

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université BLIDA 1
Faculté des Sciences
Département de Chimie



Mémoire présenté par

BOUCHACHIA ROUFILA ET AMEUR SELMA

En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Science de la matière

Filière : Chimie

Option : **Chimie des produits Naturels**

Thème

**Valorisation via héli-synthèse des huiles
essentielles à chemotype aldéhyde**

Soutenu publiquement le 17/09/2019 devant le jury composé de :

R.Mehdaoui	MCA	Présidente	Université Blida 1
F.Benmered	MAA	Examinatrice	Université Blida 1
H.Boutoumi	Pr	Promoteur	Université Blida 1
A.Drioueche		Co-promotrice	Université Blida 1

Année universitaire : 2018-2019

Sommaire

Remerciement

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

Abstrat

ملخص

Introduction..... 01

Partie théorique

Chapitre 1 : Aperçu bibliographique sur les HEs

1.1 Définition	03
1.2 Localisation	03
1.3 Composition	03
1.4 Méthodes d'extractions	04
1.4.1. Entraînement à la vapeur	04
1.4.2. Hydro-distillation	04
1.5. Analyse des huiles essentielles	05
1.5.1 Analyse chromatographique	05
1.5.1.1 CPG	05
1.5.1.2 CG/SM	05
1.5.2 Analyse spectroscopique	06
1.5.2.1 A.T.R-IRTF	06
1.5.2.2 UV-Visible	06
1.5.2.3 RMN	07
1.6 Les HEs chémotypées	07

Chapitre 2 : Monographie des deux espèces étudiées

2.1 Introduction	08
2.2 Description de la famille des Apiaceae	08

2.3 <i>Cuminum cyminum</i>	08
2.3.1 Caractéristiques botaniques	08
2.3.2 Habitat	10
2.3.3 Utilisation thérapeutique et biologique	10
2.3.4 Les principaux constituants biochimiques de l'HE du cumin	10
2.4 <i>Ammodaucus leucotrichus</i>	10
2.4.1 Caractéristiques botaniques	11
2.4.2 Habitat	12
2.4.3 Utilisation thérapeutique et biologique	12
2.4.4 Les principaux constituants biochimiques de l'HE du cumin velu	13
2.5 Intérêts biologiques des HEs à chémotype aldéhyde	13

Chapitre 3 : La chimie des aldéhydes

3.1 Définition	15
3.2 Tests de reconnaissance	15
3.3 Caractérisation de la liaison C=O	15
3.3.1 Géométrie et énergie	15
3.3.2 Polarité	15
3.4 Propriétés physiques	16
3.5 Réactivité du groupe carbonyle	16
3.6 Héli-synthèse des aldéhydes	17
3.6.1 Synthèse des hydrazones	17
3.6.2 Synthèse des benzimidazoles	18

Partie expérimentale

Chapitre 1 : Matériels et méthodes

1.1 Matériels	19
1.1.1 Matériels végétaux	19
1.1.2 Matériels d'analyses	19
1.1.2.1 UV-Visible	19
1.1.2.2 CPG	20

1.1.2.3 CG/SM	20
1.1.2.4 ATR-IRTF	20
1.1.2.5 RMN	21
1.1.3 Matériels biologique	21
1.1.3.1 Les milieux de cultures	21
1.1.3.2 Souches microbiennes	21
1.2 Méthodes	22
1.2.1 Extraction de l'HE	22
1.2.2 Caractéristiques des HEs	23
1.2.2.1 Propriétés organoleptiques	23
1.2.2.2 Indices physico-chimiques	23
1.2.3 Test de reconnaissance	24
1.2.4 Modification chimique	25
1.2.4.1 Synthèse des hydrazones	25
1.2.4.2 Synthèse des benzimidazoles	25
1.2.5 Evaluation de l'activité antimicrobienne	25
1.2.5.1 Aromatogramme	25
1.2.5.2 Méthode micro-atmosphérique	26
1.2.5.3 Détermination de la CMI	27

Chapitre 2 : Résultats et discussions

2.1 Rendement de l'extraction des HEs des plantes étudiées	30
2.2 Caractéristiques physico-chimiques	31
2.3 Test de reconnaissance	31
2.4 Analyse chromatographiques et spectroscopiques des deux huiles	32
2.4.1 Caractérisation par UV-vis	32
2.4.2 Caractérisation par ATR-IRTF	33
2.4.3 Caractérisation par CPG	34
2.5 Modification chimique des deux huiles par l'hydrazine	36
2.5.1 Synthèse des hydrazones	36

2.5.2	Caractères physico-chimiques des hydrazones	37
2.5.3	Caractérisation par UV-vis	37
2.5.4	Caractérisation par ATR-IRTF	38
2.5.5	Caractérisation par CG/SM.....	39
2.6	Modification chimique des deux huiles par o-phenelenediamine	42
2.6.1	Synthèse de benzimidazole	42
2.6.2	Caractères physico-chimiques de benzimidazole	42
2.6.3	Caractérisation par UV-vis	43
2.6.4	Caractérisation par ATR	43
2.6.5	Caractérisation par RMN	44
2.7	Evaluation de l'activité antibactérienne des HEs testées	45
2.7.1	Méthode de l'aromatogramme	45
2.7.2	Méthode atmosphérique.....	47
2.7.3	Méthode de la CMI.....	47
	Conclusion	49
	Bibliographie	50

Remerciements

Merci ALLAH de nous avoir donné la vie, la force et la patience, la faculté d'accomplir la noble tâche d'apprendre, et pour ces orientations et ces encouragements durant la réalisation de ce mémoire.

Nous tenons à exprimer nos profonds remerciements à notre promoteur, le professeur BOUTOUMI HOCINE, Professeur à la faculté de Technologie et notre Co-promotrice Mme DRIOUECHE ASMA qui nous ont fait l'honneur d'avoir veillé et dirigé ce travail par leurs conseils pertinents, leurs aides précieuses et chaleureuses et la constante disponibilité dont ils ont fait preuve pour suivre le cheminement de ce travail. Nous voudrions qu'ils trouvent ici toute notre reconnaissance pour ces encouragements.

Nous voudrions remercier très sincèrement Mlle AMEL, qui nous a encadrés au LABORATOIRE de FOUBOURG, pour son aide précieuse et ses orientations concernant l'étude de l'activité antimicrobienne.

Nous remercions vivement les membres de ce jury :

Nous remercions particulièrement Madame MEHDAOUI d'avoir accepté d'assurer la présidence de ce jury.

Nous remercions également Madame BENMERED pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner et d'évaluer ce modeste travail.

Nos sentiments de reconnaissance et nos vifs remerciements vont également à tous ceux qui ont contribué chacun par son nom, de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Rêve qui se réalise grâce à Dieu le tout puissant, ce mémoire est enfin achevé, je le dédie aux personnes qui sont très chères pour moi :

A mes très chers parents djilali et fatma, tout au long de mon cursus, ils m'ont toujours soutenu, encouragé et aidé. Sans eux je n'y arriverais jamais à être la personne que je suis. Qu'ils trouvent, dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de leurs efforts ainsi que l'expression de ma plus affectueuse gratitude.

A mes sœurs, Souad, Nawal, Sarah, Amina et mon neveu Ayoub pour ce bonheur d'avoir grandi ensemble et pour tous ces bons moments que l'on continue à passer.

A mes plus chers amis pour leur présence de tous les instants, pour le soutien qu'ils m'ont apporté Aki, Aya, Maroua et Khadidja.

A mon amie, sœur d'abord puis binôme Roufila pour tous les moments durs et agréables passés ensembles.

Mes dédicaces sont également adressées à tous mes camarades avec lesquels j'ai partagé de beaux moments et dont je garde d'excellents souvenirs.

Selma

Dédicace

Avec l'aide de bon DIEU, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

A mes chers parents que j'adore, papa Abdelkader et mama Aziza, pour leurs soutiens, leurs amours et leurs encouragements tout le long de mon cursus universitaire "je ne trouverai jamais les mots pour vous remercier"

A la mémoire de ma grand-mère

A Mes grands-parents

A mes frères adorés Hacen et Youssef

A ma petite et adorable sœur Soundous

A mon fiancé Smail

A mes meilleures amies Manel, Loubna, Saliha

Non oublier mon amie, sœur d'abord puis binôme Selma pour tous les moments durs et agréables passés ensemble.

Mes dédicaces sont également adressées à tous mes camarades de promotion de master avec lesquels j'ai partagé de beaux moments et dont je garde d'excellents souvenirs

Roufela

Liste des abréviations

AFNOR : Association Française de Normalisation.

A.leucotrichus : *Ammodaucus leucotrichus*.

ATB : Antibiotique

ATR-IRTF : Réflexion Totale Atténuée- Infrarouge à Transformée de Fourier

ATCC: American Type Culture Collection.

°C : Degré Celsius.

cm : centimètre.

C.cyminum : *Cuminum cyminum*.

CG/SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

CPG : Chromatographie en Phase gazeuse.

DMH : 1,2-dimethyl hydrazine.

DMSO : Dimethyl sulfoxyde.

DO : Densité Optique.

E.coli : *Escherichia coli*

eV : électron-volt

F.T.I.R : Infrarouge à Transformée de Fourier.

G : gramme.

h : heure.

Ir : indices de rétention.

HE : Huile Essentielle.

H.E.C.T : Huile Essentielle ChemoTypée.

IK : Indice de Kovats.

ml : Millilitre.

mm : millimètre.

mg : milligramme.

nm : nanomètre.

MH: Muller Hinton.

Min: minute.

R : Rendement en huile essentielle.

RF : Radiofréquence.

SAB: Sabouraud.

UV-Visible: Ultraviolet/Visible.

VSEPR: Valence Shell Electron Pair Repulsion.

pm : Partie par Million.

µg : Micro gramme.

µL : Micro litre.

% : Pourcentage.

Liste des figures

Partie bibliographique

Chapitre 1

Figure 1.1 : Schéma de montage de l'entraînement à la vapeur.

Figure 1.2 : Schéma de montage d'hydro-distillation.

Chapitre 2

Figure 2.1 : *Cuminum cyminum*.

Figure 2.2 : Graines de *C.cyminum*.

Figure 2.3 : *Ammodaucus leucotrichus*.

Figure 2.4 : Graines d'*A.leucotrichus*.

Chapitre 3

Figure 3.1 : Les formes limites du carbonyle.

Figure 3.2 : Réaction de formation d'hydrazone.

Figure 3.3 : Mécanisme réactionnel de la synthèse d'hydrazone.

Figure 3.4 : Réaction de formation de benzimidazole.

Figure 3.5 : Mécanisme réactionnel de la synthèse de benzimidazole.

Partie expérimentale

Chapitre 1

Figure 1.1 : Montage légendé de l'extraction par hydro-distillation de type clevenger.

Figure 1.2 : Pycnomètre remplie d'HE de *C.cyminum*.

Figure 1.3 : Pycnomètre remplie d'eau.

Figure 1.4 : Pycnomètres remplie d'HE d'*A. leucotrichus*.

Figure 1.5 : Réaction de test de reconnaissance.

Figure 1.6 : Principe de l'aromatogramme.

Figure 1.7 : Principe de la micro-atmosphérique.

Figure 1.8 : Schéma descriptive de la CMI.

Chapitre 2

Figure 2.1 : Histogramme des rendements de l'extraction des HEs du *C.cyminum* et d'*A.leucotrichus*.

Figure 2.2 : La position des HEs par rapport à l'hydrolat.

Figure 2.3 : Réactions de test de reconnaissance des aldéhydes.

Figure 2.4 : Spectre UV-Visible de l'HE de *C.cyminum*.

Figure 2.5 : Spectre UV-Visible de l'HE d'*A.leucotrichus*.

Figure 2.6 : Spectre ATR-IRTF de l'huile essentielle de *C.cyminum*.

Figure 2.7 : Spectre ATR-IRTF de l'huile essentielle d'*A.leucotrichus*.

Figure 2.8 : Chromatogramme de CPG de l'huile essentielle de *C.cyminum*.

Figure 2.9 : Chromatogramme de CPG de l'huile essentielle d'*A.leucotrichus*.

Figure 2.10 : Synthèse des hydrazones.

Figure 2.11 : Spectre UV-Visible du composé A.

Figure 2.12 : Spectre UV-Visible du composé B.

Figure 2.13 : Spectre ATR-IRTF du composé A.

Figure 2.14 : Spectre ATR-IRTF du composé B.

Figure 2.15 : Chromatogramme de CG/SM du composé A.

Figure 2.16 : Chromatogramme de CG/SM du composé B.

Figure 2.17 : Synthèse des benzimidazoles.

Figure 2.18 : Spectre UV-Visible du composé C.

Figure 2.19 : Spectre UV-Visible du composé D.

Figure 2.20 : Spectre ATR-IRTF du composé C.

Figure 2.21 : Spectre ATR-IRTF du composé D.

Figure 2.22 : Spectre RMN ^1H du composé D.

Figure 2.23 : Spectre RMN ^{13}C du composé D.

Figure 2.24 : 2-[4-(prop-1-en-2-yl)cyclohex-1-en-1-yl]-1*H*-benzimidazole.

Liste des tableaux

Partie bibliographique

Chapitre 2

Tableau 2.1 : Appellation de *C.cyminum*.

Tableau 2.2 : Classification de *C.cyminum*.

Tableau 2.3 : Appellation d'*A.leucotrichus*.

Tableau 2.4 : Classification d'*A.leucotrichus*.

Partie expérimentale

Chapitre 1

Tableau 1.1 : Matériels végétaux utilisés.

Tableau 1.2 : Matériels biologiques utilisés.

Chapitre 2

Tableau 2.1 : Le rendement d'extraction des HEs du *C.cyminum* et d'*A.leucotrichus*.

Tableau 2.2 : Caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques des HEs.

Tableau 2.3 : Composition chimique des HEs du *C.cyminum* et d'*A.leucotrichus*.

Tableau 2.4 : Les caractéristiques physico-chimiques des hydrazones.

Tableau 2.5 : Composition chimique du composé A.

Tableau 2.6 : Composition chimique du composé B.

Tableau 2.7 : Les caractéristiques physico-chimiques des benzimidazoles des deux huiles.

Tableau 2.8 : Les zones d'inhibitions des microorganismes pour les échantillons à l'état purs et diluer.

Tableau 2.9 : Effet inhibiteur des huiles essentielles.

Tableau 2.10 : Les CMI avec les huiles et les hydrazones.

Résumé

Les plantes aromatiques représentent une source inépuisable de substances naturelles douées de propriétés biologiques présentant un intérêt réel. Dans ce contexte, l'hydrodistillation du *Cuminum cyminum* (le cumin) et d'*Ammodaucus leucotrichus* (le cumin velu) a permis l'obtention des huiles essentielles avec un rendement moyen de 2.15% et de 2.27% respectivement. L'identification de ces huiles essentielles par CPG a montré leurs richesses en aldéhydes ou le cuminaldéhyde a été révélé comme composé majoritaire de l'HE du cumin avec une teneur de 42.29% et le périllaldéhyde comme composé majoritaire de l'HE du cumin velu avec une teneur de 40.08%, ces résultats ont été confirmés par la CG-SM. La modification chimique de ces HES par action de l'hydrazine monohydrate et l'o-phenylenediamine sur les aldéhydes constituants a conduit à la formation des hydrazones et des benzimidazoles correspondant, ces derniers ont été caractérisés et identifiés par UV-vis, ATR-IRTF, CG-SM et RMN. Les résultats de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles natives et modifiées étudiés par la méthode de diffusion sur disque (Aromatogramme) et confirmés par l'étude de la CMI ont montré une amélioration considérable de l'activité dans le cas d'utilisation des hydrazones par rapport à celle des huiles sur trois souches bactérienne et une souche fongique.

Mots clé : *Cuminum cyminum* ; *Ammodaucus leucotrichus* ; huile essentielle ; hydrazones ; benzimidazoles ; activité antimicrobienne.

Abstrat

Aromatic plants are an inexhaustible source of natural substances with biological properties of real interest. In this context, the hydrodistillation of *Cuminum cyminum* (cumin) and *Ammodaucus leucotrichus* (hairy Cumin) has enabled the obtaining of essential oils with an average yield of 2.15% and 2.27% respectively, the identification of these essential oils by CPG has showed their riches in aldehydes or cuminaldehyde was revealed as the majority compound of cumin oil with a content of 42.29% and perillaldehyde as the majority compound of hairy cumin oil with a content of 40.08%, this results are confirmed by the GC-MS. Chemical modification of these oils by action of monohydrate hydrazine and o-phenylenediamine on constituent aldehydes led to the formation of corresponding hydrazones and benzimidazoles. These products are characterized and identified by UV-vis, ATR-IRTF, GC-MS and RMN. The results of the antimicrobial activity of native and modified essential oils studied by the disk diffusion method (Aromatogram) showed a considerable improvement in activity in the case of the use of the hydrazone compared to essential oils on three bacterial strains and one fungal strain; these results are confirmed by the study of CMI.

