

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة زيان عاشور بالجلفة
Université Ziane Achour (Djelfa)



MÉMOIRE DE MAGISTER

Pour l'obtention du titre de Magister en Chimie Organique Appliquée
Option : Chimie des Substances Naturelles

Présenté et soutenu par : Mme KHERKHACHE Hayat
Le : 30-10-2010

Composition Chimique et l'Activité Antimicrobienne de l'Huile Essentielle et l'Extrait Butanolique de *Saccocalyx satureioides*

Devant le jury :

Mr Choukri A.	Professeur à l'U-Z-A-Djelfa	Président
Mr Lahrech M.B.	Professeur à l'U-Z-A-Djelfa	Rapporteur
Mr Fodili M.	Maître de conférences à l'U-Z-A-Djelfa	Co-Rapporteur
Mr Amari Med.	Maître de conférences à l'USTHB	Examineur
Mr Boutaiba S.	Maître de conférence à l'U-Z-A-Djelfa	Examineur

Remerciements

J'ai eu la chance et le plaisir d'effectuer ce travail dans le laboratoire de chimie de la Faculté des Sciences de Nature et de la vie à l'université Ziane Achour –Djelfa sous la direction du professeur Lahrech M.B.

Tout d'abord, Je tien particulièrement à remercier Monsieur le professeur Lahrech M.B pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Chimie, pour m'avoir fait confiance, m'avoir encouragé et conseillé tout en me laissant une grande liberté. Pour son soutien et sa grande générosité, qu'elle soit assurée de ma profonde gratitude.

Mes remerciements vont également à Monsieur Chokri.A professeur à l'université Ziane Achour –Djelfa de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury et de juger ce travail.

Je remercie vivement : Monsieur Fodili.M Maître de conférence à l'Université Ziane Achour – Djelfa et Monsieur Amari M^{ed} Maître de conférence à USTHB qui ont bien voulu lire ce travail et faire partie du jury.

J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur Boutaiba.S Maître de conférence à l'Université Ziane Achour – Djelfa pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je tien aussi à remercier Monsieur Brahimi.A Maître de conférence à l'Université Ziane Achour – Djelfa pour son soutien moral.

A tous mes camarades de la première promotion de la Chimie des Substances Naturelles.

Toute gratitude va à mes parents qui n'ont jamais douté de moi et m'ont aidé et encouragé tout au long de mes études, à mes frères et sœurs et à mon mari qui m'a beaucoup aidé.

A tous ceux, que je n'ai pas nommé, et qui de prêt ou de loin ont contribué à l'élaboration de ce travail.

Que tous en soient vivement remerciés

Je dédie Ce travail:

A ALLAH le tout puissant, le clément, le miséricorde DIEU, pour m'avoir donné la chance la volonté et le courage nécessaire pour mener ce travail à bout ; je souhaite qu'il me montre d'autres jours meilleurs.

A mon père, pour m'avoir soutenu moralement jusqu'à ce jour. Père, ce travail est le tien, il est le fruit de tes efforts. Je prie le tout puissant qu'il t'accorde longue vie pour que tu puisses voir concrétisation de tes espoirs.

A ma mère, voici l'aboutissement de tes nombreuses nuits de prières, de ta sagesse et ta générosité ; mère de tous les enfants du monde si tes bonnes œuvres ont été jetées au fond de l'océan, si les poissons ne te le reconnaissent pas, le tout Puissant te le reconnaîtra ; chère mère, ce travail est le tien.

A mon mari pour sa patience et son soutien pendant la période ardue qu'est la rédaction.

A mes frères et mes sœurs qui ont été un soutient morale généreux et précieux pendant toutes années d'études.

*Sans oublier un spéciale dédicace à mes enfants : **Yasmine, Ayoub** et **Mouhamed** qui auraient été si fier de voir ce que je suis devenue.*

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

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

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Les terpènes (Les terpénoïdes)

I.1. Introduction	4
I.2. Définition des terpènes	4
I.3. Répartition	5
I.4. Localisation	6
I.5. Classification	6
I.5.1 Monoterpènes	7
I.5.2 Sesquiterpènes	12
I.5.3 Diterpènes	13
I.5.4 Triterpènes	15
I.5.5 Tétraterpènes	17
I.5.6 Polyterpènes	18
I.6. Biosynthèse des terpènes	18
I.7. Intérêt des terpènes	22
I.8. Caractérisation des terpinéols isolés à partir de quelques plantes	25
I.9. Conclusion	26

Chapitre II : Généralités sur les huiles essentielles

II.1 Introduction	27
II.2 Définition	27
II.3 L'origine des huiles essentielles	29
II.4 Répartition botanique	30
II.5 Localisation et lieu de synthèse	30
II.6 Rôle physiologique	31
II.7 Propriétés physiques et chimiques des huiles essentielles	32
II.8 Les facteurs influençant la composition	32

II.9	Composition chimique des huiles essentielles	33
II.9.1	Structure de base et sites fonctionnels	34
II.9.2	Composés terpéniques	36
II.9.3	Composés aromatiques dérivés du phénylpropane	36
II.9.4	Composés d'origines diverses	37
II. 10	Procédés d'extraction des huiles essentielles	37
II. 11	Activités biologiques des huiles essentielles	39
II. 11.1	Activité antimicrobienne	39
II. 11.1.1	Activité antibactérienne	39
II. 11.1.2	Activité antifongique	43
II. 11.2	Mode d'action des huiles essentielles	44
II. 11.3	Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	44
II.11.3.1	Techniques par contact direct.....	45
II.11.3.2	Technique de micro atmosphère.....	45
II.12	Toxicité des huiles essentielles.....	45
II.13	Propriétés et utilisation des huiles essentielles.....	46

Chapitre III : Travaux antérieurs

III.1	Description botanique.....	50
III.1.1	La famille des Lamiacées.....	50
III.1.1.1	Intérêt économique.....	51
III.1.1.2	Propriétés médicales.....	52
III.1.2	Le genre <i>Saccocalyx</i>	53
III.1.3	L'espèce <i>Saccocalyx satureioïes</i>	53
III.1.3.1	Les noms vernaculaires.....	54
III.1.3.2	Position dans la systématique.....	54
III.2	Distribution.....	55
III.3	Récolte.....	55
III.4	Intérêt écologique.....	55
III.5	Usage traditionnel.....	55
III.6	Etude chimique antérieures.....	57
III.6.1	Sur la famille.....	57
III.6.2	Travaux antérieurs sur l'espèce.....	62

Partie II : Partie expérimentale

Chapitre IV : Partie expérimentale

IV.1	Introduction.....	63
IV.2	Partie expérimentale.....	63
IV.2.1	Matériel végétal.....	63
IV.2.2	Analyse de la composition des huiles essentielles.....	63
IV.2.2.1	La chromatographie.....	63
IV.2.2.1.1	Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	64
IV.2.2.2	La spectroscopie de masse (MS).....	64
IV.2.2.3	Le couplage CPG/MS.....	65
IV.2.3	Méthode de séparation et purification des extraits.....	65
IV.2.3.1	Chromatographie sur couche mince (CCM).....	65
IV.2.3.2	Chromatographie liquide sur colonne.....	66
IV.2.4	Les techniques d'identification structurales.....	67
IV.2.4.1	Le couplage chromatographie – spectrométrie de masse (LC / MS).....	67
IV.2.4.2	Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN).....	69
IV.2.4.2.1	Spectre de la RMN ¹ H.....	69
IV.2.4.2.2	Spectre de la RMN ¹³ C.....	70
IV.2.4.2.3	La RMN à deux dimensions (RMN2D).....	70
IV.3	Etude phytochimique.....	72
IV.3.1	Extraction de l'huile essentielle.....	72
IV.3.1.1	Calcul du rendement R (%).....	75
IV.3.1.2	Etude de l'huile essentielle.....	75
IV.3.1.2.1	Etude cinétique.....	75
IV.3.1.2.2	Analyse physico-chimique de l'huile essentielle de <i>Saccocalyx satureioides</i>	75
A.	Les caractéristiques physiques.....	76
-	Mesure de la densité.....	76
-	L'indice de réfraction.....	76
-	Evaluation de la miscibilité à l'éthanol.....	77
IV.3.2	Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle.....	77
IV.3.3	Extraction par les solvants organique.....	78
IV.3.4	Méthode analytique et appareil.....	80
IV.3.5	Control chromatographiques des extraits.....	81
A.	Extrait Hexanique	81
B.	Extrait Chloroformique	81
C.	Extrait d'Acétate d'éthyle	82

D. Extrait butanolique	82
IV.3.6 Séparation et purification de l'extrait butanolique	82
IV.4 Tests d'activités antimicrobiennes	83
IV.4.1 Mise en évidence de l'activité antibactérienne in vitro de l'extrait naturel de <i>Saccocalyx satureioides</i>	83
IV.4.1.1 Matériel	83
A. Les souches microbiennes	83
B. Les milieux de culture	84
IV.4.1.2 Techniques d'évaluation de l'activité	84
A. Préparation de l'inoculum	84
B. Technique par contact direct	84
a. L'aromatogramme	85
b. Activité antibactérienne	85
c. Activité antifongique	86

Chapitre V: Résultats et discussion

V.1 Résultats de l'étude phytochimique	87
V.1.1 Le rendement en huile essentielle	87
V.1.2 Influence de la durée d'extraction sur le rendement en huile essentielle	88
V.1.3 Résultats de caractéristiques organoleptiques et physicochimiques	89
V.1.3.1 Examen organoleptique	89
V.1.3.2 Caractéristiques physico-chimique	89
V.1.4 Composition chimiques de l'huile essentielle de <i>Saccocalyx satureioides</i> : analyse par CPG/MS.....	89
V.1.5 Résultats de l'extraction par des solvants organiques	95
V.1.5.1 Rendement	95
V.1.5.2 Caractéristiques organoleptiques de l'extrait butanolique	95
V.1.5.3 Identification structurale du composé isolé	95
A. Analyse structurale	95
V.2 Résultats du test de pouvoir antimicrobien	103
V.2.1 Effets de l'huile essentielle et l'extrait butanolique sur les bactéries : <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Pseudomona aeruginosa</i>	103
V.2.2 Effets de l'extrait butanolique sur la levure <i>Candida albicans</i> et les deux moisissures : <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus neiger</i>	105

Conclusion générale	108
Références bibliographique	110
Annexes	118

Liste des figures

Fig. I.1 : Structure de l'isoprène et l'isoprène actif.....	4
Fig. I.2 : Elongation de la chaîne isoprénique	7
Fig. I.3 : Terpène de la feuille de Menthe poivrée	9
Fig. I.4 : Exemple des monoterpènes et corps apparentés	10
Fig. I.5 : Exemples d'iridoïdes	11
Fig. I.6 : Les différents isomères de terpinéol	11
Fig. I.7 : Exemple des sesquiterpènes	13
Fig. I.8 : Formules de quelques diterpènes	13
Fig. I.9 : Numérotation des différents types de diterpènes cycliques	14
Fig. I.10 : Formules de quelques stérols et stéroïdes (Triterpénoïdes)	17
Fig. I.11 : Exemples de tétraterpénoïdes : carotènes et leurs dérivés oxygénés	17
Fig. I.12 : Exemples des polyterpènes	18
Fig. I.13 : Principales étapes de la biosynthèse du diphosphate d'isopentényle à partir de l'acétyl CoA	20
Fig. I.14 : Synthèse de différentes classes terpéniques chez les plantes	22
Fig. I.15 : Structure des perillosides A-D	25
Fig. II.1 : Usine végétale	29
Fig. II.2: Glande simple, entièrement chargée d'une huile en forme de dôme	31
Fig. II.3: Les poils épidermiques sur le calice fleur d'un origan	31
Fig. II.4: Structures chimiques de quelques composés des huiles essentielles	35
Fig. II.5: Les différents composés aromatiques rencontrés dans les huiles essentielles	36
Fig. II.6: Structure générale des principaux agents antimicrobiens	42
Fig. III.1: <i>Saccocalyx satureioides</i>	56
Fig. III.2: <i>Saccocalyx satureioides</i> (Zaâfrane)	57
Fig. III.3: Localisation de la région visitée	58
Fig. III.4: 3,4-dihydroxyphényléthanoïde glycosiles	59
Fig. III.5: Cléodane diterpénoïde	60
Fig. III.6: <i>p</i> -coumaroyl glucosile d'Apigenin	61
Fig. III.7: Apigenin glucosides	62

Fig. IV.1: Schéma représentant les différentes étapes d'extraction e d'analyse de l'huile essentielle de <i>Saccocalyx satureioides</i>	73
Fig. IV.2: Montage d'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation	74
Fig. IV.3: Schéma de l'extraction des parties aériennes de <i>Saccocalyx satureioides</i>	79
Fig. IV.4: CCM de l'extrait hexanique	81
Fig. IV.5: CCM de l'extrait chloroformique	81
Fig. IV.6: CCM de l'extrait d'acétate d'éthyle	82
Fig. IV.7: CCM de l'extrait butanolique	82
Fig. IV.8: Etape de réalisation du test d'activité antibactérienne	86
Fig. V.1: Rendement en huile essentielle obtenu par hydrodistillation de quelques labiées	87
Fig. V.2: Evolution du rendement en fonction du temps	88
Fig. V.3: Distribution en fonction du pourcentage des différents composants existant dans l'huile essentielle de <i>Saccocalyx satureioides</i>	89
Fig. V.4: Distribution en fonction de pourcentage de différentes catégories existant dans l'huile essentielle de <i>Saccocalyx satureioides</i>	92
Fig. V.5: Enumération des constituants de l'essence de <i>Saccocalyx satureioides</i> des différentes provenances	93
Fig. V.6: Le pourcentage du carvacrol dans l'essence de <i>Saccocalyx satureioides</i> récolté de différentes régions	93
Fig. V.7: Le pourcentage de carvacrol dans les essences des différentes plantes	94
Fig. V.8: Spectre de masse du composé isolé de <i>Saccocalyx satureioides</i>	96
Fig. V.9: Spectre RMN ¹ H du compose isolé de <i>Saccocalyx satureioides</i>	97
Fig. V.10 : Spectre RMN ¹³ C en J module.....	98
Fig. V.11 : Spectre ¹³ C (DEPT 135).....	99
Fig. V.12: Spectre COSY H-H du compose isolé de <i>Saccocalyx satureioides</i>	100
Fig. V.13: Spectre HSQC H-C du compose isolé de <i>Saccocalyx satureioides</i>	101
Fig. V.14: Corrélations HMBC (Méthyles 7,9 et 10).....	102
Fig. V.15: Corrélations HMBC (proton oléfinique H-2).....	102
Fig. V.16: Antibiogramme ; indique les antibiotiques qui ont donné les zones d'inhibition suivant les souches bactériennes.....	103
Fig. V.17: Résultats de pouvoir antimicrobien de l'extrait butanolique de <i>Saccocalyx satureioides</i>	106

Liste des tableaux

Tableau.III.1 : Présentation de la capacité antioxydante des plantes, le nom commun, les parties aériennes des plantes et leurs utilisations	54
Tableau.III.2 : Les différents composés de 3,4-dihydroxyphényléthanoïde	60
Tableau.III.3 : Les clérodanes diterpénoides extraits d' <i>Ajuga pseudoiva</i>	60
Tableau.III.4 : Les différents composés chimiques extraits de l'espèce <i>Patchouli</i>	61
Tableau. IV.1 : Titres des solutions hydro-éthanoliques et leurs indices de réfraction	77
Tableau. IV.2 : Les différentes souches microbiennes étudiées	83
Tableau. V.1 : Evolution du rendement en huile essentielle de <i>Saccocalyx satureioïdes</i> en fonction du temps d'extraction	88
Tableau. V.2 : Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de <i>Saccocalyx satureioïdes</i>	89
Tableau. V.3 : Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de <i>Saccocalyx Satureioïdes</i>	89
Tableau. V.4 : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Saccocalyx satureioïdes</i> gratifié par CPG/SM	91
Tableau. V.5 : Différentes catégories existant dans l'huile essentielle de <i>Saccocalyx Satureioïdes</i>	92
Tableau. V.6 : Le rendement des extraits	95
Tableau. V.7 : Les caractéristiques de l'extrait butanolique	95
Tableau. V.8 : Résultats de la spectroscopie RMN ¹ H, RMN ¹³ C (CD ³ OD, 400MHz) du composé isolé de <i>Saccocalyx satureioïdes</i>	99
Tableau. V.9 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Saccocalyx satureioïdes</i> et son extrait butanolique	103
Tableau. V.10 : Aromatogrammes des trois bactéries	104
Tableau. V.11 : L'activité antimicrobienne de l'extrait butanolique de <i>Saccocalyx satureioïdes</i> sur la levure et les deux moisissures	105
Tableau. V.12 : Antibiogramme de la levure et les deux moisissures	106

Liste des abréviations

- IPP:** Diphosphate d'isopentényle
- Acetyl-CoA:** Acetyl-Co enzyme A
- Acetoacetyl- CoA:** Acetoacetyl-Co enzyme A
- HMG-CoA:** β -Hydroxy- β -Methyl Glutaryl Co-enzyme A
- HMGL:** β -Hydroxy- β -Méthyl Glutaryl Co-enzyme A Lyase
- MGH:** 3- Methyl Glutaconyl Co- enzyme A Hydratase
- ATP:** Adenosine triphosphate
- MVA:** Acide 3R-mévalonique
- MVAP:** Acide 5-phosphomévalonique
- MVAPP :** Acide 5-diphosphomévalonique
- DMAPP:** Dimethylallyl diphosphate
- GPP:** Geranyl diphosphate
- FPP:** Farnasyl diphosphate
- GGPP:** Geranylgeranyl diphosphate
- GAP:** Phosphate glyceraldehydes
- NADPH:** Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
- HE:** Huile essentielle
- Trolox :** Un analogue de vitamine E [Acide 6- hydroxy-2, 5,7, (amidinopropane)]
- CPG:** Chromatographie en phase gazeuse
- MS:** Spectrométrie de masse
- GC-MS :** Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
- R_v :** Volume de rétention
- R_t :** Temps de rétention
- UV :** Ultra- Violet
- ISO :** International Standard Organisation
- A.F.NOR :** Association Française de Normalisation
- A.O.A.C:** Association of Official Agricultural Chemist, USA
- VIH :** Virus d'Immunodéficience Humaine
- CCM:** Chromatographie sur couche mince
- CL :** Chromatographie liquides sur colonne
- FID :** Détecteur à ionisation de flamme
- TMS :** Trimethylsilyl
- CDCl₃ :** Chloroforme deutérié

EtOH : Ethanol

CH₂CL₂: Dichlorométhane

RMN: Résonance magnétique nucléaire

RMN¹H: Résonance magnétique nucléaire du proton

RMN¹³C (Jmod) : Résonance magnétique nucléaire du carbone (en mode J modulé)

RMN2D : Résonance magnétique nucléaire à deux dimensions

COSY: COrelated SpectroscopY

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Correlation

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

δ_H: Déplacement chimique du proton (ppm)

δ_c: Déplacement chimique du carbone (ppm)

ESI: Electro Spray Ionization (Ionisation par électrospray)

MAE: Microwave-assisted extraction

SFME: Solvent- free microwave extraction

RI : Indice de rétention

s : Singulet

d : Doublet

t : Triplet

m : Multiplet

dd : Doublet de doublet

ddd : doublet dédoublé dédoublé

ppm : Partie par million

ATCC: American Type Culture Collection

GN: Gélose nutritive

EB : Extrait butanolique

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

μl: Microlitre

mm : Millimètre

Hz : Hertz

J : Constante de couplage

Introduction générale

Au travers des âges, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ces besoins de base : nourriture, abris, vêtements et également pour ses besoins médicaux. L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes pour le traitement de toutes les maladies de l'homme est très ancienne et évolue avec l'histoire de l'humanité.

Bien qu'une grande partie du XX^{ème} siècle ait été consacrée à la mise au point de molécules de synthèse, la recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs via le screening de sources naturelles a résulté dans la découverte d'un grand nombre de médicaments utiles qui commencent à jouer un rôle majeur dans le traitement de nombreuses maladies humaines. ^[1]

Dans le monde, 80% des populations ont recours à des plantes pour se soigner, par manque d'accès aux médicaments prescrits par la médecine moderne mais aussi parce que ces plantes ont souvent une réelle efficacité. Aujourd'hui, le savoir des tradipraticiens est de moins en moins transmis et tend à disparaître. C'est pour cela que l'ethnobotanique et l'ethnopharmacologie s'emploient à recenser, partout dans le monde, des plantes réputées actives et dont il appartient à la recherche moderne de préciser les propriétés et valider les usages. ^[2] La recherche de nouvelles molécules doit être entreprise au sein de la biodiversité végétale en se servant de données ethnopharmacologiques. Cette approche permet de sélectionner des plantes potentiellement actives et d'augmenter significativement le nombre de découvertes de nouveaux actifs.

Les plantes se défendent par divers moyens physiques chimiques en synthétisant des métabolismes secondaires extraordinairement diversifiés. Ces molécules appartiennent à des familles chimiques très diverses telles que les alcaloïdes, les phénols, les flavonoïdes, les terpénoïdes, les stéroïdes. Les plantes aromatiques et médicinales constituent une véritable banque de ces molécules chimiques. ^[3]

Beaucoup de métabolites secondaires sont également important pour notre alimentation (goût, couleur), alors que d'autres parmi alcaloïdes, anthocyanines, flavonoïdes, quinine, lignanes, les stéroïdes et les terpénoïdes ont une application commerciale dans les domaines pharmaceutiques et biomédicaux et font partie des drogues, colorants, arômes, parfums et des insecticides. ^[4]

L'Algérie possède une richesse floristique considérable. Ce potentiel de plantes médicinales comporte des milliers d'espèces présentant des intérêts divers, notamment dans le domaine de la recherche des substances biologiquement actives.

C'est pourquoi, nous nous sommes intéressé à étudier certaines plantes, poussant à l'état spontané dans les monts de notre région et qui sont moins fréquemment employé ou sans application par la population.

Le présent travail, consacré essentiellement à l'étude phytochimique des parties aériennes de l'espèce : «*Saccocalyx satureioides*», une plante sauvage abondante dans notre région steppique qui appartient à la famille des Lamiacées et s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouveaux composés biologiquement actifs qui peuvent trouver une application thérapeutique ou cosmétique.

Le but de cette étude consiste à renforcer la connaissance phytochimique de ces extraits de plantes et à mettre en évidence de traceurs spécifique pour chacune des plantes en vue de l'utilisation ultérieure de leurs extraits dans l'industrie.

Notre travail sera donc reparti en cinq chapitres, initié par une recherche bibliographique où nous apportons dans le premier chapitre les différents types des terpènes : leur définition, leur intérêt biologique et leur biosynthèse. Le deuxième chapitre élucide la composition, la biosynthèse et les activités biologiques d'un groupe important de métabolite secondaire produit par cette plante et qui est l'huile essentielle. Le dernier chapitre de la partie bibliographique expose l'état des connaissances botaniques et phytochimiques sur cette plante et sa famille botanique.

La partie pratique est subdivisée en deux chapitres, le premier (4^{ème} chapitre) présente les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail à savoir :

- Extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation. Extraction des composés par macération par des solvants organiques.
- Les analyses de la composition chimique par CPG/MS pour l'huile essentielle et RMN ¹H, RMN ¹³C et la RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC) pour les composés extraits par des solvants organiques.
- Les méthodes du test de sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis des extraits naturels.

Le cinquième chapitre discute les résultats obtenus dans cette étude.

Enfin, le mémoire est clôturé par une conclusion générale contenant tous les résultats principaux.

^[1] Gurib-Fakim A., (2006), Medicinal plants, Tradition of yesterday and drugs of tomorrow, Molecular aspects of medicine 27, 1-93.

^[2] Pelt J. M., (2001), Les nouveaux actifs naturels, Marabout-Paris

^[3] Ben Ayad N., (2008), Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines ; Moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées, Projet de recherche, Faculté des sciences de Rabat.

^[4] Teixeira dasilva J. A., (2004), Mining the essential oils of the anthemideae, African journal of biotechnology, 3(12), PP. 706-720.

Partie I :

Synthèse Bibliographique

Chapitre I :
Les terpènes

I.1. Introduction

Les aliments végétaux, particulièrement les fruits et les légumes, exercent des effets protecteurs sur la santé. Actuellement, de nombreuses études s'intéressent aux mécanismes de ces effets. De nombreuses molécules, microconstituants trouvés exclusivement dans les Produits végétaux, ont des effets physiologiques. Les terpènes sont l'une des classes de microconstituants étudiés dans cette partie.

I.2. Définition

Les terpènes sont une classe d'hydrocarbures cycliques ou à chaînes ouvertes. Ce sont des produits naturels largement répandus dans le règne végétal. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette un assemblage d'un nombre entier d'unités pentacarbonées ramifiées dérivées du 2-méthylbutadiène, appelées unités isopréniques ^[5] à 5 atomes de carbones (C₅H₈) reconnue par Wallach dès 1887. Cet isoprène (Fig. I.1a) est la base du concept de la "règle isoprénique" énoncée en 1953 par Ruzicka. ^[6] Cette règle considère le diphosphate d'isopentényle (IPP), désigné sous le nom d'isoprène actif (Fig. I.1b) comme le véritable précurseur de la molécule terpénique.

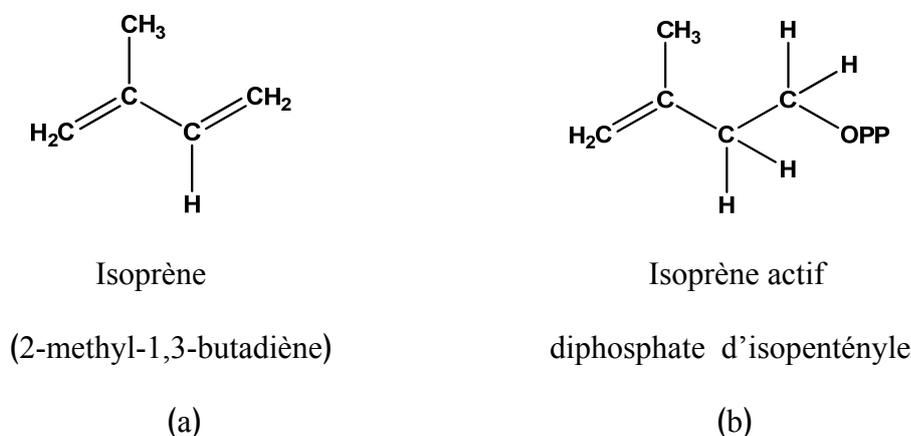


Fig. I. 1 : Structure de l'isoprène et de l'isoprène actif

^[5] Parisr.R, Moxse H., (1965), précis de matière médicale, Tome 1, MASSON et Cie, Editeur.

^[6] Lamarti A., Badoc A., Deffieux G., et Cardé J.P., (1994), Biogenèse des monoterpènes, Bull soc, Pharm, Bordeaux, 133,69-118.

Les systèmes enzymatiques responsables de cette conversion (IPP en composés terpéniques dans les trois compartiments: cytoplasmes, mitochondries et plastes) sont hydrosolubles ou membranaires. Ces derniers permettent l'élongation de la chaîne isoprénique. ^[6] Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien former des cycles conduisant à tout l'éventail des composés terpéniques à 10, 15, 20 et 30 atomes de carbones. ^[7]

I.3 Répartition :

La très grande majorité des terpènes est spécifique du règne végétal, mais cette spécificité n'est pas absolue. On peut en rencontrer chez les animaux :

- phéromones monoterpéniques connus chez les insectes élaborées à partir de monoterpéniques végétaux apportés à ces insectes par leur alimentation ^[8] et hormones juvéniles sesquiterpéniques des insectes.

- Les diterpènes des organismes marins (Cnidaires, Spongiaires) et les triterpènes : Squalène ainsi que son nom l'indique a été découvert chez les requins. ^[9]

Les terpènes les plus volatils C'est-à-dire ceux dont le poids moléculaire n'est pas trop élevé, sont presque exclusives de l'embranchement des spermatophytes. ^[8]

^[7] Bruneton J., (1999), Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales 3^{ième} édition, Tec & Doc et EM inter.

^[8] Bruneton J., (1987), Elément de phytochimie et de pharmacognosie, Technique et documentation Lavoisier, Paris.

^[9] Guignard J.L., (1996), Biochimie végétale, Masson, Paris.

I.4. Localisation :

Les terpènes sont trouvés dans tous les organes végétaux : fleurs ^[10], ^[11], feuilles ^[12], rhizomes ^[13], écorces ^[14] et fruits ^[13] ou graines.

La synthèse des terpènes est généralement associée à la présence de structures histologiques spécialisées, localisées en certains points des autres tissus, le plus souvent situées sur ou à proximité de la surface de la plante. Ces formations sont les suivantes :

- Cellules à essence : Lauracées, Zingibéracées.....
- Poils sécréteurs stipités (Pélargonium) ou sessiles et à tête pluricellulaire (Labiées)
- Poches sécrétrices schizogènes (Myrtacées) ou schizolysigènes (Rutacées, Burséracées)
- Canaux sécréteurs : Térébinthacées, Ombellifères.

I.5. Classification :

La synthèse d'une grande variété de terpénoïdes cyclique et acyclique, dans les plantes, fait intervenir un nombre variable d'éléments isopréniques.

Suivant le nombre entier d'unités pentacarbonées (C_5H_8)_n ramifiées, dérivées du 2-méthylbutadiène, on peut faire la classification suivante :

- **Pour n = 2 :** les monoterpènes (C_{10})
- **Pour n = 3 :** les sesquiterpènes (C_{15})
- **Pour n = 4 :** les diterpènes (C_{20})
- **Pour n = 5 :** les sesterpènes (C_{25})
- **Pour n = 6 :** les triterpènes (C_{30})
- **Pour n = 8 :** les polyterpènes

[10] Gards S. N., Charles R., Kumar S., (1999), A new cyclic monoterpènes glucoside from the capitula of *tagetespatula*, *Fitoterapia*, The journal for the study of medicinal plants, 70, N°5, PP.472-474

[11] Randriamiharisoa P. R., (1983), Contribution à l'étude analytique et structurale des différents grades d'huile essentielle *canangium odoratum genuina*, Thèse de doctorat, Université des sciences d'Aix- Marseille, Marseille.

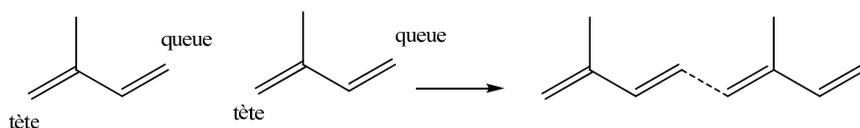
[12] Lamatyr., Menotc., Molangui T., Valade I., Rasoanaivo P., Petitjean A., (1993), Huiles essentielles de quelques plantes aromatiques malgaches. Fifth napreka. Symposium on naturel products. Septembre 19-23 Antananarivo, Madagascar.

[13] Ramanandraibe V., (1995), Contribution à l'étude des huiles essentielles de feuilles et de fruits de *pittosporium viridiflorum pittosporaceae*, Mémoire de DEA de chimie organique, Option produits naturels, Faculté des sciences, Université d'Antananarivo, Madagascar.

[14] Randriamanantoanina H. C., (1984), Extraction d'aromes alimentaires : cas du gingembre, Mémoire d'ingénieur de l'E.E.S.A-IAA, Université d'Antananarivo, Madagascar

Dans les terpénoïdes, la tête d'une unité isoprène est ordinairement liée à la queue d'élément suivant ; toute fois, on rencontre des exemples de terpénoïdes où se trouvent des liaisons "tête-tête" et "queue-queue" (Fig. I.2).

• **Enchaînement régulier :**



• **Enchaînement irrégulier :**

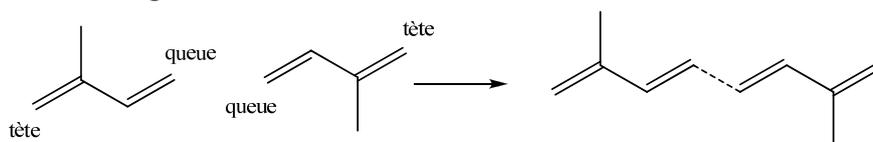


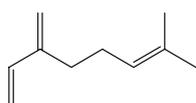
Fig. I.2 : Elongation de la chaîne isoprénique

I.5.1. Monoterpènes:

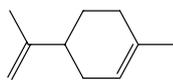
Les monoterpènes sont largement répartis dans le règne végétal. Néanmoins, les plantes de certains ordres sont dépourvues de monoterpènes comme les Ranunculales, les violales ou les Primulales tandis que d'autres en sont très largement pourvues qualitativement et quantitativement comme les Rutales, les Cornales, les Lamiales ou les Astérales. ^[15]

Les composés monoterpéniques correspondent le plus souvent à la formule brute $C_{10}H_{16}$ ^[16], qui correspond aux trois possibilités suivantes :

- Monoterpènes acycliques (myrcène, ocimènes),
- Monoterpènes monocycliques (Limonène, α -et γ -terpinène, ρ -cymène)
- Monoterpènes bicycliques (α -pinène, sabinène, camphène,....).



Myrcène



Limonène



Camphène

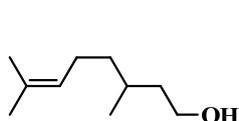
^[15] J. L. Guignard, L. Cosson et M. Henry.,(1985), Abrégé de phytochimie, Masson et cie, Paris, 154-174.

^[16] Rahal.S., (2004), Chimie des produits naturels et des êtres vivants, O.P.U, Alger, p 162.

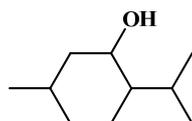
Les monoterpènes sont volatils, entraînés à la vapeur d'eau, d'odeur souvent agréable et représentent la majorité des constituants des huiles essentielles, ils constituent parfois plus de 90% de l'huile essentielle (Citrus, Térébenthines).^[17]

Selon Bruneton (1999), la réactivité des cations intermédiaires justifie l'existence de nombreuses molécules caractérisées par différentes fonctions :

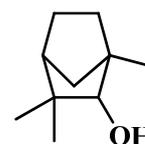
- **Alcools** : acycliques (citronellol), monocycliques (menthol), bicycliques (fenchol) ;



Citronellol

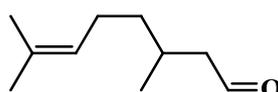


Menthol



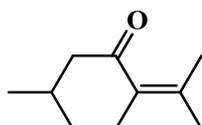
Fenchol

- **Aldéhydes** : le plus souvent acycliques (citronellal) ;

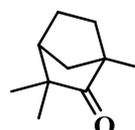


Citronellal

- **Cétones** : acyclique (tagétone), monocycliques (menthone, pulégone), bicycliques (fenchone) ;



Pulégone



Fenchone

- **Esters** : acycliques (acétate de citronellyle), monocycliques (acétate de menthyle, acétate d' α -terpinyle), bicycliques (acétate d'isobornyle).^[9]

Dans une même plante, coexistent d'ailleurs plusieurs molécules de formules voisines ne différant que par leur degré hydrogénation ou d'hydroxylation (Fig. I.3).^[15]

^[17] Bruneton J., (1993), Elément de phytochimie et de pharmacognosie, Technique et documentation Lavoisier, Paris.

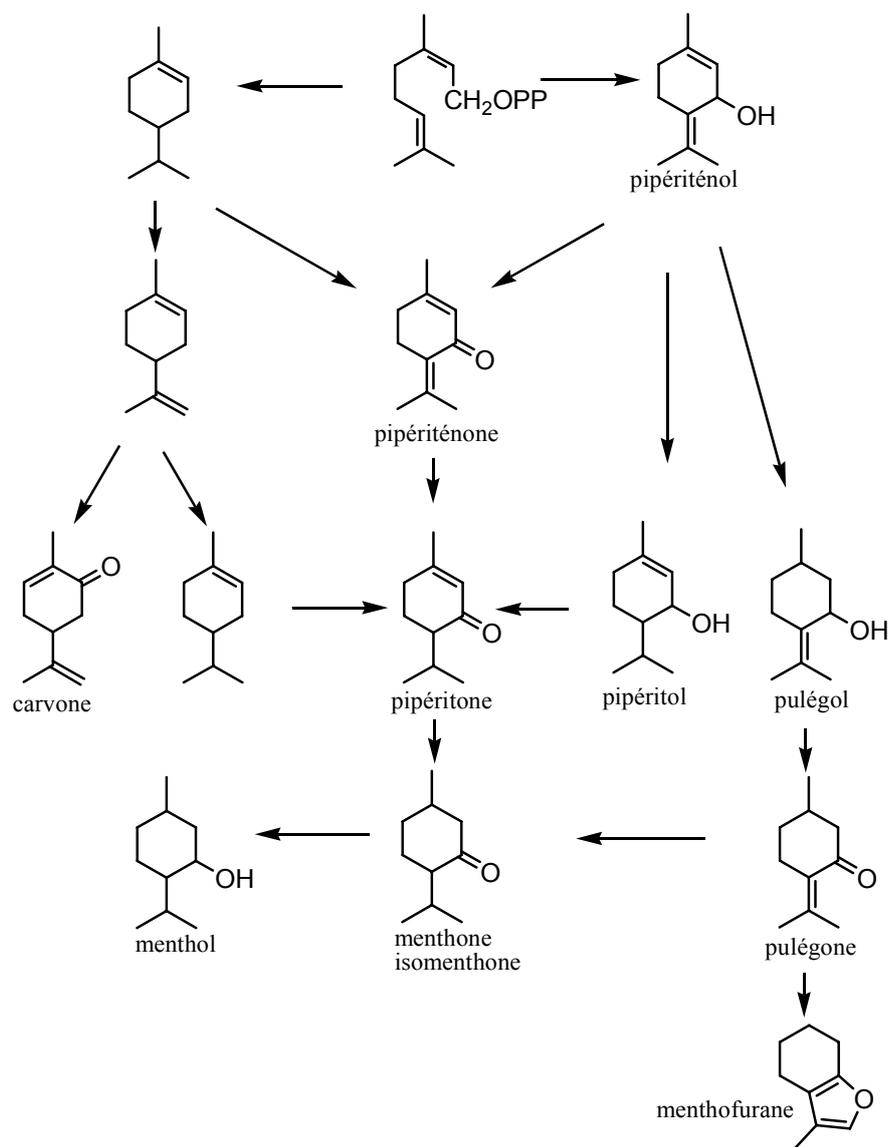


Fig. I.3 : Terpènes de la feuille de Menthe poivrée.

Les flèches indiquent l'ordre présumé de leur apparition. ^[15]

Dans ce groupe sont à classer des terpènes irréguliers comme l'acide chrysanthémique (Fig. I.4) caractéristique des composés.

