

UNIVERSITE BLIDA 1

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire**

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Biotechnologie Végétale

**EXTRACTION DE L'HUILE ESSENTIELLE DE SAPIN DE NUMIDIE
« *Abies numidica* » ET L'ETUDE DE QUELQUES ACTIVITES
BIOLOGIQUES.**

Par

Manel DIRAHOU

Devant le jury composé de :

Mme SAIDI F.	Pr., U. S. D. Blida 1	Présidente
Mme SMAIL-SAADOUN N.	Pr., U. Tizi Ouzou	Examinatrice
Mme TAIL G.	MCA., U. S. D. Blida 1	Examinatrice
Mme KARA F / Z.	Pr., U. S. D. Blida 1	Rapporteur

Juillet, 2017

RESUME

Les plantes médicinales constituent une source immense de métabolites secondaires, dont les huiles essentielles dotées de nombreuses activités biologiques, souvent recherchées dans le domaine phytopharmaceutique et en agro-alimentaire.

L'huile essentielle d'*Abies numidica* L. (sapin de Numidie), une plante endémique à l'Algérie possédant des vertus médicinales, a fait l'objet d'une étude physicochimique et microbiologique.

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydrodistillation. Le rendement obtenu à partir des rameaux feuillés (0,67%) est intéressant. La densité relative à 20° (0.861), l'indice de réfraction (1.475), et la miscibilité à l'éthanol (1 :3) ont été déterminés sur l'huile fraîchement extraite.

Sa caractérisation par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse montre une dominance des composés monoterpéniques (Δ -3-Carene, Caryophyllene, β -Pinene, Limonène et α - Pinene).

L'activité antibactérienne montre une importante efficacité vis-à-vis des souches Gram positives testées. *Staphylococcus aureus* enregistre le plus haut taux de sensibilité. L'activité antioxydante, déterminée par la méthode DPPH a montré que l'huile essentielle a un potentiel antioxydant modéré, comparé à d'autres espèces d'*Abies* cités dans la littérature.

Mots clés : *Abies numidica* L. ; Huiles essentielle ; caractérisation physicochimique, Aromatogramme.

ABSTRACT

The medicinal plants constitute an immense source of secondary metabolites, including the essential oils with many biological activities, often sought in the phytopharmacological field and into agro-alimentary.

The essential oil of *Abies numidica* L. (Numidia tree), a plant endemic to Algeria with medicinal properties, has been a physicochemical and microbiological study.

In this work, the essential oil was extracted by hydrodistillation. The yield obtained from the leafy branches (0.67%) is interesting. The density at 20 ° (0,861), the refractive index (1.475), and miscibility with ethanol (1: 3) were determined on the freshly extracted oil.

GC and GC/MS investigated the composition of the essential oils. The essential oil of *A. numidica* was found to be rich in monoterpenes hydrocarbons (Δ -3-Careens, Caryophyllene, β -Pinene, Limonène and α - Pinene).

The antibactérienne activity shows an important effectiveness with respect to the positive Gram stocks tested. *Staphylococcus aureus* records the most rate of sensitivity. The antioxydant activity, determined by method DPPH showed that essential oil has a moderated antioxydant potential, compared with other species of *Abies* cited in the literature.

Keywords: *Abies numidica* L.; essential oils; physicochemical characterization, Aromatogram.

ملخص

في هذا العمل، الزيت الطيارة المستخلصة من الأغصان المورقة للشح النوميدي، شجرة مستوطنة في الجزائر كانت محل دراسة فيزيوكيميائية و ميكروبيولوجية، كانت محل دراسة فيزيوكيميائية و ميكروبيولوجية.

تم استخلاص الزيت الطيارة بالتقطير المائي، و ذلك بمرود معتبر يقدر بـ67%، اظهرت التحاليل الكثافة تساوي 86,0% في 20 درجة مئوية، و معامل الانكسار 1,475، اما الامتزاز مع الايثانول فهو يعادل (3:1).

التحقيق في التركيب الكيميائي للزيت الطيارة لـ *Abies numidica* عن طريق GC/MS ، بين انها غنية باحادية التربين ، مع (α -Pinene و Limonène, β -Pinene ,Caryophyllene, Carene Δ -3) كونها عناصر رئيسية.

اثبتت الدراسة الميكروبيولوجية فعالية الزيت الطيارة *Abies numidica* ، على الميكروبات ذوات Gram+ المجربة و سجل اكبر نشاط ضد المكورات العنقودية الذهبية.

حدد النشاط المضاد للاكسدة بطريقة DPPH، و اظهر الفحص ان الزيت الطيارة لديها إمكانات مضادة للاكسدة معتدلة بالمقارنة مع الانواع الاخرى.

الكلمات المفتاح: *Abies numidica*، الزيت الطيارة، دراسة فيزيوكيميائية، اروماتوغرام.

À la mémoire de mon très cher et regretté grand-père.

REMERCIEMENT

Ce travail a été réalisé en grande partie au Laboratoire de Recherche de Biotechnologie, Environnement, et Santé au niveau du département de Biologie et Physiologie cellulaire, de la Faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université – Saad Dahlb – Blida 1 sous la direction de Mme le professeur SAIDI F.

Tout d'abord, je tiens à remercier Mme SAIDI F., professeur à l'université Blida 1 et directrice du laboratoire de Recherche de Biotechnologie, Environnement, et Santé pour son accueil au sein du laboratoire.

Mes remerciements les plus vifs s'adressent à ma directrice de mémoire Mme KARA F., professeur à l'université de Blida 1, qui m'a honoré en acceptant de diriger ce travail, je lui exprime mes sentiments de reconnaissance les plus sincères pour sa précieuse aide, ses encouragements et ses conseils et surtout de m'avoir accordé une libre expression de mes idées.

Je tiens à remercier madame SAIDI F. professeur à l'université de Blida 1 pour avoir accepté de présider le jury.

Je remercie madame SMAIL-SAADOUN N., professeur à l'université de Tizi Ouzou, et madame TAIL G., maitre de conférences à l'université de Blida 1 pour avoir accepté d'examiner mon mémoire.

Enfin, à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail veuillez bien accepter ici l'expression de ma gratitude.

TABLE DES MATIERES

RESUME	
REMERCIEMENT	
LISTES DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	
INTRODUCTION	6
CHAPITRE 1: PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	8
1-1 Principales caractéristiques d'Abies numidica	8
1-1-1 Caractères morphologiques.....	8
1-1-2 Position systématique.....	10
1-1-3 Répartition géographique des Abies	11
1-1-4 Écologie du sapin	14
1-2 Principaux intérêts du Sapin de Numidie.....	16
1-2-1 Intérêt écologique.....	16
1-2-2 Intérêt économique.....	16
1-2-3 Intérêt médicinal	17
1-3 Aromathérapie	17
1-3-1 Huiles essentielles	17
1-3-2 Composition chimique des huiles essentielles :.....	19
1-3-3 Notion de chémotype	20
1-3-4 Localisation et lieu de synthèse.....	21
1-3-5 Techniques d'extraction des huiles essentielles	22
1-3-6 Principales propriétés des huiles essentielles	24
CHAPITRE 2: MATERIEL ET METHODES	31
2-1 Matériel biologique et non biologique.....	32
2-1-1 Matériel biologique	32
2-1-1-1 Description du matériel végétal	32
2-1-1-2 Souches bactériennes testées	33
2-1-2 Matériel non biologique	33
2-2 Méthodes d'analyse.....	33
2-2-1 Protocole d'échantillonnage	33

2-2-2 Coupes histologiques	35
2-2-3 Détermination du taux d'humidité de la plante	35
2-2-4 Extraction de l'huile essentielle	35
2-2-5 Détermination de la cinétique et du rendement d'extraction	36
2-2-6 Étude analytique des huiles essentielles	37
2-2-7 Etude chromatographique de l'huile essentielle	39
2-2-8 Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle	40
2-2-9 Etude de l'activité anti-oxydante de l'huile essentielle	43
CHAPITRE 3 : RESULTAT ET DISCUSSIONS	45
3-1 Identification de la plante	45
3-2 Observations microscopiques de la plante.....	48
3-3 Taux d'humidité de la plante.....	51
3-4 Rendement en huile essentielle	52
3-5 Étude de la cinétique d'extraction	53
3-6 Étude analytique de l'huile essentielle	53
3-6-1 Propriétés physico-chimiques.....	54
3-6-2 Propriétés organoleptiques	55
3-7 Étude chromatographique de l'huile essentielle.....	55
3-8 Étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle.....	57
3-9 Etude de l'activité anti-oxydante	64
CONCLUSION.....	66
APPENDICE	68
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE.....	73

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Structure de l'arbre du Sapin de Numidie.....	9
Figure 1.2	Structure des Cônes du sapin de Numidie.....	10
Figure 1.3	Carte de répartition des sapins méditerranéens.....	12
Figure 1.4	Carte de situation géographique du mont Babor.....	13
Figure 1.5	Sapin de Numidie dans son habitat naturel.....	15
Figure 1.6	Isoprène.....	19
Figure 1.7	Coupe transversale d'aiguille de pin.....	22
Figure 2.1	Sapin de Numidie situé au niveau du centre des asthmatiques « Chréa ».....	32
Figure 2.2	Localisation du Parc National de Chréa.....	34
Figure 2.3	Montage de l'hydrodistillation (type clevenger).....	36
Figure 3.1	Port conique d' <i>Abies numidica</i> , de la station Chréa	46
Figure 3.2	Rameaux d' <i>Abies numidica</i> portant des aiguilles sur la face inférieure avec la pousse de l'année	47
Figure 3.3	Rachis et cônes en désarticulation d' <i>Abies numidica</i>	47
Figure 3.4	Aiguilles du sapin de Numidie.....	46
Figure 3.5	Coupe transversale au niveau de l'aiguille du sapin de Numidie (Gx100).....	49
Figure 3.6	Canal résinifère occupant le bord de l'aiguille (Gx100).....	49
Figure 3.7	Faisceau cribro-vasculaire au niveau de l'aiguille du sapin de Numidie (Gx400).....	50
Figure 3.8	Taux d'humidité des rameaux feuillés du sapin de Numidie.....	51
Figure 3.10	Évolution du rendement de l'huile essentielle du sapin de Numidie en fonction du temps.....	53
Figure 3.11	Profil chromatographique de l'huile essentielle des rameaux feuillés du sapin de Numidie.....	56
Figure 3.12	Photos montrant l'effet antimicrobien de l'huile essentielle et de l'antibiotique sur les bactéries Gram +.....	59
Figure 3.13	Photos montrant l'effet antimicrobien de l'huile essentielle et de l'antibiotique sur les bactéries Gram -.....	61

Figure 3.14	Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne.....	63
Figure 3.15	Pourcentage de réduction de DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'huile essentielle.....	64
Figure 3.16	Pourcentage de réduction de DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'acide gallique.....	64

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Huiles essentielles et familles biochimiques.....	24
Tableau 2.1	Transcription des diamètres d'inhibition des disques.....	41
Tableau 3.1	Caractéristiques morphologiques d' <i>Abies numidica</i> de Chréa....	45
Tableau 3.2	Détermination de la teneur en eau	45
Tableau 3.3	Rendement en huile essentielle des échantillons étudiés.....	52
Tableau 3.4	Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle.....	54
Tableau 3.5	Composition chimique de l'huile essentielle du sapin.....	55
Tableau 3.6	Résultats des Aromatogrammes et antibiogrammes des souches bactériennes GRAM +.....	57
Tableau 3.7	Résultats des Aromatogrammes et antibiogrammes des souches bactériennes GRAM -.....	60
Tableau 3.8	Résultats de la CMI, CMB, et la méthode phase vapeur.....	62
Tableau 3.9	Comparaison des coefficients de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et de l'antibiotique utilisé.....	62
Tableau 3.10	Résultats des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations en Huile Essentielle.....	65
Tableau 3.11	Résultats des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations en Acide gallique.....	65

INTRODUCTION

La région méditerranéenne possède une diversité biologique exceptionnelle, sa richesse floristique est estimée à 25000 espèces soit près de 9.2 % de la flore mondiale. La diversité végétale de ses forêts, beaucoup plus accusée que celle des forêts européennes, s'explique par des facteurs paléogéographiques et historiques, mais aussi par des critères écologiques actuels. [1]

La flore algérienne est pour sa part très diversifiée, cette biodiversité est vulnérable en raison notamment des facteurs de dégradation naturels et anthropiques. Plusieurs espèces sont menacées de disparition telles que le cyprès du Tassili, le pin noir, le genévrier Thurifère et le sapin de Numidie. [2]

Le sapin de Numidie (*Abies numidica* Lannoy) est une espèce très rare, menacée, et endémique des monts des Babors et Tababors en Algérie, possédant une forte valeur patrimoniale. Le sapin a un intérêt sylvicole et forestier par la qualité de son bois et phytosanitaire par l'huile essentielle de ses aiguilles. [3]

Les huiles essentielles ont, à toutes époques, occupé une place importante dans la vie quotidienne des hommes qui les utilisaient autant pour se parfumer, aromatiser la nourriture ou même se soigner. La résistance grandissante des bactéries pathogènes aux antibiotiques classiques pose un problème majeur de santé publique. Ainsi la recherche de nouvelles molécules biologiquement actives ne fait qu'augmenter. L'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles est l'une des voies prometteuses à cause de leur efficacité antibiotique avérée. [4]

Afin de valoriser cette plante endémique, en mettant explicitement l'accent sur l'efficacité de l'huile essentielle extraite des rameaux feuillés d'*Abies numidica*, L'étude menée au niveau du laboratoire de recherche de biotechnologie végétale,

à la faculté des sciences de la nature et de la vie, à l'université de Blida, s'est basée sur les étapes suivantes :

- Caractérisation botanique du sapin de Numidie ;
- Extraction et caractérisation chimique de l'huile essentielle de cette espèce.
- Évaluation de l'activité biologique antioxydante et antibactérienne.

CHAPITRE 1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1-1 Principales caractéristiques d'*Abies numidica*

1-1-1 Caractères morphologiques

Les conifères font partie des Gymnospermes, ce sont des plantes ligneuses se présentant surtout sous la forme d'arbres, quelques-unes d'entre elles étant des arbustes. Les sapins sont reconnaissables au mode de fixation des aiguilles sur la tige, à leurs formes qui diffèrent de l'épicéa ainsi qu'à leurs cônes dressés qui se désagrègent à maturité. Ce sont des arbres monoïques à écorce quelquefois ponctuée de vésicules résinifères, à branches verticillées et étagées [2] [5].

Le sapin est un arbre à feuillage persistant et touffu (Figure 1.1), haut d'une vingtaine de mètre et développant une circonférence de 6 m, parfois plus [6]. Son port allongé est extrêmement décoratif, particulièrement au printemps lorsqu'il se couvre de jeunes feuilles d'un vert jaunâtre. C'est un arbre à cime pyramidale, régulièrement conique et très compact [7].



Figure 1.1 : Aspect de la cime du Sapin de Numidie [8].

C'est un arbre pouvant atteindre 25m de hauteur, possède des rameaux vert olive ou brun, les aiguilles des rameaux stériles sont droites, d'une longueur de 15 à 25mm. Les aiguilles des rameaux fertiles disposées en brosse. Les bourgeons sont ovoïdes et pointus d'un brun rouge résineux à la base [2].

Le sapin est constitué de :

- ❖ **Tronc** : Le tronc du sapin est revêtu d'une écorce grise et lisse dans le jeune âge et prend la couleur brune grisâtre et écailleuse dans le vieil âge, avec l'insertion des feuilles sur le tronc, le fut qui est la partie non ramifiée du tronc, est rectiligne, robuste, duquel partent des branches étagées en verticille et disposées à l'horizontal. Ces derniers sont, très ramifiées et pourvues de feuilles de couleur verte foncée ;
- ❖ **Feuilles** : les aiguilles sont raides, toutes tordues à la base. Elles présentent à la face inférieure deux lignes blanchâtres. Les feuilles sont d'une longueur de 0,6 à 2, 4 cm et d'une largeur de 0,5 à 1,5 mm, son épaisseur fluctue entre 0,7 à 0, 8mm. En disposition semi radiale avec un apex arrondi, un peu pointu mais non piquant ;
- ❖ **Cône** : de forme cylindrique, gris brun, à bractée (Figure 1.2). Parvenus à maturité, les cônes se désarticulent laissant sur l'arbre l'axe principal et livrant

au vent les graines, laissant sur l'arbre l'axe principal (rachis). Les cônes femelles sont solitaires ou groupés et sont disposés sur le côté des rameaux les plus hautes, tandis que les cônes mâles sont globuleux de couleur rouge pourpre, situés à la face inférieure des rameaux ;

- ❖ **Graines** : de grosseurs moyennes, très résineuses, de forme triangulaire est munies d'une aile enveloppante rousse luisante [5].



Figure 1.2 : Cônes du sapin de Numidie [8].

1-1-2 Position systématique

Globalement, Il existe environ 630 espèces de conifères et quelques 170 taxons à l'échelle intra-spécifique (sous-espèce et variété), totalisant 800 taxons [13].

Les **Pinaceae** regroupent trois sous familles :

- 1- Les **Laricoideae** regroupent les genres **Pseudolarix**, **Larix** et **Cedrus**.
- 2- Les **Pinoideae** comportent les genres **Pinus**.
- 3- Les **Abietoideae** regroupent les genres ; **Keteleeria**, **Cathaya**, **Pseudotsuga**, **Tsuga**, **Picea** et **Abies** [9].

Le sapin de Numidie est une espèce monoïque classée comme suit :

L'embranchement :	<i>Spermatophytes.</i>
Sous embranchement :	<i>Gymnospermes.</i>
Ordre :	<i>Coniférales</i>
Famille :	<i>Pinaceae</i>
Genre :	<i>Abies</i>
Espèce :	<i>Abies numidica</i> [10].