Keywords: *Cuminum cyminum* ; *Ammodaucus leucotrichus*; essential oil; hydrazones ; benzimidazoles ; antimicrobial activity.

ملخص

تعتبر النباتات العطرية مصدر للمواد الطبيعية التي تتمتع بخصائص بيولوجية ذات أهمية حقيقية. في هذا السياق أتاحت عملية التقطير المائي للكمون (*Cuminum cyminum*) والكمون الصوفي (*Ammodaucus leucotrichus*) الحصول على زيوت أساسية بمتوسط قدره 2.15% و 2.27% على التوالي. أظهر تحديد هذه الزيوت العطرية من قبل CPG ثروتها في الأدهيدات، حيث تم الكشف عن كومينالديهيد باعباره المركب الرئيسي للكمون بمحتوى 42.29% والبيغيلالديهيد كمركب أغلي للكمون الصوفي مع درجة 40.08%. حيث تم تأكيد هذه النتائج بواسطة CG-SM. أدى التعديل الكيميائي لهذه المواد الكيميائية عن طريق عمل هيدرازين مونوهيدرات وأو فينيلينديامين على الأدهيدات المكونة إلى تكوين hydrazone و benzimidazoles المطابقين اللذين تم تمييزهما وتحديدتهما بواسطة UV-vis، حيث أظهرت نتائج النشاط المضاد للميكروبات للزيوت الأساسية الأصلية ATR-IRTF، CG-SM و RMN. حيث أظهرت نتائج النشاط المضاد للميكروبات للزيوت الأساسية الأصلية والمعدلة بطريقة نشر القرص (Aromatogram) تحسنا ملحوظا في هذا النشاط في حالة استخدام hydrazones مقارنة مع الزيوت الأساسية على ثلاث سلالات بكتيرية وسلالة فطرية و تم تأكيد هذه النتائج دراسة CMI.

الكلمات المفتاحية: *Cuminum cyminum* ; *Ammodaucus leucotrichus* ; الزيوت الاساسية ; benzimidazoles ; hydrazones ; النشاط المضاد للمكروبات.

Introduction générale

De tout temps et à travers les diverses civilisations : grecque, romaine, égyptienne, chinoise... et arabe, l'homme a eu recours aux plantes non seulement pour se nourrir, se vêtir, se chauffer, se loger, se parfumer...mais aussi pour entretenir son équilibre, soulager ses maux, prévenir et guérir les maladies qui nuisent à sa santé.¹

En effet, les plantes aromatiques et médicinales représentent la principale source de principes actifs, dont le rôle et l'utilisation sont très variés. Ainsi, les HEs constituent l'un des principes actifs les plus remarquables par leurs nombreuses propriétés organoleptiques, odorantes, curatives...et par leurs multiples applications dans le secteur industriel.² Et aussi par leurs diverses activités antimicrobienne, anti-oxydante, analgésique et anti-inflammatoire...³

La flore algérienne avec ses 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15% endémiques, reste très peu explorée sur le plan phytochimique comme sur le plan pharmacologique. Sous l'influence de facteurs extérieurs, la composition chimique des huiles essentielles issues de deux plantes d'une même famille botanique peut présenter des spécificités biochimiques très différentes, on parle alors de chémotype.⁴

Dans ce contexte, deux plantes médicinales Algérienne chémotypées aldéhyde, appartiennent à la même famille des Apiaceae, *Cuminum cyminum* (le cumin) et l'*Ammodaucus leucotrichus* (le cumin velu), ont été étudiés dans le présent travail. Ces derniers sont des plantes annuelles, qui ont une variété des propriétés médicinales connue depuis l'antiquité. Les deux plantes sont utilisées pour traiter les troubles digestives, les coups de froids, ainsi qu'une prise d'une infusion quotidienne prévient le diabète.^{5,6}

L'objectif de notre étude est la valorisation via l'hémi-synthèse des huiles essentielles de ces deux espèces dans le but d'améliorer leurs activités antimicrobienne. Le présent travail comporte deux parties :

Dans la première partie, nous abordons les différentes connaissances bibliographiques sur les huiles essentielles, les deux plantes étudiées, leurs répartitions géographiques, caractéristiques botaniques, utilisations thérapeutiques, compositions chimiques de ses huiles et leurs propriétés médicinales et on termine par la chimie des aldéhydes.

Une partie expérimentale composée elle-même de plusieurs volets, à savoir :

- L'extraction des huiles essentielles du cumin et du cumin velu par hydro-distillation.
- La caractérisation physico-chimique et organoleptique des huiles essentielles.
- La modification chimique des HEs via l'hémi-synthèse.
- L'identification des produits synthétisés par les méthodes chromatographiques et spectroscopiques.
- L'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles natives et modifiés.
- L'interprétation et discussion des résultats obtenus.
- En fin, une conclusion générale.

Partie
théorique

Chapitre 1 : Aperçu bibliographique sur les HEs

1.1 Définition

Une huile essentielle est un extrait liquide concentré très complexe hydrophobe qui contient les principes actifs (ou principes volatils) d'une partie d'un végétal, c'est le résultat d'extraction d'une plante aromatique.⁷

AFNOR définit une HE comme étant un produit obtenu à partir d'une matière végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation à sec. L'HE est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques.⁸

1.2 Localisation

Elles se localisent dans toutes les parties vivantes de la plante, aussi bien dans les fleurs, les feuilles, les fruits, les tiges que dans les écorces, les graines, les racines, les rhizomes ou le bois. Elles se forment dans des cellules spécialisées, le plus souvent, regroupées en poches ou en canaux sécréteurs et elles sont ensuite transportées lors de la croissance de la plante dans d'autres parties.⁹

1.3 Composition

La composition chimique des HEs est très complexe d'un double point de vue, à la fois par le nombre élevé des constituants présents et surtout par la diversité considérable de leurs structures. Elle peut varier selon l'organe, l'origine géographique et botanique, la localisation des sites producteurs, les facteurs climatiques, la nature de sol, le procédé et les conditions d'extraction, ainsi que la conservation (séchage et stockage).¹⁰

En effet, les HEs sont un mélange de molécules variées qui appartiennent principalement à deux groupes : Les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes qui se différencient entre eux par l'origine biogénétique. D'autres substrats en faible proportion, entrent dans la constitution de certaines HEs (acides organiques, esters et autres...).¹¹

1.4 Méthodes d'extractions

Le choix de la méthode la mieux adaptée à l'extraction des huiles essentielles d'un végétal se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter.

1.4.1 Entraînement à la vapeur

Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur ascendant ou descendant sans macération préalable. Cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale, elle est basée sur le fait que la plupart des composés odorants volatils contenus dans les végétaux sont entraînés par la vapeur d'eau. Le plus souvent, la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille perforée.¹²

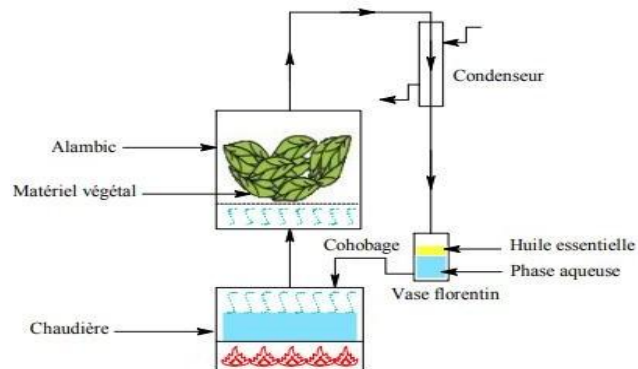


Figure 1.1 : Schéma de montage de l'entraînement à la vapeur

1.4.2 Hydro-distillation

Son principe consiste à immerger la matière végétale directement dans un réacteur rempli d'eau placé sur une source de chaleur. L'ensemble est ensuite porté à ébullition sous une pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales.¹²

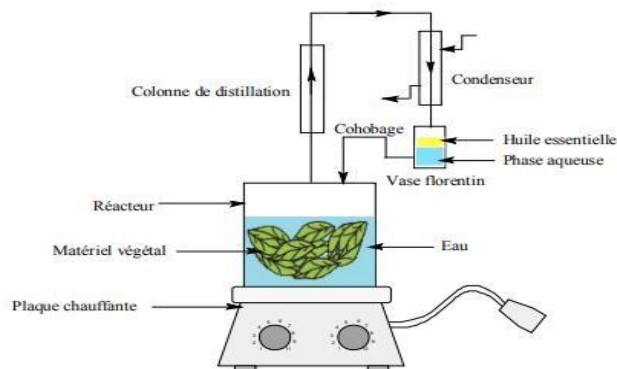


Figure 1.2 : Schéma de montage d'hydro-distillation

1.5 Analyses des huiles essentielles

Les techniques d'analyses chromatographiques et spectroscopiques ont pour but de séparer les différentes molécules présentes dans un mélange et pour déduire des informations sur la structure de ces molécules.

1.5.1 Analyses chromatographiques

1.5.1.1 CPG

La CPG s'est montrée une méthode la plus appropriée à la séparation et l'identification des constituants des HEs particulièrement avec la programmation de la température. Elle permet à la fois l'analyse qualitative et quantitative. L'échantillon est injecté et vaporisé au sommet de la colonne. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert à la phase mobile. A la sortie de la colonne se trouve un détecteur relié à un enregistreur.¹³

1.5.1.2 CG-SM

Le but de combiner entre la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse, après séparation chromatographique, est d'ajouter à la chromatographie une deuxième dimension analytique.¹⁴

Principe

Il consiste à transférer les composés séparés par chromatographie en phase gazeuse par la phase mobile (le gaz vecteur) dans le spectromètre de masse au niveau duquel, ils vont être fragmentés en ions de masse variables dont la séparation sera en fonction de leur Masse. L'identification est ensuite réalisée par comparaison des indices de rétention (Ir) et des données spectrales (spectre de masse) des constituants individualisés avec les caractéristiques de produit de référence contenu dans des bibliothèques de spectres.¹⁵

1.5.2 Analyses spectroscopiques

1.5.2.1 ATR-IRTF

La réflexion totale atténuée est une technique d'échantillonnage IR qui fournit d'excellentes données de qualité en conjonction avec la meilleure reproductibilité, cette technique a révolutionné l'échantillon liquide et solide à travers une manipulation plus rapide.

Principe

Un accessoire de réflexion totale atténuée fonctionne en mesurant les changements qui se produisent dans un faisceau infrarouge réfléchi totalement à l'intérieur lorsque le faisceau entre en contact avec un échantillon. Un faisceau infrarouge est dirigé sur un cristal optiquement dense avec un indice de réfraction élevé à un certain angle. Cette réflexion

interne crée une onde évanescente qui se prolonge au-delà de la surface du cristal dans l'échantillon maintenu en contact avec le cristal. Il peut être plus facile de penser de cette onde évanescente comme une bulle d'infrarouge qui se trouve sur la surface du cristal. Cette onde évanescente fait saillie à quelques microns ($0,5\mu - 5\mu$) au-delà de la surface du cristal et dans l'échantillon. Par conséquent, il doit y avoir un bon contact entre l'échantillon et la surface du cristal. Dans les régions du spectre infrarouge où l'échantillon absorbe de l'énergie, l'onde évanescente sera atténuée et modifiée. L'énergie atténuée de chaque onde évanescente on fait passer vers le faisceau infrarouge, qui sort ensuite de l'extrémité opposée du cristal et transmis au détecteur dans le spectromètre IR.¹⁶

1.5.2.2 UV-Visible

La spectroscopie d'absorption dans l'UV et le visible est une méthode très commune dans les laboratoires. Elle est basée sur la propriété des molécules d'absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée.

Principe

Dans une molécule, les transitions électroniques UV-visibles mettent en jeu les énergies les plus importantes (environ de 13000 à 50000 cm^{-1} soit 160 à $665\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). L'ordre de grandeur des énergies mises en jeu est celui des énergies de liaison des molécules et ces rayonnements peuvent parfois provoquer des ruptures de liaisons. Plus généralement, ils provoquent des transitions électroniques entre les différents niveaux d'énergie des molécules.¹⁷

1.5.2.3 RMN

La résonance magnétique nucléaire est fondée sur la mesure de l'absorption de la radiation de radiofréquence (RF) par un noyau atomique dans un champ magnétique fort.

L'absorption de la radiation pousse le spin nucléaire à se réaligner ou à retourner dans la direction de la plus haute énergie. Après avoir absorbé l'énergie, les noyaux atomiques réémettront une radiation RF et retourneront à leur état initial de moindre niveau d'énergie.

Identification des constituants

L'identification est réalisée par la prise en compte du nombre de pics observés par rapport à ceux attendus pour chaque molécule, du nombre de superpositions des signaux et des variations des déplacements chimiques des carbones dans les spectres du mélange par rapport aux valeurs de références (M). En plus de ces paramètres qui sont accessibles par un logiciel, l'intensité des raies de résonance permet de contrôler l'appartenance d'un déplacement chimique à un composé donné. Cette technique permet l'identification de

différents composants à une teneur supérieure ou égale à 0.5% sans purification précédente.¹⁸

1.6 Les HEs chémotypées

Les H.E.C.T sont des formes de classification chimique, botanique et biologique de la molécule présente en majorité dans une huile essentielle. Par exemple, l'H.E.C.T de *Thymus vulgaris* à carvacrol est connue pour son activité antiseptique majoritairement alors que l'H.E.C.T de *Thymus vulgaris* à thymol a des propriétés anti-infectieuses majeures.¹⁹ Il est donc préférable de choisir une H.E.C.T lorsqu'on utilise les huiles essentielles en thérapeutique.

Chapitre 2 : Monographie des deux espèces étudiées

2.1 Introduction

Les plantes médicinales ont constitué le principal outil thérapeutique à la disposition de l'homme, leurs propriétés ont été mises en évidence par l'observation des effets qu'elles généraient sur l'organisme. Avec le progrès de la science, les chercheurs basés sur l'isolement des principes actifs qui sont issus des métabolites secondaires, ces substances chimiques naturelles sont considérées comme responsables de l'action thérapeutique.²⁰

2.2 Description de la famille des Apiaceae

Famille de plantes dicotylédones, très importante dans la flore algérienne où elle est représentée par 55 genres. Ce sont des arbustes, plantes sous-frutescentes ou herbacées, très variables à feuilles en général très divisées. Inflorescences ombelliformes munies à leur base de bractées souvent très caduques simples, ou le plus souvent composées d'ombellules. Fleurs, sépales généralement très petits ou nuls, avec des pétales libres. Fruits constitués par un diakène couronné par le bourrelet calycinal.²¹

2.3 *Cuminum cyminum*

Le cumin est une petite plante annuelle, originaire du Turkestan, d'où elle fut rapidement propagée dans l'ensemble des pays méditerranéens puis jusqu'en Amérique latine. Épice et plante médicinale très populaire dans l'Égypte ancienne, le cumin était prescrit contre les affections digestives et respiratoires, ainsi que pour soigner les caries dentaires. Le cumin est largement employé au moyen Âge.²² Le fruit du cumin est un ingrédient essentiel dans de nombreux mélanges d'épices : baharat arabe, poudre de curry Indienne, pâte de curry Thaïlandaise et condiment cajun.²³

2.3.1 Caractéristiques botaniques

2.3.1.1 Description de la plante

Le cumin est une petite plante herbacée de la famille des Apiaceae, d'une hauteur de 30 cm à feuilles parfumées, finement divisées, ombelles de petites fleurs blanches ou roses en été. Le fruit est fusiforme, d'une couleur jaune claire, qui devient plus foncée au contact de l'air, strié variant du vert au gris-brun,²⁴ d'une odeur aromatique et un goût épicé et amer.²⁵



Figure 2.1 : *Cuminum cyminum*



Figure 2.2: Graines de *C.cyminum*

2.3.1.2 Classification ²¹

Appellations

Nom français	Cumin, Cumin blanc
Nom anglais	Cumin
Nom arabe	الكمون
Nom latin	<i>Cuminum cyminum</i>

Tableau 2.1 : Appellation de *C.cyminum*

Systematique

Règne	Plantes
Embranchement	Spermaphytes
Classe	Dicotyledones
Ordre	Apiales
Famille	Apiaceae
Genre	<i>Cuminum</i>
Espèce	<i>Cuminum cyminum</i>

Tableau 2.2 : Classification de *C.cyminum*

2.3.2 Habitat

Le cumin est cultivé en Afrique du Nord et au Sud-ouest de l'Asie; dans des sols légers, bien drainés, au soleil.²³ On cueille ses graines à la fin de l'été, lorsqu'elles sont mûres.²²

