



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Amar Thelidji- Laghouat

FACULTE : SCIENCES

DEPARTEMENT : SCIENCES AGRONOMIQUES

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par : Maicha Imane

DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE (SNV)

FILIERE : SCIENCES ALIMENTAIRE

OPTION : AGROALIMENTAIRE ET CONTROLE DE QUALITE

Thème

**Etude de l'effet des extraits de Genévrier de Phénicie
(*Juniperus Phoenicea*) sur la croissance des bactéries
pathogènes**

Jury de soutenance :

Nom et Prénom	Grade	Qualité
M. Houicher Abderrahmane	Pr	- Président
Mme. Hamini Faiza	MAA	- Examineur
M. Djokhdem Laid	MAA	- Encadreur

Promotion : Juin 2022



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة عمار ثلجي - الأغواط

كلية : العلوم

قسم العلوم الفلاحية



مذكرة ماستر

تقديم الطالبة : معيشة إيمان

ميدان: علوم الطبيعة والحياة

شعبة: علوم غذائية

تخصص: صناعات غذائية ومراقبة النوعية

الموضوع

دراسة تأثير مستخلصات العرعر الفينيقي (*Juniperus Phoenicea*)

على نمو البكتيريا المسببة للأمراض.

لجنة المناقشة:

الصفة
رئيس
ممتحن
مؤطر

الرتبة
أستاذ تعليم عالي
أستاذ مساعد أ
أستاذ مساعد أ

الإسم و اللقب
السيد هويشر عبد الرحمان
السيدة حميني فايزة
السيد جخدم العيد

دورة : جوان 2022

Remerciement

Avant tout, nous remercions Allah tout puissant de nous avoir donné la volonté et le courage de mener à bien ce travail.

*Nous remercions très chaleureusement notre respectueux encadreur
Monsieur Dr. Djokhdem Laid*

Nous tenons à remercier les membres de jury :

*Pr. Houicher Abderrahmane pour avoir accepté de présider le jury de ce
mémoire.*

Dr. Hamini Faiza pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Nos remerciements vont aussi à :

*Pr. Yousfi M le directeur du laboratoire des Sciences Fondamentales, de
m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.*

*Mes sincères remerciements vont également à Dr. Harathe M, pour le soutien
et l'aide qu'ils ont su m'apporter dans laboratoire des Sciences
Fondamentales.*

*Enfin, Nos remerciements vont à tous les gens qui ont contribué à notre
formation et notre éducation de près ou de loin*

Merci à tous

Dédicace

Je dédie ce travail :

*A la mémoire de mon père, à ma chère mère Amina pour tous leurs sacrifices,
leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes
études,*

*A ma chère sœur Sarah pour leurs encouragements permanents, et leur
soutien moral,*

*A mes chers frères, Mohammed el Habib, Taher, Khalil, Youcef, et à mon petit
frère, Ali pour leur appui et leur encouragement,*

A ma chère cousine, qui est comme ma sœur Khadidja,

A mes cousins Mohammed et Bachir,

A ma tante et ma deuxième mère Oumelkheir,

A ma chère tante Noun,

*A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours
universitaire,*

A mes amis, Wafa, Meriem, Aroua, Khadidja et Widad.

Nom et prénom : Maicha Imane

Thème : Etude de l'effet des extraits de Genévrier de Phénicie (*Juniperus Phoenicea*) sur la croissance des bactéries pathogènes

Résumé

Les conservateurs alimentaires synthétiques ont été limités dans plusieurs pays, en raison de leurs effets indésirables sur la santé. En plus, la tendance actuelle des consommateurs à chercher une alimentation plus naturelle a augmenté durant ces dernières décennies. Plusieurs travaux de recherche ont été concentrés sur les extraits naturels.

Les différents résultats publiés indiquent qu'elles sont douées de plusieurs propriétés biologiques. Le but de cette étude est d'évaluer l'activité antibactériennes de l'huile essentielle et l'extrait éthanolique de la plante de *Juniperus phoenicea*, l'extraction a été réalisée par hydrodistillation pour l'huile essentielle et par la macération pour l'extraction éthanolique. Puis on calcule le rendement on obtient les résultats suivants, les rendements respectifs sont de (1%) pour l'huile essentielle et (1.83%) pour l'extrait éthanolique.

L'analyse chromatographique (CG/SM), de l'huile essentielle nous a permis d'identifier 25 composés différents dont l' α -pinène (71.43%), β - Phellandrene (6.11%) et δ -3-Carene (5.04%), comme composés majoritaires, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été estimées par la méthode de macro-dilution. Les extraits de *Juniperus phoenicea* ont montré une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (12.5mg/ml) et *Escherichia coli* ATCC 25922 (12.5mg/ml) plus élevée que celle de *Listeria innocua* ATCC 33090 (25mg/ml). Ces résultats laissent suggérer que les huiles essentielles de de *Juniperus phoenicea* peuvent éventuellement utilise comme un produit naturel antibactérien et conservateur alternatif.

Mots clés :

Activité antibactérienne, Extrait éthanolique, Huile essentielle, CMI, CMB, *Juniperus phoenicea*.

Name and surname: Maicha Imane

Theme: Study of the effect of Phoenician Juniper (*Juniperus Phoenicea*) extracts on the growth of pathogenic bactérie.

Abstract

Synthetic food preservatives have been restricted in several countries, due to their adverse health effects. In addition, the current trend of consumers seeking a more natural diet has increased in recent decades. Several research works have focused on natural extracts.

The various published results indicate that they are endowed with several biological properties. The aim of this study is to evaluate in vitro the antibacterial activity of the essential oil and the ethanolic extract of *the Juniperus phoenicea* plant, the extraction was carried out by hydrodistillation for the essential oil and by maceration for the ethanolic extraction. Then we calculate the yield we obtain the following results; the respective yields are (1%) for the essential oil and (1.83%) for the ethanolic extract.

Chromatographic analysis (CG/MS) of the essential oil allowed us to identify 25 different compounds including α -pinene (71.43%), β - Phellandrene (6.11%) and δ -3-Carene (5.04%), as major compounds, the minimum inhibitory concentrations (MIC) were estimated by the micro-dilution method. *Juniperus phoenicea* extracts showed higher antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (12.5mg/ml) and *Escherichia coli* ATCC 25922 (12.5mg/ml) than against *Listeria innocua* ATCC 33090 (25mg/ml).

These results suggest that essential oils of *Juniperus phoenicea* can possibly be used as an alternative antibacterial and preservative natural product.

Key words:

Antibacterial activity, Ethanolic extract, Essential oil, CMI, CMB, *Juniperus phoenicea*.

الاسم و اللقب: معيشة إيمان.

الموضوع : دراسة تأثير مستخلصات العرعر الفينيقي (*Juniperus Phoenicea*) على نمو البكتيريا المسببة للأمراض.

ملخص

هناك تراجع في استعمال المواد الحافظة للأغذية الاصطناعية في العديد من البلدان، بسبب آثارها الصحية الضارة . بالإضافة إلى ذلك، ازداد الاتجاه الحالي للمستهلكين الذين يبحثون عن نظام غذائي أكثر طبيعية في العقود الأخيرة ركزت العديد من الأعمال البحثية على المستخلصات الطبيعية. تشير النتائج المختلفة المنشورة إلى أنها تتمتع بخصائص بيولوجية عديدة. الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للزيت العطري والمستخلص الإيثانولي لنبات العرعر الفينيقي. تم الاستخراج عن طريق التقطير المائي للزيت العطري وعن طريق النقع من أجل الاستخراج الإيثانولي. ثم نحسب المحصول ونحصل على النتائج التالية، العوائد الخاصة هي (1%) للزيت العطري و (1.83%) للمستخلص الإيثانولي. سمح لنا التحليل الكروماتوغرافي CG/MS للزيت الأساسي بتحديد 25 مركبًا مختلفًا بما في ذلك 3 - δ Carene(5.04%) و α -pinene(71.43%), β -Phellandrene (6.11%) كمركبات رئيسية. كما تم تقدير الحد الأدنى من التركيزات المثبطة (MIC) بواسطة طريقة التخفيف الدقيق. أظهرت مستخلصات العرعر الفينيقي نشاطًا مضادًا للبكتيريا أعلى ضد *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (12.5) و *Escherichia coli* (12.5) و *Listeria innocua* ATCC33090 (25) من ATCC 25922. تشير هذه النتائج إلى أنه يمكن استخدام الزيوت الأساسية كمضادات للبكتيريا وكمواد بديلة للحفاظ.

الكلمات المفتاحية:

نشاط مضاد للجراثيم، مستخلص إيثانولي، زيت عطري، الحد الأدنى للتركيز، CMB ، العرعر الفينيقي.

Sommaire

✓ Remercîment	
✓ Dédicace	
✓ Résumé	
✓ Liste des figures	
✓ Liste des tableaux	
✓ Liste des abréviations	
✓ Introduction	1

Chapitre I : Les plantes médicinales

1. Les plantes médicinales.....	3
1.1. Définition	3
1.2 Historique.....	3
1.3 Intérêt de l'étude des plantes médicinales.....	4
2. Famille des Cupressacées.....	4
2.1. Juniperus phoenicea.....	5
2.2. Répartition géographique	7
2.3. Description botanique	8
2.4. Composition chimique	9
2.5. Usages traditionnels et médicaux	9
2.6. Activités biologiques des composés phénoliques	10
2.6.1. Activité antibactérienne.....	12
2.6.2. Autre bioactivité	12
2.7. La croissance du genévrier de Phénicie	12

Chapitre II : Généralités sur les extraits des plantes

1. Définition des huiles essentielles	13
2. Historique et importance.....	14
3. Répartition d'extraction des huiles essentielles	15
4. Procédés d'extraction des huiles essentielles	17
5. Composition chimique des HE.....	24
6. Caractérisation des huiles essentielles.....	26
7. Toxicité des huiles essentielles	28
8. Les méthodes d'analyses des HE.....	29
9. La conservation des huiles essentielles.....	32
10. Principales utilisation des huiles essentielles.....	32
11. Contrôle des huiles essentielles.....	34
12 -Extraction éthanolique.....	34
12.1. Définition	34
12.2. Généralités biochimiques.....	35
12.3. Localisation et rôle dans les plantes.....	35
12.4. Classification des composés phénoliques.....	36
12.5. Les rôles des composés phénoliques.....	39
12.6. Mode d'action des polyphénols.....	40
12.7. Extraction des polyphénols	41
12.8. Polyphénols et santé.....	41
12.9. Polyphénols et maladies infectieuses.....	42

Chapitre III : Activité antimicrobienne des extraits

1. Introduction.....	43
2. Bactéries	43
2.1. Définition.....	43
2.2. Bactéries à Gram négatif.....	44
2.3. Bactéries à Gram positif	45
3. Les facteurs influençant l'activité antimicrobienne des HE.....	53
4. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne	54
5. Mécanisme d'action antimicrobienne des huiles essentielles.....	56

Chapitre IV : Matériel et méthodes

1-Présentation de la région d'étude.....	58
1-1 Situation géographique de la région d'étude.....	58
1-2 Les facteurs climatiques.....	59
2. Objectif	59
3. Matériel	60
4. Méthodes.....	61
4.1. Echantillonnage.....	61
4.2. Extraction des huiles essentielles.....	62
4.3. Calcul du rendement de l'huile essentielles	63
4.4. Caractérisations de l'huile essentielle.....	64
4.5. Extraction éthanolique.....	65
4.6. Calcul du rendement d'extrait éthanolique.....	67
4.7. Les souches bactériennes	67

4.8. Préparations de l'inoculum	68
4.9. Préparation des dilutions	69
4.10. Lecture des tubes CMI.....	69
4.11. Détermination des CMB.....	69

Chapitre V : Résultats et discussions

1. Analyse quantitative des extraits.....	71
1.1. Le rendement de l'huile essentielle de <i>Juniperus phoenicea</i>	71
1.2. Le rendement en extrait éthanolique de <i>J. phoenicea</i>	73
2. Analyse qualitative des extraits	73
2.1. Détermination de l'activité antibactérienne (CMI et CMB)	73
3. Caractérisations des huiles essentielles.....	77
Conclusion et perspectives.....	80
Références bibliographiques.....	82
Annexes.....	97

Liste des figures

Numéro de figure	Titre	Page
Figure 01	Classification détaillée de l'ordre des <i>Cupressales</i>	05
Figure 02	Aspect général Feuilles et fruits du genévrier de Phénicie	06
Figure 03	Différents noms de genévriers selon la région	06
Figure 04	Localisation de <i>Juniperus phoenicea</i> dans la région méditerranéenne	08
Figure 05	Localisation des huiles essentielles	17
Figure 06	Schématisation du procédé de l'hydrodistillation	18
Figure 07	Distillation à vapeur saturée	19
Figure 08	Illustration du mécanisme de l'extraction par micro-ondes	23
Figure 09	Structures des Composés terpéniques (A : monoterpènes, B : sesquiterpènes)	25
Figure 10	Structure de base des flavonoïdes	39
Figure 11	Structure de base des anthocyanes	39
Figure 12	<i>E. coli</i> au microscope électronique × 15000	44
Figure 13	<i>S. aureus</i> sur gélose de Chapman	46
Figure 14	Localisation géographique d'Oued Morra entourant, le site de récolte de Genévrier de Phénicie	58
Figure 15	La Genévrier de Phénicie (<i>Juniperus phoenicea</i>) séchée et broyé	62
Figure 16	Protocole de préparation des huiles essentielles	63
Figure 17	Montage d'un hydrodistillateur de type Clevenger	63
Figure 18	Protocole de préparation d'extrait éthanolique	65
Figure 19	Macération de la poudre de <i>Juniperus phoenicea</i> dans l'éthanol absolu	66
Figure 20	Filtration de l'extrait sur papier filtre Whatman N°1 Evaporator, Laborota 4000	66
Figure 21	Evaporation de l'éthanol à 50°C dans un évaporateur rotatif de type Heidolph Rotary Evaporator, Laborota 4000	66
Figure 22	L'extrait brut de <i>Juniperus phoenicea</i> après évaporation	67

Figure 23	Souche lyophilisée de <i>Escherichia coli</i> ATCC25922 ; <i>Listeria innocua</i> ATCC*33090 et <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213	68
Figure 24	Spectrophotomètre de type Jenway 6405 UV/VIS	68
Figure 25	Méthode de macro-dilution en milieu liquide	70
Figure 26	Histogramme représenté les pourcentages des rendements des huiles essentielles en termes de durée de séchage	71
Figure 27	Effet inhibiteur de l'huile essentielle et l'extrait éthanolique de <i>Juniperus phoenicea</i> sur la souche bactérienne testée <i>Escherichia coli</i>	74
Figure 28	Effet inhibiteur de l'huile essentielle et l'extrait éthanolique de <i>Juniperus phoenicea</i> sur la souche bactérienne testée <i>Listeria innocua</i>	74
Figure 29	Effet inhibiteur de l'huile essentielle et l'extrait éthanolique de <i>Juniperus phoenicea</i> sur la souche bactérienne testée <i>Staphylococcus aureus</i>	75
Figure 30	Chromatographie d'analyses physico-chimiques de l'huile essentielle de <i>Juniperus phoenicea</i>	79

Liste des tableaux

Numéro de tableau	Titre	Page
Tableau 01	Classification botanique de <i>Juniperus phoenicea</i>	07
Tableau 02	Teneur de composés phénoliques des Parties aériennes de <i>J.phoenicea</i> .	09
Tableau 03	Teneur en Oligo-éléments et minéraux des Parties aériennes de <i>J.phoenicea</i> .	09
Tableau 04	Activités biologiques des composés phénoliques	11
Tableau 05	Activité antibactérienne de <i>Juniperus phoenicea</i> .	12
Tableau 06	Dose létale de quelque huile essentielle	29
Tableau 07	Classification des polyphénols selon le nombre d'atomes de carbone	37
Tableau 08	<i>E.coli</i> testées pendant l'évaluation des activités antimicrobiennes	45
Tableau 09	Les souches testées (Gram +) pendant l'évaluation des activités antimicrobiennes	46
Tableau 10	Comparaison des rendements en huile essentielle de <i>J.phoenicea</i> de différents pays.	72
Tableau 11	Résultat CMI et CMB de <i>Escherichia coli</i> sur l'huile essentielles et l'extrait éthanolique	74
Tableau 12	Résultat CMI et CMB de <i>Listeria innocua</i> sur l'huile essentielles et l'extrait éthanolique	74
Tableau 13	Résultat CMI et CMB de <i>Staphylococcus aureus</i> sur l'huile essentielles et l'extrait éthanolique	75
Tableau 14	Les résultat CMI et CMB de l'huile essentielle et de l'extrait éthanolique sue les souches testées	75
Tableau 15	Résultat d'analyse de l'huile essentielle	78

Liste des abréviations

AFNOR : Association française de normalisation

ATCC : American Type Culture Collection

BHI : Brain Heart Infusion Broth

CCM : La chromatographie sur couche mince

CMB : Concentration minimale bactéricide

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CPG : La chromatographie en phase gazeuse

CPG/SM : La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

GRAS : Generally recognized as safe

HACCP : Le système d'analyse des risques et de maîtrise des points critiques

HE : Huile essentielle

MHA : Mueller Hinton Agar

MHB : Mueller Hinton Broth

OMS : L'Organisation mondiale de la santé

RMN : La résonance magnétique nucléaire

UFC : Unité formant colonie

UV : Ultraviolet

Introduction

Introduction

Introduction

Depuis la nuit des temps, l'homme est habitué à utiliser les plantes pour leurs propriétés médicinales et nutritives. Le monde des végétaux est plein de ressources et de vertus d'où l'homme puise non seulement sa nourriture mais aussi des substances actives qui procurent souvent un bienfait à son organisme parfois affecté de troubles insidieux.

En 2007, l'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 80% des habitants ont recours aux préparations traditionnelles à base de plantes par manque d'accès aux médicaments prescrits mais aussi parce que les plantes ont pu démontrer une réelle efficacité. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme. En effet, environ de 10 à 20% des hospitalisations sont dues aux effets secondaires des médicaments chimiques (**Mehani, 2015**).

Actuellement, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques a conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales et culinaires en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse (**Abedini, 2013**) Plusieurs plantes peuvent être une guérison de nombreux maux quotidiens qui vont des simples troubles digestifs jusqu'à le traitement des maladies chroniques comme le cancer, l'ulcère, le diabète, les calculs rénaux (**Tahri et al., 2012**).

L'Algérie, par sa situation géographique au centre de la méditerranée, abrite une végétation riche et diversifiée. Un grand nombre de plantes aromatiques y poussent spontanément dont les *Juniperus phoenicea* qui sont riches en huiles volatiles.

Les plantes aromatiques ont été traditionnellement employées pour l'assaisonnement et la prolongation de la durée de conservation des aliments (**Wang et al., 2010**). La plupart de leurs propriétés sont dues aux huiles essentielles produites par leur métabolisme secondaire (**Rashid et al., 2010**). Ces huiles sont d'intérêt croissant pour les industries et la recherche scientifique en raison, d'une part, de leurs activités antioxydante, antibactérienne et antifongique (**Dung et al., 2008**), d'autre part, la plupart des huiles essentielles sont classées dans la liste des substances GRAS, qui les rendent utiles en tant que conservateurs naturels dans les industries agroalimentaires (**Rasooli et al., 2008**).

La qualité microbiologique d'un aliment constitue l'une des bases essentielles de son aptitude à satisfaire la sécurité du consommateur, un aliment, exposé à la détérioration par

Introduction

les bactéries et les moisissures peut voir diminuer ses caractéristiques sensorielles, nutritives et sanitaires (**Guiraut, 2003**).

Malgré l'amélioration des techniques de conservation des aliments, la nature des conservateurs alimentaires reste une des questions les plus importantes pour la santé publique (**Burt, 2004**).

Notre étude consiste à l'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et d'extrait éthanolique de la plante de *Juniperus phoenicea*, qui appartient à la famille cupressacées. La sélection de cette plante est pressée par le fait qu'elle est parmi les plantes médicinales les plus populaires utilisées dans le monde entier, Ces plantes médicinales plus intéressants dans le domaine de médecine traditionnelle et celui de culinaire et, aussi leurs huiles essentielles dans les industries alimentaires.

Notre travail de recherche comporte deux parties, la première partie se compose une étude bibliographique avec trois chapitres intitulés par les plantes médicinales puis généralités sur les extraits des plantes et le dernier chapitre dans cette partie il est l'activité antibactérienne des extraits dans cette chapitre nous examinons l'activité antibactérienne de trois bactéries (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogène*).

La deuxième partie présente la région d'étude, le matériel et les méthodes mis en œuvre pour l'extraction des composés Phénoliques et l'huile essentielle qui utilisé dans notre travail et l'évaluation de leurs activités antibactériennes et présentation des résultats obtenus et leurs discussions.

Chapitre I : Les plantes médicinales

1. Les plantes médicinales

1.1. Définition

Ce sont des plantes utilisées en médecine traditionnelle et possède des propriétés thérapeutiques (**Sanago, 2006**).

Depuis des milliers d'années, l'homme utilise les plantes trouvées dans la nature, pour traiter et soigner des maladies (**Sanago, 2006**).

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (2003), environ 65-80% de la population recourt à la médecine traditionnelle (**Mabry et al., 1980**).

Actuellement, les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. (**Maurice, 1997**).

1.2. Historique

La connaissance rationnelle des plantes médicinales date de l'Antiquité. C'est Hippocrate qui différencie l'usage interne et l'usage externe et qui définit la notion de dose qui permet de distinguer l'effet thérapeutique de l'effet toxique (**Colette-Keller, 2004**).

Au cours des dernières décennies, les recherches scientifiques les plus modernes n'ont fait que confirmer le bien-fondé des vertus thérapeutiques de la plupart des plantes médicinales utilisées (**Carillon, 2000**).

Ce savoir traditionnel ancestral qui se transmet de génération en génération est devenu aujourd'hui une mine d'informations extrêmement précieuses pour les chercheurs d'industrie pharmaceutique (**Fouché et al., 2000**).

Après des années de domination de la synthèse chimique, la pharmacologie, mais aussi la nutrition et l'agroalimentaire redécouvrent les vertus des plantes dites médicinales, ce qui est le cas de toutes les plantes. Elles sont de plus en plus considérées comme source de matières premières essentielles pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments (**Maurice, 1997**).

Mais leurs usages traditionnels n'ont jamais disparu, bien au contraire (**Pierangeli et al., 2009**).

Aujourd'hui la pharmacologie s'oriente de plus en plus vers des traitements à base de plantes, car l'efficacité de la synthèse chimique a largement atteint ses limites et n'arrive plus

Chapitre I : Les plantes médicinales

à être créative. L'exemple de l'antibiorésistance microbienne, à l'origine de la recrudescence des maladies nosocomiales se passe de tout commentaire (**Iserin, 2001**).

1.3. Intérêt de l'étude des plantes médicinales

La plupart des espèces végétales contiennent des substances qui peuvent agir, à un niveau ou un autre, sur l'organisme humain et animal. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie. Elles présentent en effet des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus (**Iserin, 2001**).

La raison fondamentale est que les principes actifs végétaux proviennent de processus biotiques répandus dans tout le monde vivant, alors que l'essentiel des médicaments de synthèse sont des xénobiotiques aux effets secondaires très mal maîtrisés (**Bruneton, 2009**).

2. La famille des *Cupressacées*

La famille des *Cupressaceae* comprend deux sous-familles, se divisant chacune en trois tribus, les *Cupressoideae* et les *Callitoideae* qui sont essentiellement et respectivement des hémisphères nord et sud (**Haluk, 2000**). Elle comporte environ trente genres (**Farjon, 2001**), les plus importants sont *Cupressus L.*, *Juniperus L.* et *Callitris Vent* (**Schulez et al, 2005**).

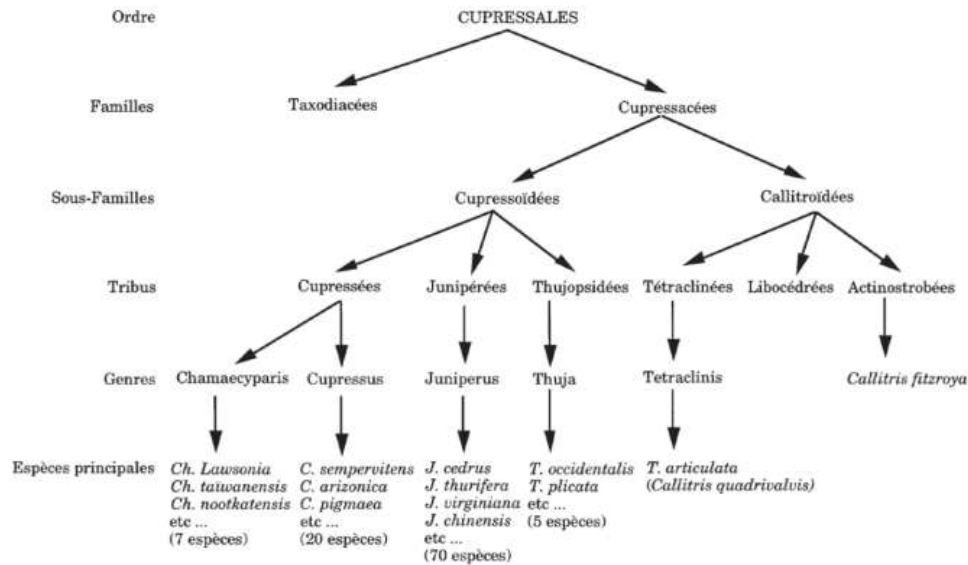


Figure 1. Classification détaillée de l'ordre des *Cupressales* (Haluk Roussel 2000).

2.1. *Juniperus phoenicea*

Le *Genévrier de Phénicie* ou *genévrier rouge* (*J. phoenicea*) (Figure 2) est un arbrisseau touffu ou un arbuste de 1 à 3 m de hauteur mais pouvant atteindre cependant jusqu'à 8 à 10 mètres (Bouyahyaoui, 2017).

Cette espèce est monoïque, assez rarement dioïque à feuillage persistant et aromatique, la floraison a lieu pendant l'hiver et la fructification à la fin de l'été de l'année suivante (Abdelli, 2017).

Juniperus phoenicea, « Ara'ar » (*Cupressaceae*) est un arbuste indigène de la région méditerranéenne (Derwich, 2011).

C'est une espèce qui appartient à la section Sabina, du genre *Juniperus*. Elle est très variable, caractérisée par la présence de variations morphologiques, biochimiques et moléculaires, dont on distingue trois sous espèces : *J. phoenicea subsp phoenicea*, *J. phoenicea subsp eu-mediterranea* et *J. phoenicea var. turbinata* (Mélanie et al., 2006).