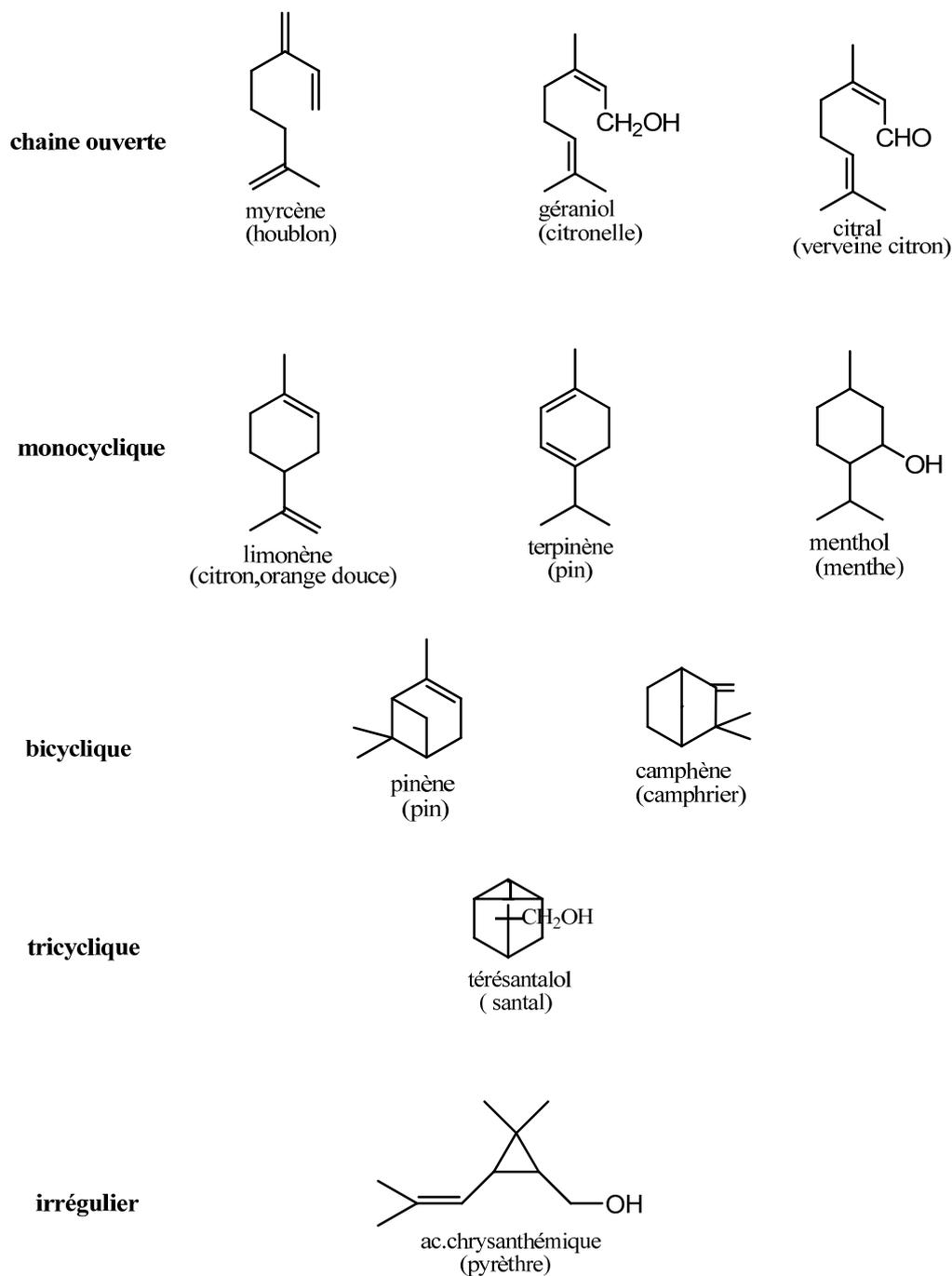


Fig. I. 4: Exemples des monoterpènes et corps apparentés. ^[15]

Nous citerons également les iridoïdes qui sont des terpènes comportant un hétérocycle oxygéné (pyrane). La loganine (ou loganoside) en est un exemple (fig. I.5), qui est le précurseur de la partie terpénique des alcaloïdes indoliques des Apocynacées-Rubiacées-Loganiacées ; son oxydation produit des composés tels que la gentiopirine, principe amer des Gentiane.^[15]

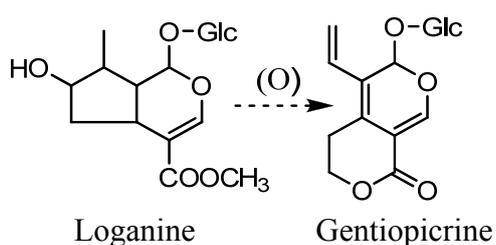


Fig. I.5 : Exemples d'iridoïdes.^[15]

• Terpinéols :

Le terpinéol est un monoterpène qui a été isolé de plusieurs sources naturelles, de formule brute $C_{10}H_{18}O$. Il a trois isomères : α -terpinéol, β -terpinéol et γ -terpinéol (fig. I.6) dont les deux derniers diffèrent seulement par l'endroit de la double liaison. Le terpinéol est habituellement un mélange de ces isomères, avec l' α -terpinéol est le constituant majoritaire.

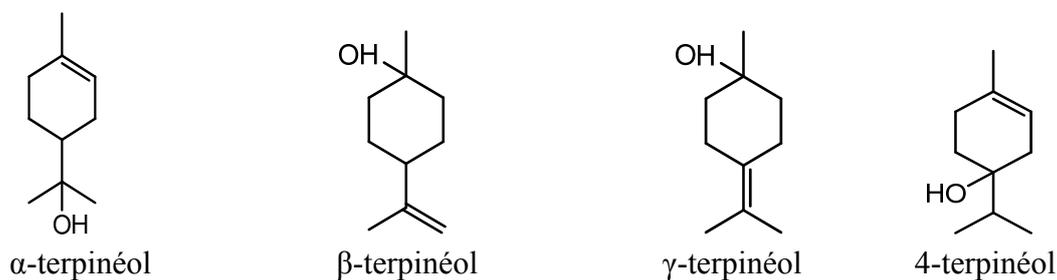


Fig. I.6 : les différents isomères de terpinéol

L' α -terpinéol a une odeur plaisante semblable au Lilas. ^[18] On le trouve en nombreuses plantes et nourritures, mais aussi est produit en quantité commerciale par un processus synthétique. ^[19] L' α -terpinéol est utilisé généralement dans les parfums, les savons et les produits de beauté. ^[20]

Dans l'industrie alimentaire, l' α -terpinéol est employé comme aromatisant, particulièrement dans des saveurs de citron (citron, chaux, orange), et aussi comme adjuvant.

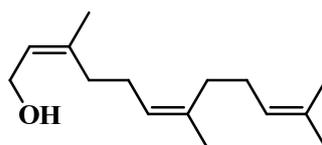
1.5.2. Sesquiterpènes :

Ils comportent trois unités d'isoprène, leur formule est $C_{15}H_{24}$ soit une fois et demie (sesqui) la molécule des terpènes. ^[21] Ils présentent une grande variété dans les structures conduisant à un nombre élevé de possibilités, ce qui a retardé l'élucidation de leurs structures. ^[16]

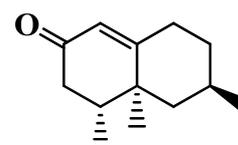
Les sesquiterpènes peuvent être également, comme les monoterpènes, acycliques (farnésol), monocycliques (humuleine, α -Zingibérène) ou polycycliques (matricine, longifolène, artémisinine). Ils renferment aussi des fonctions comme alcools (farnésol, carotol, β -Santalol, patchoulal), cétones (nootkatone, cis-longipinane-2.7-dione, β -Vetivone), aldéhydes (sinensal), esters (acétate de cédryle) (fig. I.7). ^[9]



Longifolène



farnésol



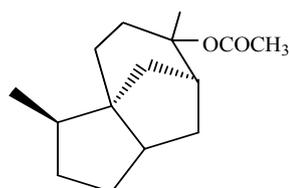
Nootkatone

^[18] Burdock, G. A., (2002), Fenaroli's handbook of flavor ingredients, pp.1741-1742 (CRC press, Boca Raton, FL, 2002).

^[19] Bauer, K. & Garbe, D., (1985), Common fragrance and flavor materials : préparation, properties and uses, pp-55-56 (VCH GmbH, D-6940 Weinheim, Germany, 1985).

^[20] Bedoukian P., (1986), perfumery and flavoring synthetic: Allured publishing corporation, Wheaton IL.

^[21] Belaiche P., (1979), Traité de phytothérapie et d'aromathérapie, Tome 1, Maloine S. A., Paris.



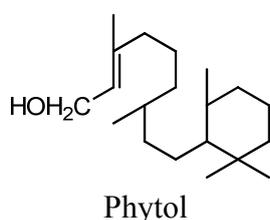
Acétate de cédryle

Fig. I.7 : Exemples de sesquiterpènes

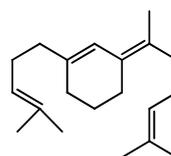
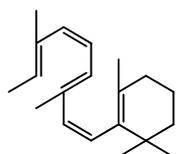
I.5.3 Diterpènes :

Ce sont des dérivés des hydrocarbures de formule ($C_{20}H_{32}$) à quatre unités d'isoprènes. Ces composés à point d'ébullition élevée, se rencontrent surtout dans les résines. ^[5] Les diterpènes sont beaucoup moins répandus que les mono et sesquiterpènes. On les trouve surtout chez les fabales et les Géraniales qui en constituent les sources les plus importantes, et également chez les plantes dérivées des Géraniales comme les Laminales et les Asterales. ^[15]

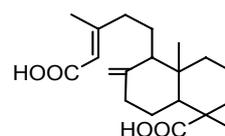
Les diterpènes peuvent être acyclique (phytol), monocyclique (α -camphorène, vitamine A), bicyclique (acide agathique), ou tricyclique (acide abiétique) (fig. I.8). ^[15]



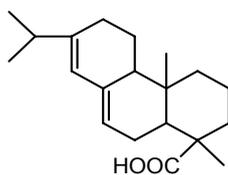
Phytol

 α -camphorène

Vitamine A



Acide agathique



Acide abiétique

Fig. I.8 : Formules de quelques diterpènes

La numérotation des différents types de diterpènes utilisées de nos jours est celle qui est préconisée par Row ^[22] dans son ouvrage : la nomenclature systématique des terpènes cycliques. ^[23] Voici quelques exemples (fig. I.9) :

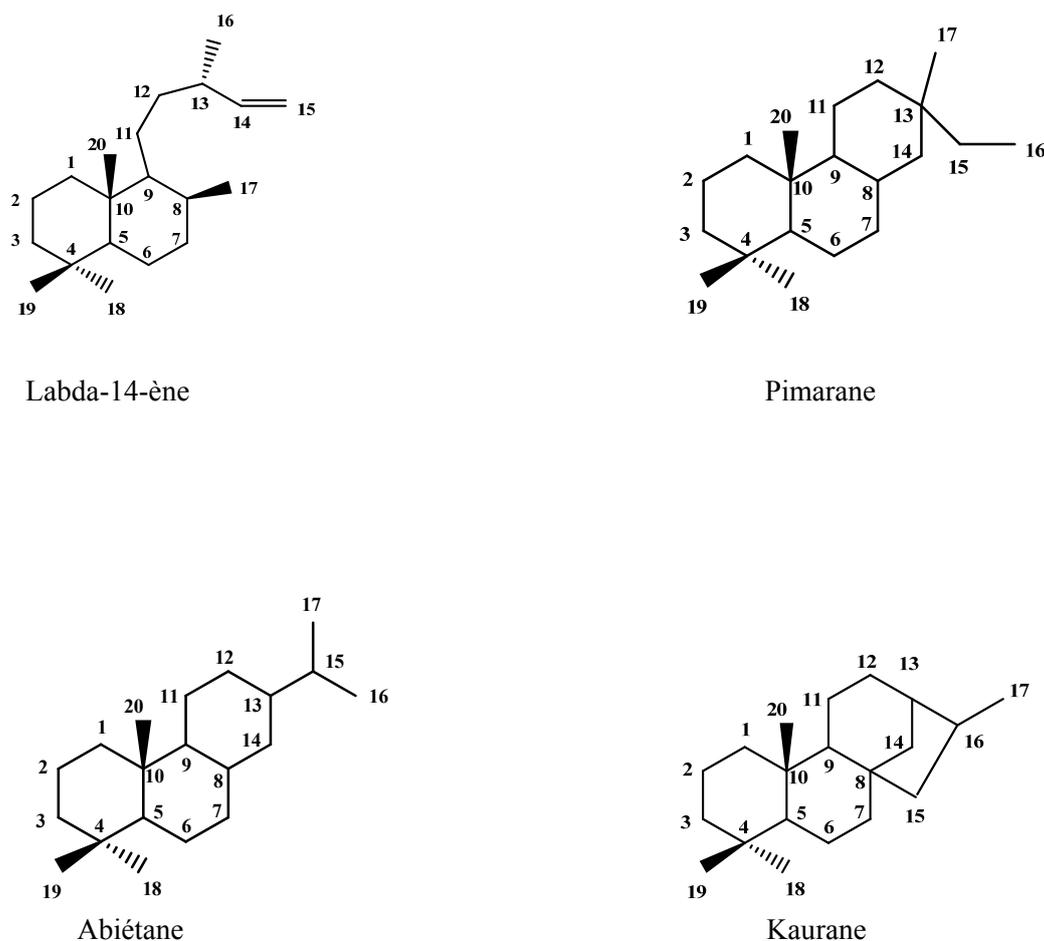


Fig. I.9 : Numérotation des différents types de diterpènes cycliques

^[22] Halim A. F., Saad H., E. A., Lahloub, M. F. et Ahmed, Q. F., (1989), Annual congress of the society for medical plant research, Braunschweig, Germany.

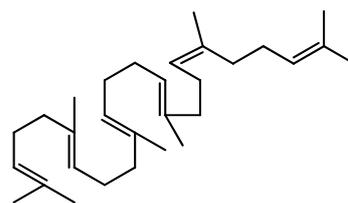
^[23] Nait said. N., (2007), Etude phytochimique des extraits chloroformiques des plants : *pituranthos chloranthus* et *marrubium vulgare*, Mémoire de magistère.

I.5.4 Triterpènes :

Ces composés en C₃₀ ont six (06) unités isoprènes, ils sont très répandus, notamment dans les résines, à l'état libre (squalène, phytostérols, triterpènes pentacycliques), ou sous formes d'hétérosidiques (saponosides).^[24]

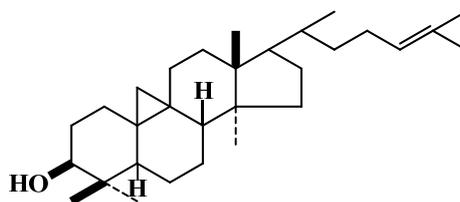
Les triterpènes peuvent être sous forme :^[15]

- Acycliques :



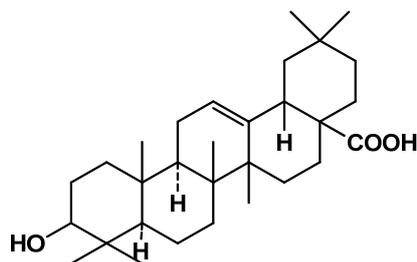
Squalène

- Tétracyclique :



/

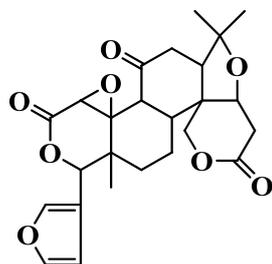
- Pentacyclique



Acide oléanolique (Sapogénine)

^[24] Govindachrit R., Gopalakrishnan G., Suresh G., (1999), Triterpenoidal constituents of an aqueous extract from neem kernels, *Fitoterapia, The journal for the study of medicinal plants* 70, N°6, pp 558-560.

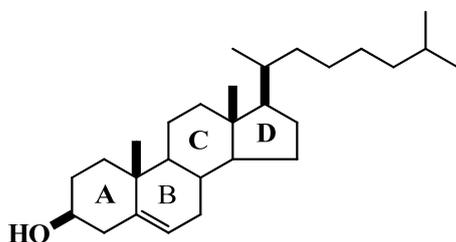
- Dérivé d'oxydation



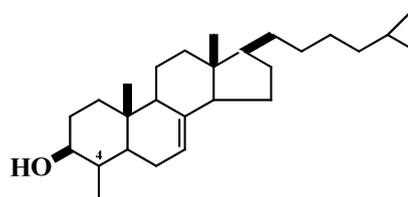
Limonine (Principe amer ; citron, orange)

Nous citerons également les triterpénoïdes qui sont des stéroïdes et des stérols. Ce sont des constituants essentiels des membranes cellulaires. On les trouve aussi bien chez les animaux (cholestérols) que dans les végétaux (phytostérols), et même dans sédiments d'origine organique bien qu'en fait provenant initialement de végétaux ou d'animaux (Fig. I.10).^[25]

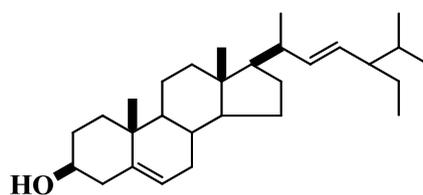
- Stérols



Cholestérol



Lophénol (4- méthyl stérol)



Stigmastérol

^[25] Gagnault J. C., Bidet D., Gaillard M., Perronnet J., (1997), stérols et stéroïdes, Paris, 11-31, 1997.

- Stéroïdes

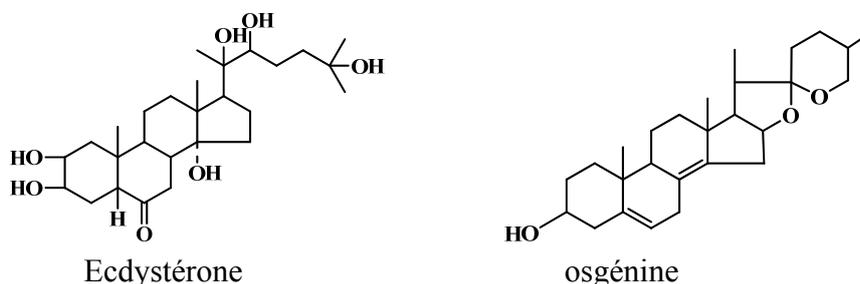


Fig. I.10 : Formules de quelques stérols et stéroïdes (Triterpénoïdes)^[15]

I.5.5.Tétraterpènes :

Ce groupe de composé en C_{40} contient huit (08) unités d'isoprènes.^[26] Les seuls représentants de ce groupe sont les caroténoïdes ; substances colorées en jaune, orange ou rouge auxquelles de nombreuses fleurs et fruits doivent leurs couleurs, leur nom provient de ce que le premier d'entre eux a été isolé de la racine de Carotte.^[15]

Les tétraterpènes peuvent être acyclique (Lycopène), monocyclique (γ -carotène), bicyclique (β -carotène) ou encore sous forme des dérivés oxygénés (Xanthophylle (Lutéine)) (fig. I.11).

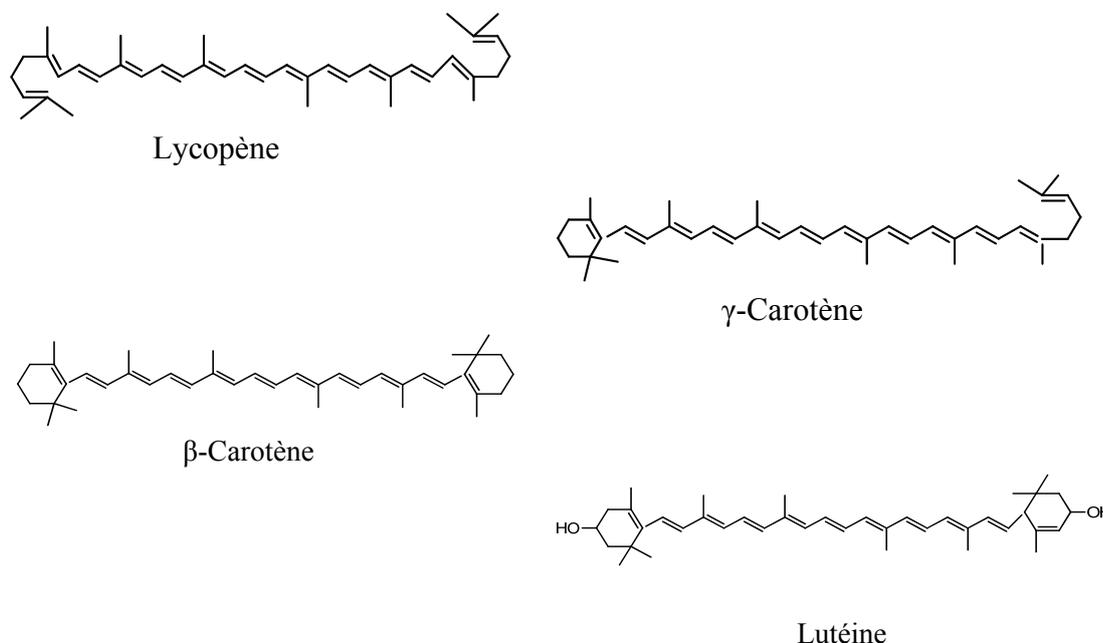


Fig. I.11 : Exemples de tétraterpénoïdes : carotènes et leurs dérivés oxygénés^[15]

^[26] Ralambomananad A., (1998), Contribution à l'étude chimique de *Senecio myricaefolius* Bojer (compositae) : Composition chimique de l'huile essentielle, Insaponifiable et alcaloïdes totaux chimio taxonomie du genre *Senecio*, Mémoire de chimie organique, Option produit naturels, Université d'Antananarivo, Madagascar.

I.5.6. Polyterpènes :

Ce sont des Macromolécules, composés d'un grand nombre d'unité d'isoprène ^[26]. Ces polyisoprénoïdes présentent une structure linéaire ^[15]; dans le règne végétal on trouve : le caoutchouc de poids moléculaire 150 000 environ, la gutta de poids moléculaire 100 000 environ (fig. I.12) ^[26].

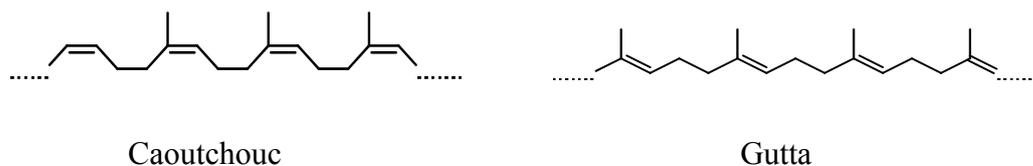


Fig. I.12 : Exemples de polyterpènes

I.6. Biosynthèse des terpènes :

Les trois séquences réactionnelles fondamentales qui justifient l'existence de tous les terpènes et même des stéroïdes sont les suivantes :

1. Formation des unités réactives en C₅ à partir de l'acétate, via le mevalonate.
2. Couplage tête-à-queue des unités isopréniques impliquées dans la formation des mono-, di-, sester- et polyterpènes.
3. Couplage queue-à-queue des unités en C₁₅ et en C₂₀ permettant l'élaboration des précurseurs des triterpènes et des carotènes ^[27].

Nous décrivons dans ce chapitre la biosynthèse des terpènes ^[27] ^[28].

La voie la plus couramment admise pour la synthèse de la molécule d'IPP consiste à la condensation de deux molécules d'acétyl CoA pour former de l'acétoacétyl CoA (Fig. I.13).

^[27] T. J. Vanderjagt, R. Ghattas, D. J. Vanderjagt, M. Crossey, R. H. Gleixl., (2002), Comparaison of the total antioxidant content of 30 widelyused medicinal plants of new Mexico, Life sciences 70, 1035-1040.

^[28] A. Kariati, H. Skaltsa, J. Heilmann, O. Sticher., (2003), Acylated flavonoid and phenylethanoid glycosides from *Marrubium velutinum*, Phytochemistry 64,655-660.

Cette réaction est d'abord catalysée par une acétoacétyl CoA thiolase, couplée à une Fe quinone. Puis l'HMG CoA synthétase catalyse la fixation d'une troisième molécule d'acétyl CoA qui donne le β -hydroxy- β -méthyl glutaryl coenzyme A (HMG CoA hydrosoluble).

L'HMG CoA est aussi un substrat pour deux autres enzymes spécifique, l'HMG CoA lyase (HMGL) et la 3-méthylglutaconyl CoA hydratase (MGH). Cette fixation d'un acétyl CoA sur un groupement carbonyle est semblable à la réaction permettant l'entrée de l'acétyl CoA dans le cycle de Krebs par condensation sur l'acide oxaloacétique. La réduction de la fonction acide (engagée dans une liaison thioester) en alcool est catalysée par l'HMG CoA réductase et donne l'acide mévalonique.

Un groupement diphosphate va ensuite être fixé sur la fonction alcool primaire de l'acide mévalonique. Le mévalonate-5-diphosphate ainsi formé va réagir avec une troisième molécule d'ATP ; cette réaction fournit un composé instable qui se décompose spontanément en perdant la fonction alcool tertiaire et le groupement carbonyle libre. Ainsi est élaboré un dérivé à 5 atomes de carbone, le diphosphate d'isopentényle (IPP), qui est la forme biologiquement active de la molécule isoprénique.

L'IPP est l'intermédiaire clé dans la formation des composés terpénique (Fig. I.13). La première étape de la formation des diphosphates des prényles est l'isomérisation de l'IPP en diphosphate de diméthylallyle (DMAPP). Cette réaction est catalysée par une enzyme hydrosoluble, l'isopentényl diphosphate isomérase. ^{[6] [29]}

Les terpénoïdes sont classés selon le nombre d'unités isoprène en une série de structures homologues : hemiterpènes C_5 (1 unité isoprène), monoterpènes C_{10} (2 unités isoprènes), sesquiterpènes C_{15} (3 unités isoprènes), diterpènes C_{20} (4 unités isoprènes), triterpènes C_{30} (6 unités isoprènes), tetraterpènes C_{40} (8 unités isoprènes) et polyterpènes $(C_5)_n$ où n peut être 9-30 000.

^[29] Dudareva N., Andersson S., Orlova I., Gatto N., Reichet M., Rhodes D., Boland W. et Gershenzon J., (2005), The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers, Ed., Rodney B. Croteau, Washington state university, Pullman, WA. PNAS.102 (3), 933-938.

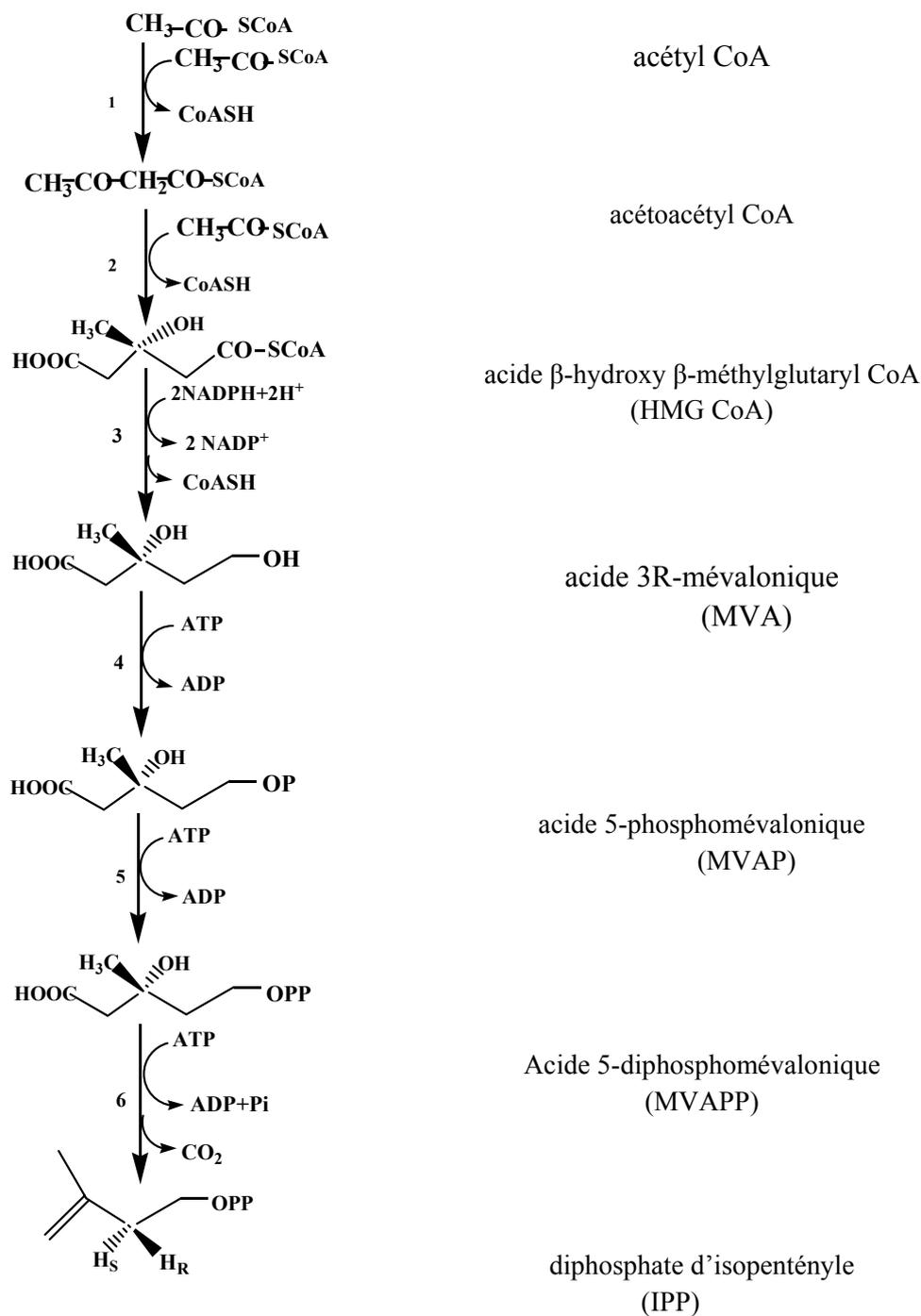


Fig.I.13 : Principales étapes de la biosynthèse du diphosphate d'isopentényle à partir de l'acétyl CoA. ^[6]

1: acétoacetyl CoA thiolase
 2: HMG CoA synthase
 3: HMG CoA reductase

4: mévalonate kinase
 5: mevalonate 5-phosphate kinase
 6: mevalonate 5-diphosphate décarboxylase

La biosynthèse des terpénoïdes 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. ^[30]

Les systèmes enzymatiques : les systèmes hydrosolubles et les systèmes membranaires permettent l'élongation de la chaîne isoprénique conduisant à tout l'éventail des composés terpéniques à 10, 15, 20,30 atomes de carbones (fig.I.14). Les enzymes impliquées sont, d'une part, une isomérase et, d'autre part, une ou plusieurs prényltransférases. ^[17]

Les mono et sesquiterpènes sont synthétisés au niveau du réticulum endoplasmique. Cependant les cellules qui les produisent s'organisent en appareil sécréteur ; les stéroïdes (triterpénoïdes) et les polyterpènes sont également synthétisés au niveau du même organe quant aux caroténoïdes (tetraterpénoïdes) des fleurs et des fruits, ils sont synthétisés au niveau des chromoplastes, lesquels reçoivent l'acide mévalonique du réticulum endoplasmique. ^[9]

A la fin des années quatre vingt une nouvelle voie de synthèse du pyrophosphate d'isopentényle (IIP) à été constatée chez divers bactéries (*Rhodospseudomonas ssp*, *Menthylobacterium ssp.*) et chez une algue verte *Scenedesmus obliquus* ; l'IIP résulte de la condensation d'une unité dicarbonée issue de la décarboxylation d'une molécule de pyruvate sur le carbone du carbonyle de phosphate glycéraldéhyde (GAP), suivie d'une transposition et réduction pour former le 2-C-méthyl-D-erythritol-4-phosphate le précurseur de l'IPP. ^[7]

^[30] Dubey V.S., Bhalla R. et Luthira R., (2003), An overview of the mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants, J. Biosci, 28(5), 637-646.

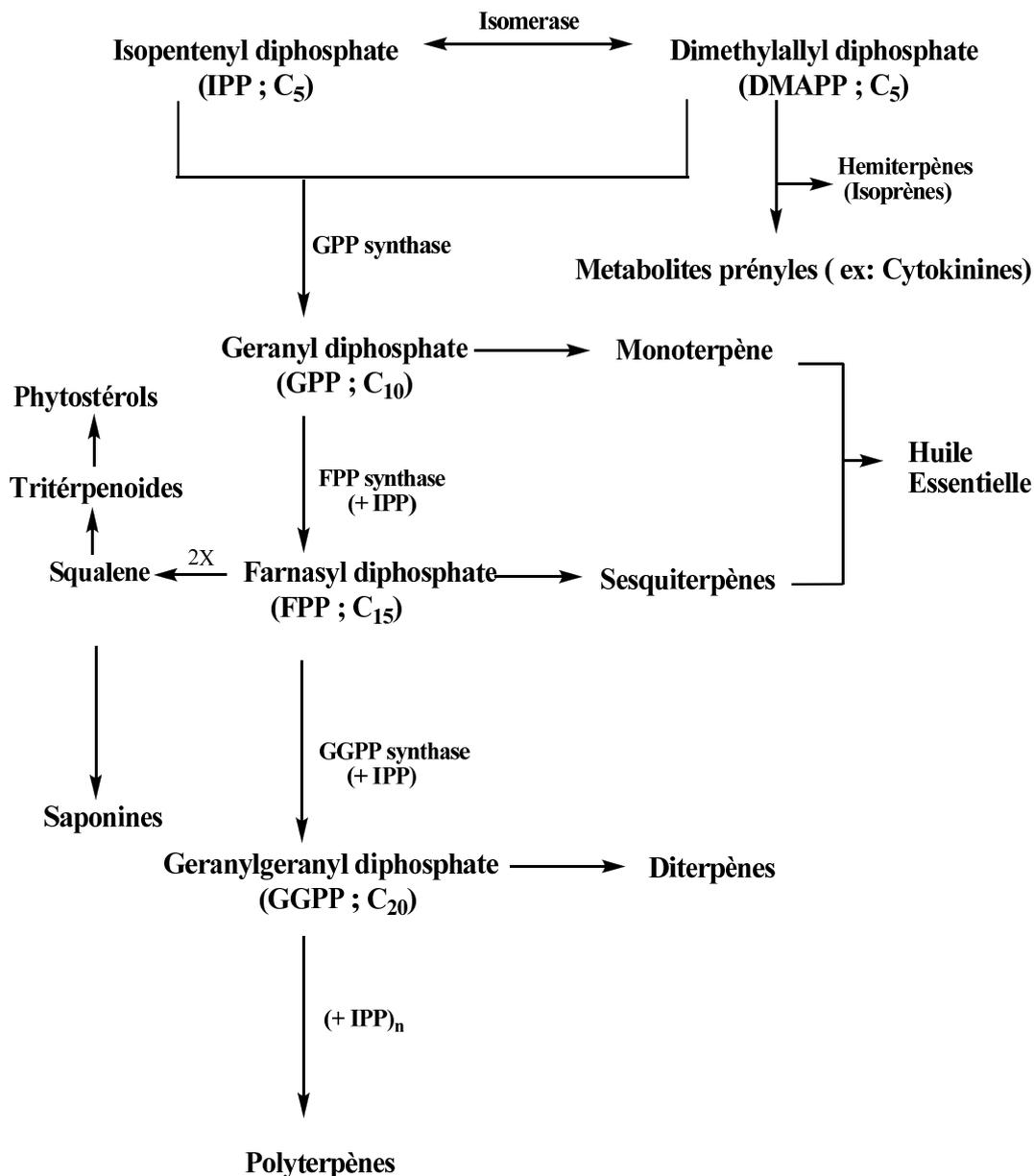


Fig. I. 14 : Synthèse de différentes classes terpéniques chez les plantes. [30]

I.7. Intérêt des terpènes :

Les terpènes sont les constituants majeurs de l'huile essentielle. Cependant si l'on peut connaître les effets de monoterpènes ou de sesquiterpènes isolés, les résultats sont difficilement transposables à l'essence, mélange complexe et variable.

Beaucoup de drogues doivent aux composés terpéniques des essences leurs propriétés aromatiques. Les terpènes non cycliques sont en grande partie responsables de l'odeur suave des plantes et des fleurs et dont quelques-unes sont employées en parfumerie. Ces substances possèdent aussi des propriétés pharmacodynamiques très variées, en relation avec les différentes fonctions liées au squelette terpénique. [5]

Les diterpènes sont abondants chez les Lamiales et les Asterales – plus de 1200 produits repartis en une centaine de squelettes ont été décrits chez les seules Astéraceae- Ils sont plus dispersés chez les Gentianales, les Géraniales et les Fabales ^[31], ils suscitent un grand intérêt, certains sont très connus tels que le Taxol qui est un diterpène complexe isolé en 1962 de l'écorce des troncs de l'if du pacifique *Taxus brevifolia*. Il constitue une nouvelle arme cliniquement approuvée très efficace dans l'arsenal contre le développement des tumeurs cancéreuse chez l'homme. En 1994 les chimistes organiciens sont parvenus à deux synthèses totales de cette molécule qu'est le Taxol. ^[33]

Les diterpènes sont pourvus des propriétés thérapeutiques suivantes :

- anti-hypertensive de la torskoline isolée du *Plectranthus barbatus*. ^[32]
- anti rétrovirale de la prostratine d'*Homothantus nutans*. ^[32]
- anti-tumorale. ^{[34][35]}
- anti-inflammatoire et analgésique du borjatriol isolé de *Sedretis mugronensis*. ^[13]
- anti-oxydante des diterpènes phynoliques du *Romarin* et de la *Sauge*. ^[36]
- édulcorante du stéviolose de l'herbe sacrée de Paraguay. ^[37]
- hallucinogène marqué de Salvinorine A, diterpène actif de *Salvia divinorum*. ^[38]
- anti-bactérienne du Totarol et Ferruginol vis-à-vis du MRSA ^[39] (*Staphylococcus aureus* résistant au méthicilline)
- antivirale. ^[40]
- antibiotique. ^{[41][42]}
- antimalarique. ^[43]

^[31] Paris M. et al., (1981), Abrégé de matière médicale (pharmacognosie), Tome 1, Masson, Paris.

^[32] Jens A., Pedersen., (2000), Distribution and taxonomie implication of phynolics in the family Lamiaceae determined byesr spectroscopy, Biochemical systematics and ecology, 28, 229-253, .

^[33] Stoll A., Renw J., Brack A., (1950), Isolierung und konstitution des echinacosids, eines glykosods aus denwurzeln von *Echinacea angustifolia* D. C. Helv. Chim.Acta 33, 1877-1893.

^[34] Endo, K., takahashi, K., Abe T., Hikino H., (1982), Structure of forsythoside B, an antibacterial principale of forsythiakoreana stems, Heterocycles 19,261-264.

^[35] Naticp A. R. HATAM, Andea and Karlheinz Seifert.,(1995) Polyodonine, a prefuranic labdane diterpene from *Marrubium polydon*, Phytochemistry, Vol 40, N°5, pp 1575-1576, .

^[36] Zadororhny Q. M., Zapesochnaya G. G., Pervykh L. N., Shehavlinsky A. N., Kovtum L. S., Svanidze N. V., (1986), Investigation of the herb Aervalanata I. O-acylglycosides of flavonoids, Khimiko- Farmatsevticheskii Zhurnal 20, 855-858.

^[37] Savona G., Bruno M., and Rodriguez B., (1984), Phytochemistry 23, 191.

^[38] Frang J. M., Wang K. C., and Cheng Y. S., (1991), Phytochemistry 30, 3383.

^[39] Rao L. J. M., Kumari G. N. K., and Rao N. S. P. j., (1985), Nat, Prod. 48, 150.

^[40] G. S. Çitagli F. Aksit.,(2002), Occurrence of Marrubilin and ladanein in *marrubium trachyticum boiss*, from turkey, Biochemical systematics and ecology 30, 885-886.