2.3.3 Utilisation thérapeutique

Les phytothérapeutes Indiens prescrivent le cumin contre les insomnies, les coups de froid et pour abaisser la fièvre. Mélangé au jus d'oignon, il forme une pâte que l'on applique sur les piqûres de scorpion.²²

Partout au Maroc, les graines de cumin en poudre ou en décoction, sont très utilisées dans le traitement des troubles gastro-intestinaux. Il est en effet recommandé comme stomachique, carminatif, antispasmodique et vermifuge. Ils l'ont employé aussi en décoction comme emménagogue. En usage externe, le cumin est utilisé en cataplasmes sur la nuque contre les oreillons.²⁶

Le cumin est utilisé largement dans la médecine Ayurvédique (l'ancienne médecine Indienne), pour le traitement de la dyspepsie, la diarrhée et de l'ictère.²⁷

2.3.4 Les principaux constituants biochimiques de l'HE du cumin

L'huile essentielle de la plante du cumin, une est cultivée en Algérie (Boumerdes) et la deuxième en Tunisie obtenue par hydrodistillation a été analysée par CPG/SM. L'huile était dominée par les aldéhydes qui représentaient respectivement un rendement de 2.25% et 1.45%. Ces principaux constituants étaient le cuminaldéhyde (40.07%), 1-phenyl,1,2-Ethanol (27.89%), Myrtenal (11.25%), *p*-cymène (7.40%), γ -terpinène (5.24%)²⁸ en Algérie, et en Tunisie le cuminaldéhyde (39.48%), γ -terpinène (15.21%), *p*-cymène (11.82%), β -pinène (11.13%) et 2-carene (7.93%).²⁹

2.4 *Ammodaucus leucotrichus*

Ammodaucus leucotrichus connu sous le nom de Moudrayga, c'est une espèce de plante à fleurs de la famille des Apiaceae (anciennement Umbellifères). Elle est endémique en Afrique du Nord, y compris les îles Canaries. Cette plante à plusieurs vertus antispasmodiques, antiseptiques et carminatives, elle est utilisée également pour traiter la constipation, la toux et le cancer des poumons, ainsi une prise d'une infusion quotidienne prévient le diabète.³⁰

2.4.1 Caractéristiques botaniques

2.4.1.1 Description de la plante

Petite plante annuelle glabre à tiges dressées, rameuses, finement striées, feuilles très divisées à lanières étroites, un peu charnues, ombelles à 2-4 rayons, involucre à bractées très divisées;³¹ fleurs blanches, toutes égales. Méricarpes allongés 6-9 x 4-5mm, à côtes secondaires couvertes de longs poils soyeux très denses, crépus, jaune roux à la base, puis blancs et longs de 8-10mm. Cette plante est très appréciée et ramassée, ce qui tend à la raréfier. C'est une plante à très forte odeur d'anis.²¹



Figure 2.3 : *Ammodaucus leucotrichus*



Figure 2.4 : Graines d'*A.leucotrichus*

2.4.1.2 Classification ²¹

Appellations

Nom français	Cumin velu
Nom anglais	Hairy cumin
Nom arabe	الكمون الصوفي
Nom latin	<i>Ammodaucus leucotrichus</i>
Nom vernaculaire	Nessoufa, Moudrayga

Tableau 2.3 : Appellation d'*A.leucotrichus*

Systématique

Embranchement	Spermaphytes
Classe	dicotyledones
Sous-classe	Astéridées
Ordre	Araliales
Sous-ordre	Apiales
Famille	Apiaceae
Genre	<i>Ammodaucus</i>
Espèce	<i>Ammodaucus leucotrichus</i>

Tableau 2.4 : Classification d'*A leucotrichus*

2.4.2 Habitat

La distribution entière est basée au nord de l'Afrique : Algérie, Maroc, Tunisie, Libye, elle s'étend jusqu'à l'Egypte et l'Afrique tropicale.³² Elle est assez commune dans tout le pâturage désertique; secteur du Sahara septentrional et occidental et elle est rare dans le secteur du Sahara central.²¹

2.4.3 Utilisation thérapeutique

Les fruits d'*A.leucotrichus* sont utilisés comme condiment et en médecine traditionnelle, ils sont employés dans le traitement des coups du froid, fièvre et troubles digestifs particulièrement pour les enfants. La plante est utilisée aussi, sous forme de décoction de fruits, pour le traitement du diabète.³³

Une étude a été réalisée sur la composition chimique d'une préparation utilisée dans la pharmacopée traditionnelle dans la région de Bechar pour le traitement des maladies gastriques. Ce remède utilisé comme sirop est un extrait aqueux de 11 plantes, parmi les *A.leucotrichus*.³⁴

2.4.4 Les principaux constituants biochimiques de l'HE du cumin velu

L'huile essentielle de la plante *A.leucotrichus* cultivée dans trois régions d'Algérie à Adrar, à Guerrara-Ghardaïa et à Ghardaïa extraite, par hydrodistillation, était analysée par CG/SM. L'huile était dominée par les aldéhydes qui représentaient respectivement un rendement de 2.58%, 3% et 1.3%.

Ces principaux constituants étaient à Adrar le Périllaldéhyde (85.6%), limonène (7.8%) et α -pinène (2.2%). Le total des composés (98.6%)³⁵, à Guerrara-Ghardaïa étaient le périllaldéhyde (84.4%), limonène (1.7%). Le total des composés (97.03%).³⁶ Et à Ghardaïa le périllaldéhyde (58.3%), limonène (23.33%) et α -pinène (5.47%). Le total des composés (97.25%).³⁷

2.5 Intérêts biologiques des HEs à chémotype aldéhyde

L'activité biologique d'une huile essentielle est liée à sa structure biochimique, aux groupes fonctionnels de ses composés principaux (aldéhydes, alcools, phénols, composés terpéniques...). Les huiles essentielles à aldéhydes sont dermocaustiques et irritantes pour les muqueuses, il faut donc toujours les diluer dans une huile végétale.³⁸

Plusieurs tests ont été réalisés pour déterminer les activités biologiques des huiles essentielles du cumin et du cumin velu :

➤ **Activité antimicrobienne :**

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'HE d'*A.leucotrichus*³⁴ et de l'huile des graines de *C.cuminum*³⁹ contre plusieurs bactéries (gram positive et gram négative), montre une forte activité sur la majorité des bactéries testées, Les hydrosols du cumin ont été actifs, seulement sur *Bacillus brevis*, *Entérobacter aerogenes* et *Escherichia coli*.⁴⁰

Une forte activité antifongique a été montrée sur des moisissures et des champignons de la pourriture du bois.⁴¹ L'étude in vitro, a montré une activité antifongique des hydrosols du cumin contre quelques mycètes de microbes pathogènes de plante.⁴²

➤ **Activité anti-oxydante :**

Une étude sur les activités biologiques d'*A.leucotrichus* a montrée une bonne activité anti-oxydante de cette plante.³⁴ Une autre étude a montrée que le cumin possède un bon potentiel anti-radicalaire, antioxydant et que ces épices peuvent être utilisées pour produire de nouveaux antioxydants naturels ainsi que des agents aromatisants utilisés dans divers produits alimentaires.⁴³

➤ **Activité anti-inflammatoire :**

Généralement les huiles essentielles constituées principalement des aldéhydes possèdent des propriétés actives contre l'inflammation par voie interne.⁴⁴ L'évaluation de l'activité anti- inflammatoire d'*A.leucotrichus* a montré qu'elle a une forte activité.³⁴

Chapitre 3 : La chimie des aldéhydes

3.1 Définition

En chimie organique, un aldéhyde est une molécule dont la fonction caractéristique est un groupe carbonyle C=O situé obligatoirement au bout de la chaîne carbonée, c'est-à-dire que le carbone porteur de la fonction est lié par une double liaison à un oxygène et par une simple liaison à un hydrogène. Le groupe fonctionnel est donc au final de la forme CHO.⁴⁵

3.2 Tests de reconnaissance

Pour mettre en évidence la présence d'aldéhyde, on peut faire des tests de reconnaissances :

- Addition de composés de type Z-NH₂ (amine) \rightleftharpoons formation d'un précipité.
- Le test à la liqueur de Fehling, qui prend une couleur rouge brique à chaud en présence d'aldéhyde.
- Le test dit du « miroir d'argent », utilisant le réactif de Tollens, aboutissant à la création d'un dépôt d'argent solide.
- Le test au réactif de Schiff, qui à froid, colore la solution en rose.⁴⁵

3.3 Caractérisation de la liaison C=O

3.3.1 Géométrie et énergie

Le carbone fonctionnel, celui du groupe carbonyle, est de type AX₃ en théorie VSEPR. La géométrie autour de cet atome est donc trigonale plane; il y a donc quatre atomes et trois liaisons coplanaires, et des angles autour de 120°.

La longueur de la liaison C=O est de l'ordre de 122 pm, nettement plus courte que la liaison C=C d'un alcène 134 pm. Ceci est dû à l'électronégativité de l'oxygène; celui-ci attire fortement les électrons de la liaison, ce qui rapproche l'atome de carbone.

3.3.2 Polarité

Les aldéhydes sont fortement polaires, du fait de la présence du groupe carbonyle. La forte polarisation de cette liaison s'explique par l'existence de deux formes limites :

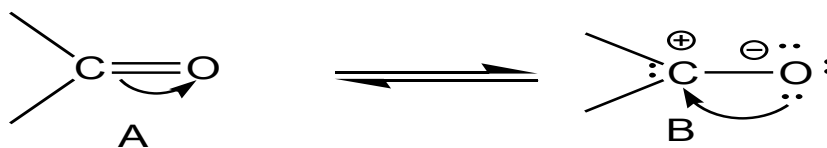


Figure 3.1 : Les formes limites du carbonyle

La forme B contribue pour une part non négligeable dans la description de la liaison; or elle présente une séparation de charge très importante, ce qui explique le fort moment dipolaire de la liaison. Ainsi, l'éthanal ou la propanone sont nettement plus polaires que l'eau.

3.4 Propriétés physiques

Du fait de la polarité importante de la liaison C=O, il existe des interactions de Van der Waals importantes au sein d'un aldéhyde. En conséquence, la température d'ébullition est plus importante que pour l'alcane, l'alcène ou l'alcyne de même chaîne carbonée. En revanche, aucune liaison hydrogène n'est possible, car les aldéhydes n'ont pas d'atome d'hydrogène lié à un atome très électronégatif. La température d'ébullition est donc moins élevée que pour l'alcool de même chaîne carbonée.

Toujours en raison de leur polarité importante, les composés carbonyles sont solubles dans l'eau, du moins tant que la chaîne carbonée n'est pas trop longue.

3.5 Réactivité du groupe carbonyle

La réactivité sur la double liaison peut être prédite en considérant la forme limite B. Elle montre que l'atome de carbone est un site pauvre en électron, alors que l'atome d'oxygène est un site riche en électron. En conséquence :

- le carbone est un site électrophile, qui peut subir l'attaque d'un nucléophile lors de réactions d'additions nucléophiles.
- l'oxygène est un site basique au sens de Brønsted et de Lewis, qui peut réagir sur un acide de Brønsted (en particulier l'ion H⁺) ou un acide de Lewis. Par ailleurs, les aldéhydes peuvent subir des réactions de réduction, soit sous l'action des ions hydrure H⁻, soit sous l'action des métaux. Les aldéhydes peuvent en outre être oxydés en acides carboxyliques.⁴⁶

3.6 Hémi-synthèse des aldéhydes

3.6.1 Synthèse d'hydrazone

La méthode de synthèse la plus utilisée pour former une hydrazone est la condensation d'une hydrazine avec un aldéhyde. L'hydrazine peut subir une double condensation du composé aldéhyde, aussi l'utilisation d'hydrazine mono- ou N,N-disubstituée permet d'éviter cette double condensation et de synthétiser facilement les hydrazones correspondantes.⁴⁷

3.6.2 La synthèse de benzimidazole

La méthode efficace et économiques de synthétiser le benzimidazole par réaction de condensation entre l'ortho phénylenediamine et diverses composés tel que les aldéhydes en présence de diverses conditions.

Puisqu'une oxydation est impliquée, la réaction est mieux réalisée dans des conditions oxydatives. Cette oxydation peut être apportée par l'air ou plus facilement par l'utilisation d'autres agents oxydants tels que l'acétate de cuivrique.⁵³

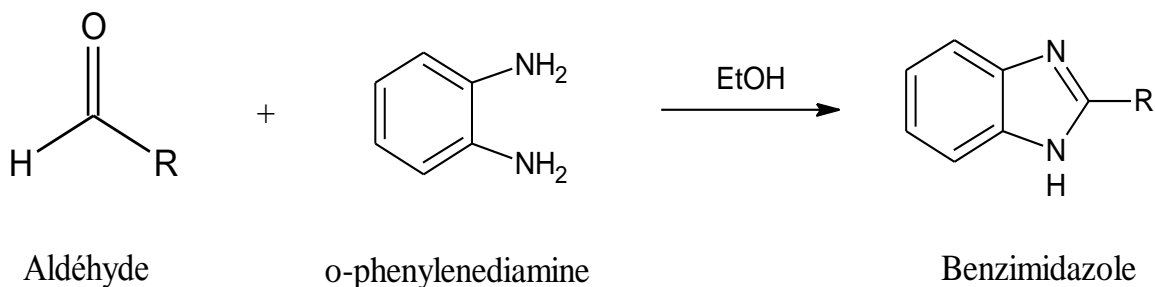


Figure 3.4 : Réaction de formation de benzimidazole

3.6.2.1 Mécanisme réactionnel de la synthèse de benzimidazole

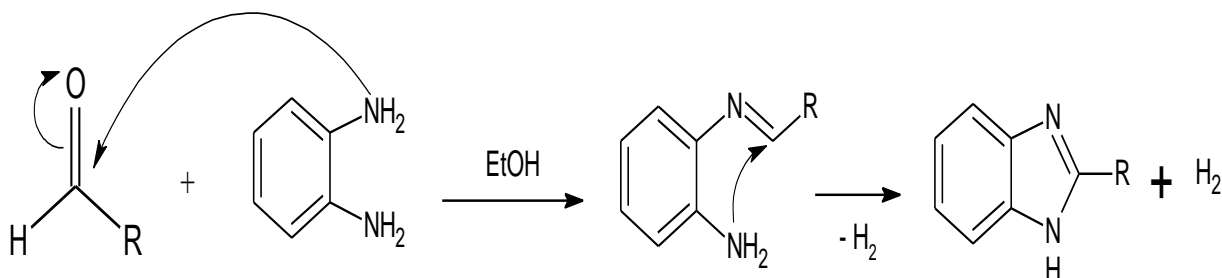


Figure 3.5 : Mécanisme réactionnel de la synthèse de benzimidazole

3.6.2.2 Application des benzimidazoles

Les benzimidazoles possèdent l'une des activités biologiques les plus utiles, leur noyau joue un rôle très important en tant qu'agent thérapeutique, comme les anti-ulcères et les médicaments anthelminthiques. Ils présentent aussi des activités pharmacologiques comme antimicrobienne, antiviral, anti-anxiété, anticancéreuse, anti-inflammatoire et analgésique.⁵³

➤ **Activité antimicrobienne**

Les benzimidazoles ont été évalués pour l'activité antibactérienne in vitro contre les souches d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus*, ainsi que pour l'activité antifongique contre les souches de *Candida albicans* et *Aspergillus niger* utilisant la technique de dilution en série et Ils sont donnés d'excellents résultats contre les souches bactériennes.⁵⁴

*Partie
expérimentale*



Chapitre 1 : Matériels et méthodes

1.1 Matériels

1.1.1 Matériels végétaux

Les plantes que nous avons utilisées lors de notre expérimentation sont : *Cuminum cyminum* (le cumin) provenant des hauts plateaux de l'Algérie et *Ammodaucus leucotrichus* (le cumin velu) provenant de la région de Ghardaïa.

Tableau 1.1 : Matériels végétaux utilisés

Espèces		Parties utilisées	Etat
<i>Cuminum cyminum</i>		Les graines	Sèches
<i>Ammodaucus leucotrichus</i>		Les graines	Sèches

1.1.2 Matériels d'analyses

1.1.2.1 UV-Visible

Les échantillons ont été analysés par le spectrophotomètre de type JASCO entre 200 et 400 nm. Ces solutions ont été analysés l'une après l'autre par l'UV-Visible en remplissant la cuve en quartz avec les solutions et en l'introduisant dans la chambre pour obtenir le spectre et pouvoir ainsi l'interpréter.

1.1.2.2 CPG

Les HEs ont été solubilisées dans le méthanol puis analysés par un chromatographe en phase gazeuse **SHIMADZU, GC-17 A** Equipé d'une colonne SE-30. Le Volume injecté est 0,1µl. Le mode d'injection est Splitless. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium pur avec un Débit (GV) de 1 ml/min. La température de la colonne est programmée de 60 à 250 °C à raison d'une montée de 5 °C/min, isotherme pendant 10 min.