Cette espèce est considérée comme une importante plante médicinale, largement utilisée dans la médecine traditionnelle dans de nombreux pays (Dawidar et al., 1991).

Chapitre I : Les plantes médicinales

Elle est utilisée à l'état vapeur pour la bronchite et le contrôle de l'arthrite. Son huile est irritante pour les microbes (Derwich et al., 2010).

Ses feuilles sont utilisées pour traiter les diarrhées, les rhumatismes et le diabète (Bellakhder, 1997).

Le mélange de feuilles et de baies de cette plante est utilisé comme agent hypoglycémiant (Amer et al., 1994).

Les fruits séchés et réduits en poudre peuvent guérir les ulcérations de la peau et les abcès (Akrouf, 1999). En Algérie elle est surtout reconnue pour son activité anti-diarrhéique (Mazari et al., 2010).



Figure 02. Aspect général Feuilles et fruits du *genévrier de Phénicie* (Pavel Buršík. 2006).

2.1.1. Nomenclature de la plante

Cette plante a plusieurs noms qui diffèrent selon les régions et les cultures (Figure 3).

NOM VERNACULAIRE: Arârlahmar
NOM ARABE :Ar'ar
NOM ANGLAIS: <i>Phoenician juniper</i> <i>Phoenician Cedar</i>, <i>Berry Bearing Cedar</i>
NOM FRANÇAIS : Genévrier de Phénicie, Genévrier rouge
NOM LATIN: <i>Jupiers phonique</i>
NOM Kabyle taqa (tawrirt plus rarement)

Figure 3. Différents noms de genévriers selon la région (Dane, 2015).

Chapitre I : Les plantes médicinales

2.1.2. Taxonomie

Cette plante est identifiée par sa classification globale donnée dans le tableau 1.

Tableau 01 : Classification botanique de *Juniperus phoenicea* (Small et al., 2001).

Règne	Plante
Sous règne	Tracheobionta
Embranchement	Spermatophytes Sous Embranchement : Gymnospermes
Classe	Pinopsida
Ordre	Pinales
Famille	Cupessaceae
Genre	<i>Juniperus</i> L
Espèce	<i>Juniperus phonique</i>

2.2. Répartition géographique

Juniperus phoenicea est une espèce qui se trouve dans les différentes régions du monde, mais il est plus fréquent dans la partie Ouest des régions méditerranéennes au Sud de l'Europe (également dans l'Est de Portugal jusqu'en Turquie) (Adams et al., 1996), Ouest d'Asie (notamment dans les montagnes de l'Ouest de l'Arabie Saoudite) (Motawe, 2008).

En Afrique du Nord, il pousse en Algérie, au Maroc, en Tunisie ainsi qu'en l'Egypte (Derwich et al., 2010). (Figure 03).

En Algérie cette espèce occupe les dunes maritimes en Oriane, les montagnes les plus sèches où il constitue des matorrals dans les Aurès et l'Atlas saharien. Par ailleurs, (Boudy, 1955), a estimé la superficie occupée par *Juniperus phoenicea* et *Juniperus oxycedrus* à 290 000 ha ; alors que dans un inventaire plus au moins récent, la superficie de ces deux espèces n'est que de 17. 504 ha , ce qui confirme les propos de certains auteurs affirmant que certaines espèces de cette essence sont dans un stade ultime de dégradation (Harfouche et al., 2005).

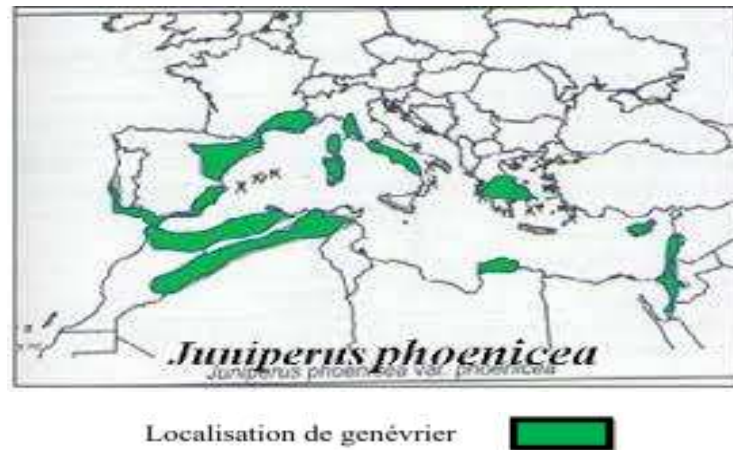


Figure 04. Localisation de *Juniperus phoenicea* dans la région méditerranéenne (Adams, 2011).

2.3. Description botanique

Juniperus phoenicea (Genévrier de Phénicie, « Arâar »), Arbuste pouvant atteindre 8 m, à rameaux brun rougeâtre écailléux (Baba Aissa, 2011), bourgeons nus, ramules cylindriques (Jamaleddine, 2010).

Les feuilles persistant non piquant, aromatique, gris vert, glauque pourvu sur le revers de deux bandes de stomates plus foncées que la partie médiane. Elles sont presque toutes squame formes, en écailles très petites et courtes, à bords cartilagineux finement denticulés, serrées contre les rameaux, le plus souvent imbriquées sur 4 ou 6 rangs (Belkacem, 2015).

La Floraison est à la fin de l'hiver au printemps (Février-Avril) (Louis et al., 2010). C'est une espèce dioïque ; les fleurs mâles sont groupées en chatons d'écailles portant des sacs polliniques sur leur face inférieure, les fleurs femelles sont groupées dans un cône contenant les ovules (Belkacem, 2015) Les fruits globuleux gros de 10 à 15 mm de diamètre, rougeâtres et luisants à maturité (impropres à la consommation : toxiques, réservée à l'usage externe) (Baba Aissa, 2011), mettant deux ans pour mûrir. Un kilogramme de cônes donne 5000 graines (Boudy, 1950).

Le tronc : est droit, l'écorce brun rougeâtre le système racinaire est profond. Gris brun, étalé et dressé.

Plante : Dioïque, rarement monoïque.

Longévité : Jusqu'à 1000 ans. (Croissance très lente)

Habitat : Régions méditerranéennes, littorales, collines et basses montagnes sèches et ensoleillées (espèce héliophile). Peu exigeant, elle s'accroche parfois aux roches et abrupte.

Chapitre I : Les plantes médicinales

Elle peut se développer dans les fissures des roches (Rameau et al., 2008).

2.4. Composition chimique

Les investigations chimiques réalisées sur *J.phoenica* dans différentes régions de part et d'autre du bassin méditerranéen, telles que l'Espagne, le Portugal et la Grèce (Cavaleiro et al., 2000), la Corse (Rezzi et al., 2001), la Tunisie (Nasri et al., 2011), l'Égypte (El-sawi et al., 2007) et l'Arabie saoudite (Dawidar et al., 1991) La Libye (Hamad, 2017) l'Algérie (Dane et al., 2015). Ont indiqué que le constituant majeur dans ses huiles est le : α -pinène, suivi des mono terpènes oxygénés tels que, α -terpinyl acétate, δ -3-carène, Myrcène, α -phellandrène et β -phellandrène (Menaceur et al., 2013).

Tableau 02. Teneur composés phénoliques des Parties aériennes de *J.phoenicea* (Dane et al., 2015).

Composés phénoliques	Pourcentage %
Catechin	41.97
Myricetin-hexose	11.11
Myricetin-rhamnoside	1.23
Myricetin-rhamnoside	45.67

Tableau 03. Teneur en Oligo-éléments et minéraux des Parties aériennes de *J.phoenicea* (Nedjimi et al., 2015).

Eléments							
	Ca (%)	Co (mg/g)	Cr (mg/g)	Fe (mg/g)	K (%)	Na (mg/g)	Zn (mg/g)
Valeurs	1.60	0.17	1.13	430	0.67	52.13	15.6

2.5. Usages traditionnels et médicaux

Les plantes médicinales ont été utilisées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines, car ils contiennent des composants chimiques de valeur thérapeutique (Nostro et al., 2000).

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS) 2008, plus de 80% de la population mondiale dépend de la médecine traditionnelle pour leurs besoins de santé primaires (Pierangeli et al., 2009).

Chapitre I : Les plantes médicinales

Le *Juniperus phoenicea* L Occupe une place primordiale dans la pharmacopée traditionnelle du Nord de l'Afrique (**Benkhigue et al., 2014**), la première utilisation enregistrée de cette plante était en Egypte vers 1500 Avant JC (**Al Groshi et al., 2018**).

Dans la médecine populaire algérienne. Ses feuilles sont utilisées sous forme de décoction pour traiter le diabète, la diarrhée et les rhumatismes. Le mélange de feuilles et de baies de cette plante est utilisé comme agent hypoglycémique oral, alors que les feuilles sont utilisées contre les maladies broncho-pulmonaires (**Achak et al., 2008**).

Les cônes, les rameaux, mais surtout les jeunes pousses préparées en infusion ont des effets diurétiques, stomachiques et digestifs (**Barrero et al., 2004**), alors que les fruits séchés et réduits en poudre peuvent guérir les ulcérations de la peau et les abcès (**Qnais et al., 2005**).

2.6. Activités biologiques des composés phénoliques

Selon les chercheurs, l'effet protecteur des fruits et légumes vis-à-vis des maladies de civilisation (maladies cardiovasculaires, diabète...) serait d'ailleurs lié à la présence de très nombreux polyphénols, vitamines et acides phénoliques, présents dans ces aliments (**Edeas, 2006**).

Chapitre I : Les plantes médicinales

Tableau 04. Activités biologiques des composés phénoliques (Frankel et al., 1995).

Polyphénols	Activités	Référence
Acides phénols (cinnamique et benzoïque)	Antibactériens Antifongiques Antioxydants	Didry et al., 1982 Ravn et al., 1984 Hayase et Kato, 1984
Coumarines	Vasoprotectrices et antioedémateuses	Mabry et Ulubelen, 1980
Flavonoïdes	Antitumorales Anticarcinogènes Anti-inflammatoires. Hypotenseurs et diurétiques Antioxydants	Stavric ., 1992 Das et al. 1994 Bidet et al., 1987 Bruneton, 1993 Aruoma et al., 1995
Anthocyanes	Protection des veines et Capillaires	Bruneton, 1993
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène Antioxydants Antitumorales Antifongiques Anti-inflammatoires	Masquelier et al., 1979 Bahorun et al., 1996 D'Oliveir et al. 1972 DEOliveir etal. 1972 Brownlee et al. 1992
Tanins galliques et catéchiques	Antioxydants	Okamura et al., 1993 Okuda et al., 1983

Chapitre I : Les plantes médicinales

2.6.1. Activité antibactérienne

Diverses études ont été menées sur le pouvoir antibactérienne de *Juniperus phoenicea*.

Tableau 05. Activité antibactérienne de *Juniperus phoenicea*.

Régions	Souches utilisez	Zones d'inhibition (mm)	Références
Maroc	<i>Escherichia coli</i>	8.30	Amalich et al 2015
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	18	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15.50	
Libye	<i>Bacillus subtilis</i>	11	Aljaiyash et al 2014
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12	

2.6.2. Autre bioactivité

Cette plante présente plusieurs activités biologiques : anti-inflammatoire, antiviral, expectorant, sédatif, herbicide, insectifuge, et aromatisant (**Duke, 1998**).

2.7. La croissance du genévrier de Phénicie

Le peuplement de genévrier de Phénicie peut atteindre des âges importants malgré une taille modeste, des individus de 1.5 m de haut, avec un tronc de 8 cm de diamètre sont âges de 1150ans (**Mandai, 2005**).

Chapitre II : Généralité sur les extraits des plantes

Chapitre II : Généralités sur les extraits des plantes

1. Définition des huiles essentielles

Afin de définir les huiles essentielles, il faut d'abord passer par la définition des "essences végétale". L'essence est élaborée dans les tissus de la plante aromatique via le processus de la photosynthèse. Au fur et à mesure que s'élaborent les essences par le biais de cellules sécrétrices, elles sont stockées au sein des tissus des plantes aromatiques dans des micropoches. Lorsque nous distillons ces plantes, la vapeur d'eau (ou n'importe quel procédé d'extraction) fait éclater les micropoches à essences et la part la plus volatile de celles-ci est extraite (**Huete, 2012**).

Selon la Commission de la Pharmacopée Européenne (01-2008 : 2098) une huile essentielle est un « produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition » (**Benoit, 2015**).

Huile essentielle : « Produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques pour les deux premiers modes d'obtention ; elle peut subir des traitements physiques n'entraînant pas de changement significatif de sa composition par exemple, redistillation, aération, ... » (**Brunton, 2004**).

Les différents procédés d'extraction des huiles essentielles permettent de définir plusieurs termes d'identification qui sont utilisés dans la pratique courante :

a) Concrète : extrait à odeur caractéristique, obtenu à partir d'une matière première fraîche d'origine végétale, par extraction au moyen d'un solvant non aqueux suivie d'une élimination de ce solvant par un procédé physique.

b) Résinoïdes : extrait à odeur caractéristique, obtenu à partir de matière première sèche d'origine végétale, par extraction à l'aide d'un solvant non aqueux, suivie de l'élimination de ce solvant par un procédé physique.

c) Pommade florale : corps gras parfumé obtenu à partir de fleurs soit par « enfleurage à froid » soit par « enfleurage à chaud ».

Chapitre II : Généralités sur les extraits des plantes

d) Absolue : produit ayant une odeur caractéristique, obtenu à partir d'une concrète, d'une pommade florale ou d'un résinoïde par l'extraction à l'éthanol à température ambiante. La solution éthanolique obtenue est généralement refroidie et filtrée dans le but de supprimer les cires ; l'éthanol est ensuite éliminé par distillation.

e) Eau florale : obtenue lors de la distillation des plantes par condensation de la vapeur d'eau chargée d'huile essentielle, et séparation des deux phases obtenues en HE et eau florale moins concentrée en composés odorants.

f) Hydrolat : résulte de la macération d'une plante dans l'eau (**Brunton, 2004**).

Ce sont des substances huileuses, volatiles, d'odeur et de saveur généralement fortes, extraites à partir des différentes parties de certaines plantes aromatiques, par les méthodes de distillation, par enfleurage, par expression, par solvant ou par d'autres méthodes (**Wichtel, 1999**).

Les huiles essentielles (= essences = huiles volatiles) sont « des produits de compositions généralement assez complexes renfermant des principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation » (**Bruneton, 1999**).

La norme française AFNOR NF T75-006 définit l'huile essentielle comme : « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, et qui sont séparés de la phase aqueuse par procédés physiques » (**Garnero, 1996**).

2. Histoire et importance

Les huiles essentielles ont, à toute époque, occupé une place importante dans la vie quotidienne de l'homme, qui les utilisait autant que pour se parfumer, aromatiser sa nourriture et particulièrement pour se soigner. La connaissance des HEs remonte à fort longtemps, puisque l'homme préhistorique pratiquait déjà, à sa manière, l'extraction des principes odorants des plantes (**Piochon, 2008**).

L'utilisation des substances odorantes des plantes a été décrite à l'antiquité par les plus anciennes civilisations : tout d'abord dans l'Orient et le moyen Orient, puis le Nord-Africain suivi de l'Europe (**Franchomme, 1990**).

Chapitre II : Généralités sur les extraits des plantes

Ensuite, progressivement, dans l'histoire moderne, les HEs se font connaître par leurs vertus thérapeutiques et deviennent alors des remèdes courants dans la médecine traditionnelle.

En 1928 le chimiste Français René Maurie Gattefosse a utilisé le terme « aromathérapie » pour décrire les propriétés curatives des huiles essentielles, lorsqu'il a découvert par accident que la lavande a guéri une brûlure à sa main (**Benabdelkader, 2012**).

En 1964, le docteur Français Jean Valunet a connu à grand succès en traitant des patients en médecine et en psychiatrie avec des HEs. De nos jours, la médecine moderne utilise les composés volatils de ces huiles constituants comme ingrédients courants dans les préparations pharmaceutiques (**Pauli, 2001**).

3. Répartition, localisation et fonction

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs, les plantes capables d'élaborer les constituants qui composent ces huiles essentielles sont connues sous le nom de plantes aromatiques, réparties dans un nombre limité de familles, ex : *Myrtacées*, *Lauracées*, *Rutacées*, *Lamiacées*, *Astéracées*, *Apiacées*, *Cupressacées*, *Poacées*, *Zingibéracées*, *Pipéracées*, etc. Tous les organes végétaux peuvent renfermer des huiles essentielles en particulier les sommités fleuries (Lavande, Menthe). On les trouve aussi dans les écorces (*Cannelier*), les racines (*Vétiver*), les rhizomes (*Gingembre*), les fruits (*Anis*, *Fenouil*, *Badiane*), le bois (*Camphrier*), les feuilles (*Citronnelle*, *Eucalyptus*), les graines (*Muscade*) et les boutons floraux (*clou de Girofle*) (**Ghuestem et al., 2001**).

Il n'existe pas de règle générale concernant les lieux d'accumulation des métabolites secondaires telles que les huiles essentielles dans l'organisme végétal. (**Guignard et al., 1985**).

La plupart des huiles essentielles se retrouvent dans des glandes. Les structures glandulaires et les cellules sécrétrices isolées peuvent se rencontrer dans tous les organes végétaux, végétatifs et reproducteurs. Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une même espèce, voire dans un même organe. (**Garneau, 2004**).

Les structures anatomiques spécifiques spécialisées dans la sécrétion des huiles essentielles sont très diverses poches sécrétrices schizogènes (*Myrtacées*) ou poches sécrétrices schizolyziques (*Aurantiacées*), des canaux sécréteurs (*Conifères et Apiacées*),

Chapitre II : Généralités sur les extraits des plantes

poils sécréteurs (*Lamiacées et Astéracées*), et cellules sécrétrices isolées (*Lauracées, Magnoliacées et Pipéracées*) (**Bruneton, 1999**).

Signalent que ces canaux et ces poches sont dit schizogènes s'ils se forment par écartement des cellules sécrétrices et lysigènes s'ils se forment grâce à leur lyse, mais il est fréquent que les deux modes de formation coexistent (canaux et poches schizolyziques). Binet et Brunel (1968) indiquent, que la teneur des plantes en huiles essentielles est faible, souvent inférieure à 1%. Il existe, cependant, des exceptions telles que le clou de girofle qui renferme plus de 15%. (**Ghestem et al., 2001**).

Beaucoup de plantes produisent les huiles essentielles en tant que métabolites secondaires, mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante est inconnu (**Rai et al., 2003**). Elles sont en général considérées comme des déchets du métabolisme (**Amiot, 2005**) ou des sous-produits de l'activité métabolique d'une plante (**Amiot, 2005**).

Cependant, plusieurs effets apparent utiles ont été décrits telles que la réduction de la compétition des autres espèces de plantes (allélopathie) par inhibition chimique de la germination des graines par exemple le ciné olé et le camphre, libérés dans l'atmosphère par *Salvia leucophylla* sont absorbés par le sol sec, inhibant la germination des espèces prairiales ainsi que la protection contre la flore microbienne infectieuse par les propriétés fongicides et bactéricides et contre les herbivores par gout et effets défavorables sur le système nerveux (**Guignard et al., 2004**).

Certains auteurs pensent que les huiles essentielles pourraient avoir un rôle attractif vis-à-vis des insectes pollinisateurs et favoriseraient ainsi la pollinisation (**Bruneton, 1999**).

D'autres auteurs affirment que les huiles essentielles jouent un rôle hormonal, régulateur et catalyseur dans le métabolisme végétal et semblent aider la plante à s'adapter à son environnement. Signale que l'utilité des huiles essentielles pour les plantes désertiques est liée à la conservation d'une humidité indispensable à la vie des plantes. Les vapeurs aromatiques permettent de saturer l'air autour de la plante empêchant, le jour, la température de l'air de monter jusqu'à un degré insupportable pour la vie végétale et la nuit de baisser de façon excessive (**Belaiche, 1979**).

Les essences pourraient constituer des supports à une communication et ce d'autant mieux que leur variété structurale autorise le transfert de messages biologiques sélectifs (**Bruneton, 1999**).

Chapitre II : Généralités sur les extraits des plantes

Les structures aromatiques spécifiques spécialisées dans la sécrétion des composés aromatiques sont très diverses, on cite :

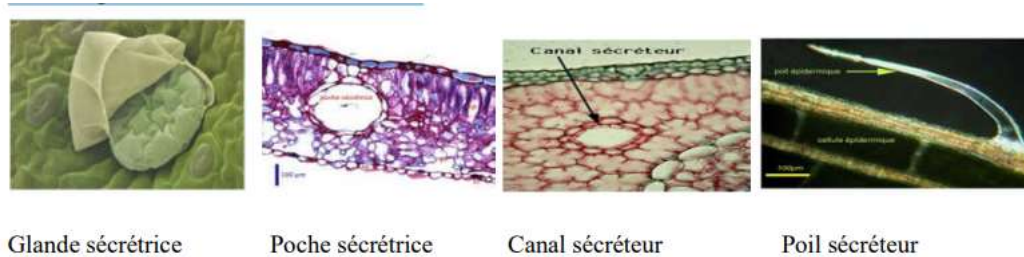


Figure 5. Localisation des huiles essentielles (Belaiche, 1979).

4. Procédés d'extraction des huiles essentielles

De tous temps, on connaît les vertus des « essences de plante » et on s'efforça de les extraire depuis la plus haute antiquité. C'est vers le 13^{ème} siècle, en Europe, plus précisément dans le Sud de la France, au royaume des parfums, que l'on a commencé à explorer diverses méthodes d'extraction de ces huiles volatiles, Connaissant mieux les constituants des huiles, des techniques se sont développées visant à optimiser la qualité de l'huile tout en maintenant un rendement intéressant. La distillation est de loin, le procédé le plus utilisé pour l'extraction des huiles essentielles. (France-Ida, 1996).

4.1. Distillation

La distillation peut être définie comme étant la séparation des constituants d'un mélange de deux ou plusieurs composants en fonction de leur température de passage à l'état gazeux (ébullition ou sublimation). La distillation peut s'effectuer avec recyclage de l'eau de distillation (cohobation), ou sans recyclage. La production des huiles essentielles se ferait donc en deux étapes : la diffusion de l'huile essentielle de l'intérieur des tissus vers la surface du matériel végétal, et l'évaporation et entraînement à la vapeur d'eau (Benjilali, 2004).

Signale que le principe de la distillation repose sur la propriété qu'ont les huiles essentielles d'être volatiles sous l'effet de la chaleur, l'huile est alors entraînée par la vapeur d'eau (Bruneton, 1999).

Après condensation, l'huile essentielle se sépare du distillat par décantation. Il existe deux méthodes de base de distillation pour l'obtention des huiles essentielles qui reposent sur le même principe : entraînement des constituants volatils du matériel végétal par la

Chapitre II : Généralités sur les extraits des plantes

vapeur d'eau. La différence entre eux réside dans le degré de contact entre l'eau liquide et le matériel végétal (Benjlali, 2004).

4.2. Distillation à l'eau ou « hydrodistillation »

Le matériel végétal est en contact direct avec l'eau. Lorsque le végétal est broyé on parle de turbo distillation. L'hydrodistillation consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition (Bruneton, 1999).

Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité. Les inconvénients de cette méthode sont : la calcination du matériel végétal, ce qui entraîne une modification de la composition et des caractéristiques chimiques de l'huile essentielle (Abou Zeid, 2000), La non maîtrise de la température du récipient contenant le mélange (eau + organes végétaux) et la modification de l'odeur, de la couleur et de la composition de l'huile essentielle au cours de la distillation (Chalchat et al., 1997). Cette méthode est généralement utilisée en cas des huiles essentielles dont les constituants chimiques sont thermorésistants. Elle est aussi utilisée dans l'extraction des huiles à partir des feuilles et des fleurs fraîches ou séchées. Parmi les huiles extraites par cette méthode, on cite l'huile de menthe, de myrte et de l'herbe à citron (Haekel et Omar, 1993).

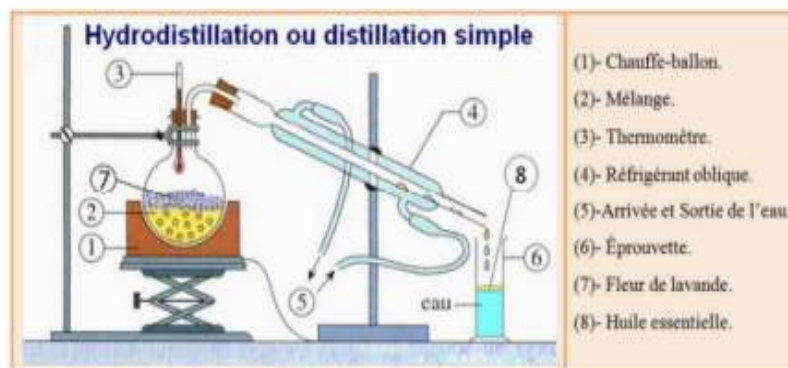


Figure 6. Schématisation du procédé de l'hydrodistillation (Bruneton, 1999).

Chapitre II : Généralités sur les extraits des plantes

4.3. Distillation à la vapeur

Distillation à la vapeur saturée : «vapo-hydrodistillation» : c'est le procédé le mieux adapté à l'extraction des essences, surtout si elles sont destinées à des fins thérapeutiques (Bego, 2001).

Le matériel végétal, dans ce cas, n'est en contact avec l'eau, se trouve supporté par une grille ou une plaque perforée placée à une distance adéquate du fond de l'alambic, rempli d'eau. Sous l'action de la chaleur, l'eau se transforme en vapeur et passe à travers les plantes en entraînant les molécules aromatiques vers un système de refroidissement (Bego, 2001).

La vapeur d'eau chargée ainsi d'essence retourne à l'état liquide par condensation. Le produit de la distillation se sépare donc en deux phases distinctes : l'huile et l'eau condensée que l'on appelle eau florale ou hydrolat (Benjlali, 2004).

Cette méthode est utilisée dans la distillation à partir de plantes fraîches telles que la menthe et le myrte et les plantes qui portent leurs huiles essentielles dans les feuilles qui sont cueillies puis partiellement coupées ensuite portées au dispositif de distillation. Puisque la plante fraîche est riche en eau, donc il n'est pas nécessaire de l'immerger (Omar, 1993).