***Activités antimicrobienne et antiparasitaire** : les terpènes ou les terpénoïdes ont des effets contre les bactéries, les mycètes, les virus et les protozoaires. En 1977 a été signalé que 60% des dérivés des huiles essentielles examinés jusqu'au 1999 sont inhibiteurs de mycètes tandis que 30% inhibent les bactéries. Le triterpénoïde, l'acide betulinique est de juste un de plusieurs terpénoïdes qui ont montrés une action inhibitrice envers HIV. Le mécanisme de l'action des terpènes n'est pas entièrement compris mais on pense qu'il s'agit de la rupture de la membrane par les composés lipophiles. ^[44]

Les glycosides terpéniques montrent plusieurs effets biologiques, ceci a été confirmé par un certain nombre de travaux. Tomoyuki F et collaborateurs (1995) ont montré dans une étude portant sur un monoterpène glucoside, perilloside A-D (Fig. I.15), obtenus à partir des feuilles de *Perilla frutescens*, que ces composés ont un effet inhibitrice sur les enzymes telles que l'aldose reductase, qui est considéré une enzyme principale dans des complications diabétiques telles que la cataracte. ^[45]

D'autres travaux ont montré l'effet cholagogue de terpinéol, Johji Yamahara et collaborateurs ont synthétisés deux glucosides monoterpinoïdes dont les structures sont basées sur ceux des produits naturels : α -terpinéol- β -D-O-glucopyranoside (TG) et α -terpinéol-2, 3, 4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranoside (TAG). Le TG administré par la voie orale chez les rats a montré un effet cholagogue significatif (facilite l'évacuation de la bile), alors que le TAG montrait peu d'effet. ^[46]

^[41] Z. Bahernik, M. Mirza and F. Shahmir., (2004), Essential oil of *Marrubium cuneatum* Russell and its secretory element, Flavour fragr J. 19, 233-235.

^[42] Diamanto M. L., Helen D. S., Theophanis C., (1999), Essential oil of *Marrubium velutinum* Sm, and *Marrubium peregrinum* L., growing wild in Greece, flavour fragr J., 14, 290-292.

^[43] Françoise M. N., Sever S., Abdelmajid K., Marie C. J. C., Patrik D. and François B., (2004), Natural phenylpropanoids inhibit lipoprotein, induced endothelin-1 secretion by endothelial cells. JJP, 56/1607-1611.

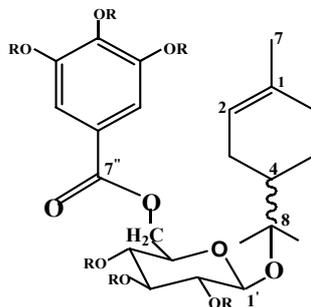
^[44] Cowan M. M., (1999), plant products as antimicrobial agent, clinical microbiology reviews, 12 (4), 564-582.

^[45] Tomoyuki F., Kumiki O., Kazutaka M., Yoshihisa N., and Mitsuru N., (1995), Inhibitory effect of perillosides A and C, and related monoterpene glucosides on aldose reductase and their structure activity relationships, chem. Pharm. Bull., Vol 43, N°6, PP 920-926.

^[46] Johji Y., Hitoshi K., Masaaki K., Toshihiro O., Tokunosuke S., Hajim F., and Takeshi C., (1985), Cholagogic action and characteristics of (+)- α -terpineol- β -D-O-glucopyranoside, a new monoterpene glucoside, chem. Pharm. Bull., Vol33, N°4, pp. 1669-1675.

1.8. Caractérisation des terpinéols isolés à partir de quelques plantes :

- *Pimenta dioica* (Myrtaceae) : [47]

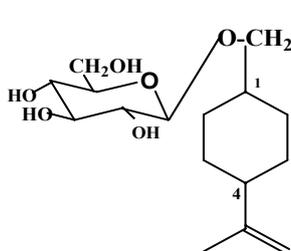


1: R=H (4S)- α -terpinéol 8-O- β -D - (6-O- galloyl) glucopyranoside

1a: R=Ac

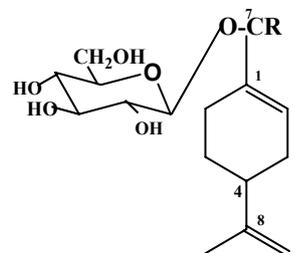
2: R= H (4R) - α -terpinéol 8-O- β -D - (6-O- galloyl) glucopyranoside

- *Perilla frutescens* : [45]



A : 1,4-trans

B : 1,4-cis

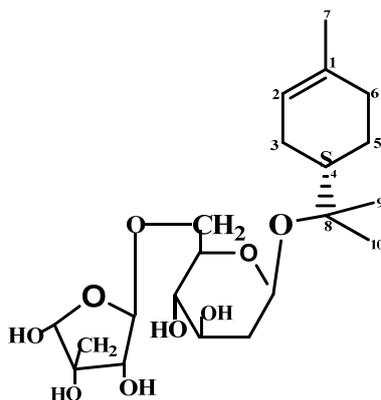


C : R=H, H

D : R=O

Fig. I. 15 : Structure des perillosides A-D

- *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) : [48]

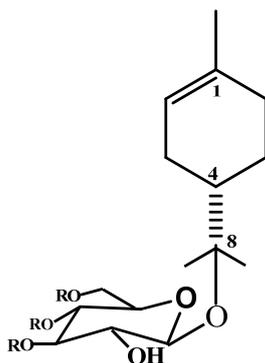


(4S)- α -Terpinéol O- β -D-Apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside

[47] Hiroe k., Akeni S., Yoko M. and Nobuji Nkatani., (2000), Galloylglucosides from berries of *pimenta dioica*, J. Nat. Prod., Vol.63, pp. 749-752.

[48] Yoshimi N., Tsutomu W., and Tadataka N., (2002), Studies on the constituents from the serial part of *baccharis dracunculifolia* DC-II, chem. Pharm. Bull., Vol 50, N°5, PP. 583-589.

- *Roldana angulifolia* (Asteraceae) : [49]



R=Ac , R=H

(4S)- α -Terpinéol 3', 4', 6'-triacetylglucoside

I.9. Conclusion:

Après cette étude sur les terpènes et spécialement les terpinéols, nous avons remarqué que cette molécule a une importance très claire chez la plupart des organismes notamment en tant qu'un précurseur. Ceci peut faire l'objet de plusieurs travaux de différentes disciplines scientifiques en utilisant les méthodes les plus fiables pour l'extraction et la purification de ces terpènes, ainsi que les doses et les modalités de leur addition aux médicaments et aux aliments.

[49] Amira A., Ana-L.pérez-castarina., José Luis V., and Alfonso R., (2006), Cacalol Derivatives from *Roldana angulifolia*, J.Nat.Prod., Vol. 69, PP. 1826-1829.

Chapitre II :
Généralité sur les huiles
Essentielles

II.1. Introduction :

Les essences parfumées connue dès l'origine des civilisations, furent d'abord utilisées à des usages sacrés. Rites funéraires, embaumement des morts, onctions des élus, sacrifices aromatiques aux ancêtres et aux divinités apparaissent comme une constante de monde antique, de la Chine à la Perse et de l'Arabie à la Grèce. ^[50] Parallèlement, on retrouve l'utilisation des végétaux dans les pratiques thérapeutiques de ces diverses civilisations, selon différents stades évolutifs liés à leur utilisation. ^[51]

Les plantes, tout d'abord utilisées fraîches après la cueillette dans l'alimentation, sont séchées pour être conservées plus longtemps. Elles sont ainsi consommées en décoctions et en infusions et utilisées dans les formules de bains thérapeutiques. Puis les plantes odorantes sont brûlées en fumigation, mises à macérer dans des huiles végétales. A cette époque apparaît la notion d'activité liée au pouvoir odorant des végétaux, car ils ont la vertu de traiter le corps et l'esprit. La recherche de moyens d'extraire ces principes odorants aboutit à l'invention de la distillation en Perse, entre 5 000 ans (découverte du premier alambic en terre cuite) et 1 000 ans avant notre ère. Le terme d'huile essentielle, encore utilisé de nos jours est lié au développement et au perfectionnement de ce procédé.

II.2. Définition :

Les huiles essentielles sont des mélanges de composés aromatiques des plantes, qui sont extraites par distillation, par la vapeur ou des solvants. ^[52]

Pour la 8^e édition de la pharmacopée française (1965), les huiles essentielles (essences = huiles volatiles) sont : « *des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation.* ». ^[17]

La norme française AFNOR NF T75-006 (1980) définit l'huile essentielle comme « *un produit obtenu à partir d'une matière végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par hydrodistillation.* ». ^[7]

^[50] Blanc-Mouchet, J., Ed. (1987). Odeur. L'essence d'un sens. Autrement. Ed, Paris.

^[51] Franchomme P., D. Penoël, et al. (1990), Clefs pour l'aromathérapie. La molécule aromatique ; matière, énergie, information. L'aromathérapie exactement. R.J., Editeur, Limoger.2. (73-227).

^[52] Smallfeild B., (2001), Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. Crops & Food research, Number 45,4p

Les huiles essentielles forment dans un grand nombre de plantes comme sous produits du métabolisme secondaire. Les huiles essentielles sont des composés liquides très complexes. Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et on donne naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie.

Au point de vue chimique, il s'agit de mélanges extrêmement complexes. Elles sont constituées de différents composants : terpènes, esters, cétones, phénols et d'autres éléments.

Les HE doivent leur nom à ce qu'elles sont très réfringentes, hydrophobe et lipophiles. Elles ne sont que très peu solubles ou pas du tout dans l'eau et on les retrouve dans le protoplasme sous forme d'émulsion plus ou moins stable qui tend à se collecter en gouttelettes de grosse taille. Par contre, elles sont solubles dans les solvants des lipides (acétone, sulfure de carbone, chloroforme, etc.....) et, à l'inverse des glycérides, dans l'alcool.

Mais à ces caractères de solubilité se limite la ressemblance avec les huiles grasses. Si les HE forment une tache transparente sur le papier, celle-ci disparaît rapidement car les essences végétales sont très volatiles (contrairement aux résines qui, habituellement dissoutes dans les essences, laissent un résidu visqueux ou solide après évaporation des essences).

Grâce à cette propriété, les essences végétales diffusent rapidement au travers des épidermes, même au travers des cuticules épaisses et se répandent dans l'atmosphère. Ce caractère, associé à la propriété qu'ont la plupart des essences végétales de posséder une odeur très prononcée, et souvent agréable, les rend responsables de l'odeur caractéristique de nombreux végétaux odoriférants.^[17]

II.3. L'origine des huiles essentielles :

Les plantes vertes puisent l'eau du sol et utilise l'énergie solaire et le gaz carbonique présent dans l'air pour synthétiser les glucides, ce processus est appelé photosynthèse, il se déroule au niveau des feuilles, plus précisément au niveau des chloroplastes qui renferment la chlorophylle, les produits issus de la photosynthèse (glucides, NADPH, ATP) constituent une source d'énergie. Ils contribuent à la génération de nouvelles cellules, ils interviennent indirectement dans la biosynthèse de divers composés secondaires tels que les lipides, les hétérosides et les essences (Fig. II. 1). Ainsi les huiles essentielles font partie des résidus du métabolisme végétal. [7]

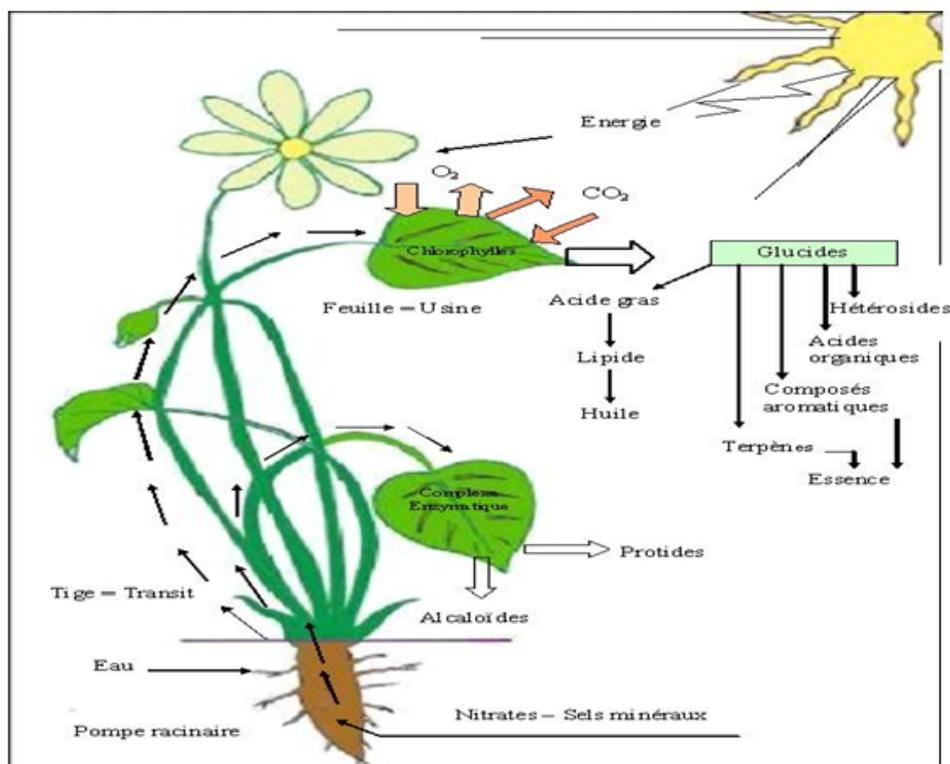


Fig. II. 1 : Usine végétale [7]

II.4. Répartition botanique :

Tous les êtres vivants ont un métabolisme primaire qui fournit les molécules de base. Entre autre, il existe aussi un métabolisme dit secondaire, chez les plantes : c'est une exclusivité du monde végétal. ^[53]

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs : il y aurait, selon Lawrence, 17500 espèces aromatique. Les genres capables d'élaborer les constituants qui composent les huiles essentielles sont répartis dans un nombre limité de familles, exemple : Myrtacées, Lauracées, Rutacées, Lamiacées, Astéracées, Apiacées, Cupressacées, Poacées, Zingibéracées, Pipéracées, etc.... ^[7]

L'huile essentielle peut avoir aussi une origine animale annoncent Frant et Damelio (1999) et donnent l'exemple de celle rencontrée dans le foie de poisson. ^[54]

II.5. Localisation et lieu de synthèse :

Pour Guignard et al., (1985), il n'existe pas de règle générale concernant les lieux d'accumulation des métabolites secondaires telles que les huiles essentielles, dans l'organisme végétal. Par contre, pour Garneau (2004), la plupart des huiles essentielles se retrouvent dans des glandes (fig.II.2 et fig.II.3). Les structures glandulaires et les cellules sécrétrices isolées peuvent se rencontrer dans tous les organes végétaux, végétatifs et reproducteurs. Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une même espèce, voir dans un même organe. ^[6]

Les structures anatomiques spécifiques spécialisées dans la sécrétion des huiles essentielles sont très diverses : ^[7] Cellules sécrétrices isolées (des Lauracées ou des Zingibéracées) poils sécréteurs (des Lamiacées, des Astéracées, des Geramiacées ou des Verbenacées), poches sécrétrices schizogènes ou schizolysigènes (des Myrtacées et des Rutacées) et des canaux sécréteurs (des Apiacées, des Asteracées et des Abitacées). ^[15]

^[53] Fouché J. G., Marquet A. et Hambuchers A., (2000), Les plantes médicinales, de la plante au médicament, Observatoire du monde des plantes Sart-Tilman.

^[54] Frank S. D., Amelio Sr., Botanicals D., (1990), A phytocosmetic desk reference C.R.C., Press Boca Raton, London.

Les trichomes glandulaires sont les sites primaires de la biosynthèse d'huiles essentielles, et les plantes qui manquent de telles structures spécialisées synthétisent et amassent seulement des traces des monoterpènes. En conséquence, la dynamique du développement de ces structures ainsi que le processus sécréteur d'huile et le mécanisme ont une incidence directe avec la production de l'huile et le potentiel du système producteur. [55]

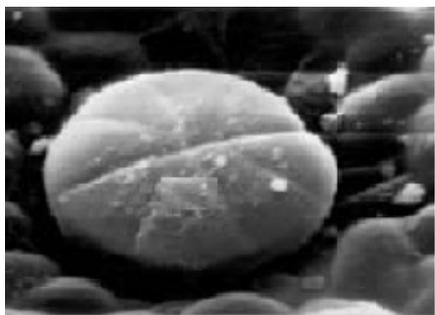


Fig. II.2 : Glande simple, entièrement chargée calice d'une huile en forme de dôme [55]



Fig. II.3 : Les poils épidermiques sur le fleur d'un origan [57]

II.6. Rôle physiologique :

Beaucoup de plantes produisent les huiles essentielles en tant que métabolismes secondaires, mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante est inconnu. [56]

Il y a beaucoup de spéculation au sujet du " rôle " d'huiles essentielles des plantes. Certainement plusieurs effets apparents "utiles" ont été décrits : réduction de la compétition des autres espèces de plante (allélopathie) par inhibition chimique de la germination des graines, et protection contre la flore microbienne infectieuse par les propriétés fongicides et bactéricides, et contre les herbivores par goût et effets défavorables sur le système nerveux. [57]

Certains auteurs pensent que la plante utilise l'huile pour repousser ou attirer les insectes, dans ce dernier cas, pour favoriser la pollinisation. D'autres considèrent l'huile comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques, conservent l'humidité des plantes dans les climats désertiques. [21]

Pour quelques auteurs, les huiles essentielles pourraient constituer des supports à une communication et ce d'autant mieux que leur variété structurale autorise le transfert de messages biologiques sélectifs. [7]

[55] Sharm .A.S., Sanwan N.S. et Sangwan R.S.,(2003), Developmental process of essential oil glandular trichome collopsingin menthol mint, Current science, 84(4-25), 544-550.

[56] Rai M.K., Acharya D. et Wadegaonkar P., (2003), Plant derived antimycartics ; potential of a astreraceous plants, current trends and future prospects, Haworth press, N-York, Londin, Oxford,165-185.

[57] Porter N. ,(2001), Essential oils and their production, Crop & food Research. Number 39.

II.7. Propriétés physiques et chimiques des huiles essentielles :

Malgré leurs différences de constituants, les huiles essentielles possèdent en commun un certain nombre de propriétés physiques : ^[7]

- Liquide à température ambiante (ordinaire).
- Elles sont généralement incolores ou jaune pâle quand elles viennent d'être préparées.
- Leur densité est généralement inférieure à 1.
- Les huiles essentielles sont volatiles, elles s'opposent par ce caractère aux huiles fixes. A cette volatilité sont liés leurs caractères odorants et la possibilité de les obtenir par entraînement à la vapeur d'eau.
- Elles possèdent un indice de réfraction souvent élevé et sont douées d'un pouvoir rotatoire.
- Peu solubles dans l'eau, elles lui communiquent cependant leur odeur (eaux distillées aromatiques appelées aussi eaux distillées florales ; elles sont solubles dans les alcools de titre élevé (différence avec les lipides) ; solubles dans les huiles fixes « liposoluble » et dans la plupart des solvants organiques.
- Elles sont très altérables, sensibles à l'oxydation (mais ne rancissent pas). Elles ont tendance à se polymériser en donnant lieu à la formation de produits résineux, ce qui conduit à la modification de leur odeur, leur point d'ébullition augmente. Elles sont donc de conservation limitée.

II.8. Les facteurs influençant la composition :

La présence ou l'absence de certains constituants dans la plante dépend de l'un ou de la combinaison de trois facteurs, qui sont le patrimoine génétique, l'âge et l'environnement de la plante. En effet, l'influence des facteurs environnementaux, comme la température, l'humidité, l'altitude et latitude, la nature du sol sur la composition chimique et le rendement des huiles essentielles a été décrite. ^[58]

Certains auteurs se sont préoccupés d'autres facteurs tels que le cycle végétatif, l'âge et l'organe végétal, la période de récolte qui influent sur le rendement et la composition chimique des huiles essentielles.

^[58] Kebissi H., (2004), Encyclopédie des herbes et plantes médicinales, Dar Al-Kotob Al-iliyah, Beyrouth-Liban.

Le contrôle génétique, l'impact de l'hybridation et du sens de croisement semblent affecter la teneur et la composition chimique d'HE.

Le rendement et la composition chimique des HE varient en fonction de la méthode d'extraction. Les méthodes de séchage n'ont aucun effet par contre la durée affecte aussi bien le rendement que la composition. ^[59]

- **Chémotype :**

La composition chimique de l'huile essentielle de certaines plantes peut varier à l'intérieur d'une même espèce. En effet, une même plante aromatique, botaniquement définie, synthétise une essence qui sera biochimiquement différente en fonction du biotope dans lequel elle se développera ; ces variétés chimiques sont communément appelées chémotypes.

Biochimiquement différent, deux chémotypes présenteront non seulement des activités thérapeutiques différentes mais aussi des toxicités très variables ^[60]. Selon Lydie (2002) le chémotype d'une huile essentielle ne signifie pas pour autant que le constituant chimique précisé est fortement majoritaire. Il peut être seulement à un faible taux, mais sa seule présence justifie une indication thérapeutique précise. On voit selon Bruneton (1999) l'importance qu'il y a, pour assurer la qualité du produit et sa constance, à étudier, définir, et contrôler l'ensemble des paramètres, de la culture à l'élaboration du produit final. Toute généralisation s'avère hasardeuse.

II.9. Composition chimique des huiles essentielles :

Comme toute substance, les huiles essentielles se caractérisent par une composition chimique analysable et très variable. Le nombre de composants isolés au sein des huiles essentielles est d'environ un millier et il en reste beaucoup à découvrir. ^[21]

La plupart sont poly-moléculaires, c'est-à-dire composés d'une grande diversité de composés. A côté des composés majoritaires (entre 2 et 6 généralement), on retrouve des composés minoritaires et un certain nombre de constituants sous forme de traces. Il existe quelques huiles dites mono-moléculaires, tel le bois de Rose (*Aniba rosaeodora*), la Menthe pouliot (*Mentha pulegium*) qui sont constituées presque exclusivement d'une molécule majoritaire. D'autres molécules sont bi et tri-moléculaires.

^[59] C.Durffourd, d'hervicourt L. et Lapraz J.C., (1990), Cahier de phytothérapie. Clinique, examen de laboratoire galénique, éléments thérapeutiques synergiques, Tome 1, 2^{ème} édition, Masson, Paris, P89.

^[60] Baudoux D., (2000), L'aromathérapie, se soigner par les huiles essentielles. Donce alternative, Dominique Baudoux Biarritz, (221).

Les huiles essentielles sont aussi homogènes ou hétérogènes dans leur composition au regard de la structure chimique des composés. Extrêmement nombreux- près de 10 000 sont chimiquement définis, on peut les grouper dans les différentes familles de composés chimiques : le groupe des terpénoïdes (les composés terpéniques) et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents. Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils. ^{[7] [61]}

II.9.1. Structure de base et sites fonctionnels :

La structure des composés des huiles essentielles est constituée d'un squelette hydrocarboné l'isoprène, constituant une chaîne plus ou moins longue. Sur ce squelette de base est souvent présent un ou plusieurs sites fonctionnels semblables ou différents. La majorité des sites fonctionnels sont des sites oxygénés avec un ou plusieurs atomes d'oxygène (O), pour quelques groupes fonctionnels azotés-N ou soufrés-S (Fig. II.4). Cette structure varie en fonction : ^[61]

- Du nombre d'atomes de carbones qui la constitue : les monoterpènes (en C₁₀), les sesquiterpènes (en C₁₅) et plus rarement diterpènes (en C₂₀)
- Du caractère saturé ou insaturé des liaisons
- De leur agencement : linéaire ou cyclique
- De la configuration spatiale (forme chaise, forme bateau,.....)
- De la nature des groupes fonctionnels : alcools terpéniques (R-OH), cétones (R₁-CO-R₂), phénols (C₆H₆-O), aldéhydes (R-CHO), esters (R₁-COO-R₂), éthers (R₁-O-R₂).

^[61] Pibiri, M. C., C. Seigniez, et al. , (2006), Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles et leurs effets sur le bien-être des occupants, Lausanne, LESO, EPFL.

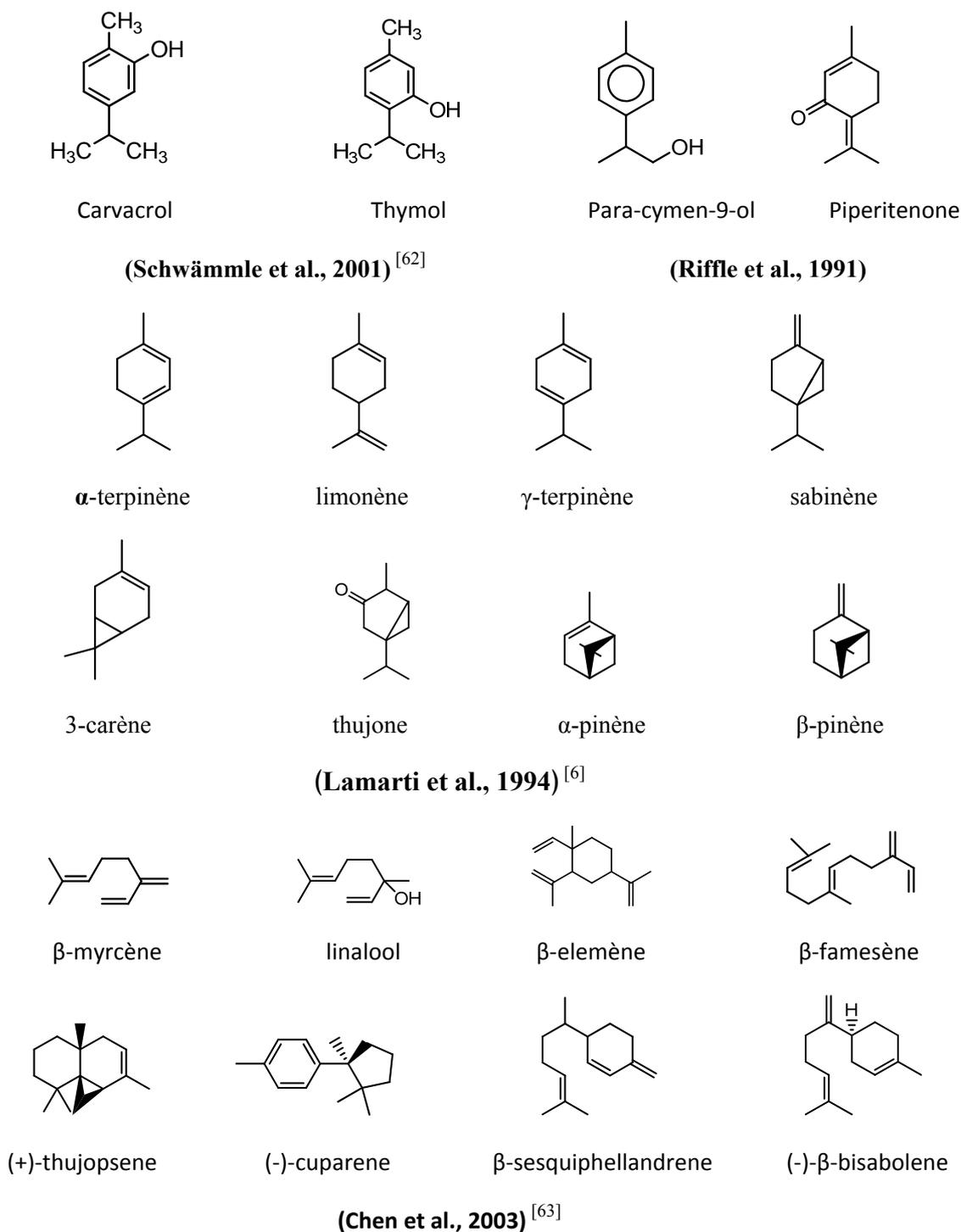


Fig. II.4 : Structures chimiques de quelques composés des huiles essentielles

^[62] Schwämmle B., Winkelhausen E., Kuzmanova S. et Steiner W. , (2001), Isolation of carvacrol assimilating microorganisms. *Biotechnol.* 39(4), 341-345.

^[63] Chen C-N, Weng M-S, Wu C-L et Lin J-K., (2004), Comparaison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis introduction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. *Ecam.* 1(2), 175-185.

II.9.2. Composés terpéniques :

Seul les terpènes dont la masse moléculaire est relativement faible (mono – et sesquiterpènes) sont rencontrés dans les huiles essentielles ^[7] et leur confère un caractère volatil et est à la base de leurs propriétés olfactives. ^[61]

II.9.3. Composés aromatiques dérivés du phénylpropane :

Les dérivés du phénylpropane ($C_6 - C_3$) sont beaucoup moins fréquents que les terpènes dans les huiles essentielles, ce sont très souvent des allyl-et propénylphénols parfois des aldéhydes. ^[7] Ils sont caractéristiques de certaines huiles essentielles d'Apiaceae (anis, fenouil, persil : anéthole, anisaldéhyde, apiol) mais aussi de celles de la girofle, de la muscade, de l'estragon, du basilic, de l'acore ou des cannelles (eugénol, safrole, asarones). On peut également et selon le même auteur, rencontrer dans les huiles essentielles des composés en $C_6 - C_1$ comme la vanilline (assez fréquente) ou l'antranilate de méthyl. Les lactones dérivées des cinnamiques (par exemple les coumarines) étant, au moins pour les plus simples d'entre elles, entraînaient par la vapeur d'eau, elles seront également présentes dans certaines huiles essentielles (fig. II.5).

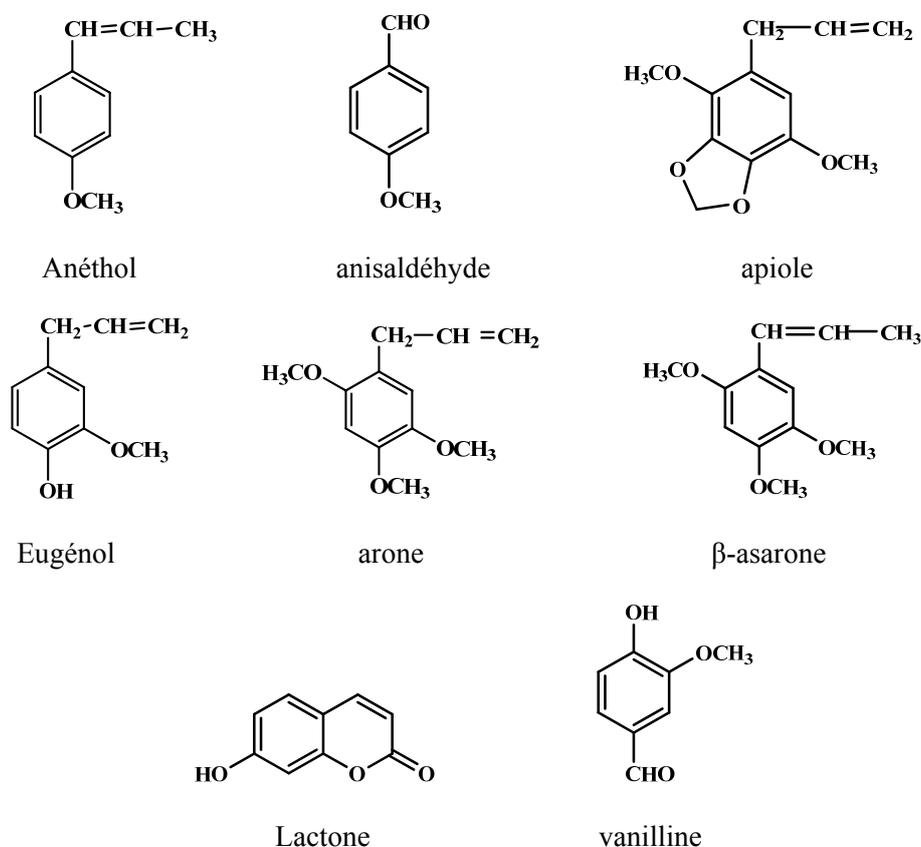


Fig. II.5 : Les différents composés aromatiques rencontrés dans les huiles essentielles

II.9.4. Composés d'origines diverses :

Ce sont des produits résultant de la transformation de molécule non volatiles entraînaibles par la vapeur d'eau. Il s'agit de composés issus de la dégradation d'acides gras, de terpènes. D'autres composés azotés ou soufrés peuvent subsister mais son rares. Enfin, il n'est pas rare de trouver dans les concrètes des produits de masse moléculaire plus importante non entraînaibles à la vapeur d'eau, mais extractibles par les solvants : homologues des phénylpropanes, diterpènes, etc.....^[7]

II.10. Procédés d'extraction des huiles essentielles :

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

- **La distillation :**

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

Il existe trois méthodes de base pour l'obtention des huiles essentielles qui repose sur le même principe : entraînement des constituants volatils du matériel végétal par la vapeur d'eau. La différence entre eux réside dans le degré de contact entre l'eau liquide et le matériel végétal.^[64]

^[64] « Parfum-L'expo », (2002) , Le monde magique du parfum, une exposition proposée par la comite français du parfum. Fondation Claude Verdan.

***Distillation à eau ou "hydrodistillation"**: La plante est mise en contact avec l'eau dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel. Le tout est ensuite porté à l'ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les HE se séparent de l'eau par différence de densité.

***Distillation à la vapeur saturée "vapo-hydrodistillation"** : Le matériel végétal, dans ce cas, n'est en contact avec l'eau, se trouve supporté par une grille ou une plaque perforée placée à une distance adéquate du fond de l'alambic, rempli d'eau. Le végétal est traversé par la vapeur d'eau saturée du bas en haut.

***Distillation à la vapeur directe "vapodistillation"** : la vapeur saturée ou surchauffée traverse la masse végétale de haut. La vapeur provient d'une chaudière indépendante. Une variante consiste à pulser de la vapeur d'eau à très faible pression à travers la masse végétale, du haut vers le bas, en utilisant la pesanteur comme force de déplacement de la vapeur ; procédé appelé distillation par hydro diffusion.

Le principe de l'entraînement à la vapeur d'eau repose sur la volatilité des molécules. Celles qui, à la température d'ébullition de l'eau (100° C), ont une pression de vapeur suffisante seront entraînées. De manière simplifiée, cette technique extraira toutes les molécules qui ont 15 atomes de carbones et moins. Le distillat contiendra les esters et les alcools légers, les monoterpènes (C₁₀) et sesquiterpènes (C₁₅), de même que quelques molécules de masses plus élevées.

Il existe aujourd'hui plusieurs méthodes d'extraction : les unes plus adéquates pour certains types de matériel végétal, pour certaines classes de produits à extraire, les autres donnant un meilleur rendement en huile. On en cite : extraction par les solvants ; extraction au supercritique ; extraction par micro-onde ; extraction par expression ; enfleurage (à froid ou à chaud).

Selon certains auteurs, il n'existe pas de procédé meilleurs que d'autres. Chaque végétal, chaque partie de végétal et l'utilisation du produit obtenu commandent la technologie à employer. Bien entendu, les aspects de rentabilité économique sont tout aussi importants.

II.11. Activités biologiques des huiles essentielles :

II.11.1. Activité antimicrobienne :

Empiriquement reconnues depuis des siècles, la confirmation scientifique de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est récente. Elle ne date que du début du siècle dernier avec les travaux du chimiste lyonnais R.M.Gattefosse, auquel on doit la dénomination : aromathérapie « thérapeutique par les huiles essentielles ». Depuis ce temps, l'utilisation des huiles essentielles s'est développée jusqu'à devenir depuis plus d'une vingtaine d'années, une sérieuse alternative à la médecine des antibiotiques dans les pathologies infectieuses.

II.11.1.1 Activité antibactérienne :

De nombreuses études traitent de l'activité antibactérienne des huiles essentielles dont les plus étudiées appartiennent à la famille des Lamiacées : *Origanum*, *Rosmarinus*, *Mentha*, *Salvia*, *Teucrium*, *Ocimum* et *Thymus*.^[65]

Si certaines études se sont focalisées sur l'étude de l'activité antibactériennes d'un seul type d'huile essentielles vis-à-vis d'un certains nombres de micro-organismes, c'est le cas par exemple de l'huile essentielles d'*Ammoides pusilla* ; celle de *Saccocalyx stureioides* Coss et Dur ou encore celle de *Salvia tomentosa* ; d'autres le sont pour un type de micro-organisme, on en cite à titre d'exemples : l'étude de l'activité antibactérienne de 60 huiles essentielles vis-à-vis *Pseudomonas putida*, autre étude qui porte sur l'activité antibactérienne de 13 huiles essentielles vis-à-vis *Hliobacter pylori*, ou encore celle qui porte sur l'activité antibactérienne de 5 huiles essentielles vis-vis *Escherichia coli*.^[66]

Ainsi en constate que plusieurs études ont été réalisées dans le but de sélectionner les huiles essentielles aux propriétés importantes. Une large gamme d'huiles et de bactéries a été testée ; et chaque année de nombreux chercheurs publient leurs résultats. Nous pouvons citer quelques un parmi ceux des récentes publications :

^[65] Kabouche Z. Boutaghane N., Laggonne S., Kabouche A., Ait Kaki, Benlabed K.,(2005), comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria , vol.15, the international journal of Aromatherapy.

^[66] Burt, S. A. et R. D. Reinders., (2003), Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O 157: H7, Letters in applied microbiology 36-3: (162-167).

M.R.Moreira et al ont utilisé plusieurs huiles essentielles extraites de nombreuses espèces aromatiques, appartenant à différentes familles : *Eucalyptus globules*, *Melaleuca alternifolia*, *Rosmarinus officinalis*, *Mentha piperita*, *Rosa moschata*, *Syzygium aromaticum*, *Citrus limonum*, *Origanum vulgare*, *pinus silvestrys* et *Ocimum basilicum*, dans un test d'antibiose contre quatre souches d'*Escherichia coli*. Les résultats de ce test ont montré que les différentes souches d'*Escherichia coli* ont présenté une sensibilité similaire vis-à-vis de l'action des huiles essentielles utilisées ; seule l'essence de clou de girofle (*Syzygium aromaticum* possède un signifiant pouvoir bactéricide bactériostatique avec une CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) = 0.25ml/100ml et une CMB (Concentration Minimale Bactéricide) = 0.30ml/100. ^[67]

Aussi l'essence obtenue par hydrodistillation de cinq espèces aromatiques appartenant à la famille des Lamiacées et poussant en Algérie : *Thymus numidicus*, *Thymus fontanesii*, *Teucrium polium subsp.aurasiacum*, *Teucrium atratum* et *Rosmarinus officinalis* ont été testé contre neufs bactéries : *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* ATCC 25922 , *klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Samonella typhimurium*, *Serratia marcescens* et *Staphylococcus aureus* ATCC. Seule l'huile essentielle de *Thymus numidicus* a exhibée une forte action antibactérienne et une CMI inférieure à 0.016µg/ml pour toutes les bactéries. ^[65]

Toute en restant au niveau du territoire algérien, Bencheikh H. a étudié l'activité antimicrobienne in vitro, des huiles essentielles de *Thymus fontanesii* (le thym) et de *Foeniculum vulgare* (les graines de fenouil) contre quinze bactéries : *Escherichia coli* ATCC 259252, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginose* ATCC 17853, *Pseudomonas aeruginose*, *Enterobacter eloacae*, *Haemophilus influenza*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus multirésistant*, *Streptococcus D*, *Streptococcus pneumoniae*) et trois champignons (*Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*) ; en employant différentes méthodes : la méthode de disque, la méthode de dilution et la méthode de microatmosphère, les résultats du test ont montré que

^[67] Moreina M. R., Ponce A. G., del valle C. E., Roura S. I., (2005) , Inhibitory parameters of essential oils to reduce foodborne pathogen , Vol. 38, LWT.

l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* possède un spectre d'action très large sur les bactéries Gram + et Gram - ainsi que sur les levures et les moisissures. En revanche, l'huile essentielle de *Foeniculum vulgare* est complètement inactive vis-à-vis des germes utilisés. [68]

Benmansour N. (2001) a également contribué à l'évaluation du pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de l'armoise blanche (*Artemisia herba alba*), c'est une plante, très abondante en Algérie, qui a été récoltée à partir de cinq stations différentes : Benisaf, Hammam Boughrar, Sebdou, Ain Sefra et Laghouat. Le test a révélé que toutes les souches microbiennes sont sensibles à l'action inhibitrice des HE des cinq stations, par ailleurs celle de la station de Laghouat était la plus active par rapport aux autres, cela est dû à sa localisation présaharienne, caractérisée par des critères édaphiques et climatiques particuliers, influant la composition chimique de l'essence qui est particulièrement riche en monoterpènes cétonique : α -thuyone, Camphre. [69]

Pour le genre *Mentha*, l'huile essentielle de *Mentha suaveoleus* et ses principaux composants aromatique (pulégone, l'oxyde de pipériténone et l'oxyde de pipéritone), ont fait l'objet d'une étude dont le but de déterminer leurs activités antimicrobiennes vis-à-vis de 11 bactéries, Gram+ et Gram-, et trois champignons. La pulégone a été enregistrée une efficacité contre tous les germes testés. [70]

Activité liée à la composition chimique :

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et les possibles effets synergiques entre les composants. Ainsi la nature des structures chimiques qui la constituent, mais aussi leurs proportions jouent un rôle déterminant.