1-1-3 Répartition géographique des ***Abies***

1-1-3-1 Répartition géographique des ***Abies*** Dans le monde

Le genre ***Abies*** est largement présent dans les forêts tempérées et froides de l'hémisphère nord, il est réparti dans les quatre continents :

- La Sibérie et l'est de l'Asie
- L'Amérique du nord
- Le Mexique et le Guatemala
- La région méditerranéenne [7].

Il compte environ 80 espèces dont près d'une dizaine est endémique au bassin méditerranéen, la répartition des sapins autour du bassin méditerranéen est représentée par la (figure 1.3) [11].



Figure 1.3 : Carte de répartition des sapins méditerranéens [12].

- | | |
|-----------------------------------|--|
| 1: <i>Abies alba</i> ; | 7: <i>Abies nordmanniana</i> ; |
| 2: <i>Abies cilicica</i> ; | 8: <i>Abies equi-trojani</i> ; |
| 3: <i>Abies pinsapo</i> ; | 9: <i>Abies borisii-regis</i> ; |
| 4: <i>Abies numidica</i> ; | 10: <i>Abies nebrodensis</i> ; |
| 5: <i>Abies cephalonica</i> ; | 11: <i>Abies pinsapo</i> var. marocana; |
| 6: <i>Abies bornmuelleriana</i> ; | 12: <i>Abies pinsapo</i> var. tazaotana. |

La répartition des sapins méditerranéens est la suivante :

- ***Abies alba* Mill.** : Le sapin pectiné occupe une aire vaste, elle va des Pyrénées aux Monts Rhodope (Bulgarie), la Corse et le sud de l'Italie entre 400 et 2000 m d'altitude.
- ***Abies cephalonica* Loudon** : le sapin de Grèce (ou de Céphalonie) est endémique des montagnes calcaires de ce pays, il s'étend entre 700 et 1 800 m d'altitude.
- ***Abies nordmanniana* Spach** : il est originaire du nord de la Turquie et de l'Ouest du massif caucasien (Abkhazie, Géorgie), situé entre 900 et 2 100 m.
- ***Abies pinsapo* Boiss** : Le sapin d'Espagne est endémique à l'Andalousie.
- ***Abies cilicica* Carr.** : le sapin de Cilicie est originaire du Taurus en Turquie, du nord du Liban et du nord-ouest de la Syrie entre 1200 et 2100 m ce qui constitue l'aire la plus vaste de ce groupe de sapins après celle d'*A. alba*.

- ***Abies pinsapo* var. *marocana* Ceballos & Bolano** : On ne le rencontre qu'à l'extrême nord du Maroc, dans le Rif, entre 1200 et 2100m sur substrat calcaire.
- ***Abies nebrodensis* Mattei** : le sapin de Sicile est le plus rare conifère européen et l'une des espèces emblématiques pour lesquelles une partie du patrimoine génétique est maintenue en arboretum. On recense 29 individus dont 23 sont fructifères, principalement sur le Mont Scalone entre 1374 et 1690 m [13].

1-1-3-2 Répartition géographique des ***Abies*** En Algérie

Le Sapin de Numidie est une espèce endémique du massif des Babors (Figure 1.4) qui est un prolongement de la crête du Djurdjura à l'est de la Kabylie [2].

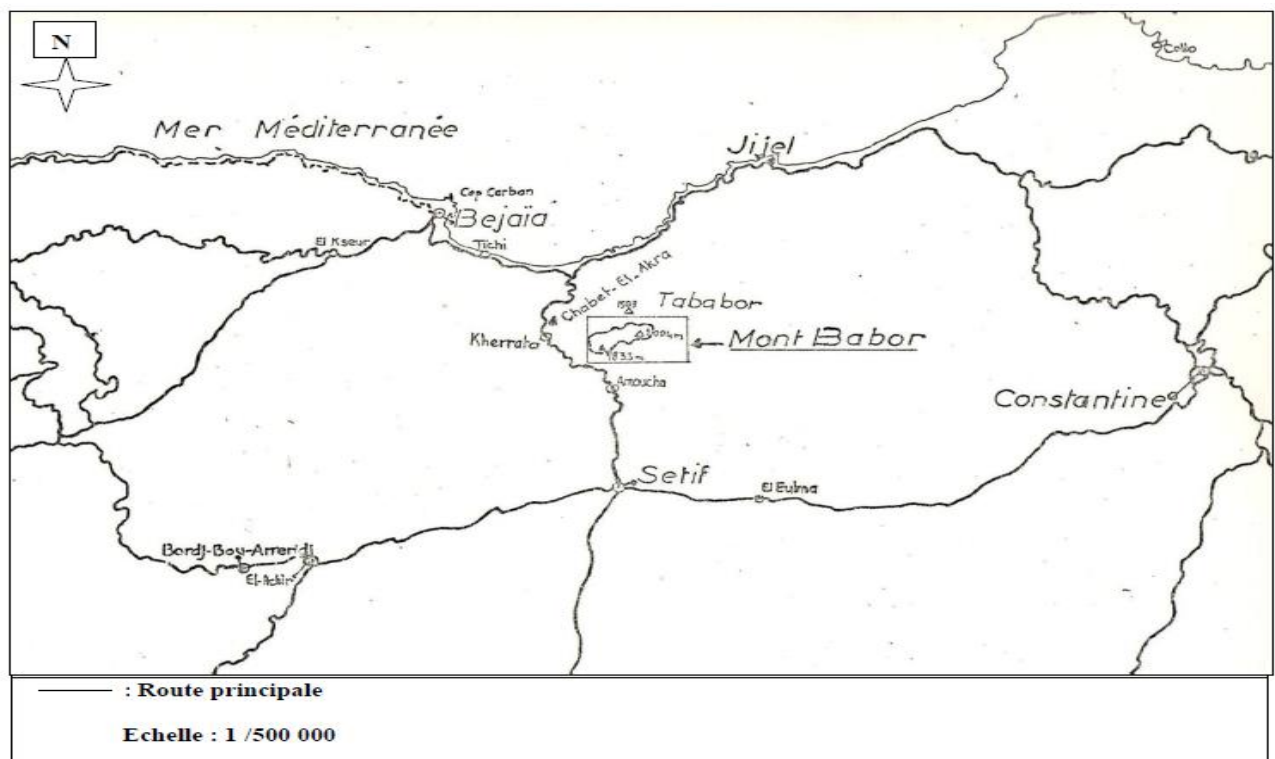


Figure 1.4 : Carte de situation géographique du mont Babors [14].

Abies numidica De Lannoy, appelé aussi le sapin de Numidie ne se rencontre qu'en petites populations dans les montagnes kabyles en Algérie (Monts Babor et Tababor) entre 1 300 et 2000m d'altitude [6].

La totalité de son aire naturelle ne couvre qu'environ 250 hectares. Au Tababors, on ne compte actuellement que quelques pieds rabougris et déformés par la neige et le vent [15].

Actuellement le sapin de Numidie a été introduit à titre expérimental en dehors de son aire naturelle dans certains arboreta et semble avoir des résultats intéressants.

On le trouve à l'arboretum d'el meurdja situé à l'atlas Blidéen, à djbel Ouahch à Constantine, aussi en plantation à l'akfadou (la kabylie), à seraidi (Annaba) et à Hakou Feraoune (parc national de Chréa). A l'étranger, ce conifère a été introduit en France en 1862 à l'arborétum des barres [15] [9].

1-1-4 Écologie du sapin

En Algérie, plusieurs espèces sont en voie de disparition. Parmi elles : on trouve le Cyprès du Tassili, le Pin noir, le Genévrier Thurifère et le sapin de Numidie, selon le rapport établi par l'Union internationale pour la conservation de la nature (UICN) en 2008 [2].

Le Sapin de Numidie a une aire de répartition dans l'étage montagnard humide et en mélange avec le chêne zeen (figure 1.5) [2].

Cette espèce est menacée par l'exploitation sauvage d'une part, et du pâturage qui détruit les régénérations d'arbres de plus en plus vieillissants et donc de moins en moins fructifères d'autre part.

En effet, parmi les taxons qui existent, 355 provoquent des inquiétudes quant à leurs protections, en tout 200 taxons sont menacés d'extinction [13].



Figure 1.5 : Sapin de Numidie dans son habitat naturel [8].

1-1-4-1 Altitude

Le sapin est une espèce de haute montagne, résistant au froid et à la sécheresse. Il fait son apparition à partir de 1650 mètre d'altitude et monte jusqu'à 2000 mètre d'altitude en se mélangeant à d'autres résineux (Cèdre de l'atlas, l'if) et à d'autres feuillus (Chêne zeen, tremble, érable, houx) [6].

Il peut pousser au-dessous de sa limite altitudinale inférieure naturelle si on prend la précaution de placer aux expositions fraîches (zones de l'atlas tellien, zones littorales, zones des Aurès) [9].

1-1-4-2 Bioclimat

Généralement les sapins méditerranéens sont exigeants du point de vue hydrique, et paraissent cantonnés en bioclimat humide, voire perhumide et exigent des précipitations annuelles moyennes supérieures à 1000 mm/an dans leur aire d'origine [1]. L'espèce occupe l'étage bioclimatique humide avec des précipitations importantes entre 800 mm et 1500 mm par an. Les températures minimales varient entre -2,2°C et 1,5°C et les moyennes maximales entre 25,8°C et 29°C [16].

1-1-4-3 Substrat

Les Sapins sont généralement indifférents à la nature de la roche mère, ils aiment par contre les sols superficiels bien alimentés en eau ou suffisamment fissurés et craignent les sols compacts surtout s'ils ont tendance à être mouilleux. Les sapins méditerranéens dont l'aire est suffisamment vaste poussent sur des substrats de type variés : calcaires, marnes, schistes, roches éruptives, et grès [17]. *Abies numidica* s'accommode bien aux sols calcaires dolomitiques, neutres ou légèrement alcalins (PH entre 7 et 8) [18] [19].

1-2 Principaux intérêts du Sapin de Numidie

1-2-1 Intérêt écologique

Les sapins jouent un rôle écologique majeur, ils atténuent les effets négatifs des facteurs climatiques (lumière, température, pluie, vent) sur la végétation.

La sapinière est plus fraîche en été que la forêt feuillue, et les gelées y sont moins rudes en hiver, le sapin joue un rôle régulateur de température [20].

1-2-2 Intérêt économique

Par ailleurs, certains sont importants pour la production de bois en dehors de leur aire de répartition naturelle. D'autres sont très appréciés comme plantes ornementales dans les plantations paysagères. De plus, en raison de leur forme

conique naturelle, de leur couleur et de la solidité de leurs branches capables de porter des objets décoratifs, les sapins sont parfaitement adaptés pour une utilisation comme arbre de Noël [21].

1-2-3 Intérêt médicinal

Les sapins ont dû développer des métabolites secondaires pour pouvoir supporter la rudesse des hivers du grand Nord. Et c'est des aiguilles de ces poumons de la nature que l'on tire des huiles essentielles réputées notamment pour traiter les infections des voies respiratoires.

Recommandée en cas de bronchite, de rhume, de grippe ou d'angine, les huiles essentielles de Sapin possèdent des vertus expectorantes qui permettent de fluidifier les sécrétions bronchiques. Leur propriété anti-infectieuse les rend également efficaces contre les sinusites et les rhinites et leur confère un fort pouvoir antiseptique aérien.

Parmi tous les conifères, l'huile essentielle de sapin est de loin la plus utilisée, elle est très appréciée en aromathérapie [22].

1-3 Aromathérapie

Le terme « aromathérapie », issu du latin « aroma = odeur » et du grec « therapein = soin », fut créé en 1928 par un chercheur lyonnais, Monsieur Gattefossé René-Maurice. L'aromathérapie est l'utilisation des huiles essentielles à des fins médicales [23].

1-3-1 Huiles essentielles

Depuis longtemps, les hommes avaient cherché le moyen de séparer les éléments huileux des produits aromatiques. Ils réussirent en soumettant la matière à l'action de la chaleur. Les substances aromatiques étaient transformées en

vapeur, il suffisait de les recueillir et de les refroidir pour les obtenir sous forme liquide. Ce procédé qui se faisait à feu nu, prit le nom de distillation [24].

Il s'agit d'un mélange de composés lipophiles, volatils et souvent liquides, synthétisés et stockés dans certains tissus végétaux spécialisés.

Extraites de la plante grâce à des procédés physiques tels l'hydro distillation, l'entraînement à la vapeur ou par expression à froid dans le cas des agrumes, les huiles essentielles sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante.

Les produits obtenus par extraction avec d'autres procédés ne sont pas repris dans la définition d'huile essentielle donnée par la norme de l'Association Française de Normalisation (AFNOR) [25].

Leurs caractères physiques sont les suivants :

- ❖ les HE sont âcres, inflammables et très odorantes.
- ❖ Elles sont solubles dans l'alcool, l'éther, les huiles fixes, insolubles dans l'eau à laquelle elles communiquent leurs odeurs.
- ❖ Elles sont dextrogyres ou lévogyres et rarement inactives sur la lumière polarisée.
- ❖ Leur point d'ébullition varie de 160°C à 240°C et leur densité de 0,759 à 1,096 [25].

Les huiles essentielles sont décrites comme les « liquides volatils, la plupart du temps insolubles dans l'eau, mais librement solubles dans l'alcool, l'éther et les huiles végétales et minérales. Elles sont habituellement non huileuses au contact de la peau. Leurs composants peuvent être regroupés en six classes selon leur structure chimique :

- Les hydrocarbures, tel que le limonène dans l'huile de citron ;
- Les alcools, tel que le bornéol dans le camphrier de Bornéo ;
- Les esters, tel que le salicylate de méthylrique dans l'huile de wintergreen ;
- Les aldéhydes, tel que l'aldéhyde benzoïque dans l'huile d'amandes amères ;
- Les cétones, telle que la menthone dans l'huile de menthe poivrée ;
- *Les lactones et oxydes, telle que la coumarine des haricots de Tonka. »* [26].

1-3-2 Composition chimique des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont de très complexes mixtures naturelles qui contiennent jusqu'à 20-60 composés à des concentrations différentes. Ils sont caractérisés par deux ou trois composés majoritaires avec des concentrations nettement élevées (20-70%) par rapport aux autres composés présents en faible quantité. Généralement, les composés majoritaires déterminent les propriétés biologiques des huiles essentielles [27].

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles révèle qu'il s'agit de mélanges complexes et variables de constituants appartenant exclusivement à deux groupes : les terpénoïdes et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane [28].

Les terpènes sont des hydrocarbures résultant de la combinaison de plusieurs unités d'isoprène (C₅H₈) (Figure 1.6). Les constituants sont principalement des monoterpènes et des sesquiterpènes de formule générale (C₅H₈)_n, ce sont des hydrocarbures ayant respectivement dix et quinze atomes de carbone. Ils peuvent être saturés ou insaturés, acycliques, monocycliques, bicycliques ou polycycliques. Ils peuvent également être accompagnés de leurs dérivés oxygénés.

Les composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures incluent des alcools, des aldéhydes, des esters, des éthers, des cétones, des phénols et des oxydes. On estime qu'il y a plus de 1000 monoterpènes et 3000 de structures sesquiterpènes. D'autres composés incluent des phenylpropanes et des composés spécifiques contenant le soufre ou l'azote [29].

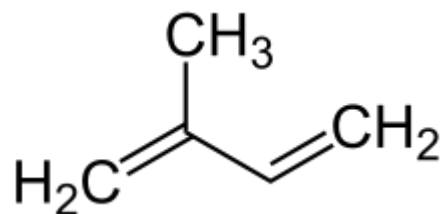


Figure 1.6 : Isoprène [29].

Les monoterpènes sont presque toujours présents, ils peuvent être acycliques (terpinène, cymène) ou bi cycliques (pinène, camphène, sabinène).

Ils constituent parfois plus de 90 % de l'huile essentielle (citrus, térébenthines), tandis que Les sesquiterpènes sont de structures très diverses (C15), Ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés : les carbures, les alcools et les cétones sont les plus fréquents [30].

Contrairement aux dérivés terpéniques, les composés aromatiques sont moins fréquents dans les huiles essentielles. Très souvent, il s'agit d'allyle et de propénylphénol. Ces composés aromatiques constituent un ensemble important car ils sont généralement responsables des caractères organoleptiques des huiles essentielles. Nous pouvons citer en exemple l'eugénol qui est responsable de l'odeur du clou de girofle [31]. La structure des composés des huiles essentielles est constituée d'un squelette hydrocarboné, formant 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, pour quelques groupes fonctionnels azotés ou soufrés [32].

1-3-3 Notion de chémotype

Un chémotype définit la molécule aromatique révélatrice des principales propriétés thérapeutiques de l'huile essentielle. Une plante de même variété botanique peut produire des huiles essentielles de compositions chimiques différentes selon son origine, son pays, son climat, son sol.

Une huile essentielle peut contenir de vingt-cinq à cent molécules biochimiques différentes. Ce qui explique la polyvalence d'action des huiles essentielles. On effectue une chromatographie en phase gazeuse liée à une spectrométrie de masse pour identifier et quantifier chacune de ces molécules et connaître ainsi la composition précise des huiles essentielles [33].

1-3-4 Localisation et lieu de synthèse

La synthèse des huiles essentielles peut avoir lieu dans toutes les parties de la plante, à savoir :

- Les fleurs : oranger, rose, lavande ; le bouton floral (girofle) ou les bractées (ylang-ylang) ;
- Les feuilles le plus souvent : eucalyptus, menthe, thym, laurier, sauge, aiguilles de pin ;
- Les organes souterrains : racines, rhizomes (gingembre) ;
- Les fruits : fenouil, anis, épicarpes des Citrus ;
- Les graines : noix de muscade, coriandre ;
- Le bois et les écorces : cannelle, bois de rose ;
- Les poils sécréteurs épidermiques rencontrés souvent chez les Lamiacées. Ils produisent les essences dites superficielles ;
- Les organes sécréteurs sous-cutanés comprenant des cellules et des poches sécrétrices qui sont généralement disséminées au sein du tissu végétal chez les Myrtacées, ainsi que les canaux sécréteurs chez les Apiacées et les Pinacées [34].

