



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique
جامعة الشهيد حمه لخضر الوادي
Université Echahid Hamma Lakhdar D'el-Oued
كلية علوم الطبيعة والحياة
Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie
قسم البيولوجيا الخلوية والجزيئية
Département De Biologie Cellulaire Et Moléculaire

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en Sciences
Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

THEME

**Extraction et Caractérisation physico_chimique et biologique
des huiles essentielles extraits à partir d'une plante
médicinale (*Cotula cineria*) de la région d'El oued**

Présenté par :

M^{me} ARAR Ouidad

M^{me} GHOUMA Thouraya

Devant le jury composé de:

Présidente :	M ^{me} AOUMEUR Meriem	M.A.A. Université d'El Oued
Promotrice :	M ^{me} MAHBOUB Nasma	M.C.B . Université d'El Oued
Examinatrice :	M ^{me} YOUMBAI Asma	M.A.B. Université d'El Oued

Année universitaire : 2018/2019

Remerciements

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

Pour les joyaux de ma vie "mes parents" sont la source de ma réussite, je souhaite qu'ils trouvent à travers ce mémoire le faible témoignage de leurs efforts et sacrifices.

Ce travail a été réalisé sous la direction de Madame MAHBOUB Nasma, Maître de conférence B en faculté sciences de la nature et de la vie à l'université Echahid Hamma Lakhdar, nous sommes très heureux d'exprimer notre profonde gratitude pour notre honneur en nous guidant dans la poursuite de ce travail. Sur l'attention que j'ai portée à cette mémoire, pour ses conseils et sa rigueur en action. Nous avons l'honneur de nous appuyer sur ses connaissances et son expérience, qui, par ses qualités humaines, resteront notre modèle.

Un grand merci à Madame OUIMEUR Meriem, Maître assistant A à l'université E Chahid Hamma Lakhdar, pour avoir assuré la présidence du jury de cette mémoire, malgré toutes ses responsabilités et ses nombreuses occupations.

Nous tiens tout particulièrement à remercier madame YOUMBAI Asma, Maître assistant B à la Faculté des sciences de la nature et de la vie de l'Université Echahid Hamma Lakhdar, d'avoir accepté de juger le travail de notre thèse en tant qu'examinatrice.

Sans oublier de remercier vivement M^{elle} SANA Responsable du laboratoire pédagogique de faculté de la nature et de la vie d'Université d'EL-OEUD pour sa aide matériel et moral.

Ouidad et Thouraya

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma mère ... ARAR Ouarda

A mon père, école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger. Que dieu le gardes et le protège....TAHAR Ghouma

A mon marie SAADANI Abdelrazak qui a été toujours à coté du moi pendant tous mes études...merci pour tous mon amour, je ne peux jamais oublier tous ce que vous avez faire pour moi

A Ma deuxième famille ... famille de mon marie saadani ainsi que chaque instant de bonheur qu'ils m'ont procuré, fasse dieu que je puisse les honnorés

A tout mes frères, Faouzi, Yaakoub ,zakaria ,soufianne, akram et. Ainsi que pour mes sœurs Moufida ,Mouna et chaima . yassine et les petites Dhia Eldhinne , Widjdanne ,Rihamme ,Hazem Et Rimasse a qui je souhaite le succès dans leurs études .

Mon binôme Arar Ouidad ,mais seulement les amis laissent des empreintes dans mon cœur. Fatma Elzouhra ,Souasan, Marwa ,Amal, Oum Elkhir ,Hanane ,Sara et enfin Soumaya

A mes amis de spécialité de biochimie appliquée Finalement, on est profondément reconnaissantes à toute personne qui nous a aidés de près ou de loin, directement ou indirectement durant ce passage.

Thouraya

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma mère ... ARAR Yasmina

A mon père, école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger. Que dieu les gardes et les protège...ARAR Brahim

Et Je dédieaussi ce modeste travail à ma douzième parents SLIMANI Belgasem et sa femme qui est ma sœur ARAR Aouatef qui ont été toujours à coté dans tous ma vie.

A mon mari MAHMOUDI Yacinequi a été toujours à coté du moi pendant tous mes études...merci pour tous mon amour, je ne peux jamais oublier tous ce que vous avez faire pour moi.

A Ma deuxième famille ... Famille de mon marie MAHMOUDI ainsi que chaque instant de bonheur qu'ils m'ont procuré, fasse dieu que je puisse les honnorés

A tout mes frères, Saad allah ; Mouhamed et. Ainsi que pour mes sœurs, Radia ; Aouatef ; Hadia ; Chahra zeed ; Khadoudja a qui je souhaite leLe meilleur dans leurs vies et tous leurs maris, Madjd ; Belgasem ; Nour el din ; Salah.

Mon binôme CHOUMATHouraya, mais seulement les amis laissent des empreintes dans mon cœur. Ilham, Fatma Elzouhra, Souasan, Marwa, Amira, Amal, Nawal, Oum Elkhir, Hanane, Sara, et enfinSoumaya

A mes amis de spécialité de biochimie appliquée Finalement, on est profondément reconnaissantes à toute personne qui nous a aidés de prés ou de loi, directement ou indirectement durant ce passage.

Ouidad

استخلاص ودراسة الخصائص الفيزيائية الكيميائية والبيولوجية للزيوت الأساسية المستخرجة من (*cotula cineria*)
في منطقة الواد

ملخص

هذا العمل هو جزء من دراسة التراث النباتي الوطني وخاصة النباتات الطبية ، التي لا يزال معظمها دون مساس ويتطلب دراسات معمقة ، لذلك سيكون هدفنا هو إستخراج الزيوت الأساسية للجزء الجوي والزهور لنبات *cotula cineria* وجدت في منطقة وادي سوف ودراسة خواصها الحسية و الفيزيائية الكيميائية بما في ذلك قياس pH وقياس الكثافة ومؤشر الانكسار من ناحية. ومن ناحية أخرى ، قياس مؤشر الحمض واستر واليود والتصبن. علاوة على ذلك ، دراسة النشاط البيولوجي (مضادات الأكسدة باستخدام DDPH ومضاد للجراثيم). قدر المرود من الزيوت الأساسية من الزهور والجزء الجوي حوالي : 2.54 % ، و 1.07 % على التوالي ، اما بالنسبة للخصائص الحسية فهي تمتلك رائحة ثابتة ولزجة مع اللون الأصفر في الجزء الجوي والأزرق ثم يتحول الى الشفاف في الأزهار. الخاصية الفيزيائية والكيميائية الموجودة في الزيوت الأساسية من الزهور والجزء الجوي لهذا النبات قدرت 8.39 و 8.60 للحموضة ، والكثافة ب0.95 و 0.90 ومؤشر الانكسار ب 1.33350 و 1.33375 بالنسبة للزهور و الجزء الهوائي على التوالي . اما مؤشر اليود قدر ب 0.0028 و 0.0054 ، ومؤشر الحمض ب 0.0564 و 0.01128 ، ومؤشر الاستر حوالي 1.056 و 3.915 ومؤشر التصبن من زيوتنا أعطى القيم 4.0278 و 1.112 من الزهور والجزء الجوي على التوالي. بالإضافة إلى نشاط مضادات الأكسدة أيضًا ، أظهر أن قيمة IC₅₀ لكلا الزيوت الأساسية (بقيمة 45.98 ml / mg و 79.28 ml / mg من الزيت العطري من الزهور والجزء الجوي من *Cotula Cineria* على التوالي) اما بالنسبة لحمض الأسكوربيك يملك نشاطية عالية وذلك لانه يملك IC₅₀ بقيمة 0.04%. وبالتوازي ، تم تحديد نشاط مضادات الميكروبات على سلالتين بكتيريتين *Eshrisha coli et pseudomonas aeruginosa* ، و أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أنها النبات يملك حساسية منخفضة بتركيزات مختلفة من هذا الزيت الأساسي (منطقة التثبيط هي 6 إلى 9 mm) ، من ناحية أخرى ، لا تزال هذه النتائج منخفضة للغاية مقارنة بالمضادات الحيوية المستخدمة (من 10 mm حتى 13 mm لـ *Eshrisha coli* ، من 13mm إلى 15 mm لـ *pseudomonas aeruginosa*)

الكلمات المفتاحية: النباتات الطبية ، الزيوت العطرية ، نشاط مضادات الأكسدة ، نشاط مضاد للجراثيم

Extraction et Caractérisation physicochimique et biologique des huiles essentielles extraits à partir d'une plante médicinale (*cotula cineria*) de la région d'El oued

Résumé

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'étude du patrimoine botanique national surtout les plantes médicinales dont une grande partie reste encore vierge et nécessite des études approfondis, alors notre objectif sera une extraction des huiles essentielles de la partie aérienne et les fleurs de *cotula cineria*, de la famille des *Astraceae* se trouve dans la région d'Oued Souf et l'étude leurs propriétés organoleptique et identifier les paramètres physico-chimiques, mesure de pH, mesure de la densité et l'indice de réfraction d'une part. Et d'autre part, mesure l'indice d'acide, l'indice d'ester, l'indice d'iode et l'indice de saponification. Par ailleurs, l'étude de l'activité biologique (Antioxydante en utilisant DDPH et Antibactérienne). le rendement d'extraction des huiles essentielles des fleurs et de la partie aérienne est d'environ 2,54% et 1,07% respectivement, avec la présence d'une odeur persistante et visqueuse Artémises, avec la couleur jaune dans la partie aérienne et bleu puis elle transforme à transparent dans les fleurs. Concernant les propriétés physico-chimiques, on trouve les huiles essentielles des fleurs et de la partie aérienne possèdent des caractères basiques avec le valeur de pH 8,39 et 8,60 respectivement, la densité est de 0.95 et 0.90 respectivement toujours et l'indice de réfraction est 1,33350 pour les fleurs et 1,33375 pour la partie aérienne. L'indice d'iode est d'environ 0,0028 et 0,0054, en parallèle, l'indice d'acide égale 0,0564 et 0,01128, l'indice d'ester ayant la valeur 1,056 et 3,915 et l'indice de saponification de nos huiles a donné les valeurs 4,0278 et 1,112 des fleurs et la partie aérienne respectivement. Aussi bien l'activité antioxydante, montre que les deux huiles essentielles présentent IC_{50} 45,98mg/ml et 79,28mg/ml des huiles essentielles des fleurs et la partie aérienne de *cotula cineria* respectivement) ont une grande capacité de piéger le radical DPPH avec la valeur de IC_{50} 0,04% pour l'acide ascorbique. En parallèle, l'activité antimicrobienne a été déterminée sur deux souches bactériennes: *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, les résultats obtenus montrent que les deux souches testés possèdent une faible sensibilité avec différents concentrations de nos huiles essentielle (Zones d'inhibitions d'*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* est compris entre 6 et 9 mm). Par contre ces résultats restent très faible par rapport l'antibiotique utilisé (Amoxyclav de telle façon que la zone d'inhibition est entre 10 et 13 mm pour *Escherichia coli* et entre 13 à 15mm pour *Pseudomonas aeruginosa*).

Mots clés: plantes médicinales, *Cotula cinerea*, huiles essentielles, Activité antioxydante, Activité antibactérienne.

Extraction and Physicochemical and Biological Characterization of Essential Oils Extracted from a Medicinal Plant (Cotula Cineria) in El Oued Region

summary

This work is part of the study of national botanical heritage especially medicinal plants, much of which remains untouched and requires in-depth studies, so our goal will be an extraction of essential oils from the aerial part and the flowers of cotula cineria, from the family of Astraceae is found in the region of Oued Souf and the study their organoleptic properties and identify physico-chemical parameters, pH measurement, density measurement and refractive index on the one hand. And on the other hand, measure the acid number, the ester index, the iodine number and the saponification index. Moreover, the study of biological activity (Antioxidant using DDPH and Antibacterial). the extractive yield of the essential oils of the flowers and the aerial part is about 2.54% and 1.07% respectively, with the presence of a persistent and viscous scent Artémises, with the yellow color in the aerial part and blue then she turns to transparent in the flowers. Regarding physicochemical properties, we find the essential oils of the flowers and the aerial part possess basic characters with the value of pH 8.39 and 8.60 respectively, the density is 0.95 and 0.90 respectively and the refractive index is 1,33350 for the flowers and 1,33375 for the aerial part. The iodine number is about 0.0028 and 0.0054, in parallel the acid number is 0.0564 and 0.01128, the ester number being 1.056 and 3.915 and the saponification index of our oils gave the values 4,0278 and 1,112 of the flowers and the aerial part respectively. As well the antioxidant activity, shows that the two essential oils present IC₅₀ 45.98mg / ml and 79.28mg / ml of the essential oils of the flowers and the aerial part of cotula cineria respectively) have a great capacity to trap the radical DPPH with the value of IC₅₀ 0.04% for ascorbic acid. In parallel, the antimicrobial activity was determined on two bacterial strains: Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa, the results obtained show that the two strains tested have low sensitivity with different concentrations of our essential oils (Escherichia coli inhibitory zones and Pseudomonas aeruginosa is between 6 and 9 mm). On the other hand, these results remain very low compared to the antibiotic used (Amoxyclav so that the zone of inhibition is between 10 and 13 mm for Escherichia coli and between 13 and 15 mm for Pseudomonas aeruginosa).

Key words: medicinal plants, Cotula cinerea, essential oils, antioxidant activity, antibacterial activity.

Liste des abréviations

°C : Degrés Celsius

μ :Micro

A. ascorbique : Acide ascorbique

AFNOR : Association Française de Normalisation

ATB : Antibiotique

ATCC :American type culture collection

C :Carbone

C.Ceneria : *Cotula Ceneria*

cm :Centimètre

DMSO :Dimethyl sulfoxide

DPPH :2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil

E.coli : *Escherichia Coli*

EC₅₀ :Concentration efficace qui réduit le Fer dans une absorbance de 0,5

g : gramme

h : Heure

HCL : acide chlorhydrique

HE: Huiles Essentielles.

I_A: Indice d'acide

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%

I_E: Indice d'ester

IR : Indice de rétention

I_s: Indice de saponification

ISO: International Organization of Standardization.

kg : Kilo Gramme

KOH : potasse alcoolique

l: litre

M : Poids Moléculaire (g/mol)

mg : milligramme

MHA : Mueller–Hinton

min : Minute

ml : Millilitre

mm : Millimètre

mol : Molarité

N : Normalité

Na₂S₂O₃ : thiosulfate de sodium

NaOH : hydroxyde de potassium

nm: Nano Mètre

OMS : Organisation Mondiale de santé

pH :Potentiel d'Hydrogène

R(%) : pourcentage du rendement des huiles essentielles

R² : Coefficient de corelation

V : Volume

Liste des figures

N°	Titre des figures	Page
Figure 01	Structure de la molécule d'isoprène	12
Figure 02	Structure chimique de certains monoterpènes	13
Figure 03	Structure de quelques composés aromatiques	13
Figure 04	Synthèse de différentes classes terpéniques chez les plantes via la voie d'IPP	15
Figure 05	Déséquilibre de la balance entre anti-oxydants et pro-oxydants	21
Figure 06	Les différents types des espèces réactives	23
Figure 07	Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie	24
Figure 08	Les pathologies associées aux espèces réactives oxygénées	25
Figure 09	les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques	26
Figure 10	Cycle oxydo-réducteur du glutathion	28
Figure 11	Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs Cofacteurs métalliques	28
Figure 12	L'acide ascorbique	29
Figure 13	Structure chimique des différents tocols	30
Figure 14	Régénération de la vitamine E via l'action de la vitamine C lors de la peroxydation lipidique	30
Figure 15	Oligoéléments nécessaires aux activités des enzymes antioxydantes	32
Figure 16	Illustration de la méthode des aromatogrammes sur boîte de Pétri	34
Figure 17	Plan générale de la partie expérimentale	40
Figure 18	Structure de DPPH et mécanisme de sa réduction par un antioxydant	49
Figure 19	Courbe d'étalonnage de DDPH de HEs des fleurs de <i>cotula cineria</i>	61
Figure 20	Courbe d'étalonnage de DDPH de HEs de partie aérienne de <i>cotula cineria</i>	61

Figure 21	Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique	62
Figure 22	Valeur de IC ₅₀ de l'acide ascorbique et HEs des fleurs et des tiges	62
Figure 23	Effet des l'HEs de partie aérienne de <i>Cotula cinerea</i> et leurs fleurs sur bactérienne gram négatif <i>Escherichia coli</i> en fonction des différentes concentrations des HEs	65
Figure 24	Effet des l'HEs de fleurs de <i>Cotula cinerea</i> et de leur partie aériennesur la souche bactérienne gram négatif (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) en fonction des différentes concentration des HEs	66

Liste des Photos

N°	Titre de photos	Pages
Photo 01	Vue générale de l'espèce <i>Cotula cinerea</i>	08
Photo 02	Test aromatoigramme	52
Photo 03	Appareil (Clevenger)	88
Photo 04	Placement De Disque	88
Photo 05	Balance Analytique	88
Photo 06	Autoclave pour stérilisation	88

Liste des tableaux

N°	Titre des tableaux	Page
Tableau 01	Présent l'utilisation thérapeutique de HE de la plante	16
Tableau 02	Matériels et les réactifs relatifs à l'indice d'iode	44
Tableau 03	Matériels et réactifs relatifs à l'indice de saponification	45
Tableau 04	Matériels et réactifs relatifs à l'indice d'acide	47
Tableau 05	présent le moyenne de rendement de fleurs de <i>cotula cineria</i> fraîche (%)	54
Tableau 06	présent moyenne de rendement de tiges de <i>cotula cineria</i> fraîche (%)	54
Tableau 07	caractères organoleptiques de l'HE <i>cotula cineria</i>	56
Tableau 08	caractères physico_chimiques de l'HE de <i>cotula cineria</i>	57
Tableau 09	Résultats de l'activité antimicrobienne de HEs (partie aérienne de <i>Cotula cinerea</i> et leurs fleurs) sur <i>E.coli</i>	65
Tableau 10	Résultats de l'activité antimicrobienne de HEs (Fleurs de <i>Cotula cinerea</i> et leur partie aérienne) sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	66

Liste des cartes

N°	Liste de carte	Page
Carte 01	Localisation géographique de la zone d'étude	39

SOMMAIRE

Résumé	
Liste des Tableaux	
Liste des Figures	
Liste des abréviations	
Introduction	
PREMIÈRE PARTIE : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre I : les plantes médicinales	
1. Définition	3
2. Mode d'emploi des plantes médicinales	3
3. Pouvoir des plantes	4
4. Efficacité des plantes entières	4
5. Définition de la Phytothérapie	4
6. Différents types de la Phytothérapie	5
7. Avantages de la phytothérapie	5
8. Famille Astéracées (Composées)	6
8.1. Répartition géographique de la famille des Astéracées	7
8.2. Genre <i>Cotula</i>	7
8.3. Etude de l'espèce <i>Cotula cinerea</i>	8
8.3.1. Description botanique de <i>Cotula cinerea</i>	8
8.3.2. Position systématique	9
8.3.3. Répartition géographique	9
8.3.4. Composition chimique de la plante	9
8.3.5. Propriétés et usages thérapeutiques	9
Chapitre II : Les huiles essentielles	
1. Généralité sur le métabolisme secondaire	11
2. Huiles essentielles	11
2.1. Définition	11
2.2. Composition chimique des huiles essentielles	12
2.2.1. Composés terpéniques	12
2.2.2. Composés aromatiques	13
3. Localisation des huiles essentielles dans la plante	13
4. Biosynthèse des huiles essentielles	14
5. Conservation des huiles essentielles	14

6. Toxicité des huiles essentielles	15
7. Utilisation des huiles essentielles	16
8. Activités biologiques des huiles essentielles	17
8.1. Propriétés antibactériennes	17
8.2. Propriétés antioxydantes	17
Chapitre III : les activités biologiques	
1. Validation de l'activité biologique des plantes médicinales	20
1.1. Généralités sur l'activité antioxydante	20
1.1.1. Stress et Radicaux libres	21
1.1.1.1. Définition du stress	21
1.1.1.2. Radicaux libres	22
1.1.1.3. Quelques sources des radicaux libres	23
1.1.1.4. Implications pathologiques du stress oxydatif	25
1.1.2. Systèmes de défenses antioxydants	25
1.1.2.1 Antioxydants enzymatiques	26
1.1.2.2. Antioxydants non enzymatiques	28
1.2. Généralités sur l'activité antibactérienne	32
1.2.1. Les principales substances antimicrobiennes	33
1.2.2. Méthodes utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne	34
DEUXIEME PARTE : PARTIE PRATIQUE	
Chapitre I : Méthodologie de travail	
1. Matériel d'étude	38
1.2. Matériel végétal	38
1.3 Site de prélèvement	38
2. Extraction des huiles essentielles	40
3. Principe d'étude	
4. Détermination des indices physico-chimiques des HEs extraits	41
4.1. Propriété physique	41
4.1.1. Calcul des rendements	41
4.1.2. Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles	41
4.1.3. Potentiel d'hydrogène (pH)	41
4.1.4. Densité	42
4.1.5. Indice de réfraction	43
4.2. Propriétés chimiques	

	44
4.2.1. Indice d'iode	44
4.2.2. Indice de saponification	45
4.2.3. Détermination de l'indice d'ester	46
4.2.4. Indice d'acide	47
5. Activité biologique	48
5.1. Détermination de l'activité antioxydante	48
5.2. Activité anti bactérienne	50
5.2.1. Microorganismes utilisés	50
5.2.2. Méthode utilisée pour matière vivo	50
Chapitre II : RESULTATS ET DISCUSSION	
1. Rendement d'extraction des huiles essentielles	54
2. Caractères organoleptiques	56
3. Caractéristiques physico-chimiques	57
4. Activités biologiques	61
4.1. Activité antioxydante	61
4.2. Etude in vivo	65
Conclusion général	
Références bibliographique	
Annexe	

INTRODUCTION

Introduction

Depuis des milliers d'années, l'homme utilise les plantes trouvées dans la nature, comme aliments, abris et matières principales pour le maintien de sa beauté et le soin de sa santé et pour traiter et soigner des maladies (**Sanago, 2006**). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (**OMS, 2003**), environ 65-80% de la population mondiale à recours à la médecine traditionnelle pour satisfaire ses besoins en soins de santé primaire, en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne (**MA *et al.*, 1997**).

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures *in vivo* et *in vitro* de tissus végétaux. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques (**Boizot et Charpentier, 2006**).

Les huiles essentielles sont par définition des métabolites secondaires produits par les plantes comme moyen de défense contre les ravageurs phytophages (**Cseke et Kaufman, 1999**).

L'Algérie est l'un des pays méditerranéens qui constitue un véritable réservoir phytogénétique et qui a une longue tradition médicale et un savoir-faire ancestral à base de plantes médicinales. Selon **Kaddem (1990)**, l'étude de la médecine traditionnelle et du traitement par les plantes est particulièrement intéressante en Algérie pour la richesse floristique, et la persistance de l'usage des plantes par une proportion de la population.

L'évaluation des propriétés phytopharmaceutiques, antioxydante et antimicrobienne demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquente ou non connue dans la médecine traditionnelle. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs (**Teixeira Da Silva, 2004**).

Parmi les activités biologiques des plantes médicinales, ces dernières années l'attention s'est portée sur l'activité antioxydante en raison du rôle qu'elle joue dans la prévention des maladies chroniques telles que les pathologies du cœur, le cancer, le diabète, l'hypertension, et la maladie d'Alzheimer en combattant le stress oxydant (**Meddour *et al.*, 2013**). Aussi la maîtrise des infections bactériennes devient complexe du fait que de nombreuses bactéries ont développé une résistance à la plupart des antibiotiques ce qui a constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale (**Benbrinis, 2012**). Les végétaux furent de plus en plus utilisés

pour l'extraction des substances physiologiquement actives ou pouvant être transformées en médicament. Mais avec l'introduction de la chimiothérapie.

Le stress oxydatif est dû à une perturbation dans la balance métabolique cellulaire déclenchant des maladies et dysfonctionnements physiologiques très graves. Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, citons la surproduction endogène d'agents pro-oxydants ou une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, pollution...) **(Smirnoff, 2005)**.

Comme on peut le constater, la recherche de substances naturelles à activité antibactérienne et antioxydant issue de plantes constitue un enjeu scientifique important.

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail de recherche dont le but principal est d'étudier les activités antioxydantes et antimicrobiennes des huiles essentielles de la partie aérienne de *cotula cineria*

Le présent manuscrit est réparti en deux parties :

1 ère Partie :

la partie théorique, où on a cité des généralités sur la plante , les activités antioxydantes et activités antimicrobiennes des huilles essentielles , ainsi que leurs modes d'action.

