benjelali. [120]

#### - Préparation de pré-culture

Les deux souches fongiques *Candida albicans* et *Aspergillus niger* sont repiquées dans le milieu de culture Sabouraud + Chloramphénicol, puis elles sont incubées à 37°C pendant 24 heures pour la souche *C. albicans* et à 25°C pendant 5 jours pour *A. niger*.

#### - Préparation de la suspension fongique

À partir des cultures de levures et champignons revivifiées, prélever à l'aide d'une anse de platine quelques colonies et les introduire dans des tubes stériles contenant 5 ml d'eau physiologique Stérile.

Bien homogénéiser la suspension fongique. La standardisation de la suspension à  $10^6$  UFC/ml.

#### - Ensemencement sur milieu Sabouraud + Chloramphénicol.

## MATERIEL ET METHODE

---

- Dépôt des disques : déposer à l'aide d'une pince stérile des disques à la surface de la gélose ensemencée et répartir comme suit
- Mettre dans chaque boîte de Pétri 4 disques, 2 imbibés par 20 $\mu$ l de l'extrait, un autre imbibé par 20 $\mu$ l de la solution de Référence (DMSO), le dernier est l'antifongique (Fluconazole) pour la souche *C. albicans* (voir figure 17').
- Laisser sécher à température du laboratoire pendant 10 à 15 minutes.
- Les boîtes de Pétri sont incubées à 25°C pendant 3 à 5 jours pour les levures et champignons, on obtient ainsi des cultures jeunes.
- Après incubation, on réalise la lecture.



**Figure 17'** : Préparation de l'antifongigramme pour *Candida albicans*  
(Photographie originale du laboratoire, 2019)

### 2.4.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de *P. odora* (Aromatogramme)

Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des huiles essentielles sur un milieu solide à l'intérieur d'une boîte de Pétri. Elle permet de mettre en évidence l'effet antibactérien et antifongique de l'huile essentielle, ainsi que la détermination de la résistance ou la sensibilité de ces bactéries et champignons vis-à-vis de cette huile essentielle.

#### **-Protocole expérimental**

Après avoir ensemencé les boîtes de pétri par les différentes suspensions microbiennes préparées (suspensions bactérienne et fongiques), le dépôt des disques sur les différents milieux gélosés (MH, SAB chloramphénicol) est réalisé dans des conditions d'asepsie à l'aide d'une pince stérile.

## MATERIEL ET METHODE

---

Dans chaque boîte, 2 disques ont été imprégnés par 10 µl d'huile essentielle de *Pulicaria odora*, Un disque de papier wattman a été déposé sans être imbibé d'huile essentielle comme contrôle négatif, un disque d'antibiotique / antifongique utilisé comme témoin positif.

Les boîtes ont été maintenues à 4°C pendant 1 heure pour que l'huile essentielle puisse diffuser. [121]

### **-Incubation**

Les boîtes ont été incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 h pour les souches bactériennes, et pendant 48 heures à 25° pour la souche fongique. [121]

**-Lecture :** voir page 64.

# **RESULTAS ET DISCUSSIONS**

# RESULTATS ET DISCUSSIONS

---

## 1. Etude botanique (Monographie de la plante)

### 1.1. Description morphologique (organographie)

#### 1.1.1. Appareil végétatif (port, racine, tige, feuilles)

a) **Type végétatif (port)** : plante herbacée vivace par un tubercule souterrain.

b) **Système racinaire** : racines adventives portées par le tubercule, ayant un aspect fasciculé, de couleur brune jaunâtre ; faiblement ramifiées (portant de fines radicelles).

c) **Système caulinaire** : il existe deux types de tiges :

Tige souterraine : tubercule assez court et peu large, de couleur brune, donnant naissance à plusieurs pousses aériennes.

Tige aérienne : dressée de 30 à 60 cm, velue, pleine, de forme cylindrique et présentant des stries de couleur violacée.

d) **Les feuilles** : non stipulées, simples, laineuses notamment sur la face inférieure, obscurément denticulées.

Les feuilles basales (radicales) : grandes, elliptiques-lancéolées, pétiolées, insérées en rosette. Elles sont pennatinerves, marquées d'un réseau dense de nervures nettement saillantes sur la face dorsale. La base du pétiole ainsi que le contour du limbe présentent une teinte noire-violacée.

Les feuilles sommitales : sessiles, demi-embrassantes, cordiforme à la base, de forme plus au moins triangulaire, elles sont alternes hélicoïdales (en hélice).

#### 1.1.2. Appareil reproducteur (étude florale)

a) **Inflorescence** : capitules regroupés en corymbes (inflorescence composée mixte) portés par des pédoncules plus larges au sommet qu'à la base. Les capitules sont radiés constitués de réceptacles plans portant :

- Fleurs du rayon : ligulées étalées, jaunes, insérées sur un seul rang ;
- Fleurs du disque : tubuleuses, jaunes.
- Involucre : bractées nombreuses insérées sur plusieurs rangs, étroites (linéaires lancéolées), poilues, à extrémités pointues et violacées.

b) **Fleurs** : sessiles insérées sur la partie supérieure du réceptacle plus au moins plane.

- Fleurs du rayon : ligulées zygomorphes, pentamère ;

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

- Calice réduit en poils blanchâtres ;
- Corolle à 5 pétales soudés (gamopétale) dont 3 développés formant la ligule (terminée par 3 dents) ;
- Androcée : absent ;
- Gynécée : ovaire infère (fleur épigyne), bicarpellé, uniloculaire, uniovulé, à placentation basale, surmonté d'un style et d'un stigmate bifide.

Les fleurs du rayon sont **femelles**.

- Fleurs du disque : tubuleuses actinomorphes.
  - Calice réduit en poils blanchâtres ;
  - Corolle : 5 pétales égaux et soudés sous forme d'un tube terminé par 5 dents ;
  - Androcée : 5 étamines synanthérées (soudées par les anthères), corolliflores de couleur jaune formant un manchon staminal autour du style ;
  - Gynécée : ovaire infère (fleur épigyne), bicarpellé uniloculaire, uniovulé à placentation basale, surmonté d'un style et d'un stigmate bifide.

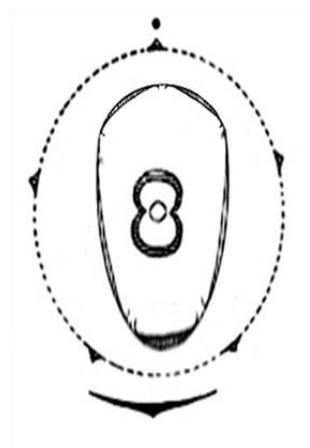
Les fleurs du disque sont **hermaphrodites**.

c) **Fruit** : il s'agit d'un akène (selon la bibliographie) que nous n'avons pas pu avoir vu qu'il n'était pas encore disponible dans la nature, durant la période de réalisation de notre travail (hors la saison de fructification).

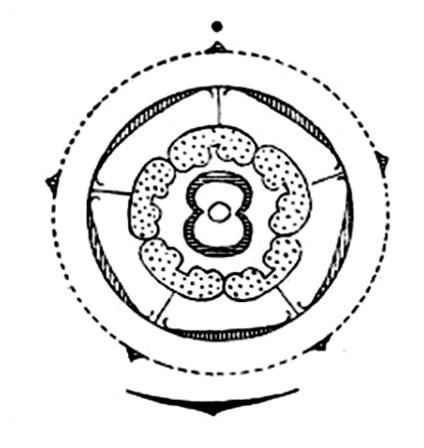
### d) Formules et Diagrammes floraux

Fleur du rayon : Fleur du disque :

FF:  $\cdot | \cdot$  ; 5S, [5]P, [2] $\bar{C}_1^1$  ; Akène

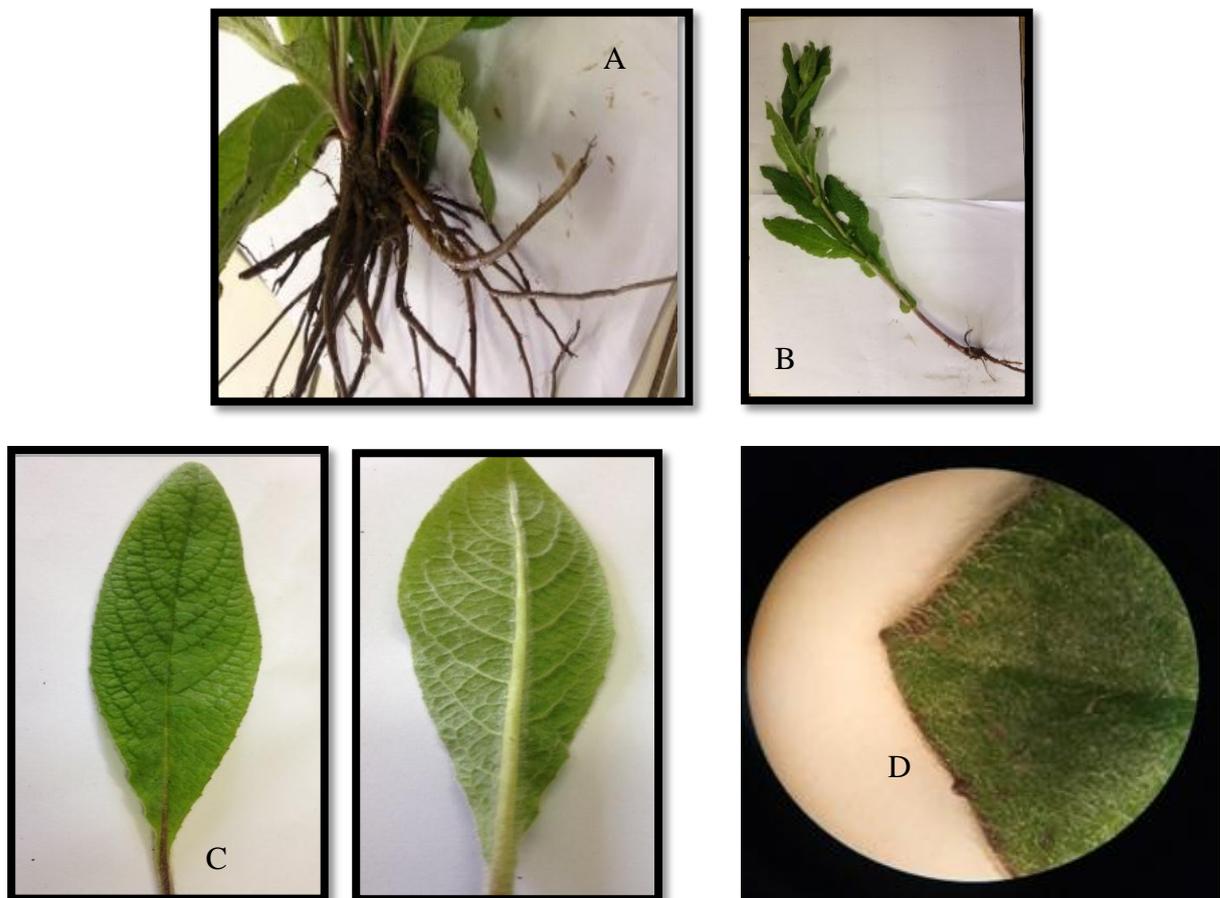


FF:  $\phi$  ; 5S, [5]P, [5]E, [2] $\bar{C}_1^1$  ; Akène





**Figure 18 :** *Pulicaria odora* dans son biotope  
(Photographies originales prises à Ath Mendes, 2019)



**Figure 19 :** Différentes parties de l'appareil végétatif de *P. odora*  
(Photographies originales, 2019)

A- Système racinaire ; B- Système caulinaire ; C- Feuille (face supérieure à gauche, face inférieure à droite) ; D- Détails du sommet de la feuille



**Figure 20** : Inflorescence de *P. odora* (photographies originales, 2019)



A- Fleur du disque.

B- Fleur du rayon.

**Figure 21** : Fleur de *P. odora* observée à la loupe (photo graphies originale, 2019)

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

---

e) **Conclusion florale :** capitule hétérogame, radié avec fleur du rayon ligulée, pentamère, femelle, incomplète, épigyne, tricyclique, hétérochlamyde et fleur du disque tubuleuse, pentamère, tétracyclique, hétérochlamyde, complète, épigyne. [122]

### 1.2. Etude histo-anatomique

#### a. Etude de la coupe transversale de la racine

Le faible grossissement (10x4) montre (figure 22) : un organe à section ronde et à symétrie axiale, le rapport écorce/cylindre central  $> 1$  avec présence de structures secondaires subéro-phellodermiques et libéro-ligneuses repérées par leur aspect caractéristique en files radiales. Donc il s'agit d'une racine de Dicotylédone à structure secondaire.

Aux grossissements supérieurs (10x10 et 10x40), nous énumérons, de la périphérie au centre les tissus suivants :

**L'écorce**, largement dominante, comprenant (figure 23)

- Un périderme : tissu de revêtement secondaire en files radiales, constitué d'un suber ou liège à plusieurs assises de cellules subérifiées (mortes), une à deux assises de phellogène (assise génératrice subéro-phellodermique) à cellules cellulosiques aplaties. Quant au phelloderme, il est rarement observable.
- Un parenchyme cortical : à méats, constitué de grandes cellules vivantes à parois fines et cellulosiques ;
- Des cellules scléreuses : isolées, réparties dans l'ensemble du parenchyme, reconnues par leur paroi très épaisse et lignifiée. La coupe longitudinale a permis de confirmer leur nature et de les différencier des fibres : elles sont plus au moins allongées, à ponctuations nombreuses et très visibles et à extrémités non effilées (cellules non fusiformes).
- Un tissu sécréteur : constitué de cellules sécrétrices cellulosiques bordant une cavité centrale, il s'agit soit d'une poche ou d'un canal sécréteur. La coupe longitudinale confirme sa nature : il s'agit de poches sécrétrices (figure 25).

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

---

**Le cylindre central**, comprenant (figure 24)

- Des restes du phloème : repoussé par le liber contre le parenchyme cortical ;
- Des tissus conducteurs secondaires : constitués du cambium continu (assise génératrice libéro-ligneuse) à cellules cellulosiques aplaties donnant, vers l'extérieur, du liber à cellules cellulosiques toutes vivantes (tubes criblés + cellules compagnes + parenchyme libérien), et vers l'intérieur du bois hétéroxylé à cellules lignifiées (vaisseaux, fibres ligneuses, parenchyme ligneux). Le bois et le liber sont organisés en 4 pachytes discontinus séparés par des bandes de parenchyme secondaire formant des rayons médullaires plurisériés issus du cambium interfasciculé.
- Des restes du xylème : peuvent être visibles à la périphérie de la moelle, entre les pachytes libéro-ligneux.
- Un parenchyme médullaire : ou moelle, réduite, à cellules fines et cellulosiques.