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : feuilles, fleurs, écorces, bois, racines, rhizomes, fruits et graines.

La synthèse et l'accumulation sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante : cellules à l'huile essentielles des Lauraceae ou des Zingiberaceae, poils sécréteurs des Lamiacées, des poches sécrétrices des Rutaceae, et canaux sécréteurs des Pinaceae (figure 1.7) [35].

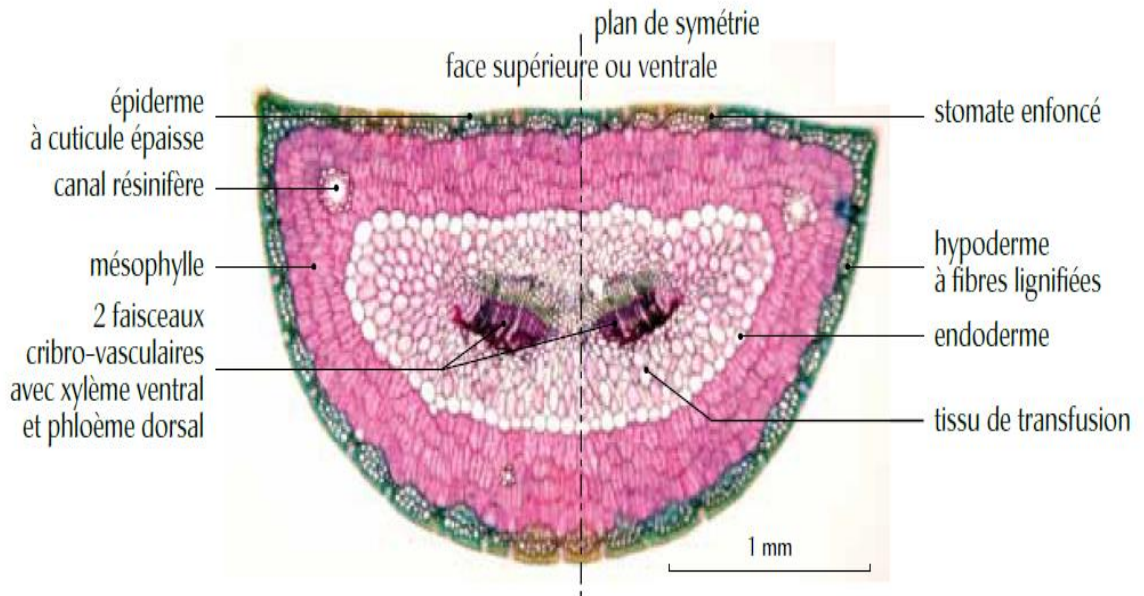


Figure 1.7 : Coupe transversale d'aiguille de pin [36].

1-3-5 Techniques d'extraction des huiles essentielles

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales, cette diversité est due à la variété des matières premières et à la sensibilité considérable de certains de leurs constituants.

- Hydro-distillation simple

Ce mode d'extraction a été proposé par Garnier en (1891), c'est la méthode la plus utilisée pour extraire les huiles essentielles et pouvoir les séparer à l'état pur mais aussi de fournir de meilleurs rendements. Le principe consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité [37].

- Entrainement à la vapeur

Cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter, la vapeur d'eau fournie traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle [38].

- Expression à froid

L'expression à froid est réservée à l'extraction des composés volatils dans les péricarpes. Il s'agit d'un traitement mécanique qui consiste à déchirer les péricarpes riches en cellules sécrétrices [39].

- Extraction par solvant

La technique d'extraction par solvant, consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique [38].

- Enfleurage

L'enfleurage est une ancienne méthode d'extraction manuelle des essences, complexe et très couteuse. Elle est utilisée essentiellement pour les végétaux dont l'arôme est trop fragile pour supporter d'autres méthodes d'extractions. C'est le cas du Jasmin, du narcisse et du muguet [40].

- Extraction par CO₂ supercritique

Le CO₂ à l'état supercritique traverse la matière première et se charge en soluté. L'ensemble est acheminé vers un ou plusieurs séparateurs, où le CO₂ est progressivement décomprimé, perdant ainsi son pouvoir solvant. Le soluté est « libéré » et le CO₂ peut alors être recyclé [41].

L'avantage de cette méthode est la possibilité d'éliminer et de recycler le solvant par simple compression détente. De plus, les températures d'extraction sont basses dans le cas de dioxyde de carbone et non agressives pour les constituants les plus fragiles. A ces différents avantages s'ajoutent ceux de l'innocuité, d'inertie et d'inflammabilité de CO₂ [42].

- Extraction assistée par micro-ondes

Les premiers travaux utilisant les micro-ondes pour extraire des composés organiques ont été publiés en 1986. Depuis cette date, l'extraction végétale assistée par micro-ondes a été le fruit de nombreuses recherches et de brevets [38].

1-3-6 Principales propriétés des huiles essentielles

Le tableau 1.1 montre la caractérisation des principaux composés majoritaires identifiés dans quelques huiles essentielles.

Tableau 1.1 : Huiles essentielles et familles biochimiques [43].

Famille	Action pharmacologique	Exemple de principe actif	Exemple d'huile essentielle
Monoterpènes	Antiseptique	Limonène α et β pinène	Pin sylvestre Sapin Genevrier
Sesquiterpènes et Azulènes	Anti-inflammatoire Anti histaminique	Bisabolène Chamazulène	Matricaire
Phénols	Bactéricide, virucide Fongicide Immunostimulant	Thymol Carvacrol Eugénol	Thym à thymol ou carvacrol Sariette Giroflie

Alcools monoterpénique	Bactéricide, virucide Antifongique	Linalol Géraniol α Terpineol Menthol Bornéol	Arbre à thé Menthe poivrée Géranium
Alcools sesquiterpéniques	Tonique Décongestionnant Veineux et lymphatique	Farnésol Viridifloral Cédrol	Niaouli Cyprés
Aldéhydes monoterpéniques	Anti-inflammatoire Anti hypertensif Sédatif Antiviral antimycosique	Citral Geranial	Mélisse Eucalyptus
Aldéhydes aromatiques	Anti infectieux Antalgique Sédatif	Aldéhyde cinnamique Aldéhyde cummique	Cannelle Cumin
Cétones	Faible dose: mucolytique Cholagogue Cholérétique	Mentone Carvone, Camphre Thuyone, Pinocamphone	Carvi, Saugé Menthe poivrée Romarin à camphre
Esters	Antispasmodique Anti inflammatoire	Acetate de linalyle Acetate de geranyle Acétate de méthyl	Lavande Carotte, sauvage
Coumarines	Sédatifs Anticoagulants Spasmodiques	Coumarine Bergaptène	Citrus
Composés soufrés	Antibactériennes Antiparasitaires	Composés soufrés	Ail Oignon

Les huiles essentielles sont reconnues depuis l'antiquité pour leurs puissantes propriétés thérapeutiques : activités antiseptiques, anti-infectieuses, antiparasitaires, antivirales... [44].

1-3-6-1 Anti-infectieuses

➤ Antibactériennes : Grâce à la pratique des aromagrammes, la connaissance des molécules porteuses de l'activité antibactérienne est essentielle. Les molécules possédant le pouvoir antibactérien le plus élevé sont (par ordre décroissant) : le carvacrol, le thymol et l'eugénol. Elles appartiennent toutes trois au groupe des phénols. Une molécule n'appartenant pas au groupe des phénols mais apparentée par la présence d'un noyau benzénique, l'aldéhyde cinnamique, possède une activité anti-infectieuse comparable à celle des phénols. On l'a retrouvée notamment dans l'huile essentielle de Cannelle de Chine et Ceylan.

Dans la hiérarchie anti-infectieuse, les monoterpénols se situent immédiatement après les phénols. Leur liste est plus étendue : géraniol, linalol, thujanol, myrcénol, terpinéol, menthol et pipéritol sont les plus connus. Elles présentent une fiabilité certaine et un spectre d'action assez large.

Elles seront utiles dans de nombreux cas d'infections bactériennes. Le groupe des aldéhydes manifeste également une certaine puissance antibactérienne : néral et géraniol (qui forment les citrals), citronnellal et cuminal sont les plus souvent employés.

Le groupe des cétones présente un intérêt dans le traitement des états infectieux mucopurulents : verbénone, thujone, bornéone (camphre), pinocamphone, cryptone, fenchone, menthone, pipéritone, carvone sont très utilisés dans l'aromathérapie.

Les éthers possèdent une action antibactérienne certaine, L'estragole et l'anéthole sont ici les molécules les plus représentatives de ce groupe.

Les oxydes présentent en général des propriétés anti-infectieuses légères. Les phtalides développent une activité antibactérienne non négligeable, c'est le cas de l'huile essentielle de graines de céleri.

Les terpènes peuvent être intéressants mais leur utilité en ce domaine se révélera plutôt sous forme aérodiffusée par une action antiseptique.

Les autres groupes moléculaires ne présentent pas d'intérêt dans le cadre de la lutte antibactérienne.

- Antifongiques : Les groupes moléculaires cités en priorité pour leur action antibactérienne se révèlent également actifs sur les champignons. Néanmoins, la durée d'un tel traitement sera plus longue que pour celle d'un traitement antibactérien.

Exemple : les huiles essentielles de Cannelle, de Palmarosa, de Clou de girofle et de Niaouli sont des antifongiques.

- Antiparasitaires : Comme c'est le cas dans la lutte contre les bactéries, les phénols manifestent une action puissante à l'encontre des parasites.

Les monoterpénols sont ici d'une efficacité proche de celle des phénols. Certains oxydes comme l'ascaridole contenu notamment dans l'huile essentielle de Chénopode sont très spécifiques de la lutte antiparasitaire, et constituent de bons antihelminthiques.

Les cétones, quant à elles, possèdent une réputation antiparasitaire bien établie mais nécessitent des précautions d'emploi en raison de leur toxicité.

- Antiseptiques : Les molécules aromatiques sont capables de détruire les germes infectieux, et de s'opposer à leur prolifération tant dans les organismes vivants que dans l'environnement.

Dans ce dernier cadre, outre les aldéhydes particulièrement actifs sur les bactéries sporulées, les terpènes sont réputés pour leurs propriétés désinfectantes atmosphériques.

En ce qui concerne la désinfection des locaux recevant des malades, en particulier les salles de réanimation et les chambres de malades contagieux, on peut faire appel aux huiles essentielles phénolées sous forme d'aérosols. Les alcools associés au cinéole, comme c'est le cas dans l'huile essentielle d'Eucalyptus radié, sont intéressants en période hivernale pour l'assainissement de l'air des habitations.

- Insecticides et insectifuges : Une dizaine d'huiles essentielles, dont les composants appartiennent à diverses familles chimiques, sont utilisées dans la lutte biologique : le citronnellal contenu par exemple dans l'huile essentielle d'Eucalyptus citronné et de Citronnelle de Ceylan, l'eugénol contenu par exemple dans le clou de Girofle, l'aldéhyde cinnamique contenu par exemple dans l'huile essentielle de Cannelle de Ceylan.

1-3-6-2 Anti-inflammatoires

Les molécules aromatiques sont susceptibles d'agir de différentes manières sur l'inflammation. Les molécules porteuses de charges négatives sont actives en compensant la perte d'électrons des tissus enflammés : le chamazulène issue de l'huile essentielle de Matricaire par exemple agit de cette manière. Il possède également une action antihistaminique remarquable utile dans certaines formes d'allergie et en particulier l'asthme.

Par voie interne, les aldéhydes comme les citrals, le citronnellal, le cuminal par exemple sont doués de propriétés immunomodulantes secondairement actives dans la lutte contre les états inflammatoires.

1-3-6-3 Régulatrices du système nerveux

- Antispasmodiques : Deux groupes moléculaires sont à retenir en priorité dans ce cadre : les éthers et les esters.

Les éthers, de charge positives, possèdent une action antispasmodique puissante et fiable mais peu nuancée alliée à une activité analeptique.

Les esters, quant à eux, porteurs de charges négatives, présentent les caractéristiques de cette classe électrique : calmantes et anti-inflammatoires. Leur action antispasmodique est plus nuancée.

- Calmantes, anxiolytiques et hypnotiques : Les aldéhydes, comme les citrals de la verveine citronnée et de la mélisse officinale, les éthers et les esters, sont utilisés par les praticiens de la santé dans le but de calmer les patients

stressés. Certaines études signalent une activité anxiolytique et hypnotique du linalol, certains composés azotés comme l'antranylate de méthyle contenu dans les feuilles et les zestes de mandarine développent également des propriétés anxiolytiques.

- Analgésiques, antalgiques : L'eugénol contenu par exemple dans l'huile essentielle de clou de girofle est un spécifique bien connu des algies dentaires.

Moins connue, l'huile essentielle extraite des feuilles de Laurier noble présente une activité plus grande encore liée à la présence de dérivés de ce phénol tout à fait particulier (tout à la fois phénol et phénol méthyl-éther).

Le menthol est spécifique des algies céphaliques, mais il est également très efficace en application in situ immédiatement après un choc.

Le paracymène est un antalgique percutané bien connu, utile dans les algies tendino-musculaires et ostéo-articulaires.

1-3-6-4 Drainantes respiratoires

- Expectorantes : Les huiles essentielles riches en 1, 8 cinéole comme l'huile essentielle d'Eucalyptus globuleux ou de Romarin à cinéole agissent sur les glandes bronchiques et sur les cils de la muqueuse bronchique ce qui fait d'elles de très bons expectorants.
- Fluidifiantes : Dans le cadre de traitement anti-infectieux où il est important de dissoudre d'éventuelles sécrétions accumulées au niveau des revêtements muqueux, les molécules cétoniques et plus encore lactoniques donnent le moyen d'y parvenir. La verbénone, la thujone, la carvone, la cryptone, la pulégone, la menthone, la pipéritone et la pinocamphone sont des exemples de molécules de première importance.

1-3-6-5 Digestives

Diverses molécules aromatiques sont susceptibles de stimuler l'appétit, et de faciliter la digestion. Ainsi, le cuminal contenu par exemple dans l'huile essentielle de Cumin stimule les glandes digestives. La menthone, la carvone et la verbénone activent la circulation au niveau des voies hépatobiliaires. Le menthol et le thujanol sont de bons stimulant hépatocytaires. Les phtalides quant à eux interviennent dans le cycle de détoxification hépatorénal.

1-3-6-6 Cicatrisantes

Les huiles essentielles cicatrisantes sont les huiles essentielles de Ciste, de Lavande vraie, d'Immortelle, de Myrrhe. Leur propriété cicatrisante s'explique par la présence de cétones capables d'accélérer la vitesse de réparation tissulaire. On utilise souvent un mélange de plusieurs huiles essentielles cicatrisantes avec une huile végétale comme l'huile d'amande douce.

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

Le but de notre travail est de valoriser l'espèce endémique *Abies numidica* qui a été introduite au sein du parc national de Chréa.

Nos travaux ont été réalisés au niveau du laboratoire de recherche de biotechnologie végétale, à la faculté des sciences de la nature et de la vie, à l'université de Blida.

Cette partie expérimentale se divise en deux axes de recherche :

Le premier axe :

- L'extraction des huiles essentielles de l'espèce végétale.
- L'étude des propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle extraite.
- La Caractérisation de l'huile essentielle du sapin de Numidie par la chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (CPG-SM).

Dans le deuxième axe :

- L'étude du pouvoir antibactérien de cette huile essentielle sur des souches bactériennes à Gram (+) et à Gram (-) par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB), après la solubilisation de l'huile essentielle dans un émulsifiant, DMSO.
- L'étude du pouvoir antioxydant par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH.

2-1 Matériel biologique et non biologique

2-1-1 Matériel biologique

2-1-1-1 Matériel végétal

Les rameaux feuillés, fraîchement récoltés situés au niveau du centre des asthmatiques (Chréa) sont séchés à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant environ 20 jours.

Devenues secs, ils sont récupérés dans des sacs propres pour servir ultérieurement à l'extraction de l'huile essentielle du sapin de Numidie (Figure 2.1).



Figure 2.1 : Sapin de Numidie situé au niveau du centre des asthmatiques « Chréa ». (Original 2014)

2-1-1-2 Souches bactériennes testées

Les souches bactériennes utilisées dans notre étude sont des germes pathogènes, (*Bacillus subtilis* ATCC 93 72, *Staphylococcus aureus* ATCC 65 38, et *Bacillus cereus* ATCC 10 876) pour les souches à Gram positif, (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27 853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 43 52, et *Salmonella typhimurium* S : P.1.VB) pour les souches à Gram négatif, elles font parties de la collection ATCC (American Type Culture Collection).

2-1-2 Matériel non biologique

L'appareil utilisé pour l'hydrodistillation est de type Clevenger, et l'huile essentielle obtenue est conservée dans des petits flacons opaques en verre.

Des antibiotiques ont été utilisés comme références (témoins positifs). Les équipements, la verrerie et les milieux de culture utilisés sont mentionnés dans l'Appendice A.

2-2 Méthodes d'analyse

2-2-1 Protocole d'échantillonnage

Le choix des arbres a été effectué selon l'accessibilité et l'état sanitaire, l'échantillonnage s'est fait à partir de 4 pieds.

La récolte des rameaux feuillés de l'espèce *Abies numidica* âgés de 28 ans, a été réalisée en début de matinée au mois de mai 2014.

❖ Zone d'étude :

La station d'étude correspond au bouquet issu d'un bouquet réalisée en 1986, situé au niveau du centre des asthmatiques (Le parc national de Chréa) à 1500m d'altitude (la ligne de crête).

Le parc national de Chréa se situe à mi-distance entre le chef-lieu des wilayas de Blida et de Médéa, compris entre les latitudes Nord 36°19' / 36°30', et

les longitudes Est 2°38' / 3°02'. Il est situé à 50 km au sud-ouest d'Alger, et s'étend en écharpe sur 26 587 ha le long des parties centrales de la chaîne de l'Atlas Tellien.