2ème partie :

- ✓ La préparation de *cotula cineria* par méthode d'extraction de hydrodistilation.
- ✓ L'évaluation de l'activité antioxydante par les tests de DPPH.et antibactérienne

Première partie

Synthèse bibliographique

Chapitre I

Les plantes médicinales

I. Les plantes médicinales et la phytothérapie

Les plantes ont toujours fait partie de la vie quotidienne de l'homme, au travers des âges, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base : nourriture, vêtements (**Gurib-Fakim, 2006**). Le monde des végétaux est plein de ressources 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 (**Baba-Aissa, 2000**).

Selon OMS (Organisation Mondiale de la Santé) plus de 80% de la population mondiale ont recours à la pharmacopée traditionnelle pour faire face aux problèmes de la santé (**Farnsworth et al., 1986**).

En effet sur les 300 000 espèces végétales recensées sur la planète plus de 200 000 espèces vivent dans les pays tropicaux d'Afrique ont des vertus médicinales (**Millogo et al., 2005**).

1 / Définition Les plantes médicinales

La définition d'une plante médicinale est très simple. En fait il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (**Farnsworth et al., 1986**).

Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains. Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne (**Elqaj et al., 2007**).

2 / Mode d'emploi des plantes médicinales

Les trois principes élémentaires de préparation des plantes sont : l'infusion, la décoction, et la macération.

Infusion : consiste à verser les plantes dans l'eau bouillante, un temps plus ou moins long, trois à dix minutes. Elles sont réservées aux fleurs fragiles, aux plantes fortement aromatiques, aux graines mucilagineuses (**Pierre et Lys, 2007**).

Décoction : les plantes sont versées dans l'eau froide et portées à ébullition un temps plus ou moins long. Deux ou trois minutes pour tiges, les feuilles, les fruits, cinq minutes ou plus pour les écorces et les racines (**Pierre et Lys, 2007**).

Macération : le liquide de macération peut être l'eau, de l'alcool, du vin, du vinaigre. Pour l'eau, les plantes sont versées dans le liquide froid ou tiède pendant quelques heures (10 ou 12 heures, en principe). Les macérations à l'eau ne doivent pas dépasser une douzaine d'heures par risque d'oxydation et de fermentation du liquide. Pour l'alcool, le vin, le vinaigre, l'huile, cette macération peut se prolonger plusieurs jours sans inconvénient (**Pierre et Lys, 2007**).

3/ Le pouvoir des plantes

L'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend de la composition des plantes, depuis XVIIIème siècle, au cours duquel des savants ont commencé à extraire et à isoler les substances chimiques qu'elles contiennent. On considère les plantes et leurs effets en fonction de leurs principes actifs. La recherche des principes actifs extraits des plantes est d'une importance capitale car elle a permis la mise au point de médicaments essentiels.

Aujourd'hui les plantes sont de plus en plus utilisées par l'industrie pharmaceutique, il est impossible d'imaginer le monde sans la quinine qui est employée contre la malaria ou sans la digoxine qui soigne le cœur, ou encore l'éphédrine que l'on retrouve dans de nombreuses prescriptions contre les rhumes (**Iserin et al., 2001**)

4 / Efficacité des plantes entières

La phytothérapie à la différence de la médecine classique, recommande d'utiliser la plante entière, appelée aussi "totum" plutôt que des extraits obtenus en laboratoire. Une plante entière est plus efficace que la somme de ses composants, les plantes contiennent des centaines voire des milliers de substances chimiques actives (**Iserin et al., 2001**).

5/ Définition de la Phytothérapie

Traitement ou prévention des maladies par l'usage des plantes, la phytothérapie fait partie des médecines parallèles ou des médecines douces (**Strang, 2006**).

La phytothérapie correspond à l'utilisation des plantes et de leurs extraits à titre thérapeutique. La médecine traditionnelle correspond à l'utilisation de substances diverses, dont les plantes selon des règles issues de la tradition (**Boukhobza et Goetz, 2014**).

Les plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeurs thérapeutiques (**Nostro et al., 2000**).

La phytothérapie actuelle a pris ses lettres de noblesse à partir des années 1980. Elle renaît grâce à la « vague écologique » mais aussi grâce à la performance des recherches

scientifiques. Ainsi la phytothérapie actuelle permet d'être une thérapeutique par elle seule ou une thérapeutique très complémentaire à la médecine la plus moderne (**Boukhobza et Goetz, 2014**).

6 / Différents types de la Phytothérapie

Aromathérapie : est une thérapeutique qui utilise les essences des plantes, ou huiles essentielles, substances aromatiques secrétées par de nombreuses familles de plantes, ces huiles sont des produits complexes à utiliser souvent à travers la peau (**Strang, 2006**).

L'efficacité thérapeutique des huiles essentielles tient à leurs compositions chimiques extrêmement puissante et complexe. Il existe deux groupes, qui sont caractérisés par des origines distinctes : le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (beaucoup moins fréquents) d'autre part elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils (**Bruneton, 2009**).

Gemmothérapie : se fonde sur l'utilisation d'extrait alcoolique de tissus jeunes de végétaux tels que les bourgeons et les radicules (**Strang, 2006**).

Herboristerie : correspond à la méthode de phytothérapie la plus classique et la plus ancienne. L'herboristerie se sert de la plante fraîche ou séchée ; elle utilise soit la plante entière, soit une partie de celle-ci (écorce, fruits, fleurs). La préparation repose sur des méthodes simples, le plus souvent à base d'eau : décoction, infusion, macération. Ces préparations existent aussi sous forme plus moderne de gélule de poudre de plante sèche que le sujet avale (**Strang, 2006**).

Homéopathie : a recours aux plantes d'une façon prépondérante, mais non exclusive ; les trois quarts des souches sont d'origine végétale, le reste étant d'origine animale et minérale (**Strang, 2006**).

Phytothérapie pharmaceutique : utilise des produits d'origines végétales obtenus par extraction et qui sont dilués dans de l'alcool éthylique ou un autre solvant. Ces extraits sont dosés en quantités suffisantes pour avoir une action soutenue et rapide. Ils sont présentés sous forme de sirop, de gouttes, de gélules, de lyophilisats... (**Strang, 2006**).

7 / Les avantages de la phytothérapie

Malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages. N'oublions pas que de tout temps à l'exception de ces cent dernières années,

les hommes n'ont pas eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes, rhume ou toux ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria.

Aujourd'hui, les traitements à base des plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît, les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus.

La phytothérapie qui repose sur des remèdes naturels est bien acceptée par l'organisme, et souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques comme l'asthme ou l'arthrite (Iserin *et al.*, 2001).

8- Famille Astéracées (Composées)

La famille des composées (Compositae = Asterceae) est une des plus vastes dans le règne végétale (Bouziane, 2002), Famille de loin la plus importante de notre territoire puisqu'elle renferme 408 espèces réparties en 109 genres (Quezel et Santa, 1962). Les deux caractéristiques essentielles de la famille sont groupement des fleurs en capitules et soudure des étamines par leurs anthères. Le capitule est entouré par des pièces appelées bractées dont l'ensemble forme l'involucre, ces bractées sont généralement sur plusieurs rangs et étroitement imbriquées. A l'intérieur de l'involucre, les fleurs sont insérées côte à côte sur un réceptacle généralement plan ou un peu bombé, parfois convexe, chez une partie des genres, elles sont séparées par des paillettes membraneuses ou dures, les fleurs sont généralement dissemblables dans un même capitule, celles du centre ayant à la fois étamines et pistil tandis que celles de la périphérie sont ordinairement uniquement femelles. La corolle peut être en forme de tube terminé par cinq dents représentant la partie libre des pétales, ou bien en forme de languette constituée par l'ensemble des pétales rejetés d'un même côté, les fleurs en languette, dites ligules, occupent la périphérie du capitule (sauf dans la sous-famille des liguliflores où les fleurs sont toutes en languette) (Ozenda, 1977).

8-1 Répartition géographique de la famille des Astéracées

Il est relativement facile de résumer la répartition géographique des Astéracées, la famille se retrouve sur tous les continents sauf l'Antarctique. Cela signifie que plus de 23000 espèces de la famille ont eu un succès extraordinaire en se dispersant dans de nouveaux habitats et en s'établissant. Une fois établis, ils sont spécifiés et rayonnés dans les nombreuses formes que nous voyons maintenant. Dans cette occurrence générale sur le globe, les tribus d'Astéracées ont

tendance à avoir au moins des concentrations continentales. Les tribus typiquement du nouveau Monde comprennent Eupatorieae, Heliantheae, Helenieae, et Mutisieae. Les trois premières tribus ont ensemble de plus grandes concentrations des taxons en Amérique du Nord et en Amérique centrale, même si toutes ont un nombre considérable d'espèces en Amérique du Sud aussi. Mutisieae, cependant, sont clairement centrées dans le sud de l'Amérique du Sud et sur la zone andine. (**Ozenda, 1977**).

Les tribus qui sont clairement centrées dans le vieux Monde comprendraient Anthemideae, Arctoteae, Calenduleae, Cynareae et Inuleae. Les Inuleae sont particulièrement diversifiées en Afrique du Sud et en Australie. Les Anthemideae se produisent de préférence dans la région méditerranéenne et en Europe et en Asie en général. Calenduleae et Arctoteae sont largement trouvés en Afrique du Sud. Les Cynareae sont les plus concentrés dans la région Méditerranéenne ne suivie par l'Europe et l'Asie. Les Vernonieae sont plus abondants dans le nouveau Monde, mais de nombreux taxons se produisent également dans l'ancien Monde,

En Afrique tropicale et en Afrique du Sud et en Asie tropicale. Les astéries sont presque deux fois plus abondantes dans le nouveau Monde, surtout au Mexique et aux États Unis, mais elles sont aussi des concentrations en Afrique du Sud et en Australie. Les Senecioneae ont réparti presque uniformément sur les deux grandes arènes de la terre. Dans l'ancien Monde, la tribu est la plus répandue dans la région Méditerranéenne, en Europe-Asie et en Afrique du Sud. Dans le nouveau Monde, la tribu se trouve abondamment au Mexique et la région andine au Chili. Les Lactucées sont concentrées dans l'hémisphère nord, sur tout dans l'ancien Monde. Dans certains continents, les Astéracées se retrouvent presque partout dans presque et ou les habitats imaginables. En règle générale, cependant, la famille est plus abondante dans les régions tempérées ou dans les régions plus froides, plus élevées d'élévation des tropiques. Peu de membres de la famille aiment les forêts tropicales humides chaudes, bien que certaines soient trouvées là. Seules quelques espèces sont aquatiques, mais de nombreux taxons se rencontrent dans les déserts, les montagnes jusqu'à la ligne des bois, les vallées, les bords des rivières, les affleurements rocheux perturbés, les forêts et presque par tout (**Bremer, 1994**).

8-2 Genre *Cotula* :

Ce genre compte quelques 80 espèces d'annuelles et de vivaces, dont quelques-uns partiellement aquatique, sont répandues dans de nombreuses régions tempérées de l'hémisphère Sud de l'Afrique, Australie et à l'Amérique du Sud. Les petites feuilles tendres sont souvent profondément découpées. Et les petits capitules ressemblent à des boutons sans rayon. Bien que les

bractées forment parfois un cercle autour du disque jaune pur ou crème. Ce genre est représenté par trois espèces dans l'Algérie Parmi lesquels *Cotula cinerea* (Ozenda, 1977).

8-3 Etude de l'espèce *Cotula cinerea*

8-3-1 Description botanique de *Cotula cinerea*

C'est une petite plante annuelle d'aspect laineux de 5 à 15 cm entièrement tomenteuse. Les tiges sont dressées ou diffuses. Les feuilles et les tiges vert-blanchâtre sont recouvertes de petits poils denses qui forment comme un manteau de velours. Les feuilles petites, entières épaisses et veloutées sont découpées en trois à sept dents ou 'doigts' qui se présentent comme une main légèrement refermée. Les fleurs sont de petits demi pompons jaune d'or au bout d'une courte tige. C'est une espèce Saharo-arabique commune dans tout le Sahara et les lieux sablonneux désertiques (Quezel et Santa 1963).



Photo 01 : Vue générale de l'espèce *Cotula cinerea* (Bouziane, 2002).

8-3-2 Position systématique

La détermination de la position taxonomique de l'espèce végétale *Cotula cinerea* Del. dans la classification systématique botanique a été faite selon (Quezel et Santa, 1963). Elle est la suivante :

Embranchement : Phanérogames ou Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Endicots

Sous classe : Astéridées

Ordre : Astérales

Famille : Astéracées ou Composées

Genre : *Cotula*

Espèce: *Cotula cinerea* Del., **syn:** *Brocchia cinerea* (Del.)

Noms vernaculaires : Chouihia ,Chihia ou Robita (**Quezel et Santa 1963**), Al gartoufa

8-3-3 Répartition géographique

L'espèce *Cotula cinerea* est très rencontrée dans toute région saharienne de l'Algérie, elle pousse dans les ergs et les sols peu ensablés. Où elle est connue sous le nom de chouihia (ou parfois chihia). *Cotula cinerea* est aussi connue dans les régions sahariennes d'Égypte et du Maroc (**Bouziane, 2002**).

8-3-4 Composition chimique de la plante

On y trouve des flavonoïdes isolés chez *Cotula cinerea* sont : flavone O- et C-glycosides, flavonols glycosides et quercetagine 3, 6, 7-triméthyl éther, lactones sesquiterpéniques, les glaucolides (**Metwally et al., 1986**) et les coumarines sesquiterpéniques (**Greger et Hofer, 1985**).

8-3-5 Propriétés et usages thérapeutiques

Cette espèce est largement utilisée en médecine traditionnelle marocaine pour ses propriétés biologiques comme les activités anti-inflammatoire, analgésique, antiseptique, antibactérienne, antipyrétique et contre les larves, (**Markouk et al., 1999 ; Larhsini et al., 2002**). Dans le Sahara algérien plus précisément à Ouargla, cette plante est destinée contre la colique, la diarrhée, la toux, le rhumatisme et la stérilité (**Hammiche et Maiza, 2006**).

Chapitre II

Les huiles essentielles

II. Les huiles essentielles

1. Généralités sur le métabolisme secondaire

Les métabolites secondaires sont un groupe de molécules qui interviennent dans l'adaptation de la plante à son environnement ainsi que la régulation des symbioses et d'autres interactions plantes-animaux, la défense contre les prédateurs et les pathogènes, comme agents allélopathies ou pour attirer les agents chargés de la pollinisation ou de la dissémination des fruits (**Judd et al, 2002**).

En général, les termes, métabolites secondaires, xénobiotiques, facteurs antinutritionnels, sont utilisés pour déterminer ce groupe, il existe plus de 200.000 composés connus qui ont des effets antinutritionnels et toxiques chez les mammifères. Comme ces composés ont des effets toxiques, leur incorporation dans l'alimentation humaine peut être utile pour la prévention contre plusieurs maladies (cancer, maladies circulatoires, les infections viral...), car la différence entre toxicité et effet bénéfique est généralement soit dose ou structure- dépendant (**Makkar, Siddhuraju et Becker, 2007**).

2. Les huiles essentielles

2.1 Définition

Les huiles essentielles sont définies comme étant des produits de composition chimique assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation. Ils sont des composants liquides et hautement volatiles des plantes, marqués par une forte et caractéristique odeur, les terpènes (principalement les monoterpènes) représentent la majeure partie (environ 90%) de ces composants (**Hamdani, 2012**). La plupart des composants des HES sont inclus dans deux groupes : les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes mais ces derniers sont moins fréquents par rapport aux terpénoïdes. Les HES ne contiennent pas de corps gras (lipides) (**Hamdani, 2012 ; Khenaka, 2011**). Sont obtenus par distillation par la vapeur d'eau (**Rakotonanahary, 2012**)

Les 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'épicerpe des Citrus, et qui sont séparés de la phase aqueuse par procédés physiques » (Garnero, 1996)

2.2 Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes dont les constituants sont presque exclusivement de deux types : des composés terpéniques d'une part et des composés aromatiques, d'autre part (Ghestem *et al.*, 2002). Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatiles (Bruneton, 2009).

2.2.1. Composés terpéniques

Les terpènes constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétal. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbone (C₅H₈) (Figure 01) reconnu par Reverchon et ses collaborateurs dès 1995. Cet isoprène est la base du concept de la "règle isoprénique" énoncée par Judd et complétée par Julsing 2006. Cette règle considère le diphosphate d'isopentényle, désigné sous le nom d'isoprène actif, comme le véritable précurseur de la molécule terpénique ; d'où le nom d'isoprénoïdes sous lequel on les désigne également (Bruneton, 2009).

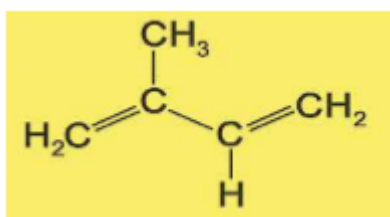


Figure 01 : Structure de la molécule d'isoprène (Lamarti *et al.*, 1994).

Les composés terpéniques sont représentés principalement par les terpènes, les plus volatils des monoterpènes (C₁₀) (Figure 02) et des sesquiterpènes (C₁₅) dont L'unité de base

étant une molécule d'isoprène. Plusieurs milliers de composés ont été décrits et sont classés selon leur nombre de cycle (composés acycliques, mono- et bicycliques) et selon la nature des fonctions qu'ils portent (alcool, aldéhyde, cétone, ester, éther-oxyde...) (Ghestem *et al.*, 2002).

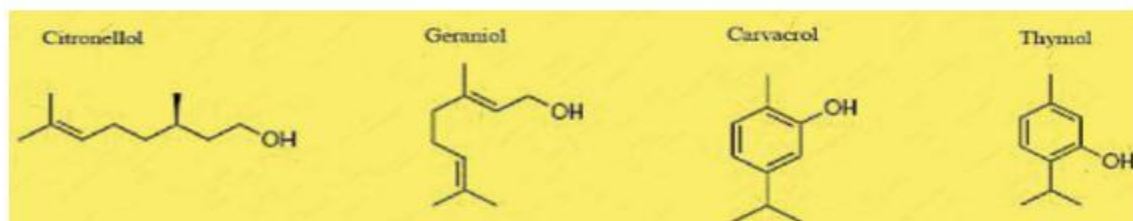


Figure 02 : Structure chimique de certains monoterpènes (Bakkali *et al.*, 2008)

2.2.2. Composés aromatiques

Les composés aromatiques sont des dérivés du phénylpropane (C6-C3) et beaucoup moins fréquents. Ce sont très souvent des allyles et des propénylphénols parfois des aldéhydes. On peut également rencontrer dans les huiles essentielles des composés en (C6C1) comme le Benzène, Toluène ou comme l'Ethyl-benzène (Figure 03)(Ghestem *et al.*, 2002).

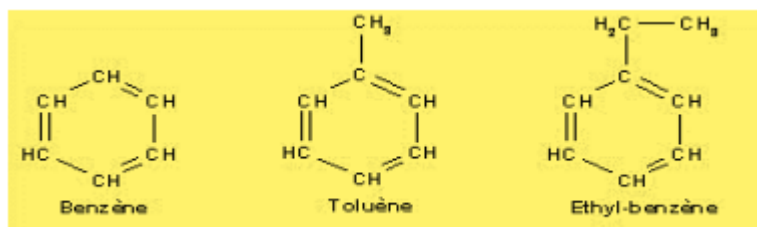


Figure 03: Structure de quelques composés aromatiques (Bruneton, 2009).

3. Localisation des huiles essentielles dans la plante

Les huiles essentielles sont retrouvées chez les Spermaphytes qui incluent les Myrtaceae, Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Cupressaceae, Poaceae, Zingiberaceae, Piperaceae, etc. (Rakotonanahary, 2012).

Elles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : fleurs, feuilles, des écorces, des bois, des racines, des rhizomes, des fruits, des graines (Figueredo, 2007).

4. Propriétés physico-chimiques

En ce qui concerne les propriétés physico-chimiques, les huiles essentielles forment un groupe très homogène, qui a des propriétés communes représentées dans les points suivants

*Les huiles essentielles sont habituellement liquides à température ambiante et volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixe

* Elles sont plus ou moins colorées

* Elles peuvent conférer leur odeur à l'eau.

*Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau.

*Leur indice de réfraction et pouvoir rotatoire sont très élevés.

* Elles sont entraînaibles par la vapeur d'eau, soluble dans l'alcool, l'éther et les huiles fixes, mais insolubles dans l'eau.

* Elles sont altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux, il convient alors de les conserver à l'abri de la lumière et de l'air (**Rakotonanahary, 2012 ; Laib, 2011**).

5. Biosynthèse des huiles essentielles

Les huiles essentielles, se composent généralement de :

* Matériaux volatiles synthétisés via le précurseur IPP (**Figure 04**), consistent en des mélanges complexes se composant des mono-sesquiterpènes hydrocarbonés et des matériaux oxygénés dérivés d'eux. La biosynthèse des terpénoïdes dans cette voie implique l'addition de l'unité isoprène avec son isomère pour former le geranyl diphosphate (GPP, C10), condensé avec une autre unité IPP forment le diphosphate de farnesyl (FPP, C15) à l'origine des sesquiterpènes. Les précurseurs parentaux compte tenu de la modification structurale par l'oxydation, la

réduction, l'isomérisation, l'hydratation, la conjugaison et /ou d'autres transformations donnent une variété de terpénoïdes (**Dubey et al., 2003**),

* Phényl-propanoïdes qui sont des métabolismes secondaires issus de la voie de l'acide shikimique, spécifique du règne végétal. à partir de la phénylalanine, à la synthèse d'une grande variété de composés phénoliques tels que la lignine, les flavonoïdes et les coumarines (**Hatanaka et al., 1987**).

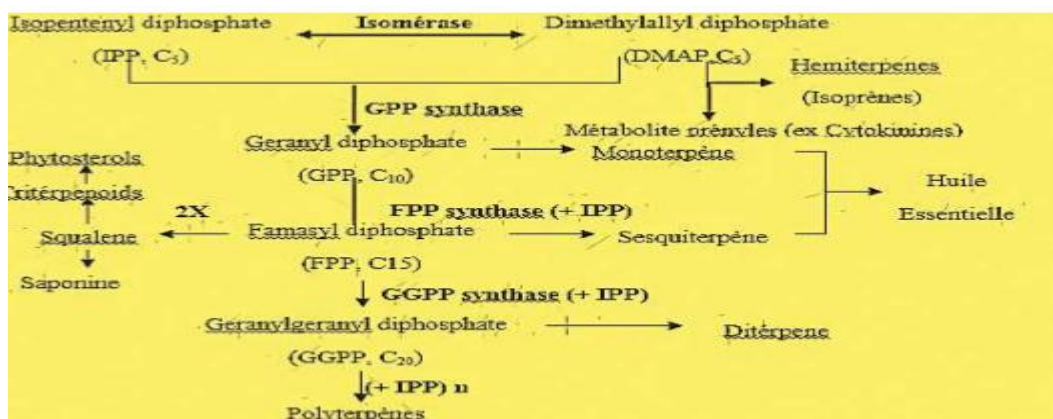


Figure 04 : Synthèse de différentes classes terpéniques chez les plantes via la voie d'IPP
(**Dubey et al., 2003**).

6. Conservation des huiles essentielles

L'instabilité relative des molécules constitutives des huiles essentielles rend leur conservation délicate (**Bruneton, 1993**). Trois facteurs interviennent dans l'altération des huiles essentielles :

La température : obligation de stockage à basse température (entre 8 °C et 25 °C), La lumière : stocker dans l'obscurité et dans un récipient opaque, brun de préférence et L'oxygène : les flacons doivent être entièrement remplis et fermés de façon étanche, il est possible de recourir à l'adjonction d'antioxydants. La durée de conservation admise est de 2 à 5 ans.

7. Toxicité des huiles essentielles

La toxicité des huiles essentielles est moins investiguée. En règle générale, les huiles essentielles d'usage commun ont une toxicité par voie orale faible ou très faible avec des DL₅₀ supérieures à 5g/kg. Chez l'Homme des intoxications aiguës sont possibles. Les accidents graves, les plus souvent observés chez les petits enfants, sont provoqués par l'ingestion en quantité importante d'huiles essentielles (Laib, 2011).

8. Utilisation des huiles essentielles

Le rôle des huiles essentielles dans la physiologie de la plante reste encore mal connu. Toutefois, les parfums émis jouent un rôle attractif pour les insectes pollinisateurs. Les huiles essentielles ont des propriétés antitoxiques, antivenimeuses, antivirales et antiparasitaires. Dû à leur vaste utilisation dans les domaines pharmaceutique, alimentaire, cosmétique et thérapeutique (Tableau 01) (Paris et Hurabielle, 1981). Néanmoins, une seule huile peut avoir plusieurs utilisations à la fois (Laib, 2011).