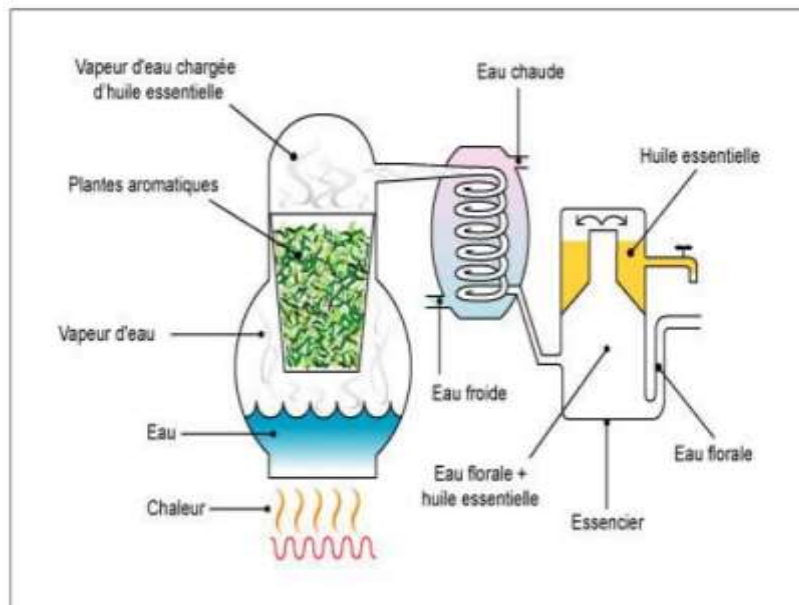


Figure 7. Distillation à vapeur saturée (Boutamani, 2013).

Chapitre II : Généralités sur les extraits des plantes

4.4. Distillation à la vapeur directe :

C'est une variante de l'entraînement à la vapeur qui consiste à pulser de la vapeur d'eau à très faible pression (0.02-0.15 bar) à travers la masse végétale du haut vers le bas, en utilisant la pesanteur comme force de déplacement de la vapeur, la composition des produits obtenus est qualitativement différente de celle des produits obtenus par les méthodes classiques. Le procédé permet un gain de temps et d'énergie ; ce procédé est appelé distillation par hydrodiffusion (**Benjilali, 2004**).

Il découle des recherches que l'entraînement à la vapeur d'eau est préférable à l'hydrodistillation du fait qu'elle permet une extraction totale des huiles essentielles en améliorant le rendement de 33% par rapport à l'hydrodistillation (**Richard, 1976**).

4.5. L'extraction par enfleurage

Ce procédé met à profit la liposolubilité des composants odorants des végétaux dans les corps gras. Il consiste à déposer des pétales de fleurs fraîches sur des plaques de verre recouvertes de minces couches de graisse (graisse animale type saindoux). Selon les espèces, l'absorption des huiles essentielles des pétales par le gras peut prendre de 24 heures (*Jasmin*) à 72 heures (*Tubéreuse*). Les pétales sont éliminés et remplacés par des pétales fraîches jusqu'à saturation du corps gras. On épuise ce corps gras par un solvant que l'on évapore ensuite sous vide (**France Ida, 1996**).

Pour certaines plantes, on procède à une immersion des fleurs dans de la graisse chauffée, c'est ce que l'on appelle enfleurage à chaud ou « digestion » (**Bruneton, 1999**).

Cette méthode appelée également macération à chaud par d'autres auteurs est surtout utilisée pour les fleurs délicates qui perdent leurs arômes très rapidement après la cueillette, comme les violettes et certains lys (**France-Ida, 1996**).

Cette technique laborieuse, qui demande une grande labilité, est de moins en moins employée au profit de l'extraction par les solvants, en raison de son faible rendement et de l'importante main d'œuvre qu'elle nécessite (**Abou Zeid, 1988**).

4.6. L'extraction par les solvants volatils

Cette méthode est utilisée pour les organes végétaux présentant une concentration en essence relativement faible ou pour les essences que l'on ne peut extraire par distillation.

Chapitre II : Généralités sur les extraits des plantes

Elle est basée sur le pouvoir qu'ont certains solvants organiques à dissoudre les composants des huiles essentielles. Dans ce procédé, un épuisement des plantes est effectué à l'aide d'un solvant volatil dont l'évaporation laisse un résidu cireux, très coloré et très aromatique appelé « concrète ». Le traitement de cette concrète par l'alcool absolu conduit à « L'absolue » (**Duraffourd et al., 1990**).

Le choix du solvant est influencé par des paramètres techniques et économiques : sélectivité (pouvoir solvant à l'égard des constituants odorants), stabilité, inertie chimique, température d'ébullition pas trop élevée pour permettre son élimination totale, pas trop faible pour éviter les pertes et donc une élévation des coûts, sécurité de manipulation c'est à dire non toxique ou inflammable. Les solvants les plus utilisés sont les hydrocarbures aliphatiques : l'éther de pétrole et l'hexane, mais aussi le propane ou le butane liquide (sous pression). Si le benzène est un bon solvant, sa toxicité limite de plus en plus son utilisation. On a également recours aux solvants halogénés (dérivés chlorés et fluorés du méthane et de l'éthane) ainsi qu'à l'éthanol. Après l'extraction, le solvant est distillé et en fin de l'opération, le solvant qui imbibe la masse végétale est récupéré par injection de vapeur d'eau dans celle-ci (**Bruneton, 1999**).

L'extraction par les solvants présente toutefois des contraintes diverses liées en premier lieu au manque de sélectivité de ces produits : de nombreuses substances peuvent de ce fait se retrouver dans les concrètes (huiles fixes, phospholipides, caroténoïdes, cires, certaines coumarines) et imposer une purification ultérieure, et en second lieu, à la toxicité des solvants et leur présence sous forme de traces résiduelles dans l'extrait final (**Bruneton, 1999**).

En effet, affirme que des analyses sérieuses, par les méthodes les plus modernes, montrent que les proportions de solvants résiduels dans les concrètes se situent entre 2 et 4% atteignant souvent 6% et même parfois 25%. Les absolues obtenues par lavage à l'alcool des concrètes contiennent encore des ppm importantes de ces solvants. De telles huiles ne sont donc pas admissibles à l'usage médical par contre, elles sont admissibles en parfumerie (**Viaud, 1993**).

4.7. L'extraction par expression

L'essence, altérable par entraînement à la vapeur d'eau, est ici extraite du péricarpe frais d'agrumes par différents modes d'extractions : dans l'industrie, les zestes sont dilacérés et le contenu des poches sécrétrices est récupéré par expression manuelle ou à l'aide de

Chapitre II : Généralités sur les extraits des plantes

machines qui rompent les poches par expression et recueillent directement l'huile essentielle (**Bruneton, 1999**), ou encore après scarifications mécaniques, un entraînement de l'huile essentielle par un courant d'eau. L'essence est séparée par décantation comme précédemment (**Hurabielle, 1981**).

Cette méthode artisanale est totalement abandonnée au bénéfice des machines utilisées pour permettre l'extraction des jus des fruits d'une part, et d'essence d'autre part (**Belaiche, 1979**).

4.8. L'extraction par micro-ondes

C'est un procédé utilisant les micro-ondes et les solvants transparents aux micro-ondes pour extraire de façon rapide et sélective des produits chimiques de diverses substances (**Paré, 1997**).

Le matériel végétal est immergé dans un solvant transparent aux micro-ondes de manière à ce que seul le végétal soit chauffé. Les micro-ondes vont chauffer l'eau présente dans le système glandulaire et vasculaire de la plante, libérant ainsi les produits volatils qui passent dans le solvant (non chauffé). On filtre et on récupère ensuite l'extrait. L'extraction par micro-ondes a le grand avantage de réduire le temps d'extraction à quelques secondes (**France Ida, 1996**).

Ce procédé très rapide et peu consommateur d'énergie, livre un produit qui, est le plus souvent, de qualité supérieure à celle du produit d'hydrodistillation traditionnelle (**Bruneton, 1999**).

Par ailleurs, l'analyse des huiles essentielles obtenues par cette méthode a montré que la composition qualitative des huiles essentielles était la même que celle des huiles obtenues par distillation mais le pourcentage des constituants variait de manière significative (**Scheffer, 1996**).

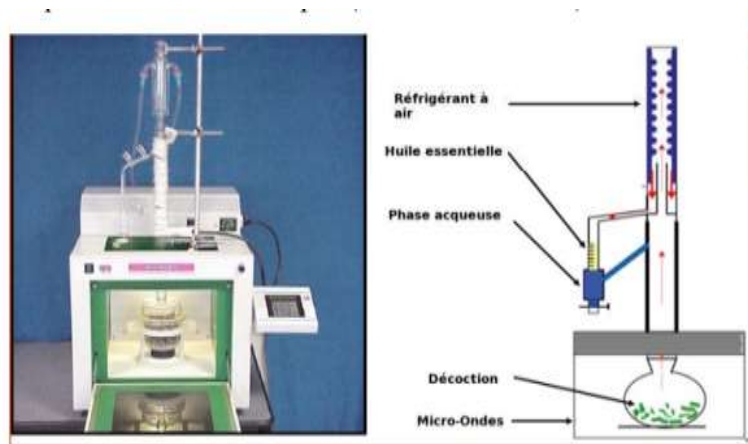


Figure 8. Illustration du mécanisme de l'extraction par micro-ondes (France Ida, 1996).

4.9. Extraction par ultrasons

Les micro-cavitations, générées par ultrasons, désorganisent la structure des parois végétales, notamment les zones cristallines celluliques. Les ultrasons favorisent la diffusion et peuvent modifier l'ordre de distillation, des constituants des huiles essentielles. L'extraction par les ultrasons est une technique de choix, pour les solvants de faible point d'ébullition, à des températures d'extraction inférieures au point d'ébullition. L'avantage essentiel de ce procédé est de réduire considérablement la durée d'extraction, d'augmenter le rendement en extrait et de faciliter l'extraction de molécules thermosensibles (figure 8) (Lagunez-Rivera, 2006).

4.10. Extraction au fluide supercritique

Procédé relativement nouveau semblait à priori intéressant pour augmenter le rendement dans le cas de plantes peu riches en huiles essentielles. Il utilise les fluides à l'état supercritique pour extraire les composants contenus dans les végétaux. En effet, dans des conditions particulières de température et de pression situées au-delà du point critique, les fluides à l'état supercritique acquièrent des propriétés importantes qui se caractérisent par une bonne diffusibilité dans les matières solides et un bon pouvoir solvant. C'est ainsi que plusieurs gaz sont actuellement utilisés industriellement, mais l'intérêt s'est porté tout particulièrement sur le dioxyde de carbone CO₂ car, celui-ci présente d'incontestables atouts : produit naturel, inerte chimiquement, inflammable, non toxique, facile à éliminer totalement, sélectif, aisément disponible et peu coûteux (Wichtl et Anton, 1999).

Chapitre II : Généralités sur les extraits des plantes

L'extraction au fluide supercritique consiste à comprimer le dioxyde de carbone à des pressions et à des températures au-delà de son point critique ($P=72.8$ bars et $T=31.1^{\circ}\text{C}$). Le fluide ainsi obtenu traverse le produit à traiter et le charge en composé à extraire ensuite, il est détendu et passe en phase gazeuse et finalement se sépare du composé extrait. L'extraction des huiles essentielles par le CO_2 supercritique fournit des huiles de très bonne qualité et en temps d'extraction relativement court par rapport aux méthodes classiques (Scheffer, 1996).

Précise aussi que cette méthode est utilisée maintenant pour préparer des extraits d'épices (gingembre, paprika, céleri), des arômes (thé noir, bois de chêne fumé) et des essences végétales pures (débarrassées des terpènes, dépourvues d'intérêts olfactifs et oxydables, ou privées de certains constituants) et que les produits obtenus par cette technique ont une composition proche de celle des produits naturels et ne comportent aucune trace résiduelle de solvant, contrairement à ce que l'on peut obtenir avec des solvants ordinaires (Bruneton, 1999).

En conclusion, il n'existe pas de procédé meilleur que d'autres. Chaque végétal, chaque partie du végétal, et l'utilisation du produit obtenu commandent la technologie à employer. Bien entendu, les aspects de rentabilité économique sont tout aussi importants (Collin, 2000).

5. Composition chimique des huiles essentielles

Ce sont des mélanges complexes et variables de différents composés chimiques dissous l'un dans l'autre formant des solutions homogènes. Ces constituants appartiennent quasi exclusivement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des *terpénoïdes* d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane d'autre part (Dorosso, 2002).

A- Terpènes et terpénoïdes

Dans le règne végétal, les *terpénoïdes* sont classés dans la catégorie des métabolites secondaires. Leur classification est basée sur le nombre de répétition de l'unité de base : isoprène ; Hémiterpène (C5), monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20). Ils représentent le groupe le plus important (Figure 9) (Brunton, 1999).

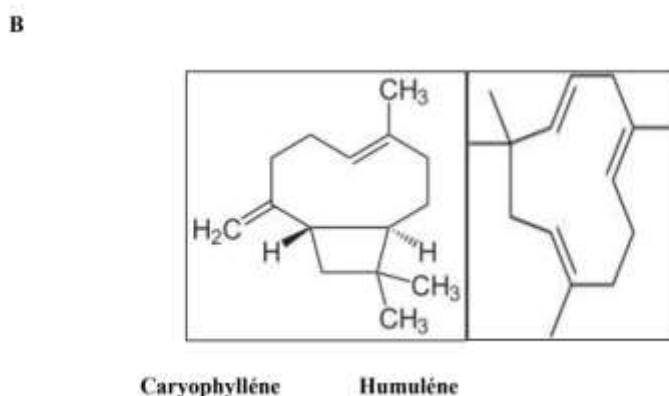
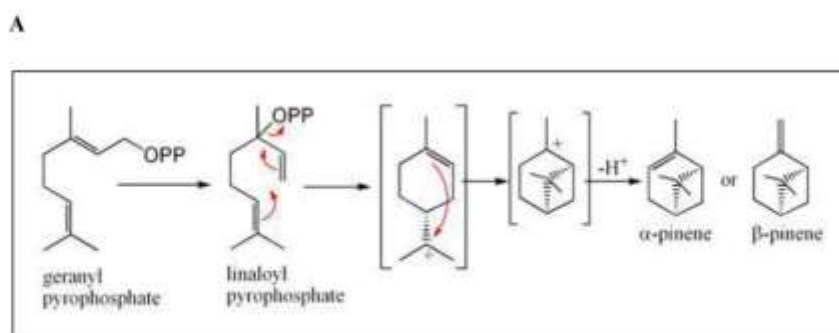
Chapitre II : Généralités sur les extraits des plantes

B - Monoterpènes

Plus de 900 monoterpènes connus se trouvent principalement dans 3 catégories structurales : les monoterpènes acycliques, monocycliques ou bicycliques. Ils constituent parfois plus de 90 % d'HE. Dans cette catégorie de composés, il existe de nombreuses molécules fonctionnalisées, à savoir, par exemple: Alcools: acyclique (géraniol, citronellol), monocycliques (menthol), bicycliques (bornéol). Aldéhydes : le plus souvent acycliques (géraniol, néral, citronellal). Cétones : acycliques (tagétone), monocyclique (menthone, isomenthone, carvone, pulégone), bicycliques (camphre, fenchone). Esters : acycliques (acétate ou propionate de linalyle, acétate de citronellyle), monocycliques (acétate de menthyle), bicycliques (acétate d'isobomyle) Ethers : 1,8-cinéole eucalyptol) mais aussi les éthers cycliques tétrahydrofuraniques ou di- et tétrahydropyraniques qui pour certains jouent un rôle majeur dans l'arôme des fruits (oxyde de linalol ou de rose). Peroxydes : ascaridole. Phénols : thymol, carvacrol (**Brunton, 1999**).

C - Sesquiterpènes

C'est la classe la plus diversifiée des terpènes puisqu'elle contient plus de 3000 molécules. Les variations structurales dans cette série sont de même nature que dans le cas précédent, carbures, alcools et cétones étant les plus fréquents (**Brunton, 1999**).



Chapitre II : Généralités sur les extraits des plantes

Figure 09. Structures des Composés terpéniques (A : monoterpènes, B : sesquiterpènes) (Bruneton, 1999).

D. Composés aromatiques

Contrairement aux dérivés terpéniques, les composés aromatiques sont moins fréquents dans les HE. Très souvent, il s'agit d'allyle et de propénylphénol. Ces composés aromatiques constituent un ensemble important car ils sont généralement responsables des caractères organoleptiques des HE. On peut citer en exemple l'eugénol qui est responsable de l'odeur du clou de girofle (Chouiteh, 2012).

E. Composés d'origine diverse

En générale, ils sont de faibles poids moléculaire, entraînés lors de l'hydrodistillation, sont des hydrocarbures aliphatiques à chaîne linéaire ou ramifiée porteurs de différentes fonctions par exemple : l'heptane et la paraffine dans l'essence de camomille (Brunton, 1999).

6. Caractérisation des huiles essentielles

6.1. Caractérisation organoleptique

Liquides à température ambiante, rarement visqueuse (*myrrhe*), certaines cristallisent partiellement ou totalement à plus faible température (*anis* : *anéthol* ; *menthe des champs* : *menthol* ; *thym saturéioïde*: *bornéol*). Les huiles essentielles sont volatiles et n'ont pas le toucher gras et onctueux, ce qui les différencie des huiles fixes (Kaloustian, 2012).

La plupart d'entre elles sont incolores ou jaune pâle lorsqu'elles viennent d'être préparées à l'exception des essences à azulènes qui sont bleues (ex : *camomille allemande*), de l'essence d'absinthe qui est verte, de celle de girofle qui est brune et de celle de wintergreen (*Gaulthérie couchée*) qui est rougeâtre. D'odeur agréable, aromatique. Pour la saveur, elle peut être douce, piquante, caractéristique, fruité, fraîche, e c t. (Haddad, 2016).

6.2. Caractérisation physique Pouvoir rotatoire

C'est une propriété des molécules chirales, celles-ci ont la propriété de dévier le vecteur d'un faisceau lumineux les traversant (Kaloustian, 2012).

Il est mesuré à l'aide d'un polarimètre. Les huiles essentielles sont le plus souvent optiquement actives. Densité relative : elle représente le rapport de la masse d'un volume de liquide (HE pour notre cas) par la masse du même volume d'eau. Elle est sans unité et varie en fonction de la température. La densité relative est mesurée par deux appareils : le

Chapitre II : Généralités sur les extraits des plantes

densimètre et le pycnomètre. La densité des HE est en général inférieure à celle de l'eau à l'exception des HES de sassafras, de cannelle et de girofle (**Brunton, 2004**).

Indice de réfraction : c'est une grandeur sans dimension, caractéristique d'un milieu, décrivant le comportement de la lumière dans celui-ci ; Il est mesuré couramment par le réfractomètre d'Abbe (**Kaloustian, 2012**).

La détermination de l'indice de réfraction pour une huile essentielle permet seulement de vérifier si elle est conforme aux normes établies (**Hadji-Minaglo, 2012**).

Les HES ont souvent un indice de réfraction élevé (1,45-1,56) (**Courtial, 2005**).

Solubilité des huiles essentielles

Dans l'eau : elles ne sont naturellement pas, ou très peu, solubles dans l'eau ; certains composants sont néanmoins plus solubles que d'autres (verbénone du romarin officinal, lavandulol de la lavande vraie) ; quelques-unes ont des constituants particulièrement solubles, ce qui entraîne, durant la distillation des écorces de cannelle, l'obtention habituelle d'émulsions (**Franchrome, 2001**).

Dans les huiles fixes elles sont totalement solubles dans les huiles grasses et dans l'éthanol une huile essentielle est dite miscible à V volumes et plus de l'éthanol de titre alcalimétrique déterminé à la température de 20°C, lorsque le mélange de 1 volume d'huile essentielle et de V volumes de cet éthanol est limpide, et le reste après addition graduelle d'éthanol de même titre jusqu'à un total de 20 volumes (**Chouiteh, 2012**).

Dans les solvants organiques : les HE s'y solubilisent très bien (**Franchrome, 2001**).

6.4. Caractérisation chromatographique

Différentes méthodes analytiques peuvent être utilisées, telles que la spectroscopie infrarouge, chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie en phase gazeuse (CPG), la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) qui est la méthode la mieux adaptée à l'analyse des huiles essentielles. (**Jammaledine, 2010**).

Chapitre II : Généralités sur les extraits des plantes

7. Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances puissantes et très actives. Elles représentent une source inépuisable de remèdes naturels. Néanmoins, il est important de souligner que l'automédication fréquente et abusive surtout en ce qui concerne le dosage ainsi que le mode d'application interne ou externe par les essences est nocive. Elle engendre des effets secondaires plus ou moins néfastes dans l'organisme (allergies, coma, épilepsie...etc.) Principalement chez les populations sensibles (enfants, femmes enceintes et allaitantes, personnes âgées ou allergiques) (**Hammoudi, 2015**).

L'accumulation des essences dans l'organisme par des prises répétées peut conduire à des nausées, des céphalées, ... L'ingestion de plus de 10 ml d'huile essentielle est neurotoxique et épiléptogène par inhibition de l'apport d'oxygène au niveau des tissus encéphaliques. Certains HEs sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau, en raison de leur pouvoir irritant (les huiles riches en *thymol*, ou en *carvacrol*), allergène (huiles riches en *cinnamaldéhyde*) ou photo-toxique (huiles de citrus contenant des *furocoumarines*). D'autres HEs ont un effet neurotoxique (les cétones comme l' α -thuyones sont toxiques pour les tissus nerveux) (**Mehani, 2015**).

En règle générale, les huiles essentielles ont une toxicité aiguë par voie orale faible ou très faible : une DL50 comprise entre 2 et 5 g/kg pour la majorité des huiles couramment utilisées : anis, eucalyptus, girofle ou le plus fréquemment supérieure à 5 g/kg (camomille, citronnelle, lavande, marjolaine, vétiver, etc.). D'autres ont une DL50 inférieure à 1g/kg : l'huile essentielle de boldo (0.13 g/kg, convulsions apparaissent dès 0.07 g/kg) ; l'essence de moutarde (0.34 g/kg) ; l'origan et la sarriette (1.37 g/kg) ; le basilic, l'estragon et l'hysope (1.5 ml/kg). Tandis que la toxicité chronique est assez mal connue, Reste à savoir que dans leur emploi externe, les risques de toxicité sont fortement réduits. Les huiles essentielles peuvent provoquer : agitation, tremblements généralisés, coma, hématurie, néphrite aiguë, ivresse, congestion cérébrale et pulmonaire, dépression du tonus sympathique, hallucination, spasmes musculaires etc. Dans certains cas, la neurotoxicose de quelques huiles peut nécessiter l'hospitalisation (tableau 06) (**Mehani, 2015**).

Chapitre II : Généralités sur les extraits des plantes

Tableau 06. Dose létale de quelque huile essentielle (Bruneton, 1999).

Plantes	Dosage
Anis, Eucalyptus, Girofle	2 à 5 g/kg
Camomille, Citronnelle, Lavande, Marjolaine	<5 g/kg
Basilic, Estragon, Hysope	1 à 2 g/kg
Origan	1,5ml/kg
Sassafras	1,9 g/kg
Wintergreen	0,9 à 1,25 g/kg

8. Les méthodes d'analyse des huiles essentielles

L'instrumentation moderne est progressivement confrontée à des analyses de plus en plus complexes, liées au nombre important de constituant présents et aux quantités extrêmement faibles à détecter. En effet l'analyse d'une huile est complexe, de par son très grand nombre de constituants chimiques volatils mais aussi, souvent, de par l'importance des composés à l'état de traces qui font le caractère spécifique de l'huile (France-Ida, 1998).

La chromatographie est le procédé fréquemment utilisé pour séparer les constituants des huiles essentielles. Elle se base sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leurs adsorptions et de leurs désorptions successives sur la phase stationnaire, soit de leurs solubilités différentes dans chaque phase (Schwedt, 1993). Plusieurs méthodes existent :

8.1. Chromatographie sur couche mince La CCM

Est utilisée comme technique de routine, pour l'analyse rapide de fractions obtenues à la suite d'une séparation initiale. L'efficacité de la CCM comme technique de séparation est souvent mise à profit dans la phase ultime de purification, au moins sur de faibles quantités, lorsque les autres techniques ont montré leurs limites (Pradeau, 2007).

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase

Chapitre II : Généralités sur les extraits des plantes

stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant (Caude, 1996).

Après la migration, le repérage des molécules s'effectue soit par ultra-violet (UV), soit par un colorant spécifique ou encore par exposition aux vapeurs d'iode. La distance de migration des composés est ensuite mesurée et comparée à celle du front de la phase mobile, ceci permet de définir la référence frontale R_f caractéristique de chaque composé. Précise que la technique du CCM, bien que beaucoup moins performante que la chromatographie en phase gazeuse, peut être utilisée en routine pour le contrôle de qualité des huiles essentielles (Bruneton, 1999).

8.2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Elle s'applique à des échantillons gazeux ou susceptibles d'être vaporisés sans décomposition dans l'injecteur. C'est de loin la technique la plus utilisée pour les huiles essentielles. La phase mobile est un gaz (hélium, azote, argon ou hydrogène), appelé gaz vecteur. Le principe de la chromatographie en phase gazeuse basé sur la séparation des différents solutés gazeux par migration différentielle le long de la phase stationnaire. Si la phase stationnaire est un liquide non ou peu volatil, possédant des propriétés de solvant vis-à-vis des composés à séparer, on parle de chromatographie gaz-liquide ou chromatographie de partage. Si la phase stationnaire est un solide absorbant (silice, alumine...), on parle de chromatographie gaz-solide ou chromatographie d'adsorption (Audigie et al, 1995).

La CPG permet une évaluation quantitative et qualitative de la composition chimique des huiles essentielles. Elle présente de nombreux avantages : facilité de mise en œuvre, temps d'analyse assez court et fiabilité des résultats (Bruneton, 1999).

8.3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/SM)

Si la chromatographie permet à elle seule de séparer correctement les différents constituants d'un mélange, il est néanmoins délicat de se livrer à une interprétation structurale permettant une identification certaine, car les paramètres déduits de la rétention sélective des solutés au travers de la colonne sont souvent lourds à manier et, dans la plupart des cas, peu reliés aux édifices moléculaires organiques. L'idée de coupler une autre méthode physique d'investigation après séparation chromatographique, dans le but d'ajouter à la chromatographie une deuxième dimension analytique, s'est concrétisée dès 1960 dans

Chapitre II : Généralités sur les extraits des plantes

la combinaison entre la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse CPG-SM (De Maack, 1994).

Le principe de cette méthode consiste à transférer par le gaz vecteur (phase mobile) les composés séparés par chromatographie en phase gazeuse dans le spectromètre de masse au niveau duquel, ils vont être fragmentés en ions de masse variables dont la séparation sera en fonction de leur masse. La comparaison informatique du spectre d'un pic inconnu avec une ou plusieurs bibliothèques de référence permet son identification à condition que la similitude des spectres, inconnus et référence, soit suffisante et que les indices de rétention soient identiques, dans des conditions opératoires comparables (Desjobert et al., 1997).