1.1.2.3 CG-SM

L'identification des constituants a été réalisée par couplage d'un chromatographe en phase gazeuse de marque Bruker ScionSQ à un spectromètre de masse à un seul quadripôle (SQ : single quadripole). La température de la source d'ions est fixée à 280°C. La fragmentation est effectuée en impact électronique sous un champ de 70 eV, scanning 35-600 Da.

Elle est muni d'une colonne capillaires de type DB-5 qui possèdent les caractéristiques suivantes (longueur : 25 m, diamètre interne : 0.220 mm, épaisseur de film : 0.25 µm).

La température de la colonne est programmée 50°C pendant 10 min, après 50 à 250°C à raison d'une montée de 2°C/min puis elle est maintenue à 250°C pendant 15 min.

La température de l'injecteur est fixée à 250°C. Le mode d'injection est Split (rapport de division de 1 : 100). Le débit de gaz vecteur (Hélium) est fixé à 1ml/min. le volume de l'échantillon injecté est 0.2µl.

1.1.2.4 ATR-IRTF

Une spectrométrie réflexion totale atténuée- infrarouge à transformée de fourier de marque THERMO SCIENTIFIQUE, équipée d'un détecteur (DTGS KBr) à haute performance (1000-375 cm⁻¹), une source infrarouge moyen (4000-400 cm⁻¹), d'un rayonnement de laser et une séparatrice (XT-KBr). L'acquisition des spectres a été avec une résolution de 8 cm⁻¹ et un nombre de scan 20 spectres. Le traitement des spectres est réalisé avec le logiciel Essential FTIR.

Après que la zone de cristal a été nettoyée avec l'eau distillé et de l'acétone et le fond infrarouge a été recueilli, les huiles et les huiles modifiées sont directement déposés sur le cristal de réflexion de l'accessoire. Elles doivent être dans une position précise au-dessus du cristal de diamant, afin d'obtenir une dispersion uniforme de l'échantillon sur la surface.

1.1.2.5 RMN

Les spectres RMN ¹H et ¹³C des produits purs ont été analysés dans le DMSO-d avec un appareil de marque Bruker-Ascendi 400 MHz.

1.1.3 Matériels biologiques

1.1.3.1 Les milieux de cultures

- Mueller–Hinton

La gélose Muller-Hinton est un milieu solide standardisé recommandé pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens par la méthode de diffusion ou de dilution en gélose.

La standardisation du milieu de Mueller-Hinton est nécessaire pour obtenir des résultats fiables au niveau de l'antibiogramme.





- Sabouroud

Milieu de base qui favorise la culture des champignons microscopiques grâce à son pH relativement acide.

1.1.3.2 Souches microbiennes

L'activité antimicrobienne des HEs est testée sur trois souches bactériennes référencées et une levure de la famille des mycoses.

Tableau 1.2 : matériels biologiques utilisés

Bactéries à gram négatif		Bactérie à gram positif	Levure
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27812	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Candida albicans</i>
			

1.2 Méthodes

1.2.1 Extraction des HEs

L'extraction des HEs a été réalisée au laboratoire de la chimie à l'université Saad Dahleb Blida par hydro-distillation au moyen d'un appareil de type Clevenger.

➤ Protocole expérimental d'extraction

80 jusqu'à 250 g de matières végétales, sont induites dans un ballon de 2 litres, rempli d'eau distillé comme solvant d'extraction aux 2/3 de son volume.

Le ballon chauffé produit de la vapeur chargée de produits volatils. Cette vapeur se condense au niveau du réfrigérant. Les premières gouttes d'huile sont apparues après 25 minutes du chauffage, elles sont superposées sur l'hydrolat. La durée de l'extraction dépend de la masse du végétal induite dans le ballon, qui varie entre 4 à 5 heures.

Le montage d'extraction est représenté dans la figure (1.1).

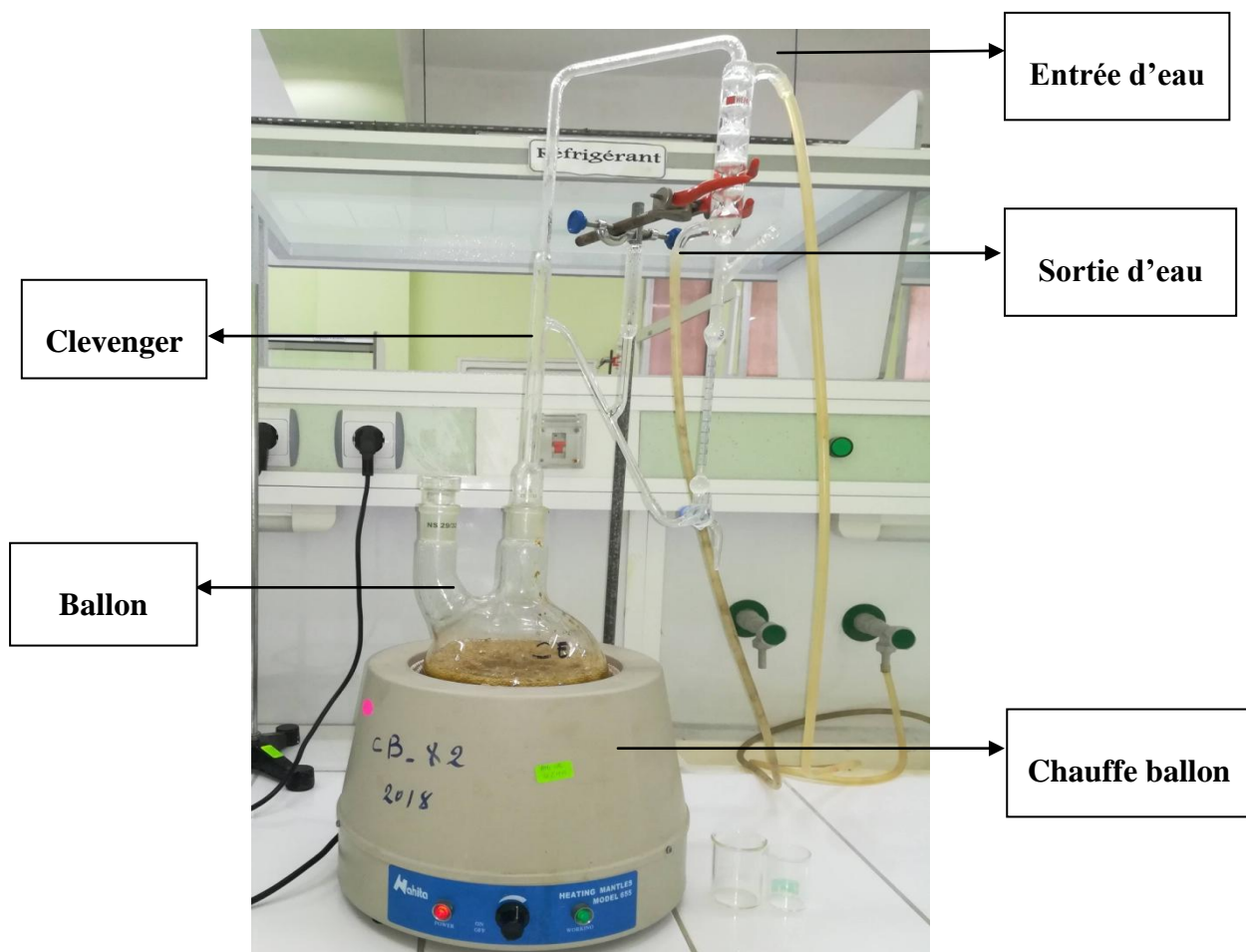


Figure 1.1 : Montage légendé de l'extraction par hydro-distillation de type clevenger

Une fois l'extraction est terminée, on récupère l'HE en le séparant de l'hydrolat, et on ajoute quelque mg de dessèchent $MgSO_4$ afin d'éliminer les traces d'eau restante.

➤ **Rendement de l'extraction**

Le rendement est le rapport entre la masse d'HE et la masse de la matière végétale sèche, et il est en pourcentage par la relation suivante :

$$R\% = \frac{m_{HE}}{m_v}$$

Avec :

$R\%$: rendement en HE

m_{HE} : masse de l'HE obtenue (g)

m_v : masse de la matière végétal (g)

1.2.2 Caractéristiques des HEs

La caractérisation d'une essence consiste à :

- Vérifier ses caractéristiques organoleptiques (Aspect, couleur, odeur, saveur) ;
- Déterminer des indices physico-chimiques (densité et indice de réfraction.....) ;
- Obtenir son profil chromatographique et une quantification relative des différents constituants.

1.2.2.1 Propriétés organoleptiques

L'appréciation des caractéristiques organoleptiques des HEs nécessite l'utilisation de nos sens afin d'évaluer l'aspect, l'odeur ainsi que la couleur.

1.2.2.2 Indice physico-chimiques

Les méthodes utilisées pour déterminer les indices physico-chimiques sont celles indiquées par le recueil de normes de l'Association Française de Normalisation.

➤ **Densité relative à 20°C : Norme NF T 75-111**

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

m_0 : Masse du pycnomètre vide en gramme.

m_1 : Masse du pycnomètre rempli d'eau distillée en gramme.

m_2 : Masse du pycnomètre rempli d'huile essentielle en gramme.



Figure 1.2 : Pycnomètre remplie d'HE de *C.cyminum*



Figure 1.3 : Pycnomètre remplie d'eau



Figure 1.4 : Pycnomètres remplie d'HE d'*A.leucotrichus*

➤ **Indice de réfraction à 20°C : Norme NF T 75-112**

$$\eta_D^{20} = \eta_D^{t'} + 0,0004(t' - 20)$$

t = 20°C.

η_D^{20} : est la valeur obtenue à la température t'.

➤ **Point de fusion**

Le point de fusion est déterminé à l'aide d'un fusiomètre de marque Fisher Jhones à lamelle, il est aperçu au moment de la fusion immédiate du solide.

1.2.3 Test de reconnaissance

Dans un bécher de 50 ml on a mis 3 ml de Bisulfite de sodium, 7 ml d'éthanol et 0.5 ml des deux huiles séparément, les mélanges sont mis sous agitation sans chauffage.

Les précipités obtenus ont été filtrés et lavés avec de l'éthanol puis sécher dans l'étuve.



Figure 1.5 : Réaction de test de reconnaissance

1.2.4 Modifications chimiques

1.2.4.1 Synthèse des hydrazones

Dans un erlenmeyer de 50 ml, 11 mmol (0.55g) d'Hydrazine monohydrate est additionnée à (1.47g) et à (1.49g) d'HE de *C.cyminum* et d'*A.leucotrichus* respectivement dans 15ml d'éthanol; les mélanges sont mis sous agitation magnétique à froid pendant 2h30min. Une fois la réaction est achevée, on évapore le solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif, le produit obtenu est caractérisé par les différentes méthodes chromatographiques et spectroscopiques.

1.2.4.2 Synthèse des benzimidazoles

Dans un erlenmeyer de 50ml, on a mis 1 mmol (0.347g); (0.37g) d'HE du cumin et cumin velu respectivement, 1.2 mmol (0.129g) d'o-phenylenediamine additionnée à 20 ml d'éthanol. Les mélanges sont mis sous agitation à la température ambiante pendant 24h pour le cumin et 12h pour le cumin velu. On évapore le solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif, les précipités obtenus ont été filtrés et lavés avec de l'éthanol.

1.2.5 Evaluation de l'activité antimicrobienne

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des HEs étudiées, plusieurs tests ont été réalisés au niveau de l'hôpital IBRAHIM TRICIN –BLIDA- au laboratoire d'analyse microbiologique.

1.2.5.1 Aromatogramme

La méthode de l'aromatogramme consiste à déposer un disque stérile en cellulose (dans notre cas les disques de 9 mm de diamètre) imprégné d'une quantité bien définie de l'HE à tester, à la surface d'une gélose préalablement coulée dans une boîte de pétri etensemencée avec le microorganisme testé. Après incubation, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre en mm de la zone claire autour du disque, appelée zone d'inhibition.

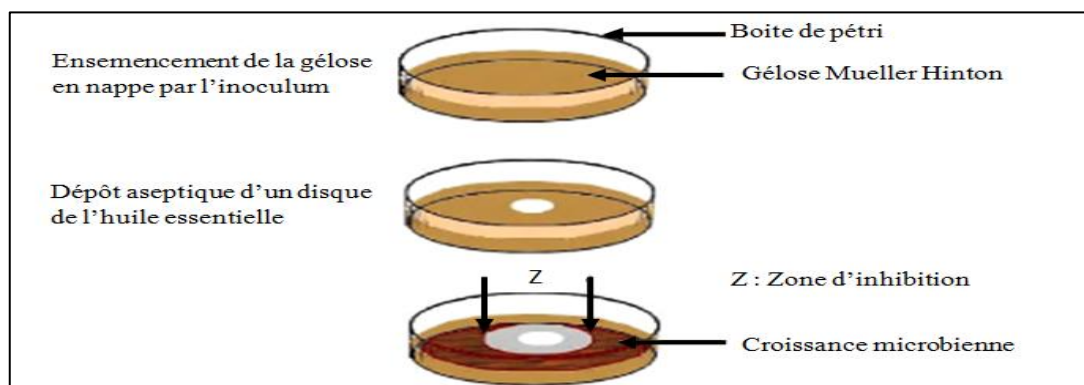


Figure 1.6: Principe de l'aromatogramme

➤ **Protocole expérimental**

A/ Préparation de la première couche de milieu

Les milieux Mueller-Hinton et Sabouraud sont chauffés dans un bain marie, après on verse aseptiquement une couche des deux milieux dans des boîtes de pétri et on laisse solidifier.

B/ Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture jeune de 18h pour les bactéries et la levure, on réalise des suspensions troubles en prélevant 2 à 3 colonies bien isolées et identiques, qu'on dépose 5ml d'eau physiologique stérile puis on agite au vortex.

C/ HEs natives et modifiées utilisées

Pour l'étude de l'activité antimicrobienne, les HEs et les huiles synthétisés sont employés à l'état pur et dilués à 50% pour pouvoir les utiliser dans la technique de l'aromatogramme.

D/ Dépôt des disques

A l'aide d'une micropipette, on prélève 20µl d'huile essentielle pure, on dépose chaque quantité prélevée sur le disque posé préalablement à l'aide d'une pince stérile sur la surface de la géloseensemencée, on laisse diffuser pendant 30min. Enfin, incubé à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 48h pour la levure.

E/ Lecture des résultats

Zones claires autour du disque: présence d'une activité inhibitrice des huiles.

Absence des zones claires autour du disque: pas d'effet inhibiteur des huiles.⁵⁵

1.2.5.2 Méthode micro-atmosphérique

Cette technique consiste à cultiver les microorganismes à tester dans les boîtes de Pétri sur un milieu de culture approprié. La différence réside principalement dans la position du disque imprégné d'huile essentielle qui est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée après fixation du disque. Celui-ci n'est donc pas en contact avec le milieu gélose. L'huile s'évapore dans l'atmosphère de la boîte, elle peut exercer son effet inhibiteur sur les microorganismes testés.⁵⁶

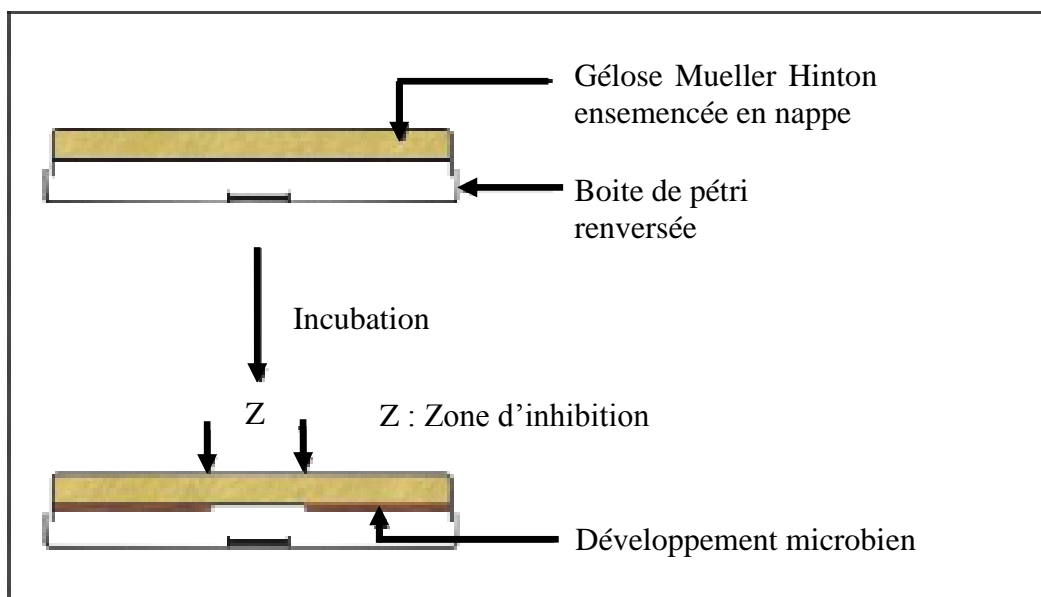


Figure 1.7: Principe de la micro-atmosphérique

➤ **Protocole expérimental**

Les boîtes de Pétri contenant le milieu de culture approprié sont ensemencées par les bactéries à l'aide d'un écouvillon (4 souches ensemencées séparément en parallèle/boîte). D'un autre côté on dépose 30µl d'HE sur un disque de papier filtre, au fond et au centre du couvercle de la boîte de Pétri. Cette dernière est incubée avec le couvercle en bas. Après incubation des bactéries à 37°C pendant 24h et jusqu'à 48h pour la levure, on observe s'il y a croissance ou non des germes-cibles.⁵⁶

1.2.5.3 Détermination de la CMI

La CMI est définie comme étant la dernière ou la plus basse concentration d'un agent antimicrobien qui peut inhiber visiblement la croissance d'un microorganisme après 24h pour les bactéries et 48h pour les levures. Son but est d'établir le niveau de sensibilité des pathogène envers les agents antimicrobiens en l'occurrence les HEs étudiées dans ce cas. Fréquemment, la CMI n'est pas totalement bactéricide, de ce fait, une partie de l'inoculum sera capable de se développer après disparition du composé inhibiteur.⁵⁷

Cette CMI est déterminée selon la méthode de dilutions sur milieu gélosé: MH pour les bactéries et SAB pour les levures.