Tableau 01 : Présent l'utilisation thérapeutique de HEs de la plante

Huile essentielle de la plante	Utilisation thérapeutique
Basilic	Diminue l'anxiété, améliore la concentration De la digestion, soulager les maux de tête
Camomille	Contre la dépression et les insomnies, soulager Les problèmes de peau.
Citron	Améliore la circulation, soulage les problèmes respiratoires
Coriandre	Soulage la nervosité et les douleurs rhumatismales, améliorer la digestion
Eucalyptus	Soulage les rhumes, problèmes respiratoires Les douleurs.

9. Activités biologiques des huiles essentielles

9.1- Propriétés antibactériennes

Les HEs les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes appartiennent aux Labiatae : origan, thym, sauge, romarin et clou de girofle sont d'autant de plantes aromatiques à HE riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés possèdent une forte activité antibactérienne. Le carvacrol est le plus actif de tous, reconnu pour être non toxique, il est utilisé comme agent de conservation et arôme alimentaire dans les boissons, friandises et autre préparations. Le thymol et l'eugénol sont utilisés dans les produits cosmétiques et, alimentaires. Ces composés ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries : E-coli, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Listeria monocytogenes, Clostridium spp, Helicobacter pylori (**Pauli, 2001**).

9.2- Propriétés antioxydantes

Le pouvoir antioxydant de ces huiles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Ce sont surtout les phénols et les polyphénols qui sont responsables de ce pouvoir (**Richard F, 1992**). Lorsque l'on parle d'activité antioxydante, on distingue deux sortes de propriétés selon le niveau de leur action : une activité primaire et une activité préventive (indirecte). Les composés qui ont une activité primaire sont interrompus dans la chaîne autocatalytique de l'oxydation (**Multon, 2002**). En revanche, les composés qui ont une activité préventive sont capables de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que la réduction d'oxygène (**Madhavi et al., 1996**).

Des études de l'équipe constituant le Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS-IAF, ont montré que l'incorporation des huiles essentielles directement dans les aliments (viandes hachées, légumes hachés, purées de fruit, yaourts...) où l'application par vaporisation en surface de l'aliment (pièce de viande).

Chapitre III

Les activités biologiques

1. Validation de l'activité biologique des plantes médicinales

Les outils du chercheur se sont tellement perfectionnés et ce d'une manière exponentielle, que toutes les méthodes ont été bouleversées. Tant en chimie qu'en pharmacologie des substances naturelles, que dans le domaine des biotechnologies, les récents développements techniques ont déterminé trois approches différentes, ce sont celles de la chimie, de la pharmacologie et des biotechnologies.

Les recherches chimiques sur les substances naturelles s'appuient sur des techniques de séparation des constituants (chromatographie) et de leur détermination structurale (spectrographie). Aujourd'hui, les multiples possibilités de chromatographie sur des supports de plus en plus différenciés permettent d'isoler sans difficultés insurmontables des produits autrefois inaccessibles. Il y a eu accroissement considérable de la puissance et de la finesse d'analyse. La détermination de structure des molécules est donc de plus en plus facile, mais elle devient aussi, et de plus en plus, l'affaire de spécialistes maîtres de tous petits créneaux techniques, et nantis d'un matériel très onéreux.

Le chercheur doit aussi étudier l'activité des plantes médicinales et de leurs extraits et donc, tenter de plus en plus de sélectionner les plantes en fonction de leur activité biologique, ensuite se préoccuper de garantir à l'utilisateur une source permanente et suffisante de principes actifs, sans détruire les gîtes naturels productifs.

1.1. Généralités sur l'activité antioxydante

L'oxygène moléculaire est un élément crucial pour les organismes vivant en aérobie, parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant la matière organique. Cependant, une partie de cet oxygène moléculaire (environ 1 à 2 %) peut capter d'une manière univalente un électron conduisant à la formation des espèces partiellement réduites et fortement toxiques appelées les radicaux libres ou encore les espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Baudin, 2006).

La production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques : oxydation de l'ADN, des protéines, de lipides et des glucides, mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (**Favier, 2003**).

D'après **Halliwell (1994)**, un antioxydant est toute molécule endogène ou exogène présente en faible concentration qui est capable de prévenir, de retarder et de réduire l'ampleur de la destruction oxydante des biomolécules. Contrairement aux enzymes antioxydantes, une molécule d'antioxydant piège un seul radical libre. Pour pouvoir fonctionner à nouveau, cette molécule d'antioxydant doit donc être régénérée par d'autres systèmes (**Dacosta, 2003**).

Plusieurs substances pouvant agir en tant qu'antioxydants *in vivo* ont été proposés. Elles incluent : la vitamine E, l'acide ascorbique, le β -carotène, les flavonoïdes, les composés phénoliques...etc. (**Kohen et Nyska, 2002**).

1.1.1. Stress et Radicaux libres

1.1.1.1. Définition du stress

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre la génération des EOR et la capacité du corps à les neutraliser et à séparer les dommages oxydatifs (**Boy et al., 2003**). Il correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire (**Morel et Barouki, 1999**). Ce qui conduit à des dommages cellulaires irréversibles (**Pincemail et al., 1999**).

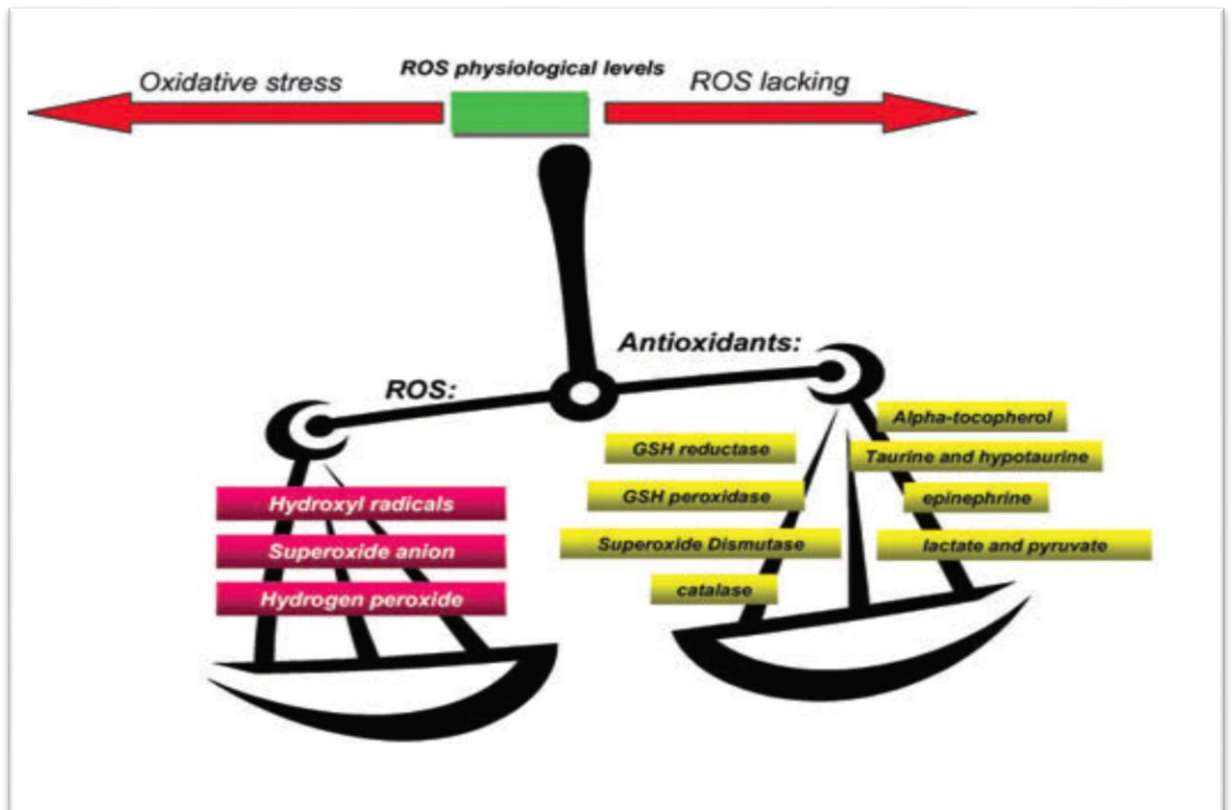


Figure 05 : Déséquilibre de la balance entre anti-oxydants et pro-oxydants (Gueye, 2007)

1.1.1.2. Radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) capables d'une existence indépendante (d'où le terme libres), portant un ou plusieurs électron(s) libre(s) non apparié(s) sur leurs couches externes (Lehucher-Michel *et al.*, 2001). Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de leurs électrons célibataires à se réappairer, leurs constantes de vitesse réactionnelle sont très élevées pouvant aller de 10^5 à 10^{10} mol⁻¹. L. s⁻¹ (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2003).

L'appellation ROS inclut les radicaux libres de l'oxygène : anion superoxyde (O₂^{•-}), radical hydroxyle (OH[•]) mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

A côté des ROS, il existe des ERN (espèces réactives nitrogénées) dont le représentant majeur est le NO•. C'est un agent vasodilatateur. Il est synthétisé par les NOSynthases (NOS). Le NO• est un radical peu réactif mais peut se lier aux radicaux libres oxygénés pour former des molécules plus toxiques comme les peroxynitrites. (Orban *et al.*, 2007)

Figure 06 : Les différents types des espèces réactives (Fontaine, 2009).

Espèces radicalaires		Espèces non radicalaires	
Nom	Symbole	Nom	Symbole
Anion superoxyde	O ₂ ^{•-}	Peroxyde d'hydrogène	H ₂ O ₂
Radical hydroxyle	OH•	Peroxyde organique	ROOH
Radical peroxyde	ROO•	Acide hypochlorique	HOCl
Radical alkoxyde	RO•	Oxygène singulet	O ₂
Monoxyde d'azote	NO•	Peroxynitrite	ONOO•

1.1.1.3. Quelques sources des radicaux libres

- **Les sources exogènes**

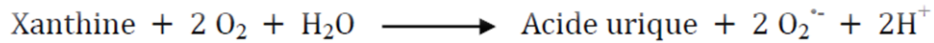
1- L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents capables de donner naissance à des radicaux libres telles que le goudron, le tabac et les polluants industriels participent également à la genèse de radicaux libres (Münzel *et al.*, 2006, Důračková, 2008).

2- Les rayonnements X ou γ peuvent par différents mécanismes faire apparaître des radicaux libres en scindant la molécule d'eau en deux radicaux. (Desikan *et al.*, 2003; Lykkesfeldt et Svendsen, 2007).

- **Les sources endogènes**

1- L'une des sources physiologiques majeures de O₂^{•-} est représentée par la chaîne respiratoire mitochondriale. Elle est une source permanente d'ERO, elle les produirait en deux sites de production : les complexes I et III (García, 2005).

2- La xanthine oxydoréductase (XOR) est une enzyme qui génère les ERO en réduisant l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique, l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électrons produisant ainsi l'anion superoxyde. La XOR joue un rôle crucial dans la génération de l'O₂^{•-} et de H₂O₂ (O'Mahony *et al.*, 2013).



Cette enzyme est présente dans le sang, les cellules endothéliales des capillaires sanguins et de façon très importante dans le foie et les intestins. La localisation cellulaire de la xanthine oxydase est principalement cytoplasmique (Quiney *et al.*, 2011).

3- Les ions métalliques, comme le fer et le cuivre sous leurs formes réduites, sont de remarquables promoteurs du processus radicalaires in vitro : ils transforment l'H₂O₂ en OH[•]. Les destructions cellulaires (hémolyse, cytolysse hépatique) pouvant donc engendrer un stress oxydant par la libération des métaux. La formation du OH[•], le radical libre le plus réactif, à partir du H₂O₂ en présence de fer ferreux est dite réaction de Fenton (Fontaine, 2007).

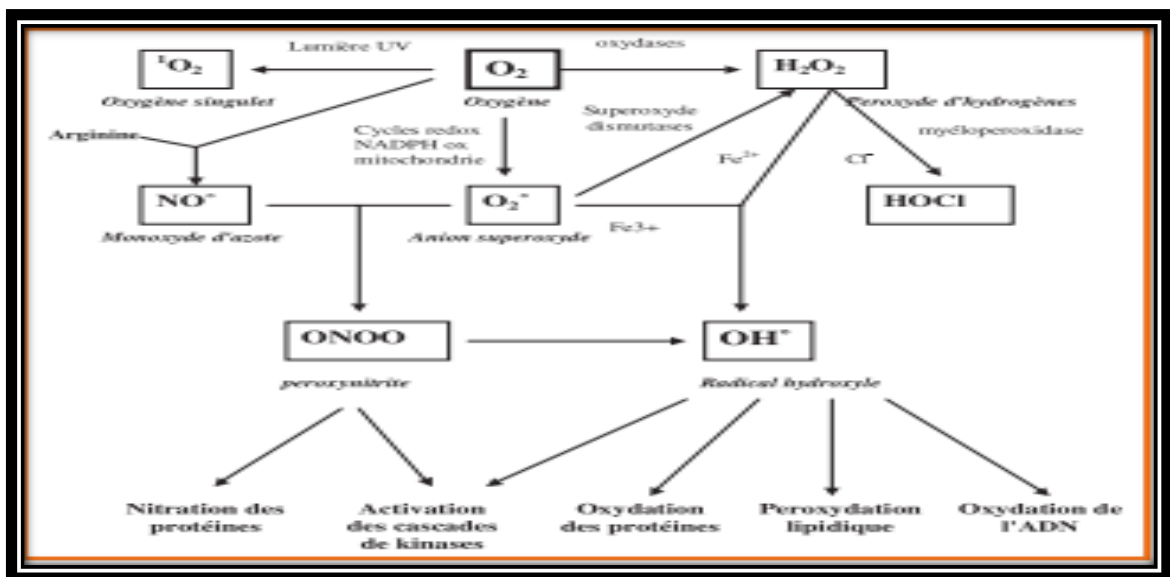


Figure 07 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie (Favier, 2003)

1.1.1.4. Implications pathologiques du stress oxydatif

Le stress oxydatif est impliqué dans de très nombreuses pathologies (**Figure 07**) comme facteur déclenchant ou associé à des complications (**Favier, 2003**). Il peut être associé à l'athérosclérose, l'asthme, l'arthrite, la cataractogénèse, l'hyperoxie, l'hépatite, l'attaque cardiaque, les vasospasmes, les traumatismes, les accidents vasculaires cérébraux, les pigments d'âge, les dermatites, les dommages de la rétine, les parodontites et les cancers (**Cohen et al., 2000; Packer et Weber, 2001**). Néanmoins, la plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale des radicaux (**Favier, 2003**)

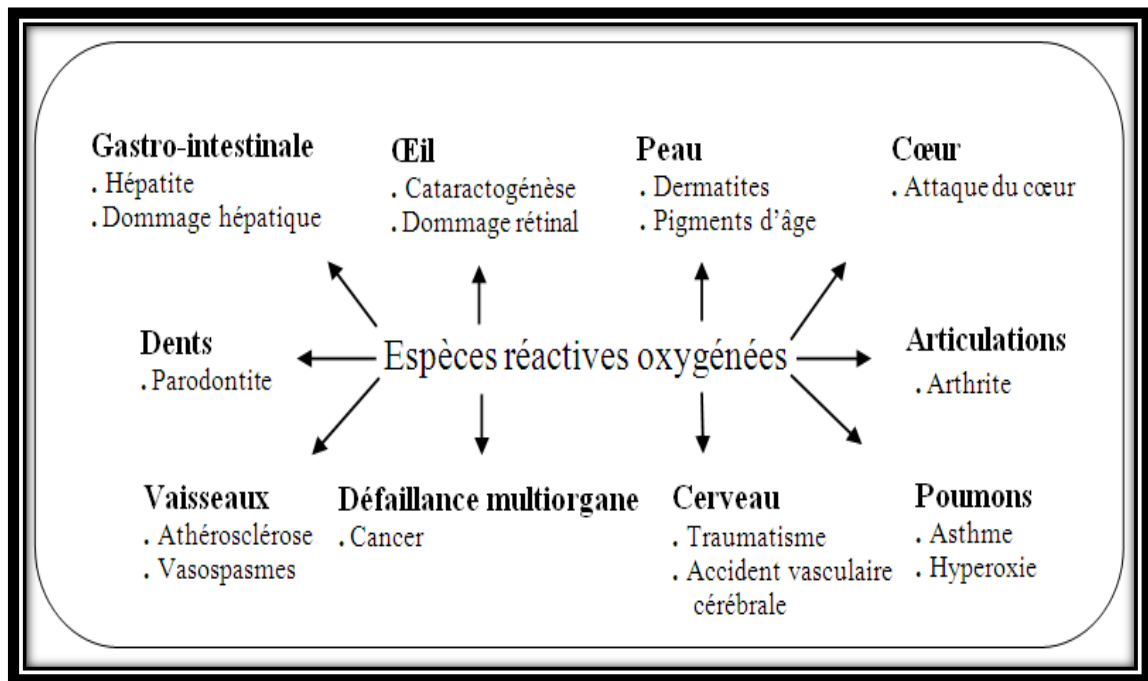


Figure 08 : Les pathologies associées aux espèces réactives oxygénées (**Lee et al., 2004**).

1.1.2. Ssystèmes de défenses antioxydants

Un antioxydant peut être défini comme tout substance qui est capable, à concentrationrelativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarderou empêcher l'oxydation de ces substrats (**Droge, 2002**).

Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques. Mais aussi à des petites molécules hydrophiliques. Les systèmes antioxydants peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine (Delattre *et al.*, 2005).

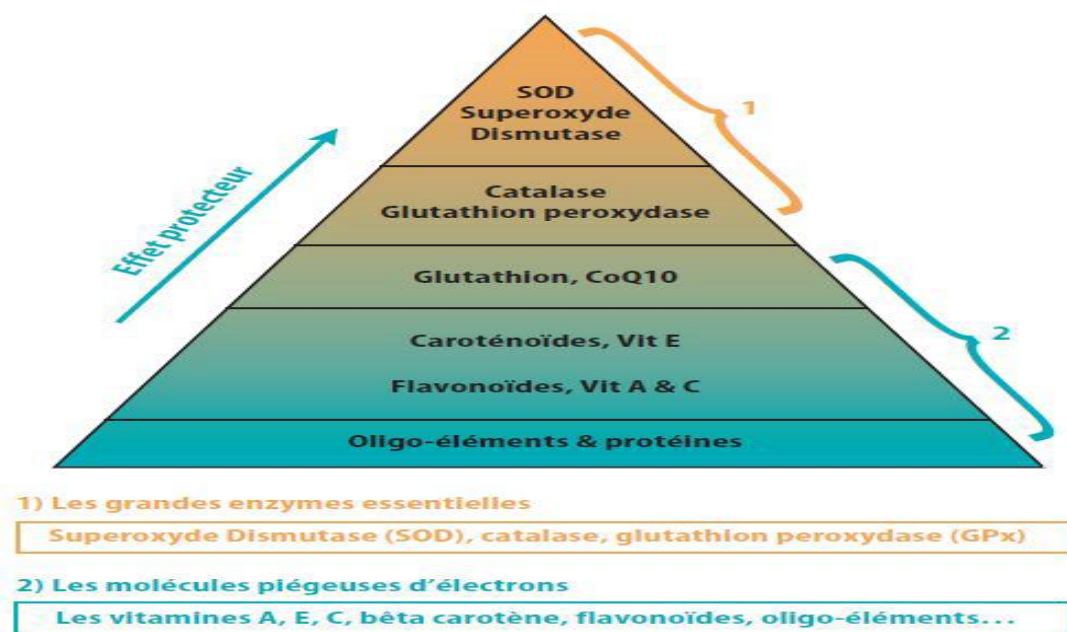


Figure 09 : les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (Menvielle-Bourg, 2005).

1.1.2.1. Antioxydants enzymatiques :

L'organisme humain possède un système enzymatique, constitué principalement de trois enzymes : le superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx) (HELENA L *et al.*, 2000) Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (ABDELGHAFOUR, 2003).

✓ Les superoxydes dismutases

Les superoxydes dismutases ou SOD sont des antioxydants enzymatiques ubiquitaires. Ces métalloprotéines représentent l'une des premières lignes de défense contre le stress oxydant en assurant l'élimination de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ par une réaction de dismutation en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante: (Haleng *et al.*, 2007).



Ces enzymes accélèrent la vitesse de cette réaction spontanée rendant très rapide la disparition du superoxyde mais en générant le peroxyde d'hydrogène. Celui-ci est un composé oxydant diffusible et dangereux à distance (**Goudable et Favier, 1997**) mais il peut être ultérieurement catabolisé par la catalase et les glutathion peroxydases.

✓ Catalase

La catalase est une enzyme responsable de la détoxification du peroxyde d'hydrogène produit dans les conditions physiologiques (**Niki et al., 2007**). Présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. La Catalase est formée de quatre sous-unités, chaque sous-unité comporte un groupement Ferri rotoporphyrine dans son site actif avec un atome de Fer à l'état Fe^{3+} et une molécule de NADPH. La fixation du NADPH par la catalase lui confère une protection contre l'attaque de H_2O_2 (**Delattre et al, 2005**).



✓ Les glutathions peroxydases et réductases

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. La glutathion peroxydase est une sélénoenzyme (Se-GPx) qui joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydro peroxydes résultants de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH). La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur (**Martínez-Cayuela, 1995 ; Sorg, 2004**).

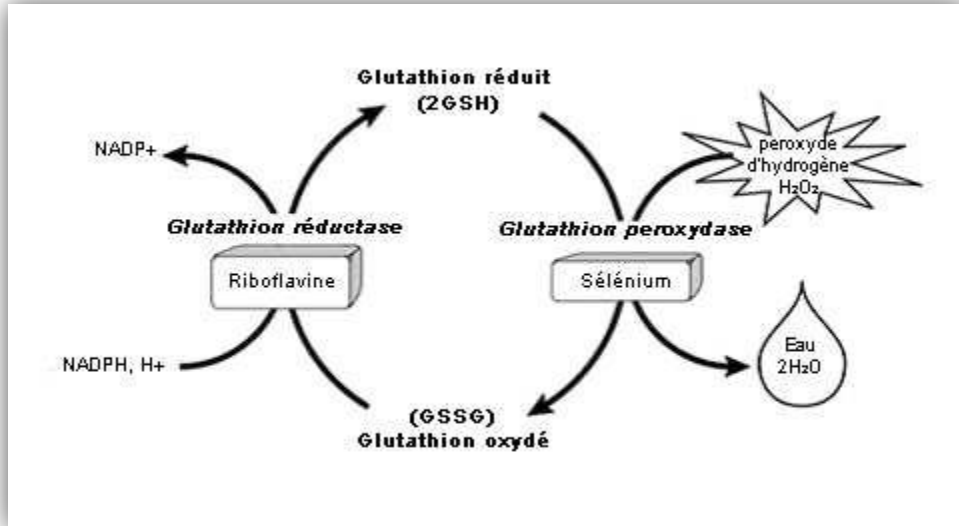


Figure 10: Cycle oxydo-réducteur du glutathion (Hagen *et al.*, 1990)

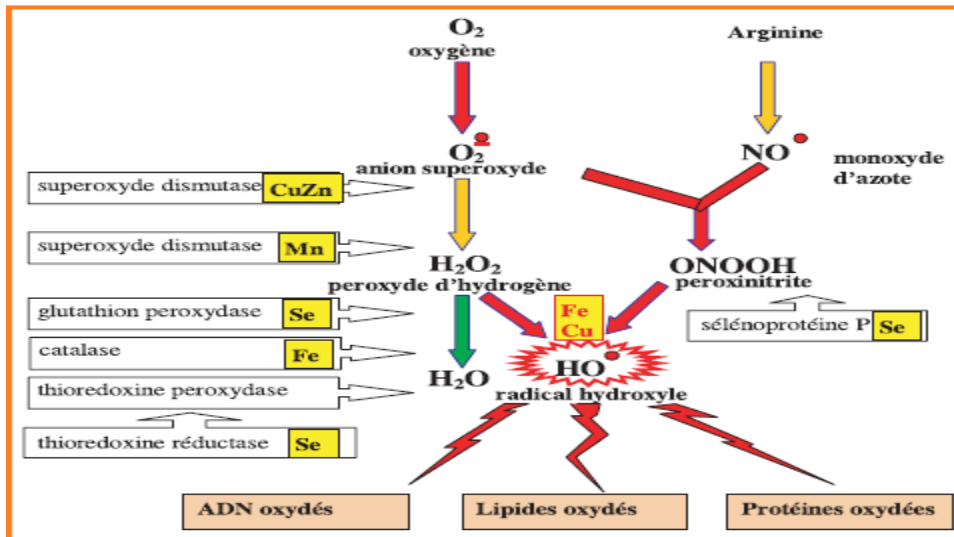


Figure 11: Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs Cofacteurs métalliques (Favier, 2003).