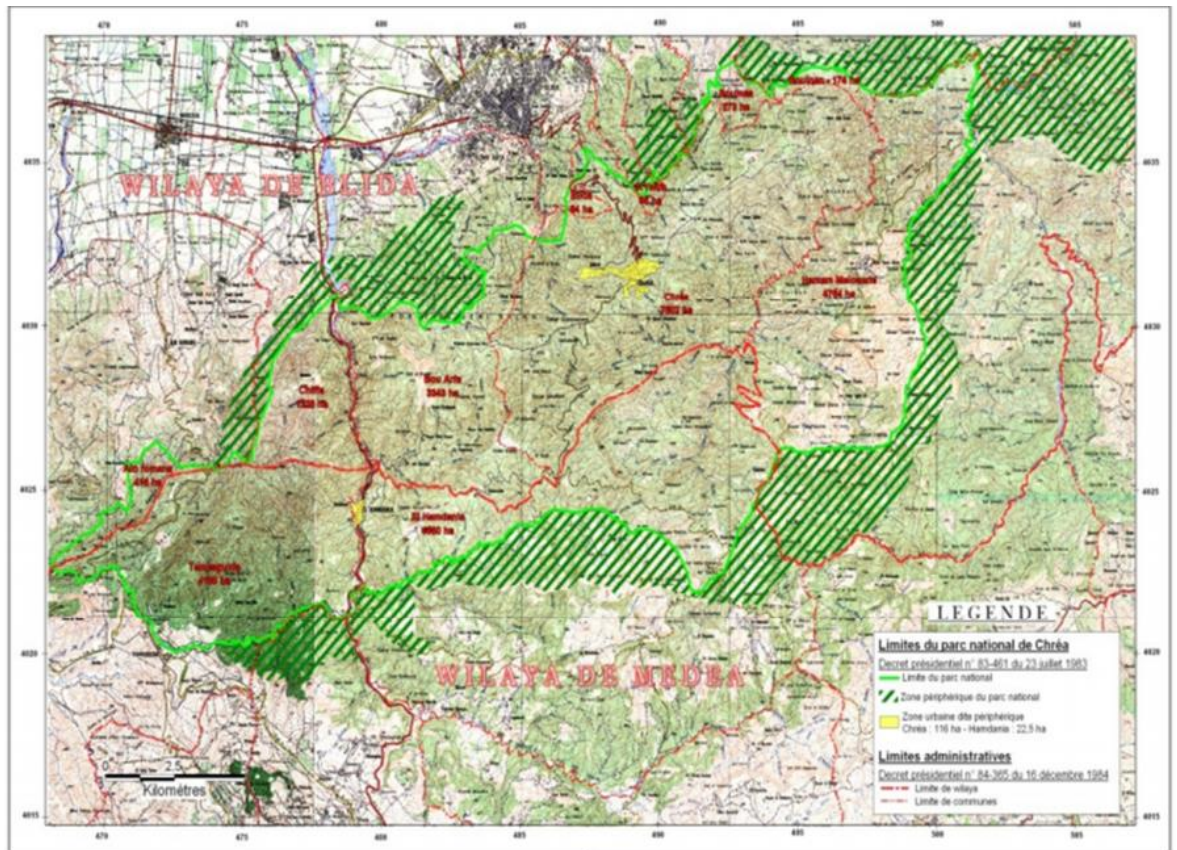


Figure 2.2 : Localisation du Parc National de Chréa. [45]

La plus grande partie du Parc National de Chréa est située sur une région montagneuse caractérisée par un relief accentué et accidenté. Cette structure topographique est surtout due à la présence de multiples Talwegs qui traversent les différents massifs (Oued Chiffa, Oued kebir, Oued Messaoud, Oued Mektaa...).

La ligne de crêtes du massif oscille entre 1400 et 1600 m d'altitude, sur une longueur approximative de 8 km, et culmine au Koudiat Sidi Abdelkader à 1629m.

Les différences d'altitudes qui s'échelonnent de 174m à 1600m permettent de rencontrer plus de 500 espèces végétales entre arbres, arbustes et herbacées. Les peuplements de cèdre, de chêne vert, de chêne liège, de thuya et de pin d'Alep sont les principales composantes végétales du parc.

Les sols de la région sont constitués de schiste marneux, en alternance avec des plaquettes de quartzites. Sur les pentes fortes, les sols sont dominés par des éléments grossiers, tel que les cailloux et les limons sont présents en faible

proportion. Dans les proches de ravins, ils sont très pauvres en phosphore, en calcaire et en chlore.

La station météorologique de Chréa (1550m) reçoit des précipitations de près de 1400mm/an, où les vents dominants sont de types nord-ouest et humides. La période pluvieuse y est de 10 mois (Septembre à Juin) et la période sèche compte 2 mois (Juillet et Août). Cependant, la nébulosité est relativement fréquente même en été dans les parties hautes de Chréa, où on compte en moyenne 104 jours/an de brouillard. [45]

2-2-2 Coupes histologiques

Pour localiser éventuellement les sites sécréteurs des huiles essentielles, des coupes histologiques au niveau des feuilles ont été réalisées. La technique de la double coloration (vert de méthyle-rouge Congo) a permis de reconnaître l'ensemble des tissus observés [46].

2-2-3 Détermination du taux d'humidité de la plante

Le taux d'humidité est la quantité d'eau contenue dans la matière végétale. Le contenu en humidité des plantes a été déterminé par le procédé de séchage à l'étuve à $70^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. Le taux d'humidité est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante [47] :

$$H\% = \frac{(m_1 - m_2)}{m_1} \times 100$$

H % = taux d'humidité exprimé en pourcentage.

M1 = Poids de l'échantillon en gramme après la récolte (plante fraîche).

M2 = poids de l'échantillon en gramme après le séchage (plante sèche).

2-2-4 Extraction de l'huile essentielle

L'hydrodistillation consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition et l'opération est généralement conduite à

pression atmosphérique. La distillation peut s'effectuer avec ou sans recyclage communément appelé cohobage.

L'appareil utilisé pour l'hydrodistillation est de type Clevenger, il est constitué d'un ballon en verre pyrex d'une contenance de 2 L où l'on place les rameaux feuillés et l'eau, une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant) qui provient de l'échauffement du ballon.

L'ensemble (eau+ matière végétale) est porté à ébullition pendant environ 4 heures. L'huile essentielle est alors entraînée par la vapeur d'eau. Elle est ensuite condensée en passant par le condensateur. L'huile essentielle extraite est pesée pour le calcul du rendement, et conservée à une température voisine de 6°C, dans des flacons en verre opaque de 5 ml, fermés hermétiquement pour les préserver de l'air, de la lumière et des variations de température qui sont les principaux agents de dégradation.

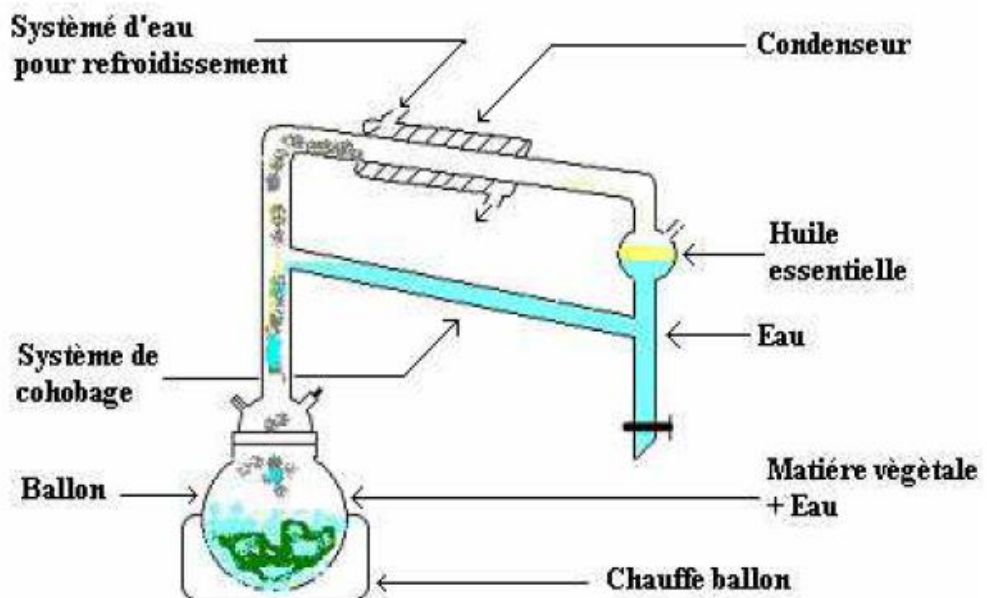


Figure 2.3 : Montage de l'hydrodistillation (type clevenger)

2-2-5 Détermination de la cinétique et du rendement d'extraction

Pour étudier la cinétique d'extraction de l'huile essentielle des rameaux feuillés d'*Abies numidica*, nous avons récupéré des quantités de l'huile essentielle correspondantes à des intervalles de temps réguliers.

Les quantités des huiles essentielles obtenues vont être exploitées dans le but de calculer le rendement à chaque intervalle de temps.

Selon la norme AFNOR (1986), le rendement en huile essentielle (RHE) est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). Le rendement est exprimé en pourcentage, et il est donné par la formule suivante :

$$R\% = \frac{m}{m'} \times 100$$

R%: rendement en huile essentielle des fleurs sèches ;

M' : masse d'huile essentielle en gramme à partir des fleurs sèches ;

M : masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme [48].

2-2-6 Étude analytique des huiles essentielles

2-2-6-1 Propriétés physiques

2-2-6-1-1 Densité relative Afnor NFT 75.111.2000 [25].

C'est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile essentielle à 20 C° à la masse d'un volume égale d'eau distillée à 20 C°.

Un volume de 1 ml d'huile essentielle a été prélevé à l'aide d'une micropipette et pesé avec une balance analytique de précision en prenant en considération le coefficient de correction de température

Où

$$d^{20} = \left\{ \frac{m_{HE}}{m_{H_2O}} \right\} + \{0,00073 \times (t^\circ \text{échantillon} - 20)\}$$

m : masse en gramme.

T : température en °C

2-2-6-1-2 Indice de réfraction Afnor NFT 75.112.2000 [25].

C'est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle.

Régler le réfractomètre en mesurant l'indice de réfraction de l'eau distillée qui doit être de 1,333 à une température de 20°C. Après ouverture du prisme secondaire, nous déposons 2 gouttes d'HE sur la partie centrale du prisme principal. Enfin, nous fermons délicatement le prisme secondaire. La lecture de la mesure s'effectue à une température stable.

L'indice de réfraction IR, à la température de référence t, est donné par l'équation suivante :

$$(IR) = nt' + \{ 0,0004 \times (20 - t') \}$$

Où

nt' : valeur de lecture obtenue à la température t'.

T' : température en °C de l'échantillon.

2-2-6-2 Propriétés chimiques

2-2-6-2-1 Miscibilité à l'éthanol Afnor NFT 75.101.2000 [25].

L'huile essentielle est dite miscible à V volume et plus de l'éthanol de titre alcalimétrique déterminé à température de 20 C°. Lorsque le mélange de 1 volume de l'huile essentielle avec V volumes d'éthanol est limpide, et le reste après addition graduelle d'éthanol de même titre jusqu'à un total de 20 volumes.

La miscibilité de l'huile essentielle a été déterminée dans de l'éthanol à 90°. Dans une éprouvette, nous avons introduit 1,0 ml de l'huile essentielle à une température de 20 C°, et à l'aide d'une burette, on additionne graduellement l'éthanol par fraction de 0.5 ml jusqu'à un total de 20 ml en agitant fréquemment et énergiquement après chaque addition, puis on note le volume (V) de l'éthanol à 90° utilisé lorsqu'une solution parfaitement limpide est obtenue.

2-2-6-3 Propriétés organoleptiques

Les différentes caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) de l'huile essentielle ont été notées.

2-2-7 Etude chromatographique de l'huile essentielle

2-2-7-1 Caractérisation et identification de l'huile essentielle

La composition des huiles essentielles est très complexe. Terpènes, aldéhydes, cétones, phénols, lactones, esters, en sont les composants principaux. Très volatiles, les huiles essentielles ne rancissent pas ; elles sont solubles dans l'huile et dans l'alcool, mais pas dans l'eau.

La détermination de la composition chimique des huiles a été faite par chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

La chromatographie est une méthode analytique qui est largement utilisée pour la séparation, l'identification et le dosage des constituants chimiques dans des mélanges complexes. Il s'agit d'une technique dans laquelle les constituants d'un mélange se séparent en fonction des vitesses auxquelles ils sont entraînés à travers une phase stationnaire par une phase mobile gazeuse [49].

2-2-7-2 Chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Les analyses de la composition chimique de l'huile essentielle des rameaux feuillés du sapin de Numidie sont réalisées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

Cette dernière est réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse de type Hewlett-Packard (6800), couplée à un spectrophotomètre de masse (HP modèle 5973), La fragmentation est effectuée par impact électronique à 70 eV.

La colonne utilisée est une colonne capillaire (30 m × 0,32 mm, 0,25 m épaisseurs de film). La température de la colonne est programmée à 45 °C pendant 8 minutes, puis augmentée progressivement à raison de 2 °C / min pour atteindre les 250°C, une température à laquelle elle sera maintenue pendant 20 minutes.

Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixé à 1,2 ml.min⁻¹.

L'identification des spectres de masse des constituants analysés par GC/SM est comparée à une bibliothèque informatique, la méthode d'identification des constituants de l'huile essentielle étudiée est basée sur leurs indices de rétention et de leurs spectres de masse par comparaison avec les données de la librairie.

Les spectres de masse obtenus sont comparés à ceux des bibliothèques informatisées (Wiley 7N et NIST 2002 bibliothèques) Liée au spectromètre, l'identification des constituants analysés par CPG, est faite en comparant leur indices de rétention à une série de n-hydrocarbures (C7-C28) avec les valeurs de la littérature [50].

2-2-8 Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle

Les méthodes utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne sont celles recommandées par l'institut des standards cliniques et laboratoires.

Les tests ont été effectués sur des souches de bactéries de référence obtenues au niveau du Laboratoire de microbiologie, institut des sciences vétérinaires Université de Blida. Ils ont été choisis pour leurs fréquences élevées à contaminer les denrées alimentaires et pour leurs pathogénicités. L'évaluation de l'activité antibactérienne est réalisée par la technique de diffusion des disques sur milieu solide.

Seules les souches qui ont donné une activité par la méthode des disques ont fait l'objet d'une évaluation de leur activité par la méthode des dilutions, pour une évaluation de la concentration minimale inhibitrice (CMI), et la méthode de micro-atmosphère. [51]

- Préparation des pré-cultures : les souches sontensemencées par stries dans un milieu de gélose nutritive, après incubation 18h à 37°C ,trois colonies bien isolées sont prélevées et émulsionnées dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9% à l'aide d'un votrex, des dilutions sont faites afin de standardiser la suspension bactérienne. L'inoculum est ajusté à 0.5 Mc Farland correspondant à une densité optique de (0.08 à 0.10) à 625 nm .La concentration finale de l'inoculum est de 107 UFC/ml [52].

2-2-8-2-1 Méthode des aromatogrammes

C'est une méthode qui permet de déterminer l'activité inhibitrice des huiles essentielles sur la croissance des germes par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque de cellulose imprégné d'huiles essentielles.

La méthode d'aromatogramme, inspirée de la pratique des antibiogrammes, permet d'étudier la sensibilité des germes aux huiles essentielles. On peut ainsi mesurer le pouvoir antibactérien des huiles essentielles de manière fiable et reproductible.

Dans cette méthode, nous utilisons des disques de papier filtre de 9 mm de diamètre, imprégnés de 20 µl d'huile essentielle. Nous déposons ces disques à la surface d'un milieu gélosé ensemencé en surface à l'aide d'une suspension bactérienne.

L'incubation est faite dans une étuve à 35°C pendant 24 h pour les bactéries. L'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque dont le diamètre est mesuré et exprimé en millimètre.

L'antibiogramme standard est réalisé pour comparer l'effet de l'huile essentielle. Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier.

La sensibilité des bactéries aux antibiotiques est appréciée selon le même protocole qu'avec les disques de papiers imprégnés d'huile essentielle.

La mesure du diamètre des halos se fait selon l'échelle suivante :

Tableau 2.1 : Transcription des diamètres d'inhibition des disques [53].

Diamètre de la zone d'inhibition	Sensibilité du germe
0	Résistant
5 mm	Peu sensible
10 mm	Sensible
20 à 30 mm	Assez bien
>30 mm	Très sensible

Le coefficient d'activité antimicrobienne A est estimé :

$$A = z' / q \quad \text{Avec} \quad z' = \pi \left(\frac{z^2}{4} \right).$$

z' : la surface d'inhibition ;

q : la quantité de l'huile essentielle (en μl) ;

z : le diamètre d'inhibition (cm), diamètre du disque imbibé inclus.

➤ Etude quantitative (détermination de la CMI et CMB)

Des dilutions de l'huile essentielle de 2% à 0.125 % sont préparées, le premier flacon contient 198 ml du milieu de culture et 2 ml de DMSO, le deuxième flacon contient 49 ml du milieu de culture + 1 ml de l'huile essentielle.

Des dilutions de moitié sont réalisées dans les boîtes de Pétri jusqu'à l'obtention de la dernière dilution 0.125%.

Les disques stériles sont déposés à la surface de la gélose, et ensemencés ensuite avec la suspension bactérienne à l'aide d'une micropipette.

La même boîte de Pétri nous permet de réaliser la CMI et la CMB. D'une part les disques sert à la détermination de la CMI d'autre part où une goutte de la suspension bactérienne est posée, sert à déterminer la CMB.

Incubation des boîtes de Pétri à 37°C pendant 24h. La lecture de résultats s'effectue à l'œil nue, on indiquant la plus faible concentration inhibitrice, qui se traduit par l'absence de toute croissance microbienne visible [54].