[68] Bencheikh H., (2004), contribution à l'étude de la composition chimique, de l'activité antimicrobienne et de la cytotoxicité des huiles essentielles de *Thymus fontanesii* Boiss. et Rent et de *Foeniculum vulgare* Miller, Thèse de magistère, université Ferhat Abbas-Sétif (U.F.A.S.), Sétif.

[69] Benmansour N., (2001) , Contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* de différentes régions d'Algérie , Thèse de magistère, U.S.T.H.B, Alger.

[70] Omzil H., Ghouami S., Rhajaoui M., Fkih-tetouni S., Faid M. and Benjouad A., (2002), Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveoleus*, vol.16, phytoterapy Research.

L'activité des HE est souvent réduite à l'activité de ses composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. Evalués séparément sous la forme de composés synthétiques, ils confirment ou infirment l'activité de l'huile essentielle de composition semblable. Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent de manière synergique. De cette manière, la valeur d'une huile essentielle tient à son « totum », c'est-à-dire dans l'intégralité de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires. ^[71]

Les molécules réputées actives sont des terpénoïdes, car les hydrocarbures saturés et les acétates ioniques sont inactifs, par la nature même de leur faible capacité de liaisons hydrogène et leur faible solubilité. ^[72] L'effet des terpénoïdes sur des membranes bactériennes isolées suggère que leur activité est fonction des propriétés lipophiles des constituants terpéniques, la nature des groupes fonctionnels, leur solubilité en phase aqueuse et la stéréochimie de la molécule. ^[73]

Les composés chimiques de plus grande efficacité et à plus large spectre sont des phénols (thymol, carvacrol et eugénol), des alcools (α -terpineol, terpinen-4-ol, linalol), des aldéhydes, des cétones et plus rarement des terpènes. ^[73] Les principaux terpénoïdes actifs sont décrits ci-dessous (fig.II.6).

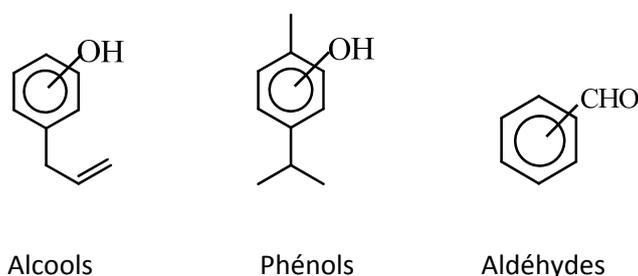


Fig. II.6 : Structure générale des principaux agents antimicrobiens

^[71] Lahlou, M., (2004), Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils, *Phytotherapy research* 18- (435-448).

^[72] Griffin, S.G., S.G. Wyllie et al., (1999) , The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity, *Flavour and fragrance journal* 14-(322-332).

^[73] Dorman, H.J.D et S.G. Deans (2000) « Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils » *Journal of applied microbiology* 88-2: (308-316).

II.11.1.2 Activité antifongique :

Le pouvoir antifongique des sécrétions végétales a fait l'objet de nombreuses études in vitro. Ainsi, les travaux qui visent la mise en évidence de ce pouvoir n'ont pas cessé, et chaque année de nombreux chercheurs publient leurs résultats. En voici une synthèse de quelques unes :

D'après Belghazi et al (2002), l'huile essentielle de *Mentha pulegium* L. est dotée d'un fort pouvoir antifongique vis-à-vis de deux champignons le *Penicillium* et le *Mucor*, ce dernier forme les moisissures blanches à sporanges foncés sur le pain humide et autre, pouvant aussi entraîner l'avortement infectieux chez la vache. La quantité minimale fongicide déterminée était de 20µl. [74]

Une année plus tard B.Chebli et al (2003) ont testé in vitro l'activité antifongique de l'huile essentielle de sept labiacées contre *Botrytis cinerea* (Pourriture noble) qui est phytopathogène, causant beaucoup de dommages à différentes productions telles que les fruits, les légumes et même au niveau des espèces ornementales, cela, avant et après leur récoltes.

L'huile essentielle de la menthe et la pulégone ont présenté une activité antifongique modeste avec une $CL_{50}=233.5$ ppm par rapport à *Origanum compactum* et *Thymus glandulosus* qui avaient des CL_{50} respectivement égales à 35.1 et 79.2 ppm. [75]

Au cours de la même année des travaux ont intéressé l'activité antifongique et Antibactérienne de huit plantes aromatiques contre deux champignons *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* var *Coeruleum*, agents causant la pourriture des tubercules de pomme de terre et une bactérie *Clavibacter michiganensis* responsable du chancre bactérien chez la tomate ; les plantes en question sont : *Origanum vulgare*, *Thymus capitatus*, *Origanum tictamnus*, *Origanum majorana*, *Lavandula angustifolia*, *Rosemarinus officinalis*, *Salvia fruticosa* et *Mentha pulegium* ; les quatre premières ont inhibé complètement la croissance des microbes à des concentrations comprises entre 85-300µg/ml alors que pour les quatre dernières la croissance microbienne est affectée seulement à des concentrations supérieures à 1000 µg / ml. [76]

[74] Belghazi L., Lahlou N., Alaoui Ismaili M., Aboussaouira T., Habati N., Tantaoui Iraki A., Talbi M., Blaghen M., Fellat. Zarrook K., (2002), Extraction et analyse par chromatographie en phase gazeuse de l'huile essentielle de la Menthe pouliot test antifongique, Biochimie et santé.

[75] Chebli Bouchra, M. chouri, L.M.Idrissi Hassani, M.^{ed} Hamamouchi., (2003), Chemical composition and antifungal activity of essential oils of sever Moroccan labiotae against botnytes cinerea pers-Fr, Vol.89, Journal of Ethnopharmacology.

[76] Daferera D.J., Zioga B.N., Polissiou M.G., (2003) ,The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cineres*, *Fusarium* sp. And *Clavibacter michiganensis*», Vol.22, Grop protection

II.11.2 Mode d'action des huiles essentielles :

Peu d'études portent sur le mode d'action des HE vis-à-vis des microorganismes, cependant plusieurs observations ont été notées :

En général les huiles essentielles empêchent la multiplication, la sporulation et la synthèse des toxines des bactéries. Sur les levures, elles agissent sur la biomasse et la production du pseudomycélium. Sur les moisissures, elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium et la toxicogénèse.

Aussi d'autres auteurs rapportent que les huiles essentielles semblent posséder plusieurs modes d'action sur les différents microorganismes. Elles peuvent agir selon plusieurs mécanismes :

- Altération de la fonction et de la structure de la membrane cytoplasmique.
- Inhibition de la respiration oxydative.^[77]
- Interférence avec le métabolisme cellulaire.^[44]
- Altération des différents systèmes enzymatiques.
- Destruction ou inactivation du matériel génétique.^[78]

II.11.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles :

D'une part l'insolubilité des huiles essentielles dans l'eau et d'une manière générale dans les milieux aqueux largement utilisés en microbiologie, est une explication de la variété des techniques.^[79] D'autre part elle pose un problème de diffusion et d'homogénéité de dispersion.^[71]

Hulin et al. (1998) décrivent les principales techniques de détermination de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles :

^[77] Cox, S.D., C.M. Mann, et al. , (2000) , The mode of antimicrobiol of the essential oils of Melaleuca alternifolia tea tree oil, Journal of applied microbiology, 88-1,170-175).

^[78] Hulin V., Mathol A.G., Mafart P. et Dufosse L., (1998), Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arôme, Vol.18, science des aliments, pp 563-582.

^[79] Zaika, L.L., (1988), Spices and herbs-their antimicrobial activity and its determination, journal of food safety 9-2: (97-118).

II.11.3.1 Techniques par contact direct :

Elles consistent à mettre en présence l'huile essentielle et les micro-organismes, puis à observer la croissance de ces derniers. Elle permet de tester l'huile dans sa globalité. Le contact peut avoir lieu en milieu gélosé ou liquide. Dans cette catégorie, l'une des variantes est l'aromatogramme.

II.11.3.2 Technique de micro atmosphère :

Dérivé de la méthode précédente, le protocole des micro atmosphères est techniquement proche de celle des aromagrammes. Cette méthode ne quantifie pas l'activité antimicrobienne réelle de l'huile essentielle. Elle montre seulement l'activité des constituants volatils à la température d'incubation. ^[78] Lahlou et al (2004) mettent l'accent sur les paramètres et les facteurs à prendre en considération lors de l'étude de l'activité biologique et pharmaceutique des huiles essentielles et de leurs constituants : la partie de la plante utilisée (feuille, fleur, graine...), l'influence du solvant/détergent, la méthode employée (plus température d'incubation, pH et temps d'exposition), matériel végétal (espèce) et les caractéristiques physiques et chimiques de son huile essentielle (hydrophobicité, volatilité, compatibilité dans le système testé), le micro-organisme testé (dimension de l'inoculum, genre bactérien,...), dose et concentration des huiles essentielles. ^[71]

II.12. Toxicité des huiles essentielles :

Les substances naturelles peuvent présenter des effets néfastes pour l'homme au même titre que certaines substances synthétiques. Certain auteurs ^{[80] [81]} se basent sur la composition des huiles essentielles et les toxicités relatives des familles biochimiques auxquelles elles appartiennent. ^{[80] [81]} Les HE contenant surtout des phénols et des aldéhydes comme : La menthe, Clou de girofle, Thym à thymol, peuvent irriter, les yeux et les muqueuses. De plus certaines HE peuvent provoquer des réactions cutanées allergiques, c'est en particulier le cas des HE de la cannelle de Ceylan, la menthe, le pin. Les réactions de la maladie sont variées et peuvent apparaître jusqu'à trois jours après le contact du produit avec la peau. Ils vont de la simple démangeaison à l'eczéma allergique en passant par des plaques.

^[80] Franchomme, P., D. Pénéol, et al. , (1990), Matière médicale aromatique fondamentale. L'aromathérapie exactement. R. J. Editeur. Limoges. 4- (317-446).

^[81] Mailhebiau, P., (1994), La nouvelle aromathérapie: biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs. Lausanne, (635).

En règle générale, les HE d'usage commun ont une toxicité par voie orale faible ou très faible avec des DL_{50} supérieure à 5g/Kg. En ce qui concerne la Sarrette et l'Origan la toxicité est un plus élevée autour des 1.4g/Kg (données observée chez l'animal).^[9]

Chez l'homme des intoxications aiguës sont possible. Les accidents graves, le plus souvent observés chez les petits enfants, sont provoqués par l'ingestion en quantité importante d'HE : Girofle (eugénol), Eucalyptus, Gaulthérie (salicylate de méthyle).

La proportion de la population développant des allergies cutanées dues au parfum est en augmentation car l'utilisation de parfums et de produits parfumés ne cesse d'augmenter. Les HE qui sont utilisées en parfumerie peuvent irriter les muqueuses respiratoires et favoriser le déclenchement de crises d'asthmes pour les asthmatiques.^[82]

Certaines HE comme celui du Citron, l'orange amère deviennent sensibilisantes et toxiques seulement sous l'influence de la lumière. De plus, les HE contenant des phénols sont toxiques pour le foie (clou de girofle, thym, origan). Les cétones et dans une moindre mesure les lactones sont neurotoxiques (romarin, camphre, thuya). Ainsi que l'évaporation à chaud d'huile essentielle peut libérer des substances de combustion, des poussières fines, du formaldéhyde et d'autres substances volatiles qui peuvent solliciter les voies respiratoires.^[83]

C'est pour cela, l'organisation professionnelle internationale à édicter des recommandations sur les HE concernant leur utilisation et / ou celle de leurs constituants (concentrations maximales, évictions, formulations particulières).^[7]

II.13. Propriétés et utilisation des huiles essentielles :

Les HE contenues dans les herbes aromatiques sont responsables des différentes senteurs que dégagent les plantes. Elles ne sont pas forcément des produits finaux dans la mesure où, une fois produites, elles peuvent servir d'intrants à la fabrication de plusieurs produits. Les HE trouvent des emplois dans trois secteurs principaux :

[82] Elberling J., Skov PS. Increased release of histamine in patients with respiratory symptoms related to perfume, *Clin exp allergy*-2007 Nov. 37 (11): 1676-80.

[83] Jean-Pierre Willem, (2006)., Les huiles essentielles: Médecine d'avenir, Edition du Dau phin.

***Secteur parfumerie :**

L'utilisation des HE comme base dans la fabrication de parfums constitue une pratique courante depuis des siècles dans la plupart des civilisations. L'Europe et les Etats-Unis ont développé des industries importantes qui se démarquent par leur haut niveau d'exportation dans ce domaine. La consommation d'huiles dans ce secteur se caractérise par le besoin d'une très grande variété de produits, de quantités relativement faibles et de prix souvent élevés. Les produits d'entretien ménager domestiques ou industriels ont également recours aux huiles essentielles pour l'image de propreté à laquelle elles sont associées, mais aussi parfois pour leurs propriétés antiseptiques. Dans ce secteur, l'industrie consomme de grandes quantités d'huiles, au meilleur prix possible, car l'industrie désire garder le prix de revient de son produit au minimum. ^[31]

***Secteur alimentaire :**

L'industrie alimentaire utilise les huiles essentielles pour rehausser le goût des aliments, pour parfumer et colorer. Depuis le début des années quatre-vingt, la part du naturel dans l'aromatization des produits alimentaires ne cesse de croître aux dépens des compositions aromatique de synthèse. A côté des dérivés de transformation des fruits, les huiles essentielles ont vraisemblablement encore une marge de progression prévisible des produits néonaturels (produits de fermentation et de bioconversion) ^[7]. Dans ce secteur, les volumes d'huiles essentielles peuvent être très importants. L'huile la plus utilisée dans le monde est l'huile essentielle d'orange.

***Secteur médical :**

Les applications thérapeutiques des huiles essentielles sont vastes. Elles requièrent de bonnes connaissances de ces substances et du fonctionnement du corps humains. Les huiles à utilisation médicinale peuvent être vendues comme tel en petits flacons ou sous forme de vaporisateurs, de pastilles, de bonbons... Ces huiles peuvent également être utilisées comme inhalants pour soulager les difficultés respiratoires, comme dentifrice (dans l'eau), ainsi que pour rafraîchir ou soulager la gorge. ^{[7][31]}

En effets, toutes les HE ont une ou plusieurs vertu (s) particulière (s). Des mélanges des huiles HE destinés à être diffusés sont conçus par exemple pour créer une synergie entre les huiles et exercer un effet sur l'organisme et le cerveau. Lorsqu'on sait que les odeurs que l'on perçoit sont recueillies dans le cerveau par l'hémisphère relié aux émotions, on comprend mieux l'impact que peuvent avoir ces huiles.

Ces HE agissent selon leur tropisme ; c'est-à-dire, que chaque huile exerce ses pouvoirs curatifs sur un organe ou une zone particulière, ces substances volatiles pénètrent les tissus et l'organisme. Par exemple, l'HE de basilic est particulièrement active au niveau de la digestion, celle de cyprès améliore la circulation. Il est donc très important de se renseigner sur les effets thérapeutiques des HE car leur usage peut comporter des inconvénients.

Les propriétés des HE sont nombreuses, mais chacune possède ces vertus particulières que certains auteurs regroupent en 13 familles thérapeutiques bien définies : ^[83]

1-Anti-infectieuses et immuno-stimulantes pour traiter rhume, grippe, otite, vaginite, herpès....

2-Anti-inflammatoires et anti-allergiques pour traiter arthrite, eczéma, fièvre des foies, asthme....

3-Anti-catarrhales (expectorantes, mucolytiques) et lipolytiques pour traiter bronchite, sinusite, cellulite.

4-Neurotropes (antispasmodiques, antalgiques) pour traiter crampes, torticolis, entorse, lombaire, arthrose, migraine, insomnie, anxiété, fatigue.

5-Endocrinorégulatrices pour traiter syndrome prémenstruel, ménopause, infertilité, hypo et hyper-thyroïdie, impuissance.

6-Vasculotropes et hémotropes pour traiter varices, hémorroïdes, phlébite, athérosclérose, hypertension.

7-Antitumorales et anti-leucémiques pour traiter certains cancers et leucémies.

8-Digestives pour traiter dyspepsie, indigestion, nausées, insuffisance hépatique.

9-Cicatrisantes et anti-hématomes pour traiter acné, cicatrices, brûlures, vergetures, hématomes.

10-Toniques et stimulantes pour traiter fatigue, épuisement.

11-Thermorégulatrices pour traiter fièvre et refroidissements.

12-Néphrostimulantes pour traiter néphrite, œdème, intoxication.

13-Litholytiques pour traiter calculs biliaires et rénaux.

L'exploitation des plantes aromatiques offre des retombées économiques importantes pour l'économie de divers pays. Au niveau local, on note la création et la distribution de la valeur ajoutée (activité de plantation, de collecte, de récolte et d'extraction), l'augmentation de recettes des localités ou de collectivités décentralisées dans les quelle sont lieu ces activités. A l'échelle nationale, il y'a création d'emploi, perception de taxes et redevances auprès des entreprises, création de valeur ajoutée, et autres effets induits sur l'économie nationale.

En conclusion, s'il apparaît clairement que les huiles essentielles peuvent trouver de nombreuses applications pour améliorer la santé, il convient d'insister une nouvelle fois sur le caractère extrêmement puissant de ces substances, qui bien que 100% naturelle peuvent potentiellement être dangereuses si elles sont utilisées à mauvais escient et sans connaissances précises. S'il est parfaitement possible d'utiliser sans danger certaines huiles essentielles pour remédier aux petits maux quotidiens, toute volonté de traiter une pathologie plus lourde nécessitera l'intervention d'un spécialiste de l'aromathérapie. Les huiles essentielles n'en restent pas moins un formidable outil de prévention et de stimulation des facultés d'autoguérison de l'organisme.

Chapitre III :
Etude antérieure

III.1 Description botanique :

III.1.1. La famille des lamiacées :

Les lamiacées constituent une des familles les mieux définies du règne végétal ; elles renferment des plantes dicotylédonées, à corolle monopétale, portant les étamines et insérée sous l'ovaire, repartis par Cantino (1992) en neuf (9) sous familles : Ajugoïdeae, chloanthoïdeae, Lamioïdeae, Nepetoïdeae, Scutellarioïdeae, Teucroïdeae, Viticoïdeae, Pagostemoïdeae.^[84]

Le calice est monosépale, tubuleux, à cinq divisions, quelquefois bilabié, persistant. La corolle monopétale irrégulière, tubuleuse, à limbe partagé en deux lèvres, l'une supérieure, l'autre inférieure. Les étamines, insérés au tube de la corolle, sont le plus souvent au nombre de quatre, deux plus grandes et deux plus petites, qui avortent quelque fois.

Le pistil se compose d'un ovaire simple, profondément quadrilobé, chaque lobe renfermant une seule graine, d'un style simple et d'un stigmate ordinairement bifide. A la base de l'ovaire on voit un bourrelet jaunâtre circulaire et saillant, formé par un disque hypogyne.

Le fruit est un tétrakène, c'est-à-dire qu'il se compose de quatre petites coques indéhiscentes, renfermant chaque une graine et environnées par le calice persistant. Les graines sont épispermiques : l'embryon a la radicule inférieure et les cotylédons planes^[85].

Les lamiacées se distinguent très facilement, dont la tige est carrée. Les feuilles et les rameaux sont opposés. Les fleurs sont odorantes, axillaires ou verticillées. Au lieu d'être des herbes, les lamiacées souvent être également, mais plus rarement, des arbrisseaux de petite taille. Pour Guignard et Dupont (2004), c'est une famille exceptionnellement homogène, une lamiacée est très facile à reconnaître.

Les lamiacées comprennent environ 200 genres et 4000 espèces.^[84] L'aire de répartition de ces espèces est extrêmement étendue, cosmopolite, mais avec une prédominance pour les régions méditerranéennes. Elles sont rares, par contre, dans les régions arctiques et en haute montagne.^[85] Au Sahara, ces espèces ne se rencontrent guère que dans la région présaharienne et dans l'étage supérieur du Hoggar^[86] sauf pour les trois espèces : *Marrubium deserti*, *Salvia aegyptiaca* et *Teucrium poleum* qui sont plus largement répandues.

^[84] Crété p., (1965), Précis de botanique systématique des angiospermes, tome II, 2^{ème} édition, Masson, Paris.

^[85] R-Edouard Spichiger ; V.Savolaineu ; M.Figeat, avec la collaboration de M.Perret., Botanique systématique des plantes à Fleurs. 296. Presses polytechniques et univ Romandes.

^[86] Ozenda, P., (1982) , Les végétaux dans la biosphère, .Edition Dom, Paris.

Selon Quezel et Santa (1963), les lamiacées constituent une famille très importante dans la flore de l'Algérie représentée par 28 genres et 146 espèces ^[87] contre 8 genres et 12 espèces décrites par Ozenda (1991) dans tous le Sahara. ^[86]

III.1.1.1 Intérêt économique :

La famille renferme de nombreuses espèces économiquement importantes due à leur production d'huiles essentielles : de nombreuses lamiacées sont rencontrées en herborisation (Origan, Sauge,...) ; beaucoup sont utilisées en pharmacie et en cosmétique « parfumerie » : sources ,par excellence, d'huiles essentielle aromatique et antibiotique (Salvia, Lavandula, Rosmarinus, Mentha, Marrubium,.....) ; de nombreux genres contiennent des espèces ornementales et sont de ce fait cultivées (Salvia, Ajuga, Scutellaria,.....). ^[88]

Des études biologiques d'huiles essentielles des espèces genre Thymus ont montré des activités anti-microbiennes, anti-inflammatoires, en plus de leur utilisation en cosmétique et en agroalimentaire. ^[89]

Un très nombre de genres de la famille des lamiacées sont des sources riches en Terpénoïdes, flavonoïdes et iridiodes glycosylés. Le genre Phlomis comprend près de 100 espèces et particulièrement riche en flavonoïdes, phénylethanoïdes, phénylpropanoïdes et en iridoïdes glycosilés. Le genre Salvia (sauge), comprenant près de 900 espèces majoritairement riche en diterpénoïdes. ^[90]

^[87] Quezel, F. et Santa, S. , (1963) , Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions Désertiques méridionales, Vol.1-2 Ed CNRS , Paris, France.

^[88] K.Miura, H.Kikuzaki, N.Nakatani, J.Agric.,(2002), Food Chem., 50 , 1845.

^[89] M.D.Guillen, M.J.Manzanos., (1998), Plant. Food Chem., 63, 373.

^[90] A.Kabouche., (2005), Thèse de doctorat d'état Chimie, Université de Constantine, Algérie.

Une étude récente sur l'antioxydant des plantes médicinales au Nouveau Mexique a été réalisée.^[91] Le tableau (III.1) donne quelques notions : Le nom commun, les parties aériennes des plantes et leurs utilisations et la capacité de l'antioxydant (6-hydroxy-2, 5,7-tetramethylchroman-2-carboxylique acide «Trolox »).

Nom Scientifique	Nom Commun	Partie de la plante	Utilisation	Capacité antioxydant (μ mole Trolox équivalent/g poids sec)
Marrubium vulgare	Mastranzo	Feuillet	Rhum et fièvre	560
Ocimum basilicum	Yerbabuna	//	Trouble d'estomac	169
Mentha Spicata	Albacar	//	//	160
Rosmarinus officinalis	Romero	//	Remède de rhume	476
Salvia officinalis	Salvia	//	Fièvre Indigestion	442

Tab.III.1 : Présentation de la capacité antioxydante des plantes, le nom commun, les parties aériennes des plantes et leurs utilisations.^[91]

III.1.1.2 Propriétés médicales :

Selon Richard (1823), l'analogie frappante qui existe entre les différentes plantes de la famille des lamiacées se trouve également dans les vertus dont elles sont douées. Toutes en effet sont remarquables par leur odeur forte, pénétrante : ce principe odorant et aromatique est dû à une huile essentielle. Un second principe existe encore dans les plantes de cette famille : c'est une matière gomme-résine qui leur donne une saveur amère, quelque fois extrêmement prononcée.

^[91] T.J.Vanderjagt, R.Ghattas,D.J.Vanderjagt, M.Crossey,R.H.Glew., (2002), Comparaison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plant of New Mexico. Life Sciences 70, 1035-1040.

Suivant que l'un de ces deux principes prédomine, les propriétés des lamiacées sont différentes, selon toujours le même auteur :

- Si c'est l'huile essentielle, elles sont alors aromatiques, stimulantes, diffusibles emménagogues, sudorifique, antispasmodiques..... ;
- Si au contraire le principe aromatique est très faible, tandis que le principe amer est très développé, les propriétés changent et les lamiacées deviennent des médicaments simplement toniques, dont l'action plus lente, moins intense mais plus durable, se concentre sur l'estomac ;
- Enfin dans un assez grand nombre de lamiacées, les deux principes se trouvent combinés à des proportions à peu près égales. Ces plantes exercent une action spéciale sur l'appareil respiratoire.

Richard (1823) conclut que la famille des lamiacées ne renferme point de plantes dangereuses : toutes sont aromatiques, stimulantes, ou amère et tonique. ^[92]

III.1.2 Le genre *Saccocalyx* :

Ce genre appartient à la famille des lamiacées, il comprend plusieurs espèces, on cite comme exemple les espèces suivantes : *Saccocalyx calycinus*, *Saccocalyx coluteoides*, *Saccocalyx follicularis*, *Saccocalyx halicacabus*, *Saccocalyx laguroides*, *Saccocalyxlineatus*, *Saccocalyx lupulinus*, *Saccocalyx tumidus*, *Saccocalyx vulnerariae*, en plus de *Saccocalyx satureioides*, qui fait l'objet de notre travail.

III.1.3 L'espèce *Saccocalyx satureioides* :

L'étude botanique de *Saccocalyx satureioides* reste difficile, limitée et très controversée car cette espèce a fait l'objet de très peu d'études descriptives. Il en est de même pour le genre de *Saccocalyx*.

Quezel ^[87] décrit l'espèce *Saccocalyx satureioides* comme un sous arbrisseau de 20-100cm tige érigée, feuilles ovales lancéolés de 4-6 fois 2-3 mm ciliées, hispides ; fleurs en verticillastres petites blanches rosées ou pourpres, calices à 5 dents fortement accrescent, vésiculeux à la maturité. Corolle incluse à 4 lobes très courts, sub-égaux, les supérieurs plus ou marginés, d'une odeur forte et agréable (fig.III.1).

^[92] G.bonnier. Flore Complète. Tome : 09.25-26. La Végétation de la France, Suisse et Belgique.



Fig.III.1 : *Saccocalyx satureioides*

III.1.3.1 Les noms vernaculaires :

Le *Saccocalyx satureioides* est connu en Algérie sous trois noms : Zaâtar R'mel, Azir El'êbel^[87] et Zaâtar El Khil.

III.1.3.2 Position dans la systématique :

La classification botanique de cette plante peut être résumée de la façon suivante :

- **Règne :** Plantes
- **Sous Règne :** Cormophytes
- **Embranchement :** Spermaphytes
- **Sous Embranchement :** Angiospermes
- **Classe :** Dicotylédones
- **Sous classe :** Asteridae
- **Ordre :** Lamiales
- **Famille :** Labiées (Lamiacées)
- **Sous famille :** Stachyoideae
- **Genre :** *Saccocalyx*
- **Espèce :** *Saccocalyx satureioides*



Fig.III.2 : *Saccocalyx satureioides* (Zaâfrane)

III.2 Distribution :

Cette espèce est caractéristique de l'Algérie, elle est répandue dans :

- Dunes de la zone prédesertique ;
- Sous –secteur du Hodna ;
- Sous- secteur de l'Atlas Saharien Oranais ;
- Sous secteur de l'Atlas Saharien Algérois ;
- Sous secteur de l'Atlas Saharien Constantinois.

Et elle est rare dans le secteur du Sahara septentrional. ^[87]

III.3 Récolte :

Nous avons récolté les parties aériennes de *Saccocalyx satureioides* au moi d'Avril à Zaâfrane. Cette zone est située dans le bassin du Zehrez Gharbi à environ 67Km au nord du chef lieu de la wilaya de Djelfa. Elle s'étend de 121.400 Hectares représentant 03.75% de la superficie globale de la wilaya (fig.III.3).

III.4 Intérêt écologique :

Le *Saccocalyx satureioides* est une espèce endémique et cosmopolite qui est commune dans les hauts plateaux et dans le secteur de Sahara septentrional. Elle est considérée comme fixatrice de dunes surtout par son enracinement profond qui contribue à la rétention du sol et lui permet de résister au dessèchement. ^[86]

III.5 Usage traditionnel :

La famille des Lamiacées est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antibactérien et antioxydant.

Dans cette famille, le *Saccocalyx satureioides* est très couramment utilisé comme herbe aromatique, principalement dans la cuisine, par exemple dans les plats traditionnels, mais en général il est utilisé comme infusion de décoction donc tisane pour la guérison et surtout du système respiratoire. ^[93]

^[93] Bouhdid.S et al.,(2006). Biochimie, Substances Naturelles et Environnement (P 324).

Localisation de la région visitée :

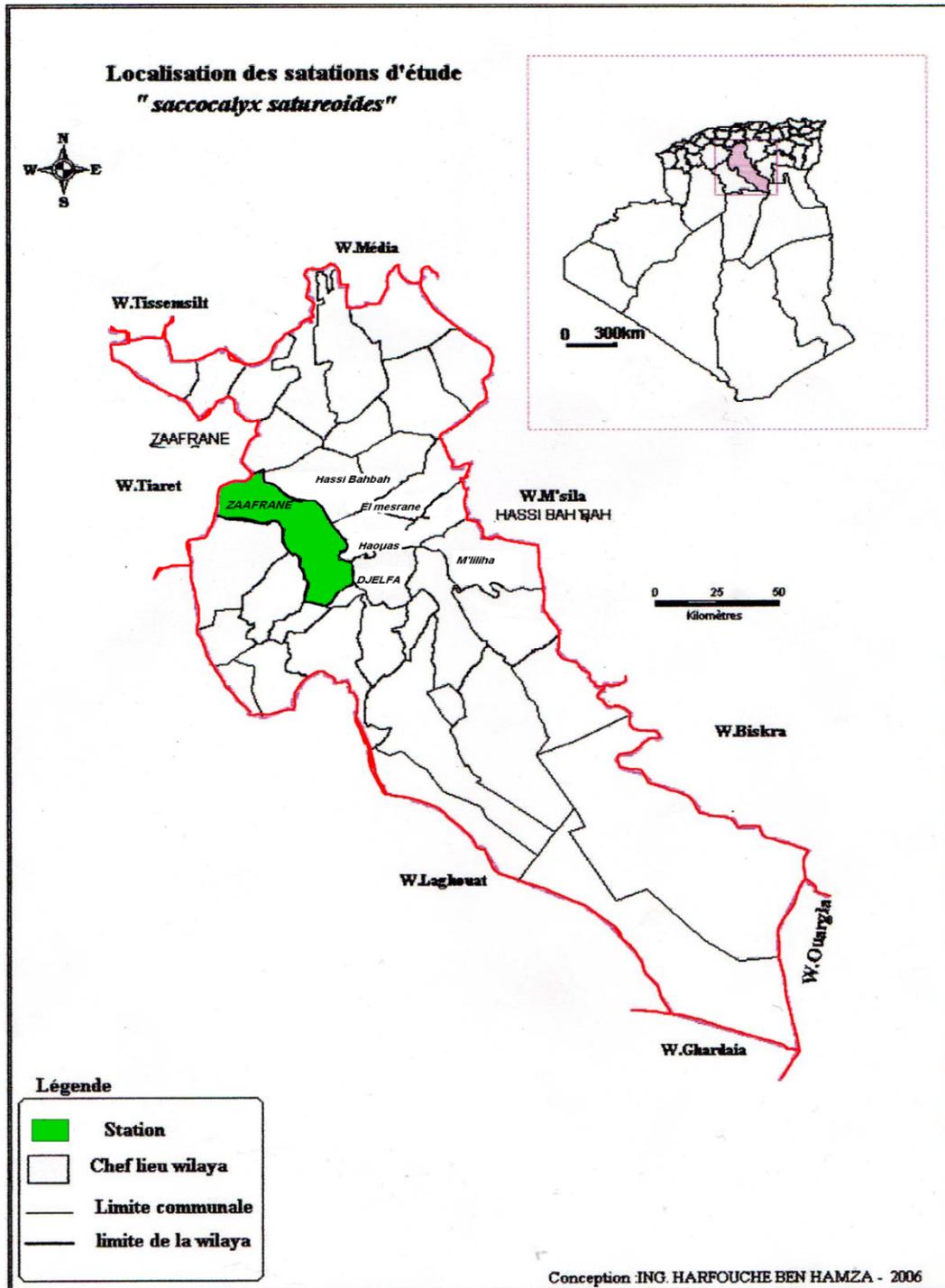


Fig.III.3 : Localisation de la région visitée

III.6 Etudes chimiques antérieures :

Avant d'entreprendre une investigation phytochimique d'une espèce végétale donnée et dans le but d'isoler de nouvelles substances qui peuvent avoir un intérêt en thérapeutique, il est nécessaire de faire une recherche approfondie de littérature. Ainsi, il est plus judicieux de choisir pour notre travail une plante peu ou pas étudiée. Cependant, même pour une plante largement étudiée, mais pour laquelle une approche différente serait employée : procédé analytique différent, cibles biologiques différentes, etc... Les résultats obtenus peuvent être prometteurs.

III.6.1 Sur la famille :

Les plantes nous offrent plus de composés nouveaux pendant mille ans d'efforts, les études phytochimiques entreprises jusqu'à maintenant sur la famille des lamiacées ont montré que la caractéristique chimique essentielle est la présence d'un grand nombre de substances connues pour leur diverses activités biologiques, à titre d'exemples, les diterpènes , les flavonoïdes, les huiles essentielles.

Une étude chimique réalisée par Jens.A et collaborateurs, ^[94] a mis en évidence plusieurs composés de type 3,4-dihydroxyphénylethanoïde glycosiles (Fig.III.4) dans la famille des lamiaceae. Il s'agit de : Deaffeoylacteoside **1**, Acteoside **2**, Isoocteoside **3**, Leucosceptoside A **4**, Lavandulifolioside (Stachyoside A) **5**, Leonoside A **6**, Phlinoside A **7**, Phlinoside B **8**, Phlinoside C **9**, Premcoryoside **10**, Teucriosid **11**, β -Hydroxyacteoside (compneosideII) **12**.

Dans le tableau.III.2 sont reportés les différents composés de 3,4-dihydroxyphénylethanoïde.

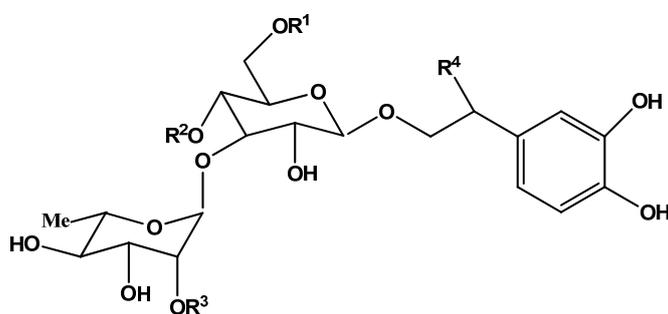


Fig.III.4 : 3,4-dihydroxyphénylethanoïde glycosiles

^[94] Jens A.Pedersen., (2000), Distribution and taxonomic implications of phenolics in the family Lamiaceae determined by ESR spectroscopy. *Biochemical Systematics and Ecology*.28, 229-253.

N°	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
<u>1</u>	H	H	H	H
<u>2</u>	H	Caffeoyl	H	H
<u>3</u>	Caffeoyl	H	H	H
<u>4</u>	H	Feruloyl	H	H
<u>5</u>	H	Caffeoyl	Ara	H
<u>6</u>	H	Feruloyl	Ara	H
<u>7</u>	H	Caffeoyl	Glu	H
<u>8</u>	H	//	Xyl	H
<u>9</u>	H	//	Rha	H
<u>10</u>	IRI(X :)	//	H	H
<u>11</u>	H	//	Lyx	H
<u>12</u>	H	//	H	OH

Tableau.III.2 : les différents composés de 3,4-dihydroxyphenylethanoïde. ^[94]

Une étude plus récente effectuée sur l'extrait acétonique de *Ajuga pseudoiva* ^[95] a permis de mettre en évidence cinq clérodane diterpénoides (Fig.III.5), Hativene A **13**, Hativene B **14**, Hativene C **15**, Lupulin A **16**, 14,15-Dihydroajugapitin **17**.

Les composés sont reportés dans le tableau.III.3.

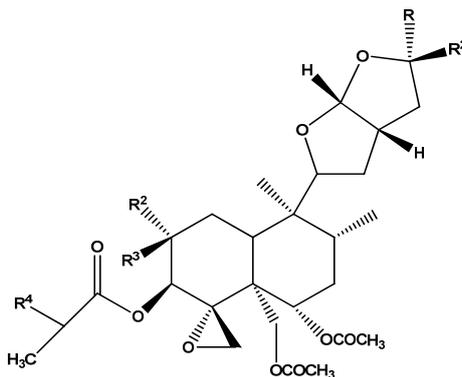


Fig.III.5 : clérodane diterpénoides

N°	R	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
13	H	OMe	OH	H	CH ₃
14	OMe	H	OH	H	CH ₃
15	OMe	H	H	OH	CH ₃
16	H	OMe	OH	H	C ₂ H ₅
17	H	H	OH	H	C ₂ H ₅

Tableau.III.3 : les clérodane diterpénoides extraits d'*Ajuga pseudoiva*

Les structures ont été établies par les différentes méthodes d'analyse spectroscopique RMN et SM.

^[95]H.Ben Jannet, F.Harzallah.Skhiri, Z.Mighri, M.S.J. Simmonds, W.M.Blaney., (2000), Responses of *Spodoptera littoralis* Larvae to Tunisian Plant extract to neo-clerodane diterpenoid from *Ajuga pseudoiva* leaves. Fitoterapia.71, 105-112.

L'étude chimique de *Patchouli* ^[96] a permis également de mettre en évidence la présence de *p*-coumaroyl glucoside d'Apigenin (Fig.III.6) et d'autre flavonoides.

Pachypodol **18**, Ombuine **19**, Apigenin **20**, Rhamnetin **21**, Apigenin-7-O- β -D-(6''*P*-coumaroyl)- glucoside **22**, Apigetrin **23**, Apigenin-7-O- β -D-(6'''-Acétyl)-glucoside**24**, Quiqueloside **25**.

Les composés **18** et **19** sont isolés de l'extrait n-hexane *Patchouli*. Par contre, les composés de **20** à **23** sont isolés de l'extrait acétate d'éthyle.

Les composés sont reportés dans le tableau.III.4.