1.1.2.2. Antioxydants non enzymatiques

Plusieurs molécules issues de notre alimentation sont considérées comme des antioxydants : la vitamine A, la vitamine C, β -carotène (Gauche *et al.*, 2006) ; les composés phénoliques (flavonoïdes, coumarines, dérivés d'acide phénolique, tanins, anthocyanines) (Messoud, 2013).

✓ **La Vitamine C**

La vitamine C appelé aussi l'acide ascorbique, c'est un antioxydant hydrosoluble, Qui se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire. Elle peut piéger directement l'anionsuperoxyde $O_2^{\bullet-}$, le radical hydroxyle HO^{\bullet} , l'oxygène singulet et réduit le peroxyde d'hydrogène en eau via l'ascorbate peroxydase (**Evans, 2000**). Elle empêche l'oxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (neutrophiles activés, cellules endothéliales activées, myéloperoxydase) (**Foyer et al., 2008**). En plus, La vit C a notamment un rôle antioxydant au niveau des tissus oculaires, en particulier la rétine, où elle participe à la dégradation du H_2O_2 (**Ohla et al., 2005**).

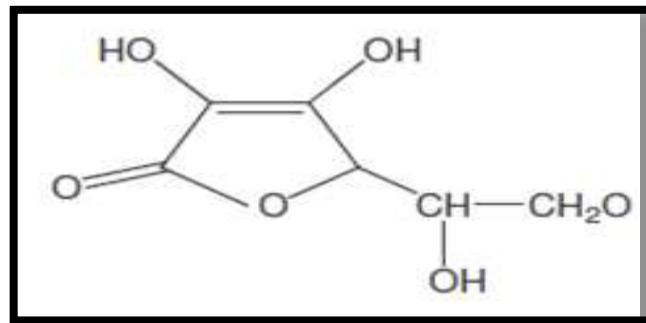


Figure 12: L'acide ascorbique (**Evans, 2000**)

✓ **Vitamine E**

La vitamine E fait partie de la famille des tocophérols, α -tocophérols est la forme la plus active (**Cuvelier et al., 2003**).

Cette vitamine est décrite comme étant le principal antioxydant liposoluble dans le plasma et les erythrocytes chez l'homme, situé dans les lipoprotéines et dans les membranes. Tocophérol, il est capable d'une part, de piéger chimiquement l'oxygène singulet en s'oxydant en quinone, et d'autre part, de réagir avec le radical hydroxyle HO^{\bullet} . Mais son principal rôle biologique est de réagir avec les radicaux peroxydes ROO^{\bullet} pour former un radical tocophéryle (**Dellatre et al., 2005**).

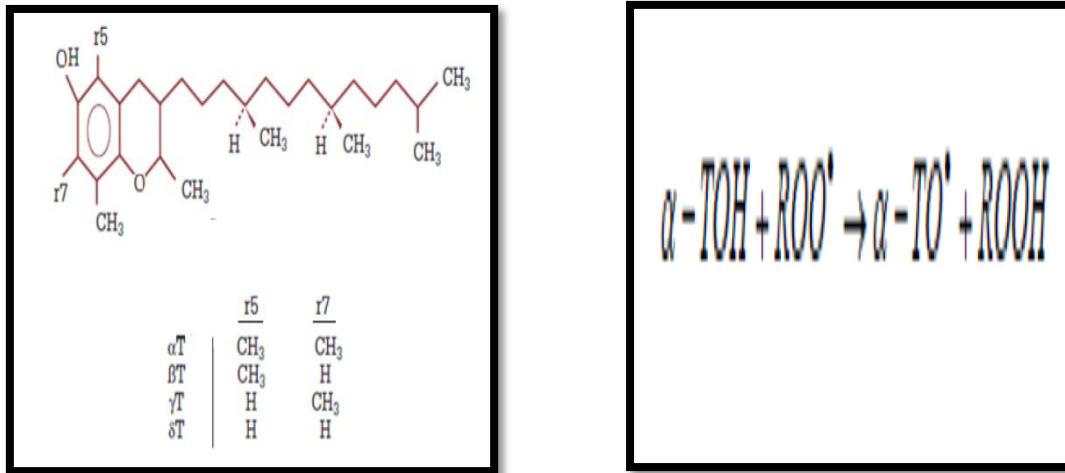


Figure 13 : Structure chimique des différents tocols (Blokhina *et al.*, 2003)Le tocophérol peut être régénéré par la vitamine C, le GSH (Chan *et al.*, 1991).

La régénération par la vitamine C s’effectue selon la réaction suivante.

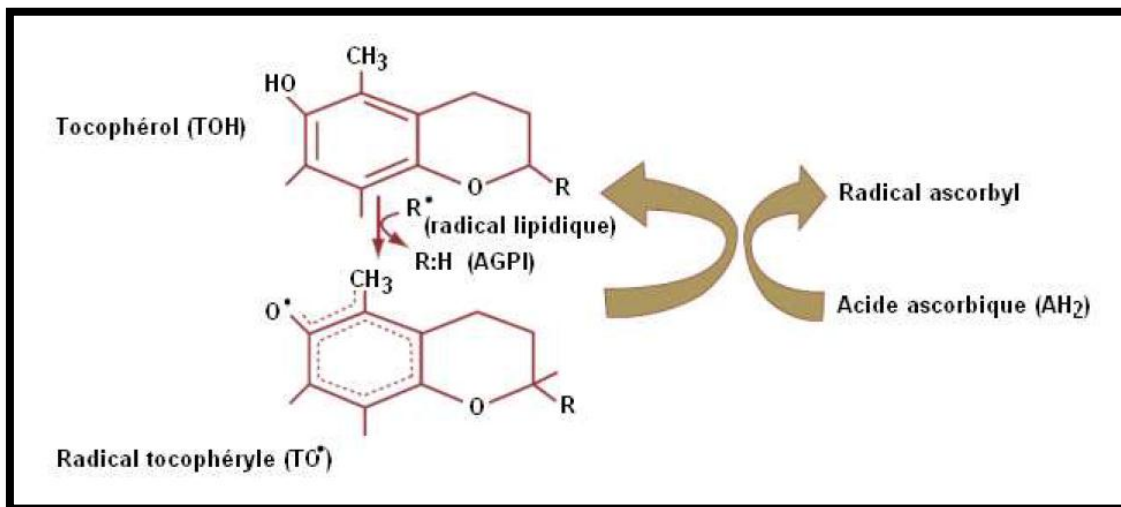
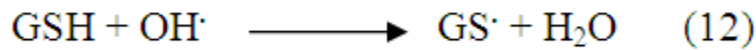


Figure 14: Régénération de la vitamine E via l’action de la vitamine C lors de la peroxydation lipidique (Lauro et Rolih, 1990)

✓ **Le glutathione**

Le GSH est un tripeptide (Lγglutamy-l-cystéinyl-glycine) impliqué dans de nombreux processus au niveau intracellulaire. Dans des conditions physiologiques, le glutathion sous forme réduite (GSH) représentela très grande majorité du glutathion total (90 à 98%), lors d’un stress oxydant le GSH est oxydéavec la formation de pont disulfure, GSSG, et/ou de pont disulfure

mixte, GSSR (R étant fixé à un autre thiol radicalaire) (Stamler et Slivka, 1996). Le glutathion agit également comme substrat d'enzymes antioxydantes telles que la glutathion peroxydase, glutathion réductase et transférase (Ravi *et al.*, 2004). Il fait aussi l'objet d'interactions synergiques avec d'autres composants du système de protection antioxydant tels que la vitamine C ou la vitamine E (Gérard et Chaudière, 1996).



✓ Les oligoéléments

Les oligoéléments ou les éléments-trace (zinc, sélénium, cuivre, manganèse) constituent des cofacteurs nécessaires aux activités des enzymes antioxydantes. D'autres constituants de l'alimentation, comme les vitamines du groupe B, le chrome ou le magnésium agissent comme des antioxydants indirects via la régulation de l'homocystéinémie (vitamines du groupe B), l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (chrome) ou la lutte contre l'inflammation (magnésium). La synthèse du glutathion, un des antioxydants le plus important de l'organisme, dépend fortement de l'apport nutritionnel en acides aminés tels que la méthionine (Roussel, 2009).

- **Le zinc**, son importance dans la prévention des effets toxiques dus aux radicaux libres est primordiale. Le zinc joue un rôle dans l'activité et le maintien de la SOD qui est un piègeur capital des ions superoxydes. Il protège également les groupements thiols des protéines et peut inhiber partiellement les réactions de formation des espèces oxygénées induites par le fer ou le cuivre. (Delattre J *et al.*, 2007).
- **Sélénium**, est un élément minéral essentiel contenu à l'état de traces dans l'organisme. Il se présente sous diverses formes chimiques dans l'alimentation. Il est activement métabolisé puis incorporé de manière originale (Roberfroid *et al.*, 2008). Le sélénium

agit comme un cofacteur enzymatique de la glutathion peroxydase. Dans l'alimentation le sélénium organique se trouve essentiellement lié à un acide aminé, la cystéine. Le sélénium organique est mieux absorbé, il subit une métabolisation hépatique qui conduit à des intermédiaires nécessaires à la synthèse de dérivés physiologiquement actifs comme la GPx. Les aliments riches en sélénium sont notamment, les noix de Brésil, les brocolis, l'ail...etc.(Haleng *et al.*, 2007).

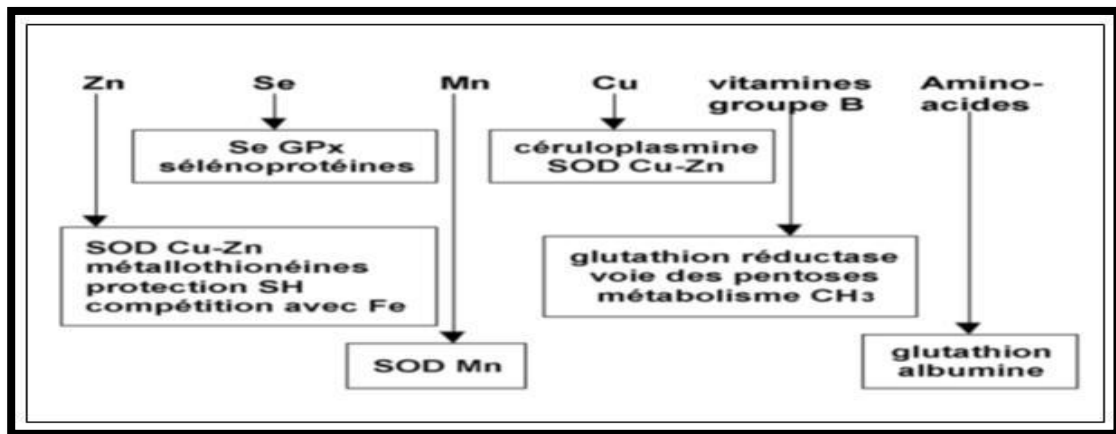


Figure 15 : Oligoéléments nécessaires aux activités des enzymes antioxydantes (Roussel, 2009).

✓ Les polyphénols

Les polyphénols sont des pigments végétaux dont les propriétés antioxydantes, les plus importants sont les flavonoïdes (Médart., 2009). Ils sont naturellement capables de piéger l'oxygène singulet $1O_2$ et le radical anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ en le dis mutant en H_2O_2 (Chen *et al.*,2003). Leur effet protecteur est notamment connu dans le système cardiovasculaire où ils préviennent l'oxydation des protéines. Ils sont particulièrement présents dans certaines boissons (thé, vin rouge, bière...) ou les fruits et légumes (agrumes, carottes...) (Lehucher *et al.*, 2001).

1.2. Généralités sur l'activité antibactérienne

Dès la naissance, l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutanéomuqueux. Pour résister à ces microorganismes de nombreux moyens sont mis en jeu. On peut schématiquement en distinguer 3 groupes : les barrières anatomiques, les mécanismes de résistance naturelle (ou innés) et l'immunité acquise (Kaufmann, 1997).

1.2.1. Les principales substances antimicrobiennes

✓ Les composés phénoliques

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Les polyphénols sont doués d'activité antibactériennes importantes et diverses, probablement dû à leurs diversités structurales. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes, avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité (**Cowan, 1999**). Il a été aussi rapporté que plus les composés phénoliques sont oxydés plus ils sont inhibiteurs des microorganismes (**Scalbert, 1991**). Les flavane-3-ols, les flavonols et les tanins ont reçu plus d'attention due à leur large spectre et forte activité antimicrobienne par rapport aux autres polyphénols. (**Daglia, 2011**).

Ces composés jouent un rôle inhibiteur, ils n'agissent pas sur la paroi bactérienne mais plutôt sur un mécanisme interne. Ces composés sont supposés agir sur l'ADN, l'ARN et la synthèse protéique (**Ulanowska et al., 2008**). Ils possèdent une capacité de supprimer un nombre de facteurs de virulence microbienne telle que l'inhibition de la formation de biofilms, la réduction de l'adhésion aux ligands de l'hôte et la neutralisation des toxines bactériennes ainsi qu'à leur capacité d'établir une synergie avec certains antibiotiques (**Daglia, 2011**).

✓ Les antibiotiques

Les antibiotiques, au sens strict, sont des produits élaborés par des micro-organismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques (**Bergogne-Berezin et Dellamonica, 1995**).

1.2.2. Méthodes utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne

Lorsque l'on parle d'activité antimicrobienne, on distingue deux sortes d'effets : une activité létale ou bactéricide et une inhibition de la croissance ou activité bactériostatique (**Zhiri , 2006**).

Les différents protocoles peuvent ainsi être classés :

- selon le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'échantillon, soit liquide, solide ou gazeux,
- selon la nature du contact de l'échantillon avec le germe : diffusion sur disque, solution alcoolique ou dispersion dans un émulsionnant (**Pibiri ,2005**).

➤ Aromatogramme

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antibactérien en milieu solide dans une boîte de Pétri, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit antibactérien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. (**Hellal, 2011**).

Placés dans une étuve à 37,5 °C, dans des conditions optimales de culture, les germes pathogènes se développent rapidement sur le milieu nutritif. Sur ces colonies microbiennes, plusieurs séries (6 à 8 par boîte) de petits disques de papier buvard imprégnés de différents échantillons à tester sont ensuite disposés. Après un temps de latence à 37,5 °C, le diamètre du halo d'inhibition entourant les disques est alors mesuré. Chaque halo, une zone claire, montre la destruction des germes pathogènes et donne une indication précise de l'activité antibactérienne de l'échantillon.

L'aromatogramme représente cependant un point de repère essentiel puisque sa technique est identique à celle utilisée pour mesurer l'activité bactéricide des antibiotiques (**Zhiri; 2006**).

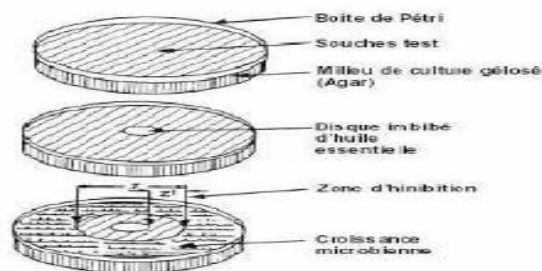


Figure16: Illustration de la méthode des aromatogrammes sur boîte de Pétri (**Zaika,1988**)

➤ **Micro atmosphères**

Dérivé de la méthode précédente le protocole des micro atmosphères est techniquement proche de celle des aromagrammes. La différence réside principalement dans la position du disque imprègne.

Dans cette technique, le disque imprègne est déposée au centre du couvercle de la boîte de Petri renversée pendant la durée de l'expérience. Celui-ci n'est donc plus en contact avec le milieu gélose (**Pibiri ,2005**).

➤ **.Méthode de diffusion en puits**

Méthode proposée par **Cooper Et Woodman**, reprise par **Shroeder et Messing**. Elle assure une diffusion radiale de l'échantillon à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire facilement mesurable. La méthode consiste à découper un trou circulaire dans la gélose et y verser une solution de l'échantillon de concentration connue. L'échantillon diffuse radialement en donnant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablementensemencée avec la suspension bactérienne (**Eymard, 2003**).

➤ **Méthode de dilution**

Les milieux à tester peuvent également être directement mélangés en concentration connue au milieu de culture, qu'il soit solide ou liquide (exige la dispersion homogène par un émulsifiant). Le milieu est ensuite inoculé à un taux déterminé de microorganismes, après incubation, on note la présence ou l'absence de culture. La lecture peut être visuelle ou à l'aide d'un spectrophotomètre, le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu (**Robert-Demuet, 1995**).

Deuxième partie

Partie Pratique

Chapitre I

Méthodologie de travail

1. Matériel d'étude

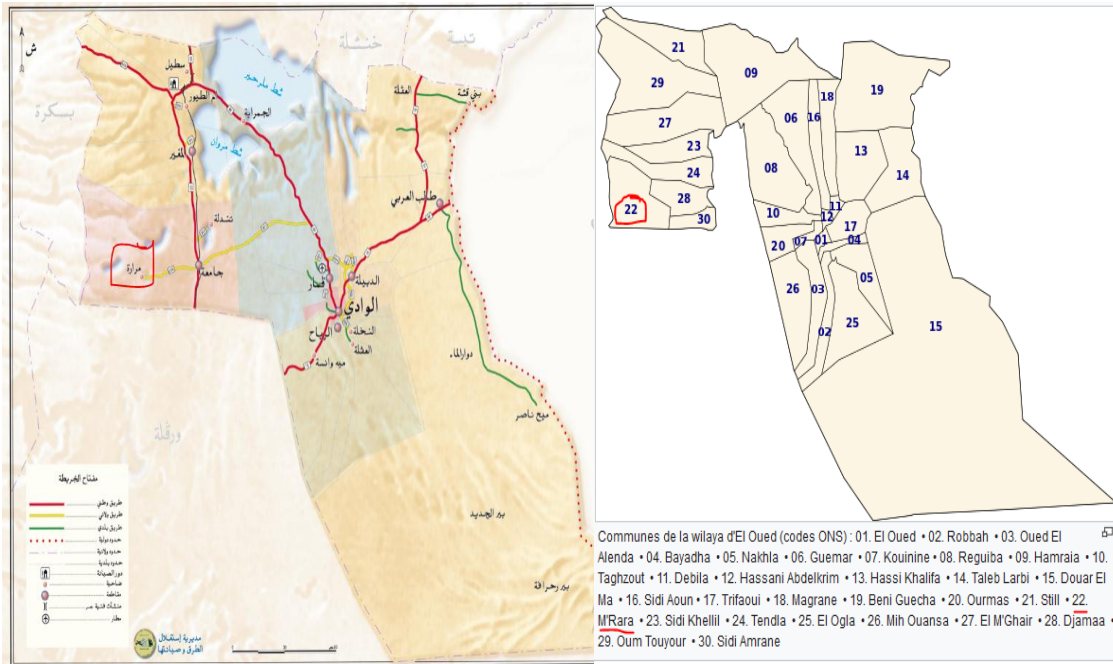
Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire pédagogique de la faculté des Sciences de la nature et de la vie de et de Laboratoire de Valorisation et Technologie des Ressources Sahariennes de l'université Echahid Hamma Lakhdar d'El Oued.

1_1 Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude expérimentale est une espèce végétale appartenant à la famille des Acéracées *Cotula cinerea*, sa taxonomie et toutes les données là concernant ont été détaillées précédemment. L'organe végétal choisi pour la réalisation des expérimentations de cette étude est les fleurs et la partie aérienne puisque c'est à son niveau que se trouve la majorité des principales substances actives, en d'autre terme, c'est le lieu de synthèse et de la mise en réserve temporaire des principaux composés du métabolisme primaire et secondaire

1_2 Site de prélèvement

La plante étudiée a été fraîchement récolte en mars 2019 durant la période floraison. Puis séparé les fleurs et la partie aérienne puis émulsion Les échantillons de la plante ont été prélevés à partir d'un site de la région de M'rara. Le site fait partie de la wilaya d'El Oued (**Carte01**).



Carte 1 : Localisation géographique de la zone d'étude (M'rara, wilaya d'El Oued).
(P.D.A.U.wilaya d'El Oued 1997).

2. Extraction des huiles essentielles

Le matériel végétal séché est soumis à une hydrodistillation au moyen d'un dispositif d'extraction type Clevenger (**Bruneton, 1999**). Cette technique se base sur le pouvoir que possède la vapeur d'eau à transporter les huiles essentielles. L'opération consiste à introduire 50g de masse végétale séchée dans un grand ballon en verre, on y ajoute une quantité suffisante d'eau distillée 750 ml sans pour autant remplir le ballon pour éviter les débordements de l'ébullition. Le mélange est porté à ébullition à l'aide d'un chauffe ballon. Les vapeurs chargées d'huile essentielle passent à travers le tube vertical puis dans le serpentin de refroidissement où aura lieu la condensation. Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans le tube rempli auparavant d'eau distillée. L'huile essentielle de faible densité par rapport à l'eau, surnage à la surface de cette dernière. L'huile ainsi obtenue est récupérée puis traitée par un déshydratant, le sulfate de sodium, pour éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans l'huile et enfin conservée dans des flacons opaques bien scellés à température basse (4-5 C°). L'opération d'extraction dure trois heures à partir du début d'ébullition.

3. Le principe d'étude :

le but principal est d'étudier les activités antioxydantes et antimicrobiennes des huiles essentielles de la partie aérienne de *Cotula cineria*. La plante étudiée a été fraîchement récolte en mars 2019 durant la période floraison Les échantillons de la plante ont été prélevés de la région de M'rara.

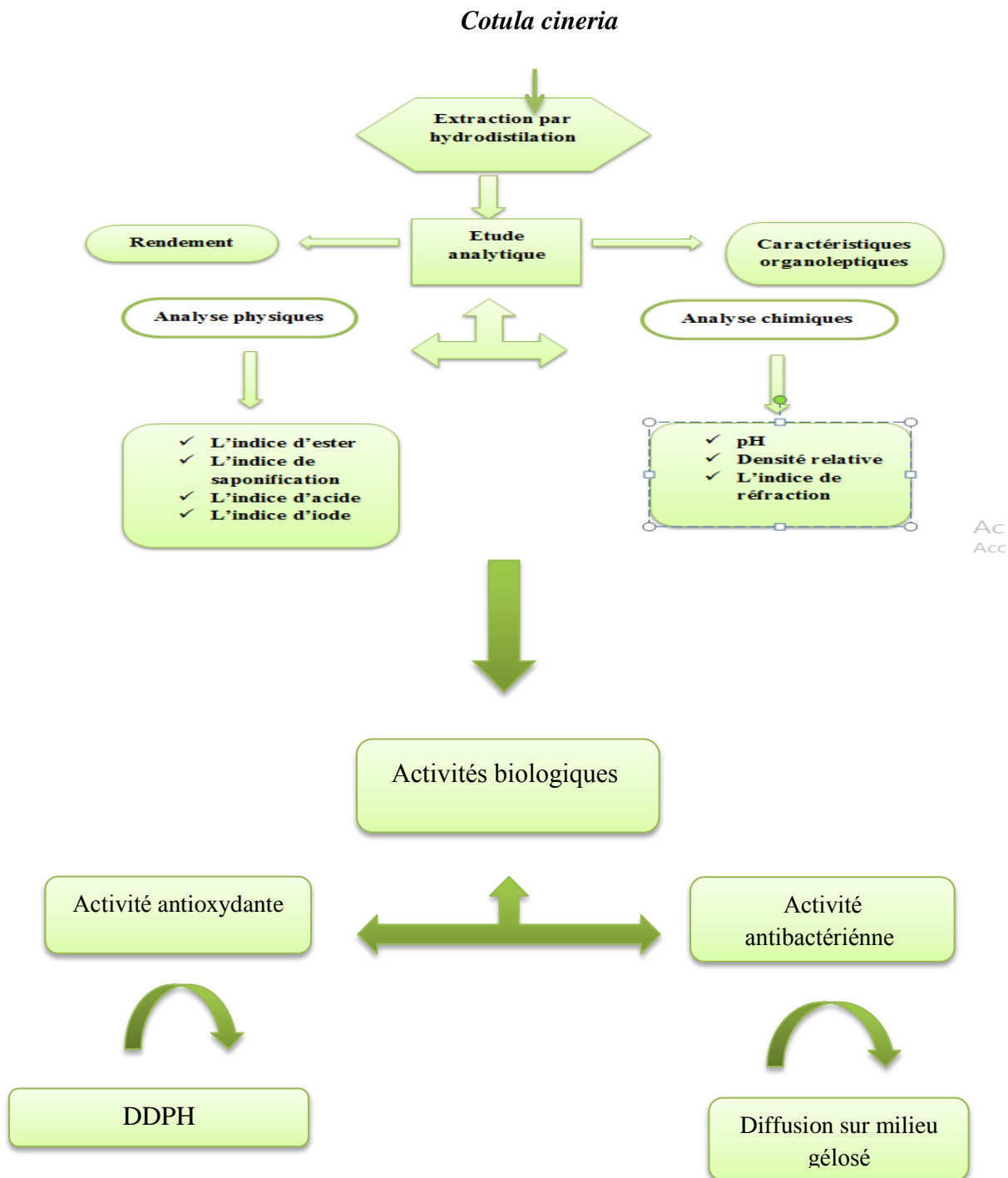


Figure 17 : Plan générale de la partie expérimentale

4. Détermination des indices physico-chimiques des HEs extraits

4.1. Propriétés physiques

4.1.1. Calcul des rendements

Selon **AFNOR (1986)**, le rendement en huiles essentielles est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction (M') et la masse sèche du matériel végétal utilisée (M). Le rendement est exprimé en pourcentage, et il est donné par la formule suivante : (**Belyagoubi, 2006**).

$$R_{HE} \% = (M' / M) * 100$$

R_{HE} : rendement en huile essentielle de matériel végétal

M' : masse de l'huile essentielle obtenue en gramme

M : masse de matériel végétal utilisée en gramme et qui vaut 50 g

4.1.2. Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont des propriétés organoleptiques (caractéristiques d'une substance qui sont perceptibles par les organes des sens : saveur, odeur, aspect et consistance de l'objet) communes comme le fait d'être liquides à température ambiante, d'être volatiles et entraînaibles à la vapeur d'eau.

