REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**

En Chimie

Spécialité :

Chimie Pharmaceutique

Présenté par :

Mansour Imene

Berberi Hafidha

Thème :

L'étude de l'effet de quelques conditions opératoires d'extraction sur le potentiel bioactif et les propriétés physico-chimiques de quelques hydrolats issus des plantes médicinales.

Soutenu le : 23/06/2022, Devant le jury composé de :

Dr.Maachou Hamida	Grade : MCA	Université de Médéa	Présidente
Dr.Arbia Wassila	Grade : MCA	Université de Médéa	Examinatrice
Dr. Madani Leila	Grade : MCB	Université de Médéa	Encadreur

Année Universitaire 2021/2022

الملخص

من أجل المساهمة في تثمين خمسة أنواع من النباتات من عائلات مختلفة، اخترنا دراسة مقارنة تباين المحصول والخصائص الفيزيائية والكيميائية (التوترالسطحي ،معامل الانكسار) و كذلك كمون النشاط ا لبيولوجي بدلالة مدة التقطير المائي لزيوتها الأساسية والمحاليل المقطرة,أظهرت هذه الدراسة أنه مع وجود تباين في المحتوى المائي والأنواع النباتية يتفاوت المردود من(0,274%-2,186%) ,(0.048%-0,1%)و(1,374%-3,5%) .للأوراق الجافة والطازجة .للتسلغة , السترانج والزوفا على التوالي. أظهرت أوراق البرتقال الطازجة أعلى مردود حيث بلغت 12.29٪ مقابل أوراق الليمون التي يمكن أن تعطي مردود 0.958٪ من الزيوت العطرية.كشفت متابعة تطور حركية التقطير المائي للأوراق الطازجة من التسلغة التي تم حصادها خلال فترة الإزهار وجود طور سريع وطور بطيء من التقطير المائي ,على سلالة Staphylococcus aureus ، أظهرت الزيوت الأساسية لأوراق البرتقال نشاطًا مثبطًا مهمًا جدًا مقارنةً بـ التسلغة, السترنج, الزوفا. و الليمون. تعتبر بكتيريا *E. Coli* حساسة قليلاً لجميع أنواع الزيوت الأساسية المستخرجة,يمكن لجميع المحاليل المقطرة التي تم الحصول عليها أن تقلل من التوتر السطحي للماء المقطر ، والذي يتباين من34.2-54.4 م ن/م .

الكلمات المفتاحية: الزيوت العطرية, المحاليل المقطرة , التقطير المائي, التوتر السطحي, النباتات الطبية.

Résumé

Afin de contribuer à une valorisation de cinq espèces de plantes de familles différentes, on a opté a une étude comparative qui a décelé la variabilité de rendement, des caractéristiques physico-chimiques (tension superficielle, indice de réfraction) ainsi que de potentiels bioactifs de leurs HEs et leur hydrolats en fonction de temps d'hydrodistillation,cette étude a montré qu'avec une variation de la teneur en eau et l'espèce botanique, les rendements en HEs varient de (0,048%-0,1%), (0,274%-2,186%) et (1,374%-3,5%) pour les feuilles sèches et fraiches de la Globulaire, Citrange, et l'Hysope respectivement. Les feuilles fraiches d'Orange ont manifesté le plus haut rendement qui atteint 12,29% par contre celles de Citron peut donner un rendement de 0,958% en huiles essentielles, le suivi de l'évolution de la cinétique d'hydrodistillation des feuilles fraiches de la Globulaire récoltées en période d'inflorescence a révélé l'existence d'une phase rapide et une phase lente d'hydrodistillation ,sur la souche *Staphylococcus aureus*, les huiles essentielles des feuilles d'Orange ont montré une activité inhibitrice très importante par rapport au Globulaire, Citrange, l'Hysope et le Citron. La bactérie *E. Coli* est légèrement sensible à toutes les HEs extraites, tous les hydrolats obtenus peuvent faire baisser la tension superficielle de l'eau distillée qui varient de [34.2-54.4]mN/m.

Mots clés : huiles essentielles, hydrolat, hydrodistillation, tension superficielle, plantes médicinales.

.

Abstract

In order to contribute to a valorization of five plant's species of different families, a comparative study was carried out to detect the variability of yield and physico-chemical characteristics (surface tension, refractive index) as well as bioactive potentials as a function of hydrodistillation time of their EOs and hydrolats, this study showed that with variation in water content and botanical species, the yields of EOs varied from (0.048%-0.1%), (0.274%-2.186%) and (1.374%-3.5%) for dry and fresh Globularia, Citrange, and Hyssop leaves respectively. Fresh Orange leaves showed the highest yield of 12.29% while Lemon leaves can give a yield of 0.958% in essential oils, the monitoring of the evolution of the hydrodistillation kinetics of fresh Globularia leaves collected during the inflorescence period revealed the existence of a fast and a slow phase of hydrodistillation, on the Staphylococcus aureus strain, the essential oils of Orange leaves showed a very high inhibitory activity compared to Globularia, Citrange, Hyssop and Lemon. The E. Coli bacteria is slightly sensitive to all extracted EOs. All the hydrolats obtained can lower the surface tension of distilled water which varies from [34.2-54.4mN/m].

***Key words**:* essential oils, hydrolat, hydrodistillation, surface tension, medecinal.


Dédicaces

Dédicaces



Je prie mon Dieu Tout-puissant d'accepter ce travail humble et de le faire dans l'équilibre de nos bonnes actions

Je dédie cette mémoire

À mes chers parents, qu'Allah les préserves et prolonge leur vie,

À mon cher mari "**BOUCHIBA BRAHIM",** qu'était mon bon assistant tout au long de mon travail, il m'a encouragé et m'a soutenue jusqu'au dernier point, que Dieu le préserve et paie ses pas,

À mon cher frère **ABD ELRAHMENE**,

À mes chères sœurs **FAYZA, WIDAD, DOUAA, CHOROUCK,**

À mes beaux-parents, mon beau-frère et mes belles-sœurs

À mes amies et ma collègue de travail "**HAFIDHA BERBERI",**

À tous les enseignants qui ont contribué à ma formation

Que Dieu les sauve tous.

Mansour Imane

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents en témoignage de ma connaissance pour leur patience, leur sacrifice et leur soutien toute au long de mes études. Ma vie entière serait insuffisante pour vous exprimer ma profonde gratitude.

QueDieu vous bénisse et vous protège.

Merci beaucoup Papa et Maman je vous aime beaucoup.

A mes frères ELHADJ, MOUSSA, ABASS, BOUALEM,

A mes sœurs ZAINAB, SAIDA, AMINA.

A mes chères amies MANSOUR IMANE, AYOUB , HIBA, SIRIN, KHADIDJA, IHCENE, HOUDA, FATIMA, NABILA, ASSMA.

A tous mes collègues et mes camarades.

A tous ceux que je porte dans mon cœur.

BERBERI Hafidha

REMERCIMENT

Remerciements

Tout d'abord, nous tenons à remercier le Dieu Tout-Puissant qui nous a apporté Donnez le courage, la patience et la force pour terminer ce travail.

Nous remercions Notre promotrice : Dr Madani Leila. Pour avoir accepté de nous encadrer. Ses précieux conseils et ses encouragements nous ont énormément aide.

Nous exprimons aussi nos remerciements au Dr Zouambia Yamina pour son aide dans la mesure de la tension superficielle.

Nous exprimons aussi nos remerciements au Dr ARBIA Wassila pour son aide dans l'activité antibactérienne.

Nous remercions tous les membres du jury : Dr Maachou Hamida et DrARBIA Wassila pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'examiner, d'évaluer et de juger ce travail.

Nous remercions également tous les enseignants du département sciences de la matière.

Nous remercions en fin tous ceux qui n'ont pas été cites dans ces quelques lignes et qui ont contribues de presso de loin par leur aide au bon déroulement de ce travail.

Merci à tous.

Sommaire

ملخص

Résumé

Abstract

Remerciement

Dédicace

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale **1**

Chapitre I : Présentation de la matière végétale

I .1.L'hysope **3**

I.1.1. Description botanique **3**

I.1.2. Classification botanique de L'hysope **3**

I.1.3. Les composés chimiques de l'*Hysopes officinales* L **4**

I.1.4. Utilisations de l'Hysopes officinales **6**

I.2. La globulaire **6**

I.2.1. Description botanique de globulaire **6**

I.2.2. Classification botanique de globulaire **7**

I.2.3.Compossitions chimiques de Globulaire **7**

I.2.4.Utulisation de Globulaire **7**

I.3. Les agrumes **8**

I.3.1. Classification botanique des agrumes **8**

Chapitre II : Huiles essentielles

II.1.Huiles essentielles **12**

II.2. Composition chimique des huiles essentielles **13**

II.3. Propriétés des huiles essentielles **14**

II.4.Méthodes d'extraction des huiles essentielles **14**

II.4.1.Paramètres influençant l'extraction **14**

II.4.2. Méthodes classiques **14**

II.4.3. Méthodes innovantes **15**

II.5. Les activités biologiques **15**

Chapitre III : L'activité antibactérienne des Huiles essentielles

III.1.Les infections microbiens **17**

III.2.Les antimicrobiens **17**

III.3. Classe antimicrobiens **18**

III.3.1 .Les agents antimicrobiens naturels **19**

III.3.2. mécanismes d'action antimicrobienne des huiles essentielles **21**

III.4.Huile essentielles et antibiorésistance **21**

Chapitre IV : Matériels et méthodes

IV.1. Matériels et méthodes **23**

IV.1.1.Réactifs chimiques et appareillage **24**

IV.1.2.Matériels biologique **25**

IV.1.2.a. les souches bactériennes testés **25**

IV.1.3.Matières végétale **26**

IV.1.4.caractérisation des feuilles des matières végétales **26**

IV.1.4.a. Teneur en eau (TE%) **27**

IV.1.4.b. Teneur en matières organiques (MO%) **28**

IV.1.4.c. Teneur en matières minérales (MM%) **28**

IV.1.5.Isolation des huiles essentielles **28**

IV.1.5.1.Obtention des hydrolats et huiles essentielles par hydrodistillation **28**

IV.1.5.2.les conditions opératoires d'extraction des huiles essentielles des matières végétales **30**

IV.1.5.3.calcules de rendement en huiles essentielles **31**

IV.1.5.4.caractérisation des fractions d'hydrolats **31**

IV.1.5.4.a.Mesure de la tension superficielle **31**

IV.1.5.4.b.Mesure de l'indice de réfraction **32**

IV.1.6.Evaluation de l'activité antibactérienne **33**

IV.1.6.a.mode opératoire **33**

Chapitre V : Résultats et discussions

V.1. Caractérisation des matières végétale **35**

V.1.1.La teneur en eau TE(%) **35**

V.1.2. Teneur en matière organique MO(%) **38**

V.1.3.Teneur en matières minérale MM% **38**

V.2.Huiles essentielles **39**

V.2.1.Propriétés organoleptiques **39**

V.2.2.Rendement en HEs **39**

V.2.3.Tension superficielle **42**

V.2.4.Indice de réfraction **45**

V.3.Test d'activité antibactérienne **47**

Conclusion **54**

Références bibliographiques

Listes des figures

Chapitre I :Présentation de la matière végétale

Figure I.1 **:** Photo d'*Hyssopus Officinalis* L : a) arbuste, b) fleurs, c) feuilles ***3***

FigureI.2 Photo *Globularia alypum* : a) arbuste, b) fleurs, c) feuilles ***6***

Figure I.3 : Photo de quelques genres d'agrumes ***9***

Chapitre III :L'activité antibactérienne des huiles essentielles

FigureIII.1 : Gel désinfectant pour main aux huiles essentielles ***20***

Chapitre IV :Matériels et méthodes.

Figure IV.1 **:**L'organigramme des différentes préoccupations de la partie pratique ***23***

Figure IV.2 **:** Etapes de détermination de la teneur en eau. ***27***

Figure IV.3 **:** Etapes de la mesure des quantités de la matière organique dans les matières végétales ***28***

Figure IV.4 Appareil d'hydrodistillation de type Clevenger ***29***

Figure IV.5 le protocole expérimental pour la réalisation de l'hydrodistillation assistée par Clevenger ***30***

Figure IV.6 Tensiomètre. ***32***

Figure IV.7 Réfractomètre ***33***

***Chapitre V* :** Résultats et discussions.

Figure V.1 Teneurs en eau TE% dans les feuilles des matières végétales récoltées en Mars (Globulaire, Hysope, Orange, Citrange, Citron). ***36***

Figure V.2 Influence de l'état des matières végétales (feuilles de Globulaire, feuilles d'Hysope, feuilles de Citrange) sur la teneur en eau TE%. ***37***

Figure V.3 : teneur en matières organiques MO% les feuilles des matières végétales (Globulaire, Hysope, Orange, Citrange, Citron). ***38***

Figure V.4 Rendement des huiles essentielles des matières végétales (sèche et fraiche). ***41***

Figure V.5 Courbe cumulative de la cinétique d'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation a partir des feuilles fraiches de la Globulaire (Mars). ***42***

Figure V.6 Variation de la tension superficielle des hydrolats en fonction du temps d'hydrodistillation des différentes matières végétales. ***44***

Figure V.7 Variation des indices de réfractions des hydrolats en fonction du temps d'hydro-distillation des différentes matières végétales ***46***

Figure V.8 **:** Zones d'inhibition pour les tests d'activité antibactérienne par La méthode de diffusion des disques. ***47***

Figure V.9 **:** Diamètres d'inhibition des tests de l'activité antibactérienne des fraction d'hydrolats issues de l'hydrodistillation des feuilles des (Globulaire, Hysope, Orange) ***51***

Liste des Tableaux

Chapitre IV : Matériels et méthodes

Tableau IV.1 Réactifs chimique et appareillage ***24***

Tableau IV.2 Matériels biologiques utilisé ***25***

Tableau IV.3 Condition opératoires d'extraction des huiles essentielles des matières végétales par hydrodistillation ***31***

Chapitre V : Résultats et discussions

Tableau V.1 Variation de la teneur en eau des feuilles de la Globulaire au cours du temps ***37***

Tableau V.2 Valeurs des tensions superficielles des fractions d'hydrolats des feuilles de la Globulaire, des agrumes et de l'Hysope ***43***

Tableau V.3 Valeurs d'indice de réfraction des fractions d'hydrolats de feuilles de la globulaire, des agrumes et de l'Hysope. ***45***

Tableau V.4 Les Diamètres d'inhibition des tests de l'activité antibactérienne des HEs issues de l'hydrodistillation des feuilles des (Globulaire, Hysope, Orange, Citrange) ***48***

Tableau V.5 composés majeurs des HEs des feuilles de Globulaire, Hysope, agrumes ***52***

Liste des abréviations :

BLSE : betalactamases à spectre élargi.

C3GR : céphalosporines de 3ème génération.

CO_2 : Dioxyde de carbone

D : diamètre.

PBP : Pénicilline binding proteins

HE : huile essentielle

H : hysope.

I.R : indice de réfraction.

MO : matière organique.

MM :matière minérale.

PH : potentiel d'hydrogène

R : rendement.

SARM : staphylocoques dorés résistants à la méthicilline.

TS : tension superficielle.

Introduction

Introduction

Ces dernières années, l'orientation vers la découverte à partir des sources naturelles de nouveaux agents à effet thérapeutique ainsi que l'utilisation des connaissances médicinales traditionnelles pour la formulation de nouveaux médicaments semble si prometteuse et participent massivement au regain d'intérêt pour l'obtention de composés biologiquement actifs par le biais des plantes médicinales et leurs extraits telles que les huiles essentielles.

Les pistes de recherche sont nombreuses mais il est devenu nécessaire d'explorer de nouvelles pistes, et y revenir à la nature et essayer de valoriser les plantes médicinales offrant depuis l'antiquité jusqu'à nos jour un espoir de guérison dans le domaine des maladies contemporaines et une amélioration de la santé et le bienêtre. Excessive, cette vision a engendré par contrecoup une vague verte, un renouveau de la phytothérapie suscité par l'attente d'une grande partie de la population, en accord avec l'esprit écologique actuel.

L'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites. Cette source semble inépuisable puisque seule une petite partie des espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans phytochimiques et pharmacologique, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents. Les molécules bioactives sont qualifiées de faire face aux stress biotiques et abiotiques et peuvent d'être une réponse concrète à plusieurs maladies qui touchent l'humanité actuellement.

Les huiles essentielles issues des plantes médicinales largement considérées comme un réservoir de ces biomolécules ont reçu une attention particulière, néanmoins moins d'attention a été octroyé à la fraction des composés restant dissous dans l'eau de distillation. Cette fraction aromatisante et odorante avec des pH légèrement acide nommée par hydrolat ou eau florale est beaucoup plus utilisé dans le domaine cosmétique et moins fréquemment dans le domaine de médecine.

Les hydrolats et eaux florales contiennent la partie la plus subtile des plantes, ce qu'autrefois on appelait « l'âme des plantes ». L'eau de distillation ou hydrolat demeure en partie un mystère. Cette vapeur d'eau transporte un subtil hydrosoluble extrait du végétal, mais de manière douce ; et c'est ce qui fait tout son intérêt.

Malgré que la composition chimique de l'hydrolat inclut des traces d'huiles essentielles et d'autre composés hydrophiles véhiculées par l'eau, ils demeurent pris comme résidus de l'hydrodistillation et l'entrainement à la vapeur d'eau des plantes aromatiques. Cet acte d'écarter cette fraction renfermant l'avantage d'être partiellement inoffensif à l'égard de l'être humain peut engendrer des pertes économiques.

Les recherches scientifiques participent à cet écartement surtout qu'elles sont peu accentuées sur la composition et l'activité biologique des hydrolats. Dans ce contexte, et conscient de leurs valeurs, on s'est mis tranché devant certains objectifs dans cette étude pour mettre en cible la valorisation des hydrolats :

- La mise en œuvre de l'hydrodistillation pour l'extraction des huiles essentielles des feuilles de cinq plantes médicinales (Globulaire, Hysope, Citrange, Orange, Citron) dont l'importance de leurs huiles essentielles a été déjà témoignée.
- Caractérisation en terme de rendement et évaluation des activités antibactériennes des huiles essentielles et des fractions d'hydrolats obtenus dans différents intervalles de temps d'hydrodistillation.
- Investiguer la variation de quelques propriétés physicochimiques comme la tension superficielle et l'indice de réfraction des fractions d'hydrolats obtenues.

Ce présent document est présenté en deux parties, une théorique et l'autre pratique :

Dans sa première partie, on a exposé une présentation de la systématique botanique des plantes étudiées et une généralité sur les huiles essentielles et les différentes méthodes et techniques classiques et innovantes de leur extraction. Une rubrique a été offerte dans l'intérêt d'illustrer les différentes actions d'huiles essentielles comme antimicrobiens naturels.