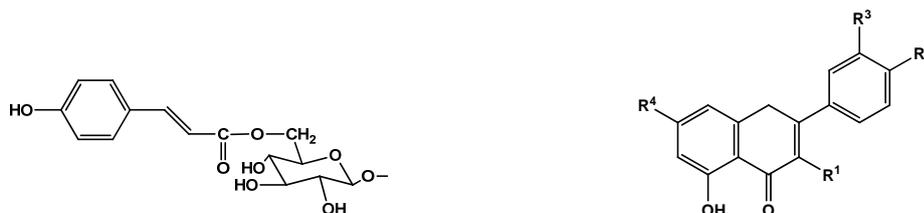


Fig.III.6 : O-(6''-*p*-coumaroyl)-glu

Apigenin

N°	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
18	OMe	OH	OMe	OMe
19	OH	OMe	OH	OMe
20	H	OH	H	OH
21	OH	OMe	OH	OMe
22	H	OH	H	O-(6''-coumaroyl)- Glu
23	H	OH	H	O-glu
24	H	OH	H	O-(6''-acétyl)-glu
25	H	O- <i>p</i> -coumaroyl	H	O-glu

Tableau.III.4 : les différents composés chimiques extraits de la plante *Patchouli*

Deux structures d'Apigenin glucosides ont été obtenues à partir des parties aériennes de *Anisomeles ovata* (Fig.III.7). ^[97]

Apigenin-7-O- β -D-(2'', 6''- di-O-*p*-coumaroyl) glucoside **26**.

Apigenin-7-O- β -D-(4'', 6''- di-O-*p*-coumaroyl) glucoside **27**.

^[96] H.Itokawa, K.Suto, and K.Takeyo. , (1981), Studies of Novel.*p*-coumaroyl glucoside of apigenin and on other flavonoids isolated from patchouli (Labiatae), Chem.Pharm.Bull.29 (1), 254-256,

^[97] L.J.M.Rao, G.N.K.Kumari and N.S.P.Rao., (1983), Two further Acylated flavones glucosides from *Anisomeles Ovata*". Phytochemistry, Vol.22, N°.4, PP.1058-1060, Printed in Great Britain.

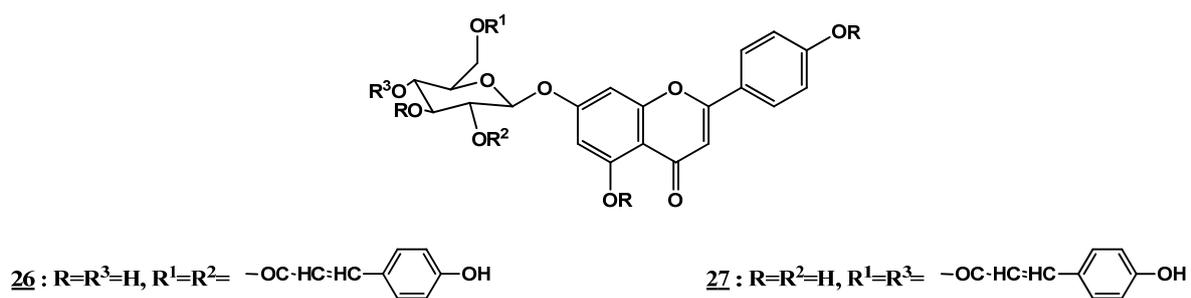
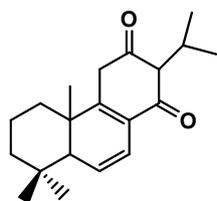
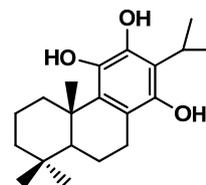
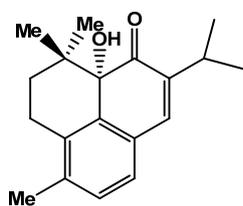
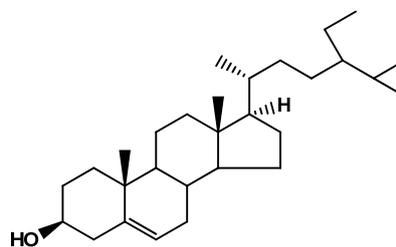
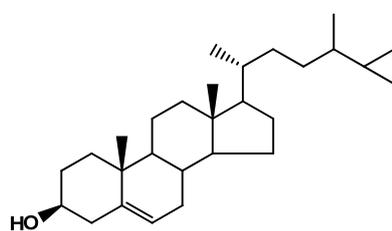
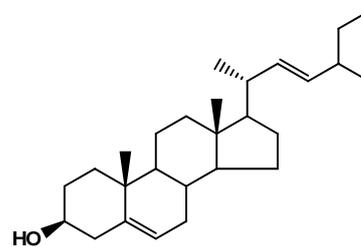
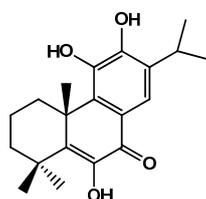


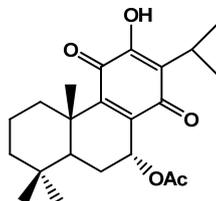
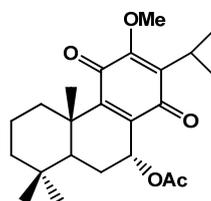
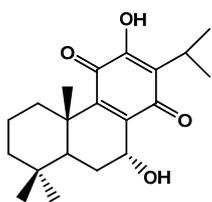
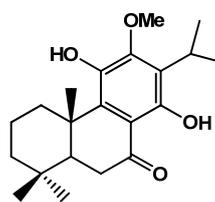
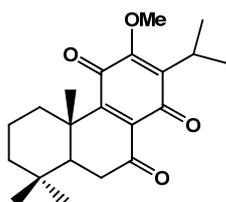
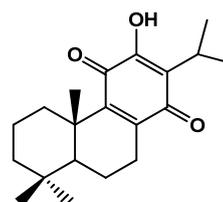
Fig.III.7 : Apigenin glucosides

Une étude menée sur l'extrait acétonique des racines de *Silvia jaminiane*, ^[90] a permis d'obtenir 7 composés à savoir :

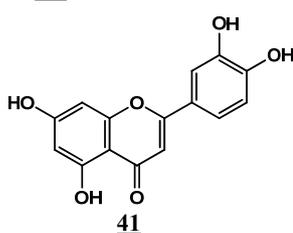
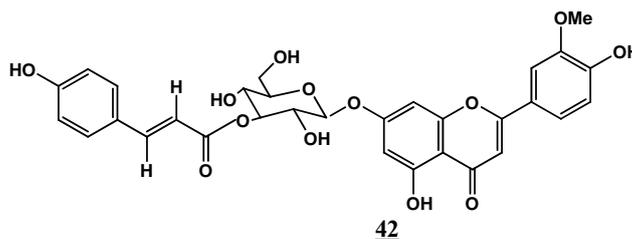
6,7-Déhydroroyléanone **28**, 11, 12,14-Trihydrobiéta-6, 8, 11,13-tétréène (Cryptanol) **29**, Microstegiol **30**, β -Sitostérol **31**, Campesterol **32**, Stigmastérol **33**, 6-Hydroxysalvinolone **34**.

**28****29****30****31****32****33**

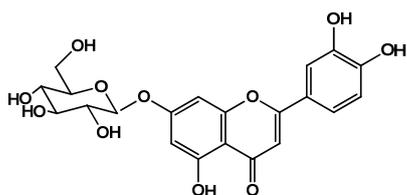
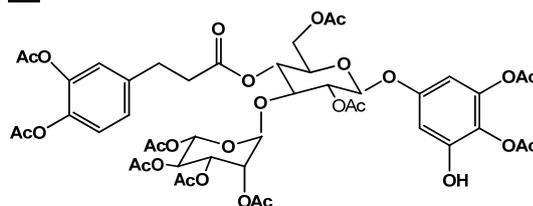
De l'extrait acétonique des racines de *Salvia barrelieri*^[90] on a pu isoler 6 composés : 7- α -Acetoxyroyleanone **35**, 12-Méthoxy-7-acétoxyroyléanone **36**, Harminone **37**, 11, 14-Dihydroxy-12-méthoxy-6-oxoabbieta-8, 11,13-triène **38**, 12-Méthoxy-7-oxoroyleanone **39**, Royleanone **40**.

**35****36****37****38****39****40**

Une autre étude réalisée sur les parties aériennes de l'extrait d'acétate d'éthyle de *Phlomis crinita*^[90] a donné deux produits : Lutéoline **41**, Chrysoeriol-7- β -D-(3''-(E)-*p*-coumaroyl) glucoside **42**.

**41****42**

De l'extrait butanolique de *Phlomis crinita*^[90] ont isolé deux autres composés : 7-O- β -D-glucosyllutéoline **43**, Nonacetylverbascoside **44**.

**43****44**

Ces structures ont été déterminées par les méthodes spectroscopiques IR, UV, RMN et spectrométrie de masse SM.

III.6.2 Travaux antérieurs sur l'espèce :

Une recherche bibliographique exhaustive faite sur l'espèce *Saccocalyx satureioides*, nous a permis de constater que cette plante est peu étudiées et que sa composition chimique reste à déterminer .

Devant ce constat, nous nous sommes intéressés à l'étude chimique de cette plante dans le but d'apporter bien évidemment notre contribution dans la connaissance des produits naturels que recelant l'espèce *Saccocalyx satureioides*.

Partie II:

Partie Expérimentale

Chapitre IV :
Partie Expérimentale

IV.1 Introduction :

Nos travaux expérimentaux concernant principalement l'étude phytochimique d'une plante qui appartient à la famille des Lamiacées ; *Saccocalyx satureioides*. Ils consistent à identifier le maximum de composés afin d'élargir et d'approfondir la connaissance phytochimique ainsi que l'activité biologique de l'extrait naturel de cette plante.

L'objectif phytochimique correspond, en effet, à l'isolement et à la détermination structurale des molécules naturelles de *Saccocalyx satureioides* pour ce faire, nous avons procédé à l'extraction à la purification de différents phytoconstituants en utilisant diverses techniques chromatographiques (CPG, CPG/MS, CCM, CL, LC/MS). Les métabolites secondaires isolées de l'espèce sont par la suite analysés et caractérisés par des techniques spectrométriques (RMN ¹H, RMN ¹³C, RMN2D, SM).

Les différentes étapes de nos travaux seront développées et détaillées tout au long de cette partie. Mais dans un premier temps, nous aborderons quelques aspects d'ordre technique concernant l'extraction, l'isolement, la purification et l'analyse structurale des composés obtenus.

IV.2 Partie expérimentale :

IV.2.1 Matériel végétal :

Le matériel végétal objet de cette étude en l'occurrence, *saccocalyx satureioides* a été récolté au mois d'Avril à Zaâfrane, pendant la période de floraison. La récolte a été pratiquée uniquement sur la partie aérienne sans déraciner la plante. Cette partie aérienne (feuilles, fleurs, tiges) est séchée à l'ombre dans une chambre aérée. Le végétal est ensuite grossièrement fragmenté pour une éventuelle extraction.

IV.2.2 Analyse de la composition des huiles essentielles :

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

IV.2.2.1 La chromatographie :

C'est une méthode de séparation basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaires ou fixe (solide ou liquide fixé), l'autre mobile (liquide ou gaz). Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leur adsorption et de leurs désorptions successives sur la phase stationnaire soit de leur solubilité différente dans chaque phase. ^[98]

^[98] Douglas A. Skoog., Holler F.J., Nieman T.A, (2003), Principes d'analyse instrumentale, 5ième édition, de boeck diffusion.

Pour l'analyse des huiles essentielles, la technique chromatographique la plus utilisée est :

IV.2.2.1.1 Chromatographie en phase gazeuse (CPG) :

Elle s'applique à des échantillons gazeux ou susceptibles d'être vaporisés sans décomposition dans l'injecteur. C'est la technique la plus utilisée pour les huiles essentielles.

Le principe de la séparation par CPG consiste à partager l'échantillon à analyser entre deux phases. L'une de ces phases est un liquide stationnaire non ou peu volatil, possédant des propriétés de solvant vis-à-vis des composés à séparer, uniformément réparti sous forme d'une pellicule mince sur un solide inerte de grande surface spécifique. Tandis que l'autre phase est un gaz mobile (hélium, azote, argon ou hydrogène), appelé gaz vecteur, qui s'écoule à travers l'ensemble stationnaire.

Si la phase stationnaire est liquide, on parle de chromatographie gaz- liquide ou chromatographie de partage. Si la phase stationnaire est un solide absorbant (silice, alumine...), on parle de chromatographie gaz-solide ou chromatographie d'adsorption. Les résultats de la CPG s'expriment par le volume de rétention (R_V) qui représente le volume de gaz vecteur nécessaire à l'élution du composé de la colonne de rétention. Ils s'expriment aussi par le temps de rétention (R_t) qui représente le temps nécessaire à l'élution. ^[99]

IV.2.2.2 La spectrométrie de masse (SM) :

La spectrométrie de masse est une méthode physico-chimique appliquée à la détermination structurale des composés organiques. Elle permet d'accéder à la masse moléculaire d'une substance et apporte des informations structurales par le biais de l'étude des fragments moléculaires engendrés. ^[100]

Parmi les méthodes analytiques, la spectrométrie de masse (SM) occupe une place privilégiée grâce à ses caractéristiques : méthode hautement sensible (détection de composés à l'état de traces en quantité inférieure au milligramme), spécifique, applicable à des mélanges complexes, combinable à de nombreuses techniques chromatographiques et possédant une grande variété d'applications (analyses chimiques qualitatives et quantitatives, interaction entre molécules, biomédecine, entre autres). ^[101]

Elle repose sur le principe d'ionisation afin de créer des ions ; ces espèces chargées sont alors soumises à l'action de champs électriques et / ou magnétique ; l'étude des trajectoires suivies permet de déterminer le rapport masse / charge (m/z) des ions donc éventuellement leur nature.

^[99] Tranchant J., Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Vergnol A., Witier P, (1995), Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, 4^{ième} édition, Masson, Paris.

^[100] De Hoffmann E. Charrette J., and Strobant V., (1999), spectrométrie de masse. Dunold. Paris.

^[101] Prasain J. K., wang C. C., and Barnes S., (2004), Masse spectrometric method for the determination of flavonoids in biological samples. Free radical biology and medicine 37 (9), 1324-1350.

IV.2.2.3 Le couplage CPG/SM:

Ce sont surtout les possibilités de couplage avec des techniques chromatographiques qui ont fait le succès de l'analyse par SM des métabolites secondaires. L'idée de coupler une autre méthode physique d'investigation après séparation chromatographique, dans le but d'ajouter à la chromatographie une deuxième dimension analytique, s'est concrétisée dès 1960 dans la combinaison entre la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse CPG-SM. ^[102]

Le principe de cette méthode consiste à transférer par le gaz vecteur les composés séparés par chromatographie en phase gazeuse dans le spectromètre de masse niveau duquel, ils vont être fragmentés en ions de masse variables dont la séparation sera en fonction de leur masse. L'identification des composants est réalisée par la comparaison des spectres de masse obtenus avec ceux connus en bibliothèque informatique. ^[103]

IV.2.3 Méthode de séparation et purification des extraits :

Pour révéler les extraits obtenus, on utilise les techniques chromatographiques suivantes :

IV.2.3.1 Chromatographie sur couche mince :

La chromatographie sur couche mince (CCM) est essentiellement une chromatographie liquide exécutée sur une couche de particules d'une substance polymérisée immobilisées sur un support planaire. ^[104]

C'est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et de l'identification des métabolites secondaires. Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvant, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une phase de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

^[102] Stobiecki M., (2000), Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Photochemistry* 54 (3), 237-256.

^[103] Desjobert J. M. Bianchini A., Tommy P., Costa J. et Bernardini A. F., (1997), Etude d'huiles essentielles par couplage chromatographique en phase gazeuse, Spectrométrie de masse application à la valorisation de plante de la flore, Vol.25, corse, Analysis.

^[104] Yrjönen T, (2004), Extraction and Planar Chromatography Separation Technique in the Analysis of Natural Products. Conference Room 53 at Viikki Infocentre, Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki. 64P.

La CCM s'applique aux molécules pures, aux extraits (mélange complexes de métabolites) et aux échantillons biologiques. Elle permet d'avoir une idée globale des métabolites présents dans un extrait ou une fraction, elle permet aussi un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé lorsque les conditions opératoires sont bien déterminées. Elle permet également de suivre la progression d'une réaction étant donné qu'elle indique le nombre de composants dans un mélange réactionnel. ^[104]

Les principaux éléments d'une séparation chromatographique sur couche mince sont :

- Une cuve chromatographique : c'est un récipient en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche.
- Une phase stationnaire : c'est une couche d'adsorbant étalé uniformément sur un support en aluminium ou en verre de dimension variables. L'adsorbant qui est souvent utilisé est le gel de silice qui permet la séparation de substances lipophiles et hydrophiles d'un mélange.
- Une phase mobile : c'est l'éluant, un solvant pur ou un mélange qui migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon déposé.
- L'échantillon : il est le plus souvent solubilisé dans un solvant volatil qui n'est pas forcément le même que l'éluant.

IV.2.3.2 Chromatographie liquide sur colonne :

Alors que les autres méthodes chromatographiques sont habituellement employées pour l'analyse et la séparation de très faibles quantités de produits, la chromatographie sur colonne peut être une méthode préparative ; elle permet en effet la séparation des constituants d'un mélange et leur isolement, à partir d'échantillon dont la masse peut atteindre plusieurs grammes. Elle est adaptée à la purification de faibles quantités de produit, lorsque les conditions opératoires sont au point. Cependant, la méthode étant très empirique, sa mise au point nécessite souvent de nombreux essais. ^[105]

Description et principe :

C'est une technique basée sur des phénomènes d'adsorption. La phase solide, le plus souvent l'alumine ou la silice, remplit une colonne de longueur et de section variables ;

^[105] Latifou.L, (2005), Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises, Thèse de doctorat, Faculté de pharmacie de Strasbourg.

l'échantillon, en solution concentrée, est déposé en haut de la colonne et la séparation des composants résulte de l'écoulement continu d'un éluant, traversant la colonne par gravité ou sous l'effet d'une faible pression. On peut utiliser comme éluant un solvant unique ou bien accroître progressivement la polarité de l'éluant de façon à accélérer le déplacement des composés.

Les molécules sont entraînées vers le bas à des vitesses selon leur affinité pour l'adsorbant et leur solubilité dans l'éluant. Le chromatogramme se développe en formant une succession de zones cylindriques qui se séparent en migrant vers le bas. A mesure que chaque zone s'écoule de la colonne, on la recueille.

IV.2.4 Les techniques d'identification structurales :

L'analyse de la composition des extraits bruts, celle des fractions obtenues par chromatographie ainsi que la pureté des molécules isolées sont évaluées par les techniques chromatographiques usuelles. De la même façon, l'identification structurale des métabolites secondaires isolés s'appuie pour l'essentiel sur les techniques spectroscopiques suivantes : RMN¹H, RMN¹³C, RMN2D, SM, CL/SM.

IV.2.4.1 Le couplage chromatographie-spectrométrie de masse (CL/ SM) :

Avec le développement des sources d'ionisation à pression atmosphérique (APCI, ESI), le couplage de la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse (LC-MS) est devenu la technique la plus efficace et de ce fait la plus utilisée pour l'analyse des métabolismes secondaires dans des mélanges complexes (facilité de mise en œuvre et disponibilité d'appareils de routine performants et abordables).Les techniques de couplage sont plébiscitées car ne nécessitant pas d'étapes de purification préalable des composés, elles représentent un gain de temps important surtout lorsque les quantités d'échantillons disponibles sont faibles.^[106] Il existe de nombreux exemples de l'application de cette technique pour l'analyse de mélanges de produits naturels complexes .^[107]

^[106] Cuyckens F., and Claeys M, (2004), Mass Spectrometry in the structural analysis of flavonoïds. Journal of Mass Spectrometry 39 (4), 1-15.

^[107] Colombo R., Lancas F.M., and Yariwake J.H, (2006), Determination of flavonoïds in cultivated sugarcane leaves, bagasse, juice and in transgenic sugarcane by liquid chromatography-UV detection. Journal of Chromatography A 1103, 118-124.

Le couplage CL-SM fournit, en fonction du type de technique de masse employée, divers éléments relatifs à la masse moléculaire de chaque constituant d'un mélange mais également des informations découlant du comportement en CL (temps de rétention en fonction du type de colonne), de l'absorbance UV et permet des comparaisons avec des standards ou des données préalablement acquise. C'est la technique de choix pour caractériser rapidement sans séparation chimique les éléments d'un mélange de composés naturels pour savoir s'ils sont, ou non, déjà connus et s'ils méritent les ressources requises pour leur isolement et leur détermination structurale .^[101] Les informations apportées par la fragmentation sont primordiales pour une identification partielle d'un mélange complexe.^[106] Pour l'identification de composés inconnus, la CL-SM à détection UV permet une identification rapide de la classe de flavonoïdes et est appliquée préalablement à une grande variété de CL-SM/SM ou CL-SM. Ces techniques sont aussi employées pour l'analyse quantitative.^[108]

Tout au long de ce chapitre, nous avons tenté de montrer que la spectrométrie de masse peut apporter une grande contribution à l'identification structurale des composés. Cette puissante technique d'analyse, hautement sensible et permettant des déterminations structurales sans isolement des composés, est un formidable atout pour détecter la présence de métabolites secondaires dans des extraits végétaux.

Aujourd'hui de nouveaux développements augmentent son champ d'application (détection et quantification de substances dans les liquides biologiques, étude des interactions entre les molécules, études des métabolisations....^[109]

Malgré les avancées de la spectrométrie de masse au cours des dernières années, cette technique n'est pas suffisante pour l'identification de nouvelles structures de métabolites secondaire mais est un préalable indispensable aux techniques de RMN mono et bidimensionnelles.

^[108] Merken H.M., and Beecher G.R, (2000), Measurement of food flavonoïds by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food chemistry* 48 (3), 577-599.

^[109] Davis B.D., Needs P.W., Kroon P.A., and Brodbelt J.S, (2006), Identification of isomeric flavonoïd glucuronides in urine and plasma by metal complexation and LC- ESI-MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry* 41 (7), 911-920.

IV.2.4.2 Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) :

La résonance magnétique nucléaire ou RMN est une technique utilisée pour l'analyse des structures de nombreuses molécules chimiques. Elle sert principalement à la détermination structurale des composés organiques. Les principaux noyaux étudiés sont le proton ^1H , le carbone ^{13}C , le phosphore ^{31}P et l'azote ^{15}N .

Cette méthode repose essentiellement sur le phénomène de magnétisme. En effet, les noyaux de certains atomes (^1H , ^{13}C , etc...) possèdent un moment magnétique nucléaire, c'est-à-dire qu'ils se comportent comme des aimants microscopiques par une grandeur quantique appelée « le spin ».

La technique de RMN étudie le comportement des noyaux atomiques en présence d'un champ magnétique externe. Ce champ magnétique appliqué aux produits entraîne un dédoublement des niveaux d'énergie du spin nucléaire, de sorte qu'on puisse induire des transitions entre eux, suite à adsorption d'une radiation électromagnétique adéquate. Les échantillons sont dissous dans un solvant deutéré qui peut être du méthanol, du chloroforme, de la pyridine etc... C'est solvants possèdent des déplacements chimiques spécifiques. Le tube contenant l'échantillon est soumis au champ magnétique permettant l'obtention des spectres utiles à l'élucidation structurale.^[110]

La spectroscopie par RMN constitue l'un des plus puissants instruments de détermination de la structure des espèces organiques aussi bien qu'inorganiques. Cette technique s'est également montrée utile dans la détermination quantitative des espèces absorbantes.^[111]

IV.2.4.2.1 Spectre de la RMN ^1H :

Le point de départ de l'analyse d'une molécule isolée est l'étude du spectre proton (^1H) unidimensionnel (1D) qui apporte des informations tant qualitatives que quantitatives. En effet, chaque proton d'une molécule donne un signal qui possède un déplacement chimique caractéristique et peut présenter des constantes de couplage avec les protons voisins. Des informations concernant les groupes fonctionnels et la position des (^1H) les un par rapport aux autres peuvent ainsi être obtenues ; de plus, l'intégration des signaux, proportionnelles aux nombres de H, permet d'accéder au nombre total de protons de la molécule.^[112]

^[110] Boudonneu M., (1990), La détection inverse en RMN, Analysis n°1, vol.18.

^[111] Canet D., (1991), La RMN : Concepts et méthodes. Inter édition. Paris.

^[112] Maes.E., (2002), La résonance magnétique nucléaire (apprentissage à l'interprétation des spectres à une et deux dimensions des chaînes O-glycanniques), Edition UMER, Villeneuve d'ascq.p.19-21.

IV.2.4.2.2 Spectre de la RMN¹³C :

Le spectre de carbone 13 (1D) donne lui aussi des informations sur l'environnement chimique des carbones de la molécule, notamment le nombre de H aux quels ils sont liés et la présence de substituant attachés directement ou proches dans l'espace, certains déplacements chimiques caractéristiques peuvent aider à la détermination de la structure.

Cependant l'interprétation des spectres (1D) peut s'avérer difficile notamment lorsque les signaux de différents atomes ¹H ou ¹³C de la molécule possédant des déplacements chimiques très proches, l'amélioration de la résolution apportée par les spectres 2D permet bien souvent de résoudre ces problèmes. ^[112]

IV.2.4.2.3 La RMN à deux dimensions RMN2D :

Depuis l'apparition la technique de RMN impulsionnelle dans les années 1970, la RMN est passée à l'âge adulte. Ceci a été en effet possible grâce à deux évolutions technologiques importantes. La première fut en informatique ce qui permis de généraliser la transformée de Fourier. La deuxième évolution fut la découverte de la supraconductivité. Dès lors, on a pu obtenir des champs magnétiques très intenses, très stables et d'une excellente homogénéité.

L'étude des structures des macromolécules d'intérêts biologique connut alors un formidable essor grâce au développement des techniques 2D (COSY, NOESY, XHCORR, etc.). ^[113] C'est en effet grâce à ces séquences que la spectroscopie RMN est devenue une méthode générale de détermination des distances internucléaires et donc complémentaire à la cristallographie par rayon X.

- **Principe de la spectroscopie de RMN à deux dimensions :**

Suite au concept proposé par Jeener en 1971, la RMN à deux dimensions voit le jour. L'expérience de RMN à deux dimensions repose sur une succession de trois intervalles de temps : préparation, évolution et détection. Dans un certain nombre d'expérience s'y ajoute encore une autre période avant la détection, le temps de mixage. Mais cette séquence à elle seule ne constitue pas encore une expérience de RMN 2D. En effet, l'idée de Jean JEENER a été d'augmenter à pas régulier la valeur du temps d'évolution t_1 afin d'obtenir une collection de précession libre du type s (t_2). Le délai t_1 est le temps entre le premier et le deuxième pulse.

Une première Transformée de Fourier par rapport à t_1 nous donne un interférogramme de la forme s (t_2, ω_1). Une deuxième Transformée de Fourier par rapport à la deuxième variable t_2 donne enfin un spectre de RMN à deux dimensions fréquentielles F_1 et F_2 .

^[113] Polycopiés de RMN 2D de la société BRUKER (Poly : 1,2 et 3), (1993).

Grace à toutes ces séquences, nous pouvons arriver à déterminer la structure moléculaire d'un produit dont on ne connaît que quelques données physico-chimique (Masse Molaire, Formule brute, etc...).^[114]

Plus généralement, les travaux rapportés dans le présent mémoire tentent de montrer que le champ d'action de la RMN multidimensionnelle n'est pas limité à l'étude structurale des macromolécules biologiques, mais qu'il est en fait beaucoup plus large et qu'il peut s'étendre à l'étude de tout système de grande complexité, nécessitant un tri de l'information spectrale recueillie.

^[114] Topic in Chemical instrumentation part 3 and 4.2D Methods. W.King and R. Williamss, (1990), journal of chemical. Education. Vol.67, N°4 and N° 5, p (93-99) and (125-137),.

IV.3. Etude phytochimique :

L'objectif de ce mémoire et la mise en valeur des espèces végétales de la steppe, parmi ces plantes nous avons choisi le *saccocalyx satureioides* disponible dans notre région durant le moi d'avril. Notre travail est basé sur l'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation ainsi que l'extraction des métabolites secondaires de cette plante par des solvants organiques et identification de ces structures chimiques.

IV.3.1. Extraction de l'huile essentielle :

Le matériel végétal est soumis à une hydrodistillation au moyen d'un dispositif d'extraction (Fig. IV.2). Cette méthode repose sur le principe : entraînement des constituants volatils du matériel végétal par la vapeur d'eau. L'opération consiste à introduire 50g de masse végétale dans un grand ballon en verre, on y ajoute une quantité suffisante d'eau distillé sans pour autant remplir le ballon pour éviter les débordements de l'ébullition. On porte alors le mélange à l'ébullition l'aide d'un chauffe ballon et on met en marche le dispositif de réfrigération. Les vapeurs chargés d'huile passent à travers le tube verticale puis dans le réfrigérant 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.

Le distillat est ensuite transvasé dans une ampoule à décanter où l'huile essentielle est séparée de l'eau par extraction liquide-liquide au moyen de l'éther (diéther) ou on récupère la phase organique.

Pour éliminer toute trace d'eau dans la phase organique on ajoute du sulfate de magnésium anhydre ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), on laisse agir pendant 15mn.

Après filtration sur papier filtre la phase organique exempte d'eau est constituée de l'huile essentielle plus le solvant, ce dernier est éliminé grâce à une distillation dans un évaporateur rotatif.

L'huile essentielle ainsi obtenue est récupérée et conservée dans un flacon opaque bien scellé à base température. L'opération d'extraction dure quatre heures à partir du début d'ébullition.

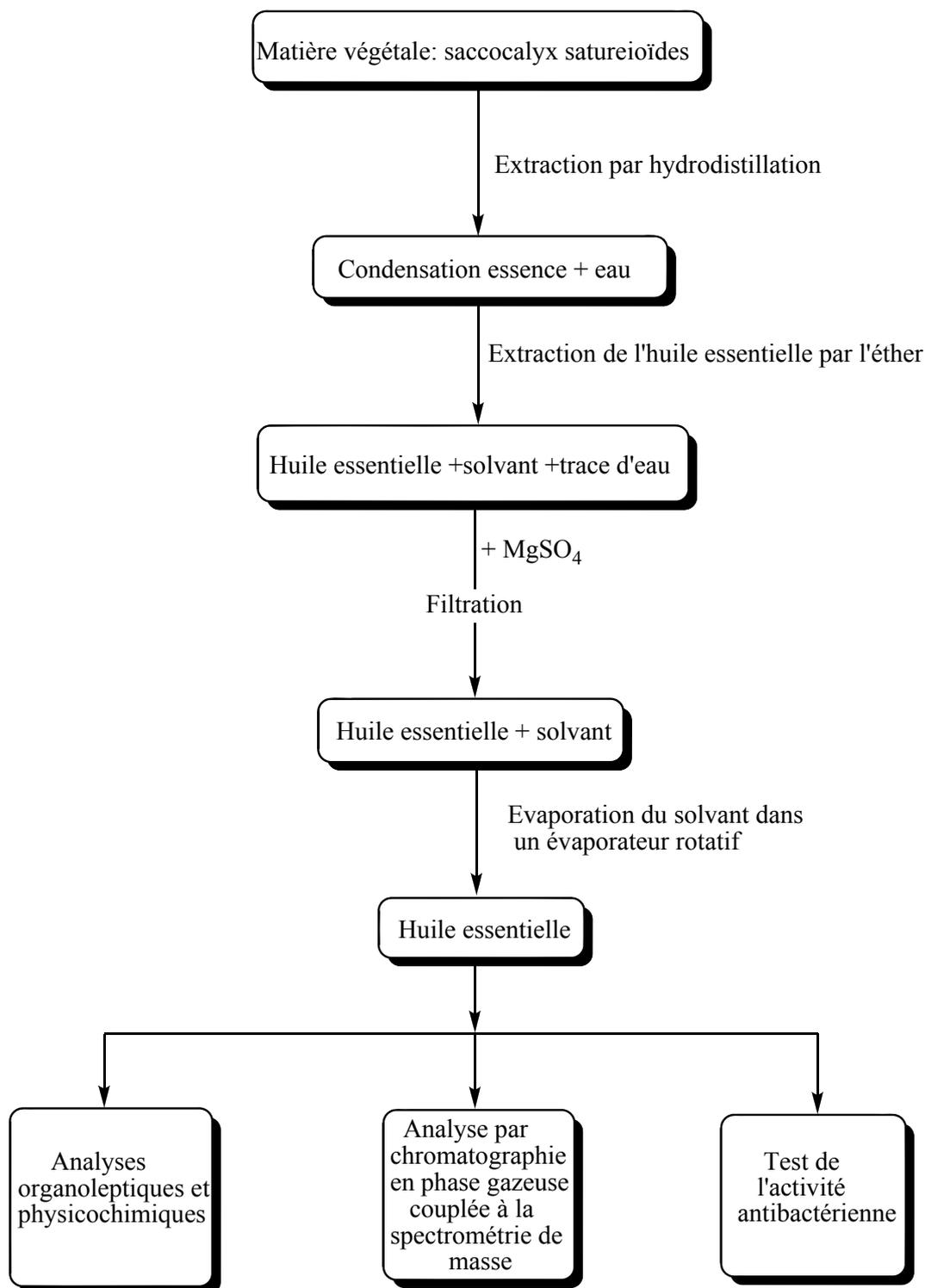


Fig.IV.1 : Schéma représentant les différentes étapes d'extraction et d'analyse de l'huile essentielle de *Saccocalyx satureioides*.

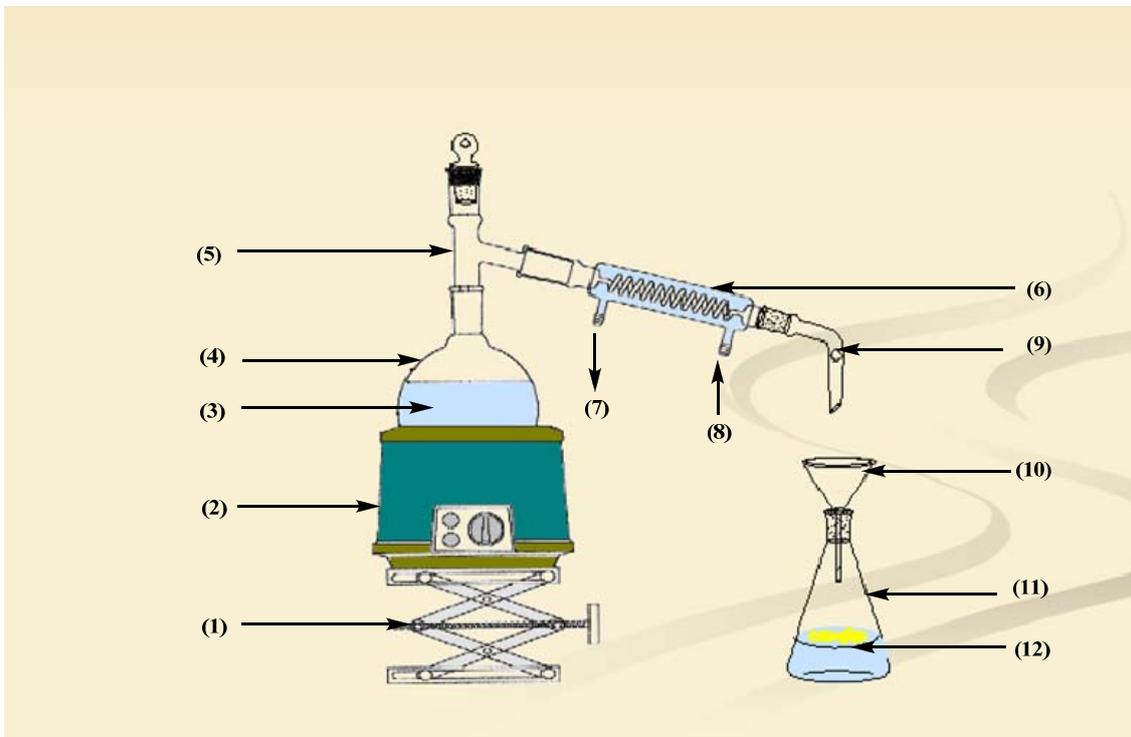


Fig. IV.2 : Montage d'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

- (1) : Support ;
- (2) : Chauffe ballon ;
- (3) : Matière végétale + Eau ;
- (4) : Ballon à col court et à fond rond ;
- (5) : T de distillation ;
- (6) : Réfrigérant ;
- (7) : Sortie d'eau de refroidissement ;
- (8) : Entrée d'eau de refroidissement ;
- (9) : Coude ;
- (10) : Entonnoir ;
- (11) : Erlenmeyer ;
- (12) : Distillat.

IV.3.1.1 Calcul du rendement $R(\%)$:

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile essentielle et le poids de la plante à traiter. ^[115] Le rendement, exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = P_{he} / P_{mv} \times 100 \dots\dots\dots (I)$$

$R(\%)$: Rendement de l'huile en %

P_{he} : Poids de l'huile en g

P_{mv} : Poids de la plante en g

IV.3.1.2 Etude de l'huile essentielle :

IV.3.1.2.1 Etude cinétique :

Cette étude a pour but de suivre l'évolution du rendement en huile essentielle dans le temps. Pour cela, après un temps déterminé, on prélève l'huile qu'on pèse et on calcule le rendement d'après la formule ci-dessus (I).

IV.3.1.2.2 Analyse physico-chimique de l'huile essentielle de *Saccocalyx satureioides* :

Autrefois, la caractérisation organoleptique était la seule indication permettant d'évaluer la valeur d'une huile essentielle (apparence, couleur, odeur, goût, etc..).

Comme ces propriétés ne donnent qu'une information très limitée sur ces essences, il semble nécessaire de faire appel à d'autres technique de caractérisations plus précises, telles que la détermination d'un certain nombre de constantes physico-chimique appelés « indices » qui ont fait l'objet d'étude statistique très importante, ces indices sont constitués soit par résultats d'analyses chimiques soit par des déterminations physiques (densité, indice de réfraction, pouvoir rotatoire, etc..).

Ces normes de normalisation ont été déterminées par plusieurs organisations connus à l'échelle mondiale, en fixant les conditions opératoires et en mettant au point des monographies pour la caractérisation des huiles essentielles les plus courantes, ces organisations sont : I.S.O, A.F.NOR, A.O.A.C.

^[115] Carré P., (1953), Précis de technologie et de chimie industrielle. T3. Ed. Ballière JB. Et fils

Dans notre cas nous nous sommes référés pour la caractérisation organoleptique et physico-chimique de notre huile essentielle à A.F.NOR plus précisément à la norme NFT 75-233 Décembre 1980 qui est en concordance technique avec la norme internationale ISO 37 14 – Juin 1980. ^[116]

***Les caractéristiques physiques :**

- **Mesure de la densité :**

La densité relative de l'huile est le rapport de masse d'un certain volume de l'huile à 20°C et la masse d'un égal volume de l'eau distillée à 20°C (AFNOR, 1992)

- **L'indice de réfraction :** Norme (AFNOR NFT 75 – 112)

L'indice de réfraction d'une huile essentielle 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 essentielle maintenue à une température constante. Suivant le type d'appareil utilisé, soit mesurage direct de l'angle de réfraction, soit observation de la limite de réflexion totale, l'huile étant maintenue dans des conditions d'isotropisme et de transparence. ^[116]

L'indice de réfraction n_D^{20} déterminé après observation de la limite de réflexion totale à l'aide d'un réfractomètre KRUSS Germany (SN 2200211892 A R2) en employant la lumière diffuse du jour.