4.1.3. Le potentiel d'hydrogène (pH)

- **Définition**

Un pH-mètre est muni d'un boîtier relié à une sonde. Le boîtier est un millivoltmètre qui mesure une tension entre les deux électrodes de la sonde, qui sera convertie en pH par un calculateur. Cette tension est due à un échange limité entre les ions sodium du verre de l'électrode et les ions H_3O de la solution.

- **Principe**

Le pH donne une indication sur l'acidité ou l'alcalinité du milieu, il est déterminé à partir de la quantité d'ions d'hydrogènes libres (H) contenue dans l'huile essentielle (**Audigie et al., 1984**).

- **Mode opératoire**

- Régler la température du pH mètre sur le milieu ambiant, rincer toujours la sonde à l'aide d'eau distillée, puis on l'essuie.

- Prendre 100ml d'huile essentielle à analyser dans un bécher,

- Plonger la sonde dans la solution et lire le pH.

4.1.4. Densité

- **Définition**

C'est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile à 20°C, et la masse d'un volume égal d'eau distillée à la même température (**Lion, 1955**).

- **Principe**

Effectuer des pesées successives de volume égal d'huile et d'eau.

- **Matériels**

- Balance analytique.

- Pycnomètre.

- Etuve.

- **Méthode de calcul**

$$d_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Avec,

m_0 : Masse de pycnomètre vide.

m_1 : Masse du pycnomètre rempli d'eau.

m_2 : Masse de pycnomètre rempli d'huile essentielle.

- **Mode opératoire**

- Nettoyer le pycnomètre, sécher dans l'étuve pendant une heure.
- Déterminer la masse du pycnomètre vide.
- A l'aide d'une pipette remplir le pycnomètre par l'eau distillée et déterminer la masse de pycnomètre rempli d'eau distillé.
- Nettoyer, sécher le pycnomètre dans l'étuve pendant une heure.
- A l'aide d'une pipette remplir le pycnomètre par l'huile essentielle et déterminer la masse de pycnomètre rempli de l'huile essentielle.

4.1.5. Indice de réfraction

- **Définition**

L'indice de réfraction est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée passant de l'air dans l'huile maintenue à température constante (**Lion, 1955**).

- **Principe**

Il est soit pour mesurer directement l'angle de réfraction, soit pour observer la limite de réflexion totale, l'huile étant maintenue dans les conditions d'iso-tropisme et de transparence

- **Mode opératoire**

- Etalonner l'appareil par l'eau distillée.
- Nettoyer la lame du réfractomètre en utilisant le papier de Joseph.
- Déposer quelques gouttes de l'huile essentielle dans la lame et régler le cercle de chambre sombre et claire dans la moitié.
- Effectuer la lecture en prenant compte la température (20°C).

4.2. Propriétés chimiques

4.2.1. Indice d'iode

- **Définition**

C'est la mesure de degré d'insaturation d'une matière grasse en déterminant le nombre d'iode (gramme). Se fixant sur les doubles liaisons présentes dans 100g de lipides.

- **Principe**

Il est pour la détermination l'insaturation de l'huile essentielle. Quelques soit le réactif halogénéutilisé, l'iode se fixe sur les insaturations des chaînes grasses en les saturants. Il est déterminé à l'aide du réactif de Wijs et titrer avec une solution de thiosulfate de sodium.

- **Matériels et réactifs**

Tableau 02 : Matériels et les réactifs relatifs à l'indice d'iode.

Matériels	Réactifs
Balance analytique	L'eau distillée
Erlenmeyer	Solution d'éthanol
Pipettes	Solution d'empois d'amidon
Burette	Solution d'iodure de potassium
	Solution de thiosulfate de potassium (0,1N)

Méthode de calcul

L'indice d'iode est donné par la formule suivante :

$$I_{\text{iode}} = \frac{(V_0 - V)}{P} \times 12,69 \times N$$

Avec,

N : Normalité de la solution.

V_0 : Volume de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (ml) nécessaire pour titrer l'essai à blanc.

V : Volume de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (ml) nécessaire pour titrer l'échantillon.

P : Prise d'essai (g).

- **Mode opératoire**

Le mode opératoire est comme suite :

- Introduire 0,2g de prise d'essai dans un erlenmeyer.
- Ajouter 25ml de tétrachlorure de carbone pour dissoudre l'échantillon.
- Ajouter 25ml de réactif de Wijs.
- Boucher et agiter et placer à l'abri de la lumière pendant une heure.
- Ajouter 20ml d'iodure de potassium et environ 150ml d'eau distillée, agiter le mélange.
- Titrer avec le thiosulfate de sodium 0,1N jusqu'à la disparition du couleur jaune.
- Ajouter trois à quatre gouttes d'empois d'amidon et continuer à titrer jusqu'à la décoloration.
- Réaliser un essai à blanc dans les mêmes conditions sans la matière grasse.

4.2.2. Indice de saponification

- **Définition**

L'indice de saponification, représente la quantité en milligrammes de KOH (potasse) nécessaire pour transformer en savon les acides gras libres et les glycérides contenues dans un gramme de corps gras, est déterminé en mélangeant un volume d'huile avec de la potasse et titration avec de l'acide chlorhydrique.

- **Principe**

Si on traite un ester par de la potasse suffisamment concentrée et chaude, on le régénère suivant une réaction totale d'alcool et le sel de potassium de l'acide puis on donne la naissance à l'ester.

- **Matériels et réactifs**

Tableau 03 : Matériels et réactifs relatifs à l'indice de saponification

Matériels	Réactifs
Balance analytique	Potasse alcoolique 0.5 mol/l
Fiole de bouchons	Acide chlorhydrique 0,5 mol/l
Pipette jaugée	Phénolphthalique
Burette	Ethanol

- **Méthode de calcul**

L'indice de saponification est donné par la formule suivante :

$$I_{\text{Saponification}} = \frac{(V_T - V_E) \times C \times M}{m}$$

Avec,

VT : Volume en ml de HCL utilisé pour l'essai à blanc.

VE : Volume en ml de HCL utilisé pour l'échantillon à analyser.

C : Concentration de la solution d'acide chlorhydrique en mol/l (0,5mol/l).

M: : masse molaire du KOH en g/mol (56.1g/mol).

m : prise d'essai en g (**Wolff, 1968**).

- **Mode opératoire**

- Peser 2g d'huile essentielle dans une fiole.
- Ajouter 25 ml de potasse alcoolique de concentration 0,5 mol/L.
- Mettre au Soxhlé et pendant une heure, agiter à chaque 15 min le ballon
- Ajouter 2 à 3 gouttes de phénolphtaléine.
- Titrer par l'acide chlorhydrique de concentration 0,5 mol /L en agitant constamment jusqu'au virage à l'incolore de la phénolphtaléine.
- Faire deux essais.

4.2.3. Détermination de l'indice d'ester

C'est le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans 1g d'HE (**AFNOR NF T 75104 : 1994**). Pour ce test, le mélange obtenu lors de l'indice d'acide est chauffé à reflux avec 25ml de potasse pendant une heure. Après chauffage et une fois la température est diminuée, la solution est dosée avec l'acide chlorhydrique jusqu'au virage de la couleur de la solution au jaune. En parallèle on a effectué un essai à blanc dans les mêmes conditions mais sans le corps gras. La valeur de l'indice d'ester est déterminée par la formule suivante:

$$IE = \left(28,05 \frac{V_0 - V_1}{m} \right) - IA$$

Avec,

V_0 : volume en millilitre de la solution d'acide chlorhydrique utilisée pour l'essai à blanc.

V_1 : volume en millilitre de la solution d'acide chlorhydrique utilisée pour la détermination de l'indice d'ester.

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

I_A : la valeur d'indice d'acide déterminée.

4.2.4. Indice d'acide

- **Définition**

L'indice d'acide est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaires pour la neutralisation des acides libres contenus dans un gramme de corps gras (**Lion, 1995**).

- **Principe**

Le principe consiste à neutraliser les acides libres par une solution alcoolique d'hydroxyde de sodium titrée.

- **Matériels et réactifs utilisés**

Le tableau suivant présente les matériels et les réactifs relatifs à l'indice d'acide :

Tableau 04: Matériels et réactifs relatifs à l'indice d'acide

Matériel	Réactifs
Balance analytique	L'eau distillée
Erlenmeyer	Ethanol
Pipettes	Phénolphthaléine à 1%
Burette	Solution d'hydroxide de sodium

- **Méthode de calcul**

L'indice d'acide est donné par la formule suivante (**Wolff, 1968**) :

$$I_{\text{Acide}} = \frac{M * V * N}{m}$$

Avec,

M : Masse molaire, exprimée en g/mole, de NaOH (M=40g/mole).

N : Normalité de la solution titrer NaOH (0.12N).

V : Volume ml de NaOH titré

m : Masse (g) de la prise d'essai

- **Mode opératoire**

-Peser 2,5 g d'huile essentielle dans un erlenmeyer.

-Ajouter 75ml d'éthanol.

- Neutraliser en présence de quelques gouttes d'empois d'amidon à 1%.

- Agiter et tirer avec la solution d'hydroxyde de potassium (0,1N) jusqu'à l'obtention d'une couleur rose.

5. Activité biologique

5.1.Détermination de l'activité antioxydante

Le test a été utilisé pour l'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles. Il s'agit de l'activité scavenger de radical libre DPPH. (2,2-diphényl-1-picryl hydroxyle).

- ✓ **Activité scavenger de radical DPPH' :**

- **Principe**

Le DPPH (2,2 diphenyl-1-picryl hydroxyle) est un radical instable qui possède un électron célibataire sur l'atome d'azote, caractérisé par une couleur violette et un pic d'absorbance spectral maximal à 517 nm. En présence d'antioxydants, l'électron célibataire devient apparié, ce qui conduit à la décoloration de DPPH du violet foncé (forme radicalaire DPPH) au violet claire (forme réduite DPPH-H). Cette décoloration est dû à la capacité d'échantillon de piéger ce radical (**Ramadan, 2010**).(Figure 17)

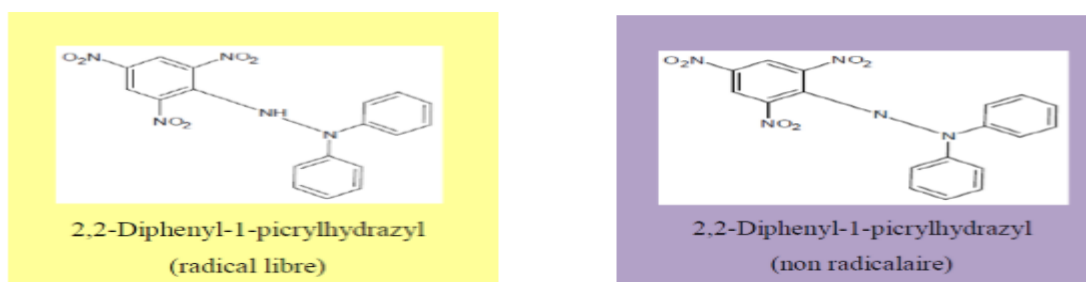


Figure 18: Structure de DPPH et mécanisme de sa réduction par un antioxydant (**Ramadan, 2010**).

- **Mode opératoire**

L'évaluation de l'activité antioxydante en utilisant ce test a été effectuée selon le protocole décrit par **Bougatef et al, (2009)**. La solution de DPPH a été préparée à une concentration de 10^{-3} M dans l'éthanol. Un volume de 0,15 ml est ajouté à 2 ml de chaque échantillon à différentes concentrations. Le mélange est ensuite soumis à une agitation au vortex, puis incubé pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante. La lecture est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à 517 nm.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition qui est donné par la formule suivante :

$$\% I = \frac{Abs_{ctl} - Abs_{éch}}{Abs_{ctl}} \times 100$$

Abs_{ctl} : absorbance de contrôle.

$Abs_{éch}$: absorbance de l'échantillon.

% I : pourcentage d'inhibition.

Les pourcentages d'inhibition ainsi déterminés, nous permettent de calculer la valeur du paramètre IC_{50} (concentration d'inhibiteur) qui représente la concentration de la substance nécessaire pour diminuer 50% des radicaux libres dans le milieu réactionnel.

5.2. Activité anti bactérienne

5.2.1. Microorganismes utilisés :

Les deux souches bactériennes utilisées dans ce travail sont de référence de type ATCC et disponibles au sein de notre laboratoire de recherche.

Aspect microscopique de la souche	Taxonomie	Description
<i>Escherichia coli</i> (ATCC25922)	Règne <i>Bacteria</i> Classe <i>Gammaproteobacteria</i> Ordre <i>Enterobacteriales</i> Famille <i>Enterobacteriaceae</i> Genre <i>Escherichia</i> Espèce <i>Escherichia coli</i> (KAPER <i>et al.</i> , 2004).	C'est l'espèce type des entérobactéries. Cette espèce qui fait l'objet d'un très grand nombre d'étude constitue le modèle des bacilles à Gram négatif aérobies. Les colonies ont en moyenne 2 mm de diamètre, allongées et à bords réguliers (JOLY et REYNAUD, 2002). C'est l'espèce dominante de la flore aérobie du tube digestif. Elle est habituellement une bactérie commensable. Elle peut devenir pathogène si les défenses de l'hôte se trouvent affaiblies ou si elle acquiert des facteurs de virulence particuliers (BERCHE, 2003)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	Règne <i>Bacteria</i> Classe <i>Gammaproteobacteria</i> Ordre <i>Pseudomonadales</i> Famille <i>Pseudomonadaceae</i> Genre <i>Pseudomonas</i> Espèce <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (DELARRAS, 2007).	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , autrement connu sous le nom de bacille pyocyanique, est une bactérie Gram négative de genre <i>Pseudomonas</i> . Les bacilles sont fins, droits et très mobiles grâce à un flagelle polaire : ciliature monotriche, dépourvus de spores et de capsules. Ils apparaissent la plupart du temps isolés ou en diplobacilles. Elle peut dans certaines conditions, être pathogène. très résistante, elle est avec d'autres bactéries de Gram négatif de plus en plus souvent responsables d'infection nosocomiales. C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement (DELARRAS, 2007 ; MEYER et ZIMMERMAN, 1993).

5.2.2. Méthode utilisée pour test bac in vitro

La méthode utilisée pour l'interaction entre l'HEs de partie aérienne de *Cotula ceneria* et leurs fleurs avec les espèces microbiennes sont basées sur la diffusion de cette HE dans de milieux de culture pour inhiber la croissance d'un microorganisme pathogène. (Dulger et Gonuz, 2004 ; Parekh et Chanda, 2007 ; Rota et al, 2008).

L'activité antimicrobienne a été déterminée par la méthode de diffusion des disques. On a travaillé sur 2 espèces pathogènes qui sont *Escherichia coli* (ATCC 25922) et *Pseudomonas*

aeruginosa ATCC 27853. Ces espèces sont procurées par le laboratoire de biologie d'université Echahid Hamma Lakhdar d'El oued.

- **Repiquage des espèces bactériennes :**

Les espèces bactériennes à tester ont été cultivées dans des boîtes de pétrie contenant de gélose nutritive puis incubées à 37 °C pendant 24 h afin d'obtenir une culture jeune des bactéries et des colonies isolées.

- **Préparation de l'inoculum**

3 à 5 colonies bien séparées des espèces bactériennes concernées ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile et homogénéisées dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9 % de sel (NaCl).

- **Test de l'aromatogramme**

Pour réaliser le test de l'aromatogramme, on a réalisé par les étapes suivantes :

- Une suspension de chaque germe est préparée dans l'eau physiologique stérile et ajustée.
- Chaque souche estensemencée par écouvillon sur des biotes de pétrie contenant le milieu Muller – Hinton. La surface des milieux est ensuite séchée sous hotte à flux laminaire en laissant le couvercle des boîtes de pétrie légèrement ouvert.
- Dépôt de disques (papier Whatman stériles de 6 mm de diamètre) préalablement imprégnés des concentrations (C1=100%, C2 = 75%, C3 = 50% et C4 = 25%) d'HEs de partie aérienne et l'HEs de fleurs de *Cotula ceneria* à la surface du milieu Muller – Hinton agar (MHA) contenant une souche donnée.
- Des disques de diméthyle sulfoxyde (DMSO) et disque antibiotique (Céfixime) sont déposés à la surface du milieu géloséensemencé avec les différentes souches bactériennes pour préparer les témoins.
- Enfin, les boîtes sont incubées à 37° C pendant 18 à 24 h.

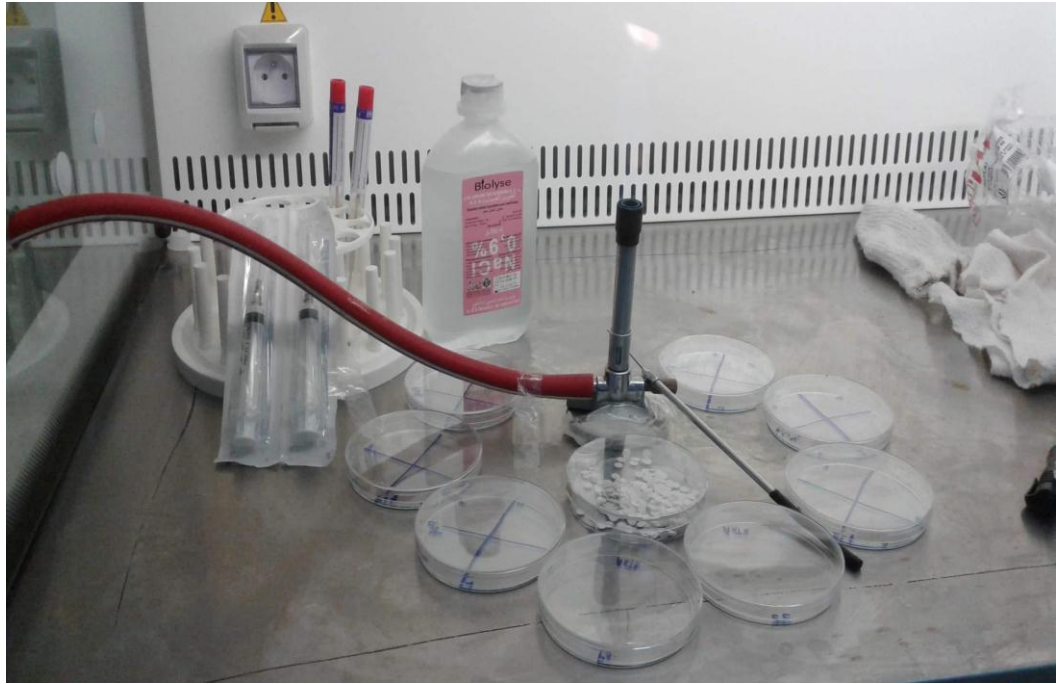


Photo 2 : Test aromatogramme (photo original, 2019).

- **Lecture :**

Après incubation 18-24 h à 37° C dans l'étuve, les résultats sont observés, en mesurant les diamètres d'inhibition.

L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant à l'aide d'une règle le diamètre de la zone d'inhibition, déterminé par les différentes concentrations autour des disques. Et comparée avec celle de DMSO comme contrôle négatif et d'un antibiotique comme contrôle positif.(cefixine)

Chapitre II

Résultats et Discussion

1. Rendement d'extraction des huiles essentielles

La première quantification à faire est celle du rendement en huile essentielle obtenue par la technique d'hydrodistillation. Ce rendement est calculé à partir du poids d'huile essentielle par rapport au poids sec de la masse végétale utilisée dans l'hydrodistillation :

Tableau 05 : présent la moyenne de rendement d'HEs de fleurs de *Cotula ceneria* Fraîche (%)

Prise	Durée (heure)	Rendement d'HEs de fleurs Fraîche (%) de chaque prise	Moyenne de rendement de plante Fraîche (%)
1 ^{ere}	3h00mn	0,3	2,54
2 ^{eme}	3h00mn	3,66	
3 ^{eme}	3h00mn	3,67	

Tableau 06 : présent le moyenne de rendement d'HES de partie aérienne de *Cotula ceneria* Fraîche (%)

Prise	Durée (heure)	Rendement d'HES de partie aérienne Fraîche (%) de chaque prise	Moyenne de rendement de plante Fraîche (%)
1 ^{er}	3h00mn	1,21	1,07
2 ^{eme}	3h00mn	1,05	
3 ^{eme}	3h00mn	0,95	

Le moyen de rendement d'huile essentielle des fleurs de l'ordre de 2,54 % Ce rendement peut être considéré comme le plus forte comparativement à ceux obtenu par hydrodistillation à partir de la partie aérienne de *Cotula ceneria* 1,07 %.

Perry et al. (1999) et Ennajjar et al, (2009), ont expliqué que le rendement diffère d'une famille botanique à une autre, entre les plantes de la même espèce, d'un stade de développement à un autre et d'une saison à une autre.

Par ailleurs, **Panizzi et al, (1993)**, dit que la qualité de la matière végétale utilisée peut influencer la sécrétion d'huiles essentielles chez une plante. Si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une huile essentielle, la composition de cette dernière (qualitative et quantitative) peut varier selon sa localisation dans la plante.

La biosynthèse et l'accumulation des molécules aromatiques sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées (cellules à essence, poches sécrétrices, canaux sécréteurs ...), souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante. D'autres facteurs, comme le pH, la température, le rapport quantité de matière au volume du solvant, les intervalles de temps, le nombre et les étapes d'extractions individuelles, jouent également un rôle important dans cette procédure (**Lee et al., 2003**).

Selon **Bruneton ,(2009)** , le mode d'extraction des huiles essentielles ne s'effectue pas toujours avec de très bons rendements. De plus, la qualité des essences obtenues dépend dans une large mesure de l'état de fraîcheur du végétal et du temps écoulé entre la récolte et la transformation industrielle. Un stockage de la plante pendant 24 heures suffit pour induire des changements sensibles de composition, lesquels peuvent d'ailleurs être souhaités. Ainsi, au cours du stockage, la perte des composés les plus volatils peut être importante. L'auteur signale aussi la disparition de 15% de produits volatils dans le végétal après 3 mois de stockage et de 80% après neuf ans.

D'après **Perrot et Paris (1971)**, La teneur en principes actifs d'une plante médicinale varie avec l'organe, l'âge de la plante, l'époque de la récolte ainsi qu'avec les variétés ou races.

Ces variations de teneurs peuvent être dues à plusieurs facteurs notamment le degré de maturité des fleurs, l'interaction avec l'environnement (type de climat, sol), le moment de la récolte et la méthode d'extraction.

Selon **Yazza et Djedjai,(2016)**, ajoutent que la composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant diverses conditions à savoir, l'environnement climatique, la localisation, le génotype, l'origine géographique, la période de récolte, lieu et durée et température de séchage, les parasites, les virus et mauvaises herbes. La lumière stimule aussi la production des huiles essentielles.

Guaouguau et al., (2018), trouvent que l'huile essentielle de parties aériennes de *Cotula cinerea* a été extraite par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger. L'extraction a été réalisée pendant six heures et l'huile obtenue (rendement = 0,92%) a été conservée dans une seule fois.

En parallèle, **Kether et al, (2012)** trouve avec la même plante le rendement en huile essentielle est très faible ($0,0801\% \pm 0,0117\%$). Il est relativement plus élevé que ceux obtenus par Kether et ses collègues travaillant sur différentes parties de *Cotula coronopifolia*L. En Tunisie ($0,01134\%$ dans les feuilles) ; $0,03935\%$ pour les fleurs ; $0,00123\%$ dans les racines et $0,00405\%$ pour les tiges).