2-2-8-2-2 Méthode en Micro-atmosphère

Cette méthode consiste à déposer un disque de papier filtre préalablement imprégné de l'huile essentielle à étudier (ou de son composant principal), au centre du couvercle d'une boîte de Pétri sans que l'huile essentielle (ou son composant principal) n'entre en contact avec la gélose de la boîte.

La boîte est hermétiquement fermée et il va se produire une évaporation des substances volatiles dans l'enceinte de celle-ci. Après 24 heures d'incubation, on regarde l'influence de l'évaporation des substances volatiles sur le diamètre d'inhibition [55].

2-2-9 Etude de l'activité anti-oxydante de l'huile essentielle

L'activité antioxydante *in vitro* a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH*(1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl). Le pouvoir antioxydant de l'huile essentielle a été estimé par comparaison avec un antioxydant de synthèse (acide ascorbique).

Une solution de 0,0024% (2,4 mg/ 100 ml) 1, 1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) dans le méthanol a été préparée et stockée dans l'obscurité avant l'utilisation. La solution donne une couleur pourpre.

Différentes concentrations d'huile essentielle ont été préparées en utilisant du méthanol comme solvant. Les concentrations des échantillons sont 300, 350, 400,450, 500 mg/ml.

Un volume de 50 µl de chacune des solutions méthanoliques de l'huile essentielle testée est ajouté à 1950 µl de la solution méthanolique du DPPH (0,0024%). En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 50 µl du méthanol avec 1950 µl de la solution méthanolique du DPPH. Tous les essais ont été effectués en triple.

L'activité antioxydante est évaluée pour l'antioxydant de référence. Après 30 min en obscurité à la température ambiante, les absorbances sont mesurées à 517 nm contre le blanc correspondant à l'aide d'un spectrophotomètre.

Par la suite, le pourcentage d'inhibition du DPPH (I%) est calculé selon l'équation suivante :

$$I\% = \frac{Abs_C - Abs_E}{Abs_C} \times 100$$

I% : Le pourcentage d'inhibition du DPPH

Abs_C: Absorbance du contrôle (DPPH dans le méthanol)

Abs_E : Absorbance de l'échantillon.

Et avec le pourcentage d'inhibition, on détermine l'IC₅₀ (concentration inhibitrice de 50 %). Elle représente la concentration de l'échantillon testé

nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH. Les IC_{50} sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle. [56]

CHAPITRE 3

RESULTAT ET DISCUSSIONS

Selon l'objectif de notre travail qui vise à la valorisation de l'espèce *Abies numidica* introduite au niveau de l'Atlas Blidéen, les résultats portent sur deux aspects différents :

- Le premier concerne la plante elle-même (identification de la plante, taux d'humidité et examen microscopique de la plante) ;
- Le deuxième concerne l'huile essentielle du sapin de Numidie (rendement de l'extraction, activités biologiques...).

3-1 Identification de la plante

L'identification de la plante a été faite selon les critères de détermination en observant et en mesurant quelques caractères morphologiques au sein de l'arbre, les résultats sont inscrits dans le tableau suivant :

Tableau 3.1 : Caractéristiques morphologiques d'*Abies numidica* de Chréa.

Critères	Description
Taille et port	Environ 20 m, avec un port conique
Longueurs des aiguilles	Environ 23 mm
Insertion des aiguilles sur les rameaux	En écouvillon
Couleurs et pubescence des rameaux	Bruns et glabre
Longueur des cônes	Environ 16 cm

Le Sapin de Numidie est un arbre à feuillage persistant et touffu, il atteint une hauteur de 20m (figure 3.1), la silhouette de l'arbre est conique.

Les aiguilles sont insérées sur le rameau, elles sont droites de 23 mm de long non piquantes. Elles sont disposées en écouvillon. La face inférieure présente deux bandelettes blanchâtre de stomates (figure 3.2). Les rameaux sont gris brun et glabres.

Les cônes parviennent à maturité, et finissent par se désarticuler pour libérer les graines (figure 3.3), laissant sur l'arbre l'axe principal du cône d'une longueur de 16 cm appelé « rachis ».



Figure 3.1 : Port conique d'*Abies numidica*, de la station Chréa. (Original, 2014)



Figure 3.2 : Rameaux d'*Abies numidica* portant des aiguilles sur la face inférieure avec la pousse de l'année. (Original, 2014)



Figure 3.3 : Rachis et cônes en désarticulation d'*Abies numidica*. (Original, 2014)

Selon LAMANT [13], les critères les plus déterminants qui permettent l'identification du sapin de Numidie de *Lannoy* sont :

L'insertion des feuilles sur le rameau se fait en demi-écouvillon ou en écouvillon, la longueur des aiguilles varie entre 10 à 25 mm, et l'apex sur lequel se fixent les feuilles est arrondi ou échancré.

Les stomates qui se trouvent sur la face supérieure de l'aiguille se dirigent vers l'apex.

Les cônes du sapin de Numidie ou sont incluses les bractées, ont une longueur qui varie entre 12 et 20 cm, leurs couleur avant la maturité peut être vert jaunâtre, puis brun rougeâtre, ou brin gris.

Les rameaux sont bruns, ou bruns rougeâtres et glabres, et les bourgeons sont non résineux.

3 -2 Observations microscopiques de la plante

Afin de localiser les structures sécrétrices des huiles essentielles au microscope optique, nous avons réalisé des coupes transversales au niveau des aiguilles du sapin (figure 3.4).

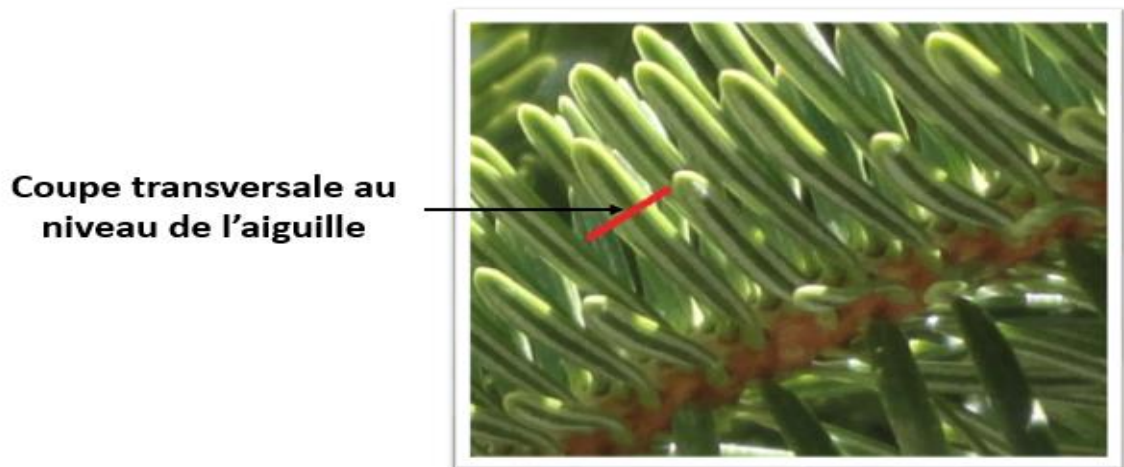


Figure 3.4 : Aiguilles du sapin de Numidie. (Original 2014)

L'examen microscopique a permis d'obtenir les coupes histologiques représentées par les figures 3.5, 3.6, 3.7 :

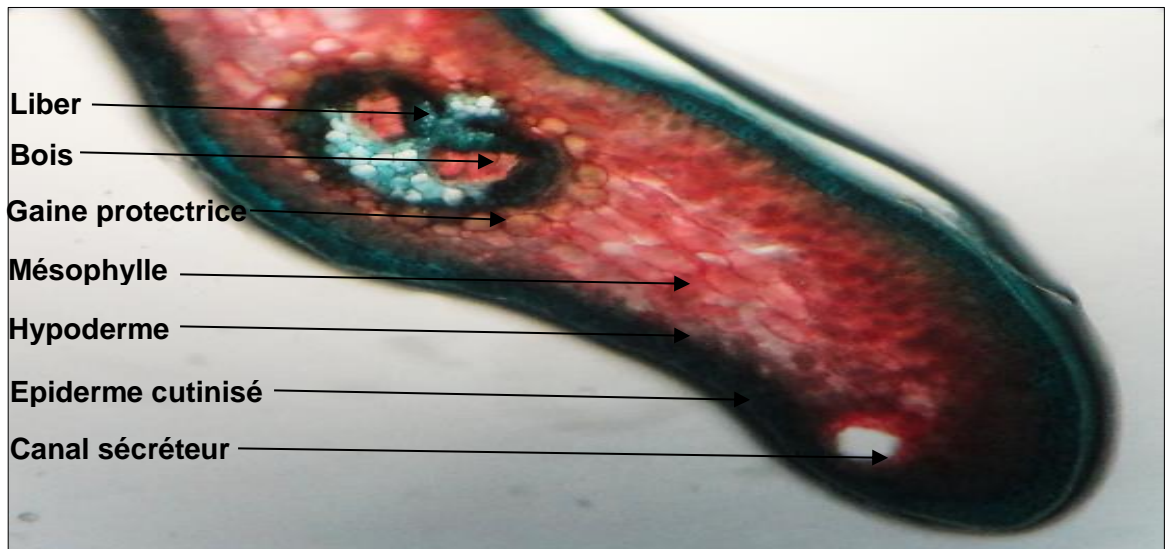


Figure 3.5 : Coupe transversale au niveau de l'aiguille du sapin de Numidie (Gx100). Original 2014

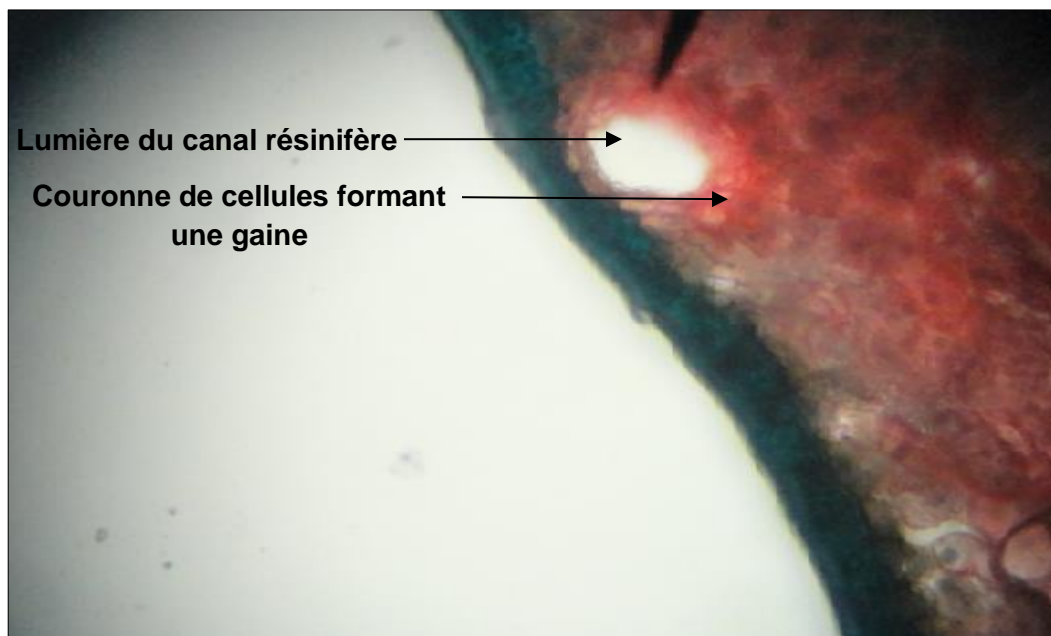


Figure 3.6 : Canal résinifère occupant le bord de l'aiguille (Gx100). Original 2014

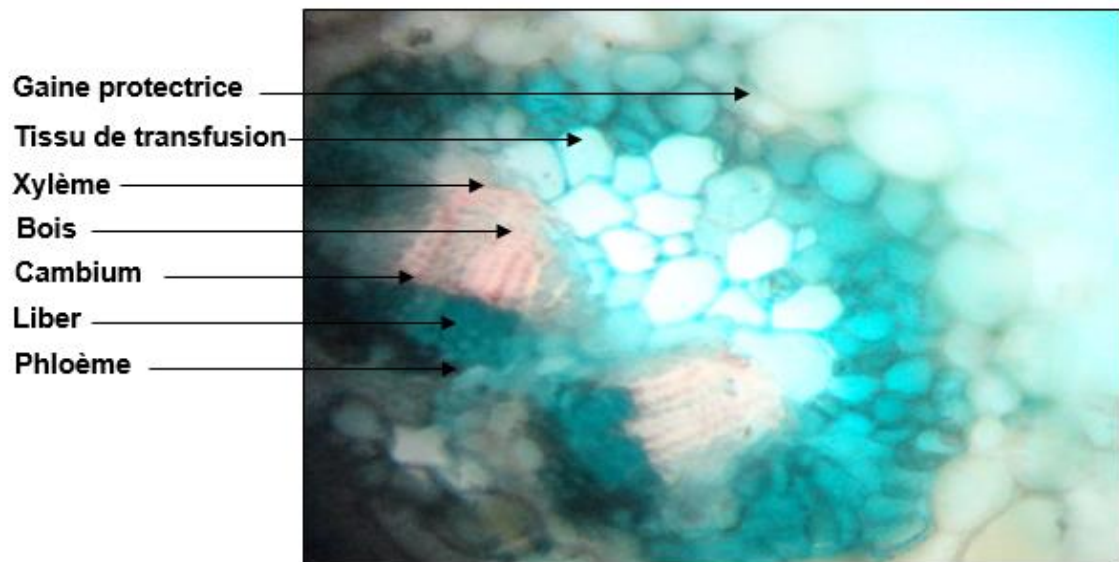


Figure 3.7 : Faisceau cribro-vasculaire au niveau de l'aiguille du sapin de Numidie (Gx400). Original 2014

L'observation au microscope des coupes de l'aiguille a permis de mettre en évidence un épiderme lignifié, des cellules sous-épidermiques qui forme le mésophylle, une stèle composée de deux faisceaux libéroligneux et deux canaux résinifères occupant les bords de l'aiguille.

Selon GORENFLOT [57], l'examen de la coupe transversale au niveau de l'aiguille du sapin permet de distinguer de l'extérieur vers l'intérieur les tissus suivants

1. L'épiderme recouvert d'une cuticule épaisse et consolidé d'un hypoderme formé de cellules également lignifiées.
2. Le mésophylle est formé d'un seul type de parenchyme, c'est dans le mésophylle que sont situés les canaux résinifères. Chaque canal résinifère est entouré d'une couronne de cellules formant une gaine.
3. La gaine protectrice délimite les faisceaux libéroligneux qui sont enfermés dans un parenchyme particulier appelé parenchyme de transfusion.

4. Les deux faisceaux conducteurs (Xylème, Bois, Liber, et Phloème) sont enveloppés dans un tissu de transfusion, lui-même entouré par une gaine protectrice formée d'une seule assise de cellules plus ou moins ovales. Le tissu de transfusion a un rôle de réserve hydrique et de conduction, assurant la jonction entre les faisceaux et le mésophylle. Il est formé de cellules vivantes parenchymateuses aux parois minces.
5. La structure sécrétrice de l'huile essentielle au niveau de l'aiguille du sapin est le canal résinifère.

3- 3 Taux d'humidité de la plante

L'analyse effectuée à la matière végétale fraîche a révélé un taux d'humidité de **38,2 ± 0.09 %** qui est représenté par la figure 3.8.

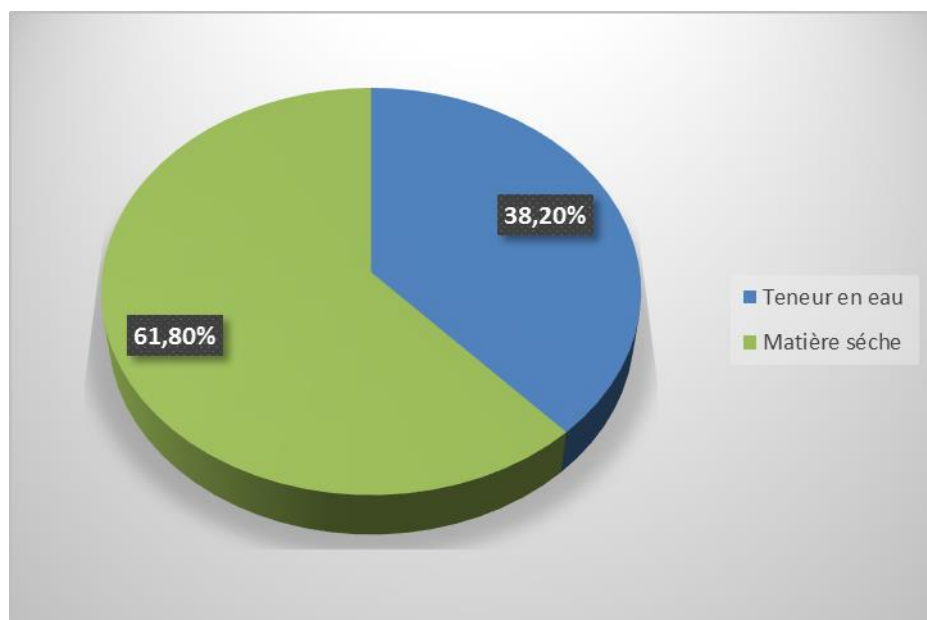


Figure 3.8 : Taux d'humidité des rameaux feuillés du sapin de Numidie.

La détermination du taux de l'humidité a été faite d'après les valeurs représentées au tableau 3.2 (Appendice B).

Les végétaux sont connus par leur richesse en eau, elle présente une partie majoritaire de leur composition, Cela signifie que plus du quart du poids des rameaux feuillés est constituée par l'eau. Le reste représente la matière sèche.

3 - 4 Rendement en huile essentielle

Suite à l'hydro-distillation des rameaux feuillés qui ont été récoltées en mai 2014, le rendement est de **0,67 ± 0,057 %**.

Tableau 3. 3 : Rendement en huile essentielle des échantillons étudiés.