Dans sa deuxième partie consacrée aux travaux expérimentaux réalisés ou une description du matériel et des méthodes utilisées ainsi qu'une présentation de nos résultats et leurs discussions ont pris part. Une conclusion générale et quelques perspectives ont clôturé toutes les composantes de cette étude.

Chapitre I

Présentation de la matière végétale

I .1.L'Hysope :

I.1.1. Description botanique :

Hysopes officinales L (*Hyssopus Officinalis* L.) de la famille des Lamiacées est dérivé du mot grec "azob" qui signifie "plante sacrée" est l'une des plus importantes l'une des espèces végétales les plus importantes. Elle est originaire d'Europe centrale et méridionale, d'Asie occidentale et d'Afrique du Nord.

L'hysope se présente sous la forme d'une plante vivace, touffue et mellifère, qui pousse sur les côtes de la Méditerranée, en Europe, en Afrique du Nord et en Asie mineure. La plante pousse comme un arbuste, elle peut atteindre 40 à 50 cm de hauteur (figure I-1). Ses tiges sont droites ligneuses ramifiées à la base et portent de nombreuses feuilles. Ces feuilles petites et opposées deux à deux sontlancéolées, de 2-4 cm de long, couvertes de soies fines portant à leur surface des glandes produisant de l'huile volatile. Les feuilles supérieures, formant un épi au sommet. Les fleurs ont un calice oblique et strié. La couleur des fleurs peut être bleue, rose, violette et (plus rarement) blanches. Elles dégagent une odeur à la fois pénétrante et agréable.

La plante cultivée à des fins médicinales et culinaires est utilisée dans de nombreux pays du monde (La période de floraison s'étend de la mi-mai à juin (récolte de la 2ème année de végétation), jusqu'à octobre-novembre (lorsque les gelées tombent). Elles sont générative ou végétative **[1].**



Figure I.1 : Photo d'*Hyssopus Officinalis* L : a) arbuste, b) fleurs, c) feuilles

I.1.2.Classification botanique [2]:

Domaine : Biota Endl

Règne : Plantae ,

Sous-Règne : Viridaeplantae

Infra-Règne : Streptophytaohn,y

Classe : Equisetopsida.h

Clade : Tracheophyta

Clade : Spermatophyta

Sous-Classe : Magnoliidae Novák ex Takht

Super-Ordre : Asteranae Takht

Ordre : Lamiales Bromhead

Famille : Lamiaceae Martinov

Sous-Famille : Nepetoideae Burnett

Tribu : Mentheae Dumort

Sous-Tribu : Nepetinae Dumort

Espèce : *Hyssopus officinalis* L

I.1.3. Les composés chimiques de l'Hysopes officinales L :

Les principaux constituants de *H. officinalis* comprennent plusieurs composés:

- Polyphénoliques : principalement les flavonoïdes apigénine, quercétine, diosmine, lutéoline
- Glucosidiques
- Phénoliques : acides chlorogénique, protocatéchuique, férulique, syringique, p-hydroxybenzoïque et caféique.

La composition chimique d'huile volatile des parties aériennes de l'*H. officinalis* ont révélé une multitude de composés, dont les plus importants sont : les terpénoïdes, l'izopinocamphone (sin.cis-, (3)-pinanone), pinocamphone (syn- trans-, (3) -pinanone) et leur précurseur β-pinène. D'autres composés importants sont la pinocarvone, le sabinène, legermacrène, l'α-, β-phellandrène, le 4-carvomenthénol, le thymol, le carvacrol, le camphre, le linalol, le 1,8-cinéole, l'α-terpinène, le myrténol, eugénol et d'autres composés [3].

I.1.4. Utilisations de l'Hysopes officinales :

L'extrait d'*Hysopes* a des propriétés antifongiques, antivirales (notamment le SIDA) et sont largement utilisés dans l'industrie alimentaire et les cosmétiques. Ses feuilles réduisent la glycémie, renforcent l'estomac glucose, traitent de l'asthme, elles sont emménagogue, et très bénéfiques. Les feuilles succulentes de l'*Hyssopus* sont utiles pour l'élimination de l'infection et la guérison des plaies **[4].**

La littérature qui s'intéresse aux aspects chimiques et biologiques de la plante indique que les principaux constituants de l'hysope comprennent plusieurs composés polyphénoliques et une huile essentielle. Les extraits et l'huile essentielle isolée de l'hysope ont montré une activité antioxydante et antimicrobienne modérée ainsi qu'une activité antifongique et insecticide et antivirales, in vitro. Des études in vivo ont indiqué des activités myorelaxantes, antiplaquettaires et inhibitrices de l'α-glucosidase pour cette plante. Elle est principalement utilisée pour l'aromatisation et la conservation des aliments et pour des usages phytothérapeutiques**[5].**

I.2. Le Globulaire :

I.2.1. Description botaniquede la Globulaire:

La plante *Globularia alypum* autrement appelée Globulaire est une plante classique appartenant à la famille des *Globulariacées* qui est un petit taxon comprenant seulement deux genres Globularia et Poskea et environ 30 espèces répandues en Europe et en Afrique du nord **[6].**

Son nom *Globularia* fait référence à la forme globuleuse de l'inflorescence et le terme *alypum* vient du grec alypon qui signifie calmer la douleur. *Globularia alypum* appelée communément Tasselgha**[7]**; '' Chebra , Zerga , zouitna , alk , haselra , oulbarda **[8].**

Les plantes du genre *Globularia* sont vivaces arbustes rameux d'environ 60 cm de hauteur (30-60cm) (figure I-2), à feuilles alternes, dont les fleurs groupées en capitules plus ou moins globuleux entourés de bractées. Les fleurs ont une corolle à deux lèvres, la supérieure bilobée souvent atrophiée, l'inferieure trilobée. Elles sont en général bleues, à quatre étamines **[9].**

Les feuilles toutes éparses sur les rameaux, coriaces, persistantes, glauques, de forme ovale ou oblongue, atténuées en court pétiole et disposées le long et au sommet des tiges très rameuses en buisson et ordinairement dressées **[7].**

En Algerie,le genre *Globularia* inclut deux espèces, *Globularia eriocephala* (Pomel) et *Globularia alypum* L.,

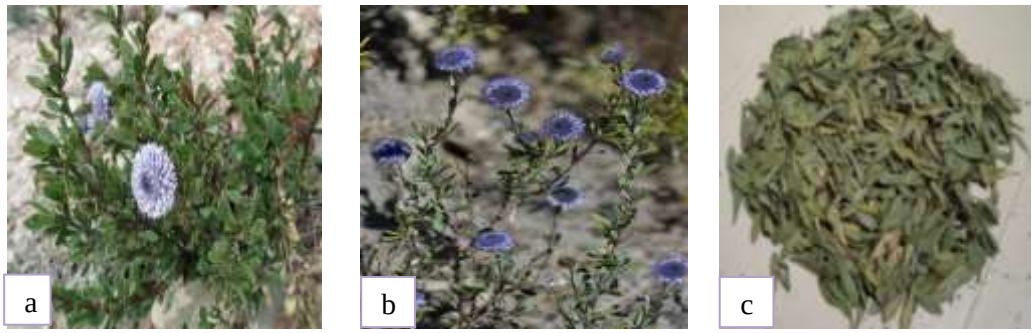


Figure I.2 : Photo *Globularia alypum*: a) arbuste, b) fleurs, c) feuilles

I.2.2 Classification botanique du Globulaire:

Règne :*Plante*

sous-règne : *tracheobionta*

division :*magnoliophyta*

Classe :*magnoliopsida*

sous-classe :*Asteridae*

Ordre : *Scrophulariales*

Famille : *globulariaceae*

Genre : *globularia*

Espèce : *globularia alypum*

I.2.3 Composition chimique de la Globulaire:

Globularia alypum L. est chimiquement riche en composés phénoliques, plusieurs études ont été réalisées en vue d'identifier les composés phénoliques extraits à partir de cette espèce. La littérature mentionne l'isolement et la caractérisation de plusieurs composés à partir de genre *Globularia* qui sont essentiellement des flavonoïdes, des polyphénols, des tannins, des anthocyanines [**10**], glucoside (globularine), résine, mucilages, tanin, choline, chlorophylle, acide-cinnamique, acide globularique [**11**]. Les iridoides glycosides constituent également des métabolites secondaires du genre *Globularia*. Ils comprennent un cyclopentane et des cyclespyranique. Ces structures sont connues pour leurs diverses activités biologiques [**12].**

I.2.4. Utilisation de la Globulaire :

Depuis des millénaires les plantes de genre *Globularia* sont utilisées en médecine traditionnelle, pour leurs effets laxatifs et diurétiques **[13].** Au nord de l'Afrique, la *Globularia* est utilisée pour traiter les douleurs rhumatismales et pour calmer les douleurs **[14].**La globulaire est couramment utilisée dans la médecine traditionnelle du Nord-Africain (Algérie, Maroc, Tunisie et Libye). Elle est dotée d'un pouvoir purgatif et désobstruant. Donc elle est utilisée pour traiter les affections gastriques telles que les ballonnements, les douleurs et la constipation. L'infusion de 30g de plante entière est efficace contre les vertiges, fièvre, douleurs gastriques et faiblesses générales **[15].**

Des études bibliographiques confirment que les espèces du genre *Globularia* présentent plusieurs activités biologiques comme l'activité : antimicrobiennes, antioxydantes, cytotoxiques, cytostatiques et anti-inflammatoires **[16].**

La globulaire et aussi utilisée dans le traitement de la goutte, l'oligurie et les rhumatismes **[17].** Certains auteurs attribuent aussi plusieurs propriétés de la famille globulaire telle que la propriété anti-leucémiques, anti-tumorales et vermifuges. Cette plante contient la globularine (substance résineuse) qui est un dépuratif **[18].**

Selon les découvertes des chercheurs, l'extrait aqueux de cette plante réduit l'hyperémie et améliore l'état oxydatif des muscles, des reins et du cœur chez les souris nourries au fructose **[19].**Cette plante est aussi dotée des potentiels d'anti-fertilité **[20].**

I.3Les agrumes :

Le mot agrume provient du mot latin *acrumen* saveur acre qui désignait dans l'antiquité, des arbres à des fruits acides **[21]**. Les analyses moléculaires récentes **[22]** suggèrent que l'évolution de Citrus s'est faite en Australasie (Australie, Nouvelle-Guinée, Mélanésie, Nouvelle-Zélande).Le groupe des agrumes appartient à la famille des *Rutaceae*, sous famille des *Aurantioideae*, tribu des *Citreae* et sous tribu des *Citrinae* **[23].**

I.3.1.Classification botanique des agrumes:

Règne : *Plantae*
Sous règne : *Tracheobionta*
Division : *Magnoliophyta*
Classe : *Magnoliopsida*
Famille : *Rutacées*
Sous famille : *Aurantoideae*
Tribu : *Citreae*
Sous-tribu : *Citrinae*
Espèce : *Citrus*

Les orangers, les citronniers et les brigadiers sont des genres de *Citrus* (figure I-3). Le bigaradier est un arbrisseau épineux très décoratif de 4 à 5 m de hauteur, qui produit l'orange amer. Son tronc est ramifié et ses feuilles sont vertes brillantes. Ses fleurs blanches sont pourprées et odorantes, le fruit, plus petit que l'orange, est ovoïde et jaune foncé.

Le Citrus aurantium (le bigaradier, l'orange amère ou l'orange de Séville) est l'un des agrumes appartenant à la famille Rutacée, est connue pour son goût extrêmement amer et

aigre **[24].** Elle se distingue des oranges douces par leurs fruits à peau plus épaissit plus rugueuse et à pulpe acide et amer **[25].**



Figure I.3 : Photo de quelques genres d'agrumes :**a**) orange amer, **b**) citron, **c**) orange douce

Le citronnier est utilisé comme antiseptique naturel mais il est aussi connu pour d'autres actions : anti-ascorbique, antifatigue, antivirales, digestive, neuro-protecteurs, anticonvulsifs, sédatifs, anti-nociceptifs. Ses bienfaits sur la santé, attribués relativement à la présence de composés bioactifs, tels que les composés phénoliques **[26, 27]**, et les caroténoïdes **[28].**
Bien que le fruit est une source de composés aromatiques de nombreux auteurs ont rapporté des propriétés anti oxydantes, antibactériennes, antifongiques, antiallergiques attribuées aux huiles essentielles extraites de ses écorces **[29].**
Pour les orangers, l'huile essentielle de *Citrus sinensis* est particulièrement apaisante et anxiolytique. C'est un sédatif puissant et un calmant psychique, elle calme le stress et la nervosité, notamment chez les enfants, et induit le sommeil en cas de troubles d'endormissement ou d'insomnie. Elle est aussi un remarquable antiseptique aérien, pour assainir l'atmosphère et éliminer les germes et les bactéries, notamment en période d'épidémie.

La bigarade fut appréciée dès le Moyen âge pour son écorce à odeur fortement poivrée, son parfum d'une exquise suavité et sa fleur blanche odorante. L'importance du bigaradier réside dans l'huile essentielle qu'on peut extraire à partir des fleurs des graines et de l'écorce pour les utiliser dans les épices, les bonbons, les liqueurs et pour usage aromathérapeutique.
L'oranger amer est inscrit sur la liste des 147 plantes pouvant bénéfice d'une autorisation de mise sur le marché (allégée) pour les médicaments à base des plantes **[30],**ces feuilles et ces feuilles sont doté d'un pouvoir veinotonique – vasculoprotecteur et antimicrobien.

Chapitre II

Huiles essentielles

II.1.Huiles essentielles :

Le terme huile souligne le caractère visqueux et hydrophobe de ces substances et le terme essentielle désigne la caractéristique principale de la plante à travers ses exhalaisons.

D'une manière générale, les huiles essentielles sont des mélanges odorants comportant de nombreuses molécules, obtenus par entraînement à la vapeur d'eau (hydrodistillation) de matières végétales d'origine botanique spécifiée ou par ou pression du péricarpe des agrumes, et séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques.

Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels ainsi dans l'alcool, entraînables à la vapeur d'eau mais très peu solubles dans l'eau **[31].** Les huiles essentielles sont biosynthétisées par les végétaux supérieurs en réponse à des conditions de stress et surtout pour combattre les agents infectieux ou parasitaires.

La pharmacopée française défini une huile essentielle comme « un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage».

Les huiles essentielles d'agrumes sont parmi les plus abondantes et les moins chères. Selon **[32].**

II.2. Composition des huiles essentielles d'agrumes :

Les huiles essentielles d'agrumes sont des mélanges comportant plus de 200 composés qui peuvent être regroupés en fractions non volatile (1-15 %) et volatile (85-99 %). Cette dernière fraction contient principalement des monoterpènes et des sesquiterpènes ainsi qu'une petite quantité de monoterpènes oxygénés (fonctions aldéhydes, cétones, alcools et esters).**et des Lactones :** esters intermoléculaire non aromatiques très actifs, non toxiques, à l'état de traces dans les huiles essentielles **[33].**

Certaines molécules entrant dans la composition des huiles essentielles d'agrumes possèdent des propriétés tensioactives. Nonanal, décanal, acétate de nonyle et undécanal en sont les principaux exemples en raison de leur partie polaire (fonction aldéhyde ou ester) et d'une longue chaîne carbonée apolaire sans insaturation (en C9 ou davantage).

De nombreuses molécules sont présentes à la fois dans l'huile essentielle de citron et d'orange. Cependant, certains composés oxygénés tels que l'octanal, le décanal, l'α-sinensal et le β-sinensal sont plus abondants dans l'huile essentielle d'orange.

II.3 Propriétés des HEs :

Les huiles essentielles sont des composés volatiles, liquides à température ambiante, limpides et rarement colorées, elles sont douées d'un pouvoir rotatoire puisqu'elles sont formées principalement de composés asymétriques, elles sont peu miscibles à l'eau.

Elles sont généralement assez solubles dans les solvants organiques (éther, alcools, hexane, pentane,...) très légèrement dans l'eau. Elles sont dissolvant les graisses, l'iode, le soufre, le phosphore et réduisent certains sels **[34, 35].**

Leur densité est en grande majorité inférieure à celle de l'eau. Pour autant quelques HE font exception cette règle. C'est le cas du sassafras, du girofle et de la cannelle. Elles sont incolores ou faiblement colorées en jaune pâle. Mais, il existe des colorées: cannelle (orange) absinthe (vert) et camomille (bleu). **[36,37].** Elles sont huileuses, mais non grasses et s'évaporent facilement.

Chaque HE est unique et se caractérise par une odeur, une couleur, une viscosité et des propriétés spécifiques. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée. On leur différentes indices chimiques (indice d'acide, d'ester, de carbonyle,...). **[37, 34].**

Elles présentent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre **[38].**

Une caractéristique importante des huiles essentielles est leur caractère hydrophobe, ce qui leur permet de s'insérer dans les couches lipidiques de la membrane cellulaire bactérienne et celles des mitochondries, perturbant ces structures en les rendant plus perméables. La fuite des ions et autres constituants de la cellule peut alors être fatal à la cellule bactérienne. Les principaux mécanismes et sites d'action des différents constituants des huiles essentielles 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 et l'épuisement de la force de mouvement des protons **[39].**

II.4 Méthodes d'extraction des huiles essentielles :

Le choix d'une technique d'extraction doit être adapté aux composés spécifiquement recherchés; en principe cela ne dépend pas du type d'organe utilisé: feuille, fleur, bois, graine ou fruit, racine ou rhizoeme, à l'état frais ou à l'état sec, car ils peuvent être traités par différents mode d'extraction tels que distillation, expression, enfleurage ou incision ou plus récentes: extraction sous irradiation micro-ondes ou par ultra-sons.

La diversité et la complexité des huiles essentielles rendent le choix des processus d'obtention délicat. La méthode choisie ne doit pas conduire à la discrimination entre les composés polaires et apolaires, ni induire de réactions biochimiques, de dégradations thermiques, d'oxydation de réduction, d'hydrolyse, de changement de pH ou entraîner une perte de composés volatils, pour cela, différentes paramètres et propriétés sont à prendre en compte **[40].**

II.4.1 Paramètres influençant l'extraction :

- Matière végétale **:** (choix des plantes, provenance, stade végétatif, période de la journée, partie de la plante distillée …) **[41,42].**
- Nature et état du solide et du soluté
- Nature, concentration et volume du solvant
- Méthode, durée, température et pression

II.4.2 Méthodes classiques d'extraction :

Parmi les méthodes conventionnelles utilisées pour séparer les huiles essentielles de la matière végétale on cite :

- ✓ Extraction par « pression à froid
- ✓ Hydrodistillation
- ✓ Entrainement à la vapeur d'eau (ou vapo-Hydrodistillation)
- ✓ Hydrodiffusion
- ✓ Enfleurage

II.4.3 Les méthodes innovantes d'extraction :

Ces techniques récentes offrent plusieurs avantages significatifs par rapport aux techniques classiques. En effet, elles nécessitent un volume moindre de solvant et un temps dechauffage

réduit ce qui évite la perte et la dégradation des composés volatils et thermosensibles. Ainsi, elles conduisent à des rendements plus élevés. Parmi elle, on peut citer :

- L'extraction sans solvant assisté par micro-onde.
- Extraction par ultrasons.
- Distillation assistée par micro-ondes ou ultrasons
- Extraction au gaz co_2 supercritique
- Extraction assistés par induction thermomagnétique.