Mais **Belyagoubi, (2012)**, trouve avec la même plante le rendement des extraits bruts méthanoïques à l'ordre ($15.79 \pm 4.539\%$).

2. Caractères organoleptiques

Les HE sont habituellement liquides à température ambiante et volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes. Elles sont plus ou moins colorées et leur densité est en général inférieure à celle de l'eau.

Les caractères organoleptiques de L'HE de *Cotula cineria* obtenus par hydrodistillation, sont présentés dans le **Tableau 08**, ci dessous :

Tableau 07 : Caractères organoleptiques de l'HE *cotula cineria*

Origine	Aspect	Couleur	Odeur
HE de fleurs	Liquide	Bleu puis transfert à transparent	Une Forte odeur
HE de partie aérienne	Liquide	Jaune	Une Forte odeur
AFNOR	Liquide	Jaune	Artémises Agréables

Nos résultats sont conformes à ceux rapportés par **AFNOR (2000)**. **Martini (2006)** signale que la plupart des huiles essentielles sont de couleur jaune pâle et parfois incolore, sauf pour les essences à azulène (camomille, matricaire) qui ont une couleur bleue.

Les huiles essentielles ont une odeur persistante et visqueuse Artémises (**Tableau 07**), jaune dans la partie aérienne et bleu puis transformé à transparent dans les fleurs. La couleur est fortement influencée par la nature du mélange complexe de composés pétroliers (**Ashnagar et al., 2007**).

Les caractéristiques organoleptiques (apparence, couleur, odeur, goût) étaient autrefois les seules indications permettant d'évaluer la qualité d'une huile essentielle, mais comme ces

propriétés ne donnent que des informations très limitées sur ces essences, il est nécessaire de faire appel à d'autres techniques de caractérisation plus précises. La qualité d'une huile essentielle et sa valeur commerciale sont définies par des normes admises et portant sur les indices physicochimiques (Taleb-Toudert, 2015).

3. Les caractéristiques physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques telles que : l'indice de réfraction, la densité, l'indice d'acide et l'indice d'ester, constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'huile essentielle. Faute de quantité, seulement les deux premières caractéristiques des huiles essentielles analysées ont été déterminées selon les normes de l'association française de normalisation (AFNOR, 1989).

Les résultats de calcul des caractères physico-chimiques de l'HE de *Cotula cineria* obtenus par hydrodistillation sont évalués et enregistrés dans le **Tableau 09**.

Tableau 08 : caractères physico-chimiques de l'HE de *Cotula cineria*

Caractéristiques	Essence de fleur	Essence de partie aérienne
Densité	0,95	0,90
pH	8,39	8,60
Indice de réfraction	1,33350	1,33375
Indice d'iode	0,0028	0,0054
Indice d'ester	1,056	3,915
Indice d'acide	0,0564	0,01128
Indice de saponification	1,1124	4,0278

. 3.1. Densité relative

La détermination de la densité d'une huile nous renseigne sur sa pureté. Elle est en fonction de la composition chimique des huiles et de la température (Karleskind, 1992).

La densité relative à 20°C d'une huile essentielle est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile essentielle à 20°C à la masse d'un volume égal d'eau distillée à la même température.

Nous avons remarqué que la densité des huiles essentielles des fleurs et de partie aérienne est de 0.95 et 0.90 respectivement. Ces valeurs de la densité sont proches de ceux relevés par (Lahrech, 2010) et (Frouhart *et al.*, 2013) et sont dans l'intervalle des normes (AFNOR, 1999) qui est comprise entre 0.9 à 2.

Selon Tenscher *et al.*, (2005), ce paramètre est lié à la composition chimique de cette huile qui est affectée par un grand nombre de facteurs tels que le phénotype, le moment de récolte, le type de terrain, la conservation, le procédé et les conditions d'extraction.

3.2. pH

Les huiles essentielles des fleurs et de la partie aérienne possèdent le caractère basique (pH>7). Il convient de souligner que le pH joue un rôle déterminant au cours des réactions chimiques et biochimiques et peut influencer les propriétés stabilisatrices d'une huile essentielle.

Par conséquent, ce résultat peut amener à un bon caractère stabilisateur contre les microorganismes ; ce qui permettra à ces huiles essentielles de jouer le rôle de conservateurs dans les produits alimentaires.

3.3. L'indice de réfraction

L'indice de réfraction calculée à la température 20 °C à l'aide de réfractomètre. La valeur est supérieure à l'indice de réfraction de l'eau à 1.333. Notre résultat obtenu est supérieur à celui rapportés par Yazza et Djedjai,(2016); L'indice de réfraction est inversement lié au degré d'insaturation de l'huile. Plus l'indice de réfraction est faible plus l'huile essentielle est de bonne qualité (Gacem *et al.*, 1995).

Boukhatem *et al.*, (2010), Cela pourrait s'expliquer par la nature de la composition de l'huile essentielle. L'indice de réfraction varie selon la composition chimique, la masse volumique et augmente avec l'instauration ou la présence de fonctions secondaires où L'indice de réfraction (IR) représente aussi un critère de pureté de l'huile.

Denis *et al.*, (1997), ont expliqué l'indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un

indice élevé. Pour certains auteurs le faible indice de réfraction de l'HE indique sa faible réfraction de la lumière ce qui pourrait favoriser son utilisation dans les produits cosmétiques (Denis *et al.*, 1997).

3.4. Indice d'iode

On peut constater d'après les résultats du tableau, que les indices d'iode de cette plante sont donnés par les fleurs et de la partie aérienne avec des taux 0,0028 et 0,0054 respectivement.

Indice d'iode est une bonne méthode générale pour exprime la dureté d'une huile. (FAO, 1990). L'indice d'iode est utilisé comme guide pour le contrôle de qualité dans l'achat des matières première et comme contrôle de l'avancement de l'hydrogénation.

Selon Kanji (2001), le rapport est étroit entre l'indice de réfraction et l'indice d'iode. Pour une huile ni oxydée ni polymérisée, les deux indices varient dans le même sens. Cela permet de classer les huiles en huiles non siccatives (comestibles) ($II < 100$ et $1.467 < IR < 1.472$), en huiles semi siccatives ($100 < II < 130$ et $1.470 < IR < 1.478$) et en huiles siccatives ($II > 130$ et $1.481 < IR < 1.482$).

3.5. L'indice d'ester

L'indice d'ester de l'HE de la partie aérienne est le plus significatif par rapport à ceux trouvés avec les fleurs, alors que l'HE des fleurs possède l'indice le plus faible. Ce qui préconise une relation proportionnelle entre la qualité d'huile et la valeur d'indice d'ester.

Pour les constantes chimiques, Acidité donne une idée sur le taux d'acides libres. Dans notre étude, cet indice, certes dans les normes, demeure relativement élevé. Cela peut trouver une explication dans la dégradation de l'HE (hydrolyse des esters) durant sa conservation, ce qui est à terme préjudiciable

Cependant, l'indice d'ester peut aussi être influencé par d'autres facteurs, tels que les conditions dans lesquelles s'effectuent l'hydrolyse (c'est-à-dire dans quel type d'alambic, les constituants de l'eau utilisés pour le chauffage). De manière générale, les huiles de très bonnes qualités ont un indice ester très élevé.

3.6. Indice d'acide

D'après nos résultats, l'huile essentielle des fleurs présente un indice d'acide plus élevé par rapport l'huile essentielle de la partie aérienne. Les valeurs de l'indice d'acide des huiles

essentielles de nos plantes trouvées sont conformes à ceux rapportée par **AFNOR (2002)** (< 2). Un indice d'acide inférieur à deux, est une preuve de bonne conservation de l'huile (faible quantité d'acides libres). (**Frenot et Vierling, 2001**). En effet, une huile fraîche ne contient que très peu d'acides libres.

L'indice d'acide indique le comportement et la quantité des acides libres présents dans notre huile. Il peut aussi nous renseigner sur la susceptibilité de l'huile à subir des altérations.

Lazouni et al, (2007) dit pendant la période de stockage que l'huile peut subir des dégradations telle l'hydrolyse des esters. Constatent des variations des indices d'acide et d'ester au cours du temps et en fonction de la température. Parce que les indices élevés montrent que l'huile essentielle est instable et provoque une oxydation inquiétante. Car, l'huile, en s'oxydant, se dégrade rapidement et provoque une augmentation de l'indice d'acide.

Comme on a constaté qu'il y a une concordance entre l'augmentation de l'indice d'acide et la diminution des pH. L'exemple de HEs des fleurs enregistrant des indices d'acide élevé concorde avec la faible valeur du pH de ces essences. Au voisinage des HEs des parties aériennes, nos résultats sont comparables à ceux de (**Yazza et Djedjai, 2016**).

3.7. Indice de saponification

La détermination des indices de saponification de nos huiles a donné les valeurs enregistrées dans le tableau qui montre que la partie aérienne reçoit la plus élevée en indices de saponification 4,0278 par contre, les fleurs marquent 1,1124.

L'indice de saponification rend compte de la longueur des chaînes hydrocarbonées des acides gras ; plus le poids moléculaire est élevé plus l'indice de saponification est faible (**Bruni et al , 1994**).

Lorsqu'une huile n'est pas soumise à de bonnes conditions de conservation, sa qualité peut se détériorer de diverses manières, mais le plus souvent par hydrolyse ou par oxydation. Dans ce cas, elle devient impropre à la consommation.

4. Activités biologiques

4.1. Activité antioxydante

L'activité anti radicalaire est réalisée par la méthode du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) qui est une méthode fréquemment utilisée pour sa simplicité. Cette

méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron, la forme non radicalaire DPPH-H est formée.

L'inhibition de la décoloration du radical DPPH est en fonction de la concentration des différents extraits utilisés (Duen *et al.*, 2006). L'activité antioxydante des extraits est exprimée en IC₅₀, il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH.

Les résultats obtenus lors du test de mesure de pourcentage d'inhibition du radical DPPH sont représentés dans les Figures 19 ,20 et 21 :

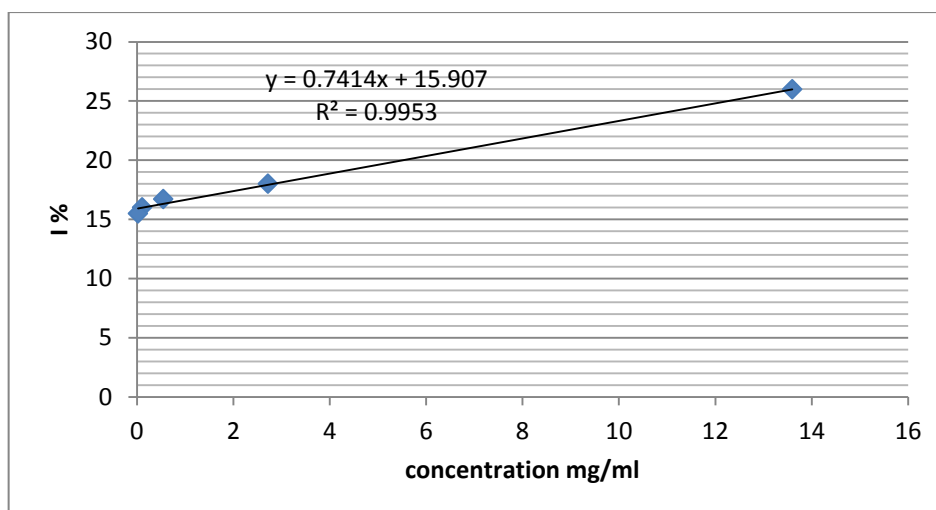


Figure 19 : Courbe d'étalonnage de DDPH de HEs des fleurs de *Cotula cineria*

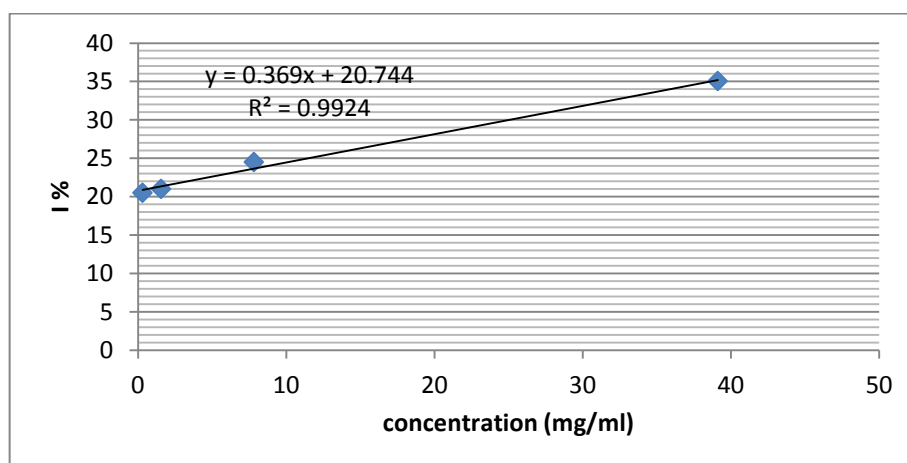


Figure 20 : Courbe d'étalonnage de DDPH de HEs de la partie aérienne de *Cotula cineria*

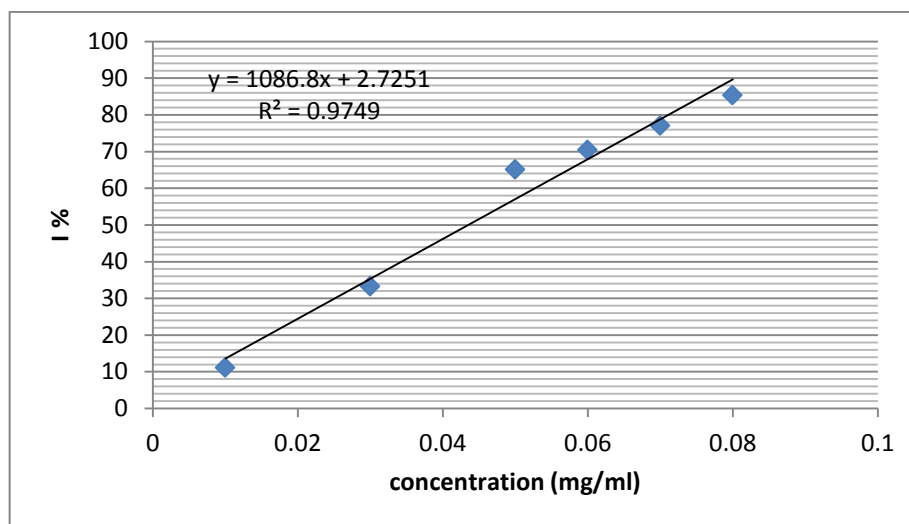


Figure 21 : Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique

Les résultats semblent que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour la vitamine C ou pour l'huile essentielle des fleurs et de la partie aérienne de *Cotula ceneria*. On remarque que le pourcentage d'inhibition du radical libre pour l'huile essentielle est inférieur à celui de la vitamine C pour toutes les concentrations utilisées.

L'activité antioxydante des extraits est exprimée en IC_{50} , ce paramètre a été employé par plusieurs chercheurs pour exprimer leurs résultats :

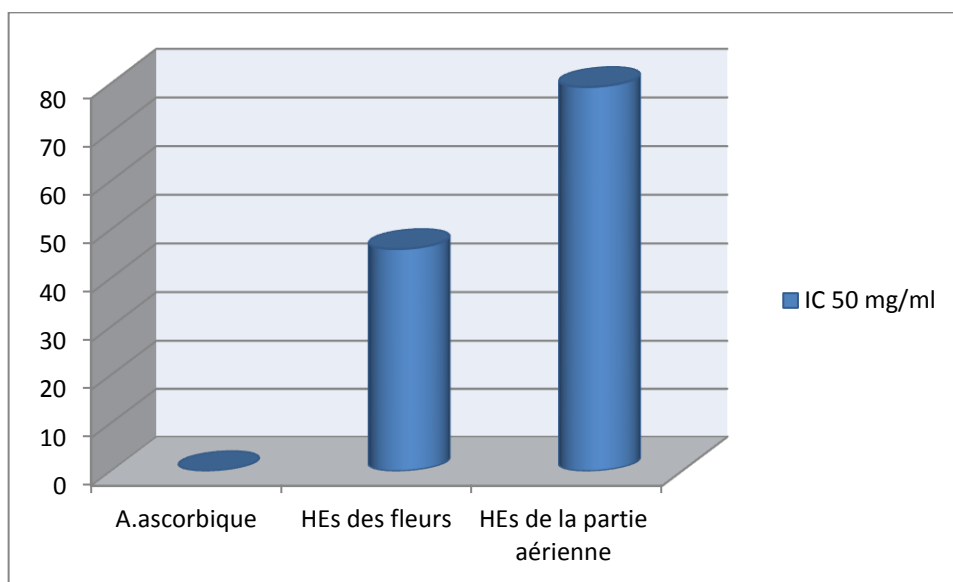


Figure 22: Valeur de IC_{50} de l'acide ascorbique et HES des fleurs et de la partie aérienne

L'acide ascorbique montre une excellente activité antioxydante ($IC_{50} = 0.04$ mg /ml). Il été observé que les l'HES des fleurs de *Cotula ceneria* aussi plus que HE de la partie aérienne de *Cotula ceneria* avec la valeur de IC_{50} respective de 45,98mg/ ml et 79,28mg /ml.

Il semble d'après ces résultats que la vitamine C est l'antioxydant le plus efficace avec un IC_{50} de 0,04 mg/ml par rapport à l'huile essentielle étudiée. Et aussi les HEs de fleurs est l'antioxydant le plus efficace par apport des HEs de la partie aérienne.

Tous ces résultats montrent que les HE de *Cotula ceneria* ayant des activités antioxydants plus faible.

Pokorny et al, (2009), les échantillons ayant une faible valeur d' IC_{50} possèdent une meilleure activité antioxydante.

Autre travaux sur la même plante par **Khallouki et al, (2015)**, trouve que IC_{50} de composés phénoliques totaux déterminée par HPLC analytique dans des extraits au méthanol était de $79,23 \pm 2,5$ mg / g de matière sèche. Les principaux composés phénoliques identifiés par HPLC-ESI-MS étaient l'acide néochlorogénique, l'acide chlorogénique, l'acide cryptochlorogénique, l'acide 3,4-dicaféoylquinique, l'acide 3,5-dicaféoylquinique, l'acide 4,5dicaffeoylquinique et le lutéoline 4'-O-glucoside. Tous les composés présentaient de très fortes capacités antioxydantes dans les tests DPPH.

les activités antioxydantes sont plus variables dans les espèces de la plante (inter-espèce) que dans la même espèces (intra-espèce) (**Ksouri et al., 2008**). Dans travaux similaires réalisé par (**Banga et al., 2010**), trouvent dans la même famille de plante présentant une activité antiradicalaire faible. C'est le cas de : *Ageratum conyzoides* (famille : Asteraceae) ($IC_{50} = 76 \pm 0,577$ μ g/ml). Et cela est bien évidemment lié à la différence dans la composition chimique ou à des facteurs saisonniers. Aussi **Belyagoubi (2012)** trouve que une valeur faible d' IC_{50} est d'environ (1.174 ± 0.047 mg/ml). Mais **Guaouguaou et a.l, (2018)** trouvent une forte valeur d' IC_{50} (173.05 ± 4.46 ug/ml).

En effet, la faible valeur IC_{50} signifie la forte activité antioxydante. **Sanchez-Morano et a.l, (1998)** trouvent dans les plantes (*T. microphylla*, *M. deserti*, *A. articulata*, *Z. album* et *C. cinerea*), présentent une faible activité antioxydante, les IC_{50} varient entre 297.744 mg/ g et 6310.041 mg/ g.

Belyagoubi (2012), les extraits d'*H. lippii* (tiges, feuilles et fruits), *I. montana* et *A. articulata* possèdent des activités antioxydantes intéressantes vis-à-vis à toutes les techniques testées par rapport aux extraits d'*A. halimus*, *Z. album*, *C. cinerea*, *P. monodiana*, *M. deserti* et *T. microphylla* qui ont montré des pouvoirs d'oxydante faibles.

La différence d'activité entre les échantillons d'HEs de *cotula ceneria* s'explique par la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle des composés phénoliques de l'huile essentielle. En présence d'un radical libre DPPH·, l'atome H est transféré sur ce dernier alors transformé en une molécule stable DPPH, ceci provoque une diminution de la concentration du radical libre et également l'absorbance au cours du temps de réaction jusqu'à l'épuisement de la capacité d'antioxydant donneur d'hydrogène (Villano *et al.*, 2007).

Cette Activité est peut être due au camphor qui est un composé majoritaire de l'huile essentielle étudiée (7,25%) et qui possède une forte activité antioxydante (Svoboda et Hampson, 1999). Ce n'est pas uniquement les composés majoritaires des HE qui sont responsables de cette activité antioxydante, mais il peut y avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres (Sidi Boulenouar et Ziane, 2003). La présence de carvacrol même à faible concentration dans l'huile essentielle de *Cotula ceneria* (0,58%) peut expliquer l'activité de piégeage du radical DPPH (Atef *et al.*, 2015).

La variabilité des teneurs en flavonoïdes chez ces espèces végétales est du probablement à la composition phénoliques des extraits (Hayouni *et al.*, 2007) aux facteurs génotypiques (El- Waziry, 2007). les conditions biotiques (espèce, organe et l'étape physiologique) et abiotiques (facteurs édaphiques) (Ksouri *et al.*, 2007). La composition est du aussi au milieu de culture (Jean, 2006).

Selon Chouikh et Chefrour (2014), cette plante contient de nombreuses substances actives telles que flavonoïdes, des huiles essentielles et essences qui donne une odeur puissante et spécifique aux plantes.

Cette plante contient de nombreux composés chimiques avec des avantages thérapeutiques tels que les flavonoïdes (Dendougui *et al.*, 2012).

4.2. Activité antibactérienne

4.2.1. Effet de la plante étudiée sur le microorganisme *Escherichia coli* (Activité antibactérienne)

Les résultats du test de sensibilité microbienne aux HEs sont regroupés dans les tableaux (09 ,10) et figures (23, 24).

Dans ce travail, deux souches microbiennes: (*Escherichia coli* (ATCC 25922) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) gram négatif), ont utilisées pour tester l'activité

antimicrobiennes de partie aérienne de la plante (*Cotula cinerea*) et leurs fleurs *via* la méthode de diffusion sur un milieu de Muller Hinton par l'intermédiaire des disques imprégnés d'HEs. Les résultats obtenus (diamètre d'inhibition (mm)).

Tableau 09 : Résultats de l'activité antimicrobienne de HEs (partie aérienne de *Cotula cinerea* et leurs fleurs) sur *E.coli*

Souche bactérienne gram négatif						
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)						
Les concentrations utilisées						
	DMSO (T-)	25%	50%	75%	100%	ATB (T+)
Zone d'inhibition de HES des fleurs (mm)	6 mm	7 mm	7.5 mm	8.2 mm	8.5 mm	13 mm
Zone d'inhibition de HES de la partie aérienne (mm)	6 mm	6.5 mm	7 mm	7.3 mm	7.9 mm	10 mm

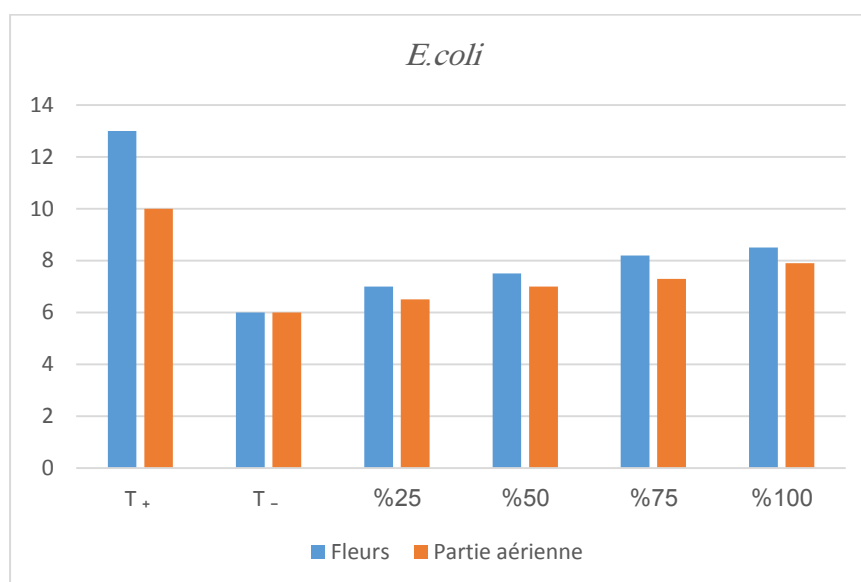


Figure 23 : Effet des l'HEs de partie aérienne de *Cotula cinerea* et leurs fleurs sur bactérienne gram négatif (*Escherichia coli*) en fonction des différentes concentrations des HEs.