	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3
Poids en MS	100 g	100 g	100 g
Poids en HE	0.62 g	0, 64 g	0,75 g
Rendement %	0,62%	0,64 %	0,75%

MS : matière sèche

Selon Ghadbane et ses collaborateurs [58], le rendement est de **0.260 ± 0.036**, une valeur inférieure à celle trouvé dans notre étude (figure 3.9), sachant que Les parties aériennes du sapin de Numidie ont été récoltées au cours de Mars 2015, dans leur habitat naturel, c'est-à-dire le massif des Babor.

Notre étude révèle une valeur supérieure à celle trouvée par Tlili-Ait Kaki et ses collaborateurs [3].

Ces variations dans le rendement peuvent être attribuées non seulement à l'origine géographique de la plante, à la nature (séchée ou fraîche) et à la technique d'extraction mais également à la période de la cueillette de la matière végétale ainsi qu'au mode d'extraction [59].

3-5 Étude de la cinétique d'extraction

D'après la formule du rendement d'extraction, nous avons obtenu les résultats illustrés dans la figure 3.10.

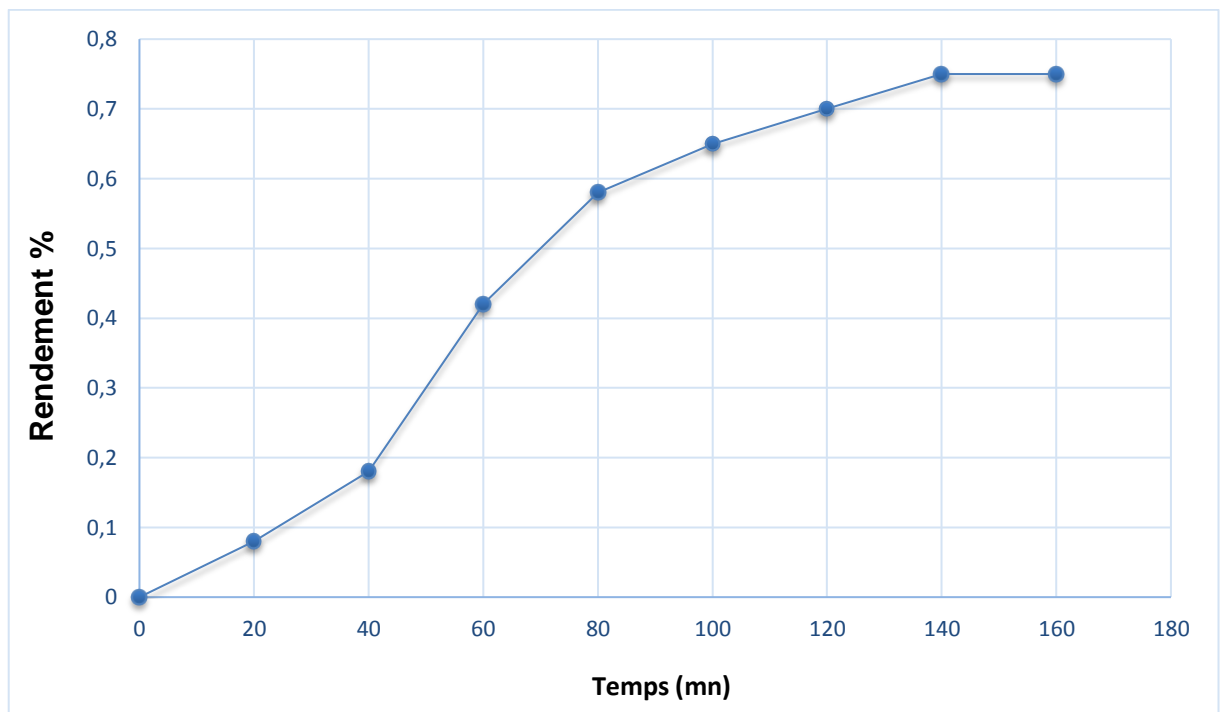


Figure 3.10 : Evolution du rendement de l'huile essentielle du sapin de Numidie en fonction du temps.

Une nette augmentation de 0,18 % à 0,68 % dans l'intervalle du temps de 40 à 120 minutes est notée. Cette augmentation tend vers un plateau de 0,75 % après 140 minutes. A l'issue de ces résultats, il serait économiquement rentable de fixer la durée d'extraction de cette huile à 140 minutes.

3-6 Étude analytique de l'huile essentielle

Les propriétés physico-chimiques tels que : le pouvoir rotatoire, l'indice de réfraction, l'indice d'ester ...etc., constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'huile essentielle.

Ces essais sont déterminés selon un protocole précis et obéissent à des normes édictées par l'association française de normalisation (A.F.N.O.R).

3-6-1 Propriétés physico-chimiques

La détermination des propriétés physico-chimiques (densité, indice de réfraction...) est une étape nécessaire mais non suffisante pour caractériser les huiles essentielles.

Les résultats obtenus sont portés dans le tableau 3.4 suivant :

Tableau 3.4 : Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle.

Paramètres physico-chimiques	Résultats obtenus	Normes AFNOR
Densité relative à 20°C	0,861	0,884-0,910
Indice de réfraction à 20°C	1,475	1,461-1,470
Miscibilité à l'éthanol	1 : 3	3-5

Les résultats obtenus des analyses physicochimiques indiquent que les échantillons analysés se trouvent dans les fourchettes de référence établies par les normes Afnor 2000.

Ces paramètres physicochimiques sont influencés par les conditions climatiques ainsi que les conditions de culture des plantes ; cela fait partie aussi de la complexité de la notion de chémotype [28].

Ces paramètres sont liés à la composition chimique de cette huile qui est affectée par un grand nombre de facteurs tels que le phénotype, le moment de récolte, le type de terrain, la conservation, le procédé et les conditions d'extraction. L'indice de réfraction dépend de la composition chimique qui augmente en fonction des longueurs des chaînes d'acides, de leurs degrés d'insaturation et de la température. Il varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé [60].

3-6-2 Propriétés organoleptiques

L'huile essentielle obtenue est de couleur jaune clair, voir limpide. Elle présente une odeur prononcée de résine citronnée :

- Aspect : liquide, mobile ;
- Couleur : incolore à jaune clair ;
- Odeur : boisée, fraîche et résineuse.

Selon **Afnor (2000)**, les huiles essentielles sont habituellement liquides à température ambiante et volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes. Elles sont plus ou moins colorées et leur densité est en général inférieure à celle de l'eau.

3-7 Étude chromatographique de l'huile essentielle

Le résultat de l'identification qualitative et quantitative des composés chimiques de l'huile essentielle est obtenu à partir du profil chromatographique (figure 3.11) et dressé dans le tableau 3.5.1.

Tableau 3.5.1 : Composition chimique de l'huile essentielle du sapin De Numidie.

Composé	Temps de rétention	%	Formule chimique	Classe chimique
α - Pinene	12,50	6,36%	C10H16	Mono terpène
Camphene	13,20	3,18%	C10H16	Mono terpène
β -Pinene	13,98	9,18%	C10H16	Mono terpène
Δ -3-Carene	15,68	23,32%	C10H16	Mono terpène
β -Myrcène	20,22	3,53%	C10H16	Mono terpène
Limonène	22,87	7,06%	C10H16	Mono terpène
Terpinolene	24,36	2%	C10H16	Mono terpène
Caryophyllene	25,99	10%	C10H16	Mono terpène

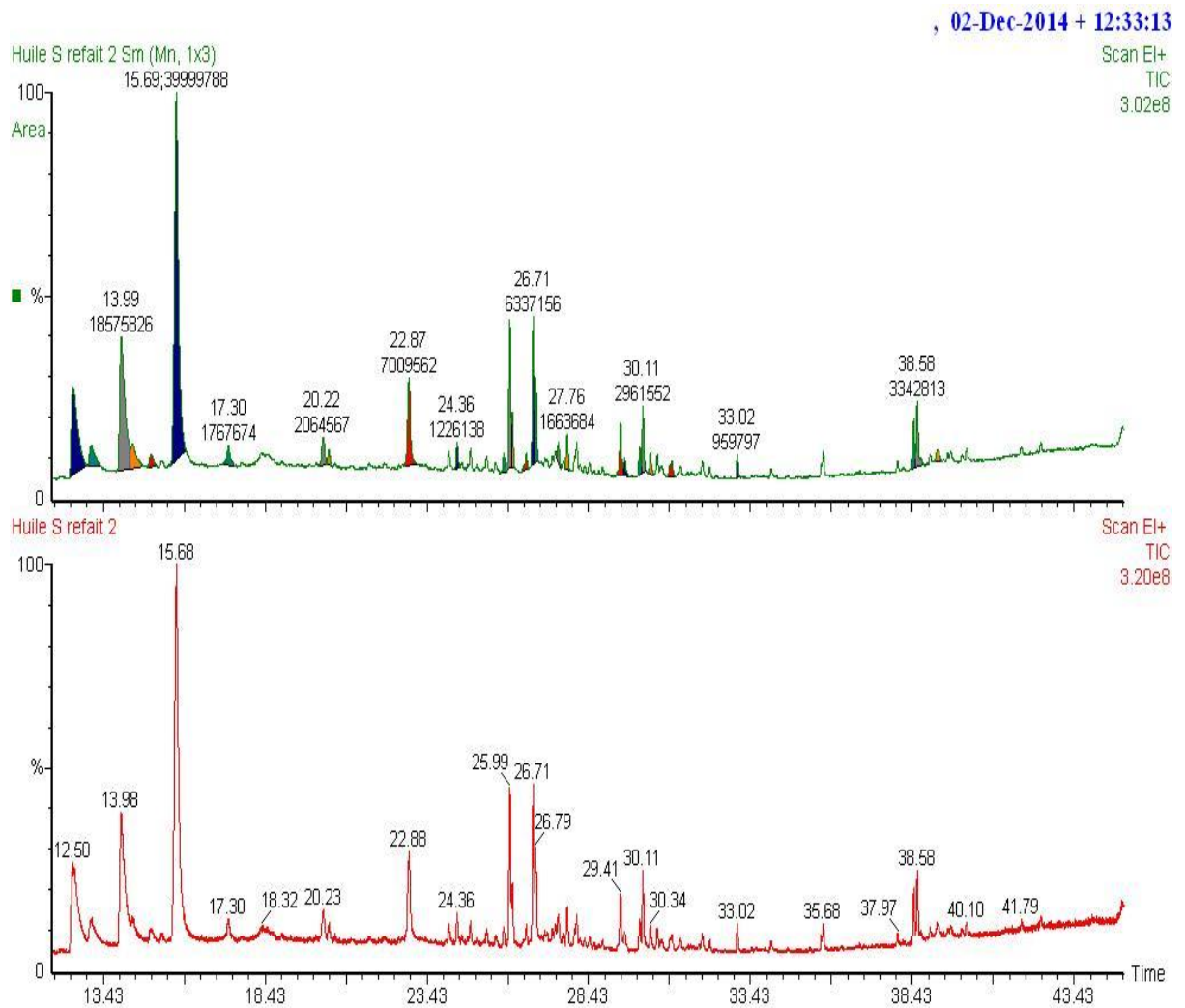


Figure 3.11 : Profil chromatographique de l'huile essentielle des rameaux feuillés du sapin de Numidie.

L'identification des composants individuels a été fondée sur la comparaison des spectres de masse avec ceux des données de la littérature, l'analyse a permis d'identifier 8 composés par ordre d'élution.

D'après ces résultats, 64,63 % des composants de l'huile essentielle d'*Abies numidica* ont été identifiés. Il semble que les composants majoritaires de l'huile essentielle du sapin de Numidie sont des mono terpènes. Les composants majeurs de cette huile sont : Δ -3-Carene (23,32%), Caryophyllene (10%), β -Pinene (9,18%), Limonène (7,06%) et α - Pinene (6,36%).

Ces résultats sont différents de ceux obtenus par Tlili-Ait Kaki et ses collaborateurs qui ont examiné la composition chimique de l'huile essentielle des

aiguilles du sapin de Numidie collectées de la région d'Annaba (Seraidi) en 2013. L'étude met en avant sa richesse en composés terpéniques et majoritairement l'acétate de bornyle, le camphène et alpha-pinène suivi de bêta-pinène [3].

Il existe beaucoup de facteurs externes pouvant influencer la composition chimique de l'huile essentielle. La température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la composition du sol sont autant de facteurs d'ordre environnemental susceptibles d'exercer des modifications chimiques [37].

D'après le Dr. Laure Menin [61], qui a analysé l'huile essentielle du sapin baumier *Abies balsamea* en Avril 2011, les composés majoritaires sont β -Pinène (29,22 %) ; α -Pinène (17,21%) ; δ -3-carene (18,55%), l'appendice C illustre la composition détaillée de cette huile essentielle.

Chez Les Abietacees, les composantes principales des aiguilles des conifères sont les monoterpènes et en particulier les α et β -pinènes (la térébenthine) [62].

3-8 Étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle sont représentés dans les tableaux suivants :

Tableau 3.6 : Résultats des Aromatogrammes et antibiogrammes des souches bactériennes GRAM +.

Souche bactérienne		Huile essentielle		Antibiotique	
		Diamètre en mm	Sensibilité	Diamètre en mm	Sensibilité
GRAM +	<i>S. aureus</i>	35,66±1,24	Très sensible	34,33±0,47	Très sensible
	<i>B. subtilis</i>	50	Très sensible	40,33±1,29	Très sensible
	<i>B. cereus</i>	30±4,08	Très sensible	25±0,81	Assez sensible

Antibiotique : Chloramphénicol (30 μ g).

Huile essentielle : 20 μ l.

Le Tableau 3.6 résume l'évaluation de la sensibilité des bactéries GRAM + choisies vis-à-vis de l'huile essentielle d'*Abies numidica* provenant de Chréa.

La zone d'inhibition, mesurée en millimètres, y compris le diamètre du disque de papier, a été utilisée comme critère de mesure de l'activité antibactérienne, les résultats montrent que les souches bactériennes à Gram (+) testées sont très sensibles à l'huile essentielle du sapin de Numidie (Figure 3.12), notamment les deux souches : *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*, avec un diamètre d'inhibition de 50 et $35,66 \pm 1,24$ mm respectivement, pour le *Bacillus cereus*, une activité modérée est notée avec un diamètre d'inhibition est de $30 \pm 4,08$ mm.

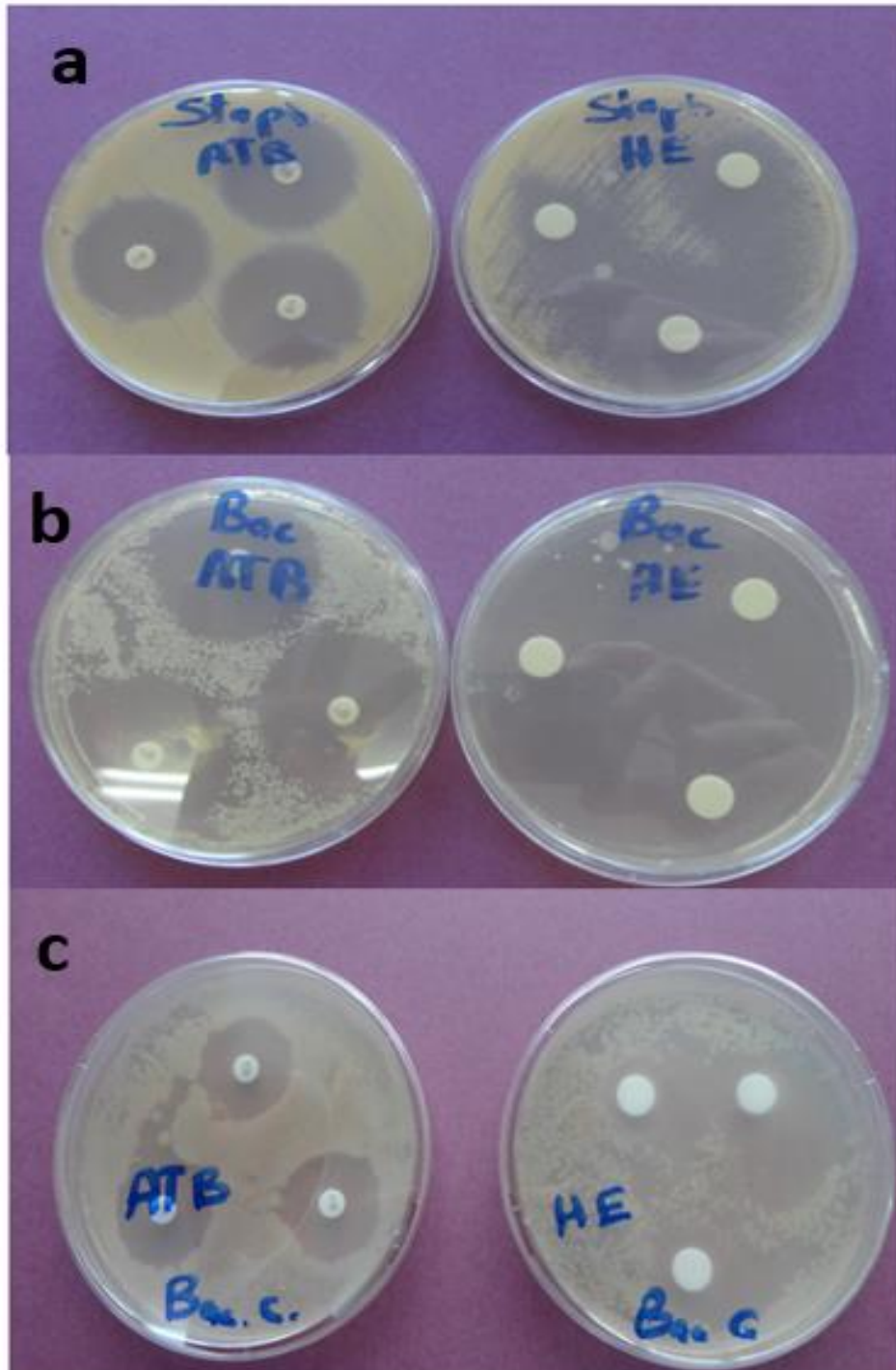


Figure 3.12 : Photos montrant l'effet antimicrobien de l'huile essentielle et de l'antibiotique sur les bactéries Gram + : *S. aureus* (a), *B. subtilis* (b), *B. cereus* (c).