Calcul :

L'indice de réfraction n_D^{20} , à la température de référence, est donné par la formule

$$\hat{n}_D = \hat{n}_D + 0.0004 (t' - t)$$

Où \hat{n}_D est la valeur de la lecture, obtenue à la température t' , à laquelle a été effectuée la détermination.

^[116] AFNOR, (1986), Huile essentielle, l'afnor, Paris.

- **Evaluation de la miscibilité à l'éthanol** : norme (AFNOR NFT 75-101)

Une huile essentielle est dite miscible à V volumes et plus d'éthanol de titre alcoométrique déterminé, à la température de 20°C, lorsque le mélange d'un volume de l'huile essentielle considérée avec V volumes de cet éthanol est limpide et le reste après addition graduelle de l'éthanol de même titre, jusqu'à un total de 20 volumes .^[116]

Addition graduelle à une prise d'essai de l'huile essentielle, à la température de 20°C, d'éthanol de titre alcoométrique convenable, évaluation de la miscibilité.

Trois solutions hydro-éthanoliques de titres différents : 50%, 70%, 90%, ont servi pour évaluer la miscibilité de l'huile essentielle de *Saccocalyx satureioides* à l'éthanol. Les titres alcoométriques des mélanges sont vérifiés par le mesurage de leurs indices de réfractons (Tab. IV.1).

Mélange %	Indice de réfraction
50	1.359
70	1.363
90	1.364

Tab. IV.1 : Titres des solutions hydro-éthanoliques et leurs indices de réfraction

Dans le cas où une solution limpide n'est pas obtenue après l'addition des 20 ml de solvant ; on utilise le mélange hydro-éthanolique de titre alcoométrique supérieur.

IV.3.2 Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle :

La séparation et l'identification des constituants de l'huile essentielle ont été réalisées par chromatographie en phase gazeuse (GC) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) à colonnes apolaires.

Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un gaz Agilent (modèle 6890N) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) couplé à un détecteur sélectif de masse quadripolaire Agilent (modèle 5973 Network) qui fonctionne en mode impact d'électron (EI) à 70 ev.

Le gaz chromatographe est équipé de deux colonnes capillaires de silice fondue HP-1(PDMS, de 50mètres de longueur par 0.2 mm de diamètre et d'une épaisseur de 0.33µm).Les paramètres d'analyse (identiques pour GC et GC/MS) sont les suivants : le Gaz vecteur est l'hélium avec un flux de 1 ml/min (la pression pour les deux colonnes est de 25psi) ; la température du four a été programmée de 60à 250°C à 2°C / min et maintenue fixé pendant 40

minutes. La température de l'injecteur (mode split, ratio 1/100) est de 250°C. La température du détecteur à ionisation de flamme (FID) a été fixée à 250 °C et, dans l'analyseur GC/MS, les températures de la source d'ion et de ligne de transfert sont de 170 °C et 280 °C respectivement.

Les constituants de l'huile essentielle sont identifiés par comparaison de leurs spectres de masse et leurs indices de rétention (RI) avec ceux des substances pures enregistrées dans la littérature ou avec ceux de la base de données élaborée par le laboratoire à partir de substances authentiques.

IV.3.3 Extraction par des solvants organiques :

500g des parties aériennes de la plantes (les fleurs et les tiges) préalablement séchées à l'air libre, puis mise à macérer pendant 48h dans un mélange hydroalcoolique à température ambiante (éthanol/eau 70/30 v/v), cette opération est répétée trois (03) fois avec renouvellement de solvant. Après filtration et élimination du solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif à la température de 45°C. Ensuite la liqueur est épuisée dans une ampoule à décantation, plusieurs fois, successivement, en utilisant des solvants de polarité croissante (hexane, chloroforme, acétate d'éthyle, butanol). Cette extraction successive a pour buter une décantation sélective de chaque famille de notre extrait :

- **Extraction par l'hexane :** cette étape a pour but d'éliminer la chlorophylle et les produits lipidiques.
- **Extraction par le chloroforme et l'acétate d'éthyle :** ces deux solvants sont utilisés pour extraire les produits moyennement polaires.
- **Extraction par le butanol :** pour extraire les composés très polaires.

A noter que pour chaque étape, on utilise Na_2SO_4 comme desséchant.

L'ensemble des opérations d'extraction de la plante décrites précédemment, est illustré par le schéma d'extraction (Fig. IV.3).

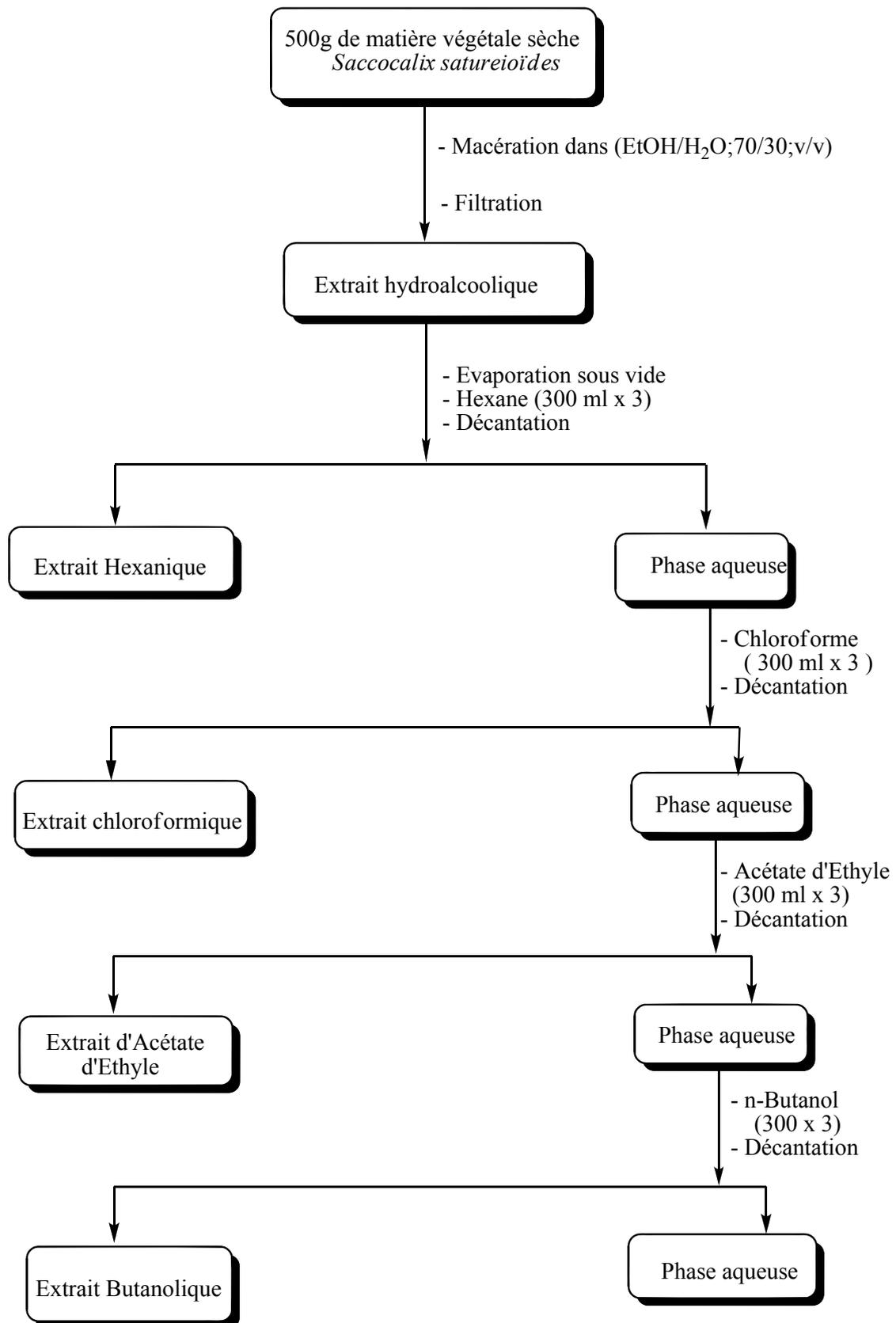


Fig. IV.3 : Schéma de l'extraction des parties aériennes de *Saccocalyx satureioides*

IV.3.4 Méthode analytiques et appareil :

IV.3.4.1 Chromatographie :

a. Chromatographie sur couche mince (CCM) :

Les CCM sont effectuées au moyen de couches minces (0.2 mm d'épaisseur), sur plaques de silice Kieselgel 60F 254 MERK. Après élution dans le solvant donné, les plaques sont révélées par le révélateur universel [p- anisaldehyde (5ml), éthanol (90ml), acide acétique (30 gouttes)] puis chauffées à 105°C.

b. Chromatographie liquide sur colonne :

Les colonnes spécialement conçues pour cet usage ont à leur base une plaque de verre et du sable. La quantité d'absorbant est telle qu'il occupe une hauteur égale à environ 10 fois le diamètre de la colonne. Il faut également prévoir un espace de 10 cm environ au-dessus de l'adsorbant pour placer le solvant.

IV.3.4.2 Spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN) :

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un appareil *Brucker AC 500* (500 MHz) dans un solvant deutérié. Les déplacements chimiques sont donnés en partie par million (ppm) et se réfèrent au pic résiduel du solvant. Tous les spectres ont été réalisés dans le chloroforme deutérié, 7.26 ppm en RMN du carbone. Les spectres réalisés dans le benzène deutérié se réfèrent au pic résiduel : 7.16 ppm au RMN du proton et 128.6 ppm au RMN du carbone. Le spectre ^{13}C est accompagné d'une séquence DEPT (Distortion Less Enhancement by Polarisation Transsfer), qui en différenciant le CH et CH_3 des CH_2 et en élimine le signal des atomes de carbones quaternaire, permet l'attribution des signaux. Les constantes de couplage sont exprimées en Hertz (Hz).

IV.3.4.3 Spectrométrie de masse (MS) :

Les spectres de masse sont enregistrés en ESI-8192 (Electro Spray Ionisation), en mode négatif et positif, sur un spectromètre de masse de type *Brucker CL-SMS type esquire -LC*.

Solvants :

Les solvants pour la chromatographie ainsi que pour l'extraction sont des solvants de commerce purs : Ethanol EtOH ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), Hexane, Chloroforme (CHCl_3), l'acétate d'Ethyle (AcOEt), Butanol, Dichloromethane (CH_2Cl_2).

IV.3. 5 Contrôle chromatographique des extraits :

A- Extrait Hexanique :

Les chromatographies sur couche mince (CCM) effectuées sur l'extrait hexanique dans le système d'élution suivant : EtOH (100%) ; EtOH/ CH₂Cl₂ 10/90 montrent après révélation par anisaldéhyde suivie par un chauffage à 100°C, plusieurs taches de couleur (bleu, vert, rouge, violet), apparaissent (Fig.IV.4).

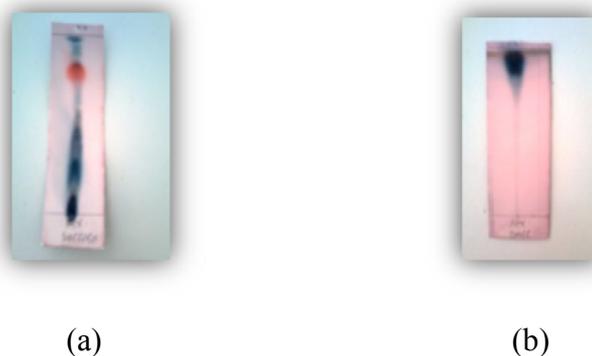


Fig. IV.4 : CCM de l'extrait hexanique

Eluant : **a-** EtOH (100%),

b- EtOH/ CH₂Cl₂ 10/90

B- Extrait Chloroformique :

L'analyse par CCM de l'extrait chloroformique dans le système de solvant suivants : EtOH/ CH₂Cl₂ 10/90 montre après révélation par anisaldéhyde, suivie par chauffage à 100°C plusieurs taches apparaissent (F ig.IV.5).



Fig. IV.5: CCM de l'extrait chloroformique

C- Extrait d'Acétate d'éthyle :

L'extrait d'acétate d'éthyle examiné par CCM le système de solvants : EtOH/ CH₂Cl₂ 10/90 montre des traînées avec des petites taches de couleur (bleu, vert, marron) (Fig. .IV.6).



Fig. IV.6 : CCM de l'extrait d'acétate d'éthyle

D- Extrait Butanolique :

Fig.IV.7 : CCM de l'extrait butanolique

Eluant : EtOH/ CH₂Cl₂ 10/90

IV.3.6 Séparation et purification de l'extrait butanolique:

D'après les résultats de l'analyse chromatographie sur couche mince, notre préférence s'est portée sur l'étude de l'extrait butanolique, et ceci pour des raisons évidentes liées à la polarité.

Cinq (05) grammes de l'extrait butanolique, ont été mis à chromatographie sur une colonne de gel de silice en phase et pression normal. L'élution est réalisée par un mélange dichlorométhane – méthanol (5/1).

IV.4 Tests d'activités antimicrobiennes :

IV.4.1 Mise en évidence de l'activité antibactérienne in vitro de l'extrait naturel de *Saccocalyx satureioides* :

La plupart de plantes médicinales doivent leurs actions thérapeutiques à un ou plusieurs principes actifs que l'on peut isoler et analyser chimiquement. Par ailleurs, en se référant à ce qui est attesté un peu plus haut, l'huile essentielle de *Saccocalyx satureioides* est dotées d'un pouvoir antimicrobien prometteur, cela nous a poussé à étudier l'activité antibactérienne de l'essence ainsi que l'extrait butanolique de *Saccocalyx satureioides* de notre région.

IV.4.1.1 Matériel :

A. Les souches microbiennes :

Les tests de l'activité antibactérienne de l'extrait naturel (huile essentielle et l'extrait butanolique) du *Saccocalyx satureioides* ont été réalisés sur trois souches bactériennes, une levure et deux moisissures. Les trois bactéries sont des souches de références. Elles proviennent de « American Type Culture Collection ATCC » tableau (IV.3).

Les germes-cibles	Morphologie	L'extrait naturel de <i>Saccocalyx satureioides</i> utilisé pour les tests de l'activité antimicrobienne
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Bactérie à Gram(-), bacilles	Huile essentielle et l'extrait butanolique
<i>Pseudomona Aeruginosa</i> ATCC 27853	Bactérie à Gram(-), bacilles	Huile essentielle et l'extrait butanolique
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Bactérie à Gram(+), une coque	Huile essentielle et l'extrait butanolique
<i>Candida albicans</i>	Une levure	L'extrait butanolique
<i>Aspergillus flavus</i>	Moisissure	L'extrait butanolique
<i>Aspergillus neiger</i>	moisissure	L'extrait butanolique

Tableau. IV.3 : Les différentes souches microbiennes étudiées.

B. Les milieux de culture :

Les milieux de cultures utilisés dans ces tests proviennent de l'institut Pasteur d'Algérie.

- La gélose nutritive (GN) à servir pour l'ensemencement et la culture des bactéries cibles.
- Le Mueller Hinton pour l'aromatogramme et antibiogramme.
- Le Sabouraud pour la culture et l'aromatogramme de la levure testée.
- Enfin le Sabouraud-chloramphénicol pour la moisissure.

Pour la composition de ces milieux, se référer à l'annexe

IV.4.1.2. Techniques d'évaluation de l'activité :

La technique utilisée pour suivre l'activité antimicrobienne de l'huile ainsi que l'extrait butanolique de *saccocalyx satureioïdes* est la technique de contact direct qui compte deux méthodes, la méthode de dilution et la méthode de diffusion, nous nous avons adopté la dernière qui est une vieille méthode, mais toujours d'actualité puisqu'elle est encore utilisé fréquemment dans les laboratoires de bactériologie pour la mesure du pouvoir antibactérien des antibiotiques de synthèse.

A. Préparation de l'inoculum :

Les germes cibles testés ont été cultivés sur gélose nutritive (GN), les boîtes ainsiensemencées sont incubées à 37°C pendant 24h.

Un tube stérile à vis contenant l'eau physiologique a été inoculé à partir d'une culture pure et jeune ultérieurement préparée. Ce tube a été ensuite vortexé pour bien disperser les amas de culture et obtenir une suspension homogène. On mesure ensuite la densité optique (DO) à 625nm contre un blanc (l'eau physiologique stérile) à l'aide d'un spectrophotomètre avec un trajet optique de 1 cm. La densité optique recherchée de la suspension est alors 0.08 - 0.1 qui est équivalente à celle du standard MacFarland 0.5. Si c'est nécessaire, la turbidité peut être diminuée (ou augmentée) en ajoutant plus de solution saline (ou de culture) afin d'ajuster la DO.

B. Technique par contact direct :

La méthode de diffusion en milieu gélosé ainsi appelée ou méthode de disques permet de prévoir avec certitude l'efficacité in vitro de l'extrait naturel, il s'agit en fait d'une appréciation qualitatif de l'activité.

a- L'aromatogramme :

Comme son nom l'indique, il est l'équivalent de l'antibiogramme ou les antibiotiques sont remplacés par l'extrait naturel (les huiles essentielles). Inspiré d'une vieille méthode datant de 1949, elle consiste à déposer des disques de papiers filtres imprégnés de l'extrait naturel sur la surface des géloses ensemencées par le germe à tester et de mesurer les diamètres d'inhibition en millimètre (mm) après incubation.

b- Activité antibactérienne :

La gélose de Mueller- Hinton a servie pour l'étude de sensibilité comme préconisé par le National Committee for Clinical Laboratory Stands (NCCLS). Les géloses sont coulées dans des boîtes de pétri sur une épaisseur de 4mm (qui correspond à 25 ml pour les boîtes de 90 mm de diamètre) puis séchées à l'étuve à 37° C avant emploi.

L'ensemencement est effectué par écouvillonnage, à partir de l'inoculum fraîchement préparé. Il consiste à tremper un écouvillon de coton stérile dans la suspension puis presser légèrement contre la paroi intérieure du tube juste au dessus du niveau du liquide, tourner l'écouvillon pour enlever les liquides excédentaires. Etaler à trois reprises sur la surface entière de la gélose, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application pour obtenir une distribution égale de l'inoculum, enfin écouvillonner partout autour de la surface de la gélose.

Des disques de papier whatman n° 2 de 6 mm de diamètre stérilisés précédemment à la chaleur humide sont imprégnés à raison de 20µl par disque de l'extrait naturel (huile essentielle, extrait butanolique) de *saccocalyx satureioides*. Chaque trois disques chargés de l'extrait naturel de concentration similaire ont été déposés dans la même boîte, le quatrième disque chargé de 20µl d'éther (pour l'huile essentielle) et 20 µl de n-butanol (pour l'extrait butanolique) sont utilisés comme témoins.

Dans des boîtes de pétri contenant le milieu Mueller- Hinton préalablement ensemencées suivant la méthode d'étalement par la germe-cibles, les disques ainsi préparés sont déposés de telle manière que les zones d'inhibition ne se chevauchent pas. Après diffusion de nos produits (essence, extrait butanolique) dans la gélose pendant 4 heures à une température de 4°C, les boîtes sont incubées à 37°C, la lecture s'effectue après 24heures d'incubation par la mesure du diamètre de l'halo d'inhibition (zone claire autour des disques).

Les étapes de réalisation de ce test sont schématisées par la figure (IV.8).

c- Activité antifongique :

Le test d'activité antifongique est similaire à ce qui a été décrit précédemment avec quelques modifications :

Le milieu de culture utilisé dans ce cas est : la gélose Sabouraud pour la levure et la gélose Sabouraud-chloramphénicol pour la moisissure.

La température et la durée d'incubation varient en fonction de chaque souche testée. Ainsi pour *Candida albicans* 37°C pendant 48h et pour *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* 28°C pendant 72h.

D'après Duraffourd et al, la sensibilité d'un germe est nulle pour un diamètre inférieure ou égal à 8 mm. La sensibilité est limitée pour un diamètre entre 14 et 20 mm. Pour un diamètre supérieur ou égal à 20 mm le germe est très sensible. ^[59]

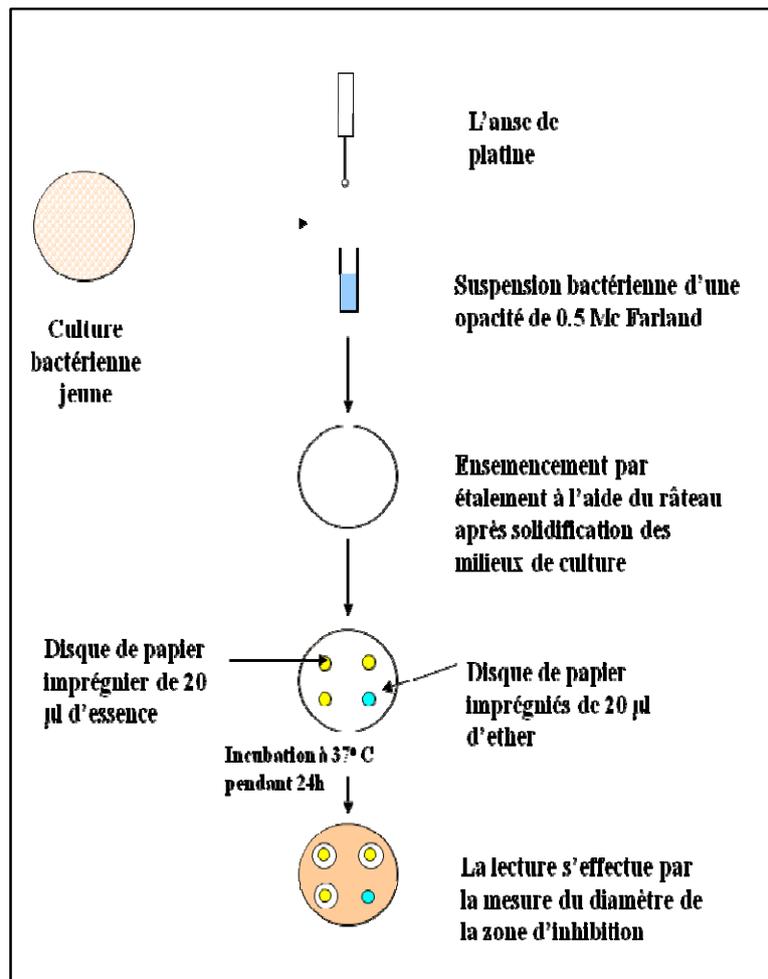


Fig. IV.8 : Etape de réalisation du test d'activité antibactérienne.

Chapitre V :
Résultats et discussion

V.1. Résultats de l'étude phytochimique:

V.1.1. Le rendement en huile essentielle:

Le rendement en huile essentielle de *Saccocalyx satureioides* endémique obtenu par hydrodistillation est calculé par la formule: $R(\%) = (P_{he} / P_{mv}) \times 100$ et il est égal à 0.92 %.

Notre rendement peut être considéré comme un rendement élevé comparé à ceux d'autres Labiées: *Thymus glandulosus* avec un rendement égal à 0.58 %, *Lavandula dentata* qui est de 0.70 % et *Rosmarinus officinalis* dont le rendement est égal à 0.79 %^[75] comme il ne peut être que modeste par rapport au rendement de *Mentha pulegium.L* endémique qui est égal à 2.32 %, ^[117] par contre il est faible au rendement d'*Origanum compactum* qui est égal à 5.4%^[75] (Fig. V.1).

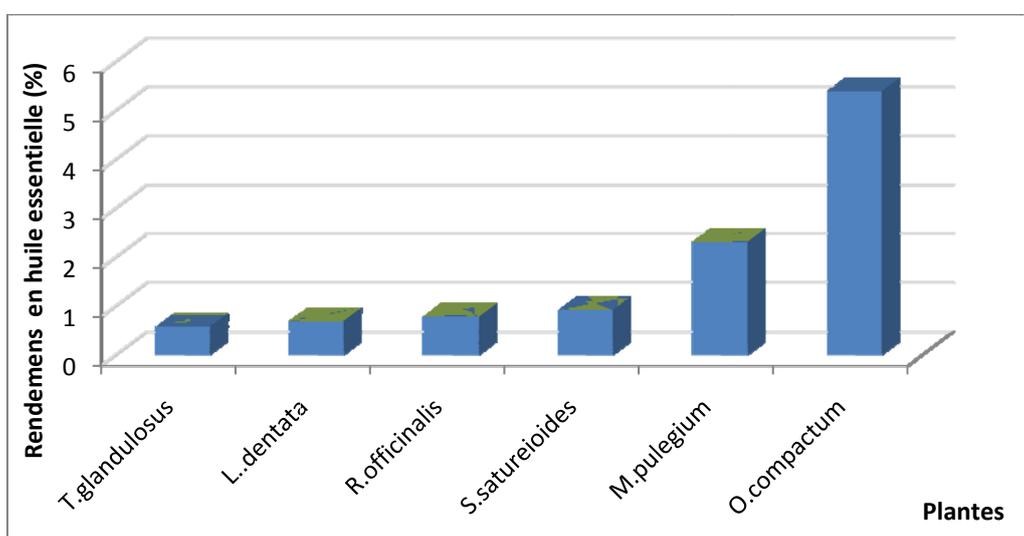


Fig. V.1: Rendement en huile essentielle obtenu par hydrodistillation de quelques labiées.

Il est à annoncer que tous les rendements précités sont obtenus à partir d'une hydrodistillation ou d'une turbodistillation. Le rendement en huile essentielle varie beaucoup avec la plante utilisé, le matériel employé pour l'extraction et la méthode d'extraction, aussi bien l'origine de la plante. Les caractéristiques écologiques ont également une influence prononcée sur la teneur et la composition des huiles essentielles : Facteurs géographiques (altitude, latitude...), nature du sol, climat (ensoleillement, température, pluviométrie....); Considération faite par beaucoup d'auteurs parmi eux on cite Garnero (1991).^[118]

^[117] Lahreche.N., (2005), Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Mentha pulegium L.* et son constituant majoritaire la Pulégone, Thèse d'ingénieur d'état en Agropastoralisme, Université de djelfa.

^[118] Garnero J., (1991), Les huiles essentielle, leur obtention, leur composition, leur analyse et normalisation, Edition Technique. Encycl. Med : Nat. Paris. France.

V.1.2. Influence de la durée d'extraction sur le rendement en huile essentielle:

Dans le but d'estimer la durée optimale d'extraction, une étude cinétique de cette dernière a été entreprise en adoptant les mêmes conditions opératoire (50g de matière végétale dans une quantité suffisante d'eau distillé), les résultats sont enregistrés dans le tableau ci-dessous (Tab V.1).

Temps (min)	0	20	40	60	80	100
M _{he} (g)	0	0.43	0.45	0.46	0.46	0.46

Tab. V.1 : Evolution du rendement en huile essentielle de *Saccocalyx satureioides* en fonction du temps d'extraction

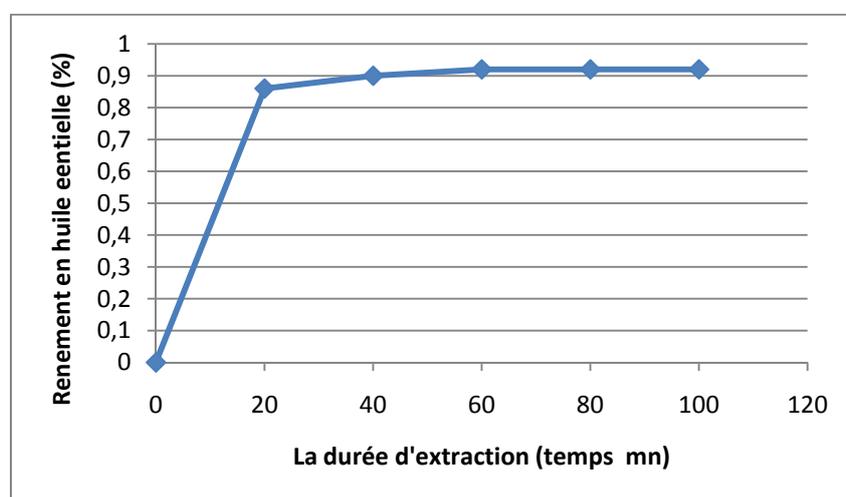


Fig. V.2 : Evolution du rendement en fonction du temps.

L'allure générale de la figure (V.2) réalisé à partir du tableau (V.1) montrant l'évaluation du rendement en fonction du temps, reflète la présence de deux phases bien distinctes une croissante et l'autre stationnaire, en effet on remarque une augmentation importante et régulière du rendement de 0 à 20 minutes ou il atteint 0.86%, cette augmentation rapide du rendement est dûe essentiellement à la localisation superficielle des structures histologiques : poils sécréteurs concernés par la synthèse et l'accumulation des huiles essentielles, ces dernières sont entraînées par les premières vapeurs d'eau.

De 20 à 60 minutes une augmentation très modeste continue, le rendement passe de 0.86 % à 0.92 %, on remarque alors une stagnation totale de l'évolution du rendement à 0.92 % qui correspond à un pallier.

Ces résultats montrent qu'une durée d'extraction de trois heures est excessive puisque au bout de 90 mn de traitement la totalité de l'huile essentielle est récupérée, à la lumière de ces résultats et pour la suite du travail, nous, nous sommes intéressés à acquérir des rendements optimisés de l'huile essentielle de *Saccocalyx satureioides* durant 90 mn.

V.1.3. Résultats de caractéristiques organoleptiques et physicochimiques :

V.1.3.1. Examen organoleptique :

Les propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de *Saccocalyx satureioides* obtenu par hydrodistillation sont présentées dans le tableau (V.2) ci-dessous.

Origine	Caractères organoleptiques		
Huile essentielle de <i>Saccocalyx Satureioides</i>	Liquide-mobile	Jaune	Caractéristique, aromatique, Phénolique avec un fond légèrement épicé

Tab V.2 : Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de *Saccocalyx satureioides*

V.1.3.2. Caractéristiques physico-chimique :

Les constantes physico-chimiques de l'huile essentielle de *Saccocalyx satureioides* sont enregistrées dans le tableau V.3.

Propriétés physico-chimique	η_D^{20}	I _A	d ₂₀	pH	La miscibilité dans l'éthanol
Huile essentielle de <i>Saccocalyx satureioides</i>	1.504	4.48	0.998	5.77	3.6V à 70%

Tab. V.3 : Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de *Saccocalyx satureioides*

V.1.4. Composition chimiques de l'huile essentielle de *Saccocalyx satureioides* : analyse par CPG/MS.

L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle de *Saccocalyx satureioides* a été effectuée au laboratoire Méditerranéen de Nutrition, Université Paul Cézanne d'Aix-Marseille III – France.

Condition opératoire : Notre échantillon a été analysé dans les conditions suivantes :

- Appareil : Chromatographe gaz HP 5890
- Colonne capillaire F SoT
- Longueur : 30m
- Diamètre interne : 032mm
- Phase stationnaire : Polymethyl, Phényle siloxane
- Epaisseur du film : 0.2 micromètre
- Température de l'injecteur : 220°C
- Programmation de la température du four : Isotherme à 30°C pendant 3 mn ;
Augmentation de la température de 30 à 220°C à raison de 3°C / mn ; isotherme à 220°C pendant 10mn
- Gaz vecteur : Hélium, débit 1 ml / mn.

La totalité des constituants de notre huile essentielle a été identifiée, le profil du chromatogramme révèle la présence de 29 constituant, ces dernier sont énumérés dans le tableau (Tab V.4).

Le constituant majoritaire de l'essence est le carvacrol avec 58.606 %, celui qui vient en deuxième position c'est linalool avec 13.152 % ensuite *p*-cymène (6.68 %), borneol(3.479 %), carvacrol methyl éther (3.193 %) et le thymol avec un pourcentage de (2.298 %).

N°	Composés	T.R (min)	Pourcentage massique (%)
1	Myrcène	4.641	0.176
2	α -terpinène	4.997	0.209
3	1,8-cinéole	5.655	0.691
4	γ -terpinène	6.449	1.732
5	3-octanone	6.633	0.865
6	<i>p</i> -cymène	6.989	6.686
7	3-octanol	1 0.492	0.343
8	1-octen-3-ol	12.063	1.170
9	Transabinène hydrate	12.537	0.729
10	Camphor	13.740	0.781
11	Linalool	14.944	13.152
12	Carvacrol methyl ehter	16.343	3.193
13	Trans-dihydrocarvon	17.030	0.477
14	Bicyclo[2.2.1]hept-2-en7-ol	18.595	0.553
15	borneol	19.129	3.479
16	Germacrène	20.000	0.362
17	α -cadinène	20.741	0.205

18	<i>p</i> -cymen-8-ol	23.059	0.546
19	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)	24.718	0.332
20	(-)-caryophyllène oxyde	26.473	0.216
21	Benzenmethanol,4-(1-methylethyl)	29.253	0.332
22	Spathulenol	30.125	1.342
23	Phenol,5-methyl-2-(1-methylethyl)	30.812	0.479
24	Thymol	31.168	2.298
25	Carvacrol	31.778	58.606
26	Vulgarol	32.235	0.154
27	Veridiflorol	32.342	0.403
28		42.193	0.238
29		42.964	0.251

Tab. V.4: Composition chimique de l'huile essentielle de *Saccocalyx satureioides* gratifié par CG/SM.

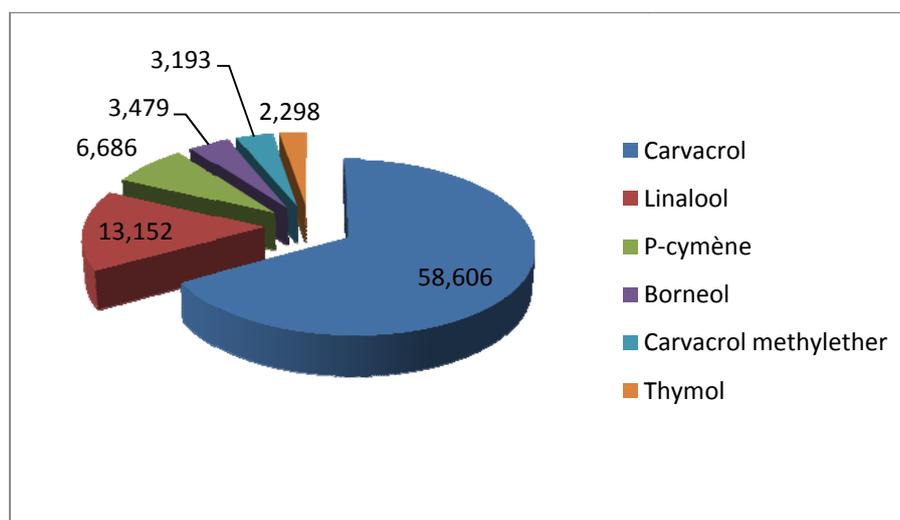


Fig. V.3 : Distribution en fonction du pourcentage des différents composants existant dans l'huile essentielle de *Saccocalyx satureioides*.

Les constituants de l'essence de *Saccocalyx satureioides* endémique sont regroupés ci-dessous (Tab. V.5) par catégories pour établir une meilleure lucidité.

Catégorie	Les composés	Pourcentage massique (%)
Monoterpènes oxygénés	Carvacrol, Linalool, ,1,8-Cinéole, Carvacrol methyl ether, borneol, thymol, vulgarol, veridiflorol, <i>p</i> -cymen-8-ol, Spathulenol	83.86 %
Hydrocarbures Monoterpéniques	Myrcène, α -terpinène, γ -terpinène, <i>p</i> -cymène, trans-sabinène hydraté, trans-dihydrocarvon, Germacrène, λ -cadinène, Camphor	11.35%
Composés Aromatiques	Phenol,2,6-bis(1,1-dimethylethyl), Benzenmethanol, 4-(1-methylethyl), Phenol,5-methyl-2-(1-methylethyl)	1.14%
Composés divers	3-Octanone, 3-octanol, 1-octen-3-ol, Bicyclo[2.2.1]hept-2-en-7ol, (-)-caryophyllène oxyde	3.14%

Tab. V.5: différentes catégories existant dans l'huile essentielle de *Saccocalyx satureioides*

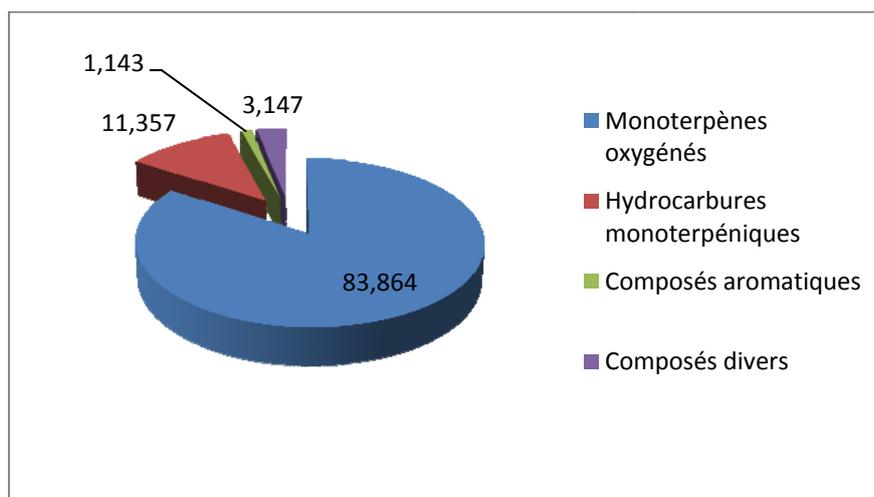


Fig. V.4: Distribution en fonction du pourcentage de différentes catégories existant dans l'huile essentielle de *Saccocalyx satureioides*.

Le résultat de cette analyse ne semble pas en coordination avec d'autres résultats que se soit sur le plan qualitatif ou quantitatif. Sari Madani et al, (2006) ont pu identifier 41 composés obtenus par hydrodistillation des parties aériennes de *Saccocalyx satureioides* provenant de la région de M'Sila. Ces composés sont regroupés en trois (03) classes à savoir hydrocarbures monoterpéniques, monoterpènes oxygénés et sesquiterpènes : les monoterpène oxygénés avec (76.9 %) étaient la classe la plus représentée, α -terpinéol (32.7 %), thymol (22.8%), bornéol (11.6 %) et le carvacrol (6.9 %) étant les composés majoritaires, pour les

hydrocarbures monoterpéniques : *p*-cymène (5.0%), camphène(2.9 %), γ -terpinène (2.8 %), α -pinène (1.8 %) et limonène (1.5 %). La concentration des sesquiterpènes était inférieure à 3%.^[119]

En effet une autre étude récente qui a été faite par Bendahou Mourad et al, (2008) sur la *Saccocalyx satureioides* récoltés de l'Ouest de l'Algérie. Ils ont pu identifier 68 composés en utilisant trois méthodes. Les composés majoritaires obtenus par hydrodistillation et (SFME) sont : bornéol (28%), thymol (18%), α -terpinéol (17%) et camphène (8% et 6%), respectivement. Reciproquement, le thymol (25%) suivi du bornéol (21.6%), le α -terpinéol (11.7%) et ethyl-o-methylbenzoate (2.5%) étaient les composants principaux extraits par MAE (Extraction par micro-onde) (Fig. V.5).^[120]

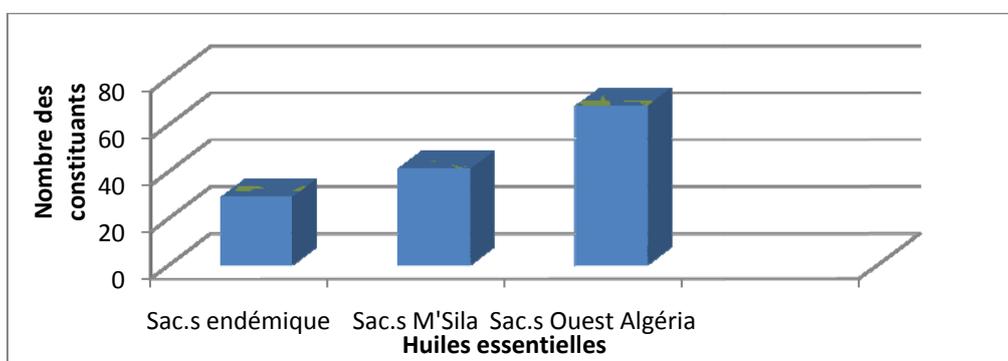


Fig.V.5: Enumération des constituants de l'essence de *Saccocalyx satureioides* des différentes provenances.