➤ **Protocole expérimental**

a- Préparation de l'inoculum microbien

A partir de culture jeune de 18h pour les bactéries et pour la levure, on prépare les solutions mères des souches à étudier en lisant l'absorbance à une longueur d'onde de 620nm, qui doit correspondre à une DO entre 0.2 et 0.3 pour *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* et à une DO entre 0.3 et 0.4 pour *Candida*.⁵⁷

b-Préparation des dilutions d'HE

On prépare une dilution d'HE à 50% en diluant 2.5ml d'huile pure (100%) auquel on ajoute 2.5ml d'eau physiologique additionné de 2% (0.2ml) de Tween 80 stérile. On procède de la même manière jusqu'à l'obtention de la dernière dilution 5%.

Mettez 100µl de chaque dilution préparé dans des tubes à essai sur lesquelles on ajoute 200µl de la solution mère de suspension microbienne préparée auparavant (4 souches ajoutées séparément), puis on agite au vortex.

Ensemencer au moyen d'un écouvillon chaque mélange préparé à la surface de la gélose.

c-Incubation

Les boîtes de pétrie ensemencées sont incubées à 37°C pendant 24h pour les bactéries et jusqu'à 48 pour la levure.

d-Lecture des résultats

La lecture des résultats se fait à l'œil nue, en indiquant la plus faible concentration inhibitrice d'HE, se traduisant par l'absence de toute croissance microbienne visible.

En bref, le schéma ci-dessous (figure **1.8**) résume les étapes du protocole expérimental de la méthode du CMI

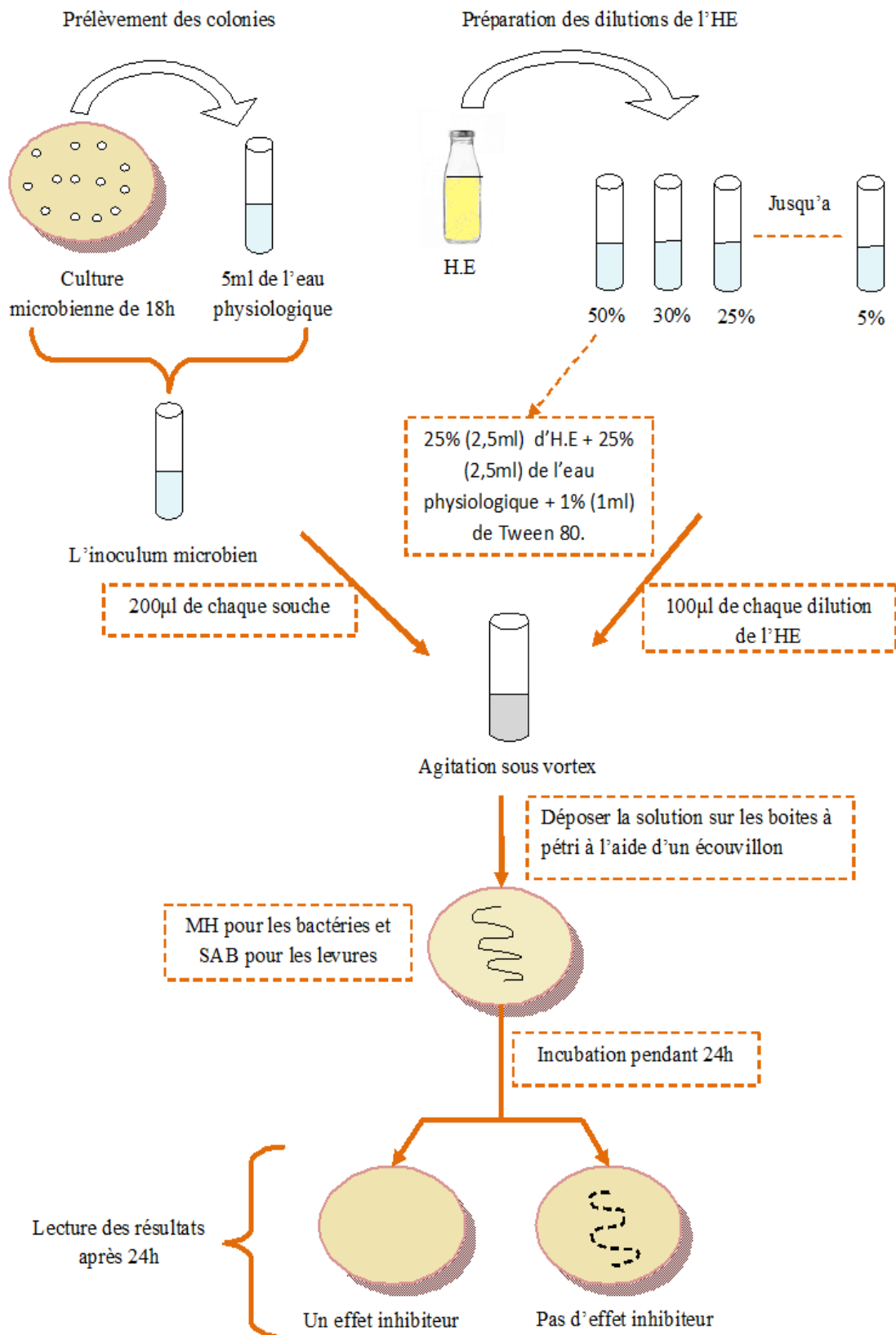


Figure 1.8 : Schéma descriptive de la CMI

Chapitre 2 : Résultats et discussions

2.1 Rendement de l'extraction des HEs des plantes étudiées

Tableau 2.1 : Le rendement de l'extraction des HEs du *C.cuminum* et d'*A.leucotrichus*

	R_{moy} (%)	
	Graines	Graines Broyées
<i>C. cuminum</i>	2,15	1,52
<i>A. leucotrichus</i>	2,27	2,52

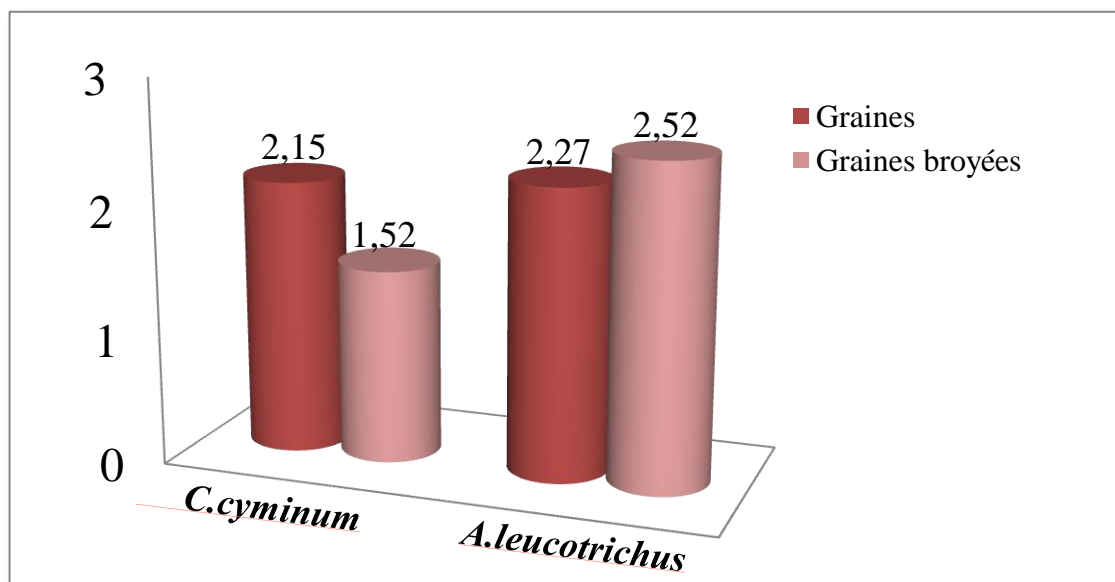


Figure 2.1 : Histogramme des rendements de l'extraction des HEs du *C.cuminum* et d'*A.leucotrichus*

Le rendement moyen en huile essentielle a été calculé en fonction de la matière végétale sèche des graines de la plante.

L'hydrodistillation des graines de cumin a fourni une huile essentielle de couleur jaunâtre (figure 2.2) avec un rendement moyen (2,15%) plus élevé par rapport à celle des graines broyées (1,52%). En revanche la partie aérienne du cumin velu a fourni une huile essentielle de couleur bleu avec un rendement plus élevé estimé de 2,52% en utilisant la plante broyée.

2.2 Caractéristiques physico-chimiques

Les résultats des analyses physico-chimiques des deux huiles des espèces étudiées sont reportés dans le tableau (2.2).

Tableau 2.2 : Caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques des HEs

	L'aspect et l'odeur	Couleur	η_D^{20}	d^{20}
<i>C. cyminum</i>	Liquide huileux odeur anisée	Jaune claire	1.5184	0.942
<i>A. leucotrichus</i>	Liquide huileux odeur anisée	Bleue	1.5004	0.937



Figure 2.2 : La position des HEs d'*A. leucotrichus* (a) et de *C. cyminum* (b) par rapport à l'hydrolat

2.3 Test de reconnaissance

L'ion hydrogénosulfite de sodium, s'additionne aux aldéhydes, pour donner un précipité blanc, qui est l'ion α -hydroxysulfonate de sodium, ce dernier est soluble dans l'eau, ce qui n'est généralement pas le cas de l'aldéhyde de départ. On pourra donc se servir de cette méthode pour séparer l'aldéhyde d'autres composés insolubles dans l'eau gênants. La

solution aqueuse purifiée est alors traitée en milieu basique très fort, ce qui régénère l'aldéhyde de départ insoluble à nouveau dans l'eau.

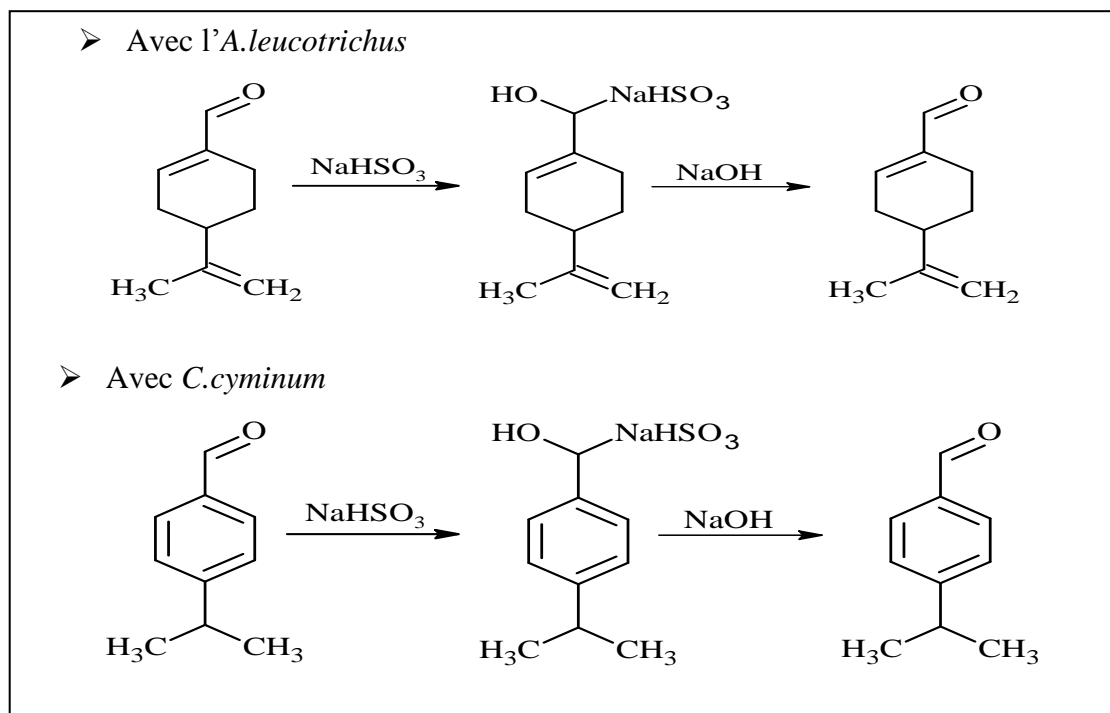


Figure 2.3 : Réactions de test de reconnaissance des aldéhydes

Ces réactions ont fournis des précipités blancs avec un rendement de 58.99% et de 59.02% pour le cumin et le cumin velu respectivement.

2.4 Analyses chromatographiques et spectroscopiques des deux huiles

2.4.1 Caractérisation par UV-vis

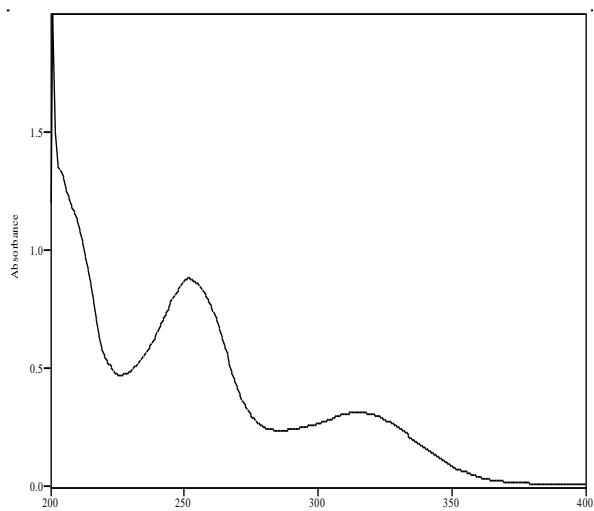


Figure 2.4 : Spectre UV-visible de l'HE de *C.cyminum*

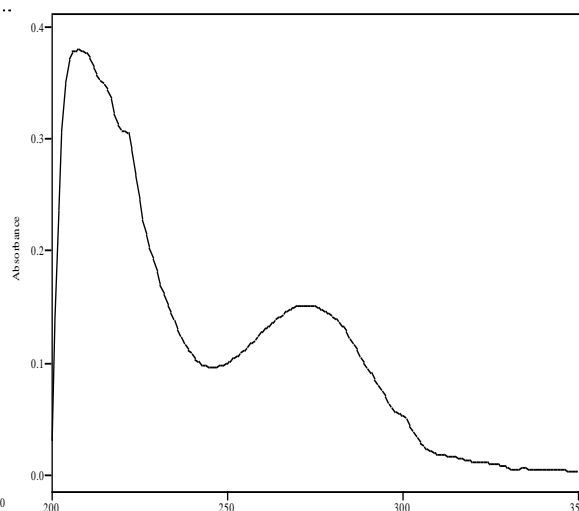


Figure 2.5 : Spectre UV-visible de l'HE d'*A.leucotrichus*

Les spectres UV-Vis des HEs du *C.cyminum* et d'*A.leucotrichus* montrent la présence des pics large localisés à 200 et 210nm respectivement, sont attribués à l'excitation électronique $\pi \rightarrow \pi^*$ de la fonction alcène présente au sein de la structure d'aldéhyde. Des deuxièmes pics situés à 255 et 275nm caractéristique de la transition électronique $\pi \rightarrow \pi^*$ du groupement carbonyle C=O d'aldéhyde. Cependant des pics situés à 315 et 300nm spécifique à l'excitation électronique $n \rightarrow \pi^*$ du doublet non liant du groupement carbonyle.