(Original., 2015)

Tableau 3.7 : Résultats des Aromatogrammes et antibiogrammes des souches bactériennes GRAM -.

Souche bactérienne		Huile essentielle		Antibiotique	
		Diamètre en mm	Sensibilité	Diamètre en mm	Sensibilité
GRAM -	<i>P. aeruginosa</i>	< 9	Résistante	18,66± 0,47	Sensible
	<i>K.pneumoniae</i>	12,33±0,47	Sensible	35±0,81	Très sensible
	<i>S. typhi</i>	< 9	Résistante	34,66±0,47	Très sensible

Antibiotique : Chloramphénicol (30 µg).
Huile essentielle : 20 µl.

Le Tableau 3.7 résume l'évaluation de la sensibilité des bactéries Gram - choisies vis-à-vis de l'huile essentielle d'*Abies numidica* provenant de Chréa.

L'huile essentielle n'a pas révélé le même pouvoir antibactérien contre les souches à Gram (-) testées (Figure 3.13), *Klebsiella pneumoniae* s'est révélée sensible avec un diamètre d'inhibition de 12,33±0,47 mm, *salmonella typhi*, et *Pseudomonas aeruginosa* n'ont montré aucune activité et sont donc résistantes à cette huile essentielle.

Pseudomonas aeruginosa a montré une grande résistance à l'encontre de l'huile essentielle, de même l'antibiotique.

Selon la bibliographie, *Pseudomonas aeruginosa* est responsable d'un grand nombre d'infections nosocomiales. Capable de s'adapter à des environnements très divers en raison de sa très grande plasticité génétique, il est capable d'infecter presque tous les sites anatomiques. Il montre également une remarquable capacité de résister aux antibiotiques, soit de façon native ou bien suite à l'exposition aux antibiotiques (acquisition de gènes codant pour des enzymes détruisant les antibiotiques, surexpression de pompes à efflux associées ou non à une diminution de l'expression des porines, mutation de cibles...) [63].

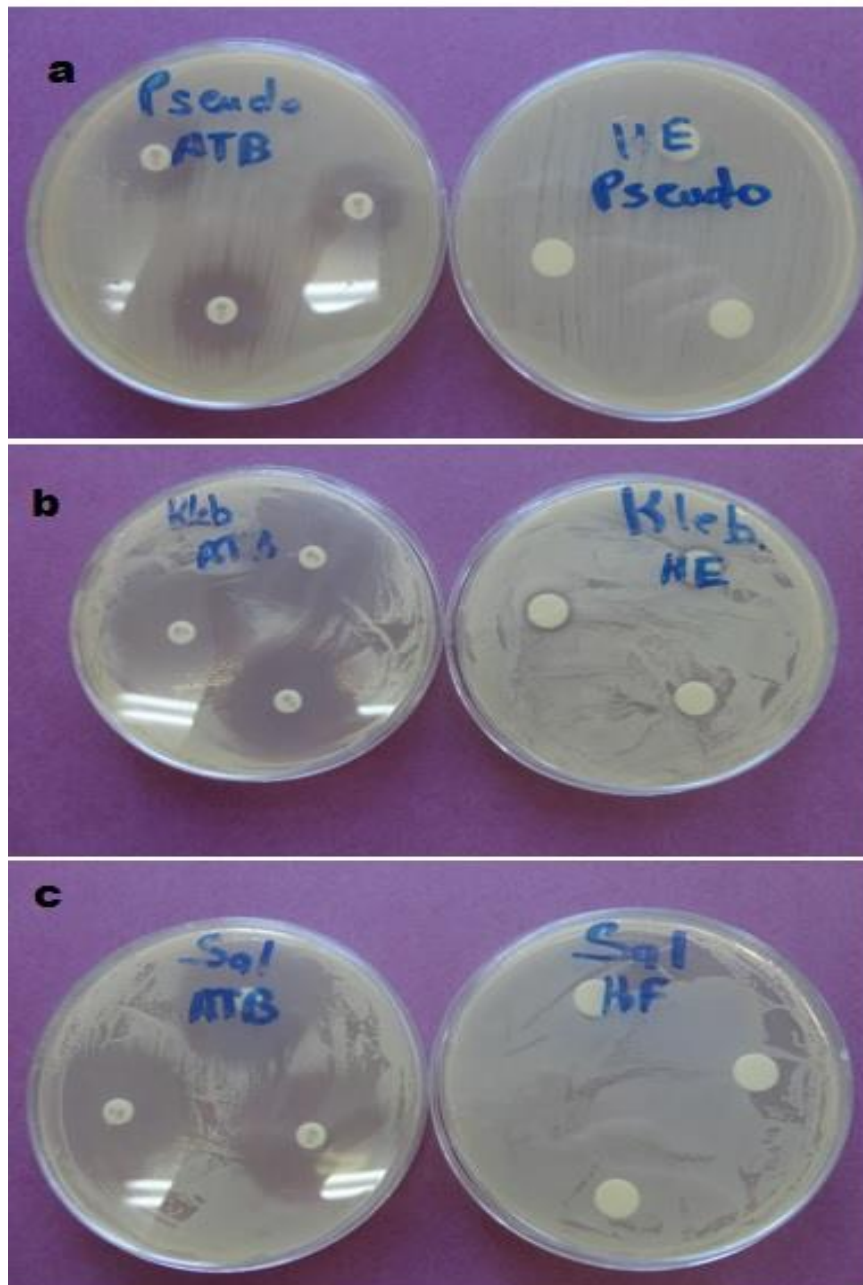


Figure 3.13 : Photos montrant l'effet antimicrobien de l'huile essentielle et de l'antibiotique sur les bactéries Gram - : *P. aeruginosa* (a), *K. pneumoniae* (b), *S. typhi* (c). (Original., 2015)

Tableau 3.8 : Résultats de la CMI, CMB, et la méthode phase vapeur.

Souche bactérienne	CMI (%)	CMB (%)	Micro-atmosphère (mm)
<i>S.aureus</i>	0,5 %	1%	0 mm
<i>B. subtilis</i>	1%	2%	90 mm
<i>B. cereus</i>	> 2%	> 2%	12 mm

Les résultats de l'aromatogramme ont été confirmés par la méthode de dilution CMI, CMB, les valeurs obtenues sont représentées au tableau 3.8.

L'effet antimicrobien de la phase volatile de l'huile essentielle du sapin de Numidie sur la souche *Bacillus subtilis* est total, une inhibition complète de la croissance de cette souche a été constaté, pour la souche *Bacillus cereus*, un diamètre d'inhibition de 12 mm a été noté, et en ce qui concerne la souche *Staphylococcus aureus*, aucun effet n'a été constaté.

La plus petite concentration inhibitrice était observée chez la souche *Staphylococcus aureus* avec 0,5 % et une concentration minimale bactéricide de 1%.

Bacillus subtilis a une concentration minimale inhibitrice de 1% et une concentration minimale bactéricide de 2%. La CMI et la CMB se sont avérées être supérieur à 2% pour la souche *bacillus cereus*.

Tableau 3.9 : Comparaison des coefficients de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et de l'antibiotique utilisé.

Souche bactérienne		Activité antimicrobienne	
		Huile essentielle	Antibiotique
GRAM +	<i>S. aureus</i>	0,49	0,30
	<i>B. subtilis</i>	0,98	0,42
	<i>B. cereus</i>	0,36	0,16
GRAM -	<i>P. aeruginosa</i>	0	0,08
	<i>K.pneumoniae</i>	0,05	0,32
	<i>S. typhi</i>	0	0,30

Les résultats du tableau 3.9 nous permettent de comparer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle à celle de l'antibiotique utilisé.

Les résultats de notre étude sont conformes à ceux trouvés par Ghadbane et ses collaborateurs [58], pour les souches à Gram +, une forte activité antibactérienne a été constatée, cependant, une activité modérée a été observée contre *Pseudomonas aeruginosa* contrairement à nos résultats

L'efficacité antimicrobienne des huiles essentielles dépend de deux principaux paramètres : l'huile essentielle et sa composition chimique d'une part, et le microorganisme (type, structure...) d'autre part [64].

L'activité des huiles essentielles est souvent réduite à l'activité de ses composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. Toutefois, les composés minoritaires pourraient agir de manière synergique [65].

Selon l'étude de Lambert et ses collaborateurs [66], l'association des principaux composés actifs agirait de façon synergique en potentialisant l'action antimicrobienne de l'huile essentielle. En effet, il a été prouvé que l'effet antimicrobien des huiles essentielles est supérieur à celui de ses composés majoritaires testés séparément.

Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries Gram positives que sur les bactéries Gram négatives. Toutefois, les bactéries Gram négatives paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire. Chez les bactéries à Gram-, le peptidoglycane est très fin et associé à une enveloppe externe complexe définissant un espace périplasmique. Cette membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique hydrophobe constituée de phospholipides, de protéines (porines...) et lipopolysaccharides (LPS). L'espace périplasmique est rempli d'enzymes qui dégradent les substances complexes pour qu'ils puissent traverser la membrane cytoplasmique, et inactivent les produits chimiques toxiques (antibiotiques, métaux lourds...) [67].

Aux niveaux physiologique et moléculaire, la résistance bactérienne est la résultante d'un phénomène qui consiste à augmenter l'activité de la pompe à efflux. Les pompes d'efflux sont des transporteurs membranaires, impliqués dans la résistance aux antibiotiques par exportation active des drogues dans le milieu extracellulaire [68].

La principale caractéristique des molécules présentes dans les huiles essentielles est leur hydrophobicité. Elle permet leur solubilisation dans les membranes, ce qui provoque une déstabilisation de la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire.

Ces modifications entraînent une fuite d'ions et de composés intracellulaires (Appendice D). Si la perte de matériel est trop importante ou si les éléments cytoplasmiques relargués sont indispensables à la survie de la bactérie, cela entraîne la mort cellulaire [69].

3-9 Etude de l'activité anti-oxydante

Les résultats de l'activité anti-oxydante l'huile essentielle et de l'acide gallique sont présentés dans les figures 3.15, 3.16 :

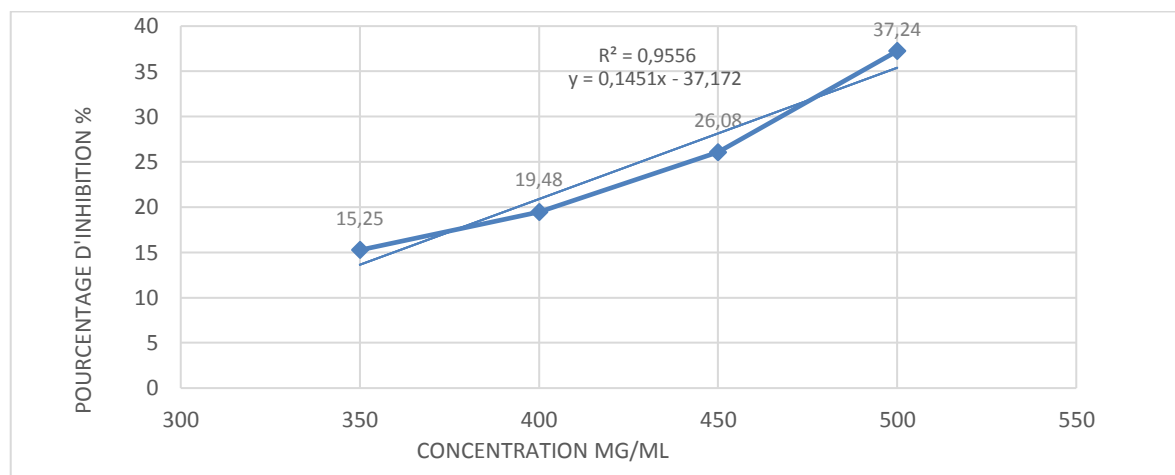


Figure 3.15 : Pourcentage de réduction de DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'huile essentielle.

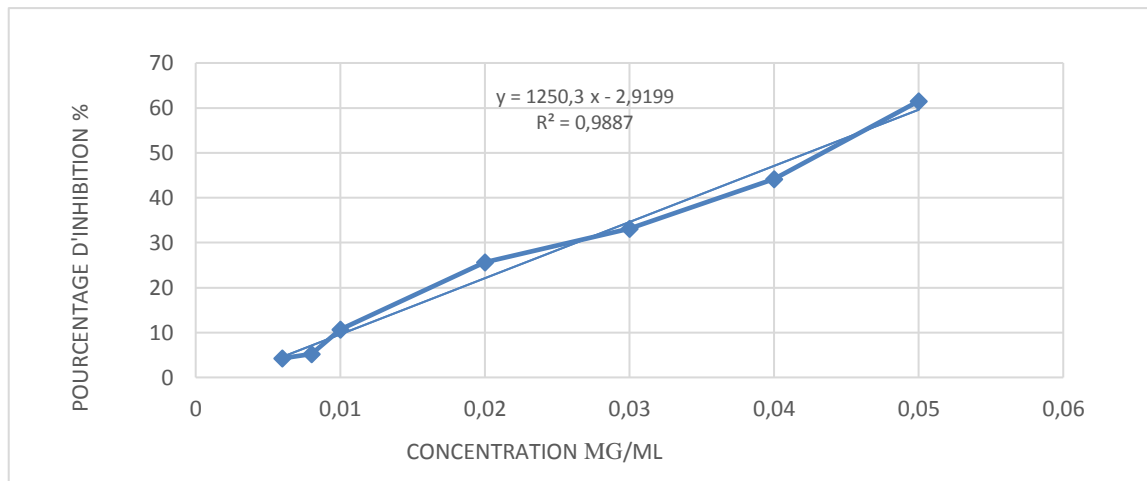


Figure 3.16 : Pourcentage de réduction de DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'acide gallique.

Les pourcentages de réduction ont été calculés à partir des valeurs obtenues sont représentées dans les tableaux 3.10 et 3.11 (Appendice B).

Pour une concentration de 500 mg/ml, l'huile essentielle a révélé un pourcentage d'inhibition de DPPH de $37,24 \pm 1,93\%$ (figure 3.15) tandis que l'acide gallique a une IC 50 (Concentration de l'inhibiteur causant 50% d'inhibition) de 0,042 mg/ml (figure 3.16).

L'huile essentielle du sapin de Numidie ne pouvait pas atteindre l'IC 50 avec la plus forte concentration qui est de 500 mg/ml, montrant une activité antioxydante très inférieure à celle du témoin positif.

D'après ces résultats, il semble que l'huile essentielle *d'Abies numidica* issues de la station de Chréa a une faible activité antioxydante, ce qui ne correspond pas aux résultats de Ghadbane et ses collaborateurs [58], qui ont trouvé une IC 50 de 0.288 mg/ml, Il est difficile d'attribuer cette activité à un seul composé de l'huile essentielle puisque un effet de synergie entre les différents composés peut avoir lieu.

Ce n'est pas uniquement les composés majoritaires des huiles essentielles qui sont responsables de cette activité antioxydante, mais il peut y avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres [70].

CONCLUSION

En raison de son endémisme en Algérie, sa répartition restreinte et ses qualités écologiques, constituant un des plus beaux peuplements forestiers encore présents en région des Monts Babor, le Sapin de Numidie est une espèce qui mériterait une attention particulière en vue de son maintien et son extension vers d'autres régions.

Au cours de ce travail, on a essayé de valoriser le Sapin de Numidie en mettant l'accent sur l'importance de son huile essentielle, par sa composition chimique qui possède une activité antibactérienne certaine.

Au terme de cette étude, il convient de rappeler les principales conclusions auxquelles nous avons abouti, et proposer quelques perspectives. L'étude morphologique de la face inférieure de l'aiguille du sapin de Numidie a indiqué la présence de deux bandelettes blanchâtres, ce caractère pourrait être considéré comme une caractéristique de l'espèce *Abies numidica*.

Le rendement en huile de la partie aérienne d'*Abies numidica* était de 0,67 %. Cette valeur est supérieure aux rendements obtenus dans d'autres travaux sur la même espèce.

Il en ressort que la composition chimique de l'huile essentielle des aiguilles de notre Sapin est en majorité représenté par les mono terpènes. En comparant les résultats de l'analyse chimique de cette huile essentielle avec les résultats obtenus de quelques espèces du genre *Abies* étudiés, nous avons constaté que les composés majoritaires se ressemblent et qu'il existe quelques différences qui peuvent être attribuées aux différents facteurs qui influencent le développement de la plante.

L'activité antibactérienne de cette huile essentielle évaluée par la méthode de diffusion sur milieu solide et en micro-atmosphère a démontré une résistance des souches bactériennes à Gram –, et une sensibilité des souches bactériennes à Gram +.

Une forte activité sur la croissance de *S. aureus* a été noté, ce qui est confirmé par la bibliographie, les huiles essentielles sont, généralement, plus actives contre ce type de bactéries.

L'activité antioxydante déterminée par le test de DPPH montre que cette huile essentielle extraite de la plante récoltée au parc national de Chréa est dotée d'une faible activité antioxydante, contrairement à d'autres travaux effectués sur la même espèce issue d'une région différente. Cela est dû à la composition chimique de l'huile essentielle, la différence notée est déterminante même si elle semble mineure.

En fin, il est impératif et dans un objectif de conservation de créer d'autres plantations avec des graines issues de la sapinière des Babor, et de mettre au point une bonne méthode de multiplication par *culture in vitro* de cette espèce, d'essayer la germination des embryons et l'induction de la rhizogénèse à partir des microboutures juvéniles.