8.4. La chromatographie liquide à haute performance

La chromatographie liquide à haute performance utilise une phase stationnaire très fine. Les particules solides ont un diamètre pouvant atteindre jusqu'à 5 μm . Le garnissage est tassé dans une colonne fermée. La phase mobile liquide circule sous l'effet d'une haute pression. L'injection de l'échantillon à analyser est pratiquée en introduisant un faible volume de produit (quelques microlitres) dans l'éluant sous pression. Après leur séparation, les différents constituants de l'échantillon sont détectés en sortie de colonne. Un ordinateur assure l'acquisition et le traitement des données (Audigie et al., 1995).

Cette technique est peu intéressante pour les fractions volatiles, toutefois elle est efficace pour étudier les constituants non volatils des concrètes et des absolues ou pour opérer des préfractionnements, on peut la coupler également à un analyseur de masse (Bruneton, 1999).

8.5. La Résonance Magnétique Nucléaire RMN

La résonance magnétique nucléaire à haute résolution est un outil exceptionnel pour déterminer la structure d'une molécule naturelle ou synthétique. Grâce à la diversité des paramètres mesurables, elle permet d'aborder l'ensemble des problèmes posés par l'examen d'une molécule en solution. L'originalité de la RMN par rapport aux autres techniques spectroscopiques réside dans le fait d'apporter une information précise et individuelle sur la très grande majorité des atomes constitutifs de la molécule, de fournir la possibilité d'identifier les connexions entre atomes des diverses entités, squelette, groupes fonctionnels et finalement de permettre de les situer dans l'espace les uns par rapport aux autres. La stratégie présentée pour la détermination de structure par RMN est très efficace pour les

Chapitre II : Généralités sur les extraits des plantes

molécules de dimension moyenne. Les méthodes de base de la RMN monodimensionnelle et bidimensionnelle sont le plus souvent suffisantes pour atteindre l'objectif fixé (**Platzer, 2002**).

9. La conservation des huiles essentielles

En raison de l'instabilité et la sensibilité à la chaleur, à l'air ainsi qu'à la lumière des molécules constitutives des HE, des précautions particulières lors de leurs conservations sont recommandées. En effet, les conséquences de la dégradation sont nombreuses : photo isomérisation, hydrolyse, coupure oxydative, peroxydation, décomposition en cétones et alcool... Celles-ci peuvent modifier et /ou mettre en cause l'innocuité de l'HE. L'emploi de flaconnage en verre coloré et foncé (brun ou ambré), en aluminium ou en acier inoxydable, de faible volume, évite la détérioration de l'HE par l'oxygène et la lumière (**Dorosso, 2002**).

Le flacon doit être pourvu d'un bouchon vissé et bien scellé pour éviter l'évaporation. L'emploi de petites billes en verre à la surface de l'HE réduit l'action oxydante de l'air.

Le stockage doit se faire dans un endroit sec (à l'abri de toute trace d'humidité), frais (loin des sources de chaleur), dépourvu de la lumière, même artificielle et à l'abri du froid. La durée de conservation d'une HE, si on a respecté les bonnes conditions de stockage, est environ 3 ans. Les essences d'agrumes font exception, ils ne peuvent se conserver que pendant 6 mois (**Courtial, 2005**).

10. Principales utilisations des huiles essentielles

Elles trouvent des emplois dans de nombreux secteurs

10.1. En pharmacie

A- Huiles essentielles inscrites à la pharmacopée

C'est un recueil de normes officielles obligatoires qui utilise des méthodes analytiques performantes, permettant d'assurer l'identité, de vérifier la pureté, de doser la concentration en constituants actifs et d'étudier la stabilité de la drogue (**Wichtl et al., 1999**).

Citons par exemple le cas du cinéol ; terpène présent dans le « tee trée oïl » ou huile de *Melaleuca*. Son pourcentage ne doit pas dépasser 15% au risque d'être irritant pour la peau et les muqueuses (**Wichtl et al., 1999**).

Chapitre II : Généralités sur les extraits des plantes

B-Utilisation pharmacologique

Leurs propriétés pharmacologiques leur confèrent une utilisation médicinale les huiles essentielles ont en effet.

B.1. Un pouvoir antiseptique

Contre des bactéries variées ainsi que des champignons et levures. Citons les huiles essentielles de thym, girofle, lavande, eucalyptus. Le thymol, constituant principal de l'huile essentielle de thym, est 20 fois plus antiseptique que le phénol (**Bruneton, 1993**).

L'huile essentielle de *Melaleuca* a prouvé cliniquement son action antiseptique, antimicrobienne et antioxydant (**Saller et al, 1998**).

B.2. Des propriétés spasmolytiques et sédatives

Certaines drogues à huiles essentielles (menthe, verveine) sont réputée efficaces pour diminuer les spasmes gastro-intestinaux. L'amélioration de certaines insomnies et de troubles psychosomatiques divers est également notée (**Bruneton, 1993**).

10.2. En parfumerie

C'est le principal débouché des huiles essentielles .la cosmétologie et le secteur des produits d'hygiène sont aussi consommateurs, même si le cout élevé des produits naturels conduit à privilégier parfois les produits synthétiques (**Bruneton, 1993**). Elles sont intégrées dans des analgésiques pour la peau, les produits solaires ainsi que de nombreux produit d'ambiance comme les liquides pour pots-pourris (**Rumbeih, 1995**).

A. Dans les industries agro-alimentaires

Certaines drogues sont utilisées en nature (épice et aromate), d'autre sous forme D'huiles essentielles ou de rétinéoïde dispersés, encapsulés ou complexé (**Saller et al., 1998**).

Si la réfrigération et d'autre moyens de conservation se sont substitué aux épices pour assure la conservation des aliments, le développement de nouvelles pratiques culinaires, le gout pour l'exotisme et les qualités gustatives, conduisent à une rapide augmentation de la consommation de type de produit. On note leur intégration dans : les boissons non alcooliques, les confiseries, les produits laitiers ou carnés, les soupes, les sauces, les boulangeries, ainsi que la nutrition animale (**Bruneton, 1993**).

Chapitre II : Généralités sur les extraits des plantes

B. Dans diverses industries

Ce sont surtout des industries chimiques qui utilisent des isolats (substances pures isolées des huiles essentielles comme matières premières pour la synthèse de principes actifs médicamenteux, de vitamines, de substances odorantes, etc....) (**Bruneton, 1993**). Malheureusement, aucune étude scientifique ne donne pour le moment les concentrations minimales à respecter pour une bonne efficacité sans effets secondaires. La plupart des produits cosmétiques contiennent 3% à 10% d'huile, ce qui apparaît généralement suffisant pour un effet thérapeutique (**Meddour et al, 2013**).

11- Contrôle des huiles essentielles

Les pharmacopées prévoient différents essais : évaluation de la miscibilité à l'éthanol, détermination des indices d'acide, d'ester, de carbonyle, éventuellement la recherche des huiles grasses et des huiles essentielles résinifier, détermination du résidu d'évaporation et autre ; elles prévoient aussi des mesures physiques comme l'indice de réfraction, l'angle de rotation optique, la densité relative, parfois le point de solidification. Elles demandent également une analyse de l'huile essentielle par une technique chromatographique (**Eloukili, 2013**).

12. Extraction éthanolique

12.1. Définition

L'extraction de principes actifs à haute valeur ajoutée à partir de la matière végétale, notamment le cas des polyphénols, qui suscitent actuellement beaucoup d'intérêt grâce à leur pouvoir antioxydant, est une étape très importante dans l'isolement aussi bien que dans l'identification des composés phénoliques. En conséquence, beaucoup d'auteurs ont étudié l'influence de différentes conditions d'extraction sur les rendements d'extraction de composés phénoliques de source végétale (**Salacs, 2012**).

L'extraction à l'éthanol est un procédé utilisé dans la distillation des liqueurs fines. Cela se fait en trempant du cannabis brut dans de l'éthanol pour en extraire un solvant et le cannabis est ensuite retiré. Le processus d'extraction à l'éthanol est utilisé pour filtrer la teneur en alcool du matériau extrait. Les systèmes d'extraction du Colorado vous permettent d'effectuer des extractions de liqueur à base de plantes et d'utiliser le processus de distillation à la vapeur pour extraire l'éthanol. L'éthanol chaud augmente le taux de solvabilité et

Chapitre II : Généralités sur les extraits des plantes

améliore le processus d'extraction. Ceci est possible grâce aux systèmes d'extraction simplifiés pour répondre à vos exigences industrielles (**Joe Mancuso, 2021**).

La solubilité des composés phénoliques dépend de leur nature chimique dans la plante, qui varie de composés simples à fortement polymérisés. Les matières végétales peuvent contenir des quantités variables d'acides phénoliques, phénylpropanoïdes, anthocyanines, et tanins (**Garcia-salas et al., 2010**).

Cette diversité structurale est responsable de la grande variabilité des propriétés physico-chimiques influençant l'extraction des polyphénols (**Koffi et al., 2010**).

Entre autres, la solubilité des composés phénoliques est affectée par la polarité du solvant utilisé. Par conséquent, il est très difficile de développer un procédé d'extraction approprié à l'extraction de tous les composés phénoliques de la plante (**Jokié et al, 2010**).

12.2. Généralités biochimiques

Les composés phénoliques sont des molécules qui appartiennent au métabolisme secondaire des plantes. Les polyphénols constituent un groupe important de métabolites secondaires, environ 10.000 composés ont été caractérisés jusqu'à aujourd'hui. La plupart des molécules phénoliques sont formées à partir de deux acides aminés aromatiques la tyrosine et surtout la phénylalanine. Ces acides aminés sont formés de façon variable suivant les végétaux (**Guignard, 2000**).

Les polyphénols sont des molécules très diversifiées, constituées d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles, Les formes les plus simples sont représentées par deux principaux groupes qui dérivent de nombreux composés : les acides hydroxy cinnamiques et les flavonoïdes, ces derniers sont des composés en C6-C3- C6, qui renferment plusieurs milliers de molécules pouvant être regroupées en plus de dix classes, induisant une nomenclature complexe. Ils sont issus du para-coumaroyl CoA et de 3 molécules de malonyl-CoA qui forment l'hydroxychalcone comprenant 2 noyaux benzéniques (**Macheix et al., 2005**).

12.3. Localisation et rôle dans les plantes

A niveau de la cellule, les composés phénoliques sont principalement répartis dans deux compartiments : les vacuoles et la paroi. Dans les vacuoles, les polyphénols sont conjugués, avec des sucres ou des acides organiques, ce qui permet d'augmenter leur solubilité et de limiter leur toxicité pour la cellule (**Cheynier, 2006**).

Chapitre II : Généralités sur les extraits des plantes

Au niveau de la paroi, on trouve surtout de la lignine et des flavonoïdes liés aux structures pariétales. Les composés phénoliques sont synthétisés dans le cytosol. Une partie des enzymes impliquées dans la biosynthèse des phénylpropanoïdes est liée aux membranes du réticulum endoplasmique, où elles sont organisées en métabolons (**Macheix et al., 2005**).

D'autres organites du cytoplasme, comme des vésicules golgiennes ou des chloroplastes, peuvent participer à la biosynthèse des composés phénoliques mais ce ne sont pas des lieux d'accumulation (**Macheix et al., 2005**).

Au sein même des feuilles la répartition des composés est variable, par exemple les anthocyanes et les flavonoïdes sont majoritairement présents dans l'épiderme (**Cheyrier, 2006**).

Les composés phénoliques interviennent dans un grand nombre de processus physiologiques chez la plante et dans les interactions avec leur environnement, leur structure leur conférant des fonctions très spécifiques (**Desjardin, 2008**).

Par ailleurs, les composés phénoliques peuvent avoir un rôle de signal (**Treutter, 2006**). Des flavonoïdes permettent par exemple la mise en place de la symbiose entre des fabacées et des bactéries, ce qui permet à ces plantes de fixer directement l'azote atmosphérique. Ils participent aux phénomènes de pollinisation puisqu'ils sont responsables de la coloration des fleurs (**Macheix et al., 2005**).

De plus, les flavonoïdes ont un rôle de filtre contre le rayonnement UV, ce qui explique leur localisation dans les tissus externes (**Gould, 2006**). Enfin, les flavonoïdes comme les dérivées hydroxy cinnamiques jouent un rôle important dans la résistance des plantes aux stress environnementaux (**Walton, 1999**).

12.4. Classification des composés phénoliques :

D'après (**Harbone, 1994**), les polyphénols sont classés en fonction de leur squelette carbonée en quatre principales classes (Tableau 1), de même qu'ils peuvent être classés en trois groupes selon leurs répartitions :

- Les composés phénoliques largement ré pondus.
- Les composés phénoliques peu ré pondus (exemple : le cathécol et l'acide caféique).
- Les composés phénoliques présents dans la nature sous forme de polymères.

Chapitre II : Généralités sur les extraits des plantes

Tableau 7. Classification des polyphénols selon le nombre d'atomes de carbone (Harbone, 1994).

Nombre de carbone	Squelette de base	Classe	Exemple
6	C6	Phénols simples Benzoquinones	Catéchol
7	C6-C1	Acides phénoliques	p-Hydroxybenzoïque Salicylique
8	C6-C2	Acétophénone Phénylacétiques acides	p- hydroxyphénylacétique
9	C6-C3	Acides hydroxy- cinnamique Phényle propènes coumarique Isocoumarique Chromone	Caféique, férulique Eugénol
10	C6-C4	Nafthoguinone	Plumbagin
13	C6-C1-C6	Xanthone	Mangiférine
14	C6-C2-C6	Stilbènes ; Anthraquinones	Acide coumarique
18	(C6-C3) ₂	Ligans	Podophyllotoxine
30	(C6-C3-C6) ₂	Biflavonoid	Amentoflavone
N	(C6-C3) n ; (C6) n ; (C6-C3-C6) n	Lignines ; Catécholmélanine Flavolans (Tanins condensés)	

Chapitre II : Généralités sur les extraits des plantes

A. Composés phénoliques largement répondus

A.1. Flavonoïdes

Comme le laisse supposer, sa dénomination historique (du latin ; flavus = jaune). Ce groupe est très important et très étendus et comprend des composés de couleur jaune. Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques présents dans les végétaux et plus de 4000 différents types de flavonoïdes ont été décrits (**Hollman, 1997**).

D'après (**Shahidi, 1995**), les flavonoïdes appartiennent aux groupes des phénols qui ont un squelette de base diphenyle-propane (C6-C3-C6). Avec différents niveaux d'oxydation au centre du cycle pyrane, et la plupart des flavonoïdes se trouvent sous forme d'aglycones liés à des glucosides. Ces constituants glycosidiques sont fixés aux groupes hydroxyyles du cycle A et plus fréquemment a la position 3 de l'hétérocycle (**Richter, 1993**). Parmi les flavonoïdes présentant le plus intérêt, nous citerons :

A.2. Les anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments, qui par suite de leur ionisation, présentent des couleurs différentes pour divers pH, de rouge orange en milieu acide au bleu mauve en milieu alcalin ; et dans certain cas forment des complexes avec les métaux (**Richter, 1993**).

Les anthocyanes se trouvent dans la plupart des espèces de plantes et plus de 200 anthocyanes différents ont été identifiés dans les plantes environ 70 dans les fruits (**Aissani, 1998**).

La plupart des anthocyanes sont des produits comme monoglycosides et diglycosides de pelargonidine, cyanidine, malvidine et peonidine (**Shahidi, 1995**). Les anthocyanes dérivent du phenyl-2-benzopyrylium ou flavylium et le cation pyrilium est un ion oxonium dans lequel l'atome d'oxygène tétravalent est chargé positivement ressemblants à une structure qui rappelle celle de l'azote dans les ions ammoniums et dans le cas du pyrilium ; alors que le caractère aromatique est dû à la présence de doubles liaisons conjuguées responsables de la stabilité de la molécule, ils sont présents dans la nature sous forme hétérosidiques ou anthocyanidines, cependant le nombre d'aglycones, ou l'anthocyanidines est assez limité (**Ribereau et al., 1968**).

Chapitre II : Généralités sur les extraits des plantes

A.3. Flavones et flavonoles

En générale les flavonoles de teinte jaune sont caractérisés par la présence d'un groupement carbonyle en position 4 et d'un groupement glucidique est le plus souvent relié en position 7. Parmi les flavonoles les plus répandus, on trouve essentiellement le quercétol et le myricétol. Les flavones proprement dites ont un rôle moins important que le flavonoles, et les flavones se trouvent dans les plantes sous forme O-glucoside. La seule différence entre les flavones et les flavonoles est la présence de groupe hydroxyle en C3 dans les flavonoles qui peut être considéré comme trois hydroxy flavonole (**Hertog et al., 1992**).

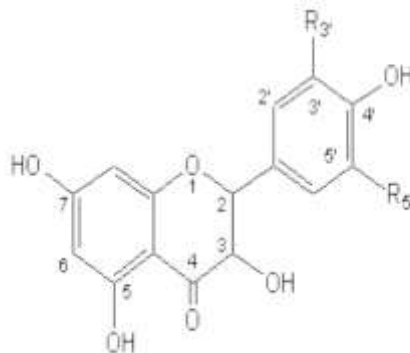


Figure 10, Structure de base des flavonoïdes (**Aissani, 1998**).

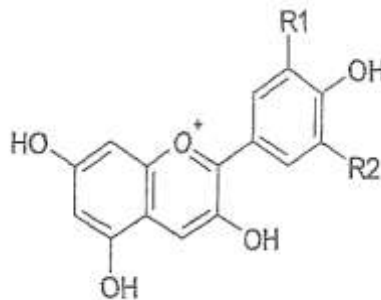


Figure 11, Structure de base des anthocyanes (**Aissani, 1998**).

12.5. Les rôles des composés phénoliques

A. Rôle nutritionnel et thérapeutique

Les polyphénols sont probablement les composés naturels les plus répandus dans la nature et de ce fait, sont des éléments qui font partie de l'alimentation animale. A titre d'exemple, l'homme consomme jusqu'à 10g de ces composés par jour. (**Rock, 2003**).

Chapitre II : Généralités sur les extraits des plantes

Un très grand nombre de données expérimentales plaide aujourd'hui en faveur d'implication des polyphénols dans la prévention des maladies dégénératives telles que les cancers, les maladies cardio-vasculaires, ostéoporoses et/ou les maladies inflammatoires (Rock, 2003).

B. Rôle physiologique

Des travaux très anciens ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaires, différenciation, organogenèse, dormance des bourgeons, floraison et tubérisation.

Les flavonoïdes sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles, ils sont universellement présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques de feuilles, ils sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs des rayonnements UV (Alibert et al., 1977).

C. Rôle technologique :

Généralement, les polyphénols sont partiellement responsables des qualités sensorielles et alimentaires des aliments végétaux. L'astringence et l'amertume des nourritures et des boissons dépendent de la teneur en polyphénols (Lugasi et al., 2003).

12.6. Mode d'action des polyphénols

L'action des polyphénols sur les cellules des microorganismes est basée sur une multiplicité d'influences individuelles. Celles-ci n'incluent pas seulement un mécanisme physique et physico-chimique mais aussi une réaction biochimique. Globalement, l'action antimicrobienne peut être expliquée par les étapes suivantes :

Influence sur les parois cellulaires, Influence sur l'ADN, Influence sur synthèse des protéines, Influence sur l'activité des enzymes. Les polyphénols considérés comme des substances lipophiles agissent sur la cellule en perforant la membrane cellulaire. Cette perforation augmente le flux des protons vers l'intérieur de la cellule ce qui accroît le besoin en énergie (Luck et al., 1995).

Les différences dans le contenu des lipides de la paroi cellulaire expliquent la différence du degré de l'activité inhibitrice entre les bactéries gram négatif et gram positif ou ce degré est plus élevé. Les dérivés de l'acide benzoïque sont les plus efficaces principalement contre les levures et moisissures. L'activité antimicrobienne exige une certaine solubilité dans l'eau

Chapitre II : Généralités sur les extraits des plantes

et dans les lipides. La croissance des microorganismes n'est pas possible que dans une phase aqueuse uniquement et la substance antimicrobienne doit être hydrosoluble afin de traverser la paroi de la cellule (**Luck et al., 1995**).

12.7. Extraction des polyphénols

L'extraction des principes actifs de la plante peut se faire par deux différents procédés :

A. Extraction à froid ou macération

La macération consiste à laisser la poudre de la matrice végétale en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs. C'est une extraction qui a l'avantage de préserver les substances thermosensibles, elle se déroule en 3 étapes : macération, filtration et concentration au rotavapeur (**Cowan, 1999**).

B. Extraction à chaud

La décantation consiste à porter le mélange poudre solvant à ébullition au bain marie. Ce procédé présente l'avantage d'en extraire le maximum de principes actifs, mais les molécules thermolabiles risquent de se détériorer à cause de la chaleur. Cette technique se passe en ces étapes : ébullition, filtration et centrifugation (**Chavane et al., 2001**).

12.8. Polyphénols et santé

Beaucoup d'études ont mis en avant les avantages potentiels des polyphénols pour la santé.

Des études épidémiologiques suggèrent que la consommation à long terme d'aliments riches en polyphénols, offrirait une protection pour limiter le développement de cancers, maladies cardiovasculaires, du diabète, des inflammations et d'autres pathologies. Ils agiraient en tant qu'antioxydants et ainsi protégeraient les cellules contre les dommages causés par les radicaux libres, qui contribuent aux lésions des tissus dans le corps. Diverses études mettent en avant le fait que la peau mettrait plus de temps à avoir un coup de soleil, en consommant des polyphénols, suite à une exposition UVs (**Cowan, 1999**).

Les polyphénols ont également montré des effets protecteurs dans d'autres pathologies, telle que la sclérose en plaque (**Gonzalez-Gallego et al., 2010**), l'ostéoporose (**Scalbert et al., 2005**), et les pathologies liées au vieillissement cérébral

Chapitre II : Généralités sur les extraits des plantes

(maladie d'Alzheimer, autres types de démences, maladie de Parkinson...) (**Spencer, 2010**).

12.9. Polyphénols et maladies infectieuses

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (**Cowan, 1999**).

Chapitre III : Activité antibactérienne des extraits

1. Introduction

L'organisme humain, constamment exposé à une multitude de microbes (bactéries, virus, parasites, champignons microscopique), possède un système complexe de défense qui lui permet de rencontrer ou d'héberger ces microbes sans leur permettre d'envahir ses tissus. Cependant, dans certaines conditions, l'infection peut entraîner une maladie infectieuse grave. Pour lutter contre ces infections, de nombreux programmes ont été conduits pour découvrir et développer de nombreux agents antimicrobiens d'origine biologique (**Fekih, 2015**).

Un agent antimicrobien, est un agent qui tue les micro-organismes ou inhibe leur croissance. Celui qui les tue et appelé « microbicide » et celui qui inhibe seulement leur croissance est appelé « antibiotique » (**Drouet, 2018**).

Un micro-organisme est un organisme vivant microscopique (1 à 2 micromètres), unicellulaire, il peut être une bactérie, un virus, champignon microscopique (micromycète). La plupart de ces microbes sont sans danger et beaucoup sont bénéfiques, voir indispensables « flore microbienne » (**Chabasse et al, 2007**).

2. Bactéries

2.1. Définition

Les bactéries sont des micro-organismes, unicellulaires et procaryotes présents dans tous les milieux. (**Fekih, 2015**).

Une infime minorité des bactéries est pathogène, l'immense majorité est bénéfique et indispensable aux processus biologiques. Ainsi, les bactéries participent à des nombreux cycles, comme le cycle de l'azote. Elles vivent en symbiose ou en parfaite harmonie avec leurs hôtes. En tenant le seul exemple de l'homme, il présente une flore normale estimée à 10¹⁴, soit cent mille milliards. (**Perron, 2010**).

Elles mesurent environ 1 micromètre et sont donc invisibles à l'œil nu. Au microscope optique, elles peuvent être observées soit à l'état frais ou après coloration de gram. La coloration de gram permet de distinguer deux groupes de bactéries : les bactéries à gram positif (colorées en violet) et les bactéries à gram négatif (colorées en rose). Cette distinction de la réponse à la coloration est due à la différence qui existe dans la composition des parois bactérienne (**Fekih, 2015**).

2.2. Bactéries à Gram négatif

2.2.1. Le genre *Escherichia coli*

Ce genre appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Les *entérobactéries* sont les hôtes du tube digestif de l'homme et des animaux, mais aussi de nombreuses souches de cette famille ont été isolées de colibacille l'environnement aquatique ou terrestre. Les bactéries de cette famille se cultivent facilement sur milieux ordinaires et utilisent une très large variété de composés organiques simples comme source d'énergie : sucres, acides aminés, acides organiques (Messai, 2004).

La plupart des *entérobactéries* pathogènes se multiplient à la température optimale de 37°C. Ce genre comprend cinq (5) espèces, mais *E. coli* (*Escherichia coli*) est la plus importante. *Escherichia coli*, appelée aussi, est une bactérie, présente de façon naturelle dans le tube digestif de l'être humain et de nombreux animaux (Messai, 2004).

Elle est en temps normal non pathogène, c'est-à-dire non responsable d'infection, mais peut le devenir dans certaines conditions. Dans la plupart des cas, certaines souches entraînent des troubles intestinaux à type de diarrhées, mais *E. coli* peut aussi coloniser d'autres organes, notamment les voies urinaires chez la femme, à l'origine de la plus grande partie des cystites par passage des bactéries des selles émises au niveau de l'anus vers le périnée et les organes génitaux. *Escherichia coli* est habituellement bien sensible aux antibiotiques, qui guérissent l'infection sans séquelle. Plus rarement, des infections généralisées ou des méningites sont également possibles (figure 12) (Messai, 2004).



Figure 12. *E. coli* au microscope électronique × 15000 (Messai, 2004).

Chapitre III : Activité antibactérienne des extraits

Tableau 8. *E.coli* testées pendant l'évaluation des activités antimicrobiennes (Hammoudi, 2015).

Substance bactérienne	Espèces	Références	Habitat préférentiel	Pouvoir pathogène
Bactérie à Gram -	<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922	Matières fécales Aliments contaminés Eaux usées	Infections urinaires Plaies Septicémies Infections respiratoires infections alimentaires, nosocomiales Gastroentérite,

2.3. Bactéries à Gram positif

Les bactéries Gram positif protègent leur membrane avec une paroi épaisse, le composant majeur de la paroi est polymère complexe de sucres et d'acides aminés, appel muréine ou peptidoglycane .la muréine est un composant essentiel qui donne à la bactérie sa forme et sa rigidité que ce soit chez les bactéries Gram positif ou chez la bactérie Gram négatif. (Messai, 2004).