- T⁺ : Témoin positif (Antibiotique céfixime)

- T⁻ : Témoin négatif (DMSO)

4.2.2. Effet de la plante étudiée sur le microorganisme *Pseudomonas aeruginosa* (Activité antibactérienne)

Tableau 10 : Résultats de l'activité antimicrobienne de HEs (Fleurs de *Cotula cinerea* et leur partie aérienne) sur *Pseudomonas aeruginosa*

Souche bactérienne gram négatif						
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)						
Les concentrations utilisées						
	DMSO (T-)	25%	50%	75%	100%	ATB (T+)
Zone d'inhibition de HES des fleurs (mm)	6 mm	7.8 mm	8 mm	8.3 mm	9 mm	15 mm
Zone d'inhibition de HES de la partie aérienne (mm)	6 mm	7.3 mm	7.8 mm	8.5 mm	8.8 mm	13 mm

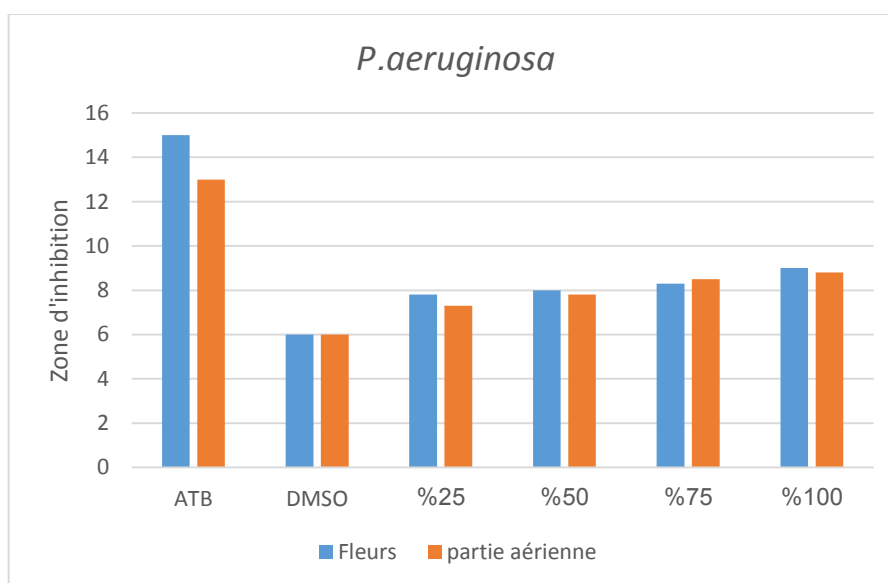


Figure 24: Effet des l'HEs de fleurs de *Cotula cinerea* et de leur partie aériennesur le souche bactérienne gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*) en fonction des différentes concentration des HES .

T⁺ : Témoin positif (Antibiotique céfixime)

T⁻ : Témoin négatif (DMSO)

D'après les **tableaux (09 ,23)** et les **figures (10,24)**, les résultats révèlent clairement un effet faible d'HEs de la partie aérienne et des fleurs de *Cotula cinerea* sur les deux souches étudiées (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*). Ont montré une activité antimicrobienne moins importante d'HEs sur les deux souches testées avec des zones d'inhibitions variables (de 6 à 9mm) ont notée aussi, dans les deux types de bactéries étudiées l'augmentation de la concentration de HEs de la plante mener à l'augmentation de zone d'inhibition (Relation de corrélation directe).

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *C. cinerea* a été réalisé par la méthode de diffusion du disque d'agar (**Malabadi et al., 2012**) Disques de papier de filtre (Whatman N° 3 et 6 mm de diamètre) ont été stérilisé par un autoclave (**Malabadi et al., 2012**).

Les différentes concentrations d'huiles essentielles (1/1 : 100% ; 1/2 : 50% ; 1/3 :75% ; 1/4 : 25%) d'assouplissement par DMSO (Di Methyl Sulf Oxide) ; les concentrations testées sur un ensemble de bactéries pathogènes : deux Gram- (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*).

La comparaison des résultats de l'étude des huiles essentielles extraites en deux parties : partie aérienne et les fleurs n'a enregistré aucune différence dans les diamètres de l'inhibition avec toutes les souches. Mais avec *P.aeruginosa* ont montré une forte résistance à toutes les concentrations d'huile essentielle et a augmenté l'intensité de cette résistance en particulier avec les concentrations d'huile essentielle de leurs fleurs par apport ont enregistré une faible résistance à toutes les concentrations d'huile essentielle avec la bactérie de gram négatif *E.coli* et les valeurs des diamètres d'inhibition de l'antibiotique utilisée était grandes par apport à diamètres d'inhibition enregistrées avec les deux souches. En comparant nos résultats avec les résultats obtenus par :

Abdenbi et al, (2014) qui ont remarquées que les zones d'inhibitions obtenues par la méthode de Vincent varient entre 20 et 55 mm avec l'huile essentielle de *Cotula cinerea*, vis-à-vis les souches bactériennes (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*). Avec les autres souches bactériennes (*Enterococcus faecalis*, *Salmonella*

heidelberg, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*), il n'y a pas une zone d'inhibition.

Par ailleurs, **Bouabdelli et al, (2012)** qui a connu plusieurs extraits (infusion ; décoction ; macération et percolation) sur : *E. coli* et *S. aureus* ont donné des diamètres de petits inhibiteurs comparés obtenus où vous arrivez à l'inhibition de diamètre supérieur (20 mm *E. coli* avec et 17 mm avec *S. aureus*); Comme avec la souche *P. aeruginosa* les résultats étaient proches (14mm).

Les souches *E. coli*, *M. morgani*, *P. vulgaris*, *S. aureus* et *A. baumannii* ont montré une grande sensibilité aux concentrations (1/1, 1/2, 1/4, 1/8) Où le diamètre d'inhibition variait entre (50 mm à 21 mm), alors que ces souches ont montré une résistance considérable avec concentrations (1/16 et 1/32) et forte résistance à toutes les concentrations d'huile essentielle et a augmenté l'intensité de cette résistance en particulier avec des concentrations de l'huile essentielle au stade de la fructose avec *P. aeruginosa* remarquées par **Chouikh et al, (2015)**.

Bensizerara et al, (2012) qui a connu différents extraits (éther de pétrole ; éthanol 70% ; n-butanol ; acétate d'éthyle) sur : *E. coli* ; *K. pneumoniae* et *S. aureus* ont donné des diamètres petits inhibiteurs comparés diamètres obtenus où vous arrivez à l'inhibition de diamètre plus élevé (13 mm *E. coli* avec, 12 mm avec *S. aureus* et 17 mm avec *K. pneumoniae*) ; Comme avec la souche *P. aeruginosa* les résultats ont été présentés avec une faible zone d'inhibition (12mm).

Conclusion générale

Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. La connaissance et l'usage de ces plantes constituent un vrai patrimoine de l'être humain. Leur importance dans le domaine de la santé publique est très accentuée dans ces dernières années grâce aux thérapeutiques qu'elles procurent.

L'objectif de notre travail réside sur l'extraction et la caractérisation physico-chimique et biologique (antioxydante et antibactérienne) des huiles essentielles de *Cotula ceneria*.

De manière générale, l'extraction des huiles essentielles préalable à l'analyse chimique et physique se compose de deux étapes : l'extraction et l'analyse. Alors que l'étape analytique requiert en général quelques minutes, l'étape d'extraction nécessite plusieurs heures. C'est le cas de la méthode de Clevenger, l'huile essentielle extraite par hydrodistillation de cette plante possède des propriétés organoleptiques très appréciées en parfumerie et sera très convoitée en aromathérapie.

Le calcul de rendement d'extraction effectuée par hydro distillation a révélé que le meilleur rendement dans les fleurs et le plus faible dans la partie aérienne de *Cotula ceneria* sont donnés avec des taux 2.54 % et 1.07 % respectivement. Cette valeur est inférieure aux rendements obtenus chez des autres espèces appartenent au même genre et supérieur à des autres espèces.

Des propriétés organoleptiques caractéristiques (odeur, couleur et goût). On observe la couleur des HEs des fleurs est bleu, jaune pour la partie aérienne. L'odeur est très forte caractérise la plante étudiée.

La détermination des caractéristique physiques des HEs (Indice de réfraction, densité relative et détermination de pH) révèle qu'elles sont conformées aux normes établies par les différentes pharmacopées et proches de certains travaux antérieurs.

La détermination des indices chimique (indice d'acide, d'iode, d'ester et de saponification) a montré certains renseignements sur la pureté de nos huiles essentielles, quantité des acides libres présents dans notre huile ...etc. Subséquemment, on peut dire que l'étude a donné des résultats acceptables pour rendement d'extraction et l'analyse physico-chimique des huiles essentielles de *Cotula ceneria*.

Par ailleurs, les résultats de l'activité antioxydante de HE végétale en utilisant le test DDPH est réalisé avec l'acide ascorbique comme standard, et qui montrent que IC₅₀ de l'HE

des fleurs et de la partie aérienne était égale 45,98 mg/ml et 79,28 respectivement, tandis que pour l'acide ascorbique était égale 0.04 mg/ml. Par conséquent, nous avons constaté que l'efficacité antioxydante de HE était inférieure à celle de l'acide ascorbique, ceci qui confirme que l'efficacité antioxydante de la plante est faible par rapport à l'acide ascorbique.

Tous ces résultats indiquent clairement que HE de *Cotula cinerea* ayant une faible activité antioxydante. Cette activité est liée en grande partie à la composition des extraits et leur richesse en composés phénoliques et en flavonoïdes. Ces propriétés sont citées pour ces composés dans de nombreuses publications et rapport scientifiques.

Concernant l'activité antimicrobienne ; les résultats révèlent clairement un effet faible d'HEs de partie aérienne et des fleurs de *Cotula cinerea* sur les deux souches étudiées (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*). Ont notée aussi, dans les deux types de bactéries étudiées l'augmentation de la concentration de HES de la plante mener à l'augmentation de zone d'inhibition (Relation de corrélation directe).

Références
Bibliographique

- **A.E.N, Harrar (2012).**Activités Antioxydante Et Antimicrobienne D'Extraits De Rhamnus Alaternus L. Thèse De Magister Biochimie Et Physiologie Expérimentale, Université Ferhat Abbas, Sétif. Algérie.73 P.
- **A.O.A.C, (2000).** Official Methods Of Analysis (17th Ed.). Gaithersburg, Md, Usa: Aoac International, Method 923.03.Cité Par : Lako J., Trenery V.C., Wahlqvist M., Sotheeswaran S., Premier R. 2007. Phytochemicals Flavonols, Carotenoïds And The Antioxidant Properties Of A Wide Selection Of Fijian Fruit, Vegetable And Other Readily Available Foods. Food Chemistry. 101: 1727-1741
- **ABDENBI ASMA, ABDELWAHED DJAMEL-EDDIN, BOUAAZA MOHAMMED & TOUATI BOUMEDIENE ;** International Journal of Research Engineering & Technology ; 2347-4599. 2014, 49-54
- **Afnor (Agence Française De Normalisation),(2000).** Huiles Essentielles. Échantillonnage Et Méthodes D'analyse (Tome 1) – Monographies Relatives Aux Huiles Essentielles (Tome 2). Vol 1 Et 2,
- **Afssaps,(2008).** Recommandations Relatifs Aux Critères De Qualité Des Huiles Essentielles, 2008.
- **Alphbid ,(2010).**Laboratoire De Pharmacodynamie-Biochimique ; Ufr Biosciences Université De Cocody, 22 Bp 582 Abidjan 22 Côte D'ivoire. 2 Laboratoire De Physiologie, Pharmacologie Et Phytothérapie, Ufr Sn 02 * Auteurs Pour Les Correspondances (E-Mail : Alphbid@Yahoo.Fr) Reçu Le 25-02-2010, Accepté Le 09-12-2010
- **Amarti F. Et Al, (2010) .** Composition Chimique Et Activité Antimicrobienne Des Huiles Essentielles De Thymus Capitatus Et De Thymus Bleicherianus Du Maroc. Phytothérapie, 6, 342-347
- **Ameenah G. F, (2006).** Medicinal Plants: Traditions Of Yesterday And Drugs Of Tomorrow Molecular Aspects Of Medicine, 27:1-93.
- **Audigie C.L., Fagerella J., Zonszain F, (1984).**Manipulation D Analyse Biochimique. Edition Tec & Doc, Lavoisier. Paris. P : 270.
- **B. Botton, A. Bertron, M. Fevere, S. Gauthier, D. Guph, J.P Larpent, P. Reymond, J.J Sanglier, Y. Vaysser & S(1990)..**Veau. Moisissures Utiles Et Nuisibles Importance Industrielle .Ed : Masson Collection Biotechnologies. (1990) : 5-10
- **B. Multon, N. Bernard, H. Ben Ahmed, C. Kerzreho, J.Y. Cognard, F.F. Faure, J. Delamare(2002).**« Stockage Electromécanique D'énergie (Cinétique Ou Inertiel) », Diaporama Présenté Au Groupe Stockage D'énergie Du Club Crin Energies Alternatives A Paris Le 23 Mai 2002. (1,8 Mo)

- **Bakkali, (2008).** F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomarbiological Effects Of Essential Oils — A Review Food And Chemical Toxicology, 46 (2008), Pp. 446-475
- **BAUDIN B., 2006.** Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. MT Cardio, 2 (1) : 43-52.
- **Bego Ph, (2001).** Connaître L'essentiel Sur Les Huiles Essentielles. Collection Aromathérapie Pratique Et Familiale, Ed. Mdb Paris, Pp.2-3.
- **Belaiche P,(1979)** . Traité De Phytothérapie Et D'aromathérapie. Tome 1 : L'aromatogramme .Ed. Maloine. Paris.
- **Beloued A, (2001)** .Les Plantes Médicinales D'algerie. (Ed) Opu, Ben Aknoun, Algérie, P100-227
- **Belyagoubi L., 2006.** Effet De Quelques Essences Végétales Sur La Croissance Des Moisissures De Détérioration Des Céréales. Mémoire De Magister. Université Abou Bekr Belkaid, 110p.
- **Belyagoubi Née Benhammou Nabila,(2012).** Activité Antioxydante Des Extraits Des Composés Phénoliques De Dix Plantes Médicinales De L'ouest Et Du Sud-Ouest Algérien, Doctorat En Biologie , Substances Naturelles, Activités Biologiques Et Synthèse , Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen (2012) P 95.
- **Benbrinis S,(2012).**Evaluation Des Activités Antioxydante Et Antibactérienne Des Extraits De Santolina Chamaecyparissus. Thèse De Magister En Biochimie. Université Ferhat Abbas-Sétif. Algérie. 84p
- **Benjilali B,(2004).** Extraction Des Plantes Aromatiques Et Médicinales Cas Particulier De L'entraînement A La Vapeur D'eau Et Ses Equipements. Manuel Pratique. Huiles Essentielles : De La Plante A La Commercialisation. 17-59
- **Bensizerara D, Menasria T, Melouka M, Cheriet L, Chenchouni H, (2012).** Antimicrobial activity of xerophytic plant (*Cotula cinerea* Delile, 1831) extracts against some pathogenic bacteria and fungi. Asian Pac J Trop Biomed, 2012;1-5
- **Blokhina O, Virolainen E and Fagerstedt K V (2003).** Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a Review. *Annals of Botany*, **91**, 179-194.
- **Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., Delattre, J. (2003)** Radicaux libres et anti-oxydants. IN : *Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires*. Delattre, J ., Durand, G ., Jardillier, J.C. Eds: *Médecine-sciences. Flammarion* (Paris), Pp: 59-81
- **Bouabdelli F, Djelloul A, Kaid-Omar Z, Semmoud A, Addou A,(2012).** Antimicrobial Activity of 22 Plants Used in Urolithiasis Medicine in Western Algeria. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2012; 530- 535.

- **Boudjouref M, (2011).** Etude De L'Activité Antioxydante Et Antimicrobienne D'Extraits D'artemisia Campestris L. Thèse De Magister En Biochimie. Université Ferhat Abbes, Sétif. Algérie. 99 P.
- **Bougatef A, Hajji M, Balti R, Lassoued I, Triki-Allouz Y Et Nasir M, (2009).** Antioxidant And Free Radical-Scavenging Activities Of Smooth Hound (*Mustelus Mustelus*) Muscle Protein Hydrolysate Obtained By Gastrointestinal Proteases. *Food Chemistry* 114: 1198-1205.
- **Boukhatem Mohamed Nadjib, Hamaidi Mohand Said, Saidi Fairouz Et Hakim Yahia, Caillet S ; Lacroix M, (2007)** .Les Huiles Essentielles: Leurs Propriétés Antimicrobiennes Et Leurs Applications Potentielles En Alimentaire. Inrs-Institut Armand-Frappier, Resala Université De Laval, Québec, Canada, 1–8
- **Boukhobza, F., & Goetz, P,(2014).** Phytothérapie En Odontologie. Edition *Cdp*.
- **Bouziane M, (2002).** Caractérisation Structurale De Quelques Molécules Organiques Dans La Plante : *Cotula Cinerea* De La Région D'ouargla. Mag. Université Ouargla. P53.
- **Boyd B., Ford C., Koepke Michael C., Gray K., Horn E, McAnalley S. et McAnalley B. (2003).** Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *GlycoScience & Nutrion* 4, 7p.
- **Bruneton J,(1999).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. 3ème Edition, Ed. Tec Et Doc, Paris.
- **Bruneton, J,(2009).** Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes Médicinales. 4ème Edition. Edition *Lavoisier Tec & Doc. Médicales Internationales, Paris*, P 261 , 308 , 571.
- **Bssaibis F. Et Al, (2009).** Activité Antibactérienne De *Dittrichia Viscosa* L. ; *Rev. Microbiol. Ind. San Et Environn.* Vol. 3(1) ; P: 44-55.
- **Chaabi M, (2008).** Etude Phytochimique Et Biologique D'espèces Végétales Africaines : *Euphorbia Stenocla* Baill. (*Euphorbiaceae*), *Anogeissus* *Carpus* Guill. *Etperr.* (*Combrétaceae*), *Limoniastrum Feei* (Girard) Batt. (*Plumbaginaceae*). Thèse De Doctorat En Pharmaco Chimie, Université, Louis Pasteur Et Université Mentouri De Constantine (Alger): 179, 180.
- **Chalchat J.K, Carry L. P, Menut C, Lamaty G, Malhuret R And Chopineau J,(1997)** . Correlation Between Chemical Composition And Antimicrobial Activity. Vi. Activity Of Some African Essential Oils. *J. Essent. Oil Res.*, 9: 67-75.
- **Chan, A. C., Tran, K., Raynor, T., Ganz, P., & Chow, C. K. (1991).** Regeneration of vitamine E in human platelets. *J.Biol .Chem*, **266**, 17290 – 17295.

- **Chouikh A ; Chefrour A,(2014)**. Seasonal Biometric And Dynamic Monitoring Of The Shihia Plant *Cotula Cinerea Del (1831)* And Its Accompanying Plants In The Saharan Region Oued-Souf (South-East Of Algeria). *International Journal Of Science And Research (Ijsr)*
- **Chouikh Atef, Mayache Boualem, Maazi Mohamed Cherif, Hadeef Youcef, Chefrour Azzedin, (2015)**. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 5 (03); 2015: 029-034.
- **Collin G, (2000)** . Quelques Techniques D'extraction De Produits Naturels. *Info-Essences*. 13 :4-5.
- **Cowan M,(1999)**. Plantproducts As Antimicrobial Agent ,*Clinical Microbiology Reviews*
Cowan, M. M. (1999). Plant Products As Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology - Reviews*12 (4), 564 – 582.
- **Cuvelier, C., Dotrepppe, O., & Istasse, L. (2003)**. Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. *Ann.Méd .Véte*, 147, 315 – 324.
- **D. Villano , M.S. Fernandez-Pachon, M.L. Moya, A.M. Troncoso & M.C. Garcia,(2007)**.Parrilla. Radical Scavenging Ability Of Polyphenolic Compounds Towards Dpph Free Radical. *Talanta* .71 (2007): 230
- **Dacosta Y., 2003**.Les phytonutriments bioactifs : 669 références bibliographiques. Ed. YvesDacosta, Paris, 317p.
- **Daglia, M. (2011)**. Polyphenols As Antimicrobial Agents. *Current Opinion In Biotechnology*,23,1 – 8.Decock, P ; 1, Isbn-8041-1592-5.).
- **Delattre Jacques, Jean-Louis Beaudoux&Dominique Bonnefont-Rousselot, 2007**. Radicaux libres et stress oxydant : Aspects biologiques et pathologiques 281-309.
- **Delattre, J., Beaudoux, J. L., & Bonnefont-Rousselot. (2005)**. Radicaux libres et stressoxydant:aspects biologiques et pathologiques. Edition Lavoisier TEC & DOC éditions MédicalesInternationales, Paris, p 14 , 93 , 94..
- **Dendougui H, Seghir S, Jay M, Benayache F, Benayache S,(2012)**. Flavonoides From *Cotula Cinerea Del*. *Int J Med Arom Plants*, 2012; 2:589-595.
- **Desikan R, Hancock JT, Neill SJ,(2003)**. Oxidative stress signalling. Chapitre5. Dans: *Topics in Current Genetics*, Vol. 4 *Plant Responses To Abiotic Stress*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 121-149.
- **Djelloul Daouadji S,(2010)**. Detection De Biofilm A Staphylocoques Sur Catheters Veineux. Thèse De Magister En Biologie Moléculaire Et Cellulaire. Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. Algérie. 77 P.
- **doctorat : Biophysique. Université de Limoges . France.2003**. page: 10-11.

- **Droge, K . S. (2002).** Free radicals in physiological control of cell fuction. *Physiol.Rev*, **82**, 47 –
- **Duen~ As. M; Herna´Ndez. T; & Estrella. I, (2006),** Assessment Of In Vitro Antioxidant Capacity Of The Seed Coat And The Cotyledon Of Legumes In Relation To Their Phenolic Contents, *Food Chemistry*, 98, 95–103.
- **Důračková Z,(2008).** Oxidants, Antioxidants and Oxidative Stress. Chapitre 2. Dans: *Mitochondrial Medicine*. Springer Science and Business Media B.V. , pp. 19-54
- **Duraffourd C., D’hervicourt L. Et Lapraz J. C.(1999),**Cahiers De Phytothérapie Clinique. Examen De Laboratoire Galénique, Eléments Thérapeutiques Synergiques. 2ème Edition, Masson (Paris), (1990), 87 P.
- **El- Waziry. A.M,(2007).** Nutritive Value Assessment Of Ensiling Or Mixing Acacia And Atriplex Using In Vitro Gas Production Technique. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 3(6): 605- 614.
- **Elqaj M., Ahami A. Et Belghyti D,(2007).** La Phytothérapie Comme Alternative A La Résistance Des Parasites Intestinaux Aux Antiparasitaires. Journée Scientifique "Ressources Naturelles Et Antibiotiques". Maroc.
- **Ennajar M, Bouajila J., Lebrihi A., Mathieu F., Arlette S, Manef A. Et Al., (2009).** The Influence Of Organ, Season And Drying Method On Chemical Composition And Antioxidant And Antimicrobial Activities Of Juniperus Phoenicea L. Essential Oils. *Journal Of Science Food And Agriculture.* 90 : 462–470.
- **Escott, Harlein, Klein (2006).** Microbiologie 2eédition Française, De Boek, P : 2.
- **Evans, W. J. (2000).** Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr*, **72**, 647S– 652S.
- **Farnsworth N. R., Akerele O., Bingel A. S., Soejarto D. D. Et Guo Z. ,(1986).** Places Des Plantes Médicinales Dans La Thérapeutique. *Bulletin De L'organisation Mondiale De La Santé.*, **64** (2) : 159-164.
- **Fathy A.F.A, Abdelbaki M.M, El Warraki A.G And Abbas S,(1965).** Studies On The Essential Oil Of Rosemary, 1- Isolation Of Rosemary Oil. *Annals Of Agri. Sciences*, Faculty Of Agri., University Of Cairo, 137-153.
- **Fatimaezzahraeguagouaou, Mohamedalienahlbebaha,Khalidtaghzouti, Abdelhakim bouyahya, Youssefbakri, Nadiadakka, Andnoureddinees-Safi (2018).** Cytotoxicological Investigation Of The Essential Oil And The Extracts Of Cotula Cinerea And Salvia VerbenacafromMorocco ;Universityofrabat, Facultyofsciences, Departmentofbiology, Genomic centerofhumanpathologies, Laboratoryofhumanpathologiesbiology, Rabat, Morocco (2018) ,P 2

- **Fellah S, Ramdhane M, Abderraba(2006).** Extraction Et Etude Des Huiles Essentielles De La *Salvia Officinalis* L. Cueillie Dans Deux Régions Différentes De La Tunisie. *J Soc Alger Chim*, 2006 ; 193-202.
- **Ferreira Icf, Baptista P, Vilas-Boas M Et Barros L, (2007).** Free-Radical Scavenging Capacity And Reducing Power Of Wild Edible Mushrooms From Northeast Portugal: Individual Cap And Stipe Activity. *Food Chemistry*, 100, 1511-1516.
- **Figueredo, A.J, (2007).** The Arizona Life History Battery
- **Fleurentin J, Balansard G, (2002)** .L'intérêt De L'ethnopharmacologie Dans Le Domaine Des Plantes Médicinales. *Méd Tropic* 62: 23–8
- **Fontaine E,(2007).** Radicaux libres. Dans: *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*. Springer-Verlag France. pp. 251-257
- **Foyer CH, Trebst A, Noctor G, (2008).** Signaling and integration of defense functions of tocopherol, ascorbate and glutathione Chapitre 16. Dans: *Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environnement*, Netherlands. Springer Science+Business Media B.V. pp. 241-268
- **France-Ida J,(1996).** Bref Survol De Diverses Méthodes D'extraction D'huiles Essentielles. *Info-Essence*. 3 : 5-6.
- **García MJ, (2005).** ROS Generation, Antioxidants, and Cell Death. dans: *Mitochondria and the Heart, Developments in Cardiovascular Medicine Volume 256* Springer Science +Business Media, Inc., USA. pp. 99-122
- **Garnero J,(1996).** Huiles Essentielles. Dossier : K345. Base Documentaire: Constantes Physico-Chimiques. Vol. Papier N°: K2.
- **GAUCHE ELODIE ; HAUSSXIRTH CHRISTOPHE, (2006).** Stress oxydant, complémentation nutritionnelle en antioxydants et exercice. *Movement & Sport Sciences*.2006 ; 58:43-66.
- **Gèrard-Monnier, D., et Chaudière, J. (1996).** Métabolisme et fonction antioxydant du glutathion. *Path Biol*, 44, 77 – 85.
- **Ghestem M, Cao K, Ma W, Rowe N, Leclerc R, Gadenne C, Stokes A (2014).** A Framework For Identifying Plant Species To Be Used As 'Ecological Engineers' For Fixing Soil On Unstable Slopes *Plos One*:9
- **Goudable, J., & Favier, A. (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin Mdtabol*, 11, 115 – 120.
- **Greger H Et Hofer O., (1985)-** Sesquiterpene-Coumarin Ethers And Méridionales. Tome Ii, Ed. Cnrs, Paris.