APPENDICE A

Liste des abréviations, symboles et conventions :

AFNOR	Association française de normalisation
ATCC	American Type Culture Collection (catalogue de microorganismes)
%	Pourcentage
°C	Degré Celsius
cm	Centimètre
mm	millimètre
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CMB	Concentration minimale bactéricide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPPH	2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
pH	Potentiel d'Hydrogène
s	Seconde
UFC	Unité Formant Colonie
IC50	concentration d'inhibition de 50% des radicaux libres
MH	milieu de Mueller Hinton
CPG-SM de masse	chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse
MS	masse sèche

Appareillage, verrerie et consommables :

- Autoclave
- Bain marie
- Balance de précision
- Balance de paillasse
- Bec bunsen
- Centrifugeuse de paillasse
- Chauffe ballon 2 L
- Chromatographe en phase gazeuse GC 6890 N, couplée à un spectromètre de masse MS-5973 N, HP Agilent Technologies
- Doseuse Fermeuse de tubes
- pH-mètre
- Pied à coulisse
- Plaque chauffante

Milieux de culture utilisés et réactifs :

Préparation de l'inoculum

L'étalon 0.5Mc Farland se prépare en versant 0.5ml d'une solution de BaCl₂ dihydraté à 1% (10g/l) dans une éprouvette de 100ml. Compléter à 100ml avec du H₂ SO₄ à 1% (10ml/l). Ainsi préparé, l'étalon doit présenter une densité optique de 0.08 à 0.1 lue à 625nm (~108 UFC /ml).

Muller Hinton agar :

- Infusion de viande de bœuf déshydraté.....300 g
- Hydrolysate de caséine.....17.5 g
- Amidon de maïs.....5 g
- Agar Agar13 g
- -Eau distillée1000 m

APPENDICE B

Tableau 3.2 : Détermination de la teneur en eau

Poids / jour	J1	J2	J3	J4
Echantillon 1	6,002	3,93	3,852	3,726
Echantillon 2	6,03	3,989	3,921	3,746
Echantillon 2	6,012	3,856	3,830	3,731

Tableau 3.10 : Résultats des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations en Huile Essentielle.

Huile essentielle (mg)	350	400	450	500
Densité optique 1	0,570	0,560	0,481	0,442
Densité optique 2	0,584	0,534	0,525	0,430
Densité optique 3	0,577	0,551	0,504	0,410
% d'inhibition	15,25	19,48	26,08	37,24

Tableau 3.11 : Résultats des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations en Acide gallique.

Acide gallique	0,006	0,008	0,01	0,03	0,1
Densité optique 1	0,859	0,86	0,809	0,602	0,117
Densité optique 2	0,89	0,865	0,829	0,624	0,108
Densité optique 3	0,885	0,883	0,821	0,613	0,1125
% d'inhibition	4,252	5,234	10,687	33,151	87,78

APPENDICE C

Tableau 3.5.2 : Composition de l'huile essentielle du sapin baumier.

N°	Retention Time (min.)	Area	% of Total	Identification (NIST 08 / Massfinder)	Prob (%)
1	6.54	1.04E+09	1.13	Santene	77
2	7.73	6.34E+08	0.69	Tricyclene	43
3	7.83	1.32E+08	0.14	α -Thujene	51
4	8.06	1.59E+10	17.21	α-Pinene	70
5	8.59	5.13E+09	5.55	Camphene	79
6	9.28	1.76E+08	0.19	Sabinene / o-Cymene (co-elution)	68
7	9.46	2.70E+10	29.22	β-Pinene	84
8	9.80	1.01E+09	1.09	Myrcene	50
9	10.42	1.72E+10	18.55	δ-3-Carene	93
10	10.69	5.74E+07	0.06	α -Terpinene	63
11	10.95	3.17E+08	0.34	p-Cymene	84
12	11.07	7.71E+09	8.33	D-Limonene	39
13	11.13	5.19E+09	5.61	β-Phellandrene	81
14	12.00	1.74E+08	0.19	γ -Terpinene	82
15	12.84	8.24E+08	0.89	Terpinolene / Dehydrosabinaketone	36/66
16	12.99	1.84E+08	0.20	Fenchone	75
17	13.54	1.15E+08	0.12	β -Thujone	66
18	14.81	1.79E+08	0.19	Camphor	65
19	15.80	1.66E+08	0.18	4-Terpineol	61
20	16.25	3.95E+08	0.43	α -Terpineol	61
21	18.71	8.26E+09	8.93	L-Bornyl Acetate	48
22	22.13	1.81E+08	0.20	Longifolene	68
23	22.36	2.07E+08	0.22	β -Caryophyllene	32
24	23.25	1.06E+08	0.11	α -Humulene	26
25	24.22	2.23E+08	0.24	β -Bisabolene	25

APPENDICE D

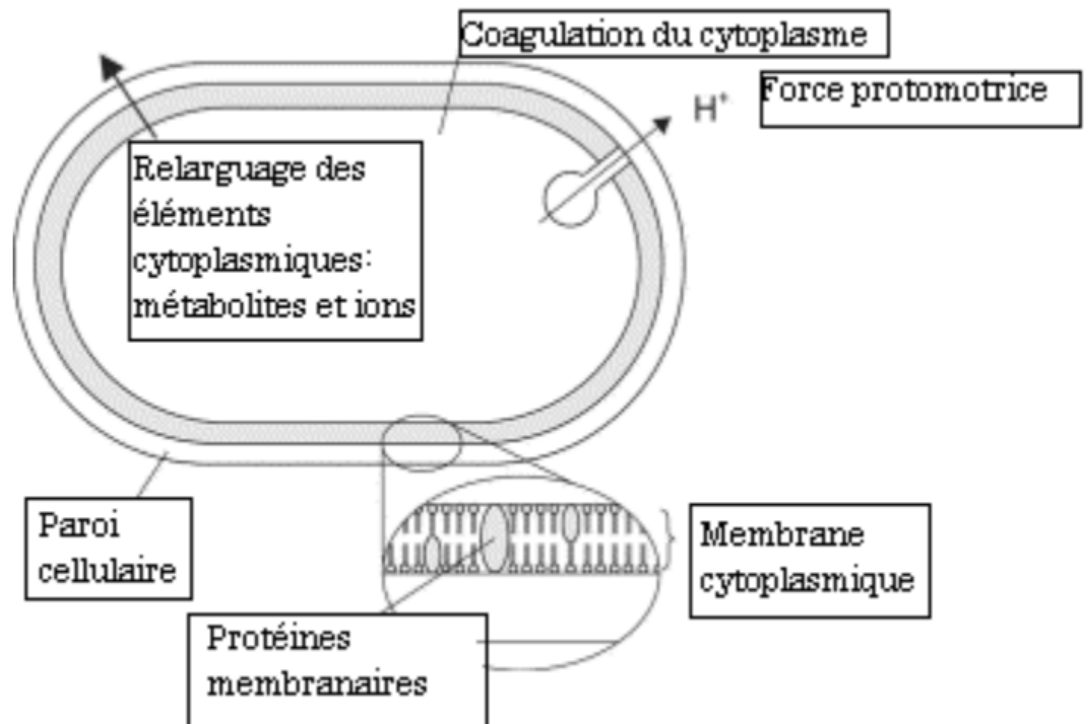


Figure 3.14 : Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

1. Quezel P. « Diversité et répartition des sapins sur le pourtour méditerranéen. » *Forêt. Médit.* Tome 9. N°2. Mai 1998, 93 -104.
2. Nature, International Union for Conservation of. «Sapin de Numidie». consulté le 09/10/2015, en ligne disponible sur <http://www.uicnmed.org/nabp/web/documents/awareness/44.pdf>
3. Tlili-Ait Kaki, T., Bennadja, S. & Chefrour, A. «Revalorisation d'une essence endémique: le sapin de Numidie (*Abies numidica*). » *Fl. Medit.*, 2013, 123 -129.
4. Akbli M., Rhallabi N., Ait Mhand R., Akssira M., Mellouki F. «Activité antibactérienne de l'huile essentielle de la sciure du bois de loupe de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc sur des souches d'origine clinique», *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 2016, 314 - 321.
5. Lebtahi F., Bouguedoura N. « La forêt Algérienne. », *Revue d'information et de vulgarisation "INRF"* , 2000, 39 - 42.
6. Kolai L. «La sapinière à *Abies numidica* dans le mont Babor. Phytosociologie et production. », *Annales de la recherche forestière en Algérie " 2ème semestre"*, 1992, 85 - 99.
7. Liul T. «A monograph of the genus *Abies*. ». Taipei, Taiwan. 1971, 508p.
8. «Threatened Conifers of the World, *Abies numidica* de Lannoy ex Carrière», <http://threatenedconifers.rbge.org.uk/taxa/details/abies-numidica3>, consulté le 22/03/2016.
9. Lebtahi F. «Contribution à l'étude du sapin de Numidie(*Abies numidica* de Lannoy) : multiplication par semis et par culture in vitro. » Mémoire de Magistère. ENS Kouba Alger, 2001, 96 p.
10. Quezel P., Santa S. «Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. », CNRS Paris, 1962, 33- 38.
11. Mhirit O., Blerot P. «Le grand livre de la forêt marocaine », Editions Mardaga, 1999, p73.

12. Linares JC. « Biogeography and evolution of *Abies* (Pinaceae) in the Mediterranean Basin: the roles of long-term climatic change and glacial refugia. ». *Journal of Biogeography*, 2011, 619 - 630.
13. Lamant T. « Aperçu sur les sapins méditerranéens en France ». *RDV techniques de l'ONF N° 19*, 2008, 64 - 72.
14. Zenasni F. «La forêt du mont Babor définition des différents types forestiers». *Mem. Ing. Agr. INA, El Harrach, Alger*, 1982, 65p.
15. Barbey A. «Une relique de la sapinière méditerranéenne : le mont Babors». *Librairie agricole de la maison rustique Paris*, 1934, 45p.
16. Gharzouli R., Djellouli M. «Diversité floristique de la kabylie des Babors (Algérie) ». *Sécheresse Vol. 16, n°3*, 2005.
17. Colombet M. «Ecologie des sapins méditerranéens». *CEMAGREF, Techniques forestières méditerranéennes, Groupement d'Aix-en-Provence*. 1984, pp: 3 -17.
18. Quezel P., Barbero M. «Caractéristiques écologiques. Dynamique et structure des populations naturelles de sapins sur le pourtour méditerranéen». *Sémin. Inter. Sapin médit. Adaptation. Sélection et sylviculture. Avignon*, 1990, 3 - 25.
19. Jullien E., Jullien J. «Guide écologique des arbres», *Sang de la Terre et groupe Eyrolles Paris*, 2009, 558 p.
20. Riou-Nivert P. «Les résineux: Écologie et pathologie». *Les résineux, Forêt privée française Vol 2*, 2005, 93p.
21. Venche T., Gary C. «Phytophthora sur *Abies* spp. (sapin) ». *Julius Kühn-Instituts, open journal system*, 2013.
22. Silvant C., «L'Aromathérapie: La nature au service de l'humanité», *Editions Publibook*, 2015, 166p.
23. Baudoux D. « Aromathérapie: se soigner par les huiles essentielles». *Amyris*, 2008.
24. Moller K. «La distillation à l'alambic, un art à la portée de tous». *Editorial UNICO*, 2008, 152 P.

25. AFNOR. «Recueil de normes : les huiles essentielles». Tome 1. Echantillonnage et méthodes d'analyse. AFNOR, Paris, 440 p.
26. Funk, Wagnalls. «Funk and Wagnalls New Encyclopedia».2004.
27. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. «Biological effects of essential oils». Food and Chemical Toxicology, 2008, 446 - 475.
28. Gildo P. «Précis de phytothérapie». Larousse Encyclopédie Alpen, 2006, pp: 3-4.
29. Bruneton J. «Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales»,2eme éd.,Paris, Tec & Doc - Éditions médicales internationales ,2008, p 1188.
30. Svoboda K.,Hampson J. «Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities».Oral Microbiology and Immunology , 1999, 202p.
31. Kunle O., Okogun J. «Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from Lippia multiflora leaf extract», Phytomedicine, 2003, 59 - 61.
32. Pibiri M.C, « Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles.», thèse de Doctorat, Lausanne, Canada, 2006, 177p.
33. Pierron C. «Les huiles essentielles et leurs expérimentations dans les services», 2014, thèse de doctorat en pharmacie, univesité de lorraine, 25p.
34. El Kalamouni C. «Caractérisation chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées.», Thèse de Doctorat. Université de Toulouse, 2010, 56p.
35. Bruneton J. «Pharmacognosie et phytochimie.» Plantes médicinales. Paris, France. Lavoisier. 1993, 278-279.
36. Boutin V., Fogelgesang J., Beaux J., Ribola F. «Atlas de la biologie végétale. » Dunod paris, 2010, 44p.
37. Breneton J., «Pharmacologie, Phytochimie, Plantes médicinales», 3ème Edition, Tec & Doc,1999, 406p.

38. Lucchesi M.E. «Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des Huiles Essentielles», Thèse de Doctorat, Université de la Réunion-france,2006, 11-18.
39. Basil A, Jimenez-carmonna M., Clifford A. « Extraction of rosemary by super heated water. », Journal of food chemistry, 1998, 5205-5209.
40. Moro Buronzo A. « Grand guide des Huiles Essentielles, Santé Beauté Bien être.», Hachette Pratique, 2008, 22-48.
41. Besombes C. «Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermo-mécanique d'herbes aromatiques, Applications généralisées», Thèse de doctorat, Université de la Rochelle,2009, 51p.
42. Lagunez Rivera L. « Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffée par induction thermomagnétique directe. » Thèse Doctorat, institut national polytechnique de Toulouse. 2006, 15 -35.
43. Roux D., Chaumont J.P., Cieur C., Millet J., Morel J.M. et Tallec D. «Conseil en aromathérapie. » Edition Pro-officina. 2ème édition. 2008, 173-174.
44. Franchomme P., Jollois R., Pénoel D. «L'aromathérapie exactement.», ed. Roger Jollois, 2010, 86 -94.
45. Halimi A. «L'Atlas Blidéen. Climats et étages végétaux »ed. O.P.N,Alger, 1980, 523p.
46. Prat R. « Expérimentation en biologie et physiologie végétales : 300 manipulations », Edition Herman, Paris, 2007, 56 p.
47. Linden G., Lorient D., «Biochimie Agro-industrielle. » Ed. Masson, Paris. 1994,360 p.
48. AFNOR « Recueil des Normes Françaises :(huiles essentielles)», AFNOR. Paris. 1986, 57 p.
49. Arpino P., Prevot A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Wittier P. «Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse», Ed.Masson, Paris,1995.

50. Djouahri A., Boudarene L., Meklati B.Y. «Effect of extraction method on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oil from the leaves of Algerian *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters» *Industrial Crops and Products*, 2013, 32–36.
51. CLSI. «Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically Approved standard M7-A7», Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2006, 26p.
52. Bendahou M., Nenyouchef M., Benkhada D., Elissa Costa J. «influence of the processes extraction on essential oil of *Origanum glandulosum*. », *Journal of applied sciences*, 2007, 1152-1157.
53. Lis-balchin M, deans SG, eaglesham E. « Relationship between the bioactivity and chemical composition of commercial plant essential oils », *Flav. Fragr. J.* 1998, 98–104.
54. Benjlali B., Tantaoui-Elaraki A., Ismaïl-Alaoui M., Ayadi A., «Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. », *Plantes médicinales et phytothérapie*. 1986, 155-167.
55. Van Vuuren SF., Suliman S., Viljoen AM. «The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. », *Lett Appl Microbiol.*, 2009, 440-6.
56. Bentabet N., Boucherit-Otmani Z., Boucherit k. «Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie», *Phytothérapie, Pharmacognosie*, 2014.
57. Gorenflot R. «Biologie végétale, plantes supérieures, tome 1 : appareil reproducteur», 3 ème édition, Masson, Paris. 1990, 38p.
58. Ghadbane M., K. R., M. S., B. H., B. L., S. T., Harzallah D. « Antioxidant and antimicrobial activities of endemictree *Abies numidica* growing in babor mountains from Algeria», *Global J Res. Med. Plants & Indigen. Med.*, 2016, 19-28.

59. Shatar S., Altantsetseg Sh., Dolgorikham D. and Sukhbaatar T. «composition of the essential oil from glycyrrhiza uralensis fisch. growing in mongolia.» Mongolian .Academic journal of Sciences, EdUlaan-baatar, 1989, p22.
60. Tenscher E., Anton R., Lobstein A. « Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles.» Edition Tec&doc. 2005, 3-50/121-124.
61. Laure Menin, Yury O. Tsybin, «Analyse d'une huile essentielle par GC-MS», école polytechnique fédérale de lausanne, 2011.
62. Ghanmi M., El Abid A., Chaouch, A. Aafi, A., Aberchane M., El Alami, A., Farah A. «Etude du rendement et la composition de l'essence de térébenthine du Maroc: cas du Pin maritime. (Pinus pinaster) et du Pin d'Alep (Pinus halepensis). », Acta Bot. Gallica , 2005, 3-10.
63. Mesaros N., Nordmann P., Plésiat P., Roussel-Delvallez M., Van Elesere J., An Eldere M., Glupczynsk Y. « Pseudomonas aeruginosa :résistance et options thérapeutiques à l'aube du deuxième millénaire.», Louvain médical, 2007, 305-316.
64. Kalemba D., Kunicka A. « Antibacterial and antifungal properties of essential oils. », Current Med Chem 2003, 813-29.
65. Lahlou, M. «Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils.» Phytother Res, 2004, 435-48.
66. Lambert R. J. W., Skandamis P. N. «A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. » J App Microbiol, 2001, 53-62.
67. Burt S. «Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods, a review. » Int. J. Food Microbiol, 2004 ,223-253.
68. Levy SB, Marshall B. « Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. » , Nat. Med.,2004, 122-129.
69. Sikkema J., Bont JAM., Poolman B., «Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. », J. Biol. Chem., 1994, 8022-8028.

70. Sing R., Marimuthu P., De Heluani C.S., Catalan Ceser A.N. « Antioxidant and biocidal Activities of Carum nigrum (seed) Essential oil, Oleoresin, and Their Selected Components. », Journal of Agricultural and Food Chemistry ., 2006, 174-181.