2.4.2 Caractérisation par ATR-IRTF

L'analyse par ATR-IRTF des deux huiles a donné les spectres suivants :

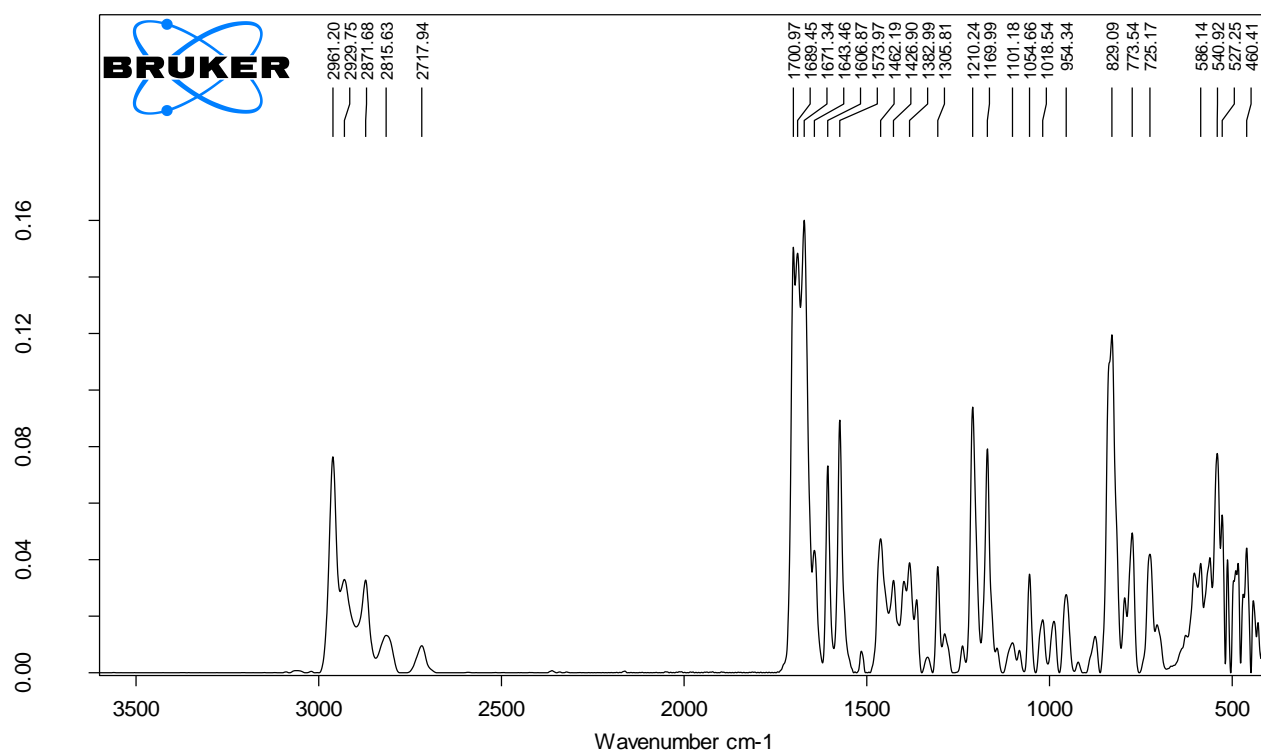


Figure 2.6 : Spectre ATR-IRTF de l'huile essentielle de *C.cyminum*

La figure (2.6) présente le spectre ATR-IRTF de l'huile essentielle de *C.cyminum* montre la présence d'un pic situé à 2961 cm^{-1} d'intensité moyenne correspond à la vibration d'élongation d'un $\text{C}_{\text{tri}}\text{-H}_{\text{Ar}}$, un pic situé à 2717 cm^{-1} est attribué à la vibration de liaison $\text{C}_{\text{tri}}\text{-H}$, à 1700 cm^{-1} on observe un pic de forte intensité due à la fonction carbonyle C=O d'aldéhyde, ainsi que la vibration d'élongation de $\text{C}=\text{C}_{\text{Ar}}$ à 1573 cm^{-1} .

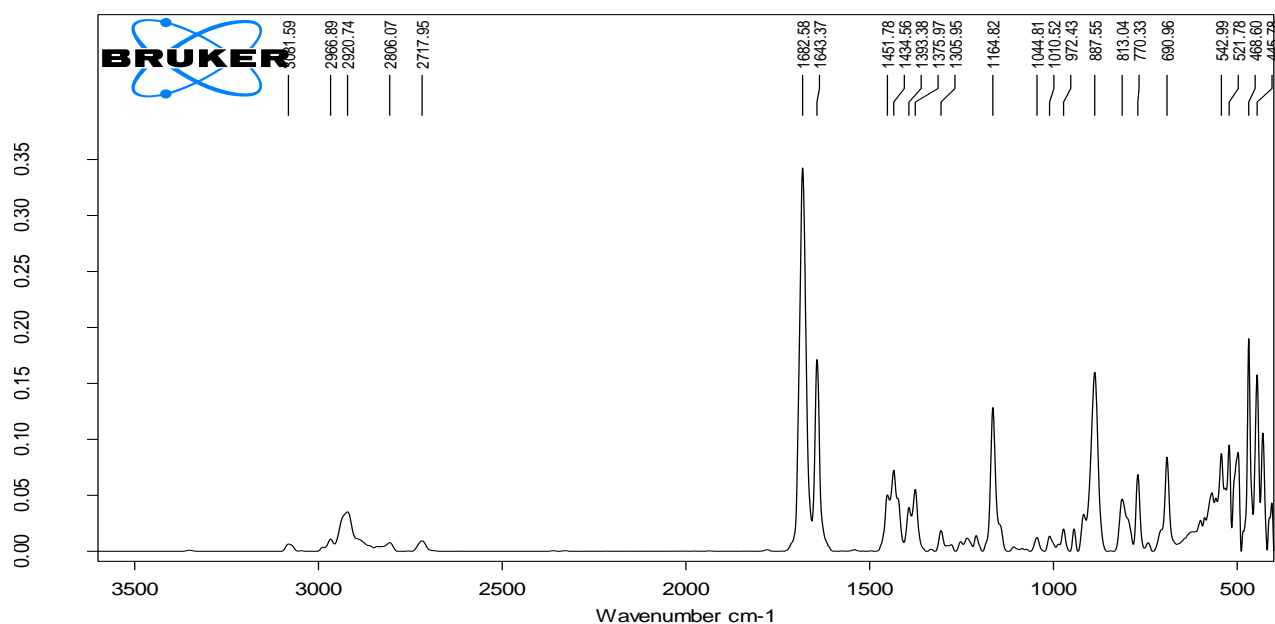


Figure 2.7 : Spectre ATR-IRTF de l'huile essentielle d'*A.leucotrichus*

Sur le spectre d'ATR-IRTF de l'EH d'*A.leucotrichus* on observe l'apparition d'une bande à 2920 cm^{-1} qui correspond à différents mode de vibration symétrique et antisymétriques des groupes CH_2 et CH_3 , on observe un autre pic à 2717 cm^{-1} attribué à la vibration d'élongation d'un $\text{C}_{\text{tri}}\text{-H}_{\text{Ar}}$ aldéhyde, à 1682 cm^{-1} , on observe un pic de forte intensité due à la fonction carbonyle $\text{C}=\text{O}$ d'aldéhyde. Ainsi que $\text{C}-\text{C}$ à 1164 cm^{-1} d'intensité moyenne.

2.4.3 Caractérisation par CPG

L'analyse chromatographique par CPG des huiles a donné les chromatogrammes suivants :

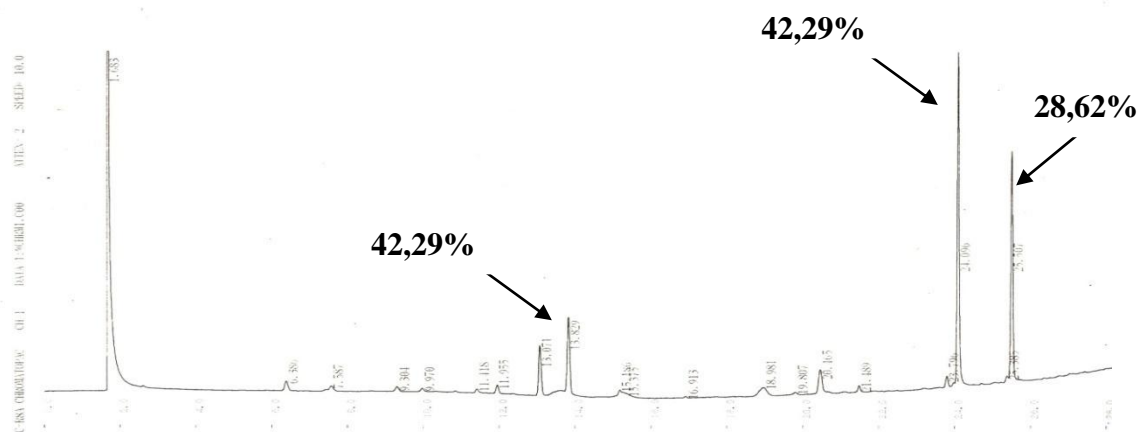


Figure 2.8 : Chromatogramme de CPG de l'huile essentielle du *C.cyminum*

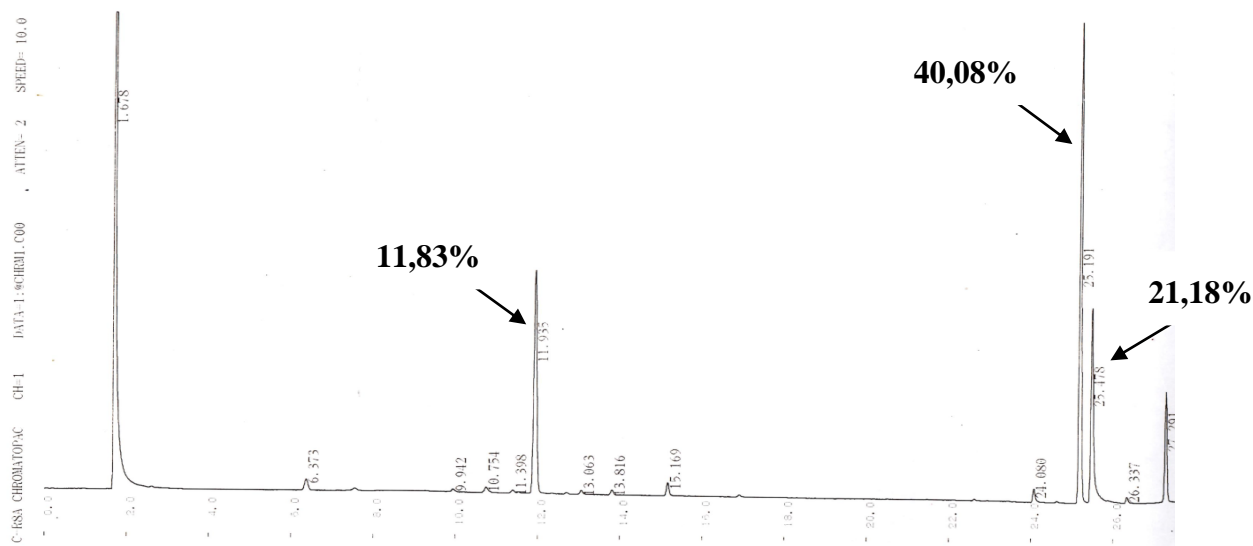


Figure 2.9 : Chromatogramme de CPG de l'huile essentielle d'*A.leucotrichus*

L'analyse chromatographique par CPG a permis la séparation des différents composés des HEs étudiées en fonction de leurs temps de rétention comme la montre les figures (2.8) et (2.9), ces derniers sont regroupés avec leurs teneurs dans le tableau (2.3).

Tableau 2.3 : Composition chimique des HEs du *C.cyminum* et d'*A.leucotrichus*

l'HE d' <i>A.leucotrichus</i>		l'HE de <i>C.cyminum</i>	
T_R (min)	Teneurs(%)	T_R (min)	Teneurs(%)
11,935	26,40	13,071	7,87
25,191	40,08	13,829	11,83
25,478	21,18	18,981	4,29
27,291	9,25	20,465	5,08
28,705	3,08	24,096	42,29
-	-	25,507	28,62

Il a été reporté que l'HE de *C.cyminum* est plus riche en composés avec un composé majoritaire à 24,09 min avec une teneur de 42,29 %, ce pic peut être attribué au

cuminaldéhyde suivi par un deuxième à 25,50 min avec une teneur de 28,62 % ; alors que la teneur du composé majoritaire de l'HE d'*A.leucotrichus* situé à 25,19 min a été estimé par 40,08 % suivi par le composé situé à 27,49 min avec 21,18 %.

2.5 Modifications chimiques des huiles essentielles

2.5.1 Synthèse des hydrazones

L'action de l'hydrazine monohydrate sur les HEs permet la conversion des aldéhydes constituants de ces HEs (le cuminaldéhyde et le périllalaldéhyde) en leurs hydrazones correspondant, selon la figure (2.10).