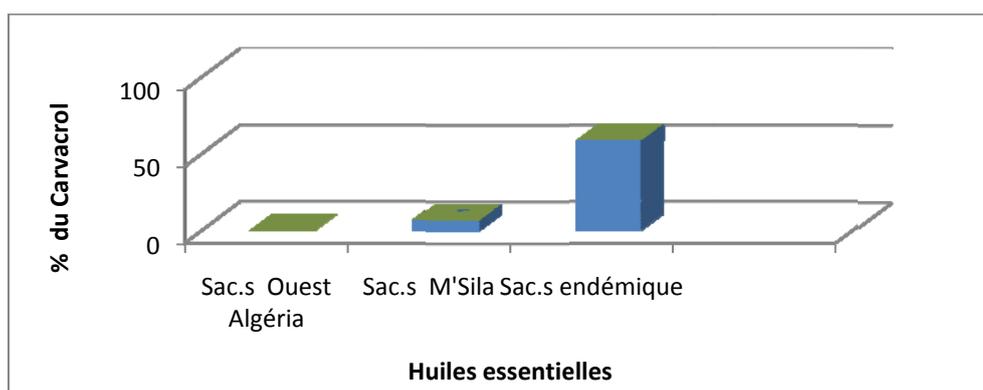


Fig. V.6 : Le pourcentage du carvacrol dans l'essence *Saccocalyx satureioides* récolté de différentes régions.

^[119] Sari Madani et al., (2006), Essential oil of Algerian *Saccocalyx satureioides* Coss. et Durieu, Flavor and fragrance journal, vol.21,n°3, pp.546-548.

^[120] Bendahou.M et al., (2008), Antimicrobial Activity and Chemical composition of *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. Essential Oil and Extract Obtained by Microwave Extraction. Comparison with hydrodistillation, the Journal of essential oil research, vol.20, n°2, pp. 174-178.

D'après la figure (V.6) on constate que notre essence est riche en carvacrol (58.60%). Ce pourcentage est grand par rapport à d'autres essences des différentes plantes, prenant par exemple l'huile essentielle du *Satureja subspicota* qui a un pourcentage en carvacrol de 16.76% ^[121] ainsi que pour HE d'*Oliveria decumbens* qui atteint (23.31%) ^[122], l'HE d'*Origanum vulgare* (l'origan) a un pourcentage de 25.1% en carvacrol. ^[123] Il est modeste par rapport *Lavandula* (42.6%) ^[124] et *Satureja hortensis* (48.1%) ^[125] par contre pour *Satura cuneifolia* a un pourcentage de carvacrol qui atteint 67.1% ^[126] (Fig. V.7).

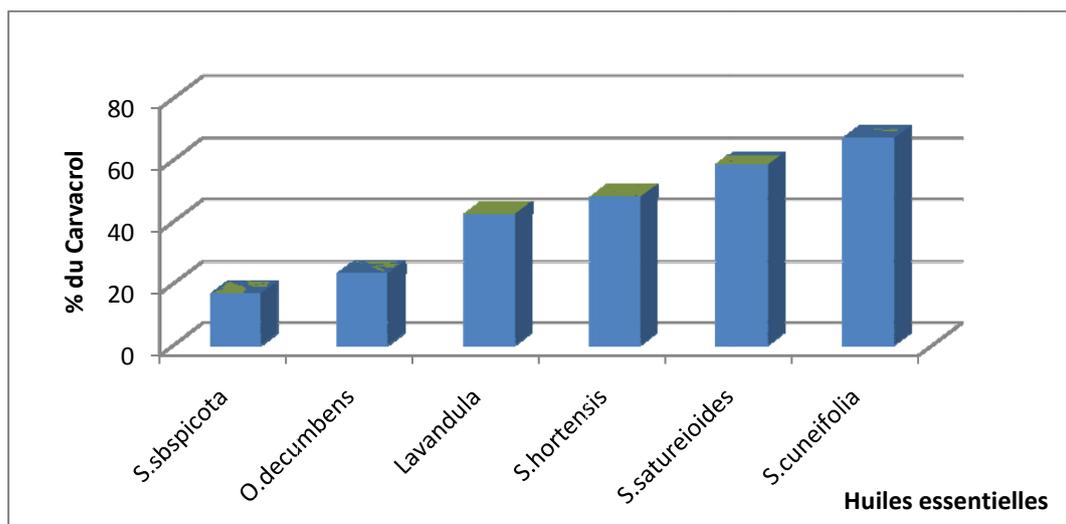


Fig. V.7 : Le pourcentage de carvacrol dans les essences des différentes plantes.

Plusieurs études ont montré que le carvacrol présente plusieurs activités biologiques : il est anthelminthique, antibactérien, antidiurétique, anti-inflammatoire, antioxydant, antiseptique, antispasmodique, antitussif, expectorant, carminative, fongicide, irritant, pesticide et vermifuge. ^[127]

^[121] Mirjana.S., et al, (2006), Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicota* Vis. Growing in Croatia, Food Chemistry 96.

^[122] Gholamreza.M and al., (2005), Essential oil composition and antimicrobial activity of *oliveria decumbens*, Fitoterapia 76.

^[123] Mladen Milos., (2001), A comparative study of biomimetic oxidation of Oregano essential oil by H₂O₂ or KHSO₅ catalyzed by Fe (III) meso- tetraphenylporphyrin or Fe (III) phthalocynine, Applied Catalysis a General. 216.

^[124] J. Pala- Paul., et al, (2004), Analysis of the volatile components of *Lavandula canariensis* L., Mill., a Canary Islands endemic species, growing in Australia, Biochemical Systematic and Ecology 32.

^[125] S. Fatemeh., et al, (2005), Influence of drying and extraction methods on yield and chemical composition of the essential oil of *Satureja hortensis*, Phytochemistry 66.

^[126] O. Eminagaoglu., et al, (2007), The invitro antioxidative properties of the essential oils and Methanol extracts of *Satureja spicigera*.Boiss. and *Satureja cuneifoliaten*, Food chemistry 100.

^[127] Schwämmle., et al, (2001), Isolation of Carvacrol Assimilating Microorganisms. Biotechnol.39 (4), 341-345.

Les variations divulguées par l'ensemble de ces travaux sont dû aux facteurs extrinsèques tels que les facteurs climatiques, édaphiques, situation géographique... et aux facteurs intrinsèques liés à la plante tel que le cycle végétatif. Ainsi qu'aux procédés d'obtention et les modalités de cueillette et séchage mais avec un moindre degré.

V.1.5. Résultats de l'extraction par des solvants organiques:

V.1.5.1. Rendement :

Pour 500g de *Saccocalyx satureioïdes*, nous avons obtenu quatre extraits dont le rendement est le suivant :

Matériel végétal	Extrait	Masse (g)	Rendement (%)
500g	Extrait hexanique	2.09	0.42
	Extrait chloroformique	7.04	1.40
	Extrait d'acétate d'éthyle	2.15	0.43
	Extrait buanolique	5.76	1.15

Tab. V.6: Le rendement des extraits

V.1.5.2. Caractéristiques organoleptiques de l'extrait butanolique :

Aspect	Couleur	Odeur
Poudre	jaune	aractéristique ; Phénolique ; Aromatique.

Tab. V.7: Les caractéristiques de l'extrait butanolique

V.1.5.3. Identification structurale du composé isolé :

Après séparation de l'extrait butanolique par chromatographie sur colonne, le composé isolé a été identifié par les analyses spectroscopiques, particulièrement la RMN ^1H , ^{13}C et 2D ainsi que la spectrométrie de masse.

A. Analyse structurale :

Le spectre de masse ESI (électrospray ionisation) enregistrés en mode négatif (fig .V.8), présente un pic d'ion moléculaire à $m/z = 338.9$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Soit une masse moléculaire égale à 316 correspondants à une formule brute en $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_6$.

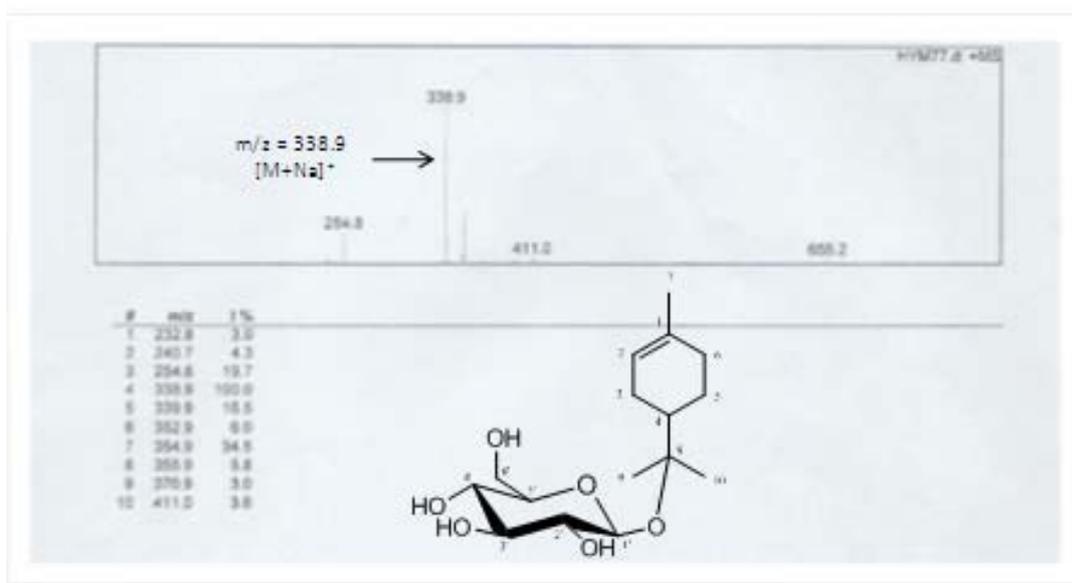


Fig. V.8 : Spectre de masse de composé isolé de *Saccocalyx satireioides*

Le spectre RMN^1H de la région méthylique du composé isolé enregistré à 400 MHz (Fig. V.9) permet d'observer :

- Présence de trois singulets à $\delta_{\text{H}} = 1.18$ ppm, 1.21 ppm, 1.62 ppm pour les méthyles (CH_3) -9, (CH_3) -10, (CH_3) -7.
- Présence de trois paires de signaux de proton geminale correspondant à trois méthylènes (CH_2) -3 : $\delta_{\text{H}} = 2.02$ ppm, (CH_2) -5 : $\delta_{\text{Hax}} = 1.18$ ppm, $\delta_{\text{Heq}} = 2$ ppm et (CH_2) -6 : $\delta_{\text{Hax}} = 1.93$ ppm, $\delta_{\text{Heq}} = 1.81$ ppm indique la présence d'une partie de α - terpinyl.
- Un signal multiplet à $\delta_{\text{H}} = 5.36$ ppm caractéristique d'un proton oléfinique ; (CH) -2 et proton de methine correspondant à (CH) -4 : $\delta_{\text{H}} = 1.62$ ppm.
- L'observation d'un signal de proton anomérique (CH) -1' à $\delta_{\text{H}} = 4.49$ ppm, c'est un doublet avec une constante de couplage $J = 7.6$ Hz, indique la configuration β .

En outre, un pic d'ion de fragment à $m/z = 315.9$ dans le spectre de masse (ESI), indique que la partie α - terpinyl est liée par une liaison glycosidique.

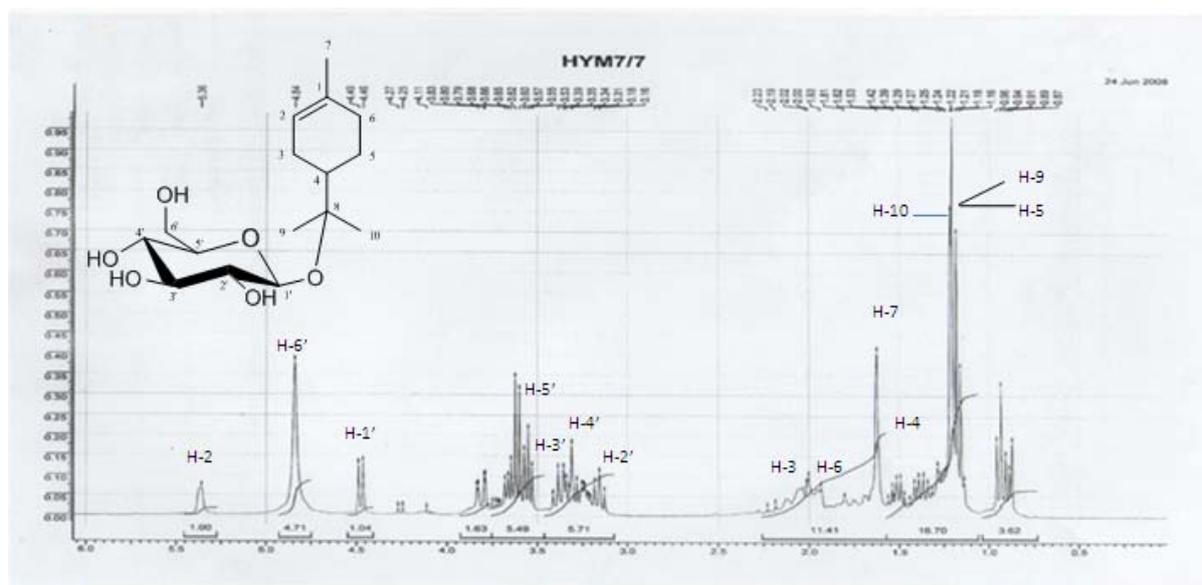


Fig. V.9 : Spectre RMN¹H du composé isolé de *Saccocalyx satureioides*

Le spectre RMN¹³C en J module (Fig. V.16) de ce composé montre la présence de 16 atomes de carbones constitués principalement de :

-Trois signaux méthyliques résonnant à $\delta_c = 23.76$ ppm, 23.76 ppm, 24.21 ppm attribués aux méthyles suivants : (CH₃)-7, (CH₃)-9, (CH₃)-10.

-Trois méthylènes résonnant à $\delta_c = 27.88$ ppm, 24.87 ppm, 31.97 ppm qui correspond à : (CH₂)-3, (CH₂)-5, (CH₂)-6.

-Un signal caractéristique d'un méthyne (CH)-4 résonnant à $\delta_c = 44.84$ ppm et un signal caractéristique d'un carbone quaternaire C-8 résonnant à $\delta_c = 80.80$ ppm.

-Deux signaux caractéristiques de deux carbones oléfinique C-1 et C-2 résonnant respectivement à $\delta_c = 134.61$ ppm et $\delta_c = 121.81$ ppm.

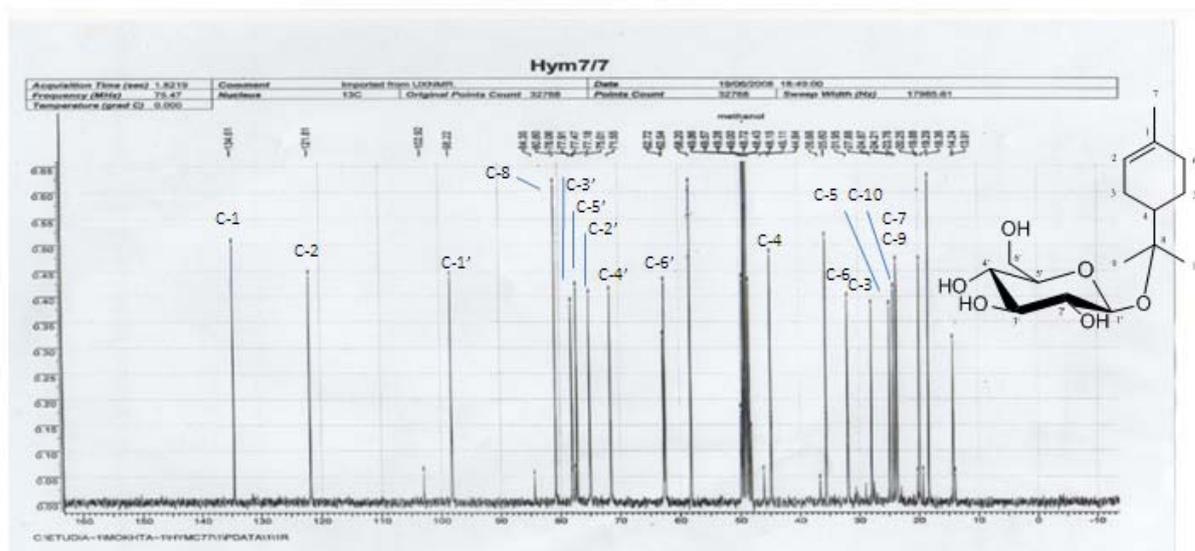


Fig. V.10 : Spectre RMN¹³C en J module

Le spectre ¹³C montre également la présence de :

- six carbones correspondant à une partie du glucose dont leurs déplacements chimiques sont comme suit : C-1' : $\delta_c = 98.22$ ppm, C-2' : $\delta_c = 75.01$ ppm, C-3' : $\delta_c = 78.06$ ppm, C-5' : $\delta_c = 77.18$ ppm, C-6' : $\delta_c = 62.54$ ppm.

Les valeurs des déplacements chimiques des protons et des carbones du composé isolé de *Saccocalyx satureioides* sont représentées dans le tableau (V.8).

Numéro de C	δ_H (ppm)	δ_c (ppm)	J (Hz)
1 (C)	-	134.61	-
2 (CH)	5.36 m	121.81	-
3(CH ₂)	2.02 m	27.88	-
4(CH)	1.62 dddd	44.84	12.0, 12.0, 4.4, 2.2.
5(CH ₂)	1.18 dddd-2.00 m	24.87	12.0, 12.0, 12.0, 3.9.
6(CH ₂)	1.93 m - 1.81 d	31.95	-
7(CH ₃)	1.62 s	23.76	-
8(C)	-	80.80	-
9(CH ₃)	1.18 s	23.76	-
10(CH ₃)	1.21 s	24.21	-
1'(CH)	4.49 d	98.22	7.6
2'(CH)	3.16 dd	75.01	8.8-7.6
3'(CH)	3.39 t	78.06	8.5

4'(CH)	3.34 t	71.55	9.0
5'(CH)	3.60 ddd	77.18	8.8, 6.6, 2.2
6'(CH ₂)	4.46 dd	62.54	11.7, 6.6

Tab. V.8 : Résultats de la spectroscopie RMN¹H, ¹³C (CD₃OD, 400MHz) du composé isolé de *Saccocalyx satureioides*.

Le spectre ¹³C est accompagné d'une séquence DEPT (Distortion Less Enhancement by Polarisation Transfer), qui en différenciant les CH (CH-2, CH-4, CH-1', CH-2', CH-3', CH-4', CH-5') et les groupements méthyliques CH₃ ((CH₃)-9, (CH₃)-10, (CH₃)-7) des CH₂ ((CH₂)-3, (CH₂)-5, (CH₂)-6, (CH₂)-6' et en élimine le signal des deux atomes de carbones quaternaire : C-1, C-8 (Fig. V.15).

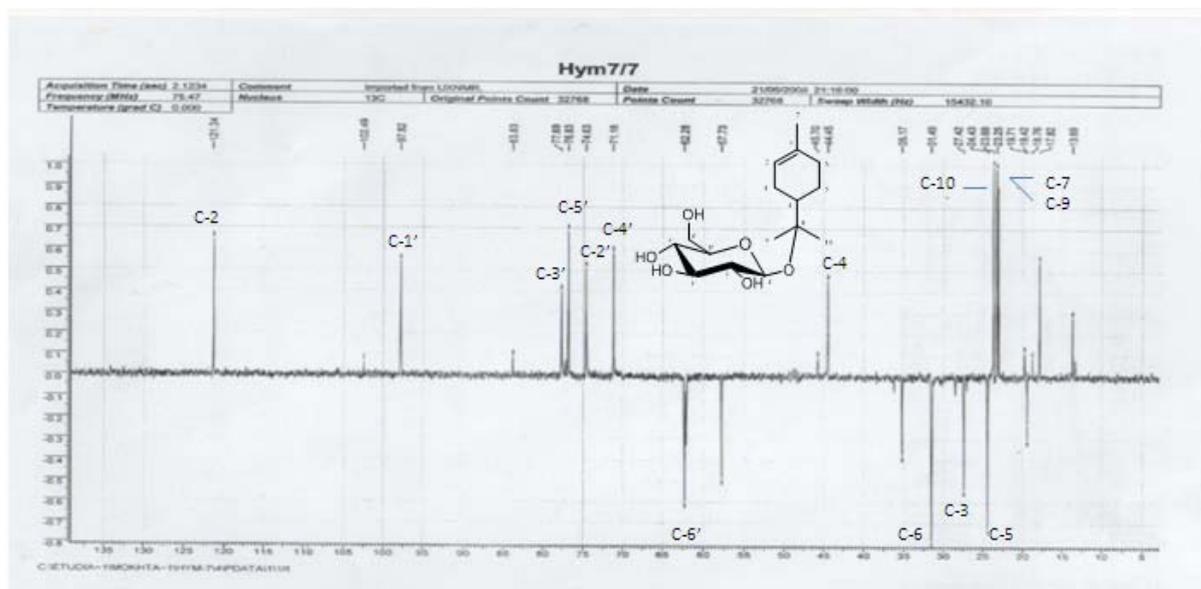


Fig. V.11 : Spectre ¹³C (DEPT 135)

L'expérience **COSY H-H** (fig. V.10) montre clairement les corrélations entre :

- Le proton H-2 et les protons résonnants à $\delta_H = 1.62$ ppm correspondant au proton de méthyle (CH₃)-7.
- Le proton H-2 et les protons résonnants à $\delta_H = 2.02$ ppm correspondant au proton méthylénique (CH₂)-3.
- Le proton H-6 et les protons de méthyle (CH₃)-7 : $\delta_H = 1.62$ ppm.
- Le proton H-4 et les protons résonnants à $\delta_H = 1.18$ ppm, $\delta_H = 1.21$ ppm correspondant respectivement au proton méthyle (CH₃)-9 et (CH₃)-10.

- Le proton H-4 et les protons des groupements méthyléniques suivants : (CH₂)-3, (CH₂)-5 résonnants respectivement à $\delta_H = 2.02$ ppm, $\delta_{H_{ax}} = 1.18$ ppm.

Le spectre **COSY H-H** montre aussi les corrélations entre :

- Le proton H-1' et les protons de groupement méthylique (CH₃)-9 réonnant à $\delta_H = 1.18$ ppm.
- Le proton H-1' et les protons H-2', H-3' et H-4' résonnants respectivement à $\delta_H = 3.16$ ppm, $\delta_H = 3.39$ ppm et $\delta_H = 3.34$ ppm.

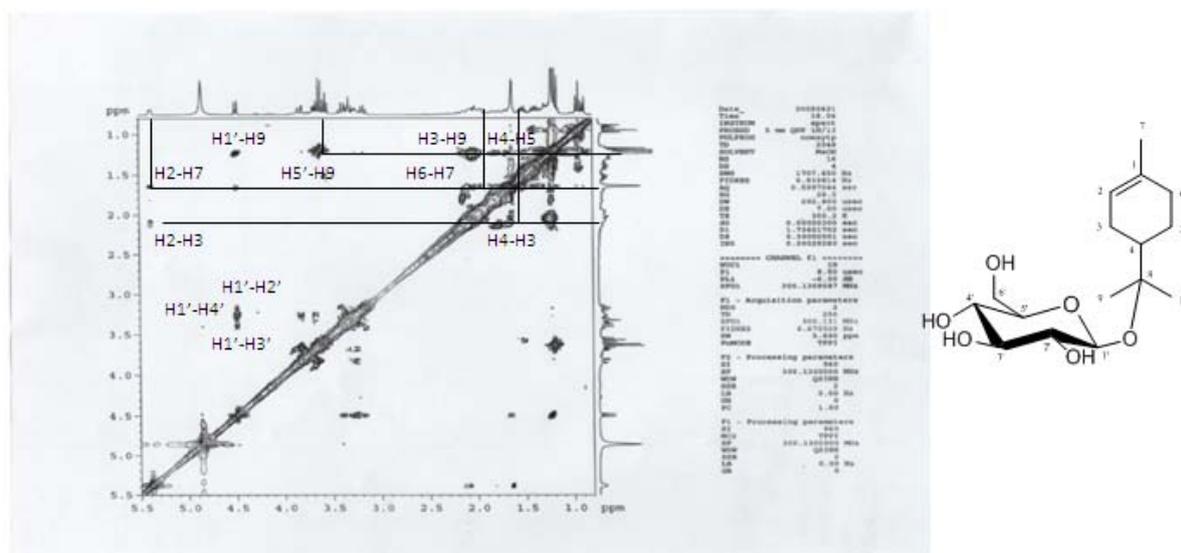


Fig. V.12: Spectre **COSY H-H** du composé isolé de *Saccocalyx satireioides*

L'expérience de corrélation directe carbone-proton ou **HSQC** (fig. V.11) montre les couplages entre :

- Le proton H-9 et son carbone à $\delta_c = 23.76$ ppm
- Le proton H-10 et son carbone à $\delta_c = 24.21$ ppm
- Le proton H-3 et son carbone à $\delta_c = 27.88$ ppm
- Le proton H-7 et son carbone à $\delta_c = 23.76$ ppm
- Le proton H-5 et son carbone à $\delta_c = 1.18$ ppm
- Le proton H-2' et son carbone à $\delta_c = 78.06$ ppm
- Le proton H-3' et son carbone à $\delta_c = 23.76$ ppm
- Le proton H-4' et son carbone à $\delta_c = 71.55$ ppm
- Le proton H-5' et son carbone à $\delta_c = 77.18$ ppm.

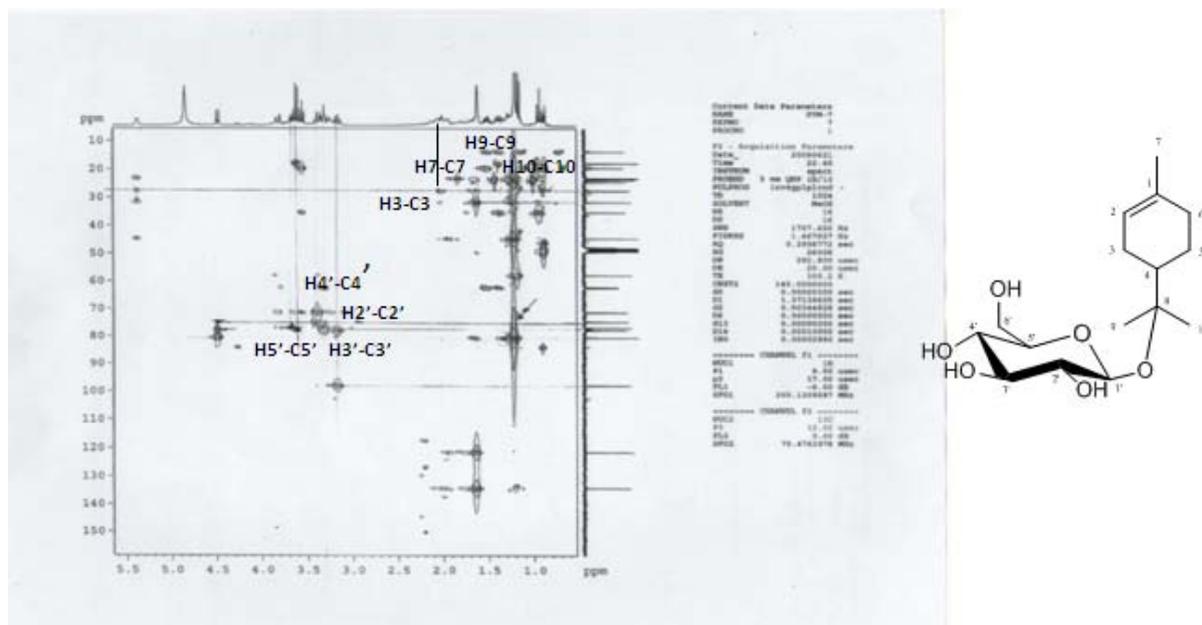


Fig. V.13 : Spectre HSQC du composé isolé de *Saccocalyx satireioides*

Ainsi que l'expérience de corrélation des déplacements chimique des ^1H et ^{13}C par les couplages à longue distance (**HMBC**) (fig. V.12) montre les couplages entre :

- Les protons du méthyle (CH_3)-7 et le carbone C- 1 à $\delta_c = 134.61$ ppm
- Les protons du méthyle (CH_3)-7 et le carbone du groupement oléfinique C-2 à $\delta_c = 121.81$ ppm
- Les protons du méthyle (CH_3)-7 et le carbone C-6 à $\delta_c = 31.95$ ppm
- Les protons du méthyle (CH_3)-9 et le carbone quaternaire C-8 résonnant à $\delta_c = 80.80$ ppm
- Les protons du méthyle (CH_3)-9 et le carbone C-10 résonnant à $\delta_c = 24.21$ ppm
- Les protons du méthyle (CH_3)-9 et le carbone C-4 résonnant à $\delta_c = 44.84$ ppm
- Le proton H-1' et le carbone quaternaire C-8 à $\delta_c = 80.80$ ppm

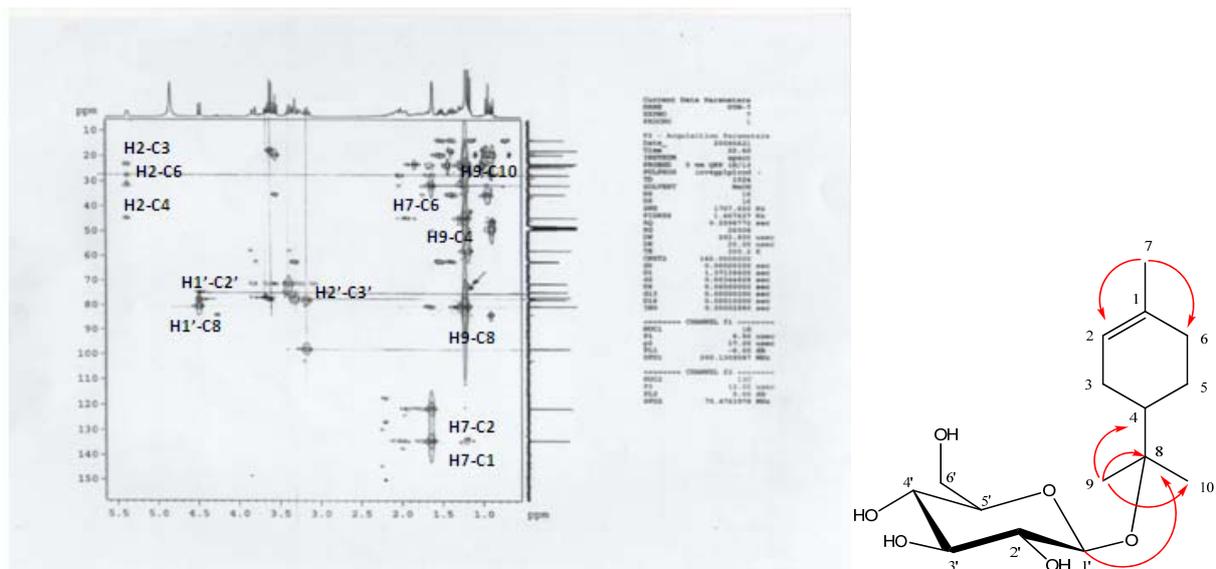


Fig. V.14 : Corrélations HMBC (Méthyles 7, 9 et 10)

Le spectre de corrélation (**HMBC**) montre aussi les couplages entre le proton oléfinique H-2 et les carbones : C-3, C-4 et C-6 résonnants respectivement à : $\delta_c = 27.88$ ppm, $\delta_c = 44.84$ ppm et $\delta_c = 31.95$ ppm (Fig. V.14).

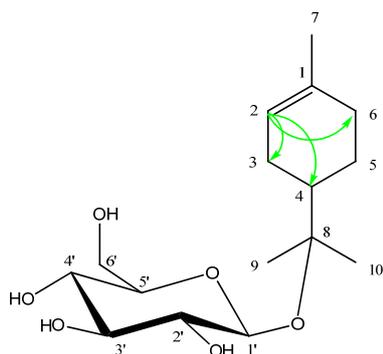
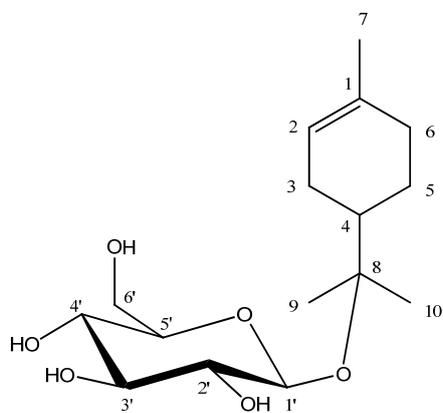


Fig. V. 15 : Corrélations HMBC (proton oléfinique H-2)

Ainsi, toute cette analyse spectrale permet d'attribuer la structure suivante au composé :



α - Terpineol 8-O- β -D-glucopyranoside.

V.2. Résultats du test de pouvoir antimicrobien :

V.2.1 Effets de l'huile essentielle et l'extrait butanolique sur les bactéries : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomona aerugionosa*

L'antibiogramme consiste à chercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques. Nous avons testé tout d'abord l'activité de l'huile essentielle et l'extrait butanolique obtenu par l'extraction successive de *Saccocalyx satureioides* sur les trois bactéries par la méthode standard des disques. Les mesures des diamètres des zones d'inhibition figurant dans le tableau (V.9) suivi par leurs interprétations graphiques (Fig. V.17).

Les bactéries	Les codes	Les diamètres (mm)	
		HE (20µl)	EB (20µl)
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	26	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	26.5	15
<i>Pseudomona aerugionosa</i>	ATCC 27853	7.5	7

Tab. V.9 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Saccocalyx satureioides* et son extrait butanolique

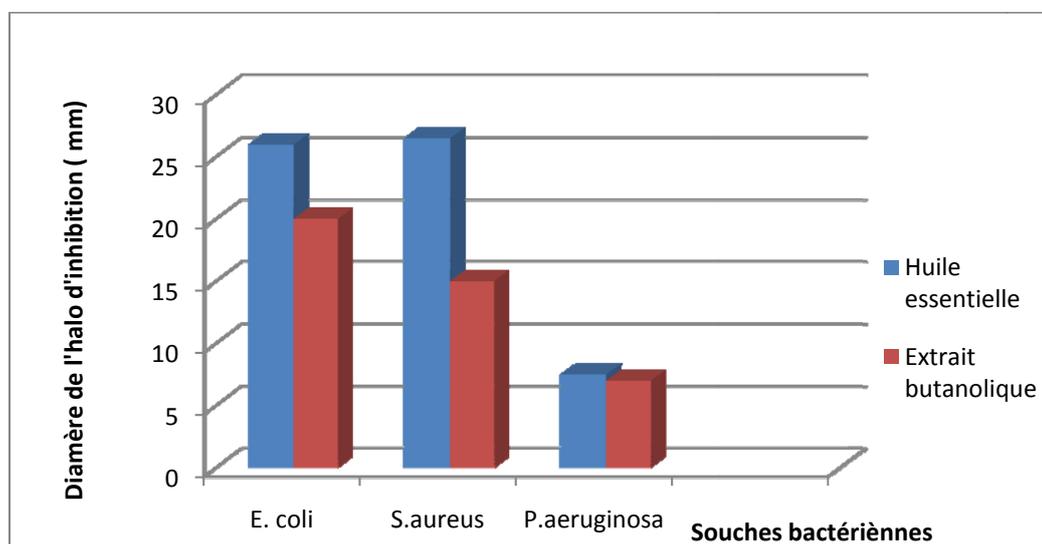
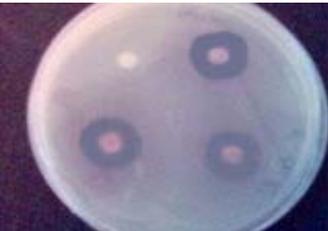
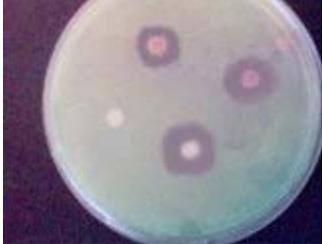


Fig. V.16 : Antibiogramme : indique les antibiotiques qui ont donné les zones d'inhibition suivant les souches bactériennes.

D'après la classification de la sensibilité des germes de Duraffourd ^[59] et les résultats obtenus (Tab V.9 & Fig. V.17), on constate que l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et l'extrait butanolique est forte vis-à-vis *Escherichia coli* et nulle vis-à-vis *Pseudomona*

aeruginosa. Par ailleurs le pouvoir antimicrobien de l'HE de *Saccocalyx satureioïdes* le plus élevé a été observé contre *Staphylococcus aureus*, mais l'extrait butanolique a présenté une certaine activité modérée dont le diamètre de zone d'inhibition n'a pas dépassé le 20mm.

Les extraits naturels Les germes	HE du <i>Saccocalyx satureioïdes</i>	EB du <i>Saccocalyx satureioïdes</i>
<i>Escherichia coli</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Pseudomona aeruginosa</i>		

Tab. V.10 : Aromatogrammes des trois bactéries

Cette disparité de sensibilité a un rapport avec la différence pariétale de ces espèces bactériennes. En effet il a été rapporté dans plusieurs travaux que les bactéries à Gram positif semblent être plus sensibles à l'effet des huiles essentielles que les bactéries à Gram négatif. ^[128] Résultats non confirmés et se trouve entre autre en contradiction avec d'autres travaux où les bactéries à Gram positif seraient plus résistantes aux huiles essentielles que les bactéries à Gram négatif. ^[79] La susceptibilité des bactéries est en effet indépendante du Gram, ^[73] ou dépend des huiles essentielles utilisées. ^[129]

^[128] Duru M.E., and al, (2004), The constituents of essential oil and invitro antimicrobial activity of *Micromeria cilicica* from Turkey, vol.94, Journal of Ethnopharmacology.

^[129] Deans S. G. et G. Ritchie, (1987), Antibacterial properties of plant essential oils, International Journal of Food Microbiology. 5- (162-180).

D'autre part on note d'après nos résultats (Fig. V.17) que l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et l'extrait butanolique semble presque identique. Cela nous laisse penser que le pouvoir antibactérien attribué à l'essence est impérativement dû à son composé majoritaire. En fait l'activité antimicrobienne des extraits naturels est hautement dépendante de leur composition chimique notamment de leurs constituants majoritaires. Beaucoup d'auteurs affirment cette constatation, on cite H.Oumzil et al (2002) dont les résultats annoncent que tout le mérite de la vertu antimicrobienne dont l'huile essentielle de *Mentha suaveoleus* jouit revient à son principal constituant "la pulégone». ^[130]

V.2.2 Effets de l'extrait butanolique sur la levure *Candida albicans* et les deux moisissures : *Aspergillus flavus*, *Aspergillus neiger* :

Le test aussi avec l'extrait butanolique de *Saccocalyx satureioides* à révélé une sensibilité très significative de la levure *Candida albicans* par rapport aux deux moisissures : *Aspergillus flavus* et *Aspergillus neiger* qui ont montré d'après le résultat figurant dans le tableau (V.11) ainsi que la figure (V.18) si dessous, leur forte résistance, cela est confirmé par les deux valeurs de leurs diamètres d'inhibition qui sont respectivement d = 9 mm et d= 11 mm qui indique que la sensibilité des deux moisissures est faible .

souches	Diamètre (mm)
	Extrait butanolique (20µl)
<i>Aspergillus flavus</i>	9mm
<i>Aspergillus neiger</i>	11mm
<i>Candida albicans</i>	19mm

Tab .V.11 : l'activité antimicrobienne de l'extrait butanolique de *Saccocalyx satureioides* sur la levure et les deux moisissures.