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

---

Figure racine

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

---

Schema racine

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

---

### b. Etude de la coupe transversale de la tige

Le faible grossissement (10x4) montre (figure 27) : un organe à section ronde et à symétrie axiale, le rapport écorce/cylindre central  $< 1$  avec présence de structures secondaires libéro-ligneuses repérées par leur aspect caractéristique en files radiales. Donc il s'agit d'une tige de Dicotylédones à structure secondaire.

Aux grossissements supérieurs (10x10 et 10x40), nous énumérons, de la périphérie au centre les tissus suivants (figure 28) :

**L'écorce**, peu large, comprenant :

- Un épiderme cutinisé : comme tissu de revêtement primaire, portant de longs poils tecteurs pluricellulaires unisériés et des poils sécréteurs à pied pluricellulaire bisérié et tête bicellulaire (figure 29).
- Un parenchyme cortical à méats, les cellules augmentent de taille en allant vers le centre de la tige, les plus externes sont collenchymateuses.
- Un sclérenchyme : sous formes d'amas péricycliques chapeautant les pachytes libéro-ligneux.

**Le cylindre central**, comportant :

- Des tissus conducteurs secondaires : organisés sous forme de pachytes discontinus plus nombreux et plus petits que ceux de la racine. Ils sont séparés par du parenchyme médullaire primaire et non pas par des rayons secondaires vu l'absence d'un cambium interfasciculé. Le bois, peu développé, est constitué de vaisseaux, fibres et parenchyme ligneux cellulosique. Liber constitué de cribles, cellules compagnes et de parenchyme libériens et quelques fibres libériennes au niveau des tiges les plus âgées.

Des restes de xylème et de phloème peuvent persister.

- La moelle : constituée de parenchyme médullaire à méats recouvrant une grande surface de la tige et constitué de cellules à parois cellulosiques pouvant se lignifier avec l'âge.

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

---

Figure tige

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

---

Schéma de la tige

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

---

### c. Etude de la coupe transversale de la feuille

Le faible grossissement (10x4) montre (figure 31) : un organe à section aplatie et à symétrie bilatérale avec distinction entre deux parties : la nervure centrale très apparente et le limbe de part et d'autre de celle-ci.

Aux grossissements supérieurs (10x10 et 10x40), nous énumérons, du haut en bas (en allant de la face supérieure à la face inférieure), les tissus suivants :

#### Au niveau du limbe (figure 32)

- Un épiderme supérieur cutinisé : sans stomates, constitué d'une seule assise de cellules cellulósiques, comportant peu de poils tecteurs semblables à ceux de la tige. Les poils sécréteurs étant quasi-absents à ce niveau.
- Un mésophylle hétérogène : constitué d'un parenchyme palissadique constitué de 2 à 3 assises de cellules allongées à parois fines.
- Un parenchyme lacuneux : constitué de cellules parenchymateuses arrondies laissant entre elles de grosses lacunes aérifères.
- Un épiderme inférieur cutinisé : avec stomates, constitué d'une seule assise de cellules cellulósiques, comportant des poils tecteurs plus abondants et des poils sécréteurs semblables à ceux de la tige (à pied pluricellulaire bisérié et tête bicellulaire).
- Des nervures secondaires : plus réduites et coupées obliquement, renferment des tissus conducteurs peu visibles.

#### Au niveau de la nervure principale (figure 33)

Elle est plus saillante du côté inférieur, ce qui facilite l'orientation de la feuille. Nous y observons :

Plusieurs arcs libéro-ligneux : au centre de la nervure, chaque arc étant constitué de d'un cambium produisant du bois du côté ventral et du liber du côté dorsal. Un phloème interne surnuméraire est observé.

Un parenchyme : cellulósique, occupe le reste de la nervure principale dont les assises les plus externes (situées sous les épidermes supérieur et inférieur) sont collenchymateuses.

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

---

L'épiderme au niveau de la nervure ne présente pas de stomates et comporte également des poils tecteurs plus marqués sur la face inférieure.

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

---

Figure feuille

Figure feuille

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

---

Schema feuille

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

---

### 1.3. Conclusion systématique (clé d'identification)

D'après l'étude botanique et anatomique, des critères taxonomiques ont pu être relevés et utilisés pour l'identification et la détermination de l'espèce (en se référant à la flore d'Algérie de *Quezel et Santa* (1963) [122] :

- Plante à fleur et à ovules enfermés dans un ovaire clos - bois de type hétéroxylé..... **Angiospermes**
- Feuilles pennatinerves - tige ramifiée et lignifiée – présence de structures anatomiques secondaires - fleur pentamère..... **Eudicotylédones**
- Fleur hétérochlamyde cyclique - corolle gamopétale pentamère - androcée oligostémonecoroliflore ..... **Astéridées**
- Fleur épigyne ..... **Campanuliidées**
- Inflorescence en capitule..... **Astérales et Astéracées**  
Capitule radié ..... **Sous famille des tubuliflores**  
Capitule hétérogame multiflores - fleurs du rayon ligulées à ligules bien marquées étalées, femelles et sur un rang - fleurs du disque tubuleuses et hermaphrodites - involucre de bractées sur peu de rangs étroites - réceptacle plan nu à épines alvéolées –fleurs jaunes..... ***Pulicaria***
- Plante vivace à ligules étalées dépassant amplement l'involucre - capitules assez grands (30-40 mm) - feuilles radicales de 10 à 20cm de long, lancéolées - plante velue ou laineuse à souche tubéforme - tige dressée simple, rameuse à la partie supérieure - feuilles obscurément denticulées ; les radicales pétiolées, les caulinaires sessiles, semi-embrassantes cordées à la base sans oreillettes saillantes - capitule en corymbe portés par des pédoncules épaissis au sommet)..... ***Pulicaria odora*(L.) Rchb.**

**Statut taxonomique :** la consultation de certaines bases de données numériques (plantes d'Afrique du CJB, Euro+MedPlantBase) a permis de noter quelques synonymes acceptés de *Pulicaria odora* (L.) Rchb. A savoir :

*Inula odora* L.

*Pulicaria majoricensis* Gand.

*Pulicaria atlantica* Pau.

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

---

### 1.4. Classification

**a. Ancienne classification :** classification morphologique de *Pulicaria odora* selon Cronquist (1981) :

**Tableau IX :** Classification de *Pulicaria odora* selon Cronquist (1981) :

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Embranchement	Spermatophyta
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Magnoliopsida (Dicotylédones)
Sous-classe	Asteridées
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae
Sous –famille	Tubuliflores
Genre	<i>Pulicaria</i>
Espèce	<i>Pulicaria odora</i> (L.) Rchb.

**b. Nouvelle classification APG III** ou classification phylogénétique, est la troisième version de classification botanique des Angiospermes établie par *Angiosperms Phylogeny Group*, fondée sur des critères moléculaires.[139]

**Tableau X :** Classification de *Pulicaria odora* selon APG III (2009)

Règne	Plantae
Embranchement	Embryophytes
Sous-embranchement	Trachéophytes
Superclasse	Spermatophytes
Classe	Angiospermes = Magnoliopsides
Clade	Eudicotylédones
Clade	Astéridées

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

---

Clade	Campanuliidées
Ordre	Asterales
Famille	Astéracées
Genre	<i>Pulicaria</i>
Espèce	<i>Pulicaria odora</i> (L.) Rchb

### 1.5. Noms vernaculaires

Français : pulicaire odorante,

Kabyle : *Amezzough guilef* (signifiant : oreille du sanglier)

### 1.6. Répartition géographique

*Pulicaria odora* est une espèce méditerranéenne [123], qu'on rencontre dans les maquis et les sous-bois clairs et les essarts [124]. Elle est commune dans les lieux frais de la région méditerranéenne, les Alpes-Maritimes, le Var et la Corse. Ainsi, elle est présente en : Espagne, Portugal, Italie, Afrique du nord [125]. Elle fait partie de la flore spontanée algérienne. [122]

### 1.7. Usages traditionnels

Selon Ezoubeiri et al. (2005) [126], *Pulicaria odora* est une plante médicinale largement utilisée en médecine traditionnelle, pour traiter les douleurs des troubles intestinaux et les crampes menstruelles. Elle rentre dans la composition de "Mssakhen" ; remède traditionnel, qui est donné aux femmes après l'accouchement. Elle est aussi utilisée comme épice pour parfumer le pain et la viande, la fleur de la plante est connue localement sous le nom d'Anssif, est utilisée comme épice et dans la préparation de divers aliments délicieux [127]. Les parties aériennes de cette plante sont également utilisées comme agent antibactérien ou anti-diarrhéique. [124]

Selon Meddour et al (2009) [129], *Pulicaria odora* est une espèce employée pour traiter exclusivement des pathologies dermiques : gale, plaies, brûlures, engelures, alopecie, eczéma, mycoses, rougeole, etc. Les racines de *Pulicaria odora* sont également utilisées dans la médecine traditionnelle pour leurs propriétés anti-inflammatoires. [130]

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

Dans certaines régions de Kabylie (Boghni, Ouadhias, Beni Douala et autres), la plante est utilisée pour ses vertus cicatrisantes, anti-inflammatoires et antiulcéreuses digestives. Elle rentre même dans les ingrédients d'un pain traditionnel : « *Aghroum oumezzough* ».

### 2. Etude Phytochimique

**Tableau XI** : Résultats du screening phytochimique.

Métabolites secondaires		Réactif		Résultat
Alcaloïdes		Dragendorff (solution iodo-bismuthate de potassium)	-	
		Bouchardat (réactif iodo-ioduré)	-	
		Mayer	-	
Polyphénols		Chlorure ferrique FeCl <sub>3</sub>	+++	
Tanins	Catéchiques	Réactif de Stiasny	-	
	Galligues	Acétate de sodium Chlorure ferrique	+++	
Flavonoïdes		Éthanol Acide chlorhydrique Copaux de magnésium	+++	
Saponosides		Indice mousse (IM)	+/-	

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

---

Anthracénosides/Quinones	Borntraeger	-	
Stérols et triterpènes	Anhydride acétique Acide sulfurique concentré	++	
Mucilages	Ethanol	+++	

- Test négatif (métabolite non détecté)

+/- Test plus au moins positif (métabolite plus au moins détecté)

++ Test positif (métabolite abondant)

+++ Test positif (métabolite très abondant).

L'étude phytochimique de la poudre des feuilles de *Pulicaria odora* a révélé que notre plante est riche en polyphénols, flavonoïdes, tanins (galliques) et mucilages.

La présence de ces métabolites secondaires à côté de l'huile essentielle expliquerait son usage traditionnel contre les affections cutanées (plaies, brûlures) et digestives (ulcère gastrique).

Nous avons également noté la présence des terpènes et stérols. Quant aux saponosides, ils sont quasi absents.

Notre plante est dépourvue d'anthracénosides et d'alcaloïdes d'où sa consommation par la population locale comme plante médicinale et alimentaire (toxicité peu probable).

Nos résultats concordent avec l'étude récente de Hussein et al. (2017) [131] menée sur *Pulicaria undulata*, une plante du genre *Pulicaria* qui souligne la richesse de cette dernière en composés sesquiterpènes, en flavonoïdes et d'autres dérivés de composés phénoliques.

El-Negoumy et al, (1982) [132] précisent que tous les flavonoïdes de *Pulicaria arabica* L. sont détectés dans les feuilles et les fleurs.

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

---

Bien que nos résultats discordent avec ceux obtenus par Ezoubeiri et al, (2005) [126] qui précise la richesse de cette plante en saponosides, ceci pourrait être dû à des variations liées à la provenance de la plante, la période de cueillette, aux conditions d'échantillonnage et de manipulation.

### 3.Préparation des différents extraits de la plante *Pulicaria odora*

#### 3.1. Extraction de l'huile essentielle

Le rendement de l'hydrodistillation était relativement faible (environ 1ml pour toute la quantité de feuilles utilisées), ce qui pourrait être du : à une faible teneur de la plante en HE, à une cueillette faite non coïncidée avec la période de production maximale de l'huile essentielle et la méthode d'extraction. Nous n'avons pas pu le calculer d'une manière exacte, faute de nombreuses déperditions (une quantité d'HE adhérente aux parois de l'appareillage, une autre quantité restée en suspension dans le distillat...)

L'HE de *Pulicaria odora* obtenue est de couleur jaune et présente une odeur forte caractéristique de la plante. Nous avons remarqué qu'elle avait tendance à se gélifier au froid et reprend son aspect liquide normal à température ambiante.



**Figure 36** : Photographie de l'HE de *P. odora*  
(Laboratoire de botanique médicale, 2019)

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

---

### 3.2. Extraits alcooliques

**Tableau XII :** Couleur et rendement des différents extraits de *Pulicaria odora*

Extrait	Couleur	Rendement %
EHMF	Verte	15 %
EMF	Verte foncée	20 %

Les résultats obtenus montrent que l'extrait méthanolique de la plante, représente le rendement le plus élevé (20%), car l'usage du méthanol pur permet d'extraire au maximum les composés organiques.

### 4. Activité antimicrobienne des différents extraits et de l'HE de *P. odora*

#### ✓ Contrôle de qualité des antibiotiques

**Tableau XIII :** Résultats du contrôle de qualité des antibiotiques sur les souches testées.

Souches	ATB	Diamètre d'inhibition / Profil de sensibilité
<i>S. aureus</i>	AMP (10µg)	0,6mm : résistant
	CX(30 µg)	23mm : intermédiaire
	C(30 µg)	25mm : sensible
	P(10µ)	18mm : résistant
	AK(30 µg)	24mm : sensible
	TEI(30µg)	20mm : sensible
	VA (30 µg)	21mm : sensible
	OF (5 µg)	28mm : sensible
	DO (30 µg)	25mm : sensible
	OX (5 µg)	26mm : sensible
	CD (2 µg)	34mm : sensible
	RP (15 µg)	30mm : sensible
	E (15 µg)	31mm : résistant
	R (5 µg)	36mm : sensible
	FAD (10 µg)	32mm : sensible
KMN (30 µg)	23mm : sensible	
<i>P. aeruginosa</i>	PIR (100 µg)	26mm: sensible
	TOB (10 µg)	26mm: sensible
	LE (5 µg)	24mm: sensible
	AK(30 µg)	21mm: sensible
	CL(10 µg)	16mm: sensible

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

<i>K. pneumoniae</i>	CZ(30 µg) NA(30 µg) C(30 µg) AMP(10 µg) AK(30 µg)	0,6mm : résistant 15mm : intermédiaire 28mm: sensible 0,6mm: resistant 19mm: sensible
<i>E.coli</i>	CZ(30 µg) NA(30 µg) C (30 µg) AMP (10 µg) AK (30 µg)	26mm : sensible 15mm : intermédiaire 28mm : sensible 0,6mm : résistant 19mm : sensible

**Remarque :** les diamètres d'inhibition des deux souches (*S. aureus*, *P. aeruginosa*) sont validés selon le protocole de standardisation des antibiotiques (CLSI) sauf pour les souches *E. coli* et *K. pneumoniae* leurs diamètres d'inhibition ne sont pas validés.