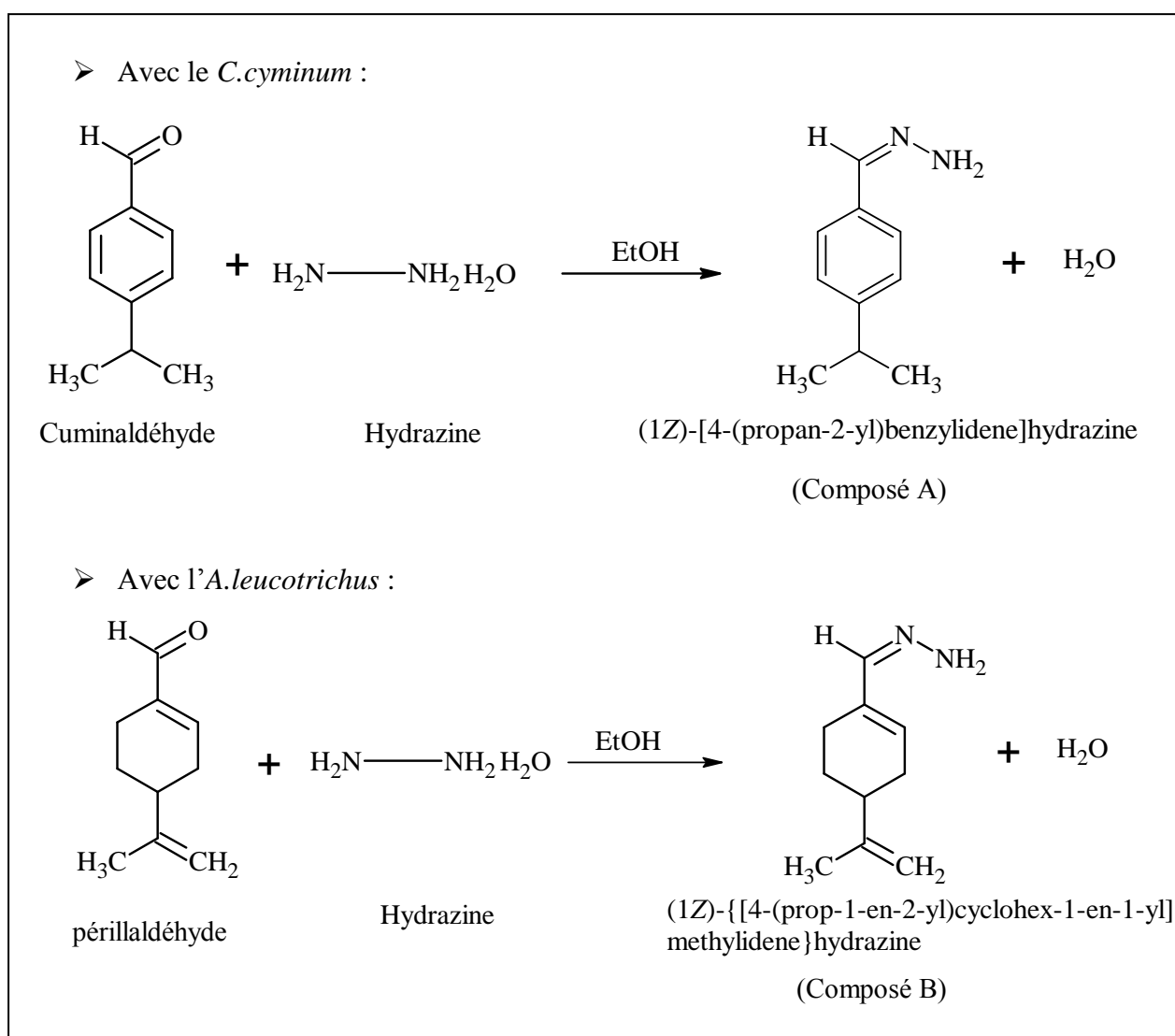


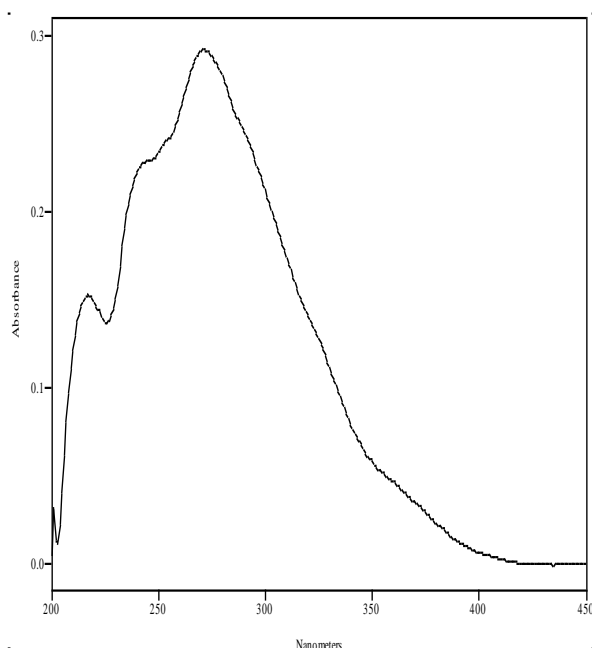
Figure 2.10 : Synthèse des hydrazones

2.5.2 Caractères physico-chimiques des hydrazones

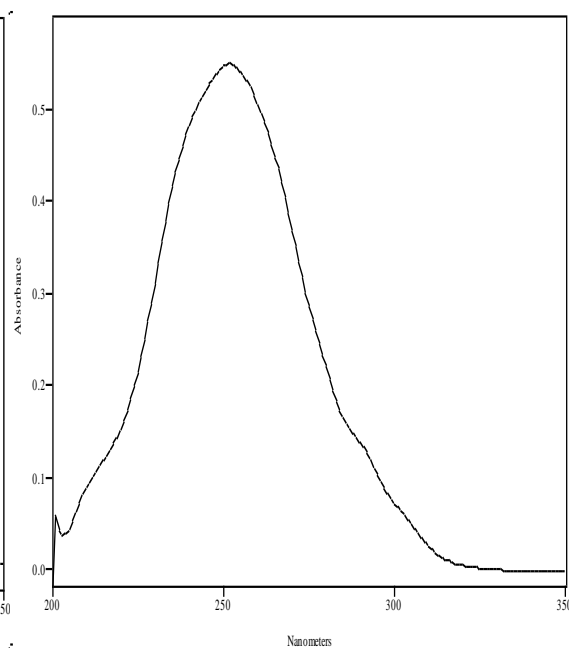
Tableau 2.4 : Les caractéristiques physico-chimiques des hydrazones

Produit	Nature	Couleur	η_D^{20}	R %
Composé A	Solide	Jaune orangée	1,5624	91.55
Composé B	Solide	Bleue vert	1,5464	91.30

2.5.3 Caractérisation par l'UV-vis



**Figure 2.11 : Spectre UV-visible
du composé A**



**Figure 2.12 : Spectre UV-visible
du composé B**

Le spectre UV-vis de composé A est caractérisé par l'apparition des nouvelles bandes à 214nm, 238 nm et une bande large située entre 260-383 nm.

Un effet bathochrome a été observé dans le spectre UV-vis de composé B où une bande a été observée de 224 à 284 nm avec un épaulement à 289 nm.

2.5.4 Caractérisation par ATR-IRTF

L'analyse spectroscopie ATR-IRTF des hydrazones a donné les spectres suivants :

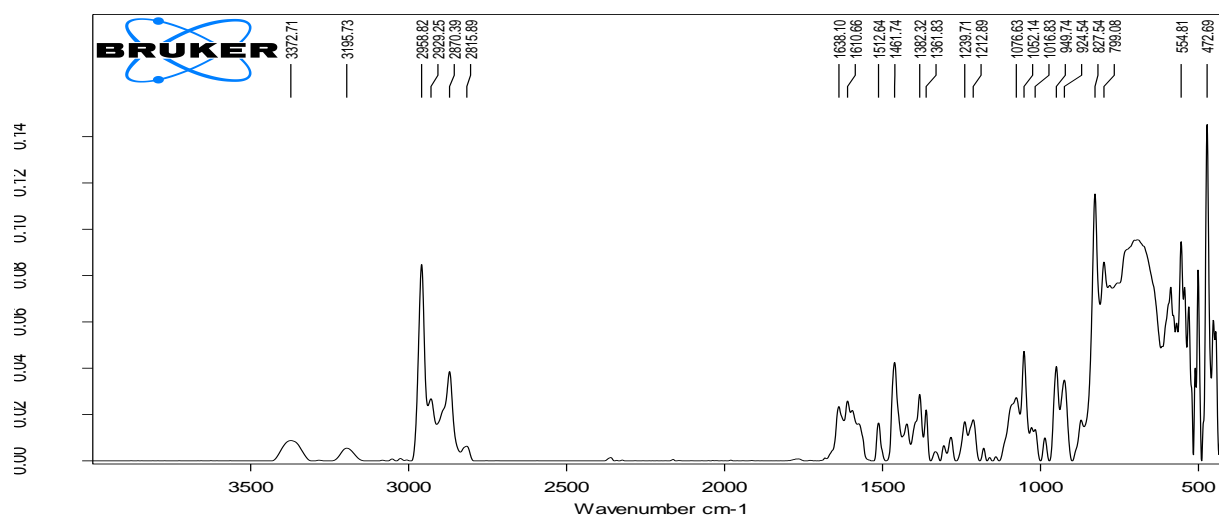


Figure 2.13 : Spectre ATR-IRTF du composé A

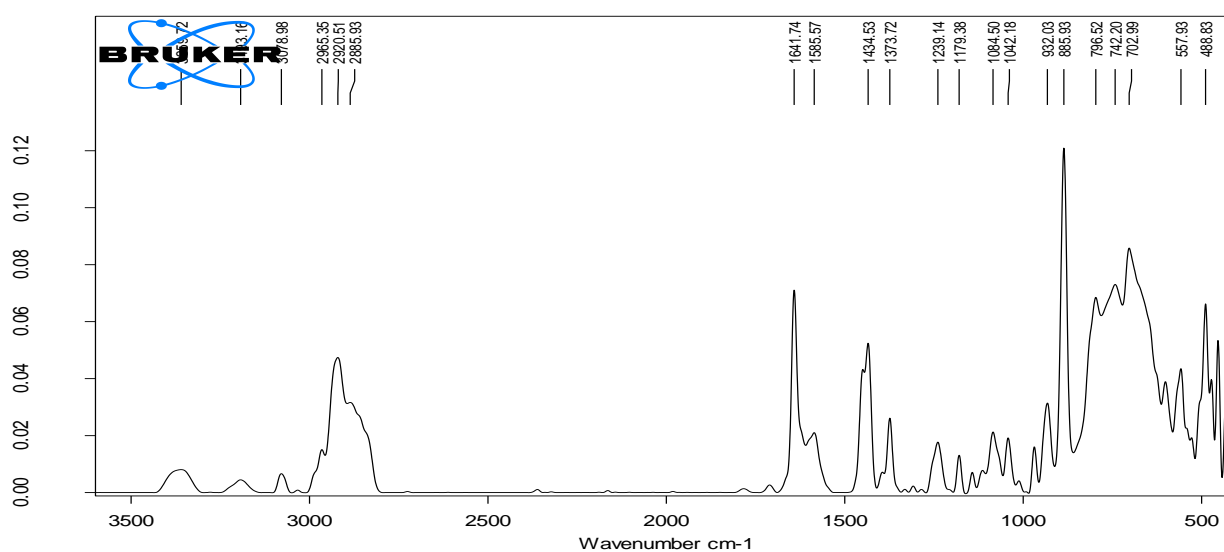


Figure 2.14 : Spectre ATR-IRTF du composé B

Les spectres ATR-IRTF du produit de condensation de la cuminaldéhyde et le périllaldéhyde avec l'hydrazine sont représentés dans les figures (2.13) et (2.14), ces derniers sont caractérisés par l'apparition de deux bandes situées entre 3100 et 3500 cm⁻¹ d'intensité fine correspond à la vibration d'élongation du groupe NH₂, et la disparition de la bande caractéristique du groupement carbonyle prouve de la réduction de l'aldéhyde, et la présence de pic caractéristique du noyau aromatique à 3000 cm⁻¹.

Un pic situé à 1638 et à 1641 cm^{-1} d'intensité moyenne attribué à la vibration d'élongation des liaisons C=N pour le composé A et B respectivement. Un pic de forte intensité d'absorption des liaisons C=C aromatique, à 1461 et à 1434 cm^{-1} pour le composé A et B respectivement.

2.5.5 Caractérisation par CG/SM

L'analyse chromatographique par CG/SM des HEs du cumin et du cumin velu a donné les chromatogrammes suivants:

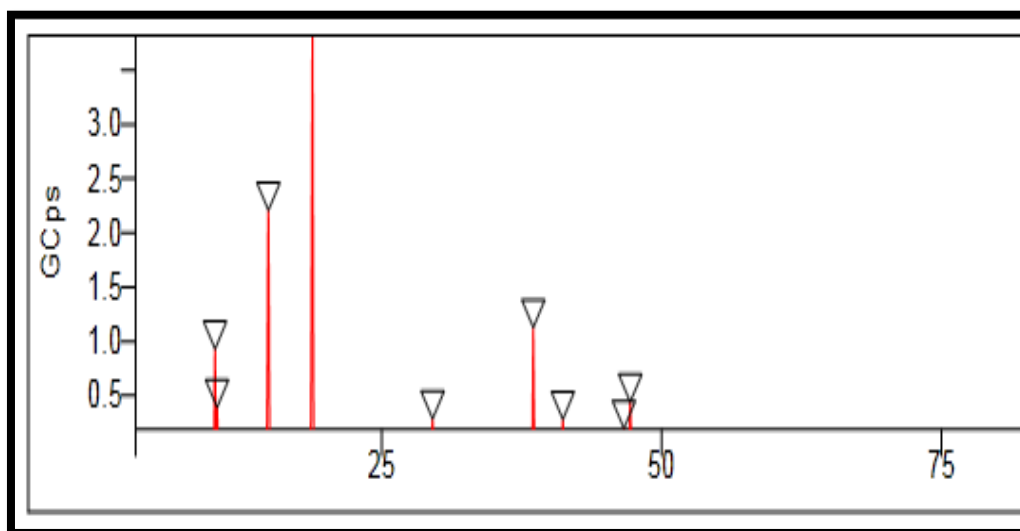


Figure 2.15 : Chromatogramme de la CG/SM de l'huile modifiée du cumin

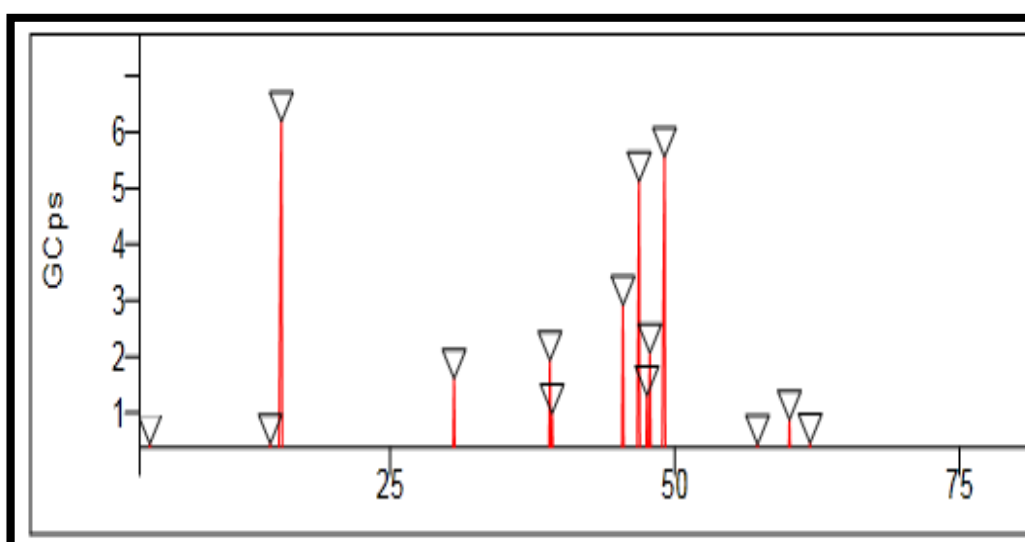


Figure 2.16 : Chromatogramme de la CG/SM de l'huile modifiée du cumin velu

L'identification des composés par cette analyse a été regroupée dans les tableaux suivants :

Tableau 2.5 : Composition chimique du composé A

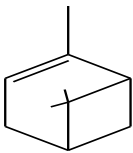
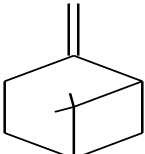
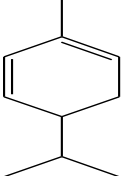
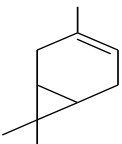
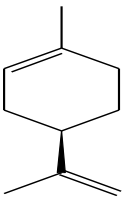
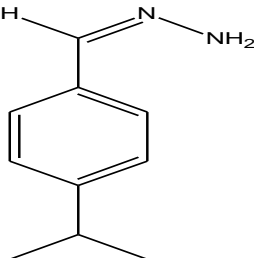
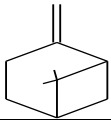
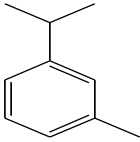
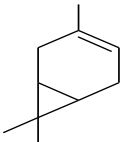
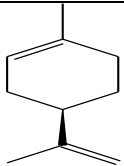
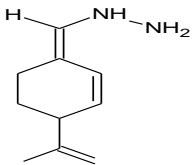
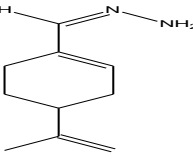
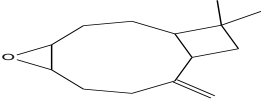
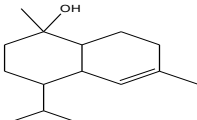
composés	Formules	T _R (min)	Teneurs (%)
α-pinene		7,24	8.76
β-pinene		7,41	2.19
α-phellandrene		12,69	24.81
γ-carene		18,80	43.79
R-limonene		28,60	1.46
(1Z)-[4-(propan-2-yl)benzylidene]hydrazine		39,49	10.95
NI	/	43,95	1.46
NI	/	48,64	6.57

Tableau 2.6 : Composition chimique du composé B

composés	Formules	T _R (min)	Teneurs (%)
β- pinene		10,10	Trace
o-cymene		14,84	0.61
γ-carene		18,76	28.48
R-limonene		28,61	6.06
{(Z)- [4-(prop-1-en-2-yl) cyclohex-2-en-1-yliene] methyl} hydrazine		45,44	23.63
NI	/	46,85	4.24
NI	/	47,80	8.48
(1Z)-{[4-(prop-1-en-2-yl) cyclohex-1-en-1-yl] methylidene} hydrazine		49,09	25.45
Caryophyllene oxide		56,36	2.42
α-cadinol		60,60	0.61