2.3.1. Les *Staphylococcus aureus*

Les *staphylocoques* sont des bactéries à Gram positif, de forme sphérique et se divisent sur plusieurs plans pour former des amas réguliers ou irréguliers à la leur nom (*staphylos tiré du grec*).

Ce sont des germes ubiquistes largement distribués dans l'environnement naturel de l'homme (air, eau et sol,) et en plus forte densité sur les surfaces cutano-muqueuses des mammifères. *S. aureus* est une bactérie impliquée dans des pathologies variées, les *Staphylocoques* sont souvent responsables d'infections contractées dans les hôpitaux le traitement est difficile car de nombreuses souches sont résistantes aux antibiotiques. Selon les services hospitaliers 20 à 50% des souches seraient en effet désormais multi résistantes (Thomas, 2011).

Chapitre III : Activité antibactérienne des extraits



Figure 13. *S. aureus* sur gélose de Chapman (Aryal, 2020).

Tableau 9. Les souches testées (Gram +) pendant l'évaluation des activités antimicrobiennes (Hammoudi, 2015).

Substance bactérienne	Espèces	Références	Habitat préférentiel	Pouvoir pathogène
Bactérie à Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC25923	Peau, cheveux Nasopharynx Périnée Poussières, air Aliments contaminés	Infections cutanées, plaies, brûlures, abcès Ostéites, ostéomyélites Endocardites Septicémies Infections pulmonaires infections alimentaires, nosocomiales

2.3.2. *Listeria monocytogène*

A. Taxonomie du genre *Listeria*

Listeria est un petit bacille à Gram positif qui a longtemps été considéré comme une bactérie corynéforme ; il est actuellement admis que les bactéries de ce genre appartiennent à la branche phylogénétique des *Clostridium*, voisin des genres *Brochothrix*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* et *Bacillus* (Avril, 2000).

Actuellement 6 espèces sont reconnues dans ce genre, en plus de *Listeria monocytogenes*. *Listeria grayi* : découverte en 1966 par Larsen et Seeliger à partir d'une coproculture chez un chinchilla ; cette souche se caractérise par la fermentation du mannitol (Rocourt et al., 2003).

Listeria innocua : qui a été découverte en 1981 par Seeliger à partir de l'environnement et de l'intestin de l'homme et des animaux ; cette souche est non hémolytique montrant qu'il s'agit d'un germe non pathogène (Rocourt, 1999), et *Listeria Seeligeri* et *Listeria welshimeri* qui ont été mises en évidence en 1982, lors des hybridations ADN / ADN (Rocourt, 1999).

B. Caractéristiques morphologiques

Les cellules de *Listeria* sont des bâtonnets Gram+ courts et réguliers, de 0,4-0,5 µm de diamètre et 0,5-2 µm de longueur, avec des extrémités arrondies. Quelques cellules peuvent être incurvées. La longueur de la cellule n'est pas corrélée avec la cinétique de croissance (Zaika, 2003).

Les cellules sont isolées ou regroupées en courtes chaînettes. Bien qu'une capsule a été observée dans des conditions particulières de culture, certains microbiologistes pensent que *L. monocytogenes* devrait être considérée comme une espèce bactérienne non capsulée. La bactérie ne forme pas de spores. Elle est mobile quand elle est cultivée à 20-25°C grâce à la présence des flagelles péritriches, et immobile ou faiblement mobile à 37°C (Fanelli, 2003).

B.1. Caractères biochimiques

La caractérisation biochimique de *L. monocytogenes* fait appel aux méthodes classiques d'identification bactérienne : catalase+, oxydase-, β-hémolyse sur gélose au sang, D-xylose-, D-mannitol-, L-rhamnose+, Citrate-, α-méthyl-D-mannoside+. Cette bactérie est privée de nitrate réductase, elle fermente le glucose sans production de gaz, elle hydrolyse l'esculine, elle ne produit pas d'indole, ni de H₂S. Elle est uréase- et non protéolytique (gélatine-),

Chapitre III : Activité antibactérienne des extraits

phosphatase alcaline+. L'arabinose, le lactose, le mélézitose, le saccharose et la dextrine sont tardivement fermentés ou négatifs. Le xylose, raffinose, inositol, dulcitol, mannitol, adonitol ne sont pas fermentés. *Listeria* donne des résultats positifs en présence de rouge de méthyle et au test Voges Proskauer. Le catabolisme du glucose emprunte la voie d'Embden-Meyrhopf. En anaérobiose, le produit terminal est l'acide lactique ; en aérobiose, apparaissent le pyruvate, l'acétoïne, l'acide lactique (**Rocourt, 2000**).

B.2. Caractères culturels

Listeria est aérobie microaérophile. Les cultures sont plus abondantes sous une tension réduite en oxygène (O₂) (**Doyle, 1988**) et anaérobie facultative. Elle est mésophile mais avec un comportement souvent psychrotrophe (**Djenane et al., 2006**).

Les colonies de *Listeria* (24- 48 h) sur gélose nutritive ont un diamètre de 0,5-1,5 mm ; elles sont arrondies, translucides en goutte de rosée, faiblement convexes à marge entière. Les colonies paraissent grises bleutées par illumination normale et bleu vert par illumination oblique. Les colonies, parfois gluante, s'émulsifient facilement et peuvent laisser une trace de gélose. Les cultures plus âgées (3-7 jours) sont plus larges (3-5 mm de diamètre) avec un centre plus opaque et des formes "rough" peuvent apparaître. Quelques espèces sont β-hémolytiques sur gélose au sang *Listeria*, en gélose molle dans un tube, inoculée par piqûre centrale et incubée à 20°C, a une croissance visible sur toute la hauteur du tube, avec un trouble plus intense à quelques millimètres au-dessous de la surface du milieu ; la mobilité se traduit par une image en parapluie caractéristique (**Larpen, 2004**).

C. *Listeria monocytogenes* et les produits alimentaires

Dans le domaine de l'agroalimentaire, il faut savoir que la contamination des produits est souvent très aléatoire. *Listeria* est un germe ubiquitaire, ce qui explique que la contamination d'un produit puisse intervenir à tous les stades de sa fabrication, de son conditionnement, au "stockage", à la commercialisation et même dans l'assiette du consommateur. Par leur origine et leur composition, certains aliments sont plus susceptibles que d'autres de contenir des *Listeria* (**Maciel et al., 2008**).

Lors des principales épidémies survenues dans plusieurs pays, rapportées dans la littérature, des produits laitiers, des produits de charcuterie ou carnés, des produits de la mer et des produits végétaux ont été mis en cause. Les *Listeria*, comme l'immense majorité

Chapitre III : Activité antibactérienne des extraits

des bactéries dans la nature, ne sont pas en suspension dans des liquides, mais adhérentes à des supports où elles forment des biofilms (Chae et al., 2006).

Ces structures où cohabitent généralement plusieurs genres bactériens, modifient la physiologie bactérienne, favorisent les échanges du matériel génétique, améliorent la survie des bactéries face aux stress, et augmentent les possibilités de contamination des aliments. L'altération microbienne des denrées alimentaires est synonyme d'un développement microbien croissant responsable de mise hors consommation du produit à cause des changements sensoriels (couleur, odeur et texture). La pathogénie ou virulence sont définies comme un développement d'un nombre suffisant de *L. monocytogenes*, d'une manière que l'ingestion du produit peut engendrer des effets pathologiques. Les denrées alimentaires destinés à être consommés directement sans subir une cuisson ou une autre transformation efficace, pour éliminer ou ramener à un niveau acceptable les micro-organismes dangereux, sont les plus incriminés dans les différents cas de listériose (Gibbons et al., 2006).

C.1. Lait et produits laitiers

Les contaminations par le germe *L. monocytogenes* et les pratiques à risque concernant l'industrie laitière ont été décrites (Aygun et al., 2006). Selon le type de production, l'incidence de *L. monocytogenes* est plus ou moins importante et cette industrie serait particulièrement touchée du fait des procédés et des conditions de fabrication, en particulier de l'humidité ambiante, favorables à la survie et à la croissance des *L. monocytogenes*. Il serait néanmoins nécessaire de signaler que le lait cru possède son propre pouvoir de défense (Système lactoperoxydase antimicrobien) contre les envahisseurs microbiens.

L. monocytogenes peut être isolée à partir des fromages à pâte molle ou semi molle, à pâte persillée, à pâte pressée ou à pâte fraîche (Millet et al., 2006).

Le comportement des *L. monocytogenes* est très variable selon les fromages (Larpent, 1997).

C'est essentiellement la technologie de fabrication fromagère qui conditionne ce comportement, compte tenu du chauffage du lait ou du caillé d'une part, et des conditions d'affinage d'autre part (durée, évolution du pH et de la température, teneur en sel et activité de l'eau). Le pH acide atteint en fin de fabrication du yaourt grâce à la fermentation lactique maîtrisée permet d'inhiber la croissance voire détruire *L. monocytogenes*. Par ailleurs, *L.*

Chapitre III : Activité antibactérienne des extraits

monocytogenes se développe très bien dans les mélanges pour glaces, mais sa croissance est inhibée à -18°C (**Palumbo, 1991**).

C.2. Viandes et produits carnés

Une augmentation constante de contaminations par *Listeria* chez les animaux de boucherie ainsi que chez les volailles a été constatée. Les risques de contamination sont augmentés avec les ensilages peu acidifiés (**Davies et al., 1998**).

Ces porteurs de germes peuvent facilement contaminer les carcasses et l'environnement au cours des opérations d'abattage et de transformation des viandes, ce qui explique que des *Listeria* soient souvent retrouvées dans les viandes issues de différentes espèces (**Nicolas, 1993**).

Il a été démontré, que lors de la découpe primaire des carcasses appartenant à différentes espèces zootechniques, les couteaux, les tapis, les tables, et autres machines sont fréquemment à l'origine de la contamination par *L. monocytogenes*. L'examen bactériologique de la contamination des surfaces démontre clairement l'origine environnementale de ces *L. monocytogenes* (**Maciel et al., 2008**).

L. monocytogenes peut être utilisée comme germe indicateur des conditions d'hygiène dans l'abattage dans le cadre d'un programme HACCP (Hazard Analysis Control Critical Point) (Systèmes d'analyse des risques – points critiques pour leur maîtrise) (**Gobat, 1990**).

L. monocytogenes a été isolée dans les usines en cours de production et après les opérations de nettoyage et de désinfection. Ceci tendrait donc à prouver la persistance de ces souches sur les surfaces entartées ou recouvertes d'un biofilm, tout en sachant qu'un apport continu de *L. monocytogenes* est réalisé par la matière première et entretenu ensuite sur les produits cuits par l'intermédiaire de croisements de circuits. Des populations adaptées de *Listeria* ont été remarquées sur les viandes et les saucisses (**Dykes, 2003**).

Dans les salamis durs, le nombre de *Listeria* diminue pendant la fermentation et la période de séchage. Cette bactérie peut être détectée après 12 semaines (**Dykes, 2003**).

C.3. Poissons et produits de la pêche

Certains poissons et coquillages pouvaient être contaminés par *L. monocytogenes* (**Parihar et al., 2008**).

Chapitre III : Activité antibactérienne des extraits

Les traitements thermiques ainsi que les techniques de fermentations de certains produits de la mer empêchent un éventuel déclenchement d'une listériose (**Notermans, 2000**).

La fréquence de contamination des poissons est considérable pour le poisson frais (**Jemmi et al., 2002**). Ce niveau de contamination varie en fonction de l'origine (sauvage ou élevage), de la saison, de la technique de pêche, de la manipulation des poissons et du mode de conservation (réfrigération, congélation). *L. monocytogenes* est capable de se développer à 4°C dans du saumon fumé, des crevettes, de la chair cuite de crabe et des homards artificiellement inoculés. Cette bactérie se développe davantage dans le homard et la chair de crabe (**Ben Embarek, 1994**).

Il est à signaler que certaines pratiques de fabrication favorisent davantage la contamination de certains produits élaborés à froid citons l'exemple de la fumaison (**Miettinen et al., 2001**).

C.4. Oeufs et ovoproduits

De nombreuses études, réalisées ont montré que certains œufs et ovoproduits pouvaient être contaminés par *L. monocytogenes*. La présence de *Listeria* dans le blanc d'œuf liquide pasteurisé durant la conservation en réfrigération a été démontrée (**Muriana, 1997**).

L. monocytogenes peut facilement survivre dans les ovoproduits déshydratés maintenus à des températures comprises entre 5°C et 20°C (**Brackett, 1991**).

La bactérie pourrait résister à des températures allant jusqu'à -18°C dans l'œuf liquide. La survie de *Listeria* à 4°C, dans l'albumine, le jaune d'œuf et l'œuf entier contenant du saccharose à 25%, est significative dans tous les produits.

C.5. Produits d'origine végétale

Les légumes peuvent être un vecteur de transmission de la listériose. En effet, des légumes pollués ont été suspectés dans plusieurs épidémies de listériose humaine. La préparation, puis la transformation des matières premières en légumes prêts à l'emploi, sont des facteurs favorisant la contamination initiale ou croisée. Le lavage et la désinfection à l'eau chlorée agissent sur les cellules de *L. monocytogenes* comme sur les autres bactéries présentes sur la surface des végétaux. L'efficacité de la chloration serait diminuée par la

Chapitre III : Activité antibactérienne des extraits

formation de biofilms par la flore bactérienne sur la surface des feuilles qui protégeraient les cellules de *L. monocytogenes*. La température est un facteur important de fixation de la bactérie sur les tissus végétaux (Gorski et al., 2003).

L'aptitude de *L. monocytogenes* à se développer aux températures de conservation de plusieurs légumes (asperges, brocoli et chou-fleur à 4°C, laitue à 5°C, endive et chicorée à 6,5°C) est un facteur constituant un risque de multiplication de la bactérie dans ces produits. Le comportement de *L. monocytogenes* dans les produits, varie en fonction de ceux-ci. Les carottes crues, découpées, ont un effet létal sur les *Listeria*, cet effet disparaît après broyage ou cuisson. En revanche les choux, brocoli, choux fleurs, asperges, salades peuvent constituer des substrats favorables à la croissance de *L. monocytogenes*. *L. monocytogenes* pourrait même survivre durant quatre semaines dans les fraises congelées à $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ (Flessa et al., 2005).

La pratique de plus en plus courante de stockage et de conservation des végétaux fermentés destinés à l'alimentation animale a ainsi vu augmenter les cas de listérioses chez ces animaux. La qualité des ensilages est d'une importance primordiale et la non maîtrise des techniques de fabrication (aérobiose, présence de terre ou stockage en semi-enterré dans les sols, pH trop élevé, broyage trop grossier des végétaux, lessivage par des pluies, mauvaise protection par des bâches abîmées) sont à l'origine de la prolifération de la bactérie (Flessa et al., 2005).

D. Listériose humaine

La listériose est transmise par l'intermédiaire des aliments, et sa pathogénie met en jeu le passage du micro-organisme de la lumière digestive aux cellules réticuloendothéliales du foie et de la rate. La réaction immunitaire contre *Listeria* se caractérise par un effet bactéricide précoce médié par les macrophages, suivi d'une énergique réponse cellulaire. L'immunité humorale ne semble jouer aucun rôle dans la réaction à l'infection. L'origine alimentaire de la listériose humaine s'explique aisément par certaines caractéristiques générales de *Listeria* : il s'agit en effet de bactéries extrêmement résistantes (bien qu'elles ne soient pas sporulées) aux conditions du milieu extérieur, notamment au froid, ce qui explique qu'elles soient largement répandues dans la nature (Gorski et al., 2003).

E. Épidémiologie

Chez l'homme, les premiers cas de listériose ont été décrits dans les années 1960 mais il a fallu attendre les années 1979-1980 pour observer les premières endémies et mettre en évidence le rôle des aliments. Ces endémies se traduisent par de petites bouffées de moins de 20 cas ou par d'importantes endémies pouvant regrouper plusieurs centaines de cas, évoluant sur des périodes prolongées (4 ans par exemple, dans l'endémie suisse) et responsables d'une importante mortalité

Outre les endémies, la transmission alimentaire est bien documentée pour un certain nombre de cas sporadiques dont on estime qu'environ 33 % ont une origine alimentaire. Les infections nosocomiales étant très rares, il est probable qu'il existe d'autres modes de contaminations non identifiés. Les épidémies, d'origine alimentaire sont incontestablement les plus fréquentes et aboutissent dans 20 à 30 % des cas à une mortalité. L'incidence des listérioses humaines dans tous les pays développés a diminué depuis quelques années. Cette baisse est due à un meilleur contrôle des denrées alimentaires et à la sensibilité des populations à risque (Swaminathan, 2007).

3. Les facteurs influençant l'activité antimicrobienne des HE

L'efficacité antimicrobienne des HE dépend de deux paramètres principaux : la composition chimique de l'HE d'une part et le micro-organisme d'autre part (Cusson, 2007).

3.1. Activité liée à la composition chimique

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et les possibles effets synergiques entre les composants. Ainsi, la nature des structures chimiques qui la constituent, mais aussi leurs proportions jouent un rôle déterminant. L'activité d'une huile essentielle est souvent réduite à l'activité de ses composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. Évalués séparément sous la forme de composés synthétiques, ils confirment ou infirment l'activité de l'huile essentielle de composition semblable. Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent de manière synergique. De cette manière, la valeur d'une huile essentielle tient à son « totum », c'est à dire dans l'intégralité de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires (Lahlou, 2004).

Chapitre III : Activité antibactérienne des extraits

Il est connu que ce sont les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes qui confèrent aux huiles essentielles leurs propriétés antibactériennes. L'activité de ces molécules dépend, à la fois, du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Les molécules oxygénées sont généralement plus actives que les hydrocarbonées (Lahlou, 2004).

3.2. Activité liée au microorganisme

Une huile essentielle peut être biocide vis-à-vis de certaines souches, biostatique vis-à-vis d'autres ou encore n'avoir aucun effet. Ceci peut être lié au type de microorganisme (à Gram positif ou à Gram négatif), à son métabolisme et à sa résistance (Cusson, 2007).

En effet, les bactéries Gram négatif seraient plus résistantes aux huiles essentielles que les bactéries Gram positif grâce à la structure de leur membrane externe. Ainsi, la membrane extérieure des Gram négatif est plus riche en lipo-polysaccharides et en protéines que ceux de Gram positif la rendant plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer (Toura, 2015).

4. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne

L'examen des données bibliographiques fait apparaître d'emblée la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne des huiles essentielles. Les techniques utilisées ont une grande influence sur les résultats. Ces méthodes utilisées donnent parfois des résultats différents selon les conditions opératoires expérimentales pour chaque manipulateur (Surk, 2003).

L'insolubilité des huiles essentielles dans l'eau et d'une manière générale dans les milieux aqueux largement utilisés en microbiologie, est une des explications de la variété des techniques d'évaluation. Selon la souche microbienne, l'huile essentielle et l'application choisie, divers milieux de culture peuvent être mis en œuvre (Surk, 2003).

4.1. Méthode de diffusion en milieu solide

Cette méthode est aussi appelée méthode de l'aromatogramme, ou technique de l'antibioaromatogramme ou encore méthode de Vincent. La diffusion de l'agent antimicrobien dans le milieuensemencé résulte d'un gradient de l'antimicrobien. Quand la concentration de l'antimicrobien devient très diluée, il ne peut plus inhiber la croissance de la bactérie testée, la zone d'inhibition est démarquée. Le diamètre de cette zone d'inhibition est corrélé avec la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour la combinaison particulière

Chapitre III : Activité antibactérienne des extraits

bactérie/antimicrobien, la zone d'inhibition correspond inversement à la CMI de l'essai. Généralement, plus la zone d'inhibition est petite, plus la concentration d'antimicrobien nécessaire pour inhiber la croissance des microorganismes est faible (Pibri, 2006).

4.2. Méthode de dilution en milieu liquide

Le but des méthodes de dilution en bouillon et en gélose est de déterminer la concentration la plus faible de l'antimicrobien testé qui inhibe la croissance de la bactérie testée (la CMI, habituellement exprimée en mg/ml ou mg/L) (Cox et al., 2000).

4.2.1. Dilution en bouillon

La dilution en bouillon est une technique dans laquelle une suspension bactérienne (à une concentration optimale ou appropriée prédéterminée) est testée contre des concentrations variables d'un agent antimicrobien dans un milieu liquide. La méthode de dilution en bouillon peut être effectuée dans des tubes contenant un volume minimum de 2 mL (macrodilution) ou dans de plus petits volumes à l'aide de plaques de microtitration (microdilution) (Amaral et al., 1998).

4.2.2. Dilution en gélose

La dilution en gélose implique l'incorporation d'un agent antimicrobien dans un milieu gélosé à des concentrations variables, en général une dilution en série de β en β , suivie de l'ensemencement d'un inoculum bactérien défini à la surface de la gélose de la boîte (Chao et al., 2000).

4.3. Le type des microorganismes cibles

Un autre paramètre important déterminant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est le type des microorganismes ciblés. En général, les différents microorganismes n'ont pas une sensibilité similaire vis à vis des huiles essentielles. Parmi les microorganismes, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* (Gram positif), *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (Gram négatif), *Candida albicans* (Levures) et *Aspergillus niger* (champignons) ont été les plus étudiés. Les champignons montrent généralement une sensibilité supérieure par rapport aux bactéries et parmi les bactéries, les Gram négatif apparaissent plus résistants que les Gram positif vis-à-vis des huiles essentielles. Inversement, *Escherichia coli* est plus sensible vis à vis de l'huile de *Melaleuca alternifolia* que *Staphylococcus aureus*. De même, certains champignons sont plus résistants vis-à-vis de l'huile de *genévrier* que les bactéries (Hayes et al., 1997).

Chapitre III : Activité antibactérienne des extraits

Enfin, une sensibilité supérieure des bactéries anaérobies a été observée quel que soit les huiles essentielles par rapport à celles vivant en aérobiose (**Juven et al., 1994**).

5. Mécanisme d'action antimicrobienne des huiles essentielles

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des huiles essentielles, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (**Carson et al., 2002**).

De façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxiques des huiles essentielles sur les bactéries comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force motrice de proton, fuite d'électron et la coagulation du contenu protéique des cellules (**Davidson, 1997**). Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane, une perturbation chémo-osmotique et une fuite d'ions (K⁺) : ce mécanisme a été observé avec l'huile de *Melaleuca alternifolia* sur les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et Gram à négatif (*Escherichia coli*) et levure (*Candida albicans*) in vitro (**Carson et al., 2002**).

Certains composés phénoliques des huiles essentielles interfèrent avec les protéines de la membrane des micro-organismes comme l'enzyme ATPase, soit par action directe sur la partie hydrophobe de la protéine, soit en interférant dans la translocation des protons dans la membrane prévenant la phosphorylation de l'ADP (**Knobloch et al., 1989**).

Une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez *Enterobacter aerogenes* a aussi été rapportée (**Wendakoon, 1995**).

Les huiles essentielles peuvent aussi inhiber la synthèse de l'ADN, l'ARN, des protéines et des polysaccharides (**Zani et al., 1991**). Le mode d'action des huiles essentielles dépend aussi du type de microorganismes : en général, les bactéries Gram à négatif sont plus résistantes que les Gram à positif grâce à la structure de leur membrane externe. Ainsi, la membrane extérieure des Gram à négatif est plus riche en lipo-polysaccharides et en protéines que ceux de Gram positif qui la rend plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer. Néanmoins, certains composés phénoliques de bas poids

Chapitre III : Activité antibactérienne des extraits

moléculaires comme le thymol et le carvacrol peuvent adhérer à ces bactéries par fixation aux protéines et aux lipopolysaccharides membranaires grâce à leurs groupements fonctionnels et atteindre ainsi la membrane intérieure plus vulnérable (**Dorman, 2000**).

Chapitre IV : Matériel et méthodes

1. Présentation de la région d'étude

Dans ce chapitre, les particularités de la région du Laghouat sont présentées, notamment sa situation géographique et les facteurs climatique.

1.1. Situation géographique de la région d'étude

La localisation de l'APC : présentation de la commune d'Oued Morra La commune d'Oued Morra est le territoire de la tribu des Ouled Ali ben Amor. Elle se trouve dans la wilaya de Laghouat à cheval sur l'Atlas Saharien à environ 500 km d'Alger (El Jazaïr sur la carte Google Earth).

Cette tribu a vu son territoire délimité – comme pour toutes les tribus des zones steppique d'Algérie par la loi dite du Senatus Consulte de 1863 par laquelle l'occupant français de l'époque a fixé les limites territoriales entre les tribus. Ce territoire est situé à une altitude dépassant les 1 000 mètres en plein cœur de l'Atlas Saharien.

Le Genévrier de Phénicie a été récolté dans les montagnes de Ain Ousmane de la commune d'Oued Morra situe $34^{\circ}12'07.0''N$ et $2^{\circ}19'25.9''E$, entourant la ville d'Aflou wilaya de Laghouat (Algérie) (Figure 14).



Figure 14. Localisation géographique d'Oued Morra entourant, le site de récolte de *Genévrier de Phénicie* (Carte Michelin Aflou-plan, 2006-2016).

1.2. Facteurs climatiques

Sur le plan climatique, le territoire d'Oued Morra peut être classé dans le bio-climat aride inférieur à hiver très froid. La pluviométrie moyenne est de 248 mm (moyenne de la période 1995-2001).

La pluie tombe généralement en automne (61 mm), en hiver (62 mm) et au printemps 93 mm, mais de façon très irrégulière et souvent torrentielle. Il y a de très fortes amplitudes thermiques et on compte en moyenne 37 jours de gelée par an. L'été y est chaud et sec. Un vent chaud venant du Sahara voisin - le sirocco - peut y souffler au printemps, très craint par les agriculteurs de la région parce qu'il peut endommager gravement les cultures en sec (pluviales). On enregistre 59 jours de sirocco par an.

La région subit des vents relativement forts (4,93 m/s en moyenne) toute l'année, vents qui provoquent une érosion importante sur les terres sableuses labourées. La commune d'Oued Morra comprend deux écosystèmes : au Nord un écosystème qu'on peut qualifier alfatier, au Sud un écosystème qu'on peut qualifier de mixte alfa-genévrier.

2. Objectif

Évaluer in vitro l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et l'extrait éthanolique de *Juniperus phoenicea* de la région d'Oued Morra de la wilaya de Laghouat sur les différentes souches testées : *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua* et *Escherichia coli*.