- **GUEYE, P. M (2007)** Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-érythrocytaire sur le globule rouge. Thèses de doctorat, Université Louis Pasteur.
- **Gurib-Fakim A, (2006)**. Medicinal Plants: Traditions Of Yesterday And Drugs Of Tomorrow. *Molecular Aspects Of Medicine*. Vol.(27): 1-93.
- **Hagen, T. M., Wierzbicka, G. T., Sillau, A. H., Bowman, B. B., & Jones, D. P. (1990)**. Bioavailability of dietary glutathione: Effect on plasma concentration. *Am j Physiol*, **259**, 524–590.
- **Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007)**. Le stressoxydant. *Revue Médicale de Liège*, **62**, 628 – 638.
- **Halliwell B., (1994)**- Free radical and antioxidants: A personal view. *Nutrition reviews*,52:253-265.
- **Hamdani, D, (2012)**. Action Des Poudres Et Des Huiles De Quelques Plantes Aromatiques Sur Les Paramètres Biologiques De La Bruche De Haricot Acanthoscelides Obtecus Say. Coleoptera Bruchidae. Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou. Mémoire En Vue De L'obtention De Magister En Sciences Biologiques. 97p.
- **Hammoudi R, Hadj Mahammed M,(2010)**.Contribution A L'étude De La Composition Chimique Des Huiles Essentielles De La Plante Teucrium Polium Ssp. Geyrii (Lamiaceae). *Annales Des Sciences Et Technologie*, 2010; 2(1): 01-05.
- **Harrar Abd El Nacer , (2012)** . "Activités Antioxydante Et Antimicrobienne D'extraits De Rhamnus Alaternus L." Thèse De Magister ,Universite Ferhat Abbas-Setif .
- **Hatanaka, T; Choi, Y. E; Kusano, Tand Sano, H, (1999)**. Transgenic Plants Of Coffea Canephora From Embryogenic Callus Via Agrobacterium Tumefaciens-Mediated Transformation. *Plant Cell Rep.*, 19, 106-110
- **Hayouni, E.Abedrabba, M., Bouix, M., Hamdi, M,(2007)**. The Effects Of Solvent And Extraction Method On The Phenolic Contents And Biological Activities In Vitro Of Tunisian Quecus Coccifera L. And Juniperus Phoenicea L. Fruit Extracts, *Food Chem.* 105: 1126-1134.
- **HELENA LINDMARK; MAENSSON et al, (2000)**.Antioxidative factors in milk. *British Journal of Nutrition*. 2000;1 :103-110.
- **Hellal Z., 2011**. Des Propriétés Antibactériennes Et Antioxydants De Certaines Huiles Essentielles Extraites Des Citrus Application Sur La Sardine (*Sardina Pilchardus*). Magistère, Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou. Pp1-8-45-78.

- **Hernandez Ochoa L-R, (2005).** Substitution De Solvants Et Matières Actives De Synthèse Par Une Combine « Solvant/Actif » D'origine Végétale. Thèse De Doctorat, Institut National Polytechnique De Toulouse
- **Humanitaire –Lyon.Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A. Et Stevens P.; (2002);** Botanique Systématique: Une Perspective Phylogénétique; Ed 1: Deboeck; P: 84-336.
- **Iserin P., Masson M., Restellini J. P., Ybert E., De Laage De Meux A., Moulard F., Zha E., De La Roque R., De La Roque O., Vican P., Deesalle –Féat T., Biaujeaud M., Ringuet J., Bloth J. Et Botrel A,(2001).** Larousse Des Plantes Médicinales : Identification, Préparation, Soins. Ed Larousse. P10-12.
- **Jean –Paul .J,(2006).** Manuel De Culture Artisanale Pour La Production De Spiruline Pages 06
- **K. Sidi Boulouar & A. Ziane,(2003)..** Etude Phytochimique Des Huiles Essentielles De Lavandula Stoechas L. De La Région De Tlemcen. Mémoire De Des En Biochimie. Université Abou Baker Belkaid, Tlemcen, (2003) 54 P.
- **K.P. Svoboda & J.B. Hampson,(1999).** . Bioactivity Of Essential Oils Of Selected Temperate Aromatic Plants: Antibacterial, Antioxidant, Anti Inflammatory And Other Related Pharmacological Activities. Ed: Plant Biology Department, Sac Auchincruive, Ayr, Scotland, Uk., Ka6 5hw, (1999).
- **Kaddem S.D, (1999).** Les Plantes Médicinales De L'Algérie.
- **Kandji, N ,(2001).**Etude De La Composition Chimique Et De La Qualite D'huiles Vegetales Artisanales Consommees Au Senegal. Thèse Doctorat. Senegal (2001).
- **Karaçelik Aa, Kuçuk M, Iskefixeli Z, Aydemir S, Smet Sd, Miserez B, Standra P,(2015).**Antioxidant Component Of Viburnum Opulus L. Determined By On-Line Hplc-Uv-Abts Radical Scavenging And Lc-Uv-Esi Method. Food Chemistry. 175n.P106-114.
- **Kaufmann S.H.E., (1997)-** Host Reponse To Intracellular Pathogens. Ed. Springer, New York,345p.
- **Kether F Bh, Mahjoub M A,(2012).** Mahjoub S A, Belhaj Salah K, Helal A N, Mighri Z. Chemical Composition, In Vitro Antifungal And Antioxidant Activities Of Essential Oil From Cotula Coronopifolia L. Growing In Tunisia. African Journal Of Microbiology Research, 2012; 6(20):4388- 4395.
- **Khenaka, K,(2011).** Effet De Diverses Plantes Médicinales Et De Leurs Huiles Essentielles Sur La Méthanogénèse Ruminale Chez L'ovin, Diplôme De Magister En Microbiologie Appliquée, Université Mentouri Constantine. P19, 24

- **Kohen R. et Nyska A., (2002)**- Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol.Path*, 30: 620-650.
- **Ksouri. R. Megdiche. W. Debez. A., Falleh, H. Grignon. C. Abdelly. C.,(2007)**. Salinity Effects On Polyphenol Content And Antioxidant Activities In Leaves Of The Halophyte *Cakile Maritima*. *Plant. Physiol Bioch*, 45: 244-249. .
- **Lagunez-Rivera L,(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 M., (2004)**, Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils,
- **Laib I Et Barbat M, (2011)**. Composition Chimique Et Activité Antioxydante De L'huile Essentielle Des Fleurs Sèches De *Lavandula Officinalis*, *Revue De Génie Industriel*, 6, 46-54.
- **Laib, I, (2011)**. Etude Des Activités Antioxydante Et Antifongique De L'huile Essentielle Des Fleurs Sèches De *Lavandula Officinalis* Sur Les Moisissures Des Légumes Secs, Diplôme De Magister En Sciences Alimentaires, Université Mentouri Constantine. P23, 25-27.
- **Lee J, Koo N and Min D B (2004)**. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3 (1), 21-33.
- **Lehucher-Michel, M. P., Lesgards, J. F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., & Prost, M.(2001)**. Oxidative stress and human disease,Current knowledge and perspectives for prevention.*Presse Medicale*, 30, 1076 – 1081..
- **Lion, (1995)**. Travaux Pratiques De Chimie Organique. Ed. Dunod, Paris
- **Lmachraa I, Fdil R, Fdil N, Mouzdahir A,(2014)**.. Huile Essentielle De *Santolina Africana* (Jord. & Fourr.) Du Maroc: Composition Chimique Et Isolement Des Deux Principaux Constituants. *J Mater Environ Sci*, 2014 ; 5 (1):67-72.
- **Lykkesfeldt J, Svendsen O.(2007)**. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal* 173: 502-511.
- **Ma W. G., Tan R. X., Fuzzati N., Li Q. S., Wolfender J. L., Hostettmann K.,(1997)**. Natural Occurring And Synthetic Polyynes Glycosides. *Phytochemistry*, 45(2): 411-415
- **Madhavi D. L., Deshpande S. S. et Salunkhe D. K., 1996**, Food Antioxidants,Maghreb, Substances Végétales D'Afrique, D'Orient Et D'Occident. Ed. Edas, Alger. Algérie. 368 P.
- **Madhavi D.L, Deshpande S.S, Salunkhe D.K, (1996)**.Food Antioxidants, Technological, Toxicological, And Health Perspectives. Marcel Dekker, New York.
- **Maiza K Et Hammiche V(, 1993)**. Pharmacopée Traditionnelle Saharienne : Sahara

- **Makkar H.P.S., Siddhuraju P. Et Becker K.; 2007**; Plant Secondary Metabolites, Methods In Molecular Biology 393; Ed: Humana Press; P: 67-111.
- **Malabadi R B, Mulgund G S, Meti N T, Nataraja K, Kumar S V, (2012)** . Antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized by using whole plant extracts of *Clitoria ternatea*. Research in Pharmacy, 2012; 2(4): 10-21.
- **MANIL J. (2004)**. Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'E.coli: IV) souches necrotoxiques. Annales de Medecine Vétérinaire, 148, 121-132.
- **MANN C.M., COX S.D. & MARKHAM J.L. (2000)**.The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749, contribue to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Letters in Applied Microbiology, 30, 294-297.
- **Marc F, Davin A, Deglene Bl, Ferrand C, Baccaunaud M Et Fritsch P, (2004)**.Methode D'évaluation Du Potentiel Antioxydant Dans Les Aliments Medecine/Sciences, 20 :458-463.
- **Markouk M., Lazrek H B Et Jana M, (1999)**.Analgesic Effect Of Extracts From *Cotula Cinerea*.Phytoterapy Research.Vol13.P 229:230.
- **Martínez-Cayuela, M. (1995)** Oxygen free radicals and human disease. Biochimie. 77: 147-161.Mashhadian, N.V., Rakhshandeh, H. (2005) Antibacterial and antifungal effects of *Nigella sativa* extracts against *S.aureus*, *P. aeruginosa* and *C.albicans*. Pakistan Journal of Medical Sciences. 21: 47-52.Masson, Paris, 486 P.
- **Médart, J. (2009)**. Manuel pratique de nutrition : l'alimentation préventive et curative. 2èmeédition. Edition de Boeck Université, p 51 , 52.
- **Meddour A., Yahia M., Benkiki N., Ayachi A, (2013)**. Étude De L'activité Antioxydante Et Antibactérienne Des Extraits D'un Ensemble Des Parties De La Fleur Du *Capparis Spinosa* L. Lebanese Science Journal. Vol. (14): 49-60
- **Menvielle-Bourg, F. J.(2005)**. La superoxyde dismutase , puissant antioxydant naturel,désormais disponible par voie orale. Phytothérapie, 118 – 121..
- **Meridionales.Vol Ii.Ed,(1986)**. Centre Nationale De La Recherche Scientifique, Paris. P 1170.
- **MESSOUD HIRECHE,(2013)**. Etude de l'activité antioxydante de la tomate séchée. Mémoire de master 2: nutrition humaine. Chlef : Université de Hassiba Ben Bouali. Algérie. 2013.page: 26-27.
- **Metwally M. A., El-Dahmy S., Jlutupovc F., Bohlmann, Dawdar A. M. Et Ally S. A. M,(1986)**.Glaucolide-Like Sesquiterpene Lactones From *Cotula Cinerea*.Phytochemistry.Vol 25 .(1):225-227.

- **Miller Nj, Rice-Evans C, Davies Mj, Gopinathan V Et Milner A,(1993).**A Novel Method For Measuring Antioxidant Capacity And Its Application To Monitoring The Miller Re, Mc Conville Mj, Woodrow Ie.(2006). *Phytochemistry*. 67 : 43-51.
- **Millogo H., Guisson I. P., Nacoulma O. Et Traore A. S,(2005).** Savoir Traditionnel Et
- **Morel Y., et Barouki R., (1999).**Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochemical Journal* 342(3), 481-496.
- **Münzel T, Post F, Warnholtz A. (2006).** Smoking and Oxidative Stress: Vascular Damage Dans: Cigarette Smoke and Oxidative Stress, Springer-Verlag Berlin Heidelberg Germany. pp. 339-364.
- **Nagavani V, Madhavi Yd, Bhaskarrao P, Koteswara R, Raghava-Rao T,(2010).** Free Radical Scavenging Activiyy And Qualitative Analysis Of Polyphenols Bay Rp-Hplc In The Flowers Of Couroupitaquia Nensisabul.Ejeaf. Chem, 9(9): 1471-148
- **Nastro, A., Germano, M .P., D'angelo,V., Marino, A., & Cannatelli, M. A,(2000).**Extraction Methods And Bioautography For Evaluation Of Medicinal Plant Antimicrobial Activity, **30** (5), 79 – 384
- **Nicklin J., Graeme K-Cook., Paget Rt., Killingtons R., (2000).**Essentiel En New York Usa.
- **Niki, L., Reynaert, S. W., Aesif, T. M., Amy, B., Emiel, F. M., Wouters, C. G., Irvin.,Yvonne, M. W., & Janssen-Heininger. (2007).** Catalase over expression fails to attenuateallergic airways disease in the mouse. *The journal of Immunology*, **178**, 3814 – 3821.
- **Normes De Catalogage Afnor . - Paris : Afnor, (1986-1999).**(Pour Les Normes Citées Dans Le Présent Document) .Réponse Envoyée Le 19 Mai 2003
- **O'Mahony JA, Fox PF, Kelly AL. (2013).** Indigenous Enzymes of Milk Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects, 4th Edition, Springer Science+Business Media New York .pp. 337-385.
- **Ohla, S. E., Opere, C. A., & Leday, A. M. (2005).** Pharmacological consequences ofoxidative stress in ocular tissues, *Mutation Research*, **579**, 22 – 36
- **Orban JC, Sibon S, Ichai C. (2007).** Ischémie/reperfusion, stress oxydant, préconditionnement et insuffisance rénale aiguë. Dans: L'insuffisance rénale aiguë, Le point sur ... Springer-Verlag France, pp. 85-105.Phytotherapy Research, p. 435-448.
- **Ozenda P, (1977).** Flore Du Sahara. 2ème Ed. Editions Du Centre Nationale De La Recherche Scientifique, Paris. P 622.
- **Paré J, (1997).**Procédé Assisté Par Micro-Ondes. Info-Essences, Bulletin Sur Les Huiles Essentielles, 4 :P.4

- **Paris La Défense : Afnor,(2007).** 663p. Ashnagar A, Gharib N, Foroozanfar S. Isolation And Identification Of The Major Chemical Components Found In The Upper Parts Of Teucrium Polium Plants Grown In Khuzestan Province Of Iran. *Chinese Journal Of Chemistry*, 2007; 25:1171-1173
- **Paris M Et Hurabielle M, (1981).** Abrégé De Matière Médicale (Pharmacognosie) Tome. Ed. Masson P.339
- **Pauli A (2001)** Antimicrobial Proprieties Of Essential Oil Constituants. *Int J Aromather* 11:126–33
- **Pibiri M.C. ; (2005) ;** Assainissement Microbiologiques De L’air Et Des Systèmes De Ventilation Au Moyen D’huiles Essentielles ; Thèse De Doctorat De La Faculté Environnement Naturel, Architectural Et Construit Lausanne ; P: 28-42.
- **Pierre, M., & Lys, M,(2007).** Secrets Des Plantes Pour Se Soigner Naturellement. Edition *Artémis*, P 36.
- **Pincemail J, Meurisse M, Limet R et Defraigne J O(1999).** L’évaluation du stress oxydatif d’un individu: une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumons*, 4 (5).
- **Quezel P Et Santa S, (1962).**Nouvelle Flore De L’algerie Et Des Regions Desetique
- **Quiney C, Finnegan S, Groeger G, Cotter TG. (2011).** Protein Oxidation Chapitre 3. Dans: *Post-Translational Modifications in Health and Disease Protein Reviews*. Volume 13, pp. 57-78.
- **Rakotonanahary, M, (2012).** Thèse Présentée Pour L’obtention Du Titre De Docteur En Pharmacie Diplôme D’état, Université Joseph Fourier. P16, 19, 27, 28
- **Ramadan Mf, (2010).** Rapid Antiradical Method For Screening Deep Fried Oils .*Journal Of Consumer Protection And Food Safety*, 5: 47-50
- **Ravi, K., Ramachandran, B., & Subramanian, S. (2004).** Effect of Eugenia Jambolana seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Life Sciences*,75, 2717 – 2731.
- **Richard F.,(1992),** Manuel des corps gras, Paris, Ed: Lavoisier, Tec& Doc., p. 1228-1242.
- **Roberfroid, M. B., Coxam,V., & Delzenne, N. M. (2008).** Aliments fonctionnels. 2ème édition.Edition *Lavoisier TEC & DOC*, p 209, 215
- **Robert-Demuet S. (1995).** Méthodes De Dilutions. In *Antibiotiques Et Antibiogrammes* -
- **Roussel A M (2009).** Qui manque d’antioxydants, et comment le savoir ? *Cahiers de nutrition et de diététique*, pp: 7.

- **Sanago , (2006).** Le Rôle Des Plantes Médicinales En Médecine Traditionnelle. Université Bamako(Mali): P53.
- **Scalbert, A. (1991).** Antimicrobial Properties Of Tannins. *Phytochemistry*, **30**, 3875 – 3883.
- **Schaechter Et Al, (1999).**Microbiologie Et Pathologie Infectieuse 2eme Edition
- **Scheffer J.J.C,(1996).** Various Methods For The Isolation Of Essential Oils. *Phyther. Res.*, 10:S6-S7.Septentriona. Médicaments Et Aliments : L’approche Ethnopharmacologique. P160 :171.
- **Stamler, J. S., & Slivka, A. (1996).**Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. *Nutrition Reviews*, 54 (1), 1 – 30.
- **Strang C.** 2006. Larousse Medical. Ed Larousse.
- **Taleb-Toudert Karima, (2015).** Extraction Et Caractérisation Des Huiles Essentielles De Dix Plantes Aromatiques Provenant De La Région Kabylie, Mémoire De Docteur, Biologie Animale Et Végétale, Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou, (2015), P 2728-29.
- **Teixeira Da Silva J. A, (2004).** Mining The Essential Oils Of The Anthemideae. *Afr. J. Biotechnol.* Vol. (3): 706-720.
- **Tenscher E, Anton R Et Lobstein A, (2005).** Plantes Aromatiques. Epices, Aromates, Condiments Et Huiles Essentielles. Edition Tec&Doc. P3-50/121-124.
- **The´Riault. M ; Caillet. S; Kermasha. S & Lacroix. M, (2006).** Antioxydant, Antiradical And Antimutagenic Activities Of Phenolic Compounds Present In Maple Products. *Food Chemistry*, 98, 490–501Thèse De Doctorat En Génie Des Procédés (Ecole Doctorale En Génie Des Procédés: Spécialité
- **Treki A.S., Merghem R., Dehimat L,(2009).**Etude Phytochimique Et Evaluation De L’activité Antibactérienne D’une Labiée: *Thymus Hirtus*. *Sciences & Technologie*.Vol. (29): 25-2995.
- **Ulanowska, K., Traczyk, A., Konopa, G & Wegrzyn, G. (2008).** Differential Antibacterial Technological, Toxicological, and Health Perspectives, Marcel Dekker, Inc. New York, p.65.
- **Viaud H, (1993).** Les Huiles Essentielles, Qualité Distillation. Gnoma, Revue Electronique. [Www.Naturehelps.Com/France/Viaud2.Htm](http://www.Naturehelps.Com/France/Viaud2.Htm)
- **Wolef, (1968).** Manuel D’analyse Des Corps Gras. Edition Azoulay – Paris, P.245.
- **Yezza Samiha et Djediai Rania,(2016).** Analyse Physicochimique Et Activités Biologiques Des Huiles Essentielles De Quelques Epices, Mémoire Master, Contrôle De Qualité Des Produits Alimentaires, Université Kasdi Merbah Ouargla, 2016, P 35

- **Zaika, L. L. (1988)**-. "Spices And Herbs - Their Antimicrobial Activity And Its Determination" Journal Of Food Safety, Pp97-118.

Annexes

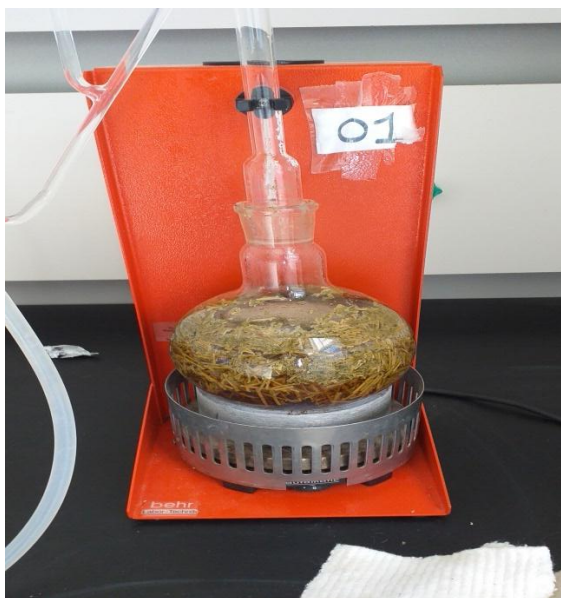


photo 03 : Placement De Disque



Photo 02 : Appareil (Clevenger)

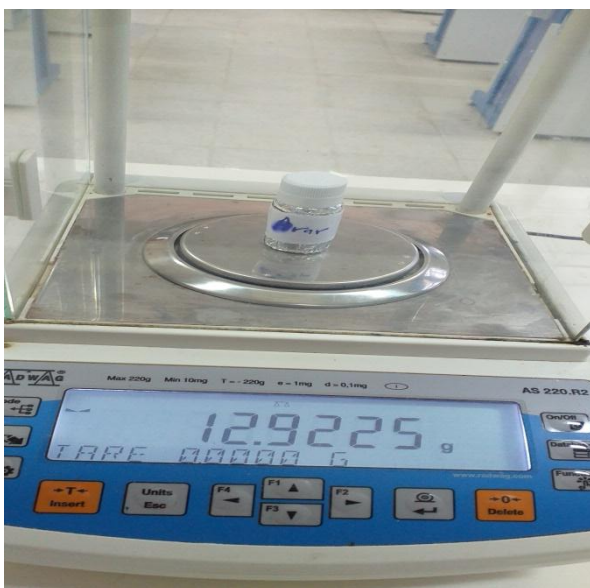


Photo 04 ; Balance Analitique



Photo 05 : Autoclave pour stérilisation