^[130] Oumzil H., Ghouami S., Rhajaoui M., Fkih. Tetouani S., Faid M., and Benjouad A ., (2002), Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveoleus*, vol.16, Phytotherapy Research.

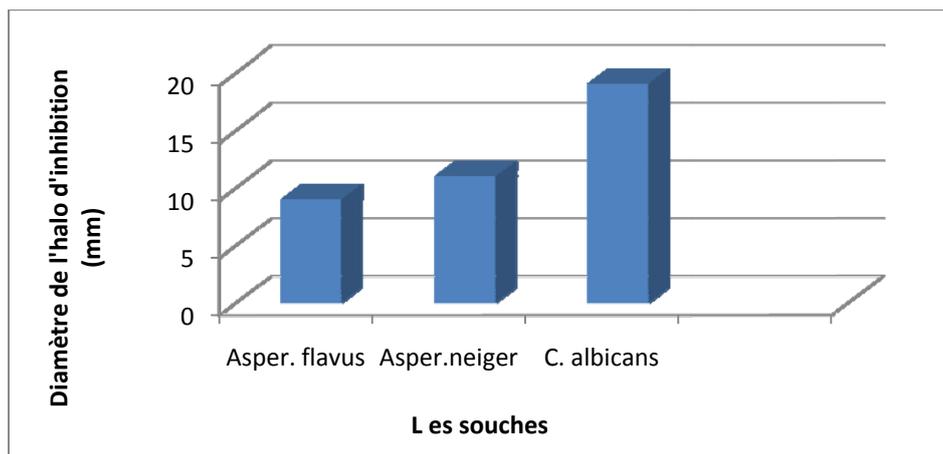


Fig. V.17: Résultats de pouvoir antimicrobien de l'extrait butanolique de *Saccocalyx satureioides*.

L'extrait Germes	EB du <i>Saccocalyx satureioides</i>
<i>Candida albicans</i>	
Aspergillus neiger	
<i>Aspergillus flavus</i>	

Tab .V.12 : AntibioGramme de la levure et les deux moisissures.

Dans la littérature on a trouvé que les travaux de Bendahou Mourad et al (2008), qui ont été réalisés sur l'huile essentielle de *Saccocalyx satureioides* récoltés de l'Ouest de l'Algérie. Cette dernière a montré une activité plus forte contre les levures que les bactéries. ^[120]

Conclusion

Bien que les données recueillies par la littérature sont riches et utiles, les résultats ne sont pas directement comparables à cause des différences méthodologiques : choix des extraits de plante, test des microorganismes et méthodes de test antimicrobien. Sous cet angle, certains auteurs dont Hammer et al. (1999) se sont fixé le but de tester l'activité anti-amibienne d'un large nombre d'huiles essentielles contre une gamme variée de microorganismes tant Gram négatif que Gram positif dont l'intention de créer une base de données directement comparable. ^[131]

^[131] Hammer, K. A., C. F. Carson, et al, (1999), Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *Journal of Applied Microbiology* 86-6: (985 – 990).

Conclusion générale

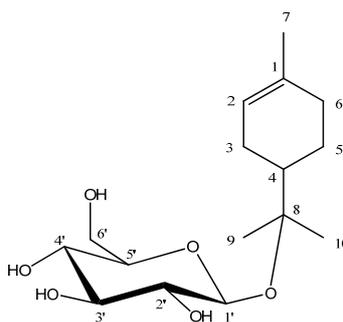
Ce travail nous a permis de découvrir les propriétés emmagasinées dans une plante herbacée endémique qui est *Saccocalyx satureioides* dont on ignorait les qualités et dont la médecine traditionnelle régionale l'enchaînait uniquement dans le cadre d'emménagogue.

L'extraction et l'analyse de l'huile essentielle de *Saccocalyx satureioides* nous a permis de constater :

- Le rendement de l'huile essentielle de cette plante obtenu par hydrodistillation est de 0.92%, c'est un rendement acceptable et satisfaisant
- Les résultats obtenus lors de l'étude de la cinétique ont montré que malgré la durée de traitement relativement longue de cent (100) minutes, nous avons pu atteindre le maximum de rendement après 40 minutes de temps ; de ce fait nous pouvons dire que l'essentiel de l'essence est extrait lors des 20 minutes de traitement et il ne serait économiquement pas avantageux de prolonger l'extraction dans ces conditions au-delà d'une heure.
- L'analyse par CPG/SM de l'huile essentielle de *Saccocalyx satureioides* a révélé la présence de 29 constituants avec un composé majoritaire le **Carvacrol (58.60 %)**.

Les différentes méthodes chromatographique utilisées ont permis l'isolement et la purification d'un seul produit de l'extrait butanolique. Nous avons pu par des méthodes de spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN¹H, RMN¹³C, RMN2D) et la spectrométrie de masse établir la structure de ce composé isolé :

α - Terpineol 8-O- β -D-glucopyranoside.



L'étude phytochimique de *Saccocalyx satureioides* a donnée d'autres composés chimiques d'après les chromatogrammes des plaques CCM. La purification de ces composés c'est avéré très difficile sur les colonnes chromatographiques. Voir même impossible. Les faibles quantités d'autres composés n'ont pas permis de réaliser les analyses spectrales.

Conclusion générale

Le pouvoir antimicrobien de l'extrait naturel de *Saccocalyx satureioides* contre les germes cibles a été mis en évidence par la méthode de disques (diffusion sur gélose), cette technique nous a montré que les deux bactéries : *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* sont sensibles à l'action inhibitrice de l'huile essentielle et l'extrait butanolique, par contre l'activité antibactérienne est nulle vis-à-vis *Pseudomona aeruginosa*.

Le test aussi avec l'extrait butanolique de *Saccocalyx satureioides* a révélé une sensibilité très significative de la levure *Candida albicans* par rapport aux deux moisissures : *Aspergillus flavus* et *Aspergillus neiger* qui ont montré d'après les résultats obtenus leur forte résistance.

A l'issue de notre recherche bibliographique, on constate que très peu d'étude a été réalisée sur cette espèce, donc ces résultats importants nous encouragent de sélectionner cette plante comme source prometteuse pour des études chimiques approfondies afin de caractériser le maximum de molécules naturelles et d'augmenter significativement le nombre de découvertes de nouveaux actifs.

Références bibliographiques

- [1]- Gurib-Fakim A., (2006), Medicinal plants, Tradition of yesterday and drugs of tomorrow, Molecular .
- [2]- Pelt J. M., (2001), Les nouveaux actifs naturels, Marabout-Paris.
- [3]- Ben Ayad N., (2008), Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines ; Moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées, Projet de recherche, Faculté des sciences de Rabat.
- [4]- Teixeira dasilva J. A., (2004), Mining the essential oils of the anthemideae, African journal of biotechnology, 3(12), PP. 706-720.
- [5] - Paris R., Moxse H., (1965), précis de matière médicale, Tome 1, MASSON et Cie, Editeur.
- [6] - Lamarti A., Badoc A., Deffieux G., et Carde J.P., (1994), Biogenèse des monoterpènes, Bull soc, Pharm, Bordeaux, 133,69-118.
- [7]- Bruneton J., (1999), Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales 3^{ième} édition, Tec & Doc et EM inter.
- [8]- Bruneton J., (1987), Elément de phytochimie et de pharmacognosie, Technique et documentation Lavoisier, Paris.
- [9]- Guignard J.L., (1996), Biochimie végétale, Masson, Paris.
- [10] -Gards S. N., Charles R., Kumar S.,1999, A new cyclic monoterpènes glucoside from the capitula of *tagetespatula*, *Fitoterapia*, The journal for the study of medicinal plants, 70, N°5, PP.472-474
- [11]- Randriamiharisoa P. R., (1983), Contribution à l'étude analytique et structurale des différents grades d'huile essentielle *canangium odoratum genuina*, Thèse de doctorat, Université des sciences d'Aisc- Marseille, Marseille.
- [12]- Lamatyr., Menotc., Molangui T., Valade I., Rasoanaivo P., Petitjean A., (1993), Huiles essentielles de quelques plantes aromatiques malgaches. Fifth napreka. Symposium on naturel products. Septembre 19-23 Antananarivo, Madagascar.
- [13]- Ramanandraibe V., (1995), Contribution à l'étude des huiles essentielles de feuilles et de fruits de *pittosporium viridiflorum pittosporaceae*, Mémoire de DEA de chimie organique, Option produits naturels, Faculté des sciences, Université d'Antananarivo, Madagascar.
- [14]- Randriamanantoanina H. C., (1984) ,Extraction d'aromes alimentaires : cas du gingembre, Mémoire d'ingénieur de l'E.E.S.S.A-IAA, Université d'Antananarivo, Madagascar.
- [15]- J. L. Guignard, L. Cosson et M. Henry.,(1985), Abrégé de phytochimie, Masson et cie, Paris, 154-174.
- [16]- Rahal.S., (2004), Chimie des produits naturels et des êtres vivants, O.P.U, Alger, p 162.
- [17]- Bruneton J., (1993), Elément de phytochimie et de pharmacognosie, Technique et documentation Lavoisier, Paris.
- [18] -Burdock, G. A., (2002), Fenaroli's handbook of flavor ingredients, pp.1741-1742 (CRC press, Boca Raton, FL, 2002).
- [19]- Bauer, K. & Garbe, D., (1985), Common fragrance and flavor materials : préparation, properties and uses, pp-55-56 (VCH Gmbh, D-6940 Weinheim, Germany, 1985).

- [20]-Bedoukian P., (1986), perfumery and flavoring synthetic: Allured publishing corporation, Wheatony IL.
- [21] -Belaiche P., (1979), Traité de phytothérapie et d'aromathérapie, Tome 1, Maloine S. A., Paris.
- [22] -Halim A. F., Saad H., E. A., Lahloub, M. F. et Ahmed, Q. F., (1989), Annual congress of the society for medical plant reseach, Braunschweig, Germany.
- [23]- Nait said. N., (2007), Etude phytochimique des extraits chloroformiques des plants : *pituranthos chloranthus* et *marrubium vulgare*, Mémoire de magistère.
- [24]- Govindachrit R., Gopalakrishnan G., Suresh G., (1999), Triterpenoidal constituents of an aqueous extract from neem kernels, Fitoterapia, The journal for the study of medicinal plants 70, N°6, pp 558-560.
- [25]- Gagnault J. C., Bidet D., Gaillard M., Perronnet J., (1997), stérols et stéroïdes, Paris, 11-31, 1997.
- [26]- Ralambomananad A., (1998), Contribution à l'étude chimique de *Senecio myricaefolius Bojer* (compositae) : Composition chimique de l'huile ssentielle, Insaponifiable et alcaloïdes totaux chimio taxonomie du genre *Senecio*, Mémoire de chimie organique, Option produit naturels, Université d'Antananarivo, Madagascar.
- [27] -T. J. Vanderjagt, R. Ghattas, D. J. Vanderjagt, M. Crossey, R. H. Gleixl., (2002), Comparaison of the total antioxidant content of 30 widelyused medicinal plants of new Mexico, Life sciences 70, 1035-1040.
- [28]- A. Kariati, H. Skaltsa, J. Heilmann, O. Sticher., (2003), Acylated flavoroid and phenylethanoid glycosides from *Marrubium velutinum*, Phytochemistry 64,655-660.
- [29]- Dudareva N., Andersson S., Orlova I., Gatto N., Reichet M., Rhodes D., Boland W. et Gershenzon J., (2005), The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers, Ed., Rodney B. Croteau, Washington state university, Pullman, WA. PNAS.102 (3), 933-938.
- [30]- Dubey V.S., Bhalla R. et Luthira R., (2003), An overview of the normevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants, J. Biosci, 28(5), 637-646.
- [31] - Paris M. et al., (1981), Abrégé de matière médicale (pharmacognosie), Tome 1, Masson, Paris.
- [32]- Jens A., Pedersen., (2000), Distribution and taxonomie implication of phynolics in the family Lamiaceae determined byesr spectroscopy, Biochemical systematics and ecology, 28, 229-253, .
- [33]- Stoll A., Renw J., Brack A.,(1950), Isolierung und konstitution des echinacosids, eines glykosods aus denwurzeln von *Echinacea angustifolia* D. C. Helv. Chim.Acta 33, 1877-1893.
- [34]- Endo, K., takahashi, K., Abe T., Hikino H., (1982), Structure of forsythoside B, an antibacterial principale of forsythiakoreana stems, Heterocycles 19,261-264.

- [35]- Naticp A. R. HATAM, Andea and Karlheinz Seifert.,(1995) Polyodonine, a prefuranic labdane diterpene from *Marrubium polydon*, *Phytochemistry*, Vol 40, N°5, pp 1575-1576, .
- [36]- Zadororhny Q. M., Zapesochneya G. G., Pervykh L. N., Shehavlinsky A. N., Kovtum L. S., Svanidze N. V., (1986), Investigation of the herb *Aervalanata* I. O-acylglycosides of flavonoids, *Khimiko- Farmatsevticheskii Zhurnal* 20, 855-858.
- [37] -Savona G., Bruno M., and Rodriguez B., (1984), *Phytochemistry* 23, 191. [38]- Frang J. M., Wang K. C., and Cheng Y. S., (1991), *Phytochemistry* 30, 3383.
- [39]- Rao L. J. M., Kumari G. N. K., and Rao N. S. P. j., (1985),*Nat, Prod.* 48, 150.
- [40]- G. S. Çitaglu F. Aksit.,(2002), Occurrence of Marrubilin and ladanein in *marrubium trachyticum boiss*, from turkey, *Biochemical systematics and ecology* 30, 885-886.
- [41]- Z. Bahernik, M. Mirza and F. Shahmir., (2004),Essential oil of *Marrubium cuneatum Russell* and ist secretory element, *Flavour fragr J.* 19, 233-235.
- [42]- Diamanto M. L., Helen D. S., Theophanis C., (1999), Essential oil of *Marrubium velutinum Sm*, and *Marrubium peregrinum L.*, growing wild in Greece, *flavour fragr J.*, 14, 290-292.
- [43]- Francoise M. N., Sever S., Abdelmajid K., Marie C. J. C., Patrik D. and Francois B., (2004), Natural phenylpropanoids inhibit lipoprotien, induced endothlin-1 secretion by endothelial cells. *JJP*, 56/1607-1611.
- [44]- Cowan M. M., (1999), plant products as antimicrobial agent, *clinical microbiology reviews*, 12 (4), 564-582.
- [45] -Tomoyuki F., Kumiki O., Kazutaka M., Yoshihisa N., and Mitsuru N., (1995), Inhibitory effect of perillosides A and C, and related monoterpene glucosides on aldose reductase and their structure activity relationships, *che. Pharm. Bull.*, Vol 43, N°6, PP 920-926.
- [46]- Johji Y., Hitoshi K., Masaaki K., Toshihiro O., Tokunosuke S., Hajim F., and Takeshi C., (1985), Chalagogic action and characteristics of (+)- α - terpineol- β -D-O-glucopyranoside, a new monoterpene glucoside, *chem. Pharm. Bull.*, Vol33, N°4, pp. 1669-1675.
- [47]-Hiroe k., Akeni S., Yoko M. and Nobuji Nkatani., (2000), Galloylglucosides from berries of *pinenta dioica*, *J. Nat. Prod.*, Vol.63, pp. 749-752.
- [48] -Yoshimi N., Tsutomu W., and Tadataka N., (2002), Studies on the constituents from the serial part of *baccharis dracunculifolia* DC-II, *chem. Pharm. Bull.*, Vol 50, N°5, PP. 583-589.
- [49]- Amira A., Ana-L.pérez-castarina., José Luis V., and Alfonso R., (2006), Cacalol Derivatives from *Roldana angulifolia*, *J.Nat.Prod.*, Vol. 69, PP. 1826-1829.
- [50]- Blanc-Mouchet, J., Ed. (1987). Odeur. L'essence d'un sens. Autrement. Ed, Paris.
- [51]- Franchomme P., D. Penoël, et al. ,(1990), Clefs pour l'aromathérapie . La molécule aromatique ; matière, énergie, information. L'aromathérapie exactement. R.J., Editeur, Limoger.2. (73-227).

- [52]- Smallfeild B., (2001), Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. Crops & Food research, Number 45,4p.
- [53] -Fouché J. G., Marquet A. et Hambuchers A.,(2000), Les plantes médicinales, de la plante au médicament, Observatoire du monde des plantes Sart-Tilman.
- [54] - Frank S. D., Amelio Sr., Botanicals D., (1990), A phytocosmetic desk reference C.R.C., Press Boca Raton, London.
- [55]- SharmA.S., Sanwan N.S. et Sangwan R.S.,(2003), Developmental process of essential oil glandular trichome collopsing in menthol mint, Current science, 84(4-25), 544-550.
- [56]- Rai M.K., Acharya D. et Wadegaonkar P., (2003), Plant derived antimycartics ; potential of a astreraceous plants, current trends and future prospects, Haworth press, N-York, Londin, Oxford,165-185.
- [57]- Porter N. ,(2001), Essential oils and their production, Crop & food Research. Number 39.
- [58]- Kebissi H., (2004), Encyclopédie des herbes et plantes médicinales, Dar Al-Kotob Al-iliyah, Beyrouth-Liban.
- [59]-C.Durfffourd, d’hervicourt L. et Lapraz J.C., (1990), Cahier de phytothérapie. Clinique, examen de laboratoire galénique, éléments thérapeutiques synergiques, Tome 1, 2^{ieme} édition, Masson, paris, P89.
- [60] - Baudoux D., (2000), L’aromathérapie, se soigner par les huiles essentiel. Donc alternative, Dominique Baudoux Biarritz, (221).
- [61] - Pibiri, M. C., C. Seigniez, et al. , (2006), Assainissement microbiologique de l’air et des systèmes de ventilation au moyen d’huiles essentielles et leurs effets sur le bien-être des occupants, Lausanne, LESO, EPFL.
- [62]- Schwammlc B., Winkelhausen E., Kuzmanova S. et Steiner W. , (2001),Isolation of carvacrol assimilating microorganisms. Biotechnol. 39(4), 341-345.
- [63]- Chen C-N, Weng M-S, Wu C-L et Lin J-K., (2004), Comparaison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis introduction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. Ecam. 1(2), 175-185.
- [64] - « Parfum-L’expo », (2002), Le monde magique du parfum, une exposition proposée par la comite français du parfum. Fondation Claude Verdan.
- [65]- Kabouche Z. Boutaghane N., Laggonne S., Kabouche A., Ait Kaki, Benlabed K.,(2005), comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria , vol.15, the international journal of Aromatherapy.
- [66]- Burt, S. A. et R. D. Reinders., (2003), Antibacterial activity of selected plant essential oils against Escherichia coli O 157: H7, Letters in applied microbiology 36-3: (162-167).
- [67]- Moreina M. R., Ponce A. G., del valle C. E., Roura S.I., (2005) , Inhibitory parameters of essential oils to reduce foodbome pathogen , Vol. 38, LWT.

- [68]- Bencheikh H., (2004), contribution à l'étude de la composition chimique, de l'activité antimicrobienne et de la cytotoxicité des huiles essentielles de *Thymus fontanesii* Boiss. et *Rent* et de *Foeniculum vulgare* Miller, Thèse de magistère, université Ferhat Abbas-Sétif (U.F.A.S.), Sétif.
- [69]- Benmansour N.,(2001) , Contribution a l'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* de différentes régions d'Algérie , Thèse de magistère, U.S.T.H.B, Alger.
- [70]- Omzil H., Ghouлами S., Rhajaoui M., Fkih-tetouni S., Faid M. and Benjouad A., (2002), Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveoleus*, vol.16, phytoterapy Research.
- [71]- Lahlou, M., (2004), Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils, *Phytotherapy research* 18- (435-448).
- [72]- Griffin, S.G., S.G. Wyllie et al., (1999) , The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity, *Flavour and fragrance journal* 14- (322-332).
- [73]- Dorman, H.J.D et S.G. Deans (2000) « Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils » *Journal of applied microbiology* 88-2: (308-316).
- [74] - Belghazi L., Lahlou N., Alaoui Ismaili M., Aboussaouira T., Habati N., Tantaoui Iraki A., Talbi M., Blaghen M., Fellat. Zarrook K., (2002), Extraction et analyse par chromatographie en phase gazeuse de l'huile essentielle de la Menthe pouliot test antifongique, *Biochimie et santé*.
- [75]- Chebli Bouchra, M. chouri, L.M.Idrissi Hassani, M.^{ed} Hamamouchi., (2003), Chemical composition and antifungal activity of essential oils of several Moroccan Labiatae against botrytis cinerea pers-Fr, Vol.89, *Journal of Ethnopharmacology*.
- [76] -Daferera D.J., Zioga B.N., Polissiou M.G., (2003) ,The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cineres*, *Fusarium* sp. And *Clavibacter michiganensis*», Vol.22, *Grop protection*. [77] -Cox, S.D., C.M. Mann, et al. , (2000) , The mode of antimicrobial of the essential oils of *Melaleuca alternifolia* tea tree oil, *Journal of applied microbiology*, 88-1,170-175).
- [78] -Hulin V., Mathol A.G., Mafart P. et Dufosse L., (1998), Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arôme, Vol.18, *science des aliments*, pp 563-582.
- [79] -Zaika, L.L., (1988), Spices and herbs-their antimicrobial activity and its determination, *journal of food safety* 9-2: (97-118).
- [80]- Franchomme, P., D. Pénoël, et al. , (1990), Matière médicale aromatique fondamentale. L'aromathérapie exactement. *R. J. Editeur*. Limoges. 4- (317- 446).
- [81]- Mailhebiau, P., (1994), La nouvelle aromathérapie: biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs. Lausanne, (635).

- [82]- Elberling J., Skov PS. Increased release of histamine in patients with respiratory symptoms related to perfume, *Clin exp allergy*-2007 Nov. 37 (11): 1676-80.
- [83]- Jean-Pierre Willem, (2006)., *Les huiles essentielles: Médecine d'avenir*, Edition du Dauphin.
- [84]- Créte p., (1965), *Précis de botanique systématique des angiospermes*, tome II, 2^{ème} édition, Masson, Paris.
- [85] -R-Edouard Spichiger ; V.Savolaineu ; M.Figeat, avec la collaboration de M.Perret., *Botanique systématique des plantes à Fleurs*. 296. Presses polytechniques et univ Romandes.
- [86] -Ozenda, P., (1982) , *Les végétaux dans la biosphère*, .Edition Dom, Paris.
- [87]- Quezel, F. et Santa,S. , (1963) , *Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions Désertiques méridionales*, Vol.1-2 Ed CNRS , Paris, France.
- [88]- K.Miura, H.Kikuzaki, N.Nakatani, J.Agric.,(2002), *Food Chem.*, 50 , 1845.
- [89]- M.D.Guillen, M.J.Manzanos., (1998), *Plant. Food Chem.*, 63, 373.
- [90]-A.Kabouche., (2005), *Thèse de doctorat d'état Chimie*, Université de Constantine, Algérie.
- [91]- T.J.Vanderjagt, R.Ghattas,D.J.Vanderjagt, M.Crossey,R.H.Glew., (2002), *Comparisan of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plant of New Mexico*. *Life Sciences* 70, 1035-1040.
- [92] -G.bonnier. *Flore Complète*. Tome : 09.25-26. *La Végétation de la France, Suisse et Belgique*.
- [93]-Bouhdid.S et al.,(2006). *Biochimie, Substances Naturelles et Environnement* (P 324).
- [94] -Jens A.Pedersen., (2000), *Ditributionand taxonomic implications of fhynolics in the family Lamiaceae determinedby ESR spectroscopy Biochemical Systematics and Ecology*.28, 229-253.
- [95]- H.Ben Jannet, F.Harzallah.Skhiri, Z.Mighri, M.S.J. Simmonds, W.M.Blaney., (2000), *Responses of Spodoptera littoralis Larvae to Tunisian Plant extract to neo-clerodane diterpenoid from Ajuga pseudoiva leaves*. *Fitoterapia*.71, 105-112.
- [96]- H.Itokawa, K.Suto, and K.Takeyo. , (1981), *Studies of Novel.p- coumaroyl glucoside of apigenin and on other flavonoids isolated frompatchouli (Labiatae)*, *Chem.Pharm.Bull*.29 (1), 254-256,.
- [97]- L.J.M.Rao, G.N.K.Kumari and N.S.P.Rao., (1983), *Two further Acylated flavones glucosides from Anisomeles Ovata"*. *Phytochemistry*, Vol.22, N°.4, PP.1058-1060, Printed in Great Britain.
- [98]- Douglas A. Skoog., Holler F.J., Nieman T.A, (2003), *Principes d'analyse instrumentale*, 5^{ième} edition, de boeck diffusion.
- [99]-Tranchant J., Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Vergnol A., Witier P, (1995), *Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse*, 4^{ième} édition, Masson, Paris.

- [100]- De Hoffmann E. Charrette J., and Strobant V., (1999), spectrométrie de masse. Dunold. Paris.
- [101]- Prasain J. K., wang C. C., and Barnes S., (2004), Masse spectrometric method for the determination of flavonoids in biological samples. Free radical biology and medicine 37 (9), 1324-1350.
- [102]- Stobiecki M., (2000), Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. Photochemistry 54 (3), 237- 256.
- [103]- Desjobert J. M. Bianchini A., Tommy P., Costa J. et Bernardini A. F., (1997) , Etude d'huiles essentielles par couplage chromatographique en phase gazeuse, Spectrométrie de masse application a la valorisation de plante de la flore, Vol.25, corse, Analysis.
- [104]- Yrjönen T, (2004), Extraction and Planar Chromatographie Séparation Technique in the Analysis of Natural Products. Conference Room 53 at Viikki Infocentre, Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki. 64P.
- [105]- Latifou.L, (2005), Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises, Thèse de doctorat, Faculté de pharmacie de Strasbourg.
- [106]- Cuyckens F., and Claeys M, (2004), Mass Spectrometry in the structural analysis of flavonoïds. Journal of Mass Spectrometry 39 (4), 1-15.
- [107]- Colombo R., Lancas F.M., and Yariwake J.H, (2006), Determination of flavonoïds in cultivated sugarcane leaves, bagasse, juice and in transgenic sugarcane by liquid chromatography-UV detection. Journal of Chromatography A 1103, 118-124.
- [108]- Merken H.M., and Beecher G.R, (2000), Measurement of food flavonoïds by high-performance liquid chromatography: a review. Journal of Agricultural and Food chemistry 48 (3), 577-599.
- [109]- Davis B.D., Needs P.W., Kroon P.A., and Brodbelt J.S, (2006), Identification of isomeric flavonoïd glucuronides in urine and plasma by metal complexation and LC- ESI-MS/MS. Journal of Mass Spectrometry 41 (7), 911-920.
- [110]- Boudonneu M., (1990), La détection inverse en RMN, Analysis n°1, vol.18.
- [111]- Canet D., (1991), La RMN : Concepts et methodes. Inter édition. Paris.
- [112]- Maes.E., (2002), La résonance magnétique nucléaire (apprentissage à l'interprétation des spectres à une et deux dimensions des chaines O-glycanniques), Edition UMER, Villeneuve d'ascq.p.19-21.
- [113]- Polycopiés de RMN 2D de la société BRUKER (Poly : 1,2 et 3), (1993).
- [114]- Topic in Chemical instrumentation part 3 and 4.2D Methods. W.King and R. Williamss, (1990), journal of chemical. Education. Vol.67, N°4 and N° 5, p (93-99) and (125-137),.
- [115] -Carré P., (1953), Précis de technologie et de chimie industrielle. T₃. Ed. Ballière JB. Et fils
- [116]- AFNOR, (1986), Huile essentielle, l'afnor, Paris.

- [117]- Lahreche.N.,(2005), Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Mentha pulegium L.* et son constituant majoritaire la Pulégone, Thèse d'ingénieur d'état en Agropastoralisme, Université de djelfa.
- [118]- Garnero J., (1991), Les huiles esentielle, leur obtention, leur composition, leur analyse et normalisation, Edition Technique. Encycl. Med : Nat. Paris. France.
- [119]- Sari Madani et al., (2006), Essential oil of Algerian *Saccocalyx satureioïdes Coss.* et *Durieu*, Flavor and fragrance journal, vol.21,n°3, pp.546-548.
- [120]- Bendahou.M et al., (2008), Antimicrobial Activity and Chemical composition of *Saccocalyx satureioïdes Coss.* et *Dur.* Essential Oil and Extract Obtained by Microwave Extraction. Comparison with hydrodistillation, the Journal of essential oil research, vol.20, n°2, pp. 174-178.
- [121]- Mirjana.S., et al, (2006), Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata Vis.* Growing in Croatia, Food Chemistry 96.
- [122]- Gholamreza.M and al., (2005), Essential oil composition and antimicrobial activity of *oliveria decumbens*, Fitoterapia 76.
- [123]- Mladen Milos., (2001), A comparative study of biomimetic oxidation of Oregano essential oil by H₂O₂ or KHSO₅ catalyzed by Fe (III) meso- tetraphenylporphyrin or Fe (III) phthalocynine, Applied Catalysis a General. 216.
- [124]- J. Pala- Paul., et al, (2004), Analysis of the volatile components of *Lavandula canariensis L.*, Mill., a Canary Islands endemic species, growing in Australia, Biochemical Systematic and Ecology 32.
- [125]- S. Fatemeh., et al, (2005), Influence of drying and extraction methods on yield and chemical composition of the essential oil of *Satureja hortensis*, Phytochemistry 66.
- [126]- O. Eminagaoglu., et al, (2007), The invitro antioxidative properties of the essential oils and Methanol extracts of *Satureja spicigera.Boiss.* and *Satureja cuneifoliaten*, Food chemistry 100.
- [127]- Schwämmle., et al, (2001), Isolation of Carvacrol Assimilating Microorganisms. Biotechnol.39 (4), 341-345.
- [128]- Duru M.E., and al, (2004), The constituents of essential oil and invitro antimicrobial activity of *Micromeria cilicica* from Turkey, vol.94, Journal of Ethnopharmacology.
- [129]- Deans S. G. et G. Ritchie, (1987), Antibacterial properties of plant essential oils, International Journal of Food Microbiology. 5- (162-180).
- [130]- Oumzil H., Ghouami S., Rhajaoui M., Fkih. Tetouani S., Faid M., and Benjouad A ., (2002), Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveoleus*, vol.16, Phytotherapy Research.
- [131]- Hammer, K. A., C. F. Carson, et al, (1999), Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, Journal of Applied Microbiology 86-6: (985 – 990).

Annexes

Composition du révélateur de CCM : L'anisaldéhyde

(90g d'Ethanol + 5ml de H₂SO₄ concentré) à 0°C + 5ml de Paranisaldéhyde + 30 gouttes d'acide acétique concentré + (agitation)

Les bactéries à Gram positif et négatif :

Les bactéries à Gram positif et négatif sont mises en évidence par une technique de coloration appelée coloration de Gram. Les bactéries à Gram positif apparaissent mauves au microscope alors Les bactéries à Gram négatif apparaissent roses. La technique de coloration repose sur les caractéristiques membranaires et de paroi de la bactérie. La coloration au Gram est un facteur déterminant dans la taxinomie (classification) bactérienne.

- **Coloration de Gram :**

La coloration de Gram est la méthode de coloration la plus utilisée en bactériologie médicale; elle permet de colorer les bactéries et de les distinguer à l'examen direct par leur aptitude à fixer le violet de gentiane (Gram +) ou la fuschine (Gram -). L'intérêt de cette coloration est de donner une information rapide et médicalement importante.

La coloration de Gram est fondée sur l'action successive d'un colorant d'aniline, le cristal violet, d'iode puis d'un mélange d'alcool et d'acétone. Dans un premier temps, le colorant pénètre dans la paroi et le cytoplasme. Dans un second temps, l'iode réagit avec le colorant et le rend insoluble. La perméabilité plus grande des bactéries à Gram négatif à l'alcool permet la décoloration. Les bactéries à Gram positif restent colorées en violet ou mauve. Une contre-coloration (par exemple en rose) permet de visualiser à nouveau, les corps cellulaires des bactéries à Gram négatif.

Milieux de culture

Préparation pour 1 litre

1- La gélose nutritive (GN) :

- Extrait de viande1.0g
- Extrait de levure.....2.0g
- Peptone.....5.0g
- Chlorure de sodium..... 5.0g
- Agar..... 15.0g
- pH = 7.2 à 7.4

Préparation : 28 g par litre (Stérilisation à l'autoclave)

2- Le Mueller Hinton :

- Infusion de viande de bœuf....300 ml
- Hydrolysate de caséine.....17.5 g
- Amidon.....1.5 g
- Agar-agar.....10 g
- PH = 7.4

3- Gélose de Sabouraud :

- Peptone.....10g
- Glucose massé.....20g
- Agar-agar.....15g
- Vitamines et facteurs de croissance
- pH = 6.0

4- Le Sabouraud-chloramphénicol

- Extrait de levure.....5.0 g
- Glucose.....20.0 g
- Chloramphénicol.....0.1g
- Agar.....11.0 g
- pH = 6.6

Les germes étudiés

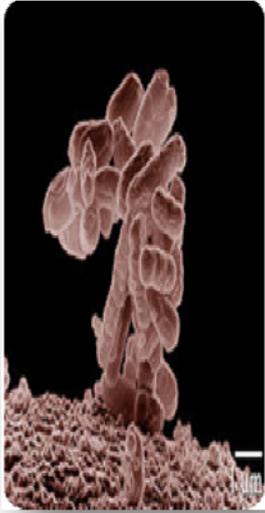


Fig 1 : Escherichia coli



Fig 2: Staphylococcus aureus



Fig 3 : Pseudomonas aeruginosa

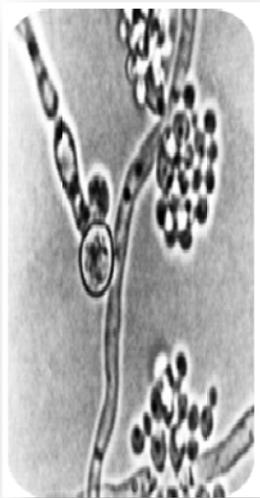


Fig 4 :Candida albicans



Fig 5: Aspergillus niger

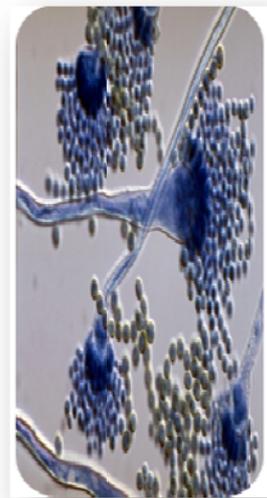


Fig A-3:Aspergillus flavus

تحتوي المستخلصات الطبيعية المستخرجة من النباتات على مختلف منتجات الأيض الثانوية التي لها فعالية ضد نشاط البكتيريا. هذا العمل يركز أساسا على الدراسة الفيتوكيميائية لنبته زعتر الرمل، نبتة مستوطنة بمنطقتنا السهبية، تنتمي إلى عائلة الشفويات و يدخل في إطار البحث على مركبات جديدة ذو فعالية بيولوجية. يتم استخلاص الزيت الطيار لزعتر الرمل بطريقة التقطير المائي و تم تحليله بالكروماتوغرافي في الطور الغازي، شكل الكروماتوغرام بين لنا وجود 29 مكون من بينها الكرفاكرول يمثل الأغلبية بنسبة 58.60 % فصل المركبات و تنقيتها تركز على استعمال المزدوج للطرق الكروماتوغرافية و التحديد البنوي عن طريق استعمال التقنيات الفيزيوكيميائية و الخاصة بالطيفية مثل مطيافية الكتلة و الرنين النووي المغناطيسي سمحت لنا بفصل المركب تربيني من مستخلص البوتانول. اختبارات مضادات البكتيريا و مضادات الفطريات أظهرت بأن الزيت الطيار و مستخلص البوتانول لزعتر الرمل لهما قدرة هامة ضد البكتيريا و الفطريات. **كلمات المفتوحة :** عائلة الشفويات، زعتر الرمل، الزيوت الطيارة، تربان، كرفاكرول، النشاط ضد المكروبات، كروماتوغرافي في الطور الغازي، كروماتوغرافي على ورق رقيق، الرنين النووي المغناطيسي، مطيافية الكتلة و طرق الكروماتوغرافية.

Résumé

Les extraits naturels issus des végétaux contiennent une variété de métabolites secondaires auxquelles on attribue un pouvoir inhibiteur des microorganismes.

Le présent travail, consacré essentiellement à l'étude phytochimique des parties aériennes de l'espèce : «*Saccocalyx satureioides*», une plante sauvage abondante dans notre région steppique qui appartient à la famille des Lamiacées et s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouveaux composés biologiquement actifs qui peuvent trouver une application thérapeutique ou cosmétique.

L'huile essentielle de *Saccocalyx satureioides* obtenue par hydrodistillation est analysée par CPG/MS. Les constituants majeurs sont : Carvacrol (58.60%) ; Linalool (13.15%) ; *P*-cymène (6.68%) ; bornéol (3.47%) ; Carvacrol méthyl éther (3.19%) et le thymol avec un pourcentage de (2.29%).

Les différentes méthodes chromatographique (CCM, LC/MS) utilisées ont permis l'isolement et la purification d'un seul produit de l'extrait butanolique qui est : α -terpinéol-8-O- β -D-glucopyranoside.

La détermination de structure de ce composé a été réalisée par la combinaison de résultats des méthodes spectroscopiques : RMN¹H, RMN¹³C, COSY H-H, HSQC, HMBC et la Spectrométrie de masse.

Des activités antimicrobiennes variables avec l'huile essentielle et l'extrait butanolique de *Saccocalyx satureioides* sur trois souches de bactéries : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomona aeruginosa*, deux espèces de moisissures : *Aspergillus flavus*, *Aspergillus neiger* et une souche de levure *Candida albicans*.

Mots clés : Lamiacées, *Saccocalyx satureioides*, huile essentielle, terpène, carvacrol, pouvoir antimicrobien, CPG, CCM, LC/MS, RMN¹H, RMN¹³C, RMN 2D.

Abstract

The natural extracts resulting from the plants contain a variety of secondary metabolites to which we allot inhibiting of the micro-organisms.

This work mainly devoted to the phytochemical study of aerial parts of the specie: «*Saccocalyx satureioides*», an abundant wild plant in our steppe area which belongs to the family of labiatae and register within the framework of the research for new biologically active compounds which can find an application therapeutic or cosmetic.

Essential oil of *Saccocalyx satureioides* obtained by hydrodistillation is analyzed by CPG/MS. The major components are carvacrol (58.60%); linalool (13.15%); *P*-cymène (6.68%); bornéol (3.47%); carvacrol méthyl éther (3.19%) and thymol with a percentage of (2.29%).

The different chromatographic methods (CCM, LC/MS) used enabled the isolation and the purification of only one product of the butanolic extract which is: α -terpinéol-8-O- β -D-glucopyranoside.

The determination of the structure of this compound has been realized by combining the results of spectroscopic methods: ¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY H-H, HSQC, HMBC and the mass spectrometry.

Variable antimicrobial activities with essential oil and the butanolic extract of *Saccocalyx satureioides* appeared on three strains of bacteria: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomona aeruginosa*, two species of moulds: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus neiger* and a one strain of yeast *Candida albicans*.

Key words: Labiatae, *Saccocalyx satureioides*, essential oil, terpene, carvacrol, antimicrobial activity, CPG, CCM, LC/MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 2D NMR.