Le choix de ces souches bactériennes c'était pour la raison de leur large impact pathologique en relation avec des problèmes plus généraux de résistance aux antibiotiques habituels.

3. Matériel

A. Equipement et réactif chimique

L'équipement (verrerie, appareillage, matériel en plastique et autres) ainsi que les réactifs chimiques sont donnés dans l'Annexe 01.

B. Milieux de culture

Afin de mener à bien notre expérience, nous avons respecté les protocoles de préparations pour cela trois milieux de cultures ont été préparés.

1. Bouillon BrainHeart Infusion Broth (BHIB)

BrainHeart Infusion Broth, le bouillon a été utilisé tant que milieu de revivification pour toutes les souches bactériennes testées. C'est un milieu polyvalent adapté à la culture d'une grande variété de microorganismes.

La croissance et mise en évidence par l'apparition d'une turbidité dans le milieu.

La composition du bouillon BHIB est donnée dans l'Annexe 02.

2. Milieu Mueller Hinton Agar (MHA)

La gélose Mueller-Hinton est un milieu standardisé recommandé pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries peu exigeantes. Pour les bactéries exigeantes, comme, par exemple, les *Streptococcus aureus*, *Listeria innocua* et *Escherichia coli*.

La composition du milieu Mueller Hinton est donnée dans l'Annexe 02.

3. Milieu Mueller Hinton Broth

Le bouillon Mueller-Hinton est un milieu liquide nutritif utilisé pour l'étude de la sensibilité des bactéries aérobies et anaérobies facultatives vis à vis des agents antimicrobiens. Il est utilisé comme milieu de culture pour réaliser la technique

Chapitre IV : Matériel et méthodes

d'antibiogramme en méthode de dilution (1, 2) ou bien comme milieu de base pour préparer tout inoculum bactérien.

La composition du milieu Mueller Hinton est donnée dans l'Annexe 02.

C. Matériel biologique

C.1. Matériel végétal

Le choix de plante (*juniperus phoenicea*) est basé sur l'utilisations traditionnelles de plante par la population locale comme plante aromatisant et de conservation et d'utilisation en phytothérapie.

C.2. Souche bactérienne

Dans cette expérience, nous utilisons trois souches bactériennes de référence ATCC (L'American Type Culture Collection), les souches testées sont des bactérie gram négatives (*Escherichia coli* ATCC25922) et des bactéries gram positives (*Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Listeria innocua* ATCC33090).

4. Méthodes

Cette expérience passe par plusieurs étapes (échantillonnage, extraction, caractérisation...etc).

4.1. Echantillonnage

Le matériel végétal (*juniperus phoenicea*) est séché à la température ambiante (<30°C) et à l'abri de la lumière dans un endroit sec et aéré (Figure 4). Après le séchage, le matériel végétal a été broyé jusqu'à l'obtention d'une poudre fine, puis la poudre a été récupérée dans des sacs en papier propres pour servir ultérieurement à l'extraction éthanolique et l'extraction d'huile.

Chapitre IV : Matériel et méthodes

A. Récolte de la plante : La plante a été récolté au niveau de la région de Ain Ousmane commune d'Oued Morra wilaya de Laghouat.

B. Séchage : La plante séchée dans un endroit aéré à l'abri de la lumière pendant une semaine, trois semaines et 6 mois (Figure 15).

C. Broyage : Nous broyons la plante manuellement ou à l'aide d'une broyeuse pour obtenir une poudre homogène tout en préservant ses propriétés chimiques.



Figure 15. La Genévrier de Phénicie (*Juniperus phoenicea*) séchée et broyé (Photo originale, 2022).

4.2. Extraction d'huile essentielle

Mode opératoire

Les huiles essentielles (HEs) ont été isolées par hydro-distillation. en utilisant un appareillage de type Clevenger, L'extraction a duré presque (4 h) pour un mélange de 200 g de matériel végétal sèche (*Juniperus phoenicea*) avec 1500 ml d'eau distillée, l'ensembles est ensuite porté à ébullition, le ballon surmonte d'une colonne de 60 cm de longueur reliée à un réfrigérant (Bruneton, 2009).

Les vapeurs chargées d'huile et qui traversent le réfrigérant, se condensent. L'eau et l'huile se séparent par différence de densité. Les huiles essentielles recueillies, l'huile essentielle de plante sera récupérée et stockée à 4° C à l'obscurité dans un flacon approprié, hermétiquement fermé et couvert d'une feuille d'aluminium pour la préserver de l'air et de la

Chapitre IV : Matériel et méthodes

lumière. La quantité d'essence obtenue est pesée pour le calcul du rendement le processus a été répété trois fois (Figure 16).

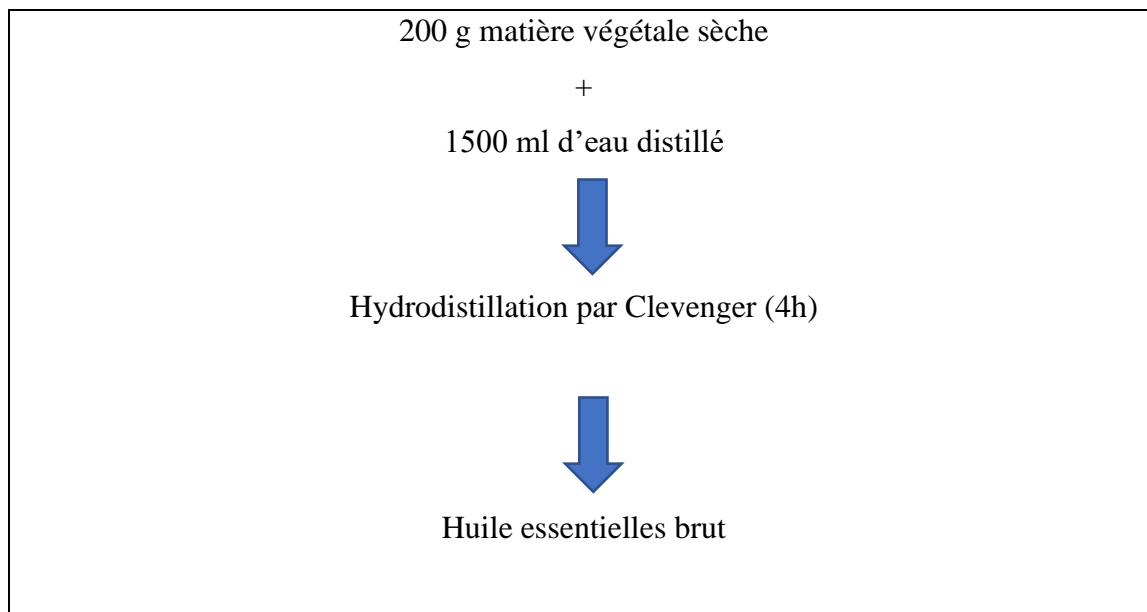


Figure 16. Protocole de préparation des huiles essentielles.

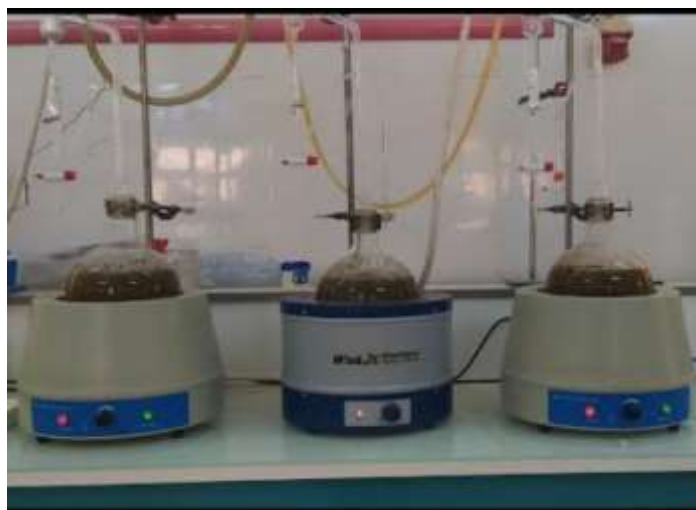


Figure 17. Montage d'un hydrodistillateur de type Clevenger (Photo originale, 2022).

4.3. Calcul du rendement de l'huile essentielles

Le rendement est calculé pour la même plante ; mais pour des périodes différentes après la récolte. (Après une semaine ; après 3 semaines et après 6 mois).

Chapitre IV : Matériel et méthodes

Le rendement d'une extraction se calcule par le rapport entre la masse de l'huile essentielle extraite et la masse de la matière première végétale traitée. Le rendement exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante :

$$R (\%) = \frac{\text{la masse de l'huile essentielle}}{\text{la masse de l'échantillon}} \times 100$$

4.4. Caractérisations de l'huile essentielle GC-MS

Pour la réalisation de la caractérisation on procède à la méthode d'analyse GC-MS.

L'analyse des échantillons (1 ml d'extrait) a été réalisée au sein du Plateau Technique d'analyse Physico-chimique (Laghouat-Algérie), à l'aide d'un GCMS SHIMADZU-Instruments QP2020, équipés d'une colonne capillaire fusionnée Rxi®-5ms (Phase :Crossbond® 5% diphényl/ 95% diméthyl polysiloxane) ses dimensions sont : 30 m × 0,25 mm et 0,25 µm d'épaisseur de film, cette colonne a une phase similaire à la suivante colonnes : HP-1ms, HP-1msUI, DB-1ms, DB-5ms, DB-1msUI, Ultra-1, VF-1ms, ZB-1, ZB-1ms et également considéré comme équivalent aux phases USP G1, G2, G38. Un volume de 0,5 µl d'échantillon a été injecté en mode fractionné (1:80).

Les températures de l'injecteur et du détecteur étaient maintenues à 250°C et 310°C, respectivement la température de la colonne a été programmée à : 50°C fixe pendant 2 min puis augmenté à 310°C avec un pas de montée de 3°C/min, puis maintenu à 310°C pendant 2 min. Le gaz vecteur utilisé était l'hélium (99,995% pureté) avec un débit de 1 ml/min.

Les conditions du spectromètre de masse étaient les suivantes :

Tension d'ionisation 70 eV, température de la source d'ions 200°C et masse d'ionisation des électrons les spectres ont été acquis sur la plage de masse de 45 à 600 m/z.

Identification des composants des huiles essentielles.

Les indices de rétention linéaire (LRI) ont été calculés pour des composés séparés par rapport à un n-alcanes homologues en série (n-C7-C33).

Les composants ont été identifiés par comparaison de leur (LRI) calculé avec ceux de la littérature (**Adams, 2017**).

Ainsi que leurs spectres de masse avec ceux enregistrés par le NIST (National Institute of Standards and Technology) et les bibliothèques Wiley "NIST17.lib, W11N17MAI et FFNSC1.2.lib".

4.5. Extraction éthanolique

Mode opératoire

200 g d'échantillon sec de *Juniperus phoenicea* a été macéré dans 1000 ml de l'éthanol absolu (99.94%, 1 :5, m/v) pendant 24 h (Figure 18 et19) à la température ambiante. L'extrait a été filtré sur papier filtre Whatman n°1. Après la filtration, du charbon actif a été ajouté au filtrat (10 g de charbon actif/50 g de matériel végétal) pour absorber la chlorophylle et diminuer la coloration verte de l'extrait, puis, le charbon actif a été immédiatement retiré de l'extrait avec du papier filtre Whatman n°1 (Figure 20). Ensuite, l'éthanol a été évaporé dans un évaporateur rotatif (Heidolph Rotary Evaporator, Laborota 4000) à 50°C (Figure 21), et le résidu a été pesé et traité avec les radiations UV-light (30 W, 50 cm distance de radiations) pendant 30 min pour réduire la flore naturelle existante. Enfin, le résidu a été stocké dans un flacon à 4 °C jusqu'à son utilisation (Figure 22).

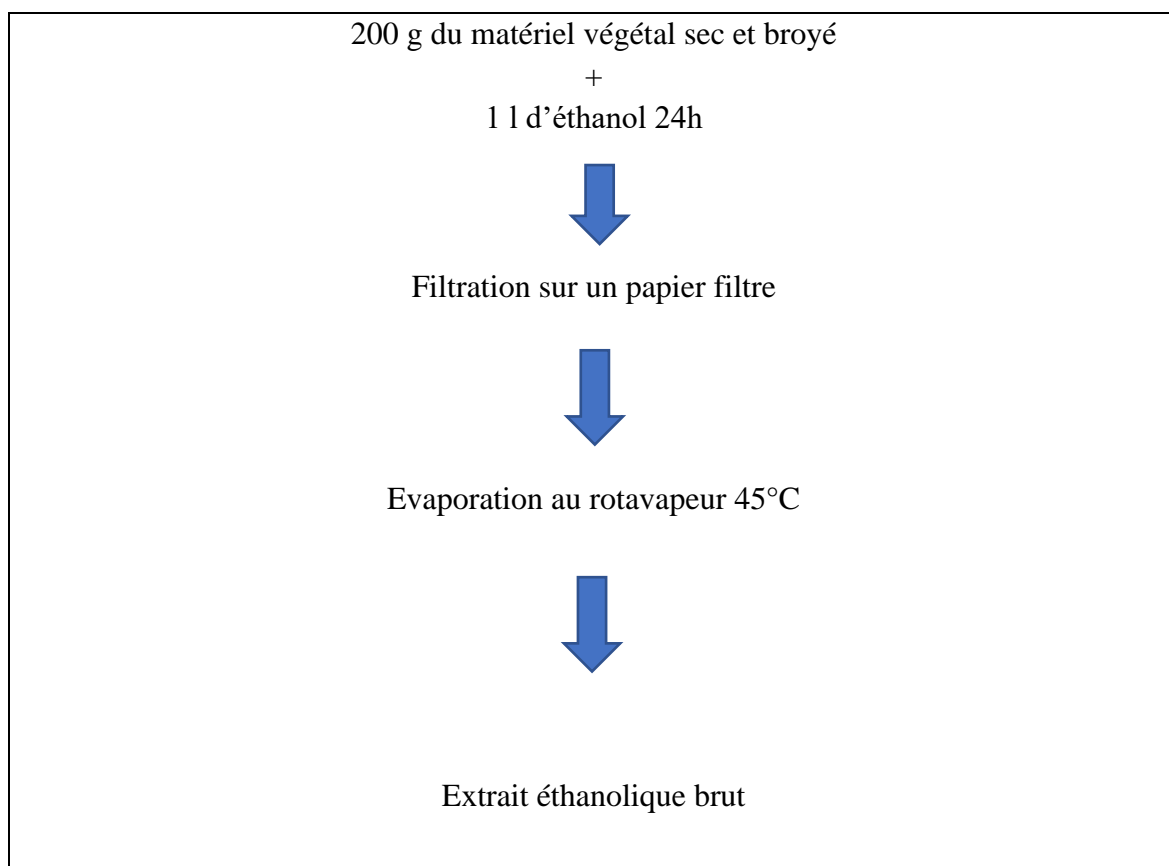


Figure 18. Protocole de préparation d'extrait éthanolique.

Chapitre IV : Matériel et méthodes



Figure 19. Macération de la poudre de *Juniperus phoenicea* dans l'éthanol absolu (Photo originale, 2022).



Figure 20. Filtration de l'extrait sur papier filtre Whatman N°1 (Photo originale, 2022).



Figure 21. Evaporation de l'éthanol à 50°C dans un évaporateur rotatif de type Heidolph Rotary Evaporator, Laborota 4000 (Photo originale, 2022).



Figure 22. L'extrait brut de *Juniperus phoenicea* après évaporation (Photo originale, 2022).

4.6. Calcul du rendement d'extrait éthanolique

Le rendement exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante :

$$R (\%) = \frac{(\text{la masse du ballon avec l'extrait brut} - \text{la masse du ballon vide})}{\text{masse de l'échantillon}} \times 100$$

4.7. Les souches bactériennes

Les souches bactériennes de référence testées dans cette étude est *Listeria innocua* ATCC33090 et *Staphylococcus aureus* ATCC29213 et *Escherichia coli* ATCC25922 obtenues du Laboratoire KWIK-STIK (Grenoble Cedex 2 France) (figure.23), dispositif contient une pastille lyophilisée d'une souche de microorganisme unique, un réservoir de liquide d'hydratation et un écouvillon d'ensemencement (ce produit est conditionné hermétiquement dans un sachet) *L.innocua* et *E.colli* et *Staphylocoque* a été stockée à 4°C.

En pinçant la partie basse du dispositif, Nous faisons écraser la pastille dans le liquide jusqu'à ce que les particules de la pastille en suspension aient une apparence homogène. On va imbiber immédiatement et généreusement l'écouvillon avec le matériau hydraté et transférer dans le milieu (BHI) stockée à température 4°C jusqu'à utilisation. Un jour avant l'utilisations on prélève 1 ml de suspension et ajouter dans tube contient 15 ml de bouillon BHI puis incubées à 37 °C pendant 24 h.

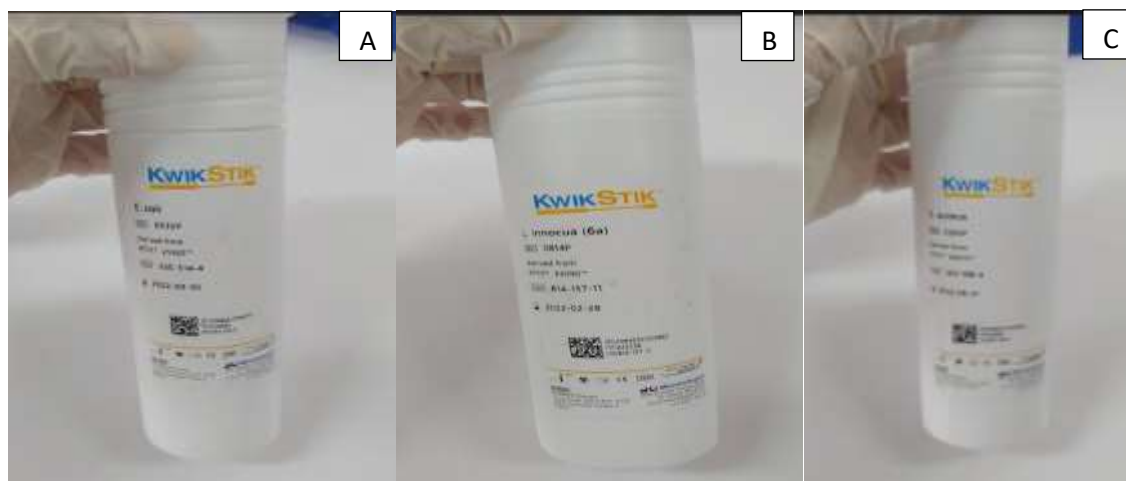


Figure 23. Souche lyophilisée de *Escherichia coli* ATCC25922 (A) ; *Listeria innocua* ATCC33090 (B) et *Staphylococcus aureus* ATCC29213 (C) (Laboratoire KWIK-STIK) (Photo originale, 2022).

4.8. Préparations de l'inoculum

Après avoir récupéré les 3 germes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Listeria innocua*). L'inoculum a été préparé à partir des cultures bactériennes récentes dans l'eau physiologique (0.9%), ajusté à la densité de 0.5McFarland, utilisant un spectrophotomètre Jenway 6405 UV/VIS (Essex, UK) à une longueur d'onde de 600 nm afin d'obtenir une concentration finale d'environ 10^8 UFC/ml.

Ensuite, les suspensions bactériennes ont été diluées 100 fois dans le bouillon Mueller-Hinton pour obtenir une concentration finale de 10^6 UFC/m.

Pour chaque souche testée, un témoin de croissance (sans l'addition de l'agent antibactérien) a été utilisé afin de vérifier les conditions de culture.



Figure 24. Spectrophotomètre de type Jenway 6405 UV/VIS (Essex, UK) (Photo originale, 2022).

4.9. Préparation des dilutions

Dans cette étude, la méthode de macro-dilution en milieu liquide a été utilisée pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les concentrations minimales bactéricides (CMB), selon la méthode de référence NCCLS M7-A7 pour les bactéries qui se développent en aérobiose (CLSI, 2006). Des solutions de stock 2.5 ml de l'huile essentielle et de l'extrait éthanolique de *Juniperus phoenicea* ont été préparées dans 50 ml d'eau distillée stérile tiède à une concentration finale de 100 µl/ml et de 100 mg/ml, respectivement. Notons que, l'huile essentielle a été précédemment diluée dans 1 à 2 µl de Tween 20 pour faciliter leur diffusion dans l'eau distillée.

Une série de dilution au 1/2 de chaque extrait a été préparée dans des tubes contenant 2 ml de milieu Mueller-Hinton Broth 2 Cation-adjusted (90922, Fluka), 6 tubes remplis par 2 ml de MHB Il reste un tube (contrôle) ou témoin de croissance de la souche à tester (E.Coli, Staphylocoque et Listeria) pour chaque extrait avec des concentrations allant de 100 à 1.56 µl/ml pour l'huile essentielle ou de 100 à 1.56 mg/ml pour l'extrait éthanolique. Pour obtenir une suspension de travail.

Tous les tubes à essai ont été inoculés avec 2 ml de la suspension bactérienne et incubés en aérobiose à 37°C pendant 24 h. Notons que la concentration finale de l'antibactérien et de l'inoculum était la moitié de la concentration d'origine dans chaque tube (50 à 0.39 µl ou mg/ml pour l'extrait de plante et de 5×10^5 UFC/ml pour l'inoculum). Toutes les expériences ont été réalisées en double et répétées si les résultats différaient (Figure 25).

4.10. Lecture des tubes CMI

Après l'incubation des tubes, la CMI était la plus faible concentration d'extrait ne montrant aucune croissance bactérienne visible, en comparant la croissance à celle du témoin.

Donc, la CMI est définie comme la plus faible concentration de l'antibactérien pour laquelle aucune croissance n'est visible (détection visuelle) comparativement au témoin.

4.11. Détermination des CMB

Après lecture des résultats CIM, 50 µl de suspension de chaque tube ne montrant aucune croissance ont été étalés en surface des boîtes de gélose Mueller-Hinton (MHA, Fluka 70191, Steinheim, Espagne). Après incubation pendant une nuit à 37°C, la CMB est définie comme la plus faible concentration d'un antibactérien qui indique soit une croissance nulle, soit une

Chapitre V : Résultat et discussion

Chapitre V : Résultats et discussions

1. Analyse quantitative des extraits

1.1. Le rendement en huile essentielle de *Juniperus phoenicea*

L'huile essentielle extraite à partir de la plante *Juniperus phoenicea* par hydrodistillation est de couleur transparent proche de jaune clair et forte odeur de genévrier.

Le rendement en huile essentielle de *J. phoenicea* provenant est 0.4 % pour une plante séchée depuis de 6 mois et 1.29% pour une plante séchée pendant 3 semaines et 1.32% pour une plante séchée pendant un semaine. Il est relativement élevé par rapport à certaines plantes qui sont exploitées industriellement comme source des huiles essentielles.

Le rendement moyen en huile essentielle a été calculé en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne de la plante, Le pourcentage du rapport poids de l'huile sur le poids de la matière végétale sèche nous a permis de calculer le rendement des échantillons de *Juniperus phoenicea* en huile essentielle (Figure 26).

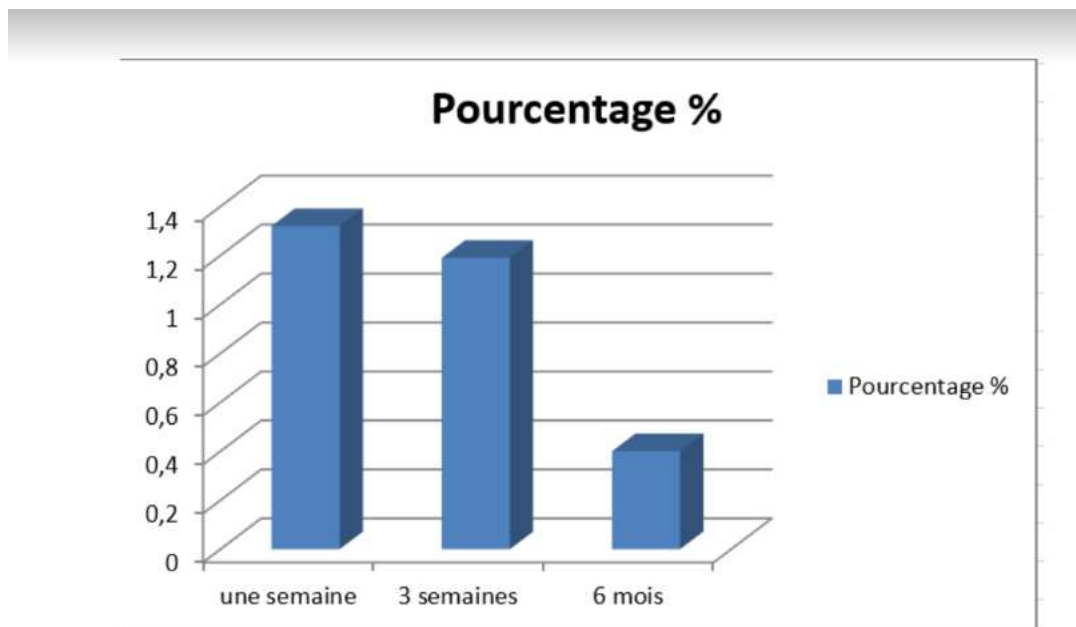


Figure 26. Histogramme représenté les pourcentages des rendements des huiles essentielles en termes de durée de séchage.

D'une manière générale, les rendements des extraits secs varient en fonction des paramètres de l'extraction : la température, le solvant d'extraction, la taille des particules et le coefficient de diffusion du solvant. Il a été démontré que les rendements sont plus élevés pour les extraits aqueux (Majhenic, 2007) ce qui concorde avec les résultats obtenus.

Chapitre V : Résultats et discussions

De profondes modifications de l'huile essentielle peuvent intervenir lors de l'exploitation des végétaux depuis leur collecte jusqu'à leur transformation industrielle.

Le mode de récolte, les conditions de transport, de séchage et de stockage peuvent générer des dégradations enzymatiques. Après la cueillette, les plantes sont soit utilisées fraîches, mais souvent elles passent à la dessiccation ; le séchage des plantes a pour intérêts d'alléger le produit et de permettre sa conservation par diminution de l'activité de l'eau (**Moghrani, 2009**).

Nos résultats confirment également ceux trouvés par plusieurs auteurs, sur des variétés locales de *Juniperus phoenicea* différentes régions d'Algérie, notamment le résultat de 1.11% dans la région de Batna (**Bousbata, 2009**) et le rendement de 0.9% dans la région de Naama (**Bouyahaoui, 2017**) et conforme aussi avec les travaux de (**Hefed, 2009**) dans la région de souk-Ahras avec un rendement de 1.27%.