2.6 Modification chimique des deux huiles par o-phenylenediamine

2.6.1 Synthèse des benzimidazoles

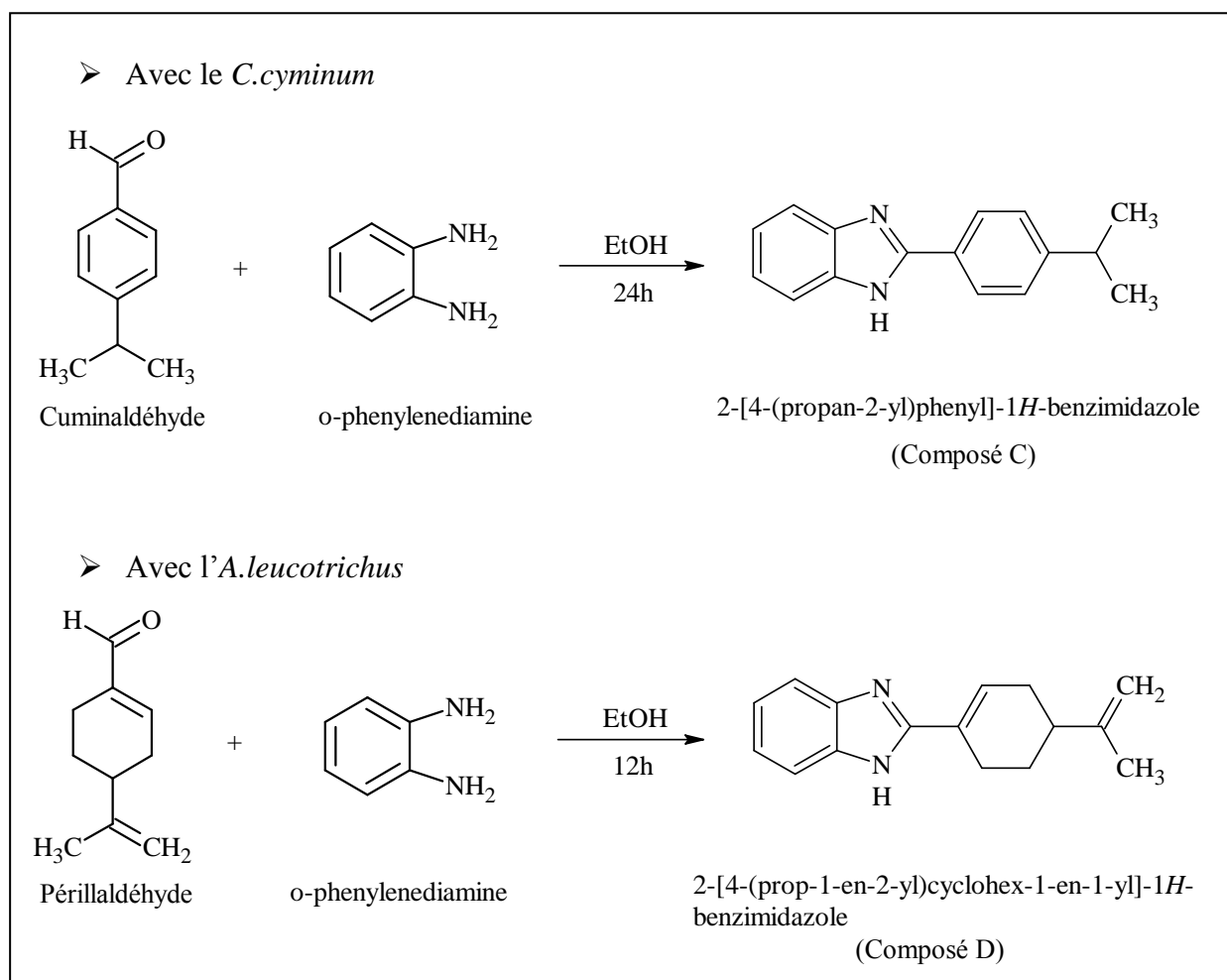


Figure 2.17 : Synthèse des benzimidazoles

2.6.2 Caractères physico-chimiques des benzimidazoles

Tableau 2.7 : Les caractéristiques physico-chimiques des benzimidazoles des deux huiles

Nom du produit	Nature	Couleur	Point de fusion °C	R %
Composé C	poudre	Jaune pale	[256-257]	63.64
Composé D	poudre	Jaune pale	[275-276]	64

2.6.3 Caractérisation par l'UV-Vis

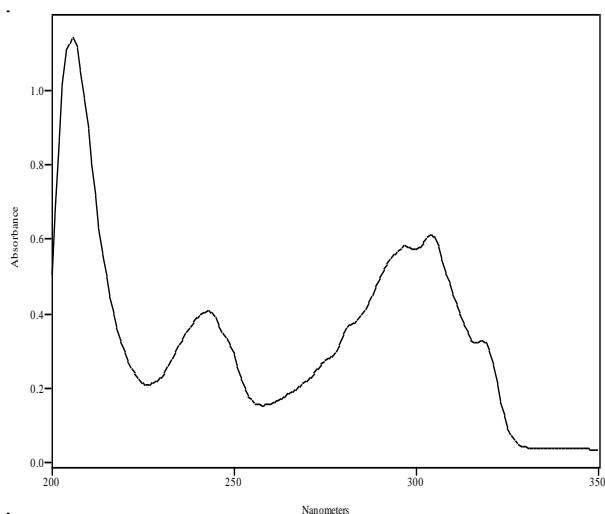


Figure 2.18 : Spectre UV-visible du composé C

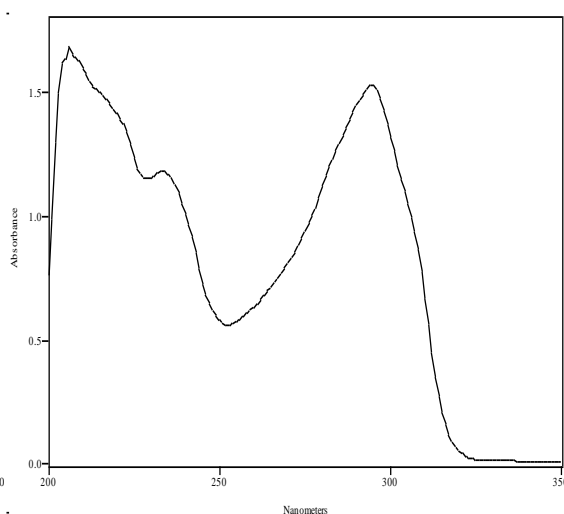


Figure 2.19 : Spectre UV-visible du composé D

Les spectres UV-Vis du produit de condensation de la cuminaldéhyde et le périllaldéhyde avec l'o-phenelenediamine montre la disparition de la bande d'absorption du groupement carbonyle des deux aldéhydes et la conservation de la bande caractéristique de la fonction alcène d'aldéhyde à 210nm. L'absence de la bande caractéristique de la transition électronique $\pi \rightarrow \pi^*$ peut être expliquée par la réduction de la fonction aldéhyde en benzimidazole.

2.6.4 Caractérisation par ATR-IRTF

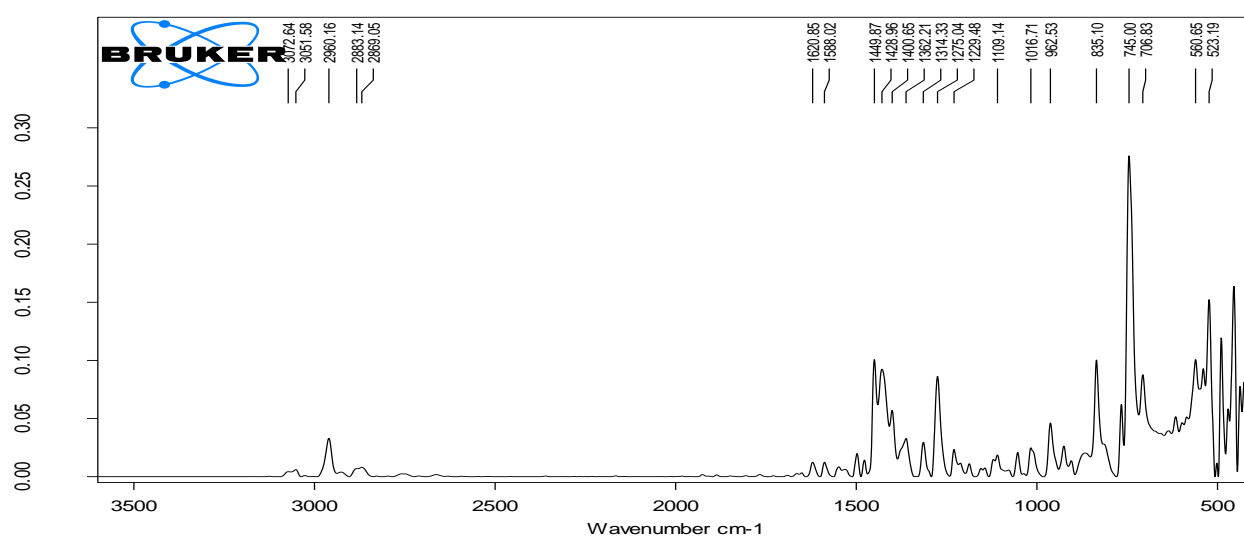


Figure 2.20 : Spectre ATR-IRTF du composé C

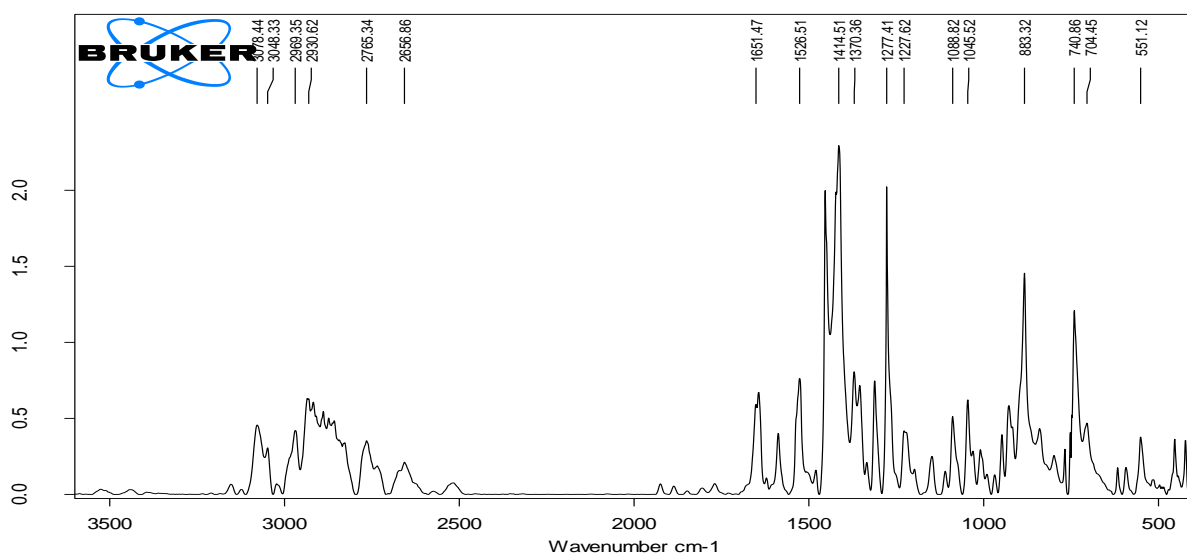


Figure 2.21 : Spectre ATR-IRTF du composé D

Les deux spectres d'ATR-IRTF des composés C et D montrent la disparition du pic de la fonction carbonyle C=O vers 1662 cm^{-1} pour les deux spectres et l'apparition d'un pic à 1620 et 1651 cm^{-1} responsable de la vibration de la fonction C=N pour les composés C et D respectivement et on remarque un nouveau pic situé à 3072 et 3078 cm^{-1} due de la liaison N-H, c'est ce qui explique la réduction de l'aldéhyde en benzimidazole. Ce résultat est confirmé par les observations obtenues à partir d'analyse UV-Vis du produit de condensation.

2.6.5 Caractérisation par RMN

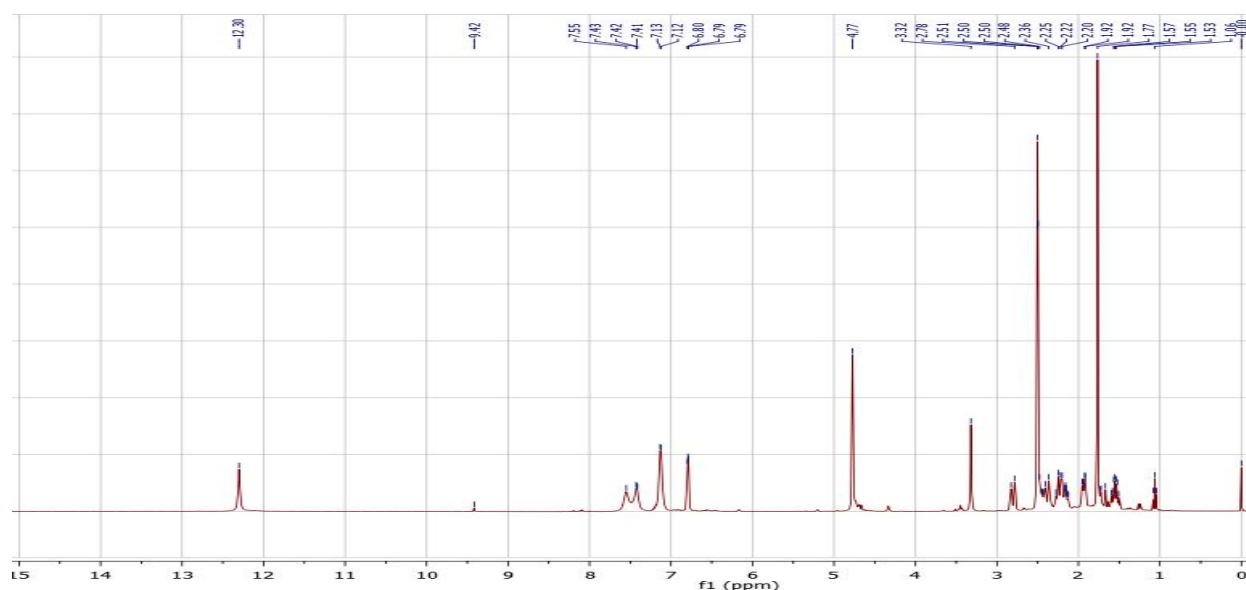


Figure 2.22 : Spectre RMN ^1H du composé D

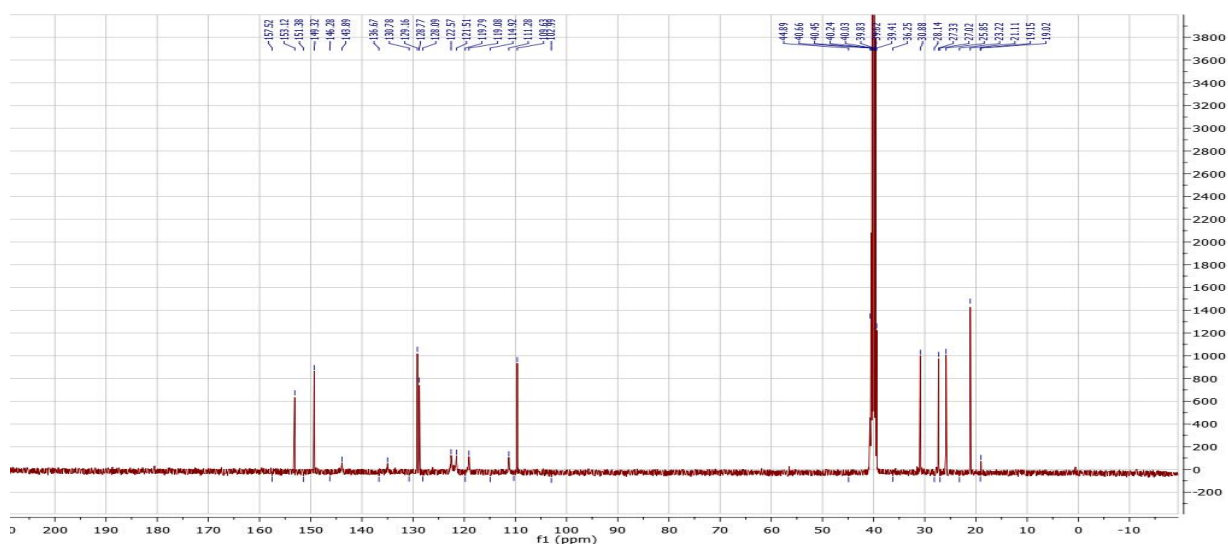


Figure 2.23 : Spectre RMN ^{13}C du composé D

RMN H^1 (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta(\text{ppm})$: 1, 53-1,57 (m, 1H, H-2) ; 1,77 (s, 3H, 1''-CH₃), 1,95 (d, 2H, H-3) ; 2,20-2,36 (qd, 2H, H-2') ; 2,48- 2,51 (t, 2H, H-5') ; 2,63-2,78(d, 1H, H-4) ; 4,6- 4,77(s, 1H, H-1') ; 6,79 -7,45(H-arom); 12,30 (s, 1H, 1-NH).

RMN C^{13} (400 MHz, DMSO- d_6): 21,22 (1''-CH₃) ; 25,64 (C-5'); 25,84 (C-4) ; 27,53 (C-3) ; 28,01 (C-2) ; 30,71 (C-2') ; 109,53 (C=C-1') ; 110,90; 118,55; 121,09; 122,04; 128,77; 129,16 (C=C arom); 149,32 (C-5) ; 143,83 (C-1); 152,83 (C-6) ppm.

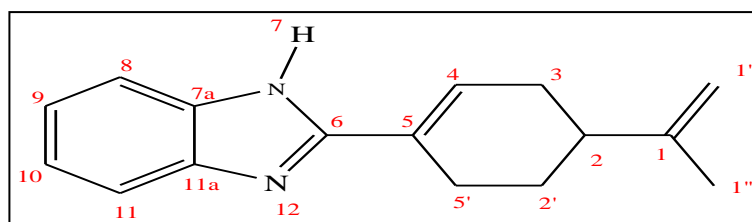


Figure 2.24 : 2-[4-(prop-1-en-2-yl)cyclohex-