II.5Les activités biologiques des huiles essentielles :

Le rôle physiologique des huiles essentielles pour le règne végétal est encore inconnu. Cependant, la diversité moléculaire des métabolites qu'elles contiennent, leur confère des rôles et des propriétés biologiques très variés.

De nombreuses huiles essentielles, comme les huiles de cannelle, de piment, de laurier et d'origan, présentent un pouvoir anti-oxydant **[43].** Un effet anti-inflammatoire a été décrit pour les huiles essentielles de *Protium strumosum*, *Protium lewellyni*, *Protium grandifolium* **[44],** ou, plus récemment, pour l'huile essentielle des racines de *Carlina acanthifolia* **[45]** ,qui est capable d'inhiber l'inflammation induite par une injection de carraghénane chez le rat. Les activités antifongiques de nombreuses huiles essentielles, incluant les huiles de thym, de citronnelle, de cannelle et de l'arbre à thé **[46]**, ont été décrites. Certaines huiles essentielles présentent des activités anti-tumorales et sont utilisées dans le traitement préventif de certains types de cancers. L'huile essentielle, isolée des graines de *Nigella sativa* L., démontre une activité cytotoxique *in vitro* contre différentes lignéescellulaires tumorales.

La croissance des bactéries, résistantes et multi-résistantes aux antibiotiques, peut être inhibée par certaines huiles essentielles. Les huiles d'agrumes, de lavande, de menthe, de genévrier, de l'arbre à thé, de thym et d'Eucalyptus se révèlent particulièrement efficaces contre les staphylocoques dorés résistants à la méthicilline (SARM) **[47].**

Plusieurs études scientifiques ont montré l'efficacité des extraits phénoliques dans l'inhibition de la croissance microbienne telle que l'étude de **[48].** L'extrait flavonoïdiques de Citrus ladaniferus montre une efficacité importante contre un grand nombre de souches bactériennes, à savoir Salmonella typhi, staphylococcus aureus... **[49].**

La nature des familles chimiques mises en évidence par le screening phytochimique laisse prévoir les activités pharmacologiques des plantes étudiées. Il s'agit essentiellement des:

- **Flavonoïdes**, possédant des propriétés anti-inflammatoires, anti-allergiques, hépatoprotecteurs, antispasmodiques, hypocholestérolémiants, diurétiques, antibactériens **[50].**
- **Saponosides,** possédant une propriété hémolytique. Cette propriété est attribuée à leur interaction avec les stérols de la membrane érythrocytaire. Il est également assez fréquent que ces molécules aient une très forte activité spermicide,logiquement corrélée avec l'activité hémolytique. In vivo, bon nombre de saponosides assurent la défense du végétal contre l'attaque microbienne ou fongique. Quasiment dépourvus d'activité antibactérienne, les saponosides sont parfois actifs, in vitro, sur des virus **[51].**

Huiles essentielles antimicrobiens naturels

III. L'activité antibactérienne des huiles essentielles

III. 1. Les infections microbiennes

Les maladies infectieuses représentent la cause majeure de morbidité, et de mortalité dans le monde ; ce sont des affections provoquées par des microorganismes pathogènes telles que les bactéries, les virus, les parasites ou les champignons et touchent des millions de personnes dans le monde **[52].**

Le contrôle des microorganismes reste un sujet brulant, parce qu'ils évoluent pour résister aux stratégies actuelles. Les efforts de contrôle ont un rôle important tant en santé publique pour prévenir la maladie qu'en thérapeutique pour traiter la maladie **[53].** Plusieurs méthodes sont utilisées pour contrôler la croissance des microorganismes à savoir : des agents physiques, méthodes mécaniques, agents biologiques et chimiques. En général tout produit chimique, physique ou biologique qui contrôle des microorganismes est désigné comme agent antimicrobien.

II**I.2Les antimicrobiens**

Selon la définition de Santé Canada, un agent antimicrobien correspond à une substance capable de causer la mort cellulaire des microorganismes pathogènes ou inhiber leur prolifération. Lorsque l'agent antimicrobien est capable de tuer le microorganisme, on dit qu'il est bactéricide pour les bactéries, fongicide pour les champignons, virucide pour les virus, etc. Lorsqu'il inhibe la prolifération du microorganisme, on dit plutôt qu'il est bactériostatique, fongistatique, etc. Pour simplifier le texte, les termes bactéricide et bactériostatique seront utilisés pour l'ensemble des microorganismes tués ou inhibés **[54].**

Le terme « agent antimicrobien » est un terme général qui englobe tous les agents antibactériens, antifongiques, antiviraux et antiparasitaires **[55, 56].** Les antimicrobiens portent différents noms selon leur usage :

- **Un antiseptique** est une substance utilisée pour désinfecter les mains et autres tissus vivants.
- **Un désinfectant** réfère à une substance servant à désinfecter les objets et les surfaces de contact.
- **Un antimicrobien** utilisé comme médicament pour combattre les infections bactériennes chez les humains et les animaux est plutôt un antibiotique.

Les antiseptiques, les désinfectants et les antibiotiques peuvent être bactéricides et/ou bactériostatiques et ils n'ont pas nécessairement d'effet sur les spores. À l'inverse, la

stérilisation, ou l'usage d'un stérilisant, est un processus qui permet de tuer complètement toutes vies de microorganismes et même les spores.

Finalement, un agent de conservation est une substance généralement bactériostatique ajoutée dans les produits alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques pour leur préservation **[57, 60].**

Contrairement aux désinfectants et antiseptiques qui ont un large spectre d'action en agissant sur une grande variété de microorganismes, les antibiotiques, eux, sont généralement plus spécifiques à une famille de microorganismes **[60].**

Les agents bactériostatiques et fongistatiques inhibent la croissance des bactéries et des champignons, respectivement. Par contre, les agents germicides (bactéricides et fongicides) tuent les germes pathogènes mais pas nécessairement les endospores.

III.3 classes des antimicrobiens :

Il existe différentes classes d'agents antimicrobiens :

- **Les antimicrobiens naturels :** c'est-à-dire des métabolites isolés directement d'organismes vivants tels que les végétaux et les microorganismes (bactéries, mycètes, champignons, micro algues, etc.).
- **Les antimicrobiens semi-synthétiques :** soit le résultat d'une modification d'une molécule naturelle pour augmenter son efficacité, sa spécificité, son spectre d'action ou encore pour diminuer les effets secondaires sur la santé humaine.
- **Les antimicrobiens synthétiques** : c'est-à-dire produits par synthèse organique en laboratoire **[58, 61].**

Depuis les années 1970, les méthodes de développement de nouveaux agents antimicrobiens prennent une place importante dans le secteur pharmaceutique. Plusieurs études se concentrent particulièrement sur le développement d'agents antimicrobiens naturels plutôt que synthétiques, ceci est à cause de ces phénomènes sont multiples mais le déterminant majeur est l'utilisation excessive et/ou inappropriée des antibiotiques **[62].** En effet, le rôle de l'exposition aux antibiotiques dans l'émergence de la multirésistance des bactéries est largement rapporté dans la littérature. Cette résistance provient de l'utilisation intensive d'antibiotiques à des fins humaines, vétérinaire et agricole, causant leur libération continue dans l'environnement et l'évolution des gènes résistants.

Dans cette perspective, un grand intérêt a été porté à la recherche de nouvelles substances biologiquement actives et efficaces comme alternative à partir des ressources naturelles. En

effet, puisque les antimicrobiens naturels ont une composition chimique très complexe, qui est le résultat de millions d'années d'évolution, certains d'entre eux arrivent à facilement pénétrer les membranes des pathogènes et à avoir une plus grande sélectivité sur certaines cibles cellulaires **[63].**

III.3.1 Les agents anti microbiens naturels

En outre leur origine naturelle, le développement d'agents antimicrobiens naturels procure aussi l'avantage de revaloriser la biomasse résiduelle provenant de différentes sources (sous- produits alimentaires, résidus forestiers et agricoles, biomasse marine, etc.). Et grâce à leur composition complexe, formés de plusieurs molécules, les extraits naturels deviennent de bons candidats pour développer des agents antimicrobiens à large spectre. En effet, il n'est pas rare qu'un extrait soit composé de **plus** d'une molécule antimicrobienne ce qui peut amener l'extrait à avoir plus d'une cible **[64].**

À ce jour, approximativement deux-tiersdes antibiotiques et autres antimicrobiens thérapeutiques sur le marché sont d'origine naturelle. Ils sont généralement produits par des microorganismes tels que des bactéries et des champignons Par exemple, l'antibiotique pleuromutiline a été isolé initialement des basiodiomycetes *Pleurotusmutilis* et *Pleurotuspasseckerianus* ou encore leramoplanine qui est produit par le champignon *Actinoplanes* **[65,66].**

Cependant, encore peu d'antimicrobiens d'origine végétale sont utilisés comme ingrédient actif dans les produits commerciaux bien que plusieurs études rapportent le potentiel de plusieurs plantes dans la synthèse d'antimicrobiens naturelscar celles-ci constituent une source potentielle de composés antimicrobiens et/ou inhibiteurs des mécanismes de résistances aux antibiotiques**[67, 68, 69].**

En effet, de nombreux composés d'origine végétale ont déjà démontré des propriétés antimicrobiennes ; ces composés agissent suivant plusieurs mécanismes : - formation de complexes avec des macromolécules telles que les protéines et les polysaccharides, inhibant ainsi leurs fonctions (polyphénols) ; - rupture de membranes microbiennes (flavonoïdes lipophiles, terpénoïdes, défensives) - inhibition de l'adhésion de protéines microbiennes aux récepteurs polysaccharidiques de l'hôte (polypeptides). Les plantes médicinales fournissent également des composés qui n'ont pas nécessairement un effet direct sur les microorganismes, mais qui augmentent ou restaurent l'activité des antibiotiques en inhibant les mécanismes de résistance. Ces composés appartiennent à diverses classes phytochimiques

et agissent comme inhibiteurs des pompes à efflux (flavonoïdes, terpénoïdes, alcaloïdes), inhibiteurs des PBP 2a (quinones, terpénoïdes) provoquant la perméabilité des membranes bactériennes (terpénoïdes) et inhibiteurs des bétalactamases (alkyls gallates) **[70].** On a également, le thymol, une molécule provenant du *Thymus vulgaris*est utilisé dans certains désinfectants commerciaux **[71].** Aussi, la berberine, un alcaloïde retrouvé dans plusieurs plantes, est vendue comme supplément naturel pour combattre les infections bactériennes et fongiques **[72].** Actuellement, et pendant la pandémie du COVID-19 y a eu émergence de désinfectants pour les mains à base d'huile essentielle**(figure III.1).**



Figure III.1 :Gel désinfectant pour main aux huiles essentielles

Les propriétés médicinales des huiles essentielles sont nombreuses : anti spasmodique, expectorant, rafraîchissant, diurétique, antiseptique…Cependant, dans ce travail, nous allons nous limiter à leurs propriétés antimicrobiennes qui constitueront l'essentiel de notre étude de recherche.

Les vertus antimicrobiennes des huiles essentielles sont bien connues et bien documentées. En effet, de nombreux travaux de recherche ont mis en évidence leur puissante activité antiseptique agissant aussi bien sur les bactéries, les champignons pathogènes que les virus **[73,74]**, leur conférant ainsi diverses indications thérapeutiques.

Depuis l'antiquité, les extraits aromatiques de plantes ont été utilisés dans différentes formulations, comme les médicaments et la parfumerie **[75].** Les huiles essentielles ont été considéré comme agents antimicrobiens les plus efficaces dans ces plantes. Les qualités microbiologiques des plantes aromatiques et médicinales sont connues. Toutefois, la première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix **[76].** Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes **[74].** Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de

bactéries, y compris celles qui développement des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre **[77,78,79].** Elles peuvent être bactéricides ou bactériostatiques **[80].** Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs [**81,82].**

L'activité bactériostatique est souvent plus assimilable aux huiles essentielles que l'activité bactéricide. Cependant il a été démontré que certains constituants chimiques des huiles essentielles ont des propriétés bactéricides **[83,84].**

En effet, des dommages au niveau des cellules de différents microorganismes ont été rapportés, illustrés par microscopie électronique. Citons l'effet bactéricide des huiles essentielles riches en monoterpénols et en phénols *sur Staphylococcus aureus* [**59]** ou encore celui de l'*Origanum compactum* sur *Escherichia coli* **[85].**

Toutefois, cette action bactéricide des huiles essentielles sur la cellule bactérienne demeure encore insuffisamment élucidée **[86].**

III.3.2 Mécanismes d'action antimicrobienne des huiles essentielles :

Plusieurs mécanismes seraient mis en jeu **[87].**

- Précipitation des protéines et des acides nucléiques **[88].**
- Inhibition de la synthèse des macromolécules (AND, ARN, protéines et peptido-glycanes **[89].**
- Inhibition de la perméabilité membranaire sélective **[90]**, et détérioration membranaire.
- Inhibition de la glycolyse et déplétion potassique **[91]**.
- Modification de la morphologie de la cellule bactérienne **[92].**
- Absorption et formation d'un film autour de la cellule bactérienne avec inhibition des processus de respiration, d'absorption et d'excrétion **[93].**

III.4 Huiles essentielles et antibiorésistance :

La croissance des bactéries, résistantes et multi-résistantes aux antibiotiques, peut être inhibée par certaines huiles essentielles. Ouassou en 2009 a étudié les propriétés antibactériennes de quelques huiles essentielles issues de la pharmacopée traditionnelle Ivoirienne,

Ocimumgratissimum, O. cimumcanum, Xylopiaaethiopica, Citrus aurantifolia, Lippiamultiflora, et Monanthotaxiscapea.

Les huiles essentielles de ces plantes se sont révélées efficaces contre les bactéries multi résistantes notamment les *E. coli* résistants aux céphalosporines de 3ème génération (C3GR), *E. coli* productrice de betalactamases à spectre élargi (BLSE) et staphylocoques dorés résistants à la méticilline (SARM).

En effet, les bactéries à Gram positif seraient plus résistantes aux huiles essentielles que les bactéries à Gram négatif **[94].**

Il existe cependant quelques exceptions. Les bactéries Gram à Gram négatif comme *Aeromonashydrophila***[95]** et *Campylobacterjejuni***[96]** ont été décrites comme particulièrement sensibles à l'action des huiles essentielles.

Par ailleurs, l'activité antimicrobienne des huiles essentielles diffère selon que la bactérie croît en forme planctonique (libre) ou au sein d'un biofilm bactérien.

La résistance bactérienne aux huiles essentielles, comme pour tout agent antimicrobien, semble être liée à la formation du biofilm. En effet, un isolat clinique récent peut montrer une résistance augmentée, pouvant provenir des interactions avec les cellules de l'hôte **[97].** Tandis que les microorganismes évoluant sous forme planctonique sont plus susceptibles **[98].**

Chapitre IV

Matériels et Méthodes

IV.1 Matériels et Méthodes :

Pour la réalisation du côté pratique de cette étude**,** On a adopté un plan selon l'organigramme de la figure IV.1 qui structure les différentes préoccupations réalisées dans la partie pratique de ce travail.

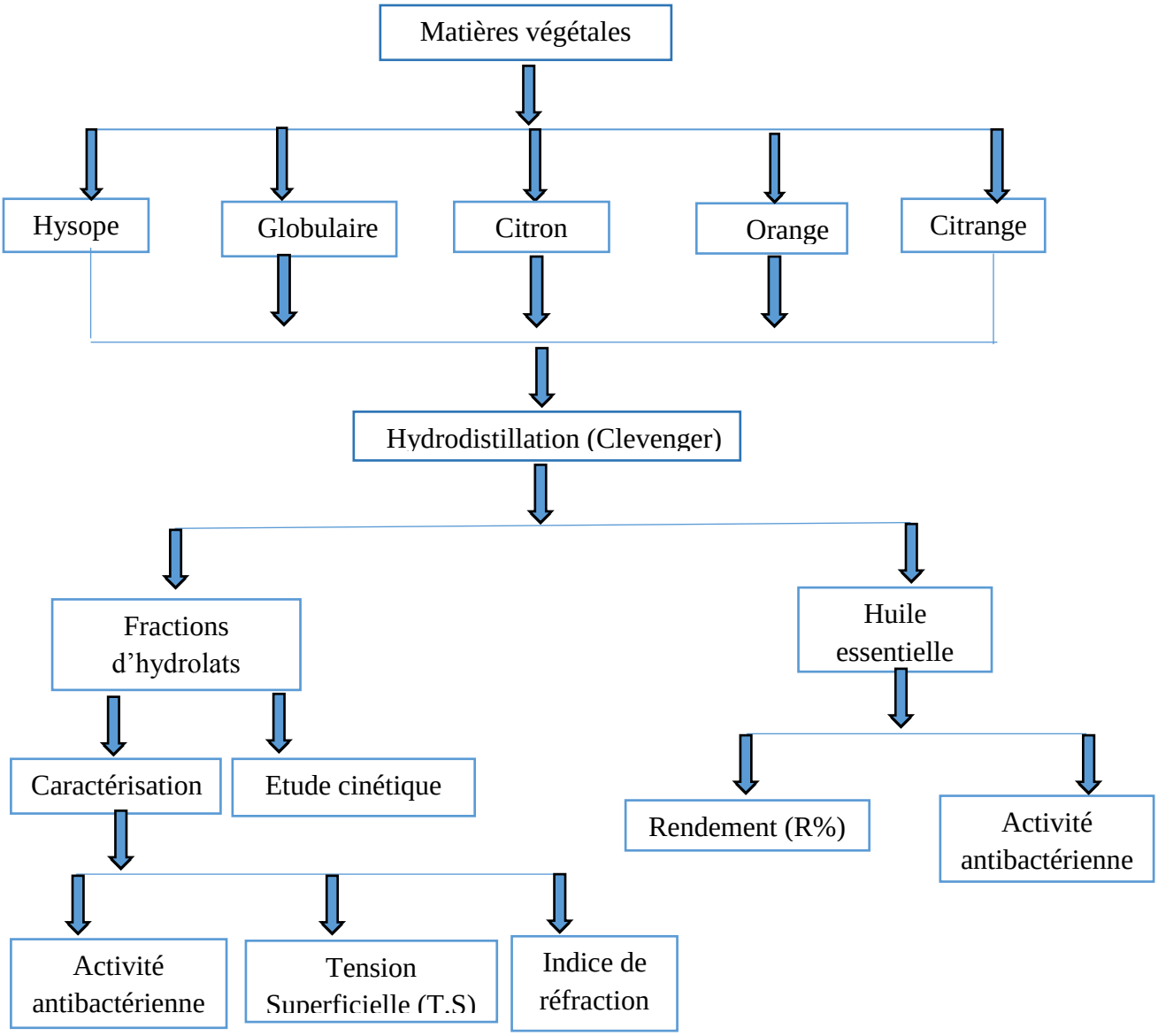


Figure IV.1 : L'organigramme des différentes préoccupations de la partie pratique**.**

IV.1.1 Réactifs chimiques et appareillage :

Ce travail a nécessité l'ensemble du matériel et d'appareillage décrit sur le tableau IV.1.

Tableau IV.1 : Réactifs chimiques et appareillage.

Appareillage	Verreries	Réactifs
Balance sensible VWR	Burette	Eau distillée
Etuve	Tubes à essai	Diéthyl éther
Four à moufle	Pipette graduée	Ethanol
	Entonnoir	
	Eprouvette	
	Fioles	
	Ampoule à décanter	

IV. 1. 2 Matériels biologiques :

Le matériel biologique utilisé afin d'évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des hydrolats issus de l'hydrodistillation des matières végétales étudiées est rassemblé sur le tableau IV.2.

Tableau IV.2 : Matériels biologiques utilisé.

Matériels	Produits
Boites Pétri	Eau physiologique
seringue	Gélose nutritive
Bec benzène	Miller Hinton
Pipettes pasteur	Les souches bactériennes
Les écouvillons	
Autoclave	

IV.1.2.a. Les Souches bactériennes testées :

Les microorganismes utilisés dans ce travail sont des bactéries de (Gram+ et Gram-).

Gram positif : Staphylococcus sp, Bacillus subtilis.

Gram négatif : Escherichia coli, Pseudomonas.

IV.1.3. Matière végétale :

Pour entreprendre les travaux expérimentaux de cette étude on a opté à extraire les huiles essentielles de trois espèces de plantes aromatiques :

- Agrumes (orange, citron, citrange) qui ont été cueillies de la région de Blida durant deux périodes distinctes :
  - Mars (feuilles fraiches)
  - Mai (feuilles sèches)

- Globulaire cueillie de la région de Médéa durant trois périodes distinctes :
  - Janvier (feuilles fraiches)
  - Février (parties aériennes fraiches)
  - Mars (feuilles fraiches)
- Hysope cueillie de la région de Blida durant deux périodes distinctes :
  - Mars (parties aériennes fraiche)
  - Mai (parties aériennes sèche)

Tous les échantillons récoltés ont été bien lavées, bien essuyées et conservées dans un papier aluminium à l'abri de la lumière dans un réfrigérateur jusqu'à leur utilisation.

IV.1.4. Caractérisation des feuilles des matières végétales :

Des échantillons de la matière végétale utilisée ont subi une caractérisation pour dévoiler leur contenu en :

- ✓ Eau.
- ✓ Matière organique.
- ✓ Matière minérale.

IV.1.4.a Teneur en eau TE (%) :

Le taux d'humidité de la matière végétale a été déterminé par dessiccation des échantillons (2g) dans une étuve ventilée à une température de 60˚C ±5˚C. Après avoir été refroidis à température ambiante dans un dessiccateur, les échantillons sont ensuite pesés avec précision après un temps de vingt-quatre heures. C'est une méthode gravimétrique qui consiste à déterminer de la perte de poids par dessiccation **[99]**. Considérons la teneur en eau TE exprimée en pourcentage (%), elle peut être calculée par la relation suivante :

$$TE(\%) = [(m_i - m_f) / m_i]. 100 \qquad \text{(IV-1)}$$

Avec :

TE : teneur en eau en pourcentage (%).

m_i : masse initiale des matières végétales en gramme (g).

m_f : masse finale des matières végétales après séchage en gramme (g).

Les étapes de détermination de la teneur en eau des matières végétales sont schématisées sur la figure IV-2.

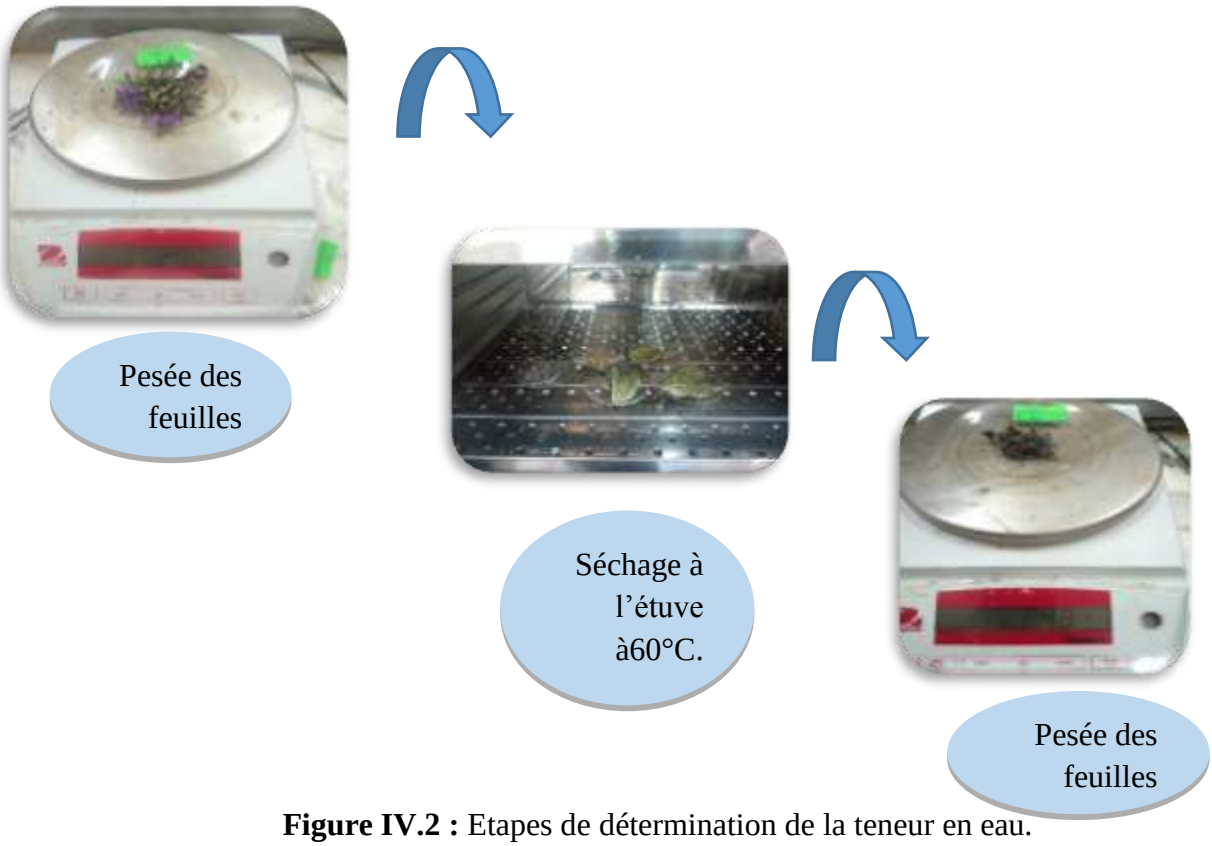


Figure IV.2 : Etapes de détermination de la teneur en eau.

IV.1.4.b Teneur en matière organique MO(%) :

La quantité de la matière organique est déterminée par la différence entre la masse de la matière sèche et la masse de la matière minérale. Cette mesure est effectuée par calcination d'une masse des feuilles (Globulaire, agrumes, hysopes) calciné dans un four à moufle réglée à 600^{O}C pendant 6 heures. Une pesée du résidu de calcination est faite pour chaque échantillon. La teneur en matière organique exprimée en % est définie par la relation suivante :

$$MO\ (\%) = [(m_i - m_f) / m_i]. 100 \qquad \text{(IV-2)}$$

Avec :

MO(%) : Teneur en matière organique

m_i : masse initiale des matières végétales

m_f : masse finale des matières végétales après calcination (c'est la masse des cendres)

Les étapes de détermination de la teneur en matière organique des matières végétales sont schématisées sur la figure IV- 3 :

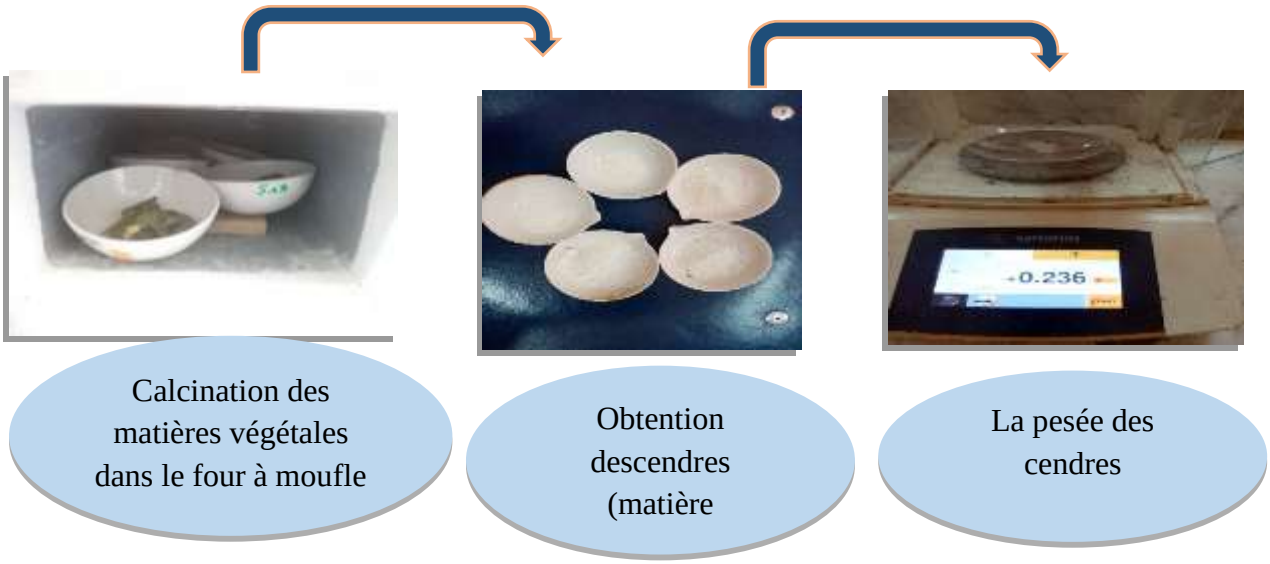


Figure IV.3 : Etapes de la mesure des quantités de la matière organique dans les matières végétales

IV.1.4.c Teneur en matière minérale MM (%) :

La teneur en matière minérale (teneur en cendres) a été déduite à partir des mesures obtenues de la minéralisation de la matière sèche exposée précédemment. Cette teneur exprimée en (%) est estimée par la relation :

$$MM\ (\%) = (m_f / m_i) .100 \qquad \text{(IV-3)}$$

MM : Teneur en matière minérale.

m_i : masse initiale des matières végétales.

m_f : masse finale des matières végétales après calcination (c'est la masse des cendres).

IV.1.5 Isolation des huiles essentielles :

IV.1.5.1 Obtention des hydrolats et d'huiles essentielles par Hydrodistillation :

Les huiles essentielles ont été extraites à partir de la matière végétale à l'aide d'un dispositif de type Clevenger (figure IV.4) selon la méthode décrite par Monteil-Rivera et al.2013 **[100,101].**

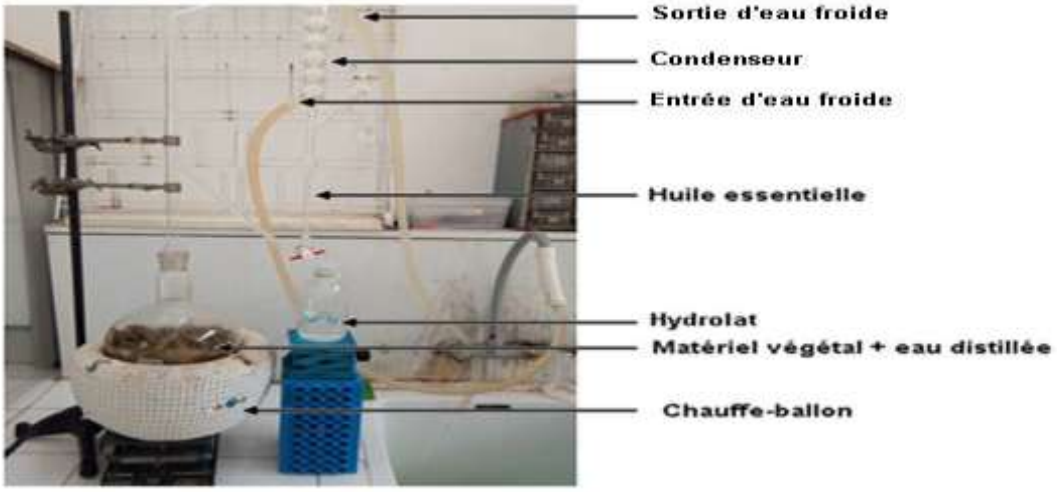


Figure IV.4 : Appareil d'hydrodistillation de type Clevenger.

Le principe de fonctionnement du Clevenger est basé sur l'extraction des huiles essentielles sous l'effet de l'eau chaude. Cette dernière provoque la libération des molécules volatiles (HE) qui s'évaporent et se condensent ensuite à travers un réfrigérant. La distillation a été effectuée avec un recyclage (cohobage). Ce système permet de faire des prélèvements horaires sur la phase aqueuse et organique destinées aux mesure de la cinétique d'hydrodistillation. Les étapes suivies sont récapitulées dans l'organigramme sur la (figure IV.5).

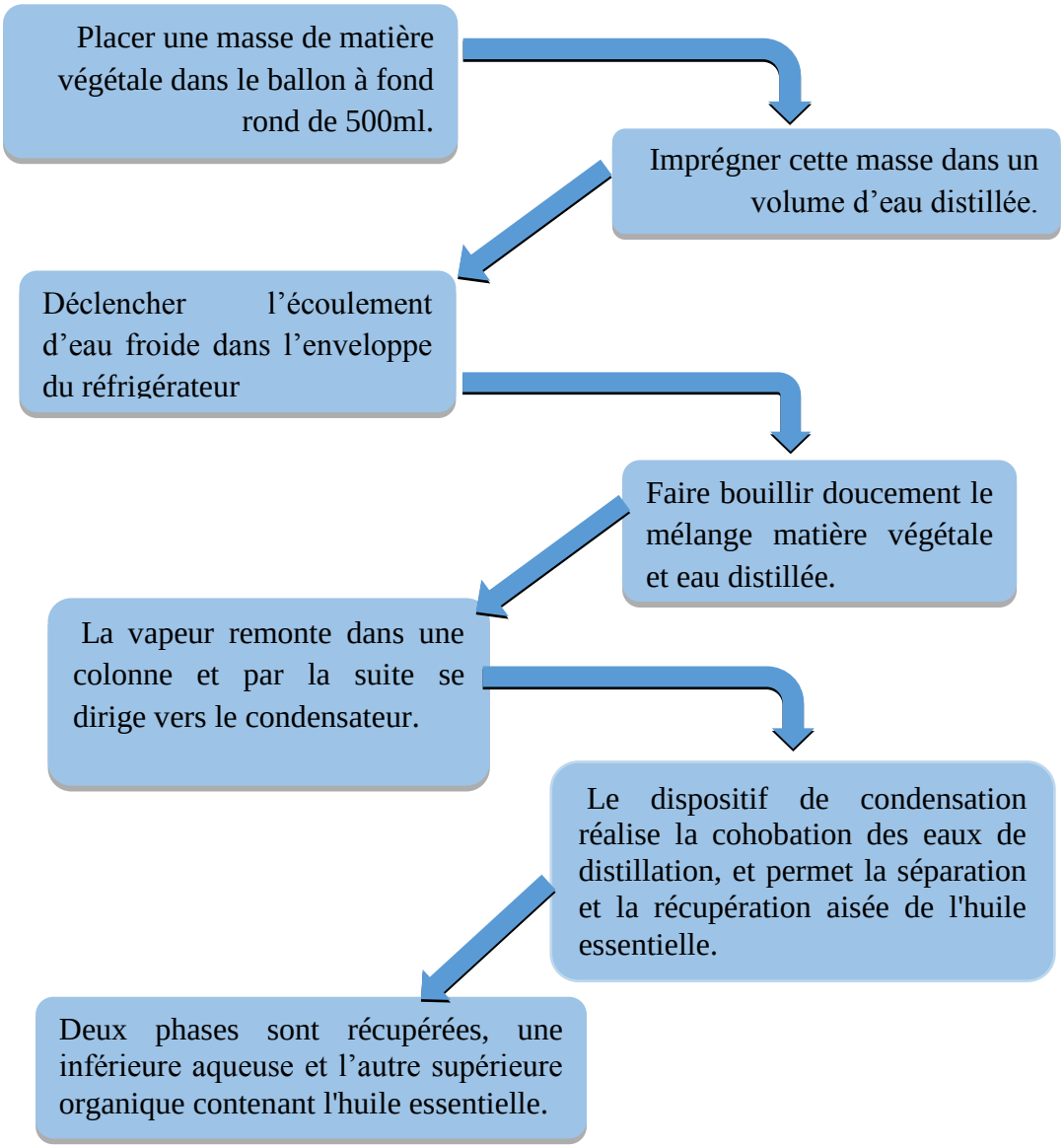


Figure IV.5 : le protocole expérimental pour la réalisation de l'hydrodistillation assistée par Clevenger.

IV.1.5.2 Les conditions opératoires d'extraction des HEs des matières végétales :

Toutes les conditions opératoires des extractions des HEs effectuées dans cette partie expérimentale sont rassemblées dans le (tableau IV.3).

Tableau IV.3 : Conditions opératoires d'extraction des HEs des matières végétales par hydrodistillation.

	Globulaire	Les agrumes	Hysopes
Période de récolte	Janvier-Février-Mars	Mars – Mai	Mars - Mai
Région de récolte	Médéa	Blida	Blida
Etat de la matière végétale	Fraiche et sèche	Fraiche et sèche	Fraiche et sèche
Masse de la matière végétale	30g	25g	15g
Volume d'eau	300ml	250ml	350ml
Taille de la Matière végétale	Non broyée	Non broyée	Non broyée
Rapport (m/v) : matière végétale/volume d'eau	1/10	1/10	1/20
Temps d'extraction	2h	2h	2h

A l'exception du lot de Mai tous les autres lots ont fait l'objet d'une étude cinétique qui consistait à recueillir des échantillons d'hydrolats à des intervalles de temps bien définis (3min, 5min, 10min, 15min, 30min, 60min, 120min).

IV.1.5.3 Calcul de rendement en HEs :

Le rendement (R%) en HEs obtenues est le rapport entre le poids de l'huile essentielle extraite et le poids de la plante sèche traitée. Il est calculé par la formule suivante :

$$R\ (\%) = [P_{HE} / Pi].100 \qquad \textbf{(IV-4)}$$

R (%) : rendement d'huile essentielle en pourcentage

P_{HE} : poids de l'huile essentielle extraite en gramme (g)

Pi : poids initial des matières végétales traitées en gramme (g).

IV.1.5.4 la caractérisation des fractions d'hydrolats :

IV.1.5.4.a Mesure de la tension superficielle :

Les mesures de la tension superficielle de toutes les fractions d'hydrolats obtenus dans l'étude cinétique ont été réalisées à l'aide d'un tensiomètre à Nouy (figure IV.6) **[102]**. Il s'agit de mesurer la force F nécessaire pour détacher un anneau en platine de la surface de l'hydrolat

qui est placé dans un Bécher. Cette méthode de mesure de la tension de surface s'appelle également méthode par détachement.



Figure IV.6 : Tensiomètre.

IV.1.5.4.b Mesure de l'indice de réfraction :

L'indice de réfraction est défini par le rapport de la vitesse de transmission d'une radiation lumineuse (la raie D du sodium 589nm) dans le vide et dans un milieu transparent considéré. C'est un nombre sans dimension caractéristique d'un milieu donné.

On Place l'Hydrolat à l'aide d'une pipette dans la cellule de mesure jusqu'au trait de signale ; le couvercle est refermé pendant 15 seconde (temps nécessaire pour que l'appareil soit stabilisé à 20°C) et on règle avec les deux boutons jusqu'à la location du trait signale au centre de la cellule.

L'indice de réfraction d'une HE est le rapport de sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'aire dans l'HE maintenue à température constant. Cette grandeur est sans dimension et son symbole est n_D^T.

L'indice de réfraction est mesuré à l'aide d'un réfractomètre (figure II-7), l'indice de réfraction n_D^T, à la température de référence T=20°C est donné par la formule suivante :

$$\mathbf{n_D^T = n_D^{T'} + 0.0004(T' - T)(IV - 5)}$$

Avec :

T' : Température de l'expérience (25°C).



Figure IV .7 : Réfractomètre.

IV.1.6 Evaluation de l'activité antibactérienne :

IV.1.6.a Mode opératoire :

L'évaluation du potentiel antibactérien a concerné les substances suivantes :

- Les fractions d'hydrolats obtenues de l'hydrodistillation de l'Hysope, de la globulaire et des agrumes.
- Les huiles essentielles obtenues de l'hydrodistillation des :
  - ✓ Feuilles de Globulaire
  - ✓ Parties aériennes de l'Hysope
  - ✓ Feuilles d'agrumes (citrange, orange, citron)

  Toute la matière végétale utilisée dans cette partie a été récolté en mois de Mars.

L'activité antibactérienne des différents échantillons testés a été déterminée contre plusieurs souches bactériennes en utilisant la méthode des disques, son principe est basé sur la diffusion des substances testées du disque vers le milieu de culture solide selon le protocole suivant :

- Une suspension bactérienne d'une opacité de 0.5 Mc Ferland (absorbance de 0.08-0.1 à 600 nm) est préparée à partir d'une culture jeune (18 heures).
- Un inoculum de cette suspension est ensemencé sur des boites de Pétri contenant la gélose Mueller Hinton.
- L'ensemencement est effectué par écouvillonnage, le frottement de l'écouvillon sur la même boite de pétri a été répété à trois reprises en tournant à chaque fois la boite d'un angle de 60°.
- Une fois l'ensemencement est effectué, des disques de 6 mm de diamètre bien imprégnées de l'extrait sont déposés sur la surface de la gélose (Muller Hinton) ensemencée.
- Après une incubation de 24 heures à 37°C, les diamètres des zones d'inhibition produites par les extraits étudiés sont mesurés, plus le diamètre d'inhibition est grand, plus l'activité antibactérienne est importante **[103].**

Résultats et discussions

V. Résultats et discussions :

V.1.Caractérisation des matières végétales :

Les résultats de la caractérisation des cinq échantillons des feuilles des matières végétales :Globulaire, de la région de Médéa ainsi que l'Hysope, citron, orange, citrange provenant de la région de Blida, sont représentés par les trois teneurs suivantes :

- Teneur en eau TE%,
- Teneur en matière organique MO%
- Teneur en matière minérale MM %.

V.1.1 La teneur en eau TE(%) :

La figure V.1 illustre le contenu en eau de la partie aérienne de l'Hysope et les feuilles de la Globulaire et des agrumes.

A la lumière de ces résultats on peut noter que :

- Les feuilles de Globulaire présentent une richesse en eau par un TE=89% suivie par un ordre décroissant des parties aériennes d'Hysope avec TE=84%, des feuilles de Citron d'une valeur de TE=70,33% puis des feuilles du citrange et d'orange avec des valeurs de TE% : 65% et 57,33% respectivement. La composition en eau des matières végétales varie d'une espèce à l'autre.
- Le contenu en eau des feuilles d'agrumes varie d'une espèce à l'autre.
- L'état de la matière végétale (frais, sec) manifeste des fluctuations du taux de perte d'eau d'une espèce à l'autre. Les feuilles de la Globulaire peuvent perdre 98% de leur poids en eau tandis que cette perte peut atteindre 92%et 90% pour les feuilles d'Hysope et celles d'Orange respectivement (figure V-2).Dans un travail de Jérémie, B., 2010 **[104]**, ont trouvé qu'au cours des différentes périodes du cycle phénologique de la plante Globulaire, le stockage de l'eau est variable (tableau V-1).

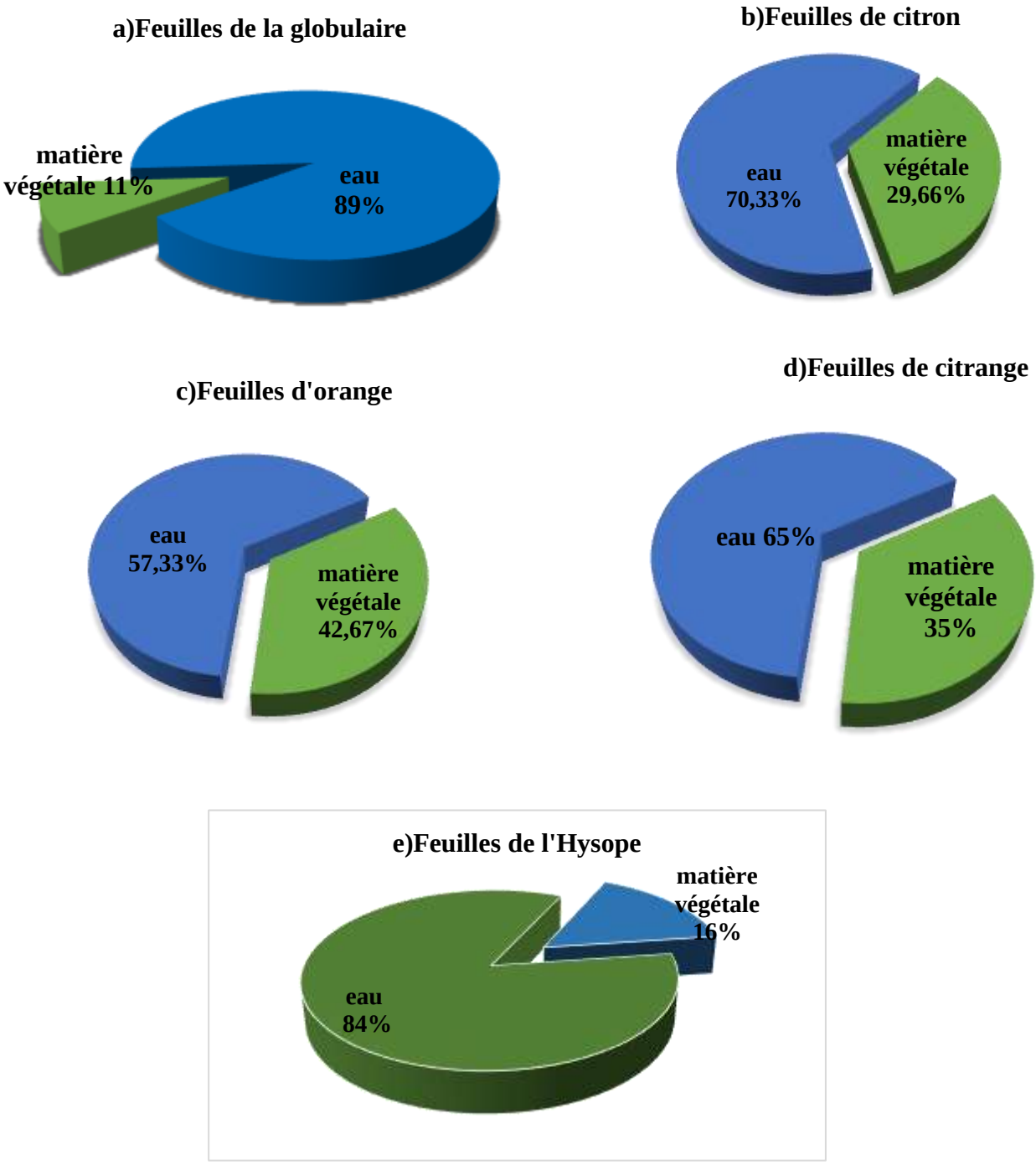


Figure V.1 : Teneurs en eau TE% dans les feuilles des matières végétales récoltées en Mars (Globulaire, Hysope, Orange, Citrange, Citron).

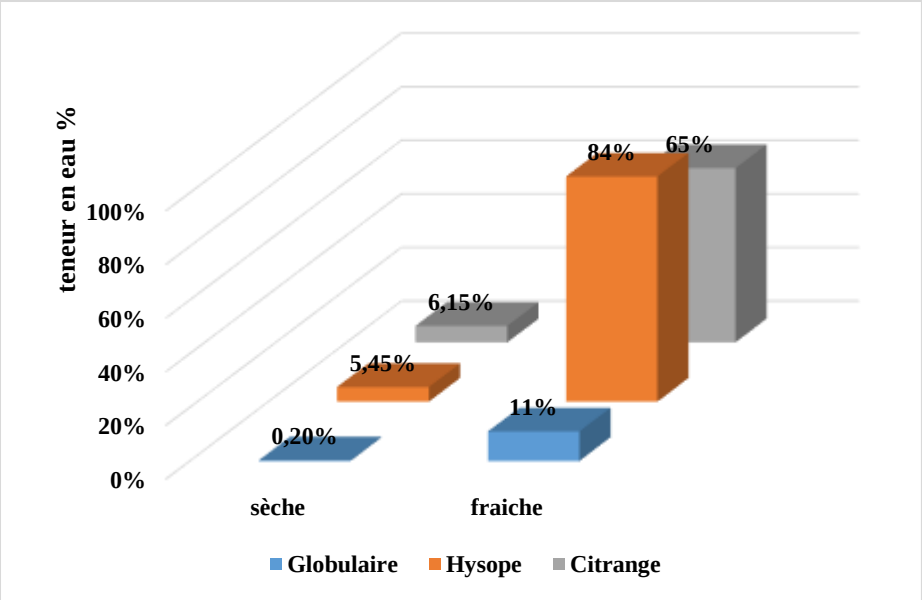


Figure V.2 : Influence de l'état des matières végétales (feuilles de Globulaire, feuilles d'Hysope, feuilles de Citrange) sur la teneur en eau TE%.

Tableau V-1 : Variation de la teneur en eau des feuilles de la Globulaire au cours du temps **[104]**

Mois	Nov	Janv	Février	Avril	Mai
TE%	42.3%	62.5%	59%	55%	40,73%

V.1.2Teneur en matière organique MO(%) :

Les feuilles d'hysope contiennent en majeur partie de leur masse des matières organiques avec un taux qui atteint 97.55%, celui-ci qui porte clairement sur le taux de la partie minérale de cette plante, tandis que les taux de cette catégorie de matière organiques'avoisinent et représentent 93.9%, 93.86% et 93.7% de la matière végétale des feuilles d'Orange ,

Globulaire et Citron respectivement. Le plus faible taux est celui enregistré pour les feuilles de Citrange de 92.9% (figure V.3).

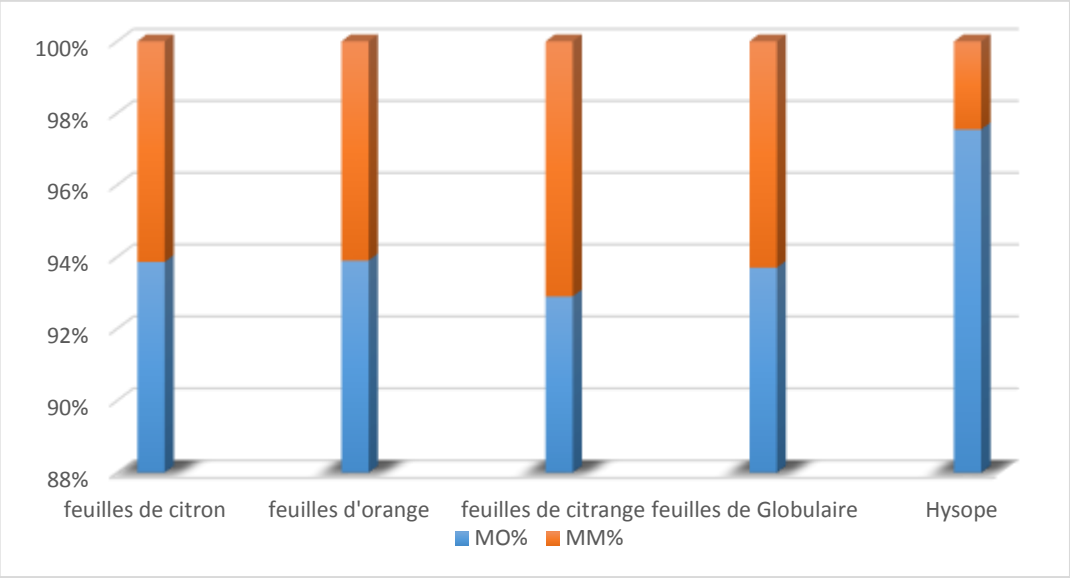


Figure V.3 : teneur en matières organiques MO% les feuilles des matières végétales (Globulaire, Hysope, Orange, Citrange, Citron).

V.1.3 Teneur en matières minérale MM%:

Les résultats des contenus en matières minérales (MM%) de tous les échantillons des matières végétales étudiées sont représentées sur la figure V.3. Il ressort de ces résultats que toutes les feuilles sont pauvres en matières minérales avec un taux allant de (2.45%-7.1%) ou les feuilles de citrange possèdent la plus haute quantité de matière minérale. Il est rapporté que pour les agrumes, généralement tant que les réserves en matières minérales (cendres) sont importantes la qualité des fruits est meilleure.

V.2.Huiles essentielles :

Dans cette partie on expose les résultats :

- Des rendements des huiles essentielles issues d'une durée de 2h d'hydrodistillation par Clevenger des plantes étudiées dans les conditions opératoires citées dans le tableau V-1. Ces résultats sont représentés sur l'histogramme de la figure V-4.
- Des rendements en huiles essentielles des fractions relevées à des intervalles de temps(3min. 5min, 10min, 15min, 30min, 1h, 2h) pour les feuilles fraiches de la Globulaire de mois de Mars.
- Des mesures de la tension superficielle et de l'indice de réfraction des fractions d'hydrolats obtenues de l'hydrodistillation par Clevenger des feuilles de la Globulaire, l'hysope et les agrumes (fraiche et sèche)de la région de Médéa et Blida respectivement cueillies pendant les trois mois (Janvier, Février , Mars)pour la Globulaire et (Mars) pour l'Hysope et les agrumes .
- Des activités antibactériennes des fractions hydrolats obtenues au cours des intervalles précis de temps ainsi que des HEs obtenues.

V.2.1 Propriétés organoleptiques :

- Les HEs issues des feuilles de Globulaire soumises à une hydrodistillation assistée par Clevenger, sont des substances hautement volatiles, d'une odeur aromatique caractéristique de Globulaire et de couleur jaune verdâtre.
- La partie aérienne d'Hysope soumise à une hydrodistillation par Clevenger a donné des substances huileuses d'une odeur aromatique caractéristique d'Hysope et de couleur jaune.
- Les huiles essentielles des feuilles des agrumes (Citron, Orange ,Citrange) manifestent une odeur et une couleur caractéristique jaune clair limpide.

V.2.2 Rendement en HEs:

Les rendements en huiles essentielles extraites à partir des feuilles de la Globulaire, d'agrumes et d'Hysope issues d'une hydrodistillation de type Clevenger sont représentés sur la figure V.4. Il ressort de l'examen de ces résultats que :

- ☞ Pour toutes les matières végétales (Globulaire, Citrange, Citron) à l'état frais les quantités des HEs obtenues représentent des rendements faibles allant 0,05% pour le Globulaire jusqu'à 0,96% enregistré pour le Citron. Le rendement des feuilles de

citrange fraiches atteint 0.27%.le rendement des feuilles de la Globulaire est plus inférieur que celui donné par Jérémie, B., 2010 **[104]** et qui varie de [0,7%-2,1%]. D'après la littérature la présence de l'eau dans la matière végétale provoque des obstacles au transfert des composés des huiles essentielles de l'intérieur de la matière végétale vers l'extérieur **[105].**

- ☞ Le plus haut rendement a été enregistrée dans le cas des feuilles d'orange qui témoigne la richesse de ces feuilles en huiles essentielles. Cette richesse est aussi marquée pour l'Hysope à l'état frais avec un rendement de 3,50%.
- ☞ A l'état sec les rendements en HEs des feuilles de Globulaire et de Citrange, sont amélioré de 2 fois et 8 fois respectivement par rapport à l'état frais. On a enregistré 0 ,11%, et 2,19% pour les feuilles de la Globulaire et du Citrange successivement. Aux feuilles de Globulaire est attribuée le plus faible rendement (0.05% à l'état frais), par contre une supériorité en rendement en HEs (estimée à plus 2,5 fois) est manifestée à l'état frais de l'hysope par rapport à celui sec ou il peut atteindre 3,50%. Vu la différence de la période de récolte pour l'état frais et l'état sec des matières végétales, ces résultats peuvent s'expliquer d'une part par l'influence du taux d'humidité -car une présence d'eau fait trainer la diffusion des HEs lors de l'hydrodistillation par Clevenger et d'autre part la variation des quantités des HEs essentielles bio-synthétisées par les plantes avec la variation saisonnière qui marque différents stades de maturité des plantes.
- ☞ La contrainte de la différence de l'espèce botanique sur la variabilité du rendement en HEs est clairement prononcée à l'état sec des feuilles de la Globulaire, Hysope ainsi que celles du Citrange. Dans leur état frais, l'ampleur de la différence en rendement entre les éspèces Hysope,Orange, Citrange, Globulaire et Citron devient plus importante.
- ☞ Chez les Citrus, les rendements en HEs varient dans l'intervalle [0,27%- 12.29%] qui s'éloignent des valeurs reportées dans la littérature qui varient dans l'intervalle [1-3%] et qui sont différentes selon l'espèce **[106][107].**
- ☞ Les quantités d'HEs extraites des feuilles de l'hysope sont bien inférieures que celles trouvées par **[108]** qui a enregistré un rendement de 1.8%(fraiche) et 2.10%(sèche).

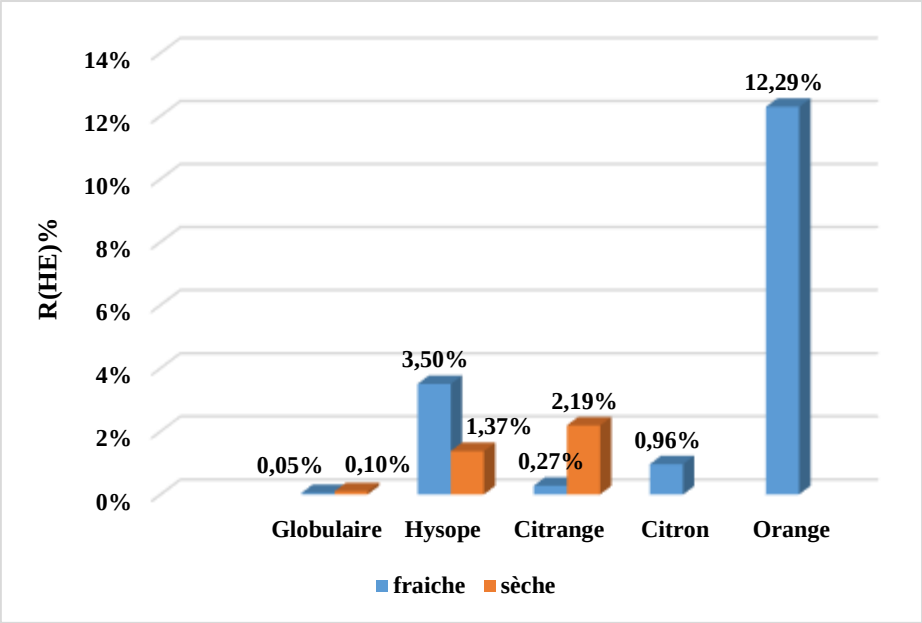


Figure V.4 : Rendement des huiles essentielles des matières végétales (sèche et fraiche).

La figure V.5 représente une courbe cumulative qui décrit l'évolution de la cinétique d'hydrodistillation à partir des feuilles fraiches de la Globulaire récoltée en mois de Mars. Il ressort qu'avec le temps l'augmentation de la vitesse d'extraction des huiles essentielles est :

- ✓ Importante dans une première période [3min- 30min]
- ✓ Très faible dans une deuxième période [30min-120min]

Ceci traduit qu'il existe dans les feuilles de la Globulaire une fraction d'HEs accessible et facilement extractible par hydrodistillation, celle-ci se localise dans les sites exogènes des HEs dans la matrice végétale, et une autre fraction difficilement accessible par HD qui occupe les sites endogènes. Plusieurs travaux ont révélé les mêmes allures des courbes pour d'autres plantes **[105].**

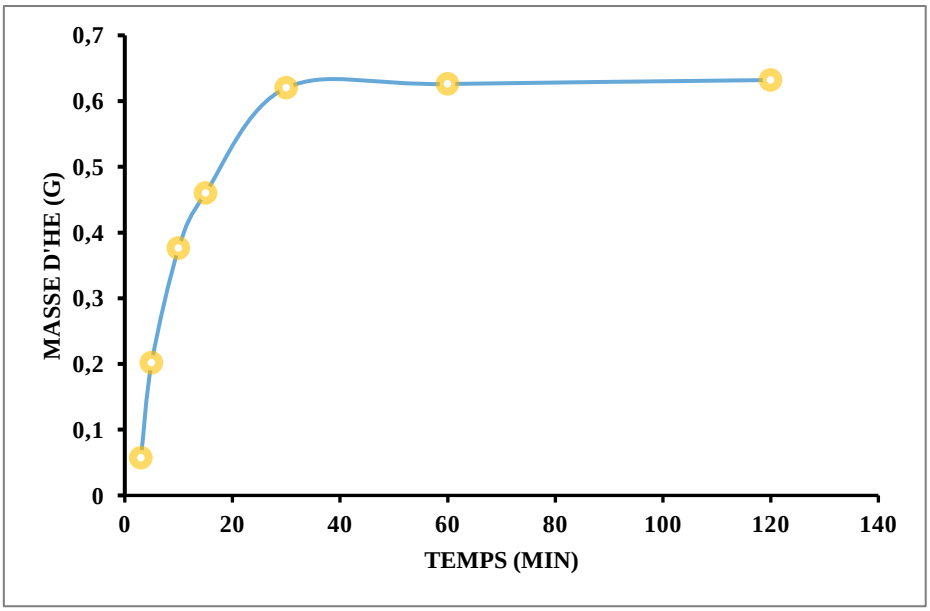


Figure V.5 : Courbe cumulative de la cinétique d'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation a partir des feuilles fraiches de la Globulaire (Mars).

V.2.3 Tension superficielle :

Les résultats des mesures de la tension superficielle des fractions d'hydrolats des matières végétales (feuilles de : Globulaire, Hysope, agrumes) sont récapitulés dans le tableau V.3,. Elles ont été obtenus en utilisant la méthode d'arrachement d'un film liquide par un anneau. Cette caractérisation s'est porté sur l'effet de l'espèce botanique ainsi que celui du temps d'hydrodistillation sur la grandeur de la tension superficielle.

A la lumière des résultats du tableau V.3, on peut noter que :

- Les valeurs de la tension superficielle des hydrolats issus d'hydrodistillation par Clevenger sont comprises dans l'intervalle [34,2 - 54,4] mN/m. Elles sont bien inférieures à celles de l'eau (62 mN/m) ce qui leur confèrent le pouvoir d'abaisser la tension superficielle de l'eau.
- Ce pouvoir est maximal pour l'hydrolat des feuilles de l'Hysope récoltées en mois de Mars issu après 10min d'hydrodistillation avec une T.S de 34,2 mN/m, Ce qui traduit la richesse de cette fraction en composés dotés de ce pouvoir. Le plus faible pouvoir est attribué à la fraction d'hydrolat de 5 minutes des feuilles de la Globulaire, cette matière

végétale a manifesté une faible teneur en HEs qui mène à un hydrolat de très faible concentration en composés aromatiques surtout pour cette fraction.

- La valeur de la tension superficielle est variable avec l'espèce botanique et le temps d'extraction figure (V-6), cette variabilité est importante pour les feuilles de la Globulaire (Janvier) qui varient dans l'intervalle [49,3- 35,9mN/m]. Il est à noter alors qu'une variabilité de composition chimique règne au cours du temps d'extraction, et ce n'est qu'à partir de 120minutes d'extraction qu'elle devient très riche en agents tensio-actifs.
- Il paraît que par rapport aux autres espèces, l'hydrolat de l'Hysope peut englober des agents à haut pouvoir tensio-actif pour tous l'intervalle de temps [2min-120min].
- Les feuilles de citron manifestent des tensions superficielles qui avoisinent celles de l'Hysope surtout pour les fractions d'hydrolat obtenu après 1heure d'hydrodistillation.
- Pour les Citrus, la T.S des feuilles d'oranges se rapprochent de celle des feuilles de Citron pour les temps prolongés d'hydrodistillation, et se rapprochent de celle des feuilles de Citrange pour les temps réduits d'hydrodistillation.

Tableau V.2 : Valeurs des tensions superficielles des fractions d'hydrolats des feuilles de la Globulaire, des agrumes et de l'Hysope.

T.S (mN/m)	Période de récolte	Echantillon	3min	5min	10min	15min	30min	1h	2h
	Janvier	Globulaire	49.3	45.1	43.5	40.9	44.4	38.2	35.9
	Février		49.5	54.4	54.1	52.4	51.9	43.7	44.5
	Mars		49.4	49.5	47.9	46.8	45.5	46.9	42.3
	Mars	Orange	39.9	41.8	43.6	41.9	36.7	35.5	35.3
		Citron	37.1	37.9	35.7	35.6	35.9	35.5	35.6
		Citrange	43.5	42.3	43.1	41.7	41.3	41.1	41.4
	Mars	Hysope	36.9	35.5	34.2	36.3	34.9	35.5	35.8

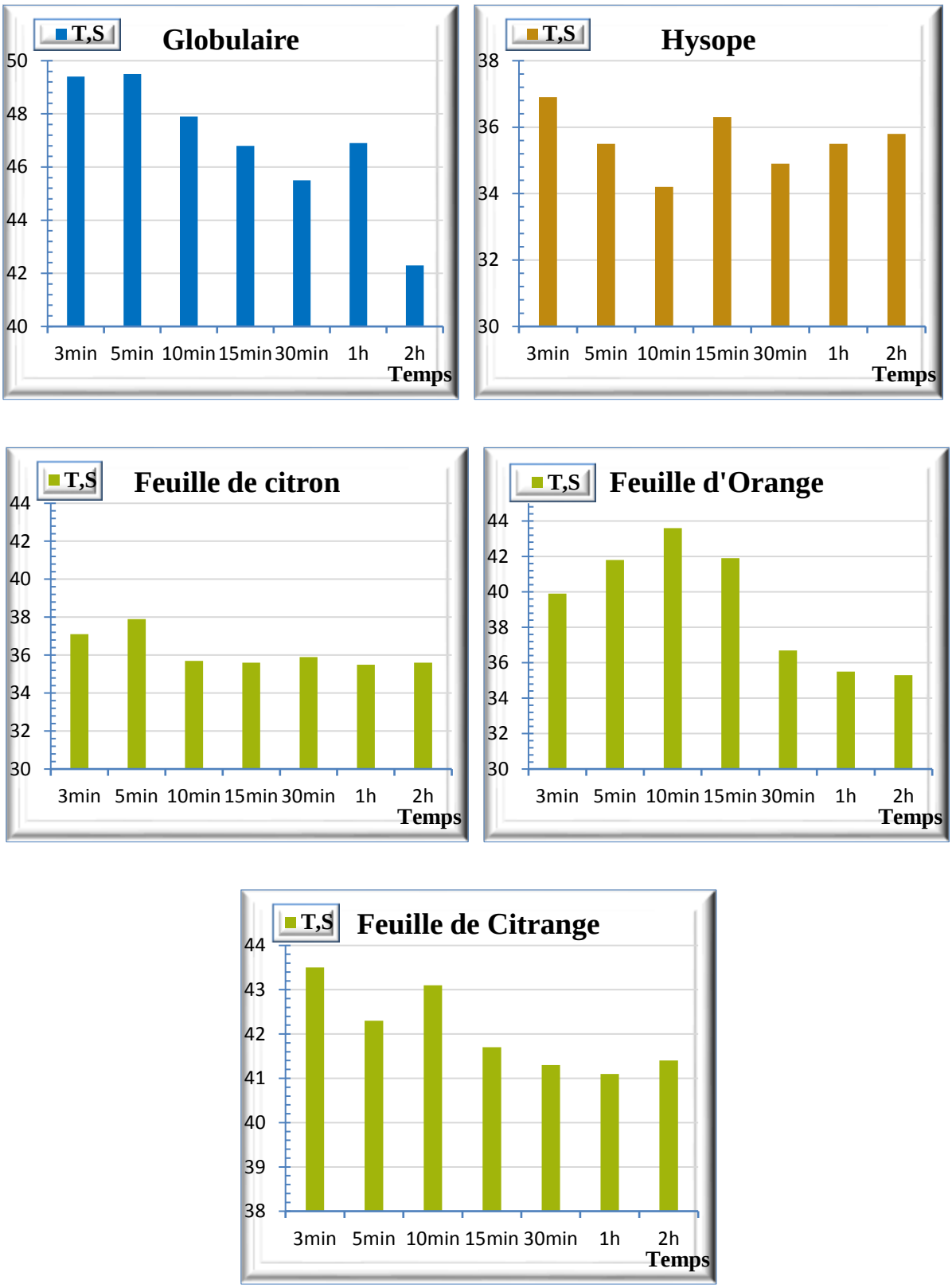


Figure V.6 : Variation de la tension superficielle des hydrolats en fonction du temps d'hydrodistillation des différentes matières végétales.

V.2.4 Indice de réfraction :

Il ressort de l'examen de toutes les valeurs de l'indice de réfraction des fractions d'hydrolats des feuilles de toutes les matières végétales (globulaire, hysope, agrumes) représentées sur le tableau V-6 que :

- ☞ Tous les indices de réfractions sont supérieurs à celui de l'eau (1,3356) qui indique une présence des substances aromatiques dans toutes les fractions d'hydrolats.
- ☞ Les réponses de l'indice de réfraction aux variations du temps sont modérées et ne concernent que les cas de la globulaire, de Citrange et de l'hysope récolté en mois de Mars où la plus importante est enregistré pour le Citrange(figure V-7). Ceci témoigne d'une fluctuation de compositions chimiques de l'hydrolat en fonction du temps.
- ☞ Les hydrolats des espèces (citron, citrange) manifestent une variation de l'indice de réfraction avec les temps prolongés d'hydrodistillation.

Tableau V.3 : Valeurs d'indice de réfraction des fractions d'hydrolats de feuilles de la globulaire, des agrumes et de l'Hysope.

Période de récolte	Echantillon	Indice de réfraction (IR)						
		3min	5min	10min	15min	30min	1h	2h
Janvier	Globulaire	1.6315	1.6315	1.6315	1.6315	1.6315	1.6315	1.6315
Février		1.6315	1.6315	1.6315	1.6315	1.6315	1.6315	1.6315
Mars		1.6260	1.6245	1.6285	1.6250	1.6194	1.6255	1.6245
Mars	orange	1.6315	1.6315	1.6315	1.6315	1.6315	1.6315	1.6315
	Citron	1.6275	1.6275	1.6275	1.6275	1.6275	1.620	1.620
	Citrange	1.6273	1.6258	1.6260	1.6208	1.6145	1.6135	1.6055
Mars	Hysope	1.6375	1.6285	1.6270	1.6270	1.6275	1.6275	1.6275

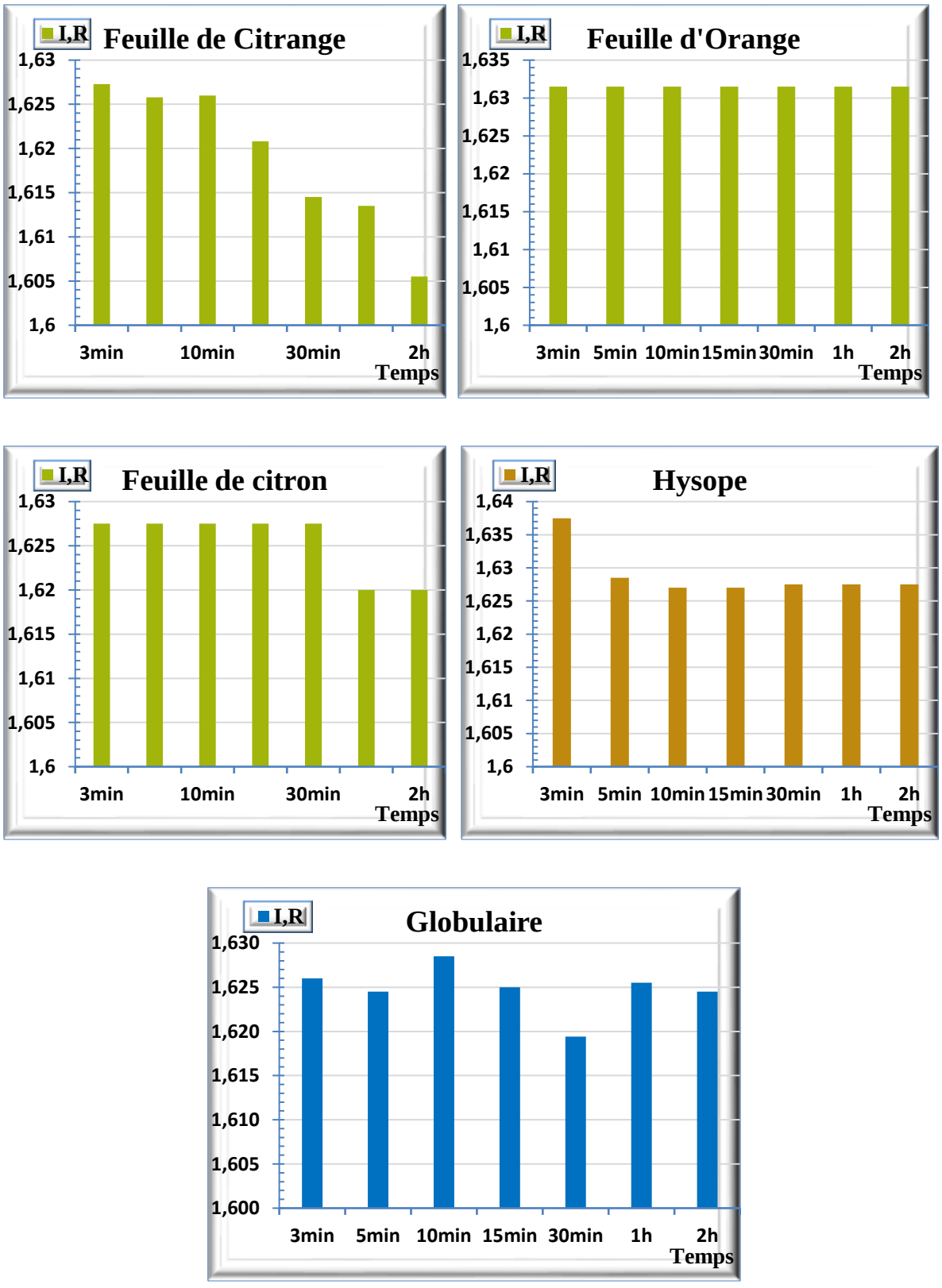


Figure V-7 : Variation des indices de réfractions des hydrolats en fonction du temps d'hydro-distillation des différentes matières végétales.

V.3 Test d'activité antibactérienne :

La méthode de diffusion des disques sur milieu solide (Mueller-Hinton) a été effectué pour le but d'évaluer le pouvoir antibactérien des huiles essentielle (HEs), et celui des fractions d'hydrolats obtenus de la partie aérienne de l'Hysope et des feuilles de (Globulaire, Citron, Orange, Citrange) contre les quatre bactéries :

- *Staphylococcus sp,*
- *Pseudomonas*
- *Bacillus subtilis* (gram positif)
- *E. coli,Pseudomonas* (gram négatif).

Le pouvoir antibactérien de chaque extrait contre les microorganismes testés a été évalué par la présence ou l'absence des zones d'inhibition comme montré à titre d'illustration sur la figureV.8.