*K. pneumoniae* s'est avérée mutée, elle a acquis une résistance à la CZ30.

### 4.1 Activité antibactérienne

La sensibilité des germes vis-à-vis les différents extraits a été classée par le diamètre des halos d'inhibition comme suite :

Souche non sensible (-) pour les diamètres moins de 8mm ;

Souche sensible (+) pour des diamètres de 8 à 14mm ;

Souche très sensible (++) pour des diamètres de 15 à 19mm [140].

**Tableau XVI :** Résultats de l'activité antibactérienne des différents extraits et de l'HE de *P. odora*.

Extraits de plante <i>P. odora</i> avec différents volumes en (µl)		Diamètre d'inhibition pour les souches microbiennes en (mm)/ profil de sensibilité							
		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Escherichia coli</i>	
Extrait brut des feuilles fraîches	10	6	-	6	-	6	-	6	-
	20	6	-	6	-	6	-	6	-
	30	6	-	6	-	6	-	6	-
	50	6	-	6	-	6	-	6	-
Extrait brut des racines	10	6	-	6	-	6	-	6	-
	20	6	-	6	-	6	-	6	-

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

	30	6	-	6	-	6	-	6	-
	50	6	-	6	-	6	-	6	-
Extrait hydro-méthanolique	10	10	+	6,33	-	9	+	9,33	+
	20	12,33	+	7,66	-	7,33	-	11	+
	30	13,66	+	10	+	7,33	-	11,33	+
	50	15,33	++	11	+	13	+	15	++
Extrait méthanolique	10	6,66	-	6,33	-	8,33	+	7,33	-
	20	8	-	8,33	+	9,66	+	9,33	+
	30	8,66	+	9	+	10,66	+	9,66	+
	50	10,66	+	10,33	+	11,33	+	11	+
HE	10	12	+	6	-	10	+	10	+
DMSO (Témoin négatif)		6	-	6	-	6	-	6	-

### 4.1.1. Extraits bruts des feuilles et des racines

Les extraits bruts des feuilles fraîches et des racines n'ont donné aucun effet sur les souches bactériennes testées cela est observé par l'absence d'un halo d'inhibition autour du disque contenant l'extrait, ceci pourrait être expliqué par une mauvaise extraction des métabolites actifs à partir des cellules végétales (sans utilisation d'aucun solvant).

### 4.1.2. Extrait hydrométhanolique

La majorité des souches bactériennes testées étaient sensibles à l'extrait hydrométhanolique et le diamètre d'inhibition croit en augmentant la quantité de l'extrait utilisé (10, 20, 30 et 50  $\mu$ l) Une anomalie a été notée avec la souche *K. pneumoniae* qui s'est avérée sensible à la dose de 10  $\mu$ l de l'extrait et résistante aux doses de 20 et 30 $\mu$ l, ceci pourrait avoir un lien avec le caractère mutant de la bactérie que nous avons mise en évidence.

### 4.1.3. Extrait méthanolique

L'extrait méthanolique a donné des résultats positifs sur les différentes souches bactériennes. L'effet antimicrobien est observé à partir de la dose 20  $\mu$ l pour les souches *P. aeruginosa* et *E. coli*.

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

---

Pour *S. aureus* l'effet est observé à partir de la dose de 30 µl par contre cet extrait s'est révélé plus efficace sur la souche *K. pneumoniae*.

D'une manière générale nous avons remarqué que l'extrait hydrométhanolique était plus efficace que l'extrait méthanolique qui pourrait s'expliquer par une meilleure solubilité des principes actifs dans le mélange « eau + méthanol » que dans le méthanol pur.

### 4.1.4. Huile essentielle

L'huile essentielle a donné des résultats positifs avec les souches *S. aureus*, *K. pneumoniae* et *E. coli* en l'utilisant à une dose de 10 µl et des résultats négatifs avec *P. aeruginosa*.

Nous n'avons pas pu effectuer la détermination de la CMI faute du très mauvais rendement de l'HE et de la non disponibilité des milieux de culture.

## 4.2 Activité antifongique

Au cours de la réalisation de cette partie nous avons rencontré plusieurs obstacles tels que le problème de contamination, le manque des milieux de culture. De ce fait nous n'avons pas pu continuer notre travail et aboutir aux résultats attendus.

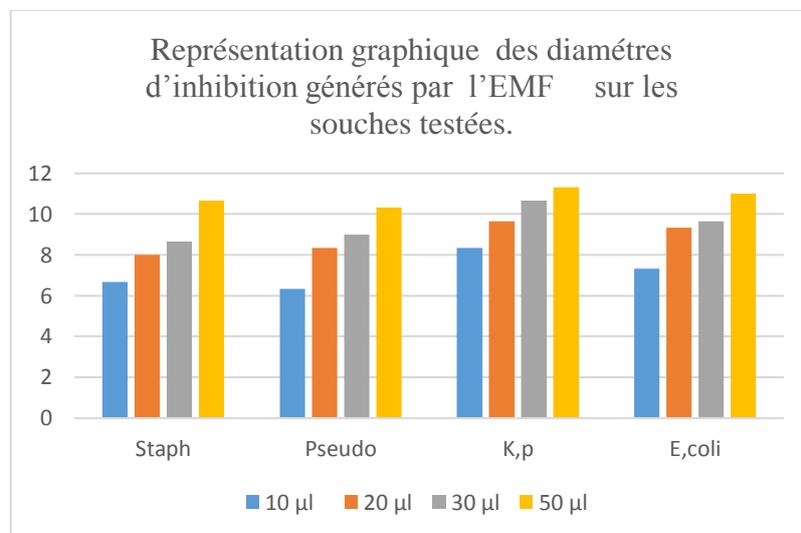
Concernant la plante *P. odora*, à notre connaissance, très peu de données ont été retrouvées concernant sa composition chimique et son activité biologique. Quant à sa structure anatomique aucune référence bibliographique ne l'a décrite, de ce fait notre travail constitue une originalité dans cette partie. Le peu de travaux disponibles sont axés sur l'effet des huiles essentielles. Ainsi, des huiles essentielles extraites des racines de cette plante (Ezoubeiri et al, 2005, Hanbali et al, 2005) [126,130] se caractérisent par une activité antibactérienne et antifongique. Cependant, des travaux menés avec différentes espèces du même genre, notamment des extraits de polyphénols méthanoliques de l'espèce *Pulicaria dysenterica* sont actifs sur les différentes souches bactériennes concordent en *grosso modo* avec nos résultats (Bahman et al, 2002) [133]. Les quelques différences notées de sensibilité des souches microbiennes aux extraits biologiques peuvent être expliquées par une adaptation évolutive liée étroitement aux conditions biotiques (l'espèce elle-même) et abiotique (milieu).

D'après Çolak et al, (2009) [134], la sensibilité d'un microorganisme à un extrait dépend des propriétés de type de polyphénols et du microorganisme lui-même. Dans notre étude, la souche bactérienne à Gram positif testée est plus sensible que les souches à Gram négatif. Cette différence dans la sensibilité aux extraits peut être attribuée à la différence de la structure entre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif (Shtayeh et al.,

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

1998) [135]. Selon Yakhlef et al., (2011) [136], la résistance des bactéries à Gram négatif n'est pas surprenante du fait que ces bactéries possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides qui est en relation avec la nature de leurs membranes externes composées de lipopolysaccharides qui forment une barrière imperméable aux composés hydrophobes.

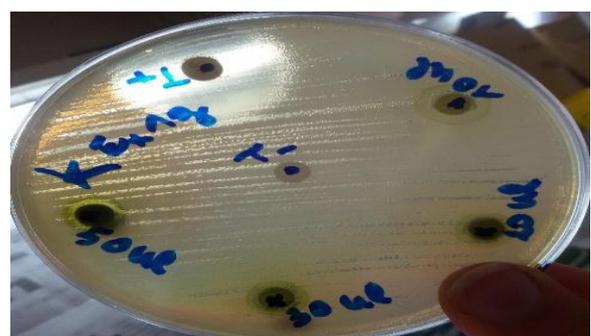
De plus, Trombetta et al, (2005) [137] ont conclu, l'effet antimicrobien des composés polyphénoliques est partiellement dû à une perturbation des fractions lipidiques de la membrane plasmique des bactéries. Selon ces auteurs, ces composés phénoliques altèrent la perméabilité de la membrane et causent ainsi la perte de ses organites intracellulaires. D'autres auteurs, Dhaouadi et al, (2010) [138] suggèrent que l'effet antimicrobien des polyphénols induit l'inhibition de la croissance bactérienne suite à leur adsorption sur la membrane cellulaire et leur interaction avec les enzymes.



**Figure 37 :** Représentation graphique des diamètres d'inhibition générés par l'EMF sur les souches testées.

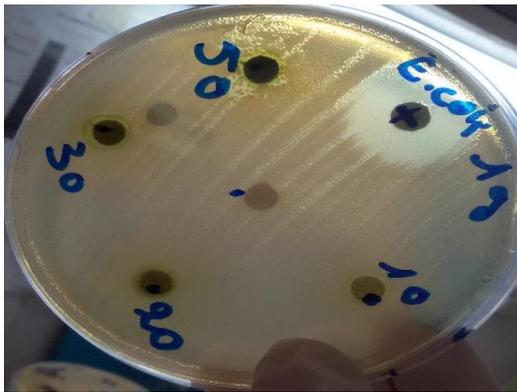


**Figure 38 :** Résultat de l'EMF testé sur *P. aeruginosa* (Photographie originale du laboratoire, 2019)



**Figure 39 :** Résultat de l'EMF pour *K. pneumoniae* (photographie originale du laboratoire, 2019)

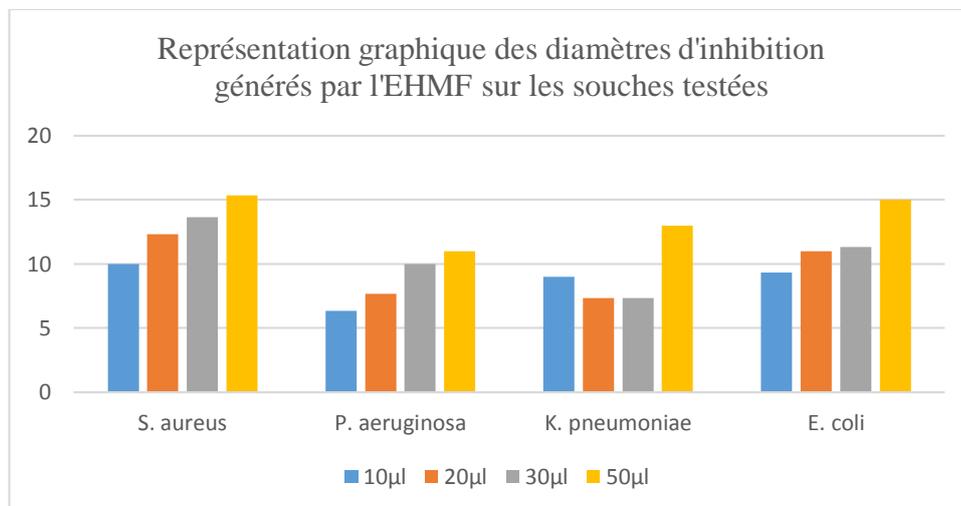
## RESULTATS ET DISCUSSIONS



**Figure 40 :** Résultat de l'EMF testé sur *E. coli* (photographie originale du laboratoire, 2019)



**Figure 41 :** Résultat de l'EMF testé sur *S. aureus* (photographie originale du laboratoire, 2019)



**Figure 42 :** Représentation graphique des diamètres d'inhibition générés par l'Ehmf sur les souches testées.



**Figure 43 :** Résultat de l'Ehmf testé sur *K. pneumoniae* (photographie originale du laboratoire, 2019)



**Figure 44 :** Résultat de l'Ehmf testé sur *E. coli* (photographie originale du laboratoire, 2019)

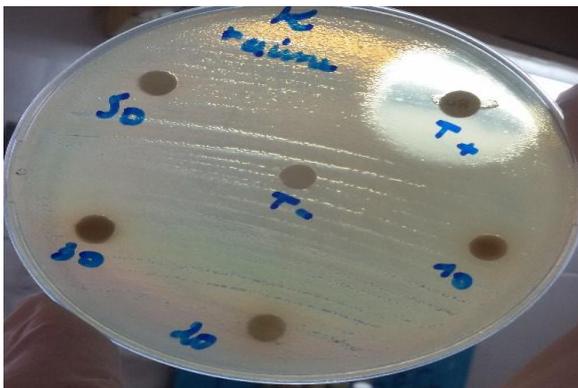
## RESULTATS ET DISCUSSIONS



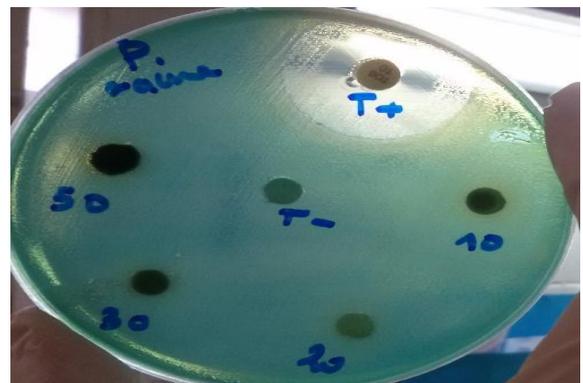
**Figure 45 :** Résultat de l'EHM testé sur *S. aureus* (photographie originale du laboratoire, 2019)



**Figure 46 :** Résultat de l'EHM testé sur *P. aeruginosa* (photographie originale du laboratoire, 2019)



**Figure 47 :** Résultat de l'EBR testé sur *K. pneumoniae* (photographie originale du laboratoire, 2019)



**Figure 48 :** Résultat de l'EBR testé sur *P. aeruginosa* (photographie originale du laboratoire, 2019)



**Figure 49 :** Résultat de l'EBF testé sur *P. aeruginosa* (photographie originale du laboratoire, 2019)

# Conclusion

## CONCLUSION

---

Les plantes aromatiques constituent une source insoupçonnée de molécules bioactives qui pourront servir à de nouvelles thérapies (aromathérapie) complémentaire aux thérapies conventionnelles.

Plusieurs études ont été réalisées sur les plantes appartenant à la famille des Astéracées, elles ont montré la richesse de ces dernières en composés bioactifs. Cependant, il existe peu de données et d'études évaluant la composition chimique et le potentiel antimicrobien de la plante *Pulicaria odora*. Dans ce contexte nous nous sommes intéressées à l'étude générale cette de plante en passant par son identification, criblage phytochimique, la préparation des différents extraits, extraction de l'huile essentielle et l'évaluation de son pouvoir antimicrobien.

Au terme de notre travail, l'étude botanique a confirmé l'identité de l'espèce, le screening phytochimique a révélé une abondance en composés polyphénoliques, flavonoïdes, tannins galliques et mucilages, nous avons également constaté que la poudre des feuilles de la plante présente une quantité moyenne en stérols et terpènes quant aux saponosides ils s'y retrouvent sous forme de traces et nous n'avons enregistré aucune contenance en alcaloïdes.

Un faible rendement en huile essentielle a été décelé en utilisant la technique d'hydrodistillation.

Concernant les résultats de l'activité antibactérienne nous avons noté qu'ils fluctuent d'un extrait à un autre en fonction de la nature du solvant et de la souche ciblée.

Nous avons remarqué que les extraits bruts des feuilles fraîches et des racines n'ont manifesté aucun effet antibactérien contre les souches *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* et *E. coli*. Par ailleurs, les extraits hydrométhanoliques et méthanoliques ont présenté un effet contre toutes les souches testées dont le meilleur a été observé notamment avec le mélange « eau + méthanol ».

L'huile essentielle extraite des feuilles de *Pulicaria odora* s'est révélée possédant un effet antibactérien vis à vis des souches testées.

## CONCLUSION

---

A l'issue de notre modeste travail qui constitue une contribution à la valorisation de la plante *Pulicaria odora* qui pourra faire le sujet d'études ultérieures plus approfondies concernant sa composition chimique et son activité biologique ainsi on suggère comme perspectives :

- 1- Caractérisation physicochimique de l'HE et une étude de son profil chimique.
- 2- Dosage et identification des principaux métabolites secondaires mis en évidence notamment les polyphénols.
- 3- Optimisation de certains paramètres conditionnant le rendement des HEs (période de récolte, séchage et méthode d'extraction) et des extraits de la plante (nature des solvants, protocole d'extraction).
- 4- Détermination de la CMI pour les souches étudiées et étendre les essais du pouvoir antimicrobien à d'autres souches bactériennes et fongiques.
- 5- Etude d'autres activités biologiques de la plante (activités cicatrisante, antiulcéreuse activité antioxydante...)

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [1] Karou D, Dicko MH, Simpore J, and Traore AS. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology*. 4 (8), 823-828.
- [2] FADWA E.L.H., MOHAMED A., AICHA E., CHAMUS E.A.G., FOUAD M., AHMED B., AMPARO M.B., H. BOVRA. (2005). Chemical composition and Antibacterial Activity of Essential Oils of *Pulicaria odorae* L., *J. of E thnopharm*. 99 : 399-401
- [3] TOUATI N., CASAS L., MARTINEZ DE LA OSSA E., BEJOU F., (2014). Green extraction methods of antioxydants from *Pulicaria odora*.
- [4] MEDDOUR R., MELLAL H., MEDDOUR-SAHAR O., DERRIDJ A. (2009). La Flore Médicinale et ses Usages en Kabylie (wilaya de Tizi- Ouzou, Algérie) : Quelques résultats d'une Etude Ethnobotanique. Faculté des Science Biologique et Science Agronomique, Université de Mouloud Mammeri, BP17 RT, 15 000, Tizi- Ouzou, Algérie. p. 184, 195.
- [5] AFSSAPS, 05/08. Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles
- ANSM, 2012. Suppositoires pédiatriques à base de terpènes destinés aux nourrissons et aux enfants - Retrait de lots - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. ANSM. URL <http://ansm.sante.fr/S-informer/Informations-de- securite-Retraits-de-lots-et-de-produits/Suppositoires-pediatriques-a-base-de-terpenes- destines-aux-nourrissons-et-aux-enfants-Retrait-de-lots/> (language) /fre-FR (accédé le 07/07/2016).
- [6] Gilly, G., 1997. Les plantes à parfum et huiles essentielles à Grasse - Botanique, culture, chimie, production et marché. L'Harmattan (Ed), Paris, France, 428 p.
- [7] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Tox.* 46, 446-475
- [8] Mishra, A.K. and Dubey, N.K., 1994. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1101-1105.
- [9] Bruneton J. (1999) -Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition, Ed. TEC et DOC, Paris
- [10] Guignard J.L., 1995. Abrégé de botanique. Ed. Masson, 285 p.
- [11] Houël E., 2011. Etude des substances bioactives issues de la flore amazonienne. Analyse de préparations phytothérapeutiques à base de *Quassia amara* L. (Simar ou baceae) et *Psidium acutangulum* D.C. (Myrtaceae) utilisées en Guyane Française pour une indication antipaludique. Identification et analyse métabolique d'huiles essentielles à activité antifongique. Thèse de doctorat en chimie des substances. Université des Antilles et de la Guyane. 220P.
- [12] Gershezon J. et Dudarveva N., 2007. The function of terpen natural products in the natural world. *Natural chemistry and Biology*. Vol.3 (7) : 407-414.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [13] Unsicker S.B.G. et Kunert G. 2009. Protective performers: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Current Opinion in Plant Biology* Vol. 12(4):479-485.
- Utida S., 1954. Phase dimorphism observed in the laboratory population of the cowpea weevil, *Callosobruchus quadrimaculatus*. *Japanese Journal Applied of Zoology*. Vol. 18: 161-168.
- [14] Figueiredo R.O., Stefanini M.B. Ming L.C. Maio Marques M.O. & Facanali R., 2004. Essential oil composition of *Aloysiatriphylla* (L'Herit.) Britton leaves cultivated in Botucatu, Sao Paulo, Brazil. *Acta Horticultura* 629:131-134.
- [15] TEISSEIRE P.J. (1991), *Chimie des substances odorantes*. Tec et Doc., Lavoisier, Paris, France. 480p
- [16] MANN J. (1987), *Secondary metabolism*. Second edition, Clarendon Press, Oxford, p.374
- [17] SPURGEON et PORTER (1981), *Biosynthesis of isoprenoid compounds*, 1-46.
- [18] Gonny M., Bradesi P. & Casanova J., 2004.- Identification of the components of the essential oil from Corsican *Daucus carota* L. using <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy. *Flavour and Fragrance Journal*. 19 : 424-433.
- [19] Boti J.B., Muselli A., Tomi F., Kouakou G., N'guessan Y.T. Costa J. & Casanova. 2006. – Combined analysis of cymbopogon giganteus Chiov. Leaf oil from Ivory Coast by GC/RI, GC/MS and <sup>13</sup>C-NMR. *Compte rendu de Chimie*. 99 : 164-168
- [20] Oussou K.R., 2009. – Etude chimique et activités biologiques des huiles essentielles de sept plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. Doctorat de l'Université de Cocody-Abidjan, 241p.
- [21] FRANCHOMME P. et PENOEL D. (1990), *Matière médicale aromatique fondamentale* (317-406), livre quatrième, l'aromathérapie exactement, encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. R. Jollois Edit., Limoge, 446p.
- [22] AZALENKO K. (1995), Contribution à la détermination des chemotypes d'une plante à huile essentielle du Togo : *Lippia mutiflora*. Mémoire d'ingénieur de travaux, ESTBA, Univ. Lomé.
- [23] KABER NZEYUMWAMI J /MEMOIRE Online. Caractérisation des huiles essentielles de trois plantes aromatiques : *Hyptis Spicigera*, *Pluchea Ovalis* et *Laggera Aurita* [En ligne]. Université de Lomé-Togo-DEA ; 2004 [consulté le 26 Décembre 2018]. Disponible sur : <https://www.memoireonline.com>.
- [24] BENOUALI Djillali. Extraction et identification des huiles essentielles [En ligne]. UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE D'ORAN « MOHAMED BOUDIAF » ; 2015 [Consulté le 10 Janvier 2019]. Disponible sur : [http://web.univusto.dz/faculte/facchimie/images/CHAPITRE\\_I\\_separation\\_et\\_analyses\\_des\\_biomolecules.pdf](http://web.univusto.dz/faculte/facchimie/images/CHAPITRE_I_separation_et_analyses_des_biomolecules.pdf)

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [25] El Haib A. VALORISATION DE TERPENES NATURELS ISSUS DE PLANTES MAROCAINES PAR TRANSFORMATIONS CATALYTIQUES [Thèse]. Toulouse : Université de Toulouse III- Paul Sabatier ; 2011.
- [26] J, Hadji-Minaglou F. La connaissance des huiles essentielles : qualité et aromathérapie. Paris : Editions Springer. 2012.
- [27] Bouderdara N. Séparation et détermination de structures des métabolites secondaires de *Cachrylibanotis* L [thèse]. Constantine : Université MENTOURI ; 2013.
- [28] SMADJA J. Les Huiles Essentielles. LCSNSA Université de la Réunion. Colloque GP3A. 2-3 juillet 2009; Tananarive
- [29] Mueller M.S., Runyambo N., Wagner I., Borrmann S., Dietz K., Heide L. (2004) :
- [30] Randomized controlled trial of a traditional preparation of *Artemisia annua* L. (Annual Wormwood) in the treatment of malaria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 98, 318-321.
- [31] Sokhna C. Molez J.F., Ndiaye P. (1997) : Test in vivo de chimio sensibilité de *plasmodium falciparum* à la chloroquine au Sénégal : evolution de la résistance et estimation de l'efficacité thérapeutique. Bull. Soc. Pathologie exotique 1997 ; 80(2) :83-89.
- [32] Chouitah O. Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de *Glycyrrhiza glabra* [thèse]. Oran : Université d'Oran, 2012.
- [33] Dipage JA. HUILES ESSENTIELLES OBTENTION ET RENDEMENT [En ligne]. 2009 [Consulté le 23 Fev 2019]. Disponible sur : <http://www.sainte-liberte.over-blog.com>
- [34] Benabdelkader T. Biodiversité, Bioactivité et Biosynthèse des composés terpéniques volatils des Lavandes Ailées, *Lavandula stoechas* Sensu Lato, un complexe d'Espèces Méditerranéennes d'Intérêt Pharmacologique [thèse]. Alger : Ecole Normale Supérieure de Kouba-Alger et Université Jean- Monnet de Saint-Étienne, 2012.
- [35] Franchomme P, JolloisR, Pénoel D. l'aromathérapie exactement : Encyclopédie de l'utilisation des extraits aromatiques. Paris : Éditions Roger Jollois ; 2001
- [36] Haddad D, Hadji D. Contribution à l'Etude de l'huile essentielle De *Myrtus communis* L. [Thèse]. Tizi Ouzou : Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, 2016.
- [37] Faye O., Lo M., Gaye O. (1997) : Connaissances et circuits thérapeutiques relatifs au paludisme en zone rurale Sénégalaise. Médecine tropicale ; 57 : 161-164.
- [38] Duval L. Les huiles essentielles à l'officine [thèse]. Rouen : Université de Rouen, 2012.
- [39] Laib I. Etude des activités antioxydantes et antifongiques de l'huile essentielles des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* sur les moisissures des légumes secs [thèse]. Constantine : Université Mentouri Constantine, 2011.
- [40] Taleb-Toudert K. Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région de Kabylie (Nord Algérien). Evaluation de leurs effets sur la bruche du niébé *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : Bruchidae) [Thèse]. Tizi-Ouzou : Université Mouloud Mammeri ; 2015.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [41] Abbes A. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* (Noukha) de la région de Tlemcen [Mémoire]. Tlemcen : Université Abou Bekr Belkaid ; 2014.
- [42] Lamamra M. Contribution à l'étude de la composition chimique et de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Tinguarra sicula* (L.) Parl. Et de *Filipendula hexapetala* Gibb. [Mémoire]. Setif : Université Ferhat Abbas.
- [43] Canalblog. Caractéristiques physiques et chimiques des huiles essentielles [En ligne]. 2012 [Consulté le 17 janvier 2019]. Disponible sur : <http://tpejbs2012.canalblog.com/archives/2012/02/13/23515518.html>
- [44] Wikipédia l'encyclopédie libre. Méthode de Karl Fischer [En ligne]. [Consulté le 24 Février 2019]. Disponible sur : [https://fr.wikipedia.org/wiki/M%C3%A9thode\\_de\\_Karl\\_Fischer](https://fr.wikipedia.org/wiki/M%C3%A9thode_de_Karl_Fischer)
- [45] Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Produits de Santé. Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles : Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles [En ligne]. Mai 2008 ; Consulté le 26 Fév 2019. Disponible sur le site : <http://www.afssaps.sante.fr>
- [46] Pinheiro A. Influence des composés oxygénés issus de la biomasse lignocellulosique et de leurs produits d'hydrodéoxygénation sur les cinétiques des réactions d'hydrotraitement de gazoles [thèse]. Lyon : université claudes bernard ; 2008.
- [47] Benazzouz M : Les huiles essentielles, importance et potentialités : mise à jour bibliographique des dernières recherches sur leurs emplois et toxicité et analyse de la composition de l'huile essentielle de quinze plantes des plus consommées au Maroc [Thèse]. Rabat : Université Mohammed V ; 2011.
- [48] Académie de Rouen. HPLC Principe et appareillage – Ressources pédagogique – Biochimie et Bio moléculaire [En ligne]. Rouen : 2010 [consulté le 15 Février 2019]. Disponible sur : <http://biotech.spip.ac-rouen.fr>
- [49] Valnet J. (1984) -Aromathérapie. Traitement des maladies par les essences des plantes. Maloine S.A. éditeur. Paris p 544.
- [50] ChemSuisse. Classification, étiquetage et emballage des huiles essentielles (Système SGH/CLP) Ver. 5.1 [En ligne]. Suisse: 2014 ; [Consulté en Déc 2018]. Disponible sur le site : [www.swissmedic.ch](http://www.swissmedic.ch)
- [51] Guignard, J. L. «Biochimie végétale», Masson, Paris, 2000, 166)
- [52] Capo, M. Couilleau, V. Valnette, C. «Chimie des couleurs et des odeurs ; cultures et techniques», 1990, 204.)
- [53] Sharkay, T. D. et Sunsun, Y. Ann. Rev. Plant physiol. Plant Mol. Biol. 2001,52, 407-436.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [54] Sallé, J. L. «Les huiles essentielles ; Synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie», Edition Frison –Roche, Paris, 1991,21.
- [55] Teissedre, P.L.; Waterhouse, A. L. J. Agric. Food Chem. 2000, 48, 3801-3805;
- [56] Ismaili Alaoui, M. et Bendjilali, B. 1<sup>er</sup> Séminaire Magrebin sur les plantes aromatiques, Tlemcen le 29-31Mai, 1990.
- [57] Latloui, N. et Tantaoui-Elaraki, A.J. Essent. oil Res.1994, 165.
- [58] Seu-Saberno, M. ; Blakeway, J. «La mouse de chêne, une base de la parfumerie», Pour la science, Edition Française de Scientific American, 1984, Mai, 83
- [59] Pharmacopée Européenne, 3ièmeEd. 1999, 103-130
- [60] Richard, J. A. Toxicology Brief 1999.
- [61] Ritschel, W.A., Sabouni, A., Hussain, A.S., 1989. Percutaneous absorption of coumarin, griseofulvin and propranolol across human scalp and abdominal skin. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 11, 643–646
- [62] Kaloustian, J., Hadji-Minaglou, F., 2013. La connaissance des huiles essentielles : qualitologie et aromathérapie : Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée. Springer Science & Business Media.
- [63] Mailhebiau, P., Soulier, J.-M., Azémar, J., 1992. Collège d'aromathérapie Philippe Mailhebiau : étude et prescription de la médecine aromatique. C. A. P. M. : Nouvelles presses internationales, Andouillé.
- [64] Zimmermann, T., Seiberling, M., Thomann, P., Karabelnik, D., 1995. [The relative bioavailability and pharmacokinetics of standardized myrtol]. *Arzneimittel for schung* 45, 1198–1201
- [65] Franchomme, P., 2015. La science des huiles essentielles médicinales. Guy Trédaniel, Paris.
- [66] Aoshima, H., Hamamoto, K., 1999. Potentiation of GABAA receptors expressed in *Xenopus* oocytes by perfume and phytoncid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 743–748
- [67] Millet, Y., Jouglard, J., Steinmetz, M. D., Tognetti, P., Joanny, P., & Arditti, J. (1981). Toxicity of some essential plant oils. Clinical and experimental study. *Clinical Toxicology*, 18(12), 1485-1498.
- [68] Miyazawa, M., Shindo, M., & Shimada, T. (2002). Metabolism of (+)-and (–)-Limonenes to Respective Carveols and Perillyl Alcohols by CYP2C9 and CYP2C19 in Human Liver Microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, 30(5), 602-607
- [69] Jäger, W., Našel, B., Našel, C., Binder, R., Stimpfl, T., Vycudilik, W., & Buchbauer, G. (1996). Pharmacokinetic Studies of the Fragrance Compound 1, 8-Cineol in Humans during Inhalation. *ChemicalSenses*, 21(4), 477-480.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [70] Degryse, A.C. ; Delpla, I ; Voinier, M.A. «Atelier Santé Environnement, Risques et bénéfiques des huiles essentielles», IGS. EHESP. 2008
- [71] (Eisenhut M. (2007) -The toxicity of essential oils, article in presse, International Journal of Infectious Diseases. 11(4): 365.
- [72] Opdyke, D.L., Letizia, C., 1983. Monographs on fragrance raw materials. Food Chem. Toxicol. 21, 645-667.
- [73] Brant, C. H., Haire, S. D., & Stumpe, A. R. (1951). Oil of chenopodium poisoning. The Journal of Pediatrics, 39(6), 742-744.
- [74] Tisserand, R., Young, R., 2013. Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals, 2nd ed. Churchill Livingstone.
- [75] Munro, I. C., & Daniel ewska-Nikiel, B. (2006). Comparison of estimated daily intakes of flavouring substances with no-observed-effect levels. Food and Chemical Toxicology, 44(6), 758-809.
- [76] Association Canadienne des Thérapeutes en Médecines Douces (ACTMD). Sécurité avec les huiles essentielles. [Consulté le 15/02/2019]. Disponible sur : <http://www.Actmel.org>.
- [77] Agence Européenne de Produits Chimiques (ECHA). Focus sur les huiles essentielles FAQ REACH & CLP [En ligne]. France 1907 [mis à jour en 2008 ; consulté le 25 Déc 2018]. Disponible sur : <http://reach-info.ineris.fr>
- [78] loi n°85- 05 du 16 février 1985 relative à la protection et à la promotion de la santé
- [79] Ministère de la santé et de la population. LA PHARMACIE Documentation juridique. El-Reghaia ; 1997.
- [80] Aquaportail. Définition bactérie [en ligne].2007 [mis à jour le 27 /03 /2018 ; consulté le 14 Fév 2019]. Disponible sur : <https://www.aquaportail.com/definition-435-bacterie.html>
- [81] Jean-Francois-pillou/ LE JOURNAL DES FEMMES SANTE : Antimicrobien- Définition [en ligne]. [Mis à jour le 25 JUIN 2014 à 10 :28 ; consulté le 10/02/2019]. Disponible sur : <https://sante-medecine.journaldesfemmes.fr>
- [82] structure schématique d'une bactérie. [Consulté le 18 Avril 2019]. Disponible sur : <https://www.futura-sciences.com>
- [83] Goetz P, Ghedira K. Phytothérapie anti-infectieuse. Paris : Springer, 2012.
- [84] Franchomme P, JolloisR, Pénoel D. l'aromathérapie exactement : Encyclopédie de l'utilisation des extraits aromatiques. Paris : Éditions Roger Jollois ; 2001
- [85] Mayer F. Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie par : UTILISATIONS THERAPEUTIQUES DES HUILES ESSENTIELLES : ETUDE DE CAS EN MAISON DE RETRAITE [Thèse].Nancy : Université de Lorraine ; 2012.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

[86] Campus de Parasitologie-Mycologie - Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL). [En ligne]. [Mise à jour le 10/10/2016 ; Consulté le 26 novembre 2019]. Disponible sur : <http://campus.cerimes.fr>

[87] Caillet S. Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. [En ligne]. [Consulté le 22 décembre 2019]. Disponible sur : [http://www.labo-resala.com/fiches/fiches\\_huiles\\_essentielles.pdf](http://www.labo-resala.com/fiches/fiches_huiles_essentielles.pdf)

[88] La rédaction de Futura. [En ligne]. [Consulté en octobre 2019]. Disponible sur le site : <https://www.futura-sciences.com>

[89] virologie. Systematique virale [En ligne]. [Consulté le 15 mai 2019]. Disponible sur <http://www.microbiologie-medicale.fr>

[90] Maisonneuve L. Le prochain défi des H.E : les virus. [En ligne]. 2015 [Consulté le 14 février 2019]. Disponible sur : <https://www.alternativesante.fr>

[91] Grand guide des HE (Santé beauté bien-être Hachette pratique) Alessandra moro buronzo page 24-25.

[92] Randrianarivelo R. ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE D'UNE PLANTE ENDEMIQUE DE MADAGASCAR « *Cinnamosmafragrans* », ALTERNATIVE AUX ANTIBIOTIQUES EN CREVETTICULTURE. Antananarivo : Université d'Antananarivo ; 2010.

[93] Toure D. ETUDES CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES DE QUATRE PLANTES AROMATIQUE MEDICINALES DE COTE D'IVOIRE. [Mémoire]. Abidjan : Université Félix Houphouët-Boigny ; 2015.

[94] Bourgoud F., Gravot A., Milesie S. et Gontier E. (2001). Production of plant secondary metabolite: ahistorical perspective. *Plant science*. 161: 839-851.

[95] Lee D, Yoon M. H., Kang Y. P., Yu J., Park J. H., Lee J., Kwon S. W. (2013). Comparison of primary and secondary metabolites for suitability to discriminate the origins of *Schisandrachinensis* by GC/MS and LC/MS. *Food Chemistry* 141: 3931–3937.

[96] Ali M., Abbasi B. H. and Ul-haq I. (2013). Production of commercially important secondary metabolites and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. *Industrial Crops and Products* 49: 400-406.

[97] Troppens D. M., Chu M., Holcombe L. J., Gleeson O., O'Gara F., Read N. D. and Morrissey J. P. 2013. The bacterial secondary metabolite 2, 4-diacetylphloroglucinol impairs mitochondrial function and affects calcium homeostasis in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* 56: 135–146. 206

[98] Iriti M. (2013). Plant neurobiology, a fascinating perspective in the field of research on plant secondary metabolites. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 10819-10821.

[99] Faugas G. Guide des travaux pratique en matière médicale pharmacognosie. France : JOUVE ; 1965.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [100] Max R. Dominique R. Didierguedon. Christelle R-S. Elsa R. 120 plantes médicinales, Edition 9. Paris : Alpen édition, France ; 2007.
- [101] Grunwald J. Janick C. guide de la phytothérapie. 2ème édition. Italie : marbout ; 2006.
- [102] Iserin P. Encyclopédie des plantes médicinales. 2ème édition. Londres : Larousse ; 2001.
- [103] Sarni-Manchado P., Cheynier V. 2006. Les polyphénols en agroalimentaire. Ed. Lavoisier. (Tec et Doc), Paris, 300-398.
- [104] Middleton E et al .2000 .The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation heart disease, and cancer pharmacological review, vol 52, 4:673-751.
- [105] Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie, Phytochimie, Plante médicinales. Lavoisier Technique& Documentation, 4ème Edition. Paris.
- [106] Rock, E. (2003). Stress oxydant, micronutriments et santé. Inra – CRNH, unité des maladies métaboliques et micronutriments 63122 St Genès Campanelle. Université d'été de nutrition –Clermont- Fernand. p. 37-42.]
- [107] Couplan F. Les belles vénéneuses. Equilibres Aujourd'hui : France ; 1990.
- [108] PARIS R.R ET MOYSE H. (1965) Précis de matière médicale, Tome 1, Masson et Cie, Ed Paris.
- [109] MINKUE S M'ENY ; (2000) ; étude chimique des substances extractibles d'Okoumé ; thèse M.Sc ; Univ. Laval.
- [110] ODILE MEYER ;( 2004) ; « Biosynthèse des isoprénoïdes : synthèses d'analogues du 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate, inhibiteurs potentiels de la voie du méthylérythritol phosphate » ; Thèse de Doctorat ; Univ. Louis Pasteur ; pp :17-22.
- [111] Cartier O. roux D. Boutanique. Pharmacognosie. Phytothérapie. 3ème édition ; France : Wolterskluwer. 2007
- [112] FAUGERAS G., LAVENIR R. (1965) ; Guide de travaux pratiques d'essai des drogues végétales ; édition VIGO FRERES, 175pages.
- [113] VIGOR C., VERCAUTEREN J., MONTELS J. (2009/2010) ; Travaux pratiques de pharmacognosie ; Laboratoire de Pharmacognosie, Université Montpellier 1, 49pages.
- [114] Pharmacopée européenne 2008 7ème édition
- [115] Diallo A. (2005). Etude de la phytochimie et des activites biologiques de *Syzygium guineense* Willd. (Myrtaceae). Thèse de Doctorat en Pharmacie. Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de Bamako, Mali.
- [116] EL-Haoud H, Boufellous M, Berrani A, Tazougart H, Bengueddour R. SCREENING PHYTOCHIMIQUE D'UNE PLANTE MEDICINALE: *Mentha Spicata* L. American Journal

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

of Innovative Research and Applied Sciences. [En ligne]. Publié le 25 Octobre 2018 [consulté le 12 mars 2019] ; [227]. Disponible sur : <https://www.american-jiras.com>

[117] République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de la Santé- de la Population et des de la Réforme Hospitalière – Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire). 7ème édition 2014. Disponible sur le site : <http://www.Sante.dz/aarn/index.htm>

[118] Silva F, Ferreira S, Duarte A, Mendoça DI, Domingues FC. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B Phytomedicine. 2011. 19 : [42– 47]

[119] Belhattab R. (2007). Composition chimique et activité antioxydante, antifongique et anti aflatoxinogène d'extraits d'*Origanum glandulosum* Desf, et *Marrubium vulgare* L (famille des Lamiaceae). Thèse de doctorat d'état Dépt Biologie, UFA Setif.

[120] BENJELALI B., TANTAOUI E.A. & ZSMAILI- ALAOUI M. (1986). Méthodes d'études des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. Plantes médicinales et Phytothérapie, 20,155-167.

[121] Ouis N. ETUDE CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES DE CORIANDRE, DE FENOUIL ET DE PERSIL [thèse]. Oran : Université d'Oran 1. 2015

[122] QUEZEL P et SANTA S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et régions désertiques méridionales. Tome2. Centre national de la recherche, Paris

[123] Williams CA, Harborne JF, GreenhamRJ, Grayer RJ, Kite GC and Eagles J. (2003). Variations in lipophilic and vacuolar flavonoids among European *Pulicaria* species. Phytochemistry. 64, 275-283.

[124] Bayer E, Buttler KP, Finkenzerler X et Grau J. (1990). Guide de la flore méditerranéenne. Ed : Delachaux et Niestlé. Paris, p. 287.

[125] RAMEAU J-C., MAUSIO D., DUME G. et GAUBERVILLE C. (2008). Flore forestière française (guide écologique illustré). Edition Agro Paris Tech-ENGREE.

[126] Ezoubeiri A., Gadhi C.A., Fdil N., Benharref A., Jana M., Vanhaelen M. 2005. Isolation and antimicrobial activity of two phenolic compounds from *Pulicaria odora* L. Journal of Ethnopharmacology, 99: 287-292.

[127] Lewis k., Ausubel FM. 2006. Prospects for plant derived antibacteriel. Nature Biotechnology, 24: 1504-1507.

[128] Awen B.Z., Unnithan C.R., Ravi S., Lakshmanan A.J. 2010. GC-MS analysis, antibacterial activity and genotoxic property of *Erigeron mucronatus* essential oil. Natural Product Communication, 5: 621-624.

[129] MEDDOUR R., MELLAL H., MEDDOUR-SAHAR O., DERRIDJ A. (2009). La Flore Médicinale et ses Usages en Kabylie (wilaya de Tizi- Ouzou, Algérie) : Quelques résultats

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

d'une Etude Ethnobotanique. Faculté des Science Biologique et Science Agronomique, Université de Mouloud Mammeri, BP17 RT, 15 000, Tizi- Ouzou, Algérie. p. 184, 195.

[130] Hanbali FE, Akssira M, Ezoubeiri A, Gadhi CEA, Mellouki F, Benherraf A, Amparo M. Blazquez AM and Boira H. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Pulicaria odora* L. Journal of Ethnopharmacology. 99, 399-401.

[131] Hussein S. R., Marzouk M. M., Soltan M. M., Ahmed E. K., Said M. M., Hamed A. R. 2017. Phenolic constituents of *Pulicaria undulata* (L.) C. A. Mey. Subsp. Undulata (Asteraceae): Antioxidant protective effets and chemo systematic significances. Journal of Food and Drug Analysis, 25: 333-339.

[132] El-Negoumy S. I., Mansour R. M.A., Saleh N. A. M. 1982. Flavonols of *Pulicaria arabica*. Phytochemistry, 21(4): 953-954.

[133] Bahman N., Gholanreza A., Parivash G. 2002. Antimicrobial Activity of *Pulicaria dysenterica* L. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 1: 31-32.

[134] Çolak F., Savaroğlu F., İlhan S. 2009. Antibacterial and Antifungal Activities of *Arum maculatum* L. Leaves Extracts. Journal of Applied biological Sciences, 3(3) : 13-16.

[135] Shtayeh A., Yaghmour R., Faidi Y., Salem K., Al Nuri M. 1998. Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. Journal of Ethnopharmacology, 60: 265-271

[136] Yakhlef G., Laroui S., Hambaba L., Aberkane M. C., Ayachi A. 2011. *Ethnopharmacologie*, Évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus Vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle. *Phytothérapie*, 9 : 209-218.

[137] Trombetta D., Castelli F., Sarpietro M. G., Venuti V., Cristani M., Daniele C., Saija A., Mazzanti G., Bisignano G. 2005. Mechanisms of antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (6): 2774-2777

[138] Dhaouadi K., Raboudi F., Estevan C., Barrajo E., Vilanova., Hamdaoui M., Fattouch S. 2010. Cell Viability Effets, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Tunisian Date Syrup (Rub El Tamer) Polyphenolic Extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 59: 402-406.

# **ANNEXES**

**Annexe I:** les huiles essentielles totalement interdites pendant toute la grossesse et l'allaitement.

## Les huiles essentielles totalement interdites pendant toute la grossesse et l'allaitement

<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Absinthe</li> <li>■ Achillées</li> <li>■ Acores</li> <li>■ Aneths</li> <li>■ Anis étoilé (badiane)</li> <li>■ Armoises</li> <li>■ Aunée</li> <li>■ Balsamite</li> <li>■ Basilic camphré</li> <li>■ Boldo</li> <li>■ Buchus</li> <li>■ Cajeput</li> <li>■ Calament</li> <li>■ Camphrier du Japon (bois)</li> <li>■ Cannelle (sauf conseil professionnel)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Carvi</li> <li>■ Cèdres (sauf conseil professionnel)</li> <li>■ Chénopode</li> <li>■ Curcuma</li> <li>■ Cyprès bleu (et vert, sauf conseil professionnel)</li> <li>■ Eucalyptus dives (mentholé)</li> <li>■ Eucalyptus polybractea à cryptone</li> <li>■ Fenouil doux</li> <li>■ Germandrées</li> <li>■ Giroflier</li> <li>■ Hélichryse (sauf conseil professionnel)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Hysope officinale ssp officinale</li> <li>■ Lantana</li> <li>■ Lavande stoechade</li> <li>■ Menthes</li> <li>■ Moutarde noire</li> <li>■ Myrique baumier</li> <li>■ Niaouli (prudence)</li> <li>■ Origans</li> <li>■ Persils (simple, frisé)</li> <li>■ Ravensare anisé</li> <li>■ Romarin à camphre (sauf conseil professionnel)</li> <li>■ Romarin à verbénone (sauf conseil professionnel)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Rue odorante</li> <li>■ Sabine</li> <li>■ Santoline</li> <li>■ Sapin baumier</li> <li>■ Sapin blanc</li> <li>■ Sassafras</li> <li>■ Sauges</li> <li>■ Souchet</li> <li>■ Tagète</li> <li>■ Tanaisie</li> <li>■ Thuya</li> <li>■ Zédoaire</li> </ul>
---	--	---	--

**Annexe II:** Les Réactifs utilisés pour le screening phytochimique.

### 1. Réactifs pour drogue à alcaloïdes

✓ **Réactif de Mayer**

Chlorure mercurique.....	1,36 g
Iodure potassium.....	25g
Eau distillée.....	30 ml
Agiter jusqu'à dissolution puis ajouter :	
Eau distillée.....	q.s.p 100 ml

✓ **Réactif de Bouchardat**

Iode .....	2,9g
Iodure potassium.....	5 g
Eau distillée.....	q.s.p 100 ml

✓ **Réactif de Dragendorff**

Sous nitrate basique de bismuth.....	0,85g
Iodure potassium.....	8 g
Acide acétique glacial.....	10 ml
Eau distillée.....	70 ml

✓ **d'acide sulfurique à 10%**

## 2. Réactifs pour drogues à polyphénol

### ✓ Réactifs de Stiasny

Formol 30%.....100 ml  
Acide chlorhydrique concentré.....10 ml

### ✓ Solution de chlorure ferrique à 10 %

Chlorure ferrique cristallisé.....1 g  
Eau distillée.....q.s.p 10 ml

### ✓ Acétone

### ✓ Ethanol

## 3. Réactifs pour drogues à flavonoïdes

### ✓ Magnésium en rognures (réactif à « cyanidine »)

### ✓ Ethanol

### ✓ Acide chlorhydrique concentrée

## 4. Réactifs pour drogues à anthracénosides /quinones

### ✓ Réactif de Bornträger

Potasse en pastille.....30 g  
Ethanol .....q.s.p. 1 L

### ✓ d'acide sulfurique à 10%

### ✓ Eau oxygénée 30 volume

### ✓ d'éther éthylique

### ✓ Hydroxyde de sodium (NaOH à 50 g /L)

## 5. Réactifs pour drogues à stérols et triterpènes :

### ✓ Ether

### ✓ Anhydride acétique

### ✓ Chloroforme

### ✓ Acide sulfurique concentré

## ANNEXES

**Annexe III:** tableau de quelques HEs majeures dans la lutte contre les bactéries.

Dénomination latine	Plante et type d'extrait et partie utilisée	Molécule(s) d'intérêt	Précaution
<i>Cinnamomum verum</i> J. Presl.	HE cannelle écorce	Cinnamaldéhyde, eugénol	Caustique sur muqueuse et peau (choix galénique important)
<i>Cinnamomum verum</i> J. Presl	HE cannelle feuille	Eugénol, alcool cinnamique	Caustique sur muqueuse et peau (choix galénique important). Attention <i>per os</i> , l'eugénol est un antiagrégant plaquettaire
<i>Eugenia caryophyllata</i> Thumb.	HE girofle clou, griffe et feuille	Eugénol	Caustique sur muqueuse et peau (choix galénique important). Attention <i>per os</i> , l'eugénol est un antiagrégant plaquettaire)
<i>Satureja montana</i> L.	HE sarriette des montagnes sommité fleurie	Carvacrol	Caustique sur muqueuse et peau (choix galénique important)
<i>Satureja hortensis</i> L.	HE sarriette des jardins sommité fleurie	Carvacrol, thymol	Caustique sur muqueuse et peau (choix galénique important)
<i>Origanum compactum</i> Bentham	HE origan compacte partie aérienne	Carvacrol, thymol	Caustique sur muqueuse et peau (choix galénique important)
<i>Origanum vulgare</i> L.	HE origan d'Europe partie aérienne	Carvacrol, linalol, thymol	Caustique sur muqueuse et peau (choix galénique important)
<i>Thymus vulgaris</i> L.	HE thym ct thymol sommité fleurie	Thymol, carvacrol	Caustique sur muqueuse et peau (choix galénique important)
<i>Thymus vulgaris</i> L.	HE thym ct carvacrol sommité fleurie	Carvacrol, thymol	Caustique sur muqueuse et peau (choix galénique important)

## ANNEXES

**Annexe IV:** Tableau des principales huiles essentielles antivirales.

Dénomination latine	Plante et type d'extrait	Molécule(s) d'intérêt	Précaution
<i>Ormenis multicaulis</i> Braun-Blanquet et Maire	HE camomille du Maroc partie aérienne fleurie	Santolina alcool, yomogi alcool, linalol, artemisia alcool, citronellol	Aucune connue
<i>Monarda fistulosa</i> L. var. <i>menthaefolia</i> (Graham) Fernald. forma « sweet »	HE monarde géraniole	Géraniole	Aucune connue
<i>Thymus vulgaris</i> L.	HE thym ct thuyanol sommité fleurie	Thuyanol, linalol,	Aucune connue
<i>Thymus vulgaris</i> L.	HE thym ct linalol sommité fleurie	Linalol	Aucune connue
<i>Thymus vulgaris</i> L.	HE thym ct géraniole sommité fleurie	Géraniole	Aucune connue
<i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel.	HE arbre à thé rameau fraichement taillé	Terpinène-4-ol, globulol, viridoflorol	Aucune connue
<i>Nigella sativa</i> L.	HE nigelle cultivée semence	Thymoquinone, carvacrol, linalol, terpinène-4-ol, thymol	Aucune connue
<i>Myrocarpus frondosus</i> Freire Allemao	HE cabreuva des forêts, bois du tronc	Nérolidol trans, farnésol, cadinol, bisabolol $\alpha$	Aucune connue
<i>Mentha citrata</i> Ehrh.	HE menthe bergamotte origine France plante coupée pré fanée	Linalol, terpinéol $\alpha$ , géraniole	Aucune connue
<i>Inula graveolens</i> Desf.	HE inule odorante sommité fleurie	Bornéol, épi- $\alpha$ -cadinol, terpinéol $\alpha$	Aucune connue

**Annexe V :** Tableau des résistances naturelles chez les enterobactéries.

Bactérie	AMP/AMX	AMC	TIC/PIP	C1G	FOX	GEN	TCY	COL	NIT
<i>Klebsiella</i> spp.	R		R						
<i>C.koseri</i>	R		R						
<i>C.freundii</i>	R	R		R	R				
<i>E.cloacae</i>	R	R		R	R				
<i>E.aerogenes</i>	R	R		R	R				
<i>S.marcescens</i>	R	R		R				R	
<i>P.mirabilis</i>							R	R	R
<i>P.vulgaris</i>	R			R			R	R	R
<i>M.morganii</i>	R	R		R			R	R	R
<i>P.stuartii</i>	R	R		R		R	R	R	R
<i>Y.enterocolitica</i>	R	R	R	R	R				

**R :** Résistance naturelle.

## Résumé

Le présent travail est une contribution à la caractérisation *in-vitro* de l'effet inhibiteur de la plante *Pulicaria odora* cueillie dans les régions Ath Mendes et Ath Zmenzer se trouvant à quelques kilomètres de la ville de Tizi Ouzou. Cette plante est utilisée en médecine traditionnelle pour les traitements de divers dysfonctionnements physiologiques (ulcère ; cicatrice ; douleur post-partum). Le screening phytochimique a révélé une richesse en métabolites secondaires dans les feuilles de cette plante et l'extraction de l'huile essentielle par la technique d'hydrodistillation est constatée d'un faible rendement.

L'HE et les extraits de cette plante ont été testés sur quatre souches microbiennes pathogènes à savoir trois souches bactériennes à Gram négatif il s'agit d'*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* ; une souche bactérienne à Gram positif qui est *Staphylococcus aureus* et quelques espèces fongiques telles que *Candida albicans* et *Aspergillus niger*.

Des propriétés antimicrobiennes intéressantes de la plante étudiée ont été constatées sur la majorité des germes testés. Cette activité antimicrobienne sur des bactéries Gram (+) et Gram (-) peut contribuer à la lutte contre les maladies infectieuses.

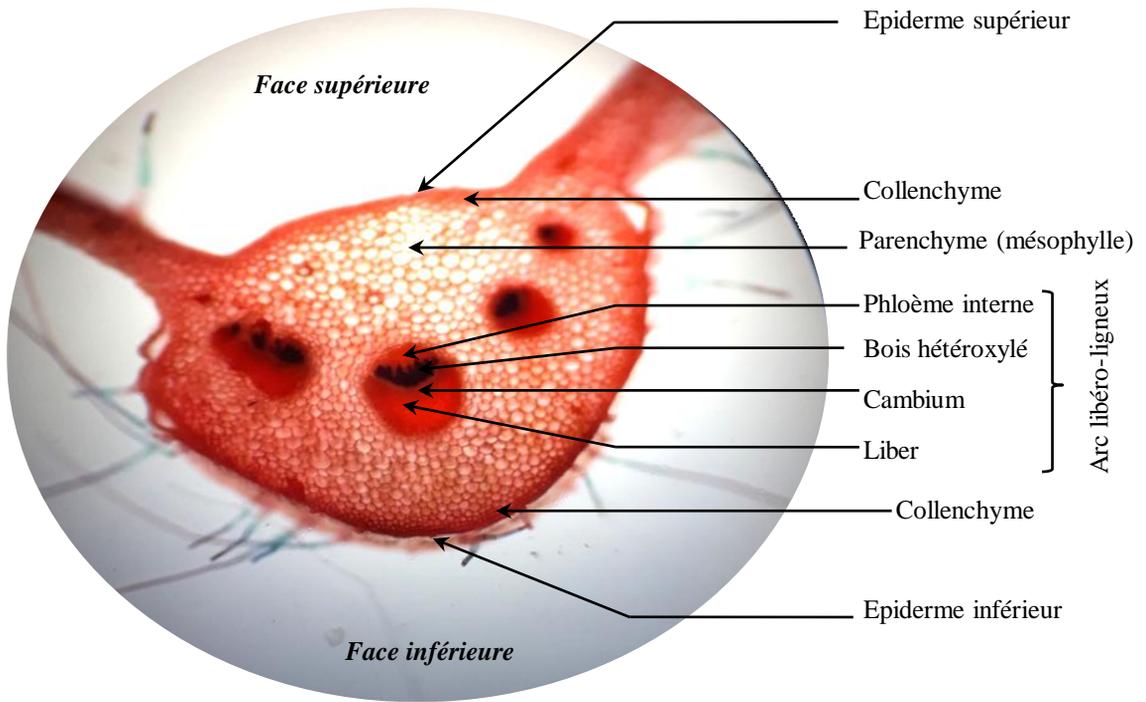
**Mots clés :** *Pulicaria odora*, screening phytochimique, extraits, huile essentielle, hydrodistillation, activité antimicrobienne.

## Abstract

The present work is a contribution to the *in-vitro* characterization of the inhibitory effect of the *pulicaria odora* plant harvested in the Ath Mendes and Ath Zmenzer regions, located a few kilometers from the city of Tizi Ouzou. This plant is used in traditional medicine for the treatment of various physiological dysfunctions (ulcer, scar, postpartum pain). The phytochemical screening revealed a richness of secondary metabolites in the leaves of this plant and the extraction of the essential oil by the hydrodistillation technique is found of a low yield.

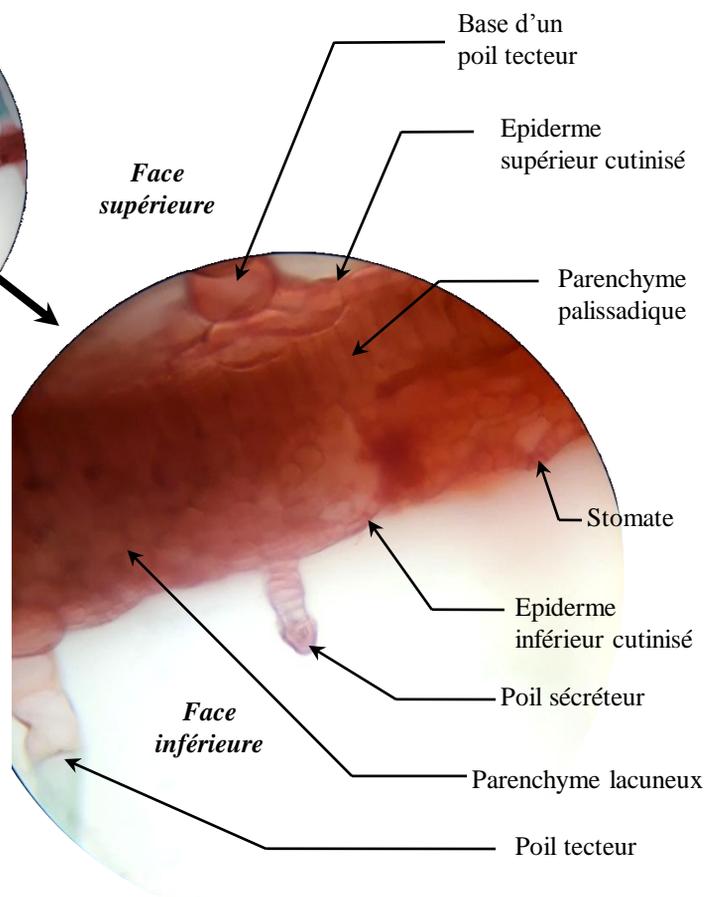
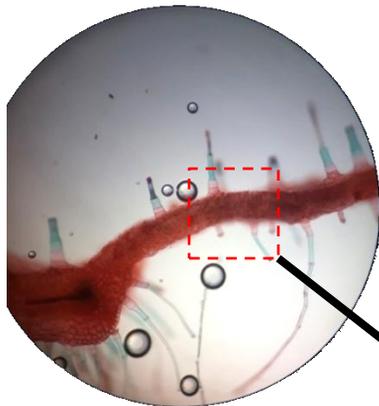
The essential oil and extracts of this plant have been tested on four microbial pathogenics trains, namely three Gram-negative bacterial strains: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*; a Gram-positive bacterial strain that is *Staphylococcus aureus* and some fungal species such as *Candida albicans* and *Aspergillus niger*. Interesting antimicrobial properties of the studied plant were found in the majority of the germs tested. This antimicrobial activity on Gram (+) and Gram (-) bacteria can contribute to the fight against infectious diseases.

**Keywords:** *Pulicaria odora*, phytochemical screening, polyphenols, essential oil, hydrodistillation, yield, antimicrobial activity.

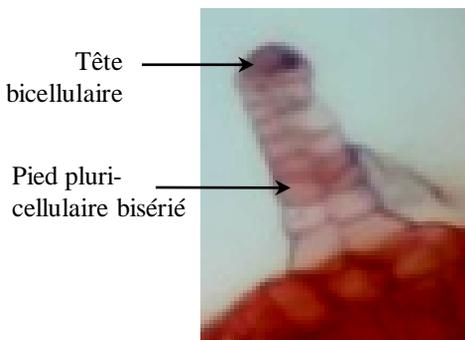


**Figure 33 : détails de la nervure principale observée au G. 10x10 (photographie originale, 2019)**

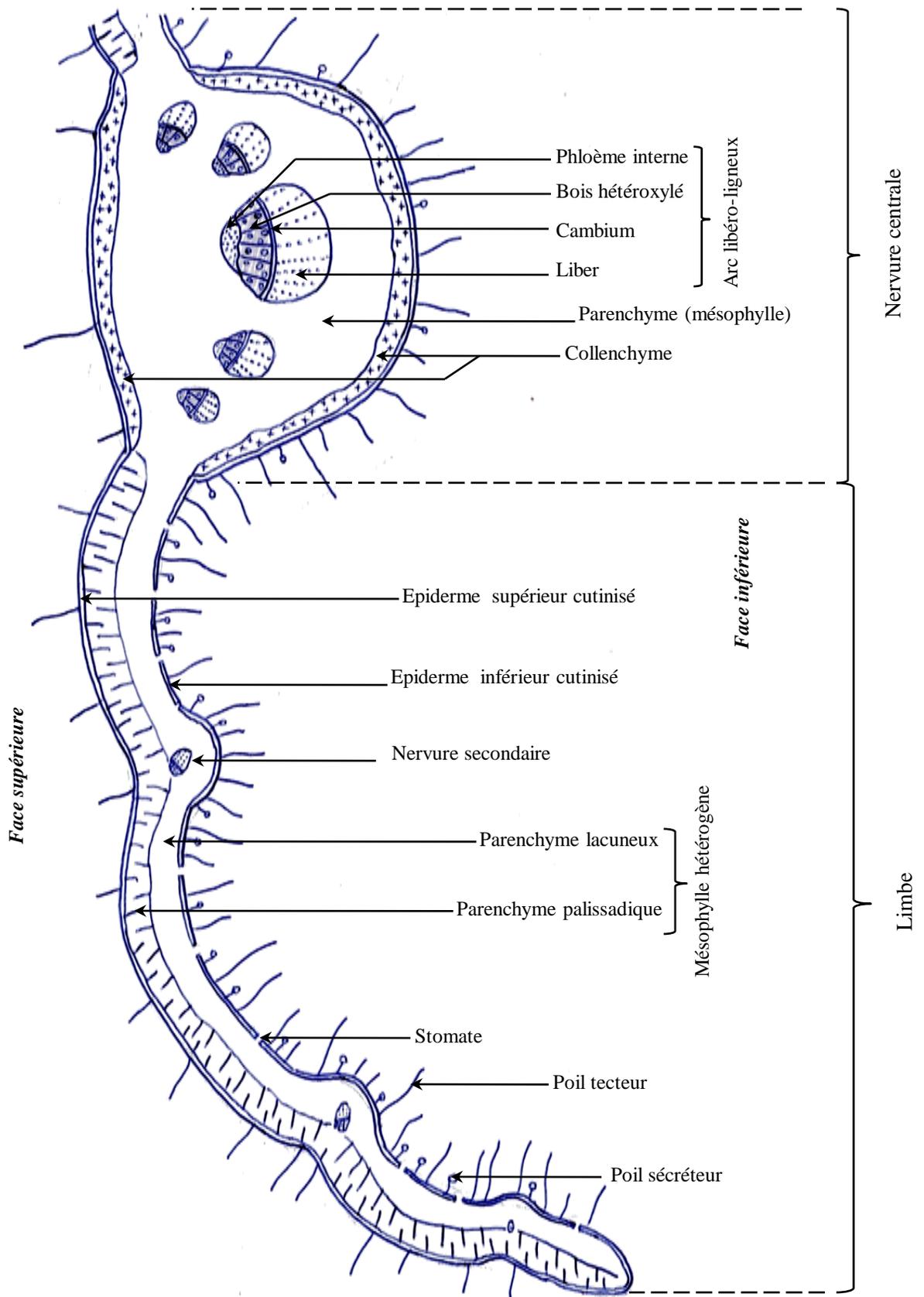
**Figure 31: coupe transversale de feuille de *Pulicaria odora* observée au microscope optique au G. 10x4 (photographie originale, 2019)**



**Figure 32 : détails du limbe observé au G. 10x10 (photographie originale, 2019)**

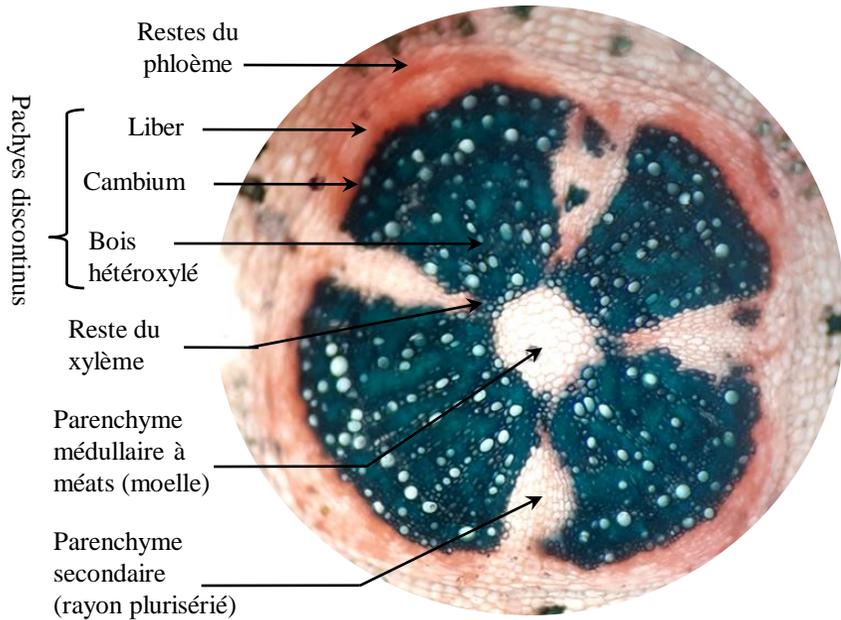
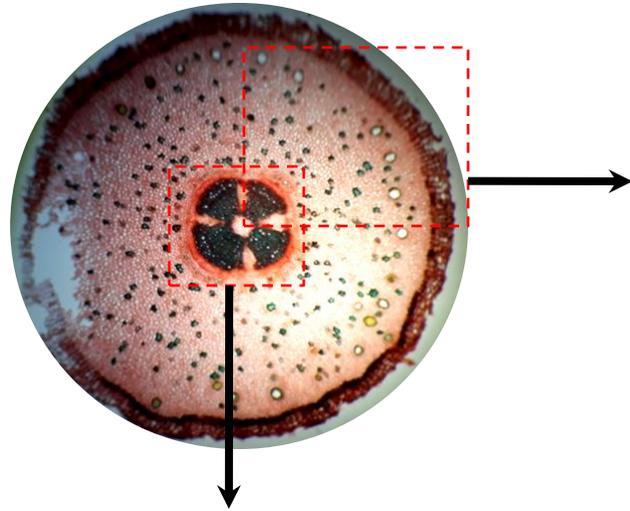


**Figure 34: détails d'un poil sécréteur observée au G. 10x40**

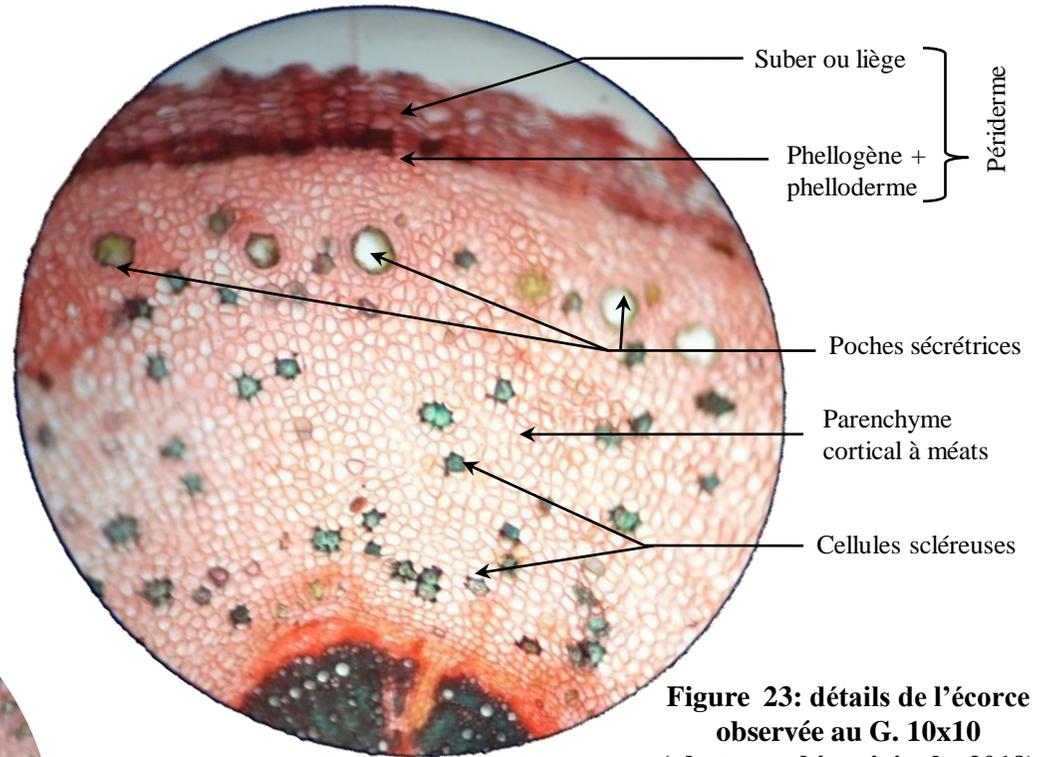


**Figure 35: schéma en figurés conventionnels d'une coupe transversale de feuille de *Pulicaria odora* (photographie originale, 2019)**

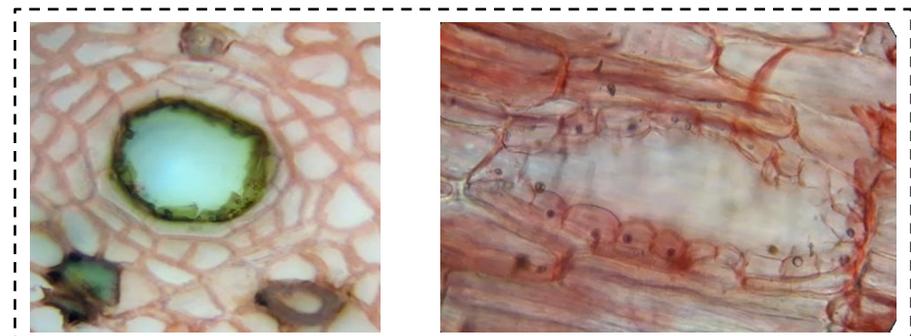
**Figure 22 : coupe transversale de racine de *Pulicaria odora* observée au microscope optique au G. 10x4**  
(photographie originale, 2019)



**Figure 24 : détails du cylindre central observé au G. 10x10**  
(photographie originale, 2019)



**Figure 23: détails de l'écorce observée au G. 10x10**  
(photographie originale, 2019)



Sur coupe transversale

Sur coupe longitudinale

**Figure 25: détails d'une poche sécrétrice observée au G. 10x40**  
(photographie originale, 2019)

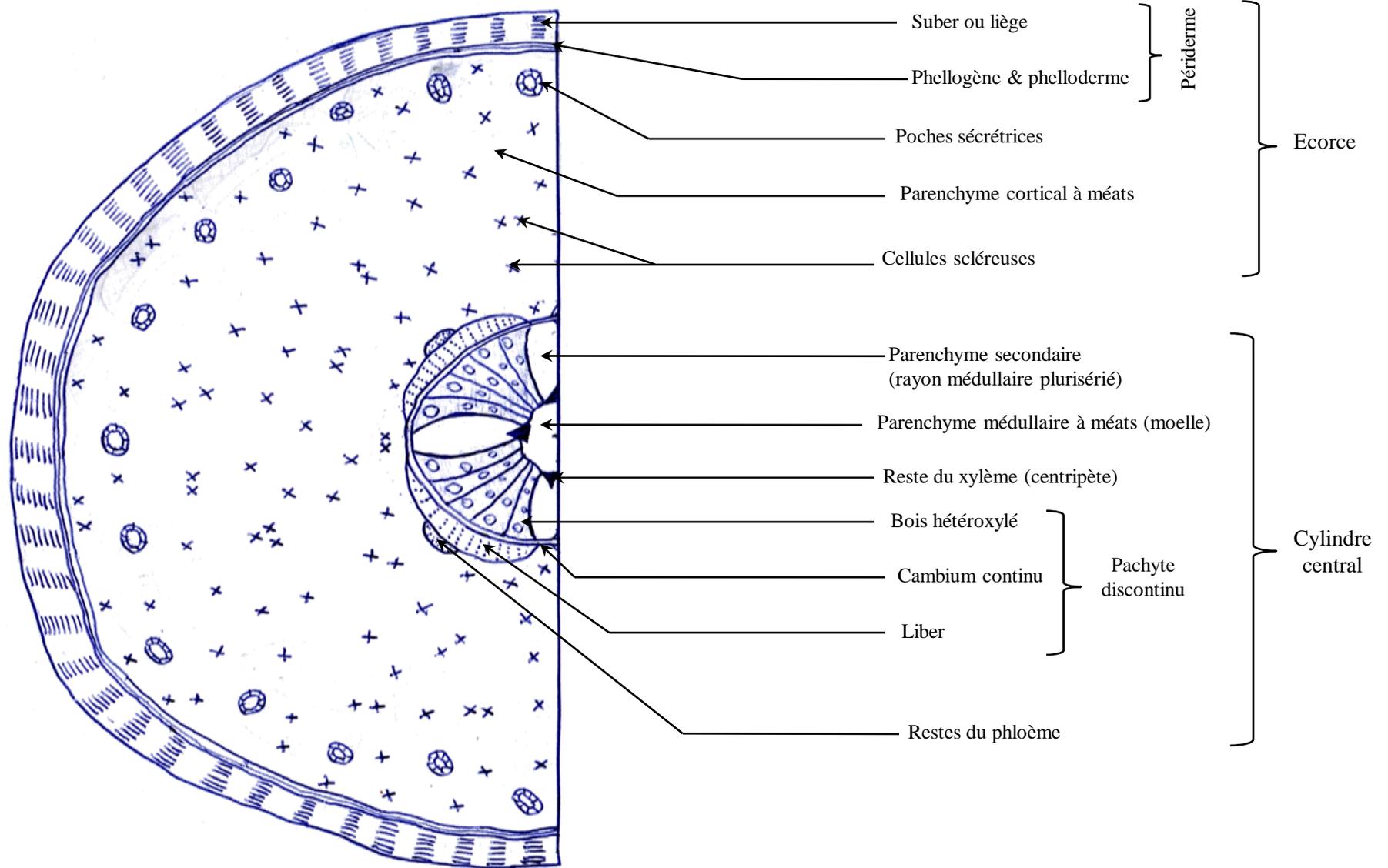
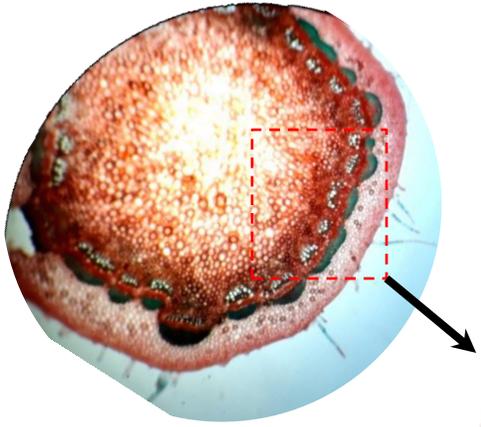
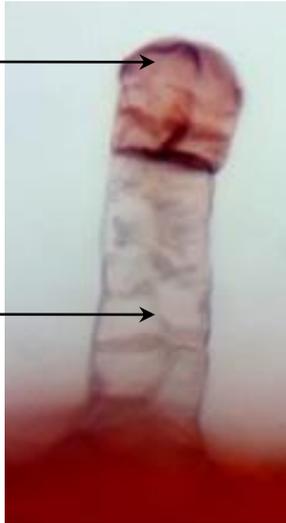


Figure 26: schéma en figurés conventionnels d'une coupe transversale de racine de *Pulicaria odora* (schéma original, 2019)

**Figure 27 : coupe transversale de tige de *Pulicaria odora* observée au microscope optique au G 10x4 (photographie originale, 2019)**

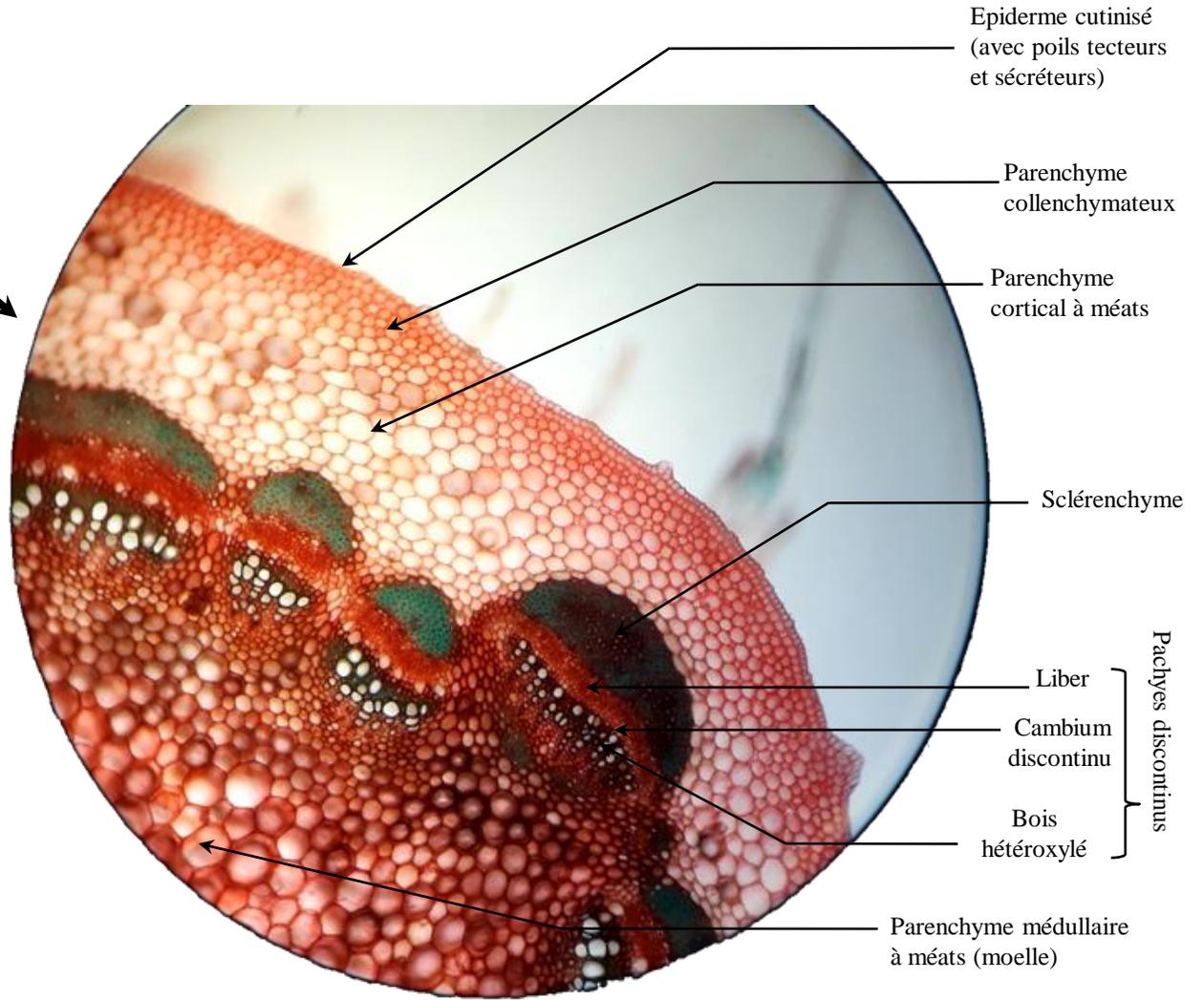


Tête bicellulaire



Pied pluri-cellulaire bisérié

**Figure 29: détails d'un poil sécréteur observé au G 10x40 (photographie originale, 2019)**



**Figure 28: détails de la tige observée au G 10x10 (photographie originale, 2019)**

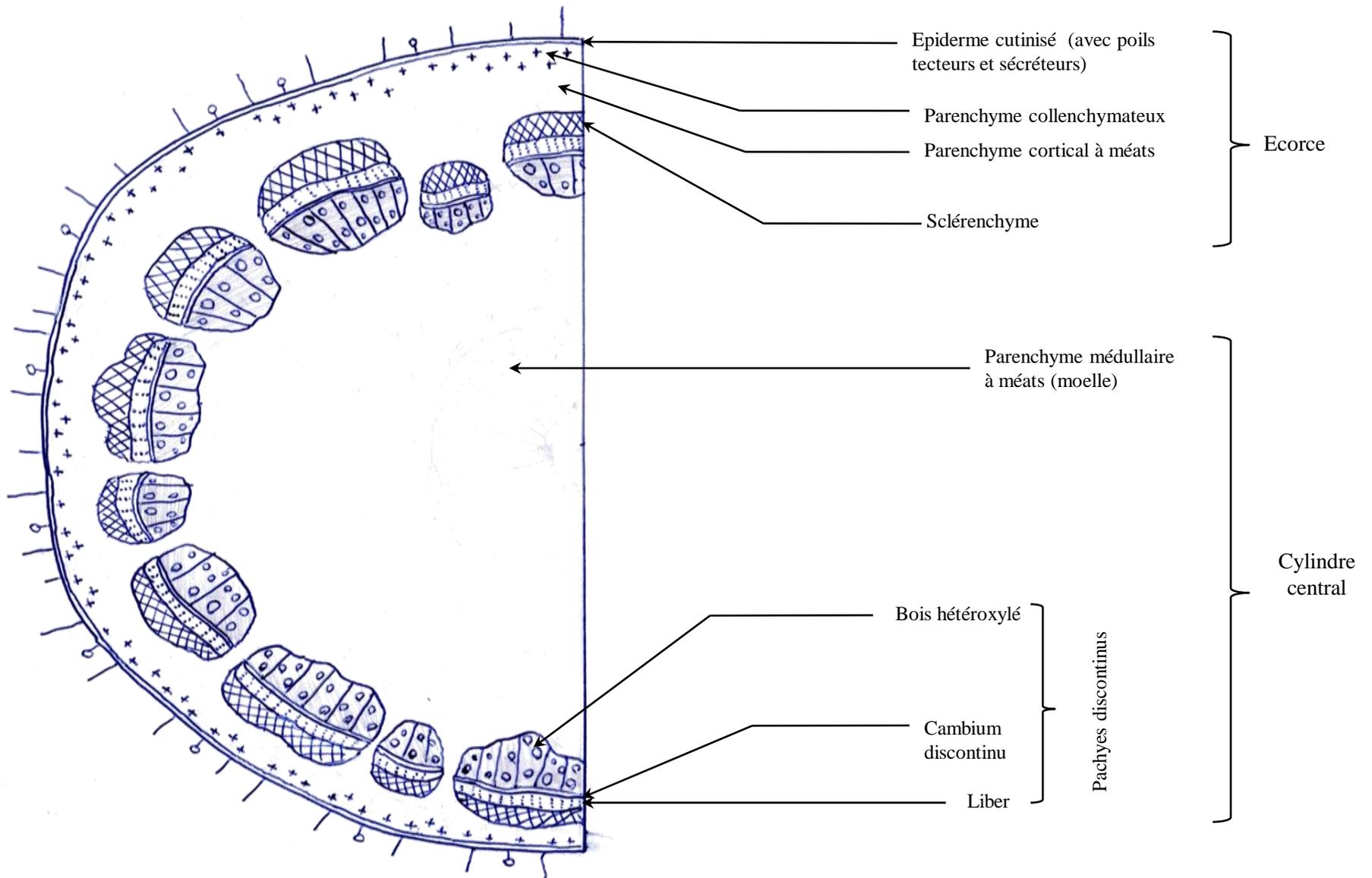


Figure 30: schéma en figurés conventionnels d'une coupe transversale de tige de *Pulicaria odora* (schéma original, 2019)