Ces taux restent plus élevés que ceux des genévriers rouges de la Grèce (0,21 % pour les rameaux) (**Adams et al., 1996**), de la sous-espèce turbinât d'Espagne (0,30% pour les rameaux)(**Adams et al.,1996**),d'Égypte(0,36% pour les rameaux ; 0,96 % pour les fruits) (**El-Sawi et al.,2007**) et de la sous-espèce eu-mediterranea du Portugal(0,41 % pour les rameaux) (**Adams et al., 1996**).

Le rendement en huile essentielle de *J. phoenicea* il est diffère d'un pays à un autre (**Derwich et al., 2010**) (Tableau 10).

Tableau 10. Comparaison des rendements en huile essentielle de *J.phoenicea* de différents pays.

Extrait	Tunisie (Bouzouita et al, 2008)	Maroc (Derwich et al, 2011)	Egypte (El-Sawi et al, 2007)	Portugal (Adams et al, 1996)	Espagne (Adams et al, 1996)	Grèce (Adams et al, 1996)
<i>Juniperus phoenicea</i>	0,5 %	1,62 %	1,96 %	0,41	0,66 %	0,58%

Cette variation dans le rendement peut être attribuée non seulement à la partie de la plante étudiée, mais également à l'emplacement géographique spécifique de cette espèce influencer par les facteurs climatologiques (température, humidité...), pédologiques (texture du sol, fertilisation...) et autres.

Chapitre V : Résultats et discussions

De même ; la période longue de séchage de la matière végétale ; diminue le rendement, plus le temps de séchage est long plus le rendement est faible (**Greche et al., 2009**).

1.2. Le rendement en extrait éthanolique de *Juniperus phoenicea*

L'extrait éthanolique obtenu à partir de la plante *J. phoenicea* est de couleur miel ou caramel et d'odeur de Genévrier (Figure 14), le rendement moyen obtenu d'extraits éthanolique de la plante *Juniperus phoenicea* est de l'ordre de 1,83%, cette quantité est supérieur à celle rapportée par (**Belarbi, 2021**) sur un échantillon de la même région d Aflou avec un taux de 1% et bien inférieure à celle de (**Mazur et al., 2003**), avec un taux de (2.48%).

Il est important de souligner que la méthode utilisée (le choix des solvants), ainsi que les conditions de l'exposition effectuer (à chaud ou à froid), affectent le contenu total en phénols et flavonoïdes, et par conséquent influence les activités biologiques méditées par ces métabolites. (**Okmude, 2005**).

2. Analyse qualitative des extraits

2.1. Détermination de l'activité antibactérienne (CMI et CMB)

Après l'incubation à 37°C pendant 24h et après l'observation, on choisit que les tubes qui n'ont pas répondu à la croissance bactérienne (présence de trouble) (Tableau 11, 12 et 13)

En ensemence en surface les boites de pétrie par 50ul de MHA et après 24h d'incubation a 30°C on compte les colonies la boite qui contient un poussé de colonie de trois colonies est retenu comme la concentration minimale inhibitrice CMI et la boite qui contient une seul a 0 colonie représenté la concentration minimale bactéricide CMB (Figure 27, 28 et 29) (Tableau 14).

Chapitre V : Résultats et discussions

Tableau 11. Résultat CMI et CMB de *Escherichia coli* sur l'huile essentielles et l'extrait éthanolique.

<i>Escherichia coli</i>							
Extrait d'huile	CMI	50	25	12.5	6.25	3.125	1.6
	CMB	0	6	17	50<	50<	50<
Extrait éthanolique	CMI	50	25	12.5	6.25	3.125	1.6
	CMB	2	7	22	43	50<	50<



Figure 27. Effet inhibiteur de l'huile essentielle et l'extrait éthanolique de *Juniperus phoenicea* sur la souche bactérienne testée *Escherichia coli*.

Tableau 12. Résultat CMI et CMB de *Listeria innocua* sur l'huile essentielles et l'extrait éthanolique.

<i>Listeria innocua</i>							
Extrait d'huile	CMI	50	25	12.5	6.25	3.125	1.6
	CMB	0	2	15	50<	50<	50<
Extrait éthanolique	CMI	50	25	12.5	6.25	3.125	1.6
	CMB	0	1	50<	50<	50<	50<

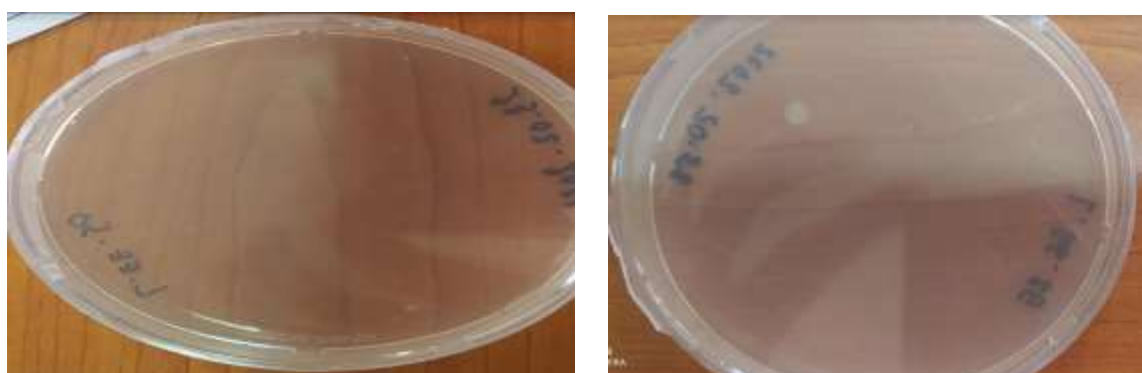


Figure 28. Effet inhibiteur de l'huile essentielle et l'extrait éthanolique de *Juniperus phoenicea* sur la souche bactérienne testée *Listeria innocua*.

Chapitre V : Résultats et discussions

Tableau 13. Résultat CMI et CMB de *Staphylococcus aureus* sur l'huile essentielles et l'extrait éthanolique.

<i>Staphylococcus aureus</i>							
Extrait d'huile	CMI	50	25	12.5	6.25	3.125	1.6
	CMB	4	13	24	29	50<	50<
Extrait éthanolique	CMI	50	25	12.5	6.25	3.125	1.6
	CMB	0	1	6	50<	50<	50<

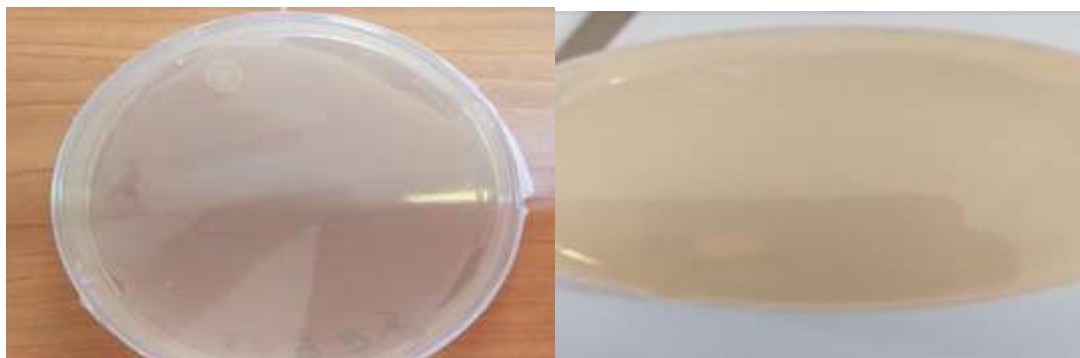


Figure 29. Effet inhibiteur de l'huile essentielle et l'extrait éthanolique de *Juniperus phoenicea* sur la souche bactérienne testée *Staphylococcus aureus*.

Tableau 14. Les résultat CMI et CMB de l'huile essentielle et de l'extrait éthanolique sue les souches testées.

Souche bactérienne	Huile essentielle ul/ml (v/v)		Extrait éthanolique mg/ml (w/v)	
	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>E. coli</i> ATCC25922	12.5	25	12.5	25
<i>Listeria innocua</i> ATCC33090	25	50	25	50
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213	12.5	25	12.5	25

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

Chapitre V : Résultats et discussions

Le mode d'action des extraits dépend du type de microorganismes, du type d'extrait et de sa concentration. En général, les bactéries Gram (-) sont plus résistantes que les bactéries Gram (+) et ce grâce à la structure de leur membrane externe (**Pool,2001**).

Les souches bactériennes se comportent différemment vis-à-vis de tous les extraits.

Donc, les résultats obtenus montrent une valeur de 25 mg/ml de la concentration initiale des extraits était considérée comme une CMI pour *Listeria innocua* et une concentration 12.5 mg/ml comme CMI pour *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* dans les deux extraits.

Pour les micro-organismes à Gram positif, le micro-organisme le plus sensible était *Staphylococcus aureus*.

Dans les études précédentes, les valeurs des concentrations minimales inhibitrices ont été déterminées dans une large gamme de concentration allant de 0,78 à 100 mg/ml d'extrait.

Les extraits le plus actifs, avec les CMI les plus faibles (0,78 mg/ml) et sont l'extrait éthanolique, une valeur de 3,125 mg/ml de la concentration initiale des extraits était considérée comme une CMI pour *S. aureus*, *E. coli* par l'extrait. Toutes les plantes se sont révélées actives sur une ou plusieurs bactéries par la méthode diffusion en milieu liquide (CMI), les extraits ont montré une activité antibactérienne plus élevée sur *Escherichia coli* avec une CMI de 0.195 mg/ml. (**Lachlah, 2019**).

Nos données n'ont pas montré de réponse uniforme entre les types de souches bactériennes testées et les résultats de sensibilité aux composés antimicrobiens dans les divers extraits testés. (**Karaman et al., 2003**) a expliqué ces différences de sensibilité entre les microorganismes vis-à-vis des substances antimicrobiennes contenues dans des extraits de plantes par le fait qu'il y a des différences de composition de la paroi cellulaire et / ou de gènes héréditaires sur des plasmides qui peuvent facilement être transférés entre des souches bactériennes.

Donc, les résultats obtenus montrent que l'HE de *Juniperus phoenicea* possède un spectre d'activité antibactérienne plus large sur les Gram + (*Staphylococcus aureus* ; *Listeria innocua*) que sur les Gram - (*Escherichia coli*), Cette différence a été expliquée selon (**Boukhatem et al., 2014**) par le fait que les Gram- possèdent une résistance intrinsèque aux agents antimicrobiens, qui est en relation avec la nature de leur paroi bactérienne. Chez les bactéries à Gram+, le peptidoglycane est très épais et associé à des protéines pariétales. Par

Chapitre V : Résultats et discussions

contre chez les bactéries à Gram-, le peptidoglycane est très fin et associé à une enveloppe externe complexe définissant un espace périplasmique. Cette membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique hydrophobe constituée de phospholipides, de protéines (porines) et lipopolysaccharides (LPS).

Dans d'autres études où les résultats indiquent que les bactéries à Gram positif sont les souches testées les plus sensibles aux différents extraits, **(Burt, 2004)** rapporte que la tendance des polyphénols et des flavonoïdes pourrait s'expliquer par le fait que les structures de l'enveloppe cellulaire, y compris la membrane cytoplasmique et le composant de la paroi cellulaire, sont différentes entre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

3. Caractérisations des huiles essentielles

Après avoir fait une analyses GC-MS de l'huile essentielles nous montrer les résultats suivants : *l'* α -pinène est fourni par des taux élevés (71.43%) suivi par *β -Phellandrene* (6.11%) et *δ -3-Carene* (5.04%) (Tableau 17).

Chapitre V : Résultats et discussions

Tableau 15. Résultat d'analyse GC/MS de l'huile essentielle.

Peak	R.Time	Pourcentage %	Similarity	Index	Composent
1	8.363	0.34	95	921	Tricyclene
2	8.825	71.43	96	932	.alpha Pinène
3	9.382	0.50	89	947	Camphene
4	10.513	1.22	96	975	.beta.-Pinene
5	11.139	2.57	95	991	Myrcene
6	11.687	0.72	95	1004	.alpha.Phellandrene
7	11.940	5.04	96	1010	delta-3-Carene
8	12.563	0.75	96	1023	o-Cymene
9	12.758	6.11	94	1028	.beta.-Phellandrene
10	15.473	0.70	94	1088	Terpinolene
11	16.003	0.56	95	1100	Linalool
12	20.219	0.97	96	1190	.alpha.-Terpineol
13	25.293	0.95	96	1302	Carvacrol
14	27.397	0.81	92	1350	Terpinyacetate<alpha->
15	30.418	0.95	96	1421	Caryophyllene
16	31.685	0.25	86	1452	cis-muurolo-3,5-diene
17	31.825	0.54	95	1455	Humulene <alpha->
18	32.660	0.59	93	1475	Cadina-1(6),4-diene<10betaH->
19	32.958	0.86	93	1483	(-)-Germacrene D
20	33.403	0.61	95	1493	cis-Muurolo-4(15),5-diene
21	34.323	0.40	89	1517	.gamma.-Cadinene
22	34.657	1.13	87	1525	.delta.-Cadinene
23	35.986	1.06	94	1559	Germacrene B
24	38.706	0.44	89	1630	Muurolol <alpha-,epi->
25	51.186	0.50	92	1994	1H-Naphtho[2,1-b]pyran, 3-ethenyldodecahydro-3,4a,7,7,10a-pentamethyl[3R(3.alpha.,4a.beta.,6a.alpha.,10a.beta.,10b.alpha.)

Chapitre V : Résultats et discussions

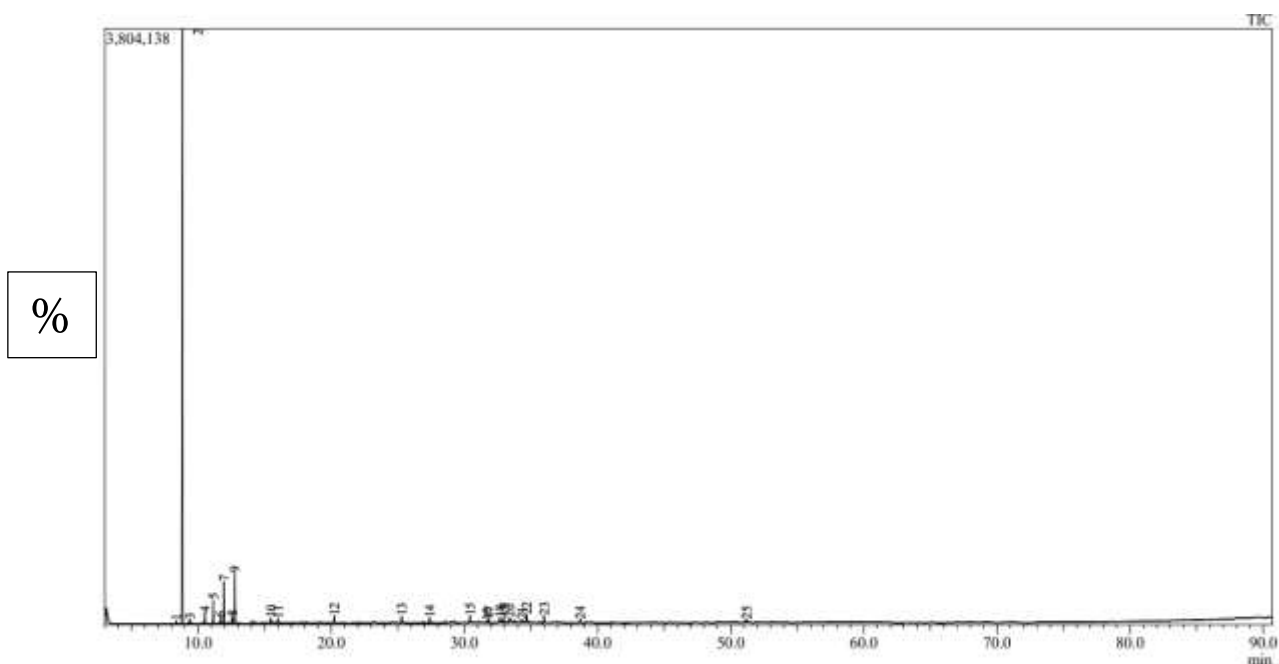


Figure 30. Chromatographie d'analyses physico-chimiques de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*.

Grace à ces résultats nous concluons que le composant actif dans l'activité antibactérienne de l'huile essentielle dans notre expérience est *l'α-pinène* pour sa présence par des taux élevé dans l'huile essentielle (tableau 15).

Le résultat d'analyse relatif à la composition chimique par le GC/MS de l'huiles essentielles nous montrer qu'une variation quantitative et qualitative profil chimique des huiles étudiées avec 25 composants dont trois constituants dominant de *J. phoenicea* qui sont respectivement *l'α-pinène* (71,23 %), *β-Phellandrene* (6.11%) et *δ--3-Carene* (5.04%), accompagnés d'autres constituants avec des pourcentages moins importants dans la même région mais à une période de récolte différentes (automne), l'analyse a conduit à l'identification de 48 composés dont le constituant dominants est toujours *l'α-pinène* (57,80 %) suivie de *d-Cadinene* (5.5%) et *Citronellyl valerate* avec (3.7%) (Djokhdem et al., 2022).

Notons qu'une variation de teneur et de pourcentage des composants ont été enregistrée dépendent du mois de collecte et la partie de la plante extraite (Elhouiti et al., 2017).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Actuellement, la recherche de nouvelles substances antimicrobiennes purement naturelles est la préoccupation suprême de la plupart des gens ainsi que la majorité des chercheurs. Avec plusieurs dizaines de milliers d'espèces de plantes différentes, le territoire algérien est un immense gisement de molécules actives d'origine végétale.

Notre présente étude a porté sur l'espèce *Juniperus phoenicea* qui appartient à la famille des *Cupressacées*, une des familles les plus importantes dans la flore Algérienne et la plus utilisée par les thérapeutes traditionnels.

Le travail que nous avons réalisé porte sur l'extraction des huiles essentielles et d'extrait éthanolique de la plante de *Juniperus phoenicea* et d'évaluer leur activité antibactérienne sur trois souche bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listéria innocua*).

L'extraction a été réalisée par hydrodistillation pour l'huile essentielle et par la macération pour l'extraction éthanolique, les rendements sont de (1%) pour l'huile essentielle et (1.83%) pour l'extrait éthanolique.

L'analyse des huiles obtenues par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC- MS) a permis d'identifier 25 composés volatiles différents dont l' α -pinène (71.43%), β - Phellandrene (6.11%) et δ --3-Carene (5.04%), comme composés majoritaires.

Nous avons remarqué que les extraits ont une activité antibactérienne sur les souches testées avec une intensité variable selon leur caractéristique. De plus, nous avons constaté que certains composés de l'huile sont responsables de cette activité suite aux analyses réalisés par la GC/MS. Ceci nous a permis de conclure qu'il y a un possible alternatif de protection et de prolongation de la vie de certains aliments par cette activité vis-à-vis les souches pathogènes testés, qui sont les plus fréquents et les plus dominants dans les intoxications alimentaires collectives.

L'alliance de la connaissance traditionnelle et de la recherche scientifique peut ouvrir de nouvelles perspectives passionnantes sur le plan de la recherche des substances de source naturelle biologiquement active. À la suite de ces résultats, il serait donc intéressant d'étendre l'éventail de ce travail :

-Une étude approfondie de la composition chimique de l'huile essentielle et du spectre d'action antimicrobien.

Conclusion et perspectives

-La détermination exacte de l'espèce utilisée est nécessaire pour éviter toute erreur possible.

-Le renforcement par un cadre juridique concernant les huiles essentielles et leur utilisation.

- D'utiliser les huiles essentielles dans la lutte contre les bactéries intractables, sachant qu'à ce jour le développement de bactéries n'a pas fait la preuve de sa résistance vis-à-vis des huiles essentielles, surtout le genévrier qui est très largement présent dans les milieux steppiques.

-Testant d'autres méthodes d'extraction et leurs influences sur le rendement et la composition chimique des extraits.

- Identification et expression des gènes impliqués dans la production des molécules responsables des activités antibactériennes.

-Aussi, il serait intéressant de faire des campagnes d'information et de sensibilisation de la population sur la meilleure façon d'utiliser les plantes et leurs huiles essentielles de point de vue qualité et quantité.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- **Abdelli, (2017)**. Caractérisation chimique et étude de quelques activités biologiques des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* et de *Thymus vulgaris*. Thèse doctorat. Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem.
- **Achak, (2008)**. Essential oil composition of *Juniperus phoenicea* from Morocco and Tunisia. *J. Essent. Oil Bear. Plants*, pp11, 137-142.
- **Adams, (2002)**. Geographic variation in the Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) of *Juniperus phoenicea*, *J. p. var. canariensis*, *J. p. subsp. eumediterranea*, and *J. p. var. turbinata*. *Biochemical Systematic Ecology* 30: 223-229.
- **Adams, (2011)**. Species Descriptions, Distribution Map and Plant Photo. In *Juniperus of the world: the genus Juniperus*, 3rd edition Trafford rev, USA . p 436.
- **Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Produits de Santé** : Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles : Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles [En ligne]. Mai 2008 ; Consulté le 12 Déc 2016. Disponible sur le site : <http://www.afssaps.sante.fr>.
- **Aissani, (1998)**. Variation de la phenylamine Ammonialyase et la peroxydase au cours de la germination de l'onion sec (*Allium cepa* L). Mémoire d'ingénieur d'état, Institut de biologie (Univ. Mostaganem), 65p.
- **Akrout, (1999)**. Etude des huiles essentielles de quelques plantes pastorales de la région de Matmata (Tunisie). Institut des régions arides, 4119 Médenine- Tunisie
- **Alibert, (1977)**. Organisation subcellulaire des voies de synthèses des composés phénoliques. *Physiol. Veg.* 15,279-301 p.
- **Allali, (2008)**. Phytothérapie of diabète in west Algeria . *Asian J. Chem.* 20 : 2701-2710 19)
- **Amer, (1994)**. Chemical and evaluation of *Juniperus phoenicea* as a hypoglycaemic agent. *J. Agric. Res.* 21 : 1077-1091.
- **Amiot, (2005)**. *Thymus vulgaris*, un cas de polymorphisme chimique pour comprendre l'écologie évolutive des composés secondaires. Thèse-doctorat-Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier. France.
- **Arvy, (2007)**. *F. Épices, aromates et condiments*. Édition Clerc- Saint- Amand- Montrond. N d'édition : 003063-02.2007. France.
- **Aryal, (2020)** : *Staphylococcus aureus- An Overview* [Internet]. *Microbe Notes*. 2020

Références bibliographiques

- **Audigie, (1995).** Principes des méthodes d'analyse biochimique. T1, 2ème ED. Doin, Paris, p. 44.
- **Augustin, (1999).** Modélisation de la dynamique de croissance des populations de *Listeria monocytogenes* dans les aliments. Thèse de Doctorat, Université Lyon 1.
- **Avlessi, (2012).** Chemical composition and Biological activities of the Essential oil extracted from the Fresh leaves of *Chromolaena odorata* (L. Robinson) growing in Benin. *ISCA Journal of Biological Sciences*, 1(3): 7-13.
- **Avril, (2000).** *Listeria*, Bactériologie clinique Troisième édition. Ellipse., 140-150
- **Aygun, (2006).** *Listeria* spp. in the raw milk and dairy products in Antakya, Turkey. *Food Control*. 17, 676-679
- **Baba Aissa, (2011).** Encyclopédie des plantes utiles : Flore Méditerranéenne (Maghreb, Europe méridionale) substances végétales d'Afrique, d'orient et d'Occident, 1er édition, El Maarifa, 10 avenue Abderrahmane Mira BEO Alger, Algérie. 158 -167-316.
- **Bahorun, (1997).** Substances Naturelles actives : La flore mauricienne une source d'approvisionnement potentielle. Université de Maurice. AMAS, Food and agricultural research council, Réduit, Mauritius, p83.
- **Barel, (1991).** The antimicrobial activity of the essential oil from *Achillea fragrantissima*. *Journal of Ethnopharmacology*. 33: 187-191.
- **Barrero, (2004).** Oxygenated terpenes and other constituents from Moroccan *Juniperus phoenicea* and *Juniperus thurifera* var. *Africana*. *Phytochemistry*,; 65(17): (2507–2515)
- **Bedi, (2001).** Composition chimique des huiles essentielles de *Chromolaena odorata* L. King Robinson (*Asteraceae*) Abidjan Côte d'Ivoire. *Journal de la Société Ouest Africaine de Chimie*. 11: 29-37.
- **Bedi, (2004).** Etude des effets antidouleurs des huiles essentielles de *Chromolaena odorata* et de *Mikania cordata*, par action sur la Lipoxygénase L-1 de soja. *Physical Chemical News*. 15: 124-127.
- **Bedi, (2010).** Effect of essential oil of *Chromolaena odorata* (*Asteracea*) from Ivory coast, on cyclooxygenase function of prostaglandin-H synthase activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 4(8): 535-538.
- **Bego, (2001).** Connaître l'essentiel sur les huiles essentielles. Collection aromathérapie pratique et familiale, Ed. MDB Paris, pp.2-3.

Références bibliographiques

- **Belaiche, (1979)**. Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1 : l'aromatogramme .éd. Maloine. Paris.
- **Belkacem, (2015)**. Contribution à l'étude du cortège floristique de l'espèce *Juniperus oxycedrus* (Cuprèssacées) dans la région de Tlemcen, Mémoire de master, Université Abou Bekr Belkaid, Algérie. 32p.
- **Bellakhder, (1997)**. La pharmacopée marocaine traditionnelle. Éd. Ibis Press, Paris, p (271–272).
- **Ben Embarek, (1994)**. Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 23, 17-34.
- **Benayad, (2013)**. Évaluation de l'activité insecticide et antibactérienne des plantes aromatiques et médicinales Marocaines. Extraction de métabolites secondaires des champignons endophytiques isolés de plantes Marocaines et activité anticancéreuse. [Thèse]. université mohammed v. faculté des sciences. rabat. 2013.
- **Bencheikh, (2005)**. Contribution à l'étude de la composition, de l'activité antimicrobienne et de la cytotoxicité des huiles essentielles de *Thymus fontanesii* et de *Foeniculum vulgare*. Mémoire de Magistère, Département de biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif.
- **Benjilali, (2004)**. Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. 17-59.
- **Benkhnigue, (2014)**. Catalogue des plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète dans la région d'Al Haouz-Rhamna (Maroc). *Anim Plant Sci* 23:3539–68.
- **Benlamdini, (2014)**. Étude floristique et ethnobotanique de la flore médicinale du Haut Atlas oriental (Haute Moulouya) Maroc. *J Appl Biosci* 78:6771–87.
- **Benoit, (2015)**. Etat des lieux sur l'aromathérapie dans les officines : enquête sectorielle dans le département de Vienne [Thèse]. Université de poitiers faculté de médecine et de pharmacie, 2015.
- **Berche, (1999)**. Physiopathologie et diagnostic bactériologique des infections materno-infantiles à *Listeria monocytogenes*. *Infections Néonatales II.*, 2, 33-39.
- **Binet, (1968)**. Physiologie végétale. Ed. Doin, Paris, pp.774-782.
- **Bonnaillie, (2012)**. Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.). *Revue de génie industriel*. Vol. 7. (2012). pp. 35-45.
- **Bonnier, (1990)**. La grande flore. Ed : Belin, Paris.