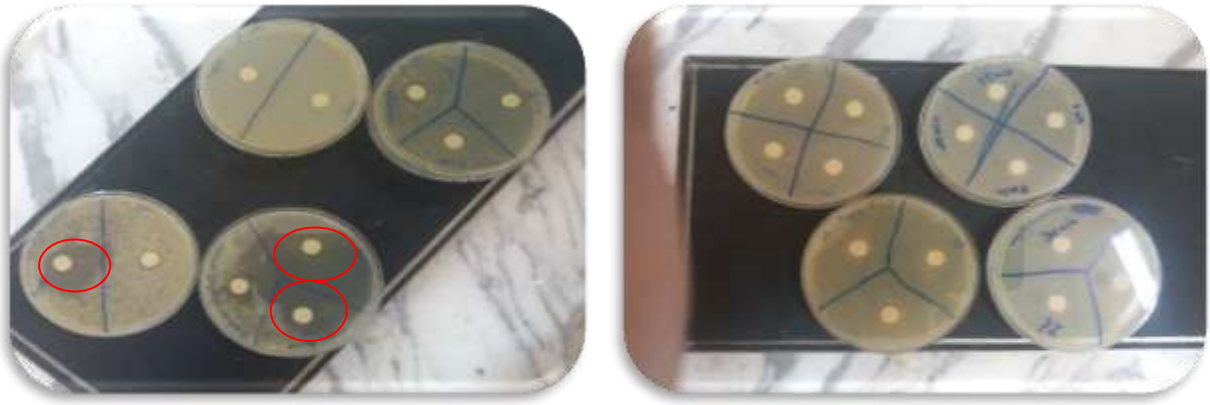


Figure V.8 : Zones d'inhibition pour les tests d'activité antibactérienne par La méthode de diffusion des disques sur milieu gélose.

L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par Doherty, T. J.2011 **[109].** ils ont classé les diamètres de zones d'inhibition (D) de la croissance bactérienne en 5 classes :

- très fortement inhibitrice : De 30mm ou bien à partir de 30mm D
- fortement inhibitrice : 21mm à 29 mm D
- Modérément inhibitrice : 16mm à 20 mm D
- Légèrement inhibitrice : 11mm à D 16 mm D
- Non inhibitrice : D< 10

Les valeurs des diamètres d'inhibitions pour les essais des huiles essentielles sont présentées sur le tableau V.4, tandis que celle des fractions d'hydrolats sont regroupées dans l'annexe.

Les HEs issues de l'hydrodistillation des feuilles des (Globulaire, Hysope, Orange, Citrange) manifestent une très forte inhibition contre la souche *Staphylococcus aureus* avec des diamètres d'inhibition allant de 30mm jusqu'à 60 mm. L'huile des feuilles d'orange est la plus active.

L'HE des feuilles de Citron inhibe légèrement la souche *Staphylococcus aureus,* pour laquelle on a enregistré un halo de 12mm.

La souche bactérienne *Escherichia coli*a montré une légère sensibilité pour toutes les huiles testées.

Tableau V.4 : Les Diamètres d'inhibition des tests de l'activité antibactérienne des HEsissues de l'hydrodistillation des feuilles des (Globulaire, Hysope, Orange, Citrange)

	Globulaire	Hysope	Orange	Citron	Citrange
Staphylococcus	50 mm	30mm	60 mm	12 mm	40 mm
L'activité	très fortement inhibitrice	très fortement inhibitrice	très fortement inhibitrice	Légèrement inhibitrice	très fortement inhibitrice
Escherichia coli	11 mm	13 mm	13 mm	11 mm	11 mm
L'activité	Légèrement inhibitrice	Légèrement inhibitrice	Légèrement inhibitrice	Légèrement inhibitrice	Légèrement inhibitrice

A partir de l'examen des histogrammes présentés sur la figure V.9 donnant les différentes valeurs des diamètres d'inhibition de chaque fraction d'hydrolat pour toutes les espèces étudiées il ressort qu'il y a une différence d'activité antibactérienne des fractions d'hydrolats recueillies à différents temps d'hydrodistillation.

L'amplitude de ces activités est modérée par rapport à celles des huiles essentielles issues de feuilles de ces matières végétales testées. Ce qui peut confirmer la différence qualitative et /ou quantitative de leur composition chimique. Une telle différence qualitative a été décelée pour l'hysope par Mandlekar et al., 2018 **[110],** ou le Camphor règne la composition chimique de l'hydrolat avec un taux de 76.4% ce composé n'est pas fréquent dans l'huile. Cette dernière est active sur l'*Escherichia coli et* le *Staphylococcus aureus* à cause de la présence de l'isopinocamphones et le pinène considérés comme de bon inhibiteur **[111].**

D'après la littérature, les tests ont montré l'activité bactériostatique plutôt que bactéricide de l'huile volatile d'hysope et moins de l'hydrosol (eau florale) (*Hyssopus officinalis*) sur la bactérie phytopathogène - *Pseudomonas marginalis***.[112]**

Pour la souche *Escherichia coli*, la réponse de la présence de résistance bactérienne envers les fractions d'hydrolats avec la variation de temps d'hydrodistillation est modérée. Sur tout l'intervalle de temps [3min- 120min] on a enregistré une inhibition légère. Ceci peut probablement traduire de la présence faible dans toutes les fractions des agents actifs sur cette souche.

Pour la souche *Staphylococcus aureus*, pour chaque espèce est attribuée un temps d'hydrodistillation pour lequel l'hydrolat peut avoir une légère activité :

- ✓ Globulaire : 5-10min.
- ✓ Hysope : 10 min et de 30min -120min.
- ✓ Citron : 3min et 1h.
- ✓ Orange : 10min-30min.

Les recherches mentionnent que l'activité sur l'*Escherichia coli* est supérieure que celle sur le*Staphylococcus aureus* **[113].**

Les souches *Pseudomonas* et *Bacillus subtilis*sont toutes les deux résistantes, à l'exception de l'HE des feuilles de citrange ; qui a montré une légère inhibition contre la souche *Pseudomeunas ;* toutes les HEs et toutes les fractions d'hydrolats étaient incapables d'inhiber ses souches. Une absence d'halo a été enregistré pour ces cas.

L'utilisation d'huiles volatiles comme l'huile d'Hysope, l'Orange, le Citrange et la Globulaire pour des formulations antibactériennes peut être prometteuse. Leurs composés majeurs ainsi que les classes de familles à lesquelles appartiennent (tableau V.5) ont prouvé un bon potentiel bioactif **[114].** Les chercheurs ont reporté l'existence d'une relation entre les structures chimiques des composés majeurs présentes dans l'huile essentielle et leur activité antibactérienne **[115].**

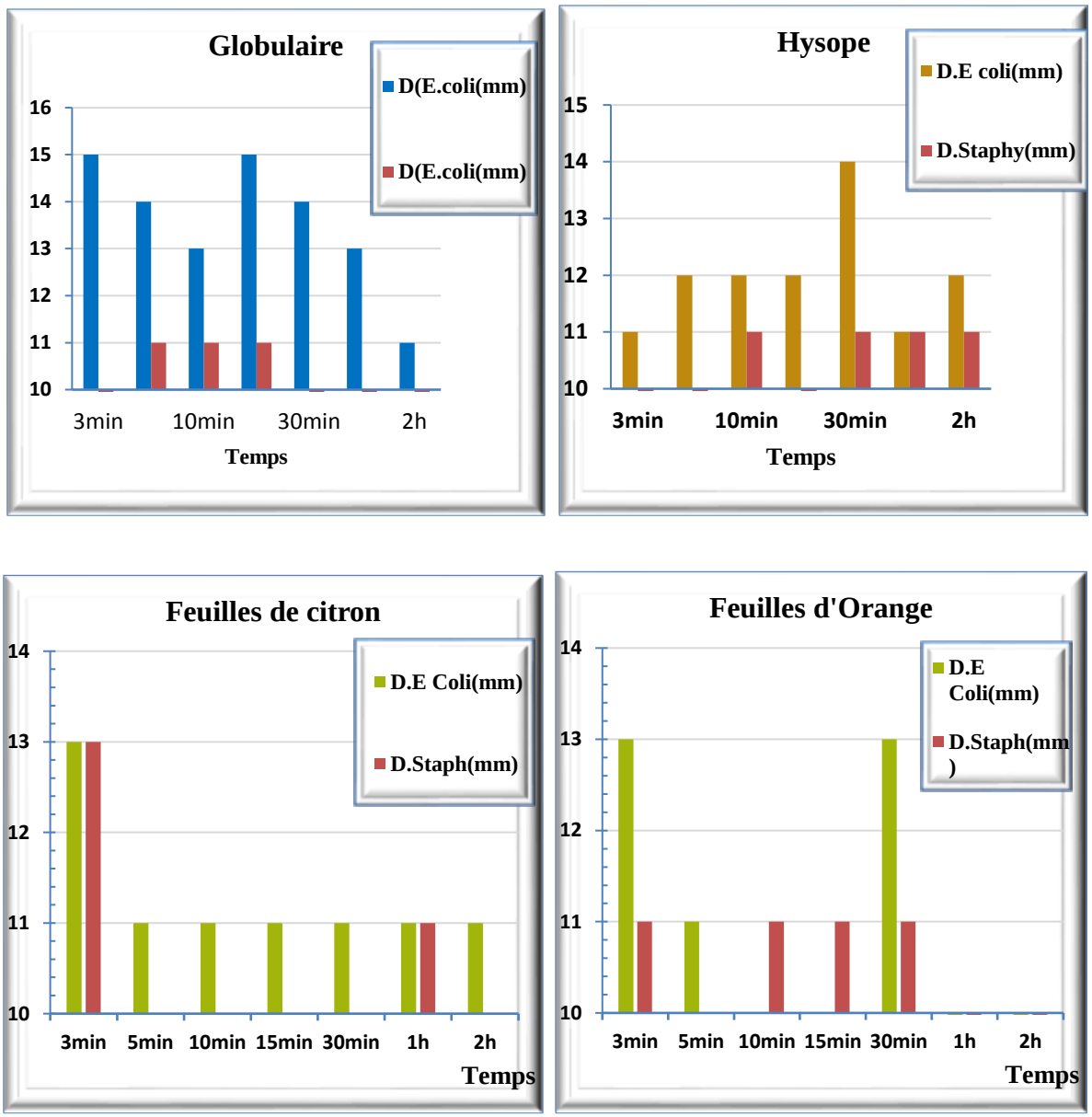


Figure V.9 : Diamètres d'inhibition des tests de l'activité antibactérienne des fraction d'hydrolats issues de l'hydrodistillation des feuilles des (Globulaire, Hysope, Orange)

Tableau V.5 : composés majeurs des HEs des feuilles de Globulaire, Hysope, agrumes.

Les plantes	Les composés major	Les familles
Globulaire **[115]**	• Eugénole 18.57% • 1-octane-3-ol 5.46% • alpha tepinène 10.45 % • Pentacosane 4.99 % • Heptacosane 4.90 % • Acétophénone 8.68%	• Alcool • Alcool • Mono terpènes • Alcanes • Alcanes • Hydrocarbonés
Hysope **[116]**	• Cis-pinocamphone 26.85% • β-pinène 20.43% • Trans-pinoconphone 15.97% • Alpha elemol 7.96% • Durenol 3.11 % • Béta phéllandrene 2.41 %	
Citron **[117]**	• Limonène • Béta pinène • Sabinène • Alpha pinène • Béta bisabolène • Alpha terpinéol	• Monotèrpènes • Monotèrpènes • Monotèrpènes • Monotèrpènes • Sesquiterpène • Alcool
Orange **[118]**	• Limonène • Sabinène • Myrcène	• Monotèrpènes • Monotèrpènes • Monotèrpènes

	• Béta élemène • Linalol • Alpha terpineol	• Sesquiterpène • Alcool • Alcool
Citrange **[119]**	• Limonène • Myrcène • Linalylpropionate • Alpha pinène • Linalol • Béta pinène	• Monotèrpènes • Monotèrpènes • • Monotèrpènes • Alcool

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

Les pistes d'investigation entreprises dans cette étude rentrent dans l'ordre de la tentative de dévoiler de nouveaux débouchés pour une éventuelle contribution à la valorisation des hydrolats issues d'hydrodistillation des feuilles de cinq plantes médicinales (Globulaire, Hysope, Citrange, Orange, Citron).

Dans ce cadre on s'est attelé d'une part dans une caractérisation en terme de rendement et évaluation des activités antibactériennes des huiles essentielles et des fractions d'hydrolats obtenus dans différents intervalles de temps d'hydrodistillation. Et d'autre part dans l'investigation de la variation de quelques propriétés physicochimiques comme la tension superficielle et l'indice de réfraction des fractions d'hydrolats obtenues.

Les résultats montrent :

- Une variabilité en rendement et en activité antibactériennes des huiles essentielles avec la variation de l'espèce botanique et l'état de la matière végétale ainsi qu'avec le temps d'extraction.
- Le plus haut rendement a été enregistrée dans le cas des feuilles d'orange 12,29% qui témoigne la richesse de ces feuilles en huiles essentielles. Cette richesse est aussi marquée pour l'Hysope à l'état frais avec un rendement de 3,50%.
- Il existe dans les feuilles de la Globulaire une fraction d'HEs accessible et facilement extractible par hydrodistillation dans la première période rapide, et une autre fraction difficilement accessible par HD issue dans la deuxième période lente.
- Les valeurs de la tension superficielle des hydrolats issus d'hydrodistillation par Clevenger sont comprises dans l'intervalle [34,2 - 54,4], indiquant que cette propriété est variable avec l'espèce botanique et le temps d'extraction.
- Par rapport aux autres espèces, les hydrolats des feuilles de l'Hysope et celles de citron peuvent englober des agents à haut pouvoir tensio-actif pour tous l'intervalle de temps [2min-120min]. Ceci leur qualifient d'être un alternatif des tensioactifs synthétisés.
- Les réponses de l'indice de réfraction aux variations du temps mêmes modérées sont toutes supérieures à celle de l'eau font signe d'une fluctuation de compositions chimiques de l'hydrolat en fonction du temps.

- La variabilité de l'indice de réfraction concerne plus les fractions d'hydrolat de la globulaire, de l'hysope et de Citrange récolté en mois de Mars où la plus importante est enregistré pour dernier.

Pour bien cerner le sujet et accomplir l'achèvement des ambitions en relation avec la valorisation des hydrolats, on juge utile en perspective de s'orienter vers :

- L'étude d'autre espèces d'autres familles
- L'étude phytochimiques des fractions d'hydrolats ainsi que les fractions d'huiles essentielles.
- Etude comparative de l'activité biologique des fractions d'huiles essentielles et celles des fractions d'hydrolats.
- Utilisation des hydrolats et des huiles pour la formulation des produits pour des fins cosmétiques ou pharmacologique.

Références bibliographiques

Références

[1] Judžentienė, A. (2016). Hyssop (*Hyssopus officinalis L*.) Oils (chapter 53, part II – Named essential oils). In: Essential Oils in Food Preservation, Flavour and Safety (Preedy V.R., eds.), AcademicPress, Elsevier Inc. All, 471-479.

[2] Wichtl.M et Anton,R.(Eds.).(2003).Plantes thérapeutiques .

[3] Hamedeyazdan, Fathiazad, F. &, Mazandarani, M., S. (2011). Phytochemical analysis and antioxidant activity of Hyssopus officinalis L. from Iran. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, *1*(2), 63.

[4] Omid Beigi, 2006The effect of encapsulated plant extract of hyssop (*Hyssopus officinalis L*.), Negin Rezaei Savadkouhi, Peiman Ariaii, Mehdi Charmchian Langerodi (2020). in biopolymer nanoemulsions of *Lepidium perfoliatum* and *Orchis mascula* on controlling oxidative stability of soybean oil Food Sci Nutr 8:1264–1271).

[5] Fathiazad, F.; Hamedeyazdan, S. *(***2011)** A review on *Hyssopus officinalis* L. Composition and biologicalactivities. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, *5*, 1959–1966.] [

[6] Bovie, B.ANNEXE (1962-1963).: Plantes potentiellement dangereuses pour les ruminants en Algérie (nomenclature , répartition, habitat, et abondance selon Quezel et Santa,

[7] Beniston, M. (1984). A numerical study of atmospheric mesoscale cellular convection. *Dynamics of atmospheres and oceans*, *8*(3-4), 223-242.

[8] Chograni H., Riahi L., Zaouali Y., Boussaid M., (2011). Polyphones, flavonoids,antioxidant activity in leaves and flowers of Tunisian Globularia alypum L.(Globulariaceae). African Journal of Ecology ,51, 343-34.

[9] Leporatti, M. L., & Ghedira, K. (2009). Comparative analysis of medicinal plants used in traditional medicine in Italy and Tunisia. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, *5*(1), 1-8.

[10] Alinezhad, H.; Azimi, R.; Zare, M.; Ebrahimzadeh, M.A.; Eslami, S.; Nabavi, S.F.; Nabavi, S.M.Antioxidant and antihemolytic activities of ethanolic extract of flowers, leaves

and stems of*Hyssopus officinalis* L. var. *angustifolius*. *Int. J. Food Prop.* **2013**, *16*, 1169–1178.

[11] Khlifi,D., Hamdi M., El Hayouni A., Cazaux,S., Souchard J.P., Couderc F.,Bouajila J.,(2011). Global Chemical Composition and Antioxidant and Anti-Tuberculosis Activities of Various Extracts of Globularia alypum L. (Globulariaceae)Leaves. Molecules,16,10592-10603.

[12] Chograni H., Riahi L., Zaouali Y., Boussaid M., (2011). Polyphynols, flavonoids,antioxidant activity in leaves and flowers of Tunisian Globularia alypum L.(Globulariaceae). African Journal of Ecology ,51, 343-34.

[13] Es-Safi N., Kollmanna A., Khlific S., Ducrot P H., (2006).Antioxidative effect ofcompounds isolated from Globularia alypum L.structure–activity relationship. Journalof Natural Products, 40,1246-1252.

[14] Sezik, E., Tabata, M., Yesilada, E., Honda, G., Goto, K., & Ikeshiro, Y. (1991). Traditional medicine in Turkey I. Folk medicine in northeast Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, *35*(2), 191-196.

[15] Boulos, L. (1983). Medicinal plants of North Africa. *Medicinal plants of North Africa.*

[16] ADOUANE, S. (2016). *Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région méridionale des Aurès* (Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider-Biskra).

[17] Calis, H. P. A., Nijenhuis, J. P. B. C., Paikert, B. C., Dautzenberg, F. M., & Van Den Bleek, C. M. (2001). CFD modelling and experimental validation of pressure drop and flow profile in a novel structured catalytic reactor packing. *Chemical Engineering Science*, *56*(4), 1713-1720.

[18] Pinkas, M., Bézanger-Beauquesne, L., & Torck, M. (1986). *Les plantes dans la thérapeutique moderne*. Maloine.

[19] Elbetieha, A., Darmani, H., & Al-Hiyasat, A. S. (2000). Fertility effects of sodium fluoride in male mice. *Fluoride*, *33*(3), 128-134.

[20] Taleb-Dida, N., Krouf, D., & Bouchenak, M. (2011). Globularia alypum aqueous extract decreases hypertriglyceridemia and ameliorates oxidative status of the muscle, kidney, and heart in rats fed a high-fructose diet. *Nutrition Research*, *31*(6), 488-495.

[21] Elbetieha, A., Darmani, H., & Al-Hiyasat, A. S. (2000). Fertility effects of sodium fluoride in male mice. *Fluoride*, *33*(3), 128-134.

[22] Faucon, M. (2015). Traité d'aromathérapie scientifique et médicale : Fondements & aide à la prescription. Édition sang de la terre, Paris, pp: 39-455.

[23] Bayer, R. J. et al. (2009) A molecular phylogeny of the orange subfamily (Rutaceae: Aurantioideae) using ninecp DNA sequences. Am. J. Bot. **96**, 668–685.

[24] Praloran, J. C. (1971). La production fruitière en Nouvelle Calédonie. Rapport de mission.

[25] U, Y., Chen, C. & Gmitter, F. G. (2016). QTL mapping of mandarin (*Citrus reticulata*) fruit characters using high-throughput SNP markers. *Tree Genet. Genomes* 12, 77.

[26] Loussert. (1989) les agrumes production .Ed. Sci. Univ., Vol.2, Liban, 280p Maison neuve et Lanos, Paris.113-556 P.

[27] Marchand L., (2002): Cancer preventive effects of flavonoids – a review. Biomed. Pharmacother. Vol. 56, pp: 296–301., la vitamine C

[28] Halliwell B., (1996) : Antioxidants in human health and disease. Ann. Rev. Nut., Vol. 16, pp: 33–50,

[29] Rao A.V. et Rao L.G., (2007): Carotenoids and human health. Pharmacol. Res. Vol. 55, pp: 207 – 216.

[30] Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S. Et Radice M., (2005): Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin As functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. Food Chem. 91, 621–632.

[31] Hadj Guenaoui Saida.,&., Tchoketch Kebir Lamia(2020). Mémoire de Master :Valorisation.. des feuilles d'agrumes : extraction des huiles essentielles.

[32] Solene, J. (2012). La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité. Thèse pour obtenir le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Lorraine. 142p.

[33] Lawrence, T. (2009). The nuclear factor NF-κB pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *1*(6), a001651.

[34] Mondello, &.L Dugo, P., Lo Presti, M., Öhman, M., Fazio, A., Dugo, G.,. (2005). Determination of flavonoids in citrus juices by micro-HPLC-ESI/MS. *Journal of separation science*, *28*(11), 1149-1156.

[35] Mondello, &.L Dugo, P., Lo Presti, M., Öhman, M., Fazio, A., Dugo, G.,. (2005). Determination of flavonoids in citrus juices by micro-HPLC-ESI/MS. *Journal of separation science*, *28*(11), 1149-1156.

[36] P. F. Cancalon, Citrus juices health benefits. Beverage impacts on health and nutrition, pp.115-127,2016.DOI : 10.1007/978-3-319-23672-8_8

[37] Kraza, L.,& Senoussi, M.M. (2021). Evaluation de l'activité antioxydante, antimicrobienne et antidiabétique des composés phénoliques d'une plante médicinale Globularia L. dans la région de Laghouat.

[38] Guinoiseau, E. (2010). Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation identification, et mode d'action (Doctoral dissertation, université de Cors).

[39] P. F. Cancalon, (2016). Citrus juices health benefits. Beverage impacts on health and nutrition, pp.115-127,.DOI : 10.1007/978-3-319-23672-8_8.

[40] J. M. Carbonell-capella, O. Parniakov, F. J. Barba, N. Grimi, O. Bals et al., (2016) Ice" juice from apples obtained by pressing at subzero temperatures of apples pretreated by pulsed electric fields, Innovative Food Science & Emerging Technologies, vol.33, pp.187-194,.

[41] H. Chanvrier, E. Jakubczyk, E. Gondek, and J. C. Gumy, 2014. Insights into the texture of extruded cereals: Structure and acoustic properties, Innovative Food Science & Emerging Technologies, vol.24, pp.6-7.

[42] Billerbeck, E., Böttler, T., & Thimme, R. (2007). Regulatory T cells in viral hepatitis. *World journal of gastroenterology: WJG*, *13*(36), 4858.

[43] Goetz, P., & Ghedira, K. (2012). Mécanisme d'action antibactérienne des huiles essentielles. In *Phytothérapie anti-infectieuse* (pp. 193-208). Springer, Paris.

[44] Salle J-L., (2004) : Les huiles essentielles, synthèse d'aromathérapie. Editions Frison-Roche,2ème édition. 220 p.

[45] Möller K., (2008) : La distillation à l'alambic, un art à la portée de tous. Editorial UNICO.152 P.

[46] Karioti, A., Koukoulitsa, C.,., Bergonzi, M. C., Pescitelli, G., Di Bari, L., & Skaltsa, H. (2006). Polar constituents from the aerial parts of Origanum vulgare L. ssp. hirtum growing wild in Greece. *Journal of agricultural and food chemistry*, *54*(15), 5388-5392.

[47] Siani, A. C., Ramos, M. D. S., Menezes-de-Lima Jr, O., Ribeiro-dos-Santos, R., Fernadez-Ferreira, E., Soares, R. O. A., ... & Henriques, M. D. G. (1999). Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of Protium. *Journal of Ethnopharmacology*, *66*(1), 57-69.

[48] Van Heumen, E., Lortz, R., Kuzmenko, A. B., Carbone, F., Van Der Marel, D., Zhao, X., ... (2007). Optical and thermodynamic properties of the high-temperature superconductor Hg Ba 2 Cu O 4+ δ. *Physical Review B*, *75*(5), 054522.

[49] Burt S., 2004.- Essential oils: theirantibacterialproperties and potential applications in foods – a review. International Journal of Food and Microbiology. 94: 223-253.

[50] May, M. J., D'Acquisto, F., Madge, L. A., Glockner, J., Pober, J. S., & Ghosh, S. (2000). Selective inhibition of NF-κB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the IκB kinase complex. *Science*, *289*(5484), 1550-1554.

[51] Chan, Y. E. (2008). Why haven't we mastered alignment? The importance of the informal organization structure. *MIS Quarterly executive*, *1*(2), 2.

[52] Mohammedi, I., Berchiche, C., Becker, K., Belkhouja, K., Robert, D., Von Eiff, C., & Etienne, J. (2005). Fatal Kytococcus schroeteri bacteremic pneumonia. Journal of Infection, 51(2), E11-E13.

[53] Saka,B. (2017). Valorisation de biomolécules issues de deux plantes algériennes Brassica rapa et Globularia alypum (Doctoral dissertation).

[54] VanMeter KC, Hubert RJ (2015).: Microbiology for the Healthcare Professional-EBook: Elsevier Health Sciences ;

[55] Alwash, A. H., Abdullah, A. Z., & Ismail, N. (2013). TiO2-zeolite Y catalyst prepared using impregnation and ion-exchange method for sonocatalytic degradation of amaranth dye in aqueous solution. *International Journal of Chemical and Molecular Engineering*, *7*(6), 375-383.

[56] Prescott, L. M., Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2018). *Microbiologie*. De Boeck Supérieur.

[57] Health Canada : Guidance document - Disinfectantdrugs. In. Edited by MinisterofHealth. Ottawa, Ontario, K1A OK9 ; 2018.

[58] Dhanasekaran D, Thajuddin N, Panneerselvam (2015).A: Antimicrobials: synthetic and natural compounds: CRC Press;

[59] Mcdonnell G, Russell DA (1999): Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *ClinicalMicrobiologyReview*, 12(1) :147-179. 86.

[60] VanMeter KC, Hubert RJ (2015): Microbiology for the Healthcare Professional-EBook: Elsevier Health Sciences ;.

[61] Desjobert J. M., Bianchini A., Tommy P., Costa J. et Bernardini A. F (1997). Etude d'huiles essentielles par couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse. Application à la valorisation des plantes de la flore Corse. Analysis; 25 (6) : 13-16.

[62] Guardabassi L, CourvaliIi P (2006): Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterialresistance. In : *Antimicrobialresistance in bacteria of animal origin.*
American Society of Microbiology;: 1-18.

[63] Ashburn, T. T., Thor, K. B. (2004). Drug Repositioning: Identifying and Developing New Uses for Existing Drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 673–683. doi: 10.1038/nrd1468 [64]

[63] Barratt, M. J., Frail, D. (2012). *Drug Repositioning: Bringing New Life to Shelved Assets and Existing Drugs* (Hoboken, N.J: John Wiley & Sons). doi: 10.1002/9781118274408**.**

[65] Farha MA, Brown ED (2016): Strategies for target identification of antimicrobial natural products. *Natural product reports*, 33(5):668-680.

[66] Butler MS, Buss AD (2006): Natural products - The future scaffolds for novelantibiotics? *BiochemicalPharmacology*, 71(7):919-929.

[67] Wink M (*2008)*: EvolutionaryAdvantage and Molecular Modes of Action of MultiComponent Mixtures Used in Phytomedicine. *Current Drug Metabolism*, 9(10):996-1009..

[68] Montecalvo MA (2003): Ramoplanin: anovelantimicrobial agent with the potential to preventvancomycin-resistantenterococcal infection in high-risk patients. *Journal of AntimicrobialChemotherapy*, 51(suppl_3):iii31-iii35.

[69] Kavanagh F, Hervey A, Robbins WJ (1951): Antibiotic substances frombasidiomycetes VIII. Pleurotus Multilus (Fr.) Sace. And Pleurotus passeckerianus Pilat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 37(9):570-57.

[70] Cowan MM : Plant products as antimicrobial agents. *Clinicalmicrobiologyreviews (*1999), 12(4):564-582.

[71] Quave CL (2016): Antibioticsfrom nature: traditionalmedicine as a source of new solutions for combating antimicrobial resistance..

[72] Daouda Toure, (2015). Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire. Thèse de Doctorat. UNIVERSITE FELIX HOUPHOUËT-BOIGNY

[73] Kulow M, Zibaee F, Allard M, Dopfer D (2015): Determination of the ability of Thymox to kill or inhibit various species of microorganisms associated with infectious causes of bovine lameness in vitro. *Journal of dairy science*, 98(11):7899- 7905.

[74] Brown D (2015): Antibiotic resistance breakers: can repurposed drugs fill the antibiotic discovery void.,*Nature Reviews Drug Discovery*,14(12):821.

[75] Safaei-Ghomi J., Ahd AA. Antimicrobial and antifungal properties of the essential oil and methanol extracts of Eucalyptus largiflorens and Eucalyptus intertexta. PharmacognMag 2010; 6:172-5 ,

[76] Belletti N., Lanciotti R., Patrignani F., Gardini F (2008). Antimicrobial efficacy of citron essential oil on spoilage and pathogenic microorganisms in fruit-basedsalads. J FoodSci; 73: 331-8.

[77] Aminov, R. (2017). History of Antimicrobial Drug Discovery: Major Classes and Health Impact. *Biochem. Pharmacol.* 133, 4–19. doi: 10.1016/j.bcp.2016.10.001

[78] Heath H.B., (1981). Source Book of Flavours. Westport: Avi, pp.890.

[79] Boyle W., (1955). - Spices and essential oils as perspectives. American Perfurmer Essential Oil Review. 66: 25-28.

[80] Burt S., (2004).- Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. International Journal of Food and Microbiology. 94: 223-253.

[81] Kalemba D. &Kunicka A., (2003).- Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Médicinal Chemistry. 10: 813-829.

[82] Oussou K.R., (2009). –Etude chimique et activité biologiques des huiles essentielles de sept plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. Doctorat de l'Université de Cocody-Abidjan, 241p.

[83] Avlessi F., Alitonou G.A., Djenontin T S., Tchobo F., Yèhouénou B., Menut C. &Sohounhloué D., (2012).- Chemical composition and Biologicalactivities of the Essential oilextractedfrom the Freshleaves of Chromolaenaodorata (L. Robinson) growing in Benin. ISCA Journal of Biological Sciences, 1(3): 7-13.

[84] Sipailiene A., Venskutonis P.R., Baranauskiene R. &Sarkinas A. (2006).- Antimicrobial Activity of commercial samples of thyme and marjoramoils. Journal of Essential OilResearch. 18: 698-703.

[85] https://www.webmd.com/diet/health-benefits-essential-oils#1

[86] Kunle O., Okogun J., et *al (*2003). Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from Lippia multi flora leaf extract. Phytomedicine; 10: 59-61.

[87] https://health.clevelandclinic.org/essential-oils-101-do-they-work-how-do-you-use-them/

[88] Burt, S. A. et Reinders R. D (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against Escherichia coli O157:H7. Lett Appl Microbiol.; 36(3):162-7..

[89] Lakhdar L., Hmamouchi M., Rida S., Ennibi O (2012). Antibacterialactivity of essential oils against period on talpathogens: A qualitative systematicreview. Trop Dent J; 35(140)..

[90] Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils- A review. Food ChemToxicol.; 46: 446-475.

[91] Rafi A., Tasneem U S., Achfaq A., Muchtaq A. Médicinal importance of essential oils. HamdardMedicus. 1994 ; XXXVI(3): 101-105..

[92] Combe J., Simonnet F., Simonnet G (1988). Action du xibornol sur la division cellulaire et

Les syntheses macromoléculaires des bactéries à gram poistif. Ann pharmfr.; 46(1): 19-26..

[93] Bouchikhi T. (1994).Activité antimicrobienne de quelques huiles essentielles. Thèse. Doct. Universit. Balaise Pascal. Clermont-Ferrand.

[94] Pattnaik S. (1995). Effect of essential oils in the variability and morphology of Escherichia coli. Microbios; 48: 195-9..

[95] Cox S D., Gustafson J E., Mann C U., Warmington J. (1998). Teatreeoil causes K+ leakage and inhibits respiration in Escherichia coli. Lett. Appl. Microbiol.; 26: 355..

[96] Jayant Shankar Raut, Sankunny Mohan Karuppayil (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. Industrial Crops and Products 62.250-264.

[97] Zaika L. L. (1988) Spices and Herbs – Their antimicrobial activity and its determination. JFood Safety; 9(2): 97-118., 120 Santos F S R., Novales M G M. Essential oilsfromaromaticherbs as antimicrobialagents. CurrOpinBiotech. 2012; 23:136–41.).

[98] Wan et al., (1998). Classification based emissivity for land surface tempurature measurement from space. International journal of Remote Sensing, 19(14), 2753-2774.

[99] Wannissorn, B., Jarikasem, S., Siriwangchai, T., & Thubthimthed, S. (2005). Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*, *76*(2), 233-236.

[100] Alviano DS., Alviano CS (2009). Plant extracts: search for alternatives to treatmicrobialdiseases. CurrPharmBiotech.; 10: 106-21

[101] Fine DH., Furgang D., Barnet ML. (2001) Comparative antimicrobial activities of antiseptic mouth rinses against isogenic planktonic and biofilm forms of actinobacillusact in omycetemcomitans. J Clin Periodontol.; 28: 697-700.).

[102] Bencheqroun *et al.(* 2012).Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'Artemisia mesatlantica, plante endémique du Maroc. Bulletin de la société Royale des sciences de Liège, 81,4-21.

[103] Simpson, William T. (1999). Drying and control of moisture content and dimensional changes. Wood hand book : wood as an engineering material. Madison, General technical report FPL ; GTR-113 : Pages 12.1-12.20.

[104] Demarne, et Lalli, (2005). L'amélioratio variétale du Gérannium rosat (pelargonium sp) : contribution systématique, caryologique et biochimique (Doctoral dissertation, Paris 11).

[105] Aureobasidium pullulans L3-GPY from a Tiger Lily Wild Flower, Lilium lancifolium Thunb. PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0122917 April 7, 2015. De mémoire souag).

[106] Rahal et al., ,(2005) Tuberculose mammaire : étude rétrospective de 65 cas. Gynécologie.

[107] obstértrique & fertilité.33(11),870-876.

[108] Saka,B. (2017). Valorisation de biomolécules issues de deux plantes algériennes Brassica rapa et Globularia alypum (Doctoral dissertation).

[109] Ahmed Elbetieha a,, Sawsan A. Oran , Ahmad Alkofahi , Homa Darmani , Aly M. Raies (2000) Journal of Ethnopharmacology 72 215–219.

[110] Ben Mansour R., Gargouri B2., Gargouri B1., Elloumil N., Ben haj Jilani I., GhrabiGammar Z., and Lassoued S. (2012). Investigation of antioxidant activity of alcoholic extract of Globularia alypum L. Journal of Medicinal Plants Research. 6(25): 4193-4199.

[111] Anton, R., Patri, F., & Silano, V. (2001). Plants in cosmetics: Plants and plant preparations used as ingredients for cosmetic products. Volume II. *Plants in cosmetics: Plants and plant preparations used as ingredients for cosmetic products. Volume II*.

[112] *Suleyman Kizil et al (*2018) Blooming stages of Turkish hyssop (*Hyssopus fficinalis* L.) affect essential oil composition. Acta agricultural Scandanavica section B. Pages 273-279

[113] KarimHosni[a] ; NesrineZahed,RaoufChrif,InesAbid, HoucineSebei (2010) . Composition of peel essential oils from four selected Tunisian *Citrus* species: Evidence for the genotypic influence *Food Chemistry journal. Volume 123.* Pages 1098-1104

[114] Mutai, C., Bii, C., Vagias, C., Abatis, D., & Roussis, V. (2009). Antimicrobial activity of Acacia mellifera extracts and lupane triterpenes. *Journal of ethnopharmacology*, *123*(1), 143-148.

[115] Habib AMRI .Extraction de l'huile essentielle de Globularia alypum L. Identification de ses constituants chimiques et étude de son activité antioxydante. (thèse de Doctorat université Ahmed ben Bella d'oran.

[116] Hussein A. H. Said-Al Ahl, *, Zahid K. Abbas, Ali S. Sabra1,Kirill G. Tkachenko (2015). Essential Oil Composition of Hyssopus officinalis L. Cultivated in Egypt International Journal of Plant Research Vol. 1, No. 2, , pp. 49-53.

[117] Aurélie DUPUY .Stabilisation de l'interface liquide-liquide dans un contacteur membranaire : Application à l'extraction sélective de terpènes oxygénés d'huiles essentielles d'agrumes (Doctorat, L'institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (AgroParisTech).

[118];Farhat et al.,(2011). Etude comparative de l'effet des méthodes d'extraction sur les phénols et l'activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange « mataise demi sanguine « et exploration de l'effet inhibiteur de la corrosio de l'acier au carbon.

[119] BEN SEDDIK, Khedidja Zohra; BEN SEDDIK, Mustapha Oussama (2021).L'effet de méthode d'extraction sur la production d'huiles essentielles à partire de citrus aurantium (région de Ghardaïa).Mémoire de Master. Université de Ghardaïa.