Références bibliographiques

- **Boudy, (1950).** guide du forestier en Afrique du nord. Tome IV, Paris ,274-278.
- **Boutamani, (2013).** Etude de la variation du rendement et de la composition chimique du *Curcuma longa* et *Myristica fragrans* en fonction du temps et de la technique utilisée. Université des sciences et de la technologie Houari Boumediene, Alger, 2013.
- **Boyle, (1995).** Spices and essential oils as perspectives. *American Perfumer Essential Oil Review*. 66: 25-28.
- **Brackett, (1991).** Survival of *Listeria monocytogenes* in whole egg yolk powders and in liquid whole eggs. *Food Microbiol.*, 8, 331-337.
- **Bruneton, (2009).** Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. 4e Ed : Lavoisier ; Paris. P.1269.
- **Brunton, (2004).** Pharmacognosie photochimie plantes médicinales 3ème édition. Paris.
- **Burt, (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food and Microbiology*. 94: 223-253.
- **Candan, (2003).** Antioxydant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achilla millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 87: 215-220.
- **Carillon, (2000).** La phytothérapie face à l'évolution médicinale. Ed :Phyto . 10-15.
- **Carrasco, (2006).** Predictive model of growth rate under different temperature and acids. *Food Science and Technology International.*, 12, 47-56.
- **Carson, (2002).** Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46: 1914–1920.
- **Catteau, (1991).** Le Genre *Listeria*. Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires., 3, 315-323.
- **Caude, (1996).** Méthodes chromatographiques. Dossier P1445. Base documentaire : Techniques d'analyse. vol ; papier TA2.
- **Cavaleiro, (2000).** Intraspecific chemical variability of the leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* from Portugal. *Biochem. Syst. Ecol.*, 29, 117,51183.
- **Chae, (2006).** Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. *Food Microbiol.*, 23, 250-259.
- **Chalchat, (1997).** Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. *J. Essent. Oil Res.*, 9: 67-75.

Références bibliographiques

- **Chavane, (2001).** Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *Journal of Food and Chemistry*. 75 : 509-512.
- **Chouiteh, (2012).** Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de *Glycyrrhiza glabra* [thèse] Oran : Université d'Oran 2012.
- **Colette-Keller, (2004).** Les plantes médicinales. ALS (séance du 25 Avril 2004). P 58.
- **Collin, (2000).** Quelques techniques d'extraction de produits naturels. *Info-essences*. 13 :4-5.
- **Copes, (2000).** Investigation of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses, *Rev. Argent. Microbiol.*, 32, 175-178.
- **Coque, (2008).** Dissemination of Clonally Related *Escherichia coli* Strains Expressing Extended-Spectrum β -Lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis*. févr 2008;14(2):195.
- **Couplan, (2000).** Dictionnaire étymologie de botanique. Nestlé (Ed). Luisane. Paris, 283p.
- **Courtial, (2005).** Précis d'aromathérapie vétérinaire à l'usage des pharmaciens d'officine [thèse]. Université de Nante, faculté de pharmacie. 2005.
- **Courtial, (2005).** Précis d'aromathérapie vétérinaire à l'usage des pharmaciens d'officine [thèse]. Université de Nante, faculté de pharmacie. 2005.
- **Cowan, (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology*. 12 : 564-582.
- **Cox (2000).** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88: 170-175.
- **Croxen, (2010).** Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*. janv 2010;8(1):26-38.
- **Cusson, (2007).** L'Aromathérapie & Les huiles essentielles [Livre En ligne]. 2007.
- **Dane, (2015).** Phytochemical analysis of methanolic extracts of *Artemisia absinthium* L. 1753 (Asteraceae), *Juniperus phoenicea* L. and *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast, 1892 (Cupressaceae) and evaluation of their biological activity for stored grain protection. *Arab. J. Sci. Eng*.
- **Davies, (1998).** The microbiology of meat and poultry, Blackie academic and professional, London. 15, 4668-4674.
- **Dawidar, (1991).** Sesquiterpenes and diterpenes from *Juniperus phoenicea* L. *Pharmazie*, 46, 472-473.

Références bibliographiques

- **De Maack, (1994).** Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse. Dossier : P2614. vol papier n°: TA3. Bases documentaires, Techniques d'analyse.
- **De Sousa, (2004).** Melissa officinalis L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 56: 677-681.
- **Deans, (1987).** Antibacterial properties of plant essential oils. International Journal of Food Microbiology 5:165-180.
- **Derwich, (2010).** Comparative Study of The Chemical Composition of The Leaves Volatil Oil of Juniperus phoenicea and Juniperus oxycedrus . Middl-Eas.t J.Res . 5(5): 416-424.
- **Derwich, (2011).** Aromatic And Medicinal Plants Of Morocco: Chemical Composition of Essential Oils of Rosmarinus Officinalis And Juniperus phoenicea. I JABPT . 2(1):145-153. 74).
- **Desjobert, (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.
- **Djenane, (2006).** Effect of lactic acid bacteria on beef steak microbial flora stored under modified atmosphere and on Listeria monocytogenes in broth cultures.
- **Djokhdem et al., (2022).** Preservative effect of Juniperus phoenicea essential oil and ethanolic extract against Escherichia coli and Staphylococcus aureus in soft fresh cheese during storage. Journal of Food & Nutrition Research, 61(1).
- **Dob, (2008).** Chemical Composition of the Essential Oil of Juniperus phoenicea L. from Algeria, The Journal of essential oil research,; 20(1): 15–20.
- **Dorman, (2000).** Antimicrobial agents from plants: antimicrobial activity of plant volatils oils. Journal of Applied Microbiology. 88: 308-316.
- **Dorosso Sonate (2002).** Composition chimique des huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone soudanienne du Burkina Faso : valorisation. Université Ouagadougou. 2002.
- **Duke, (1998).** Phytochemical database. Beltsville, MD, USA: Beltsville Agricultural Research Center.
- **Dung, (2008).** Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of Cleistocalyx operculatus (Roxb.) Merr and Perry buds. Food and Chemical Toxicology 46: pp.3632-3639.

Références bibliographiques

- **Dykes, (2003).** Influence of the adaptation of *Listeria monocytogenes* population structured or homogenous habitats on subsequent growth on processed meat. *Int. J. Microbiol.*, 25, 301-306.
- **El-Koffi, (2010).** Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty three Ivorian plants. *J. Animal & Plant Sci. Vol. 5.* (2010). pp. 550-558.
- **Eloukili, (2013).** Valeur nutritive de l'armoise blanche (*Artemisia herba- alba*) comparée à l'unité fourragère de l'orge. Mémoire de master. Université d'Abou Berk Belkaid, TlemcenAlgérie2013.
- **El-Sawi, (2007).** Chemical composition, cytotoxic activity and antimicrobial activity of essential oils of leaves and berries of *Juniperus phoenicea* L grown in Egypt. *Afr. J. Tradit. Complementary Altern. Med.*, 4(4), 417- 426. flavonoides: A structure-system-activity-relationship (SSAR) analysis.
- **Euzèby, (2004).** Valid publications of new names or new combinations: making use of the Validation Lists. *ASM News*, 70, 258-259.
- **Farber, (1992).** Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 15, 103-105.
- **Fekih, (2005).** Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre *Pinus* poussant en Algérie [thèse].Tlemcen : Université Abou Bekr Belkaid. 2015.
- **Flessa, (2005).** Survival of *Listeria monocytogenes* on fresh and frozen strawberries. *Int. J. Food Microbiol.*, 101, 255-262.
- **Fouché, (2000).** Les plantes medicinale : de la plante au médicament. Exposition temporaire de 19.09 au 30.09.2000.
- **Franchrome, (2001).** L'aromathérapie exactement : encyclopédie de l'utilisation des extraits aromatiques. Paris : Edition Roger Jollois. 2001.
- **Frankel, (1995).** *Agric. Food. Chem.*, 43:221- 235.
- **Gachkar, (2007).** Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem.*, 102: pp.898-904.
- **Garcia-Salas, (2010).** Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules. Vol. 15.* (2010). pp. 8813- 8826.
- **Garneau, (2004).** Le matériel végétal et les huiles essentielles. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. 1-16.

Références bibliographiques

- **Ghestem, (2001).** Le préparateur en pharmacie. Dossier 2, - Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie, Homéopathie. Ed. TEC et DOC, Paris.
- **Gibbons, (2006).** Investigation for possible source(s) of contamination of ready-to-eat meat products with *Listeria* spp. and other pathogens in meat processing plant in Trinidad. *Food Microbiol.*, 23, 359-366.
- **Gobat, (1990).** Epidemiological studies on *Listeria* spp. in slaughter-house. *Fleischwirtsch.*, 70, 1448-1450.
- **Gonzalez-Gallego, (2010).** Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *British Journal of Nutrition.* 104: S15-S27.
- **Gordon, (2003).** The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology.* 149(12):3575-86.
- **Gorski, (2003).** Attachment of *Listeria monocytogenes* to radish tissue is dependent upon temperature and flagellar motility. *Appl. Environ.*, 69, 258-266.
- **Grosjean, (2009).** Bactériologie et Virologie pratique. De Boeck. 2009.
- **Guignard, (2004).** Botanique- systématique moléculaire- Ed. Masson. 13^e édition.
- **Haddad, (2016).** Contribution à l'étude des huiles essentielles de *Myrtus communis* L. [thèse]. Université Mouloud Mammeri. Tizi ousou, 2016.
- **Hamad, (2017).** Separation and Identification the Speciation of the Phenolic Compounds in Fruits and Leaves of Some Medicinal Plants (*Juniperus phoenicea* and *Quercus coccifera*) Growing at Al –Gabal Al –Akhder Region (LIBYA). *Indian J of Pharmaceutical Education and Research.*;51(3)Suppl:S299-303.
- **Hammer, (1999).** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *Journal of Applied Microbiology.* 86: 985–990.
- **Hammoudi, (2015).** Activités biologiques de quelques métabolites secondaires extraits de quelques plantes médicinales du Sahara méridional algérien, Thèse de Doctorat, Université KASDI Merbah, Ouargla ,2015.
- **Harbonne, (1994).** Polyphenolics. In : Mann, J ; Davidson, R.S ; Hobbs, J.B ; Banthorpe, D.V et Harbonne, J.B(Eds) *natural products : Their chemistry and biological significance.* Longman scientific and technical, London, pp 361-388.
- **Harfouche, (2005).** Les Ressources Génétiques Forestières Nord-Africaines et Leur Conservation. *Revue Forestière Française* (1), pp.15-32. réserve du bois. *Ann. For. Sci.*, 57: 819-829.

Références bibliographiques

- **Hayes, (1997).** In vitro cytotoxicity of Australian tea tree oil using human cell lines. *Essential Oil Research*. 9: 575-582.
- **Heath, (1981).** *Source Book of Flavours*. Westport: Avi, pp.890.
- **Hill, (1959).** The Adansonian Classification of the Staphylococci. *Microbiology*. 20(2):277-83.
- **Hollman, (1997).** Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed and pharmacotherapy*, 51 :305-310.
- **Huete, (2012).** *Huiles essentielles pour tous les jours*. Editions Artémis, 223p.
- **Iserin, (2001).** *Encyclopedie des plantes medicinales*. Ed : Larousse Bourdasse .Paris . p.335.
- **Jammaledine, (2010).** Extraction et caractérisation de la composition des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* et *Juniperus oxycedrus* du Moyen Atlas [Mémoire]. Université sidi mohammed ben abdellah. Fès, 2010
- **Johnson, (1988).** Fate of *Listeria monocytogenes* in tissues of experimentally infected cattle and in hard salami. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 497-501.
- **Juven, (1994).** Factors That Interact with the Antibacterial Action of Thyme Essential Oil and Its Active Constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, 76: 626-631.
- **Kalemba, (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10: 813-829.
- **Kaloustian, (2012).** *La connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie*. Paris. Edition Springer. 2012.
- **Kobayashi, (2006).** L'utilisation de la PCR en temps réel pour l'identification bactérienne rapide des ostéomyélites à cultures négatives. *Rev Rhum*. 1 déc 2006;73(12):1419-21.
- **Lagunez-Rivera, (2006).** Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- **Lahlou, (2004).** Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*. 18 : 435-448.
- **Lahsissene, (2009).** Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc occidental). *Rev Botan* 186:1–26.
- **Larpent, (1997).** *Mémento technique de microbiologie*. Tec et Doc, Lavoisier. Paris.
- **Larpent, (2004).** *Listeria*. Tec et Doc, 3ème éd., Lavoisier. Paris.

Références bibliographiques

- **Lawrence, (2001).** Is *Listeria monocytogenes* an Important Pathogen for Prosthetic Joints? JCR: Journal of Clinical Rheumatology. USA., 1, 34-37.
- **Loi 85-5 du 16 février 1985 :** Relative à la protection et à la promotion de la santé.
- **Louis, (2010).** Plantes médicinales, Alpen, Tilier 45012 Paris, France. 118p.
- **Luck, (1995).** Antimicrobial action of preservatives antimicrobial food additives..
- **Ludwig, (2009).** Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, Vol 3 The Firmicutes, 2009 p. 15-7.
- **Lugasi, (2003).** The role of antioxydant phytonutrients in the prevention of diseases. Acta biologica Szegedientis. 1-4, 119-125p.
- **Macheix, (1990).** Fruits phenolic acids. CRC Press Boca Raton Florida 1990. 3 :105-110.
- **Maciel, (2008).** Survey of *Listeria* spp. in matched clinical, food and refrigerator samples at home level in Brazil. Food Control ,19, 1011–1013.
- **Maiza, (1993).** Pharmacopée traditionnelle saharienne: Sahara septentrional, Actes du 2ème Colloque Européen d'Ethnopharmacologie et de la 1ème Conférence internationale d'Ethnomédecine, Heidelberg. PP : 169-171.
- **Mandai, (2005).** Découverte de très vieux genévriers de Phénicie (*Juniperus phoenicea*) dans les gorges de l'Ardèche (France). J.Bot.Soc.Bot.France 29: 53-62.
- **Mann, (2000).** The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). Letters in Applied Microbiology, 30: 294-297.
- **Maurice, (1997).** De l'herboristerie d'autan à la phytothérapie moléculaire du XX^e Siècle, Ed : Lavoisier, Paris, P 12-14..
- **Mazari, (2010).** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil isolated from Algerian *Juniperus phoenicea* L and *Cupressus sempervirens* . Medicinal Plants Research. (10) : 959-964.
- **Mazur, (2003).** Morphological variability of *Juniperus phoenicea* from three distant localities on Iberian peninsula . Acta Societatis Botanicorum Poloniae. 72 (1): 71-78p.
- **Mbarek, (2007).** Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research. 40: 839-847.
- **Medini, (2006).** Composition and variability of the essential oils of the leaves from *Juniperus phoenicea* L. from Tunisia. Revue des region arides. 1: 185-189p.

Références bibliographiques

- **Mehani, (2015).** Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'Eucalyptus camendulensis dans la région d'Ouargla, thèse doctorat. Université de kasdi Merbah, Ouargla, 2015.
- **Melanie, (2006).** Genetic Variation in Five Mediterranean Populations of Juniperus phoenicea as Revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers . Annals of Botany .97: 299-304.
- **Messai, (2004).** Étude phytochimique d'une plante médicinale de l'est algérien (Artemisia herba-alba) thèse doctorat .Université Mentouri Constantine. 2004.
- **Millet, (2006).** Control of Listeria monocytogenes in raw-milk cheeses. Int. J. Food Microbiol., 108, 105-114.
- **Monti, (2002).** Effect of different terpene-containing essential oils on permeation of estradiol through hairless mouse skin. International Journal of Pharmaceutics, 237: 209-214.
- **Muriana, (1997).** Effect of pH and hydrogen peroxide on heat inactivation of Salmonella and Listeria in egg white. Food Microbiol., 14, 11-19.
- **Nasri, (2011).** Chemical compounds from Phoenicia Juniper berries (Juniperus Phoenicea). Nat.Prod. Res 25(18):1733-42.
- **Nicolas, (1993).** Rôle de la consommation d'ensilage dans la listériose ovine. Microbiol. Alim. Nutr., 1, 71- 76.
- **Nostro, (2000).** Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity, 30 (5), 79 – 384.
- **Notermans, (2000).** Risk assessment of Listeria monocytogenes in fish products: general principles, mechanism of infection and the use of performance standard to control human exposure. Int. J. Food Microbiol., 65, 223-229.
- **O'driscoll, (1996).** Adaptive acid tolerance response in Listeria monocytogenes: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. Appl. Environ. Microbiol., 62, 1693-1698.
- **Ouis, (2015).** Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil [thèse]. Université d'Oran, 2015.
- **Oussou, (2009).** Etude chimique et activité biologique des huiles essentielles de sept plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. Doctorat de l'Université de Cocody-Abidjan, 241p.

Références bibliographiques

- **Palumbo, (1991).** A review of methods for detection of the psychotropic foodborne pathogens *L. monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila*. *J. Food Saf.* 11, 105-122.
- **Paré, (1997).** Procédé assisté par micro-ondes. Info-essences, Bulletin sur les huiles essentielles, 4 :p.4.
- **Paris, (1981).** Abrégé de matière médicale (pharmacognosie) Tome. Ed. Masson p.339.
- **Pearson, (1990).** *Listeria monocytogenes*-threat to a safe supply: a review. *J. Dairy Sci.*, 73, 912-928.
- **Perni, (2005).** Biofilm development by *Listeria innocua* in turbulent flow regimes. *Food Control* (in press).
- **Phan-Thanh, (1998).** Physiological and biochemical aspects of the acid survival of *Listeria monocytogenes*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 44, 183-191.
- **Pibiri, (2005).** Assainissement microbiologique de l'air et de systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat : Faculté Environnement Naturel, Architectural et Construit, EPFL (Suisse). 161p.
- **Pierangeli, (2009).** Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Chromolaena odorata* (L. f.) King and Robinson and *Uncaria perrottetii* (A. Rich) Merr. Extracts. *J. Medicinal Plants Res.* 3(7) : 511-518.
- **Platzer, (2002).** Application de la RMN à la détermination des structures. Base Documentaire, Techniques d'analyse, Dossier : P1092, vol. TA1.
- **Porter, (2001).** Essential oils and their production. *Crop & Food Research.* Number 39.
- **Pradeau, (2007).** Chromatographie planaire : applications. Dossier P1476, Base documentaire : Techniques d'analyse, vol. papier n° TA2.
- **Qnais, (2005).** Antidiarrheal effect of *Juniperus phoenicea* L. leaves extract in rats. *J. Biol. Sci.*, 8(6), 867-871.
- **Quezel, (1963).** Nouvelle Flore d'Algérie et de régions Désertiques Méridionales. Tomes I et II. CNRS.
- **Rai, (2003).** plant derived-antimycotics: potential of Asteraceous plants, In : plant-derived antimycotics : Current Trends and Future prospects, Haworth press, N-York, Londin, Oxford. 165-185.
- **Rameau, (2008).** Flore forestière française: Région méditerranéenne. Institut pour le développement forestier. P 2426.

Références bibliographiques

- **Rashid, (2010).** Quantitative determination of antioxidant potential of *Artemisia persica*. *Analele Universității din București – Chimie (serie nouă)*, vol. 19 №1, pp. 23-30.
- **Rasooli, (2004).** Inhibitory effect of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*, 15, pp. 479-483.
- **Rezzi, (1999).** Intraspecific Chemical Variability of The Leaf Essential Oil of *Juniperus phoenicea* subs . *turbinata* from Corsica. *Biochemical systematics and Ecology* .29: 179-188.
- **Richter, (1993).** *Métabolisme des végétaux, physiologie et biologie et biochimie, les composés phénoliques*, Edition press polytechnique, France, pp 302-304.
- **Rock, (2003).** Stress oxydant, micronutriments et santé. Inra- CRNH, unité des maladies métaboliques et micronutriments 63122 St Genès Champanelle. Université d'été de nutrition – Clermont-Ferrand, 37-42.
- **Rocourt, (1997).** Foodborne listeriosis. Rapport trimestriel des statistiques sanitaires mondiales., 50, 67-73.
- **Rocourt, (2002).** Analyse du risque *Listeria monocytogenes* dans les aliments prêts à consommer. Cours National d'Hygiène et de Microbiologie des Aliments. IPA., 1-62.
- **Rudolf, (1968).** Gas-liquid chromatography of terpenes XVI, the volatile oil of the leaves of *Juniperus Aster*. *Ashee. Can. J. Chem.*, 46 (5): 83-679.
- **Sanagor, (2006).** Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Université.19-22 P.
- **Scheffer, (1996).** Various methods for the isolation of essential oils. *Phytother. Res.*, 10:S6-S7.
- **Shahidi, (1995).** Food phynolics : sources, chemistry, effects and application. Technologic publishing, Laucaster, 331p.
- **Sikkema, (1995).** Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews* 59: 201-222.
- **Sipailiene, (2006).** Antimicrobial Activity of commercial samples of thyme and marjoram oils. *Journal of Essential Oil Research*. 18: 698-703.
- **Skovgaard, (1988).** Detection of *Listeria* spp. in feaces from animals, in feeds, and in raw foods of animal origin. *Int. J. Food Microbiol.*, 6, 229-242.
- **Small, (2001).** Herbes culinaires pour nos jardins CNRC de pays froid (Français) Livre broché. Nos jardins de pays froids. Ed : CNRC. Pp 90.

Références bibliographiques

- **Spencer, (2010).** Beyond antioxidants: the cellular and molecular interactions of flavonoids and how these underpin their actions on the brain. *The Proceedings of the Nutrition Society.* 69: 244–260.
- **Surk, (2003).** Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal Applied Microbiology;* 99: 665-674.
- **Swaminathan, (2007).** The epidemiology of human listeriosis. *Microb. Infect.,* 9, 1236-1243.
- **Thomas, (2011).** Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification : Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*)". Thèse de doctorat, Universités d'Orléans. 2011.
- **Toure, (2015).** Etude chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de Cote d'Ivoire. [Thèse]. Cote d'Ivoire, 2015.
- **Tsukamoto, (2013).** High Prevalence of Cross-Resistance to Aminoglycosides in Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* Clinical Isolates. *Chemotherapy.* 2013;59(5):379-84.
- **Umezu, (1999).** Anticonflict effects of plant-derived essential oils. *Pharmacology Biochemistry and Behavior,* 64: 35-40.
- **Unlu, (2002).** Compositions and the in vitro antimicrobial activities of the essential oils of *Achilla setacea* and *Achillea teretifolia* (Compositae). *Journal of Ethnopharmacology.* 83: 117-121.
- **Vernon, (1976).** Quelques épices et aromates et leurs huiles essentielles. *APRIA,* 2 (10) : 151-166.
- **Viaud, (1993).** Les huiles essentielles, qualité distillation. *Gnoma, Revue électronique.*
- **Wan, (1998).** The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology.* 84: 152-158.
- **Wang, (2010).** Comparative study of the antioxidant activity of forty-five commonly used essential oils and their potential active components. *Journal of Food and Drug Analysis,* Vol. 18, №1, pp. 24-33.
- **Wannissorn, (2005).** Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia.* 76: 233-236.

Références bibliographiques

- **Wendakoon, (1995).** Inhibition of amino acid decarboxylase activity of Enterobacter aerogenes by active components in spices. Journal of Food Protection 58: 280-283.
- **Wichtel, (1999).** Plantes thérapeutiques : tradition, pratiques officinales, science et thérapeutiques. Ed. Tec et Doc.
- **Zaika, (2003).** Growth kinetics and cell morphology of Listeria Scott A as affected by temperature, NaCl, and EDTA. J. Food.Prot., 66, 1208-1215.
- **Zani, (1991).** Studies on the Genotoxic Properties of Essential Oils with Bacillus subtilis rec-Assay and Salmonella/Microsome Reversion Assay. Planta Medica 57: 237-241.

Annexes

Annexe N° 1

Appareils et équipements	Verreries et petit matériel
-Agitateur horizontale.	-Tube à essai.
-Bain marie.	-Béchers.
-Balance (scout).	-Erlenmeyers.
-Etuve (Mettler).	-Pipettes graduées.
-Évaporateur rotatif.	-Micropipettes.
-Plaque chauffante.	-Les embouts.
-Spectrophotomètre UV-V (JENWAY).	-Cuves.
-Broyeur électrique.	-Spatules.
-Vortex.	-Boîtes de pétri.
-Réfrigérateur.	-Flacons.
-Autoclave.	-Pipettes Pasteur.
	-Anse de platine.
	-Bec Bunsen.
	-Papier aluminium.
	-Gants.
	-Seringue.

Produits chimiques :

Les produits chimiques utilisés pour réaliser l'extraction et déterminer l'activité antibactérienne sont :

-Les solvants de l'extraction : éthanol à 70%.

-Eau distillée.

-Eau physiologique.

-tween 20.

-Poudre de *Juniperus phoenicea*.

Annexe 02

Milieux de culture utilisés

Milieu BrainHeart Infusion Broth (BHIB)

BHIB	
Extrait cœur-cervelle	17.5g
Peptone pancréatique de gélatine	10.0g
Chlorure de sodium	05.0g
Phosphate di sodique	02.5g
Glucose	0.2g
Eau distillée	1000ml

Milieu Mueller Hinton Agar (MHA)

MHA	
Hydrolysate de caséine (peptone)	17.5 g
Extrait de viande	2.0 g
Amidon	1.5 g
Calcium	20 à 25 mg
Magnésium	10 à 12.5 mg
Agar	15 g
Ph	7.4+/-0.2
Eau distillée	1 L

Milieu Mueller Hinton Broth (MHB)

MHB	
Infusion de viande	2,0
Hydrolysate de caséine	17,5
Amidon de maïs	1,5
pH final	7,3 ± 0,1
Ca ²⁺	20 - 25 mg/L
Mg ²⁺	10 - 12,5 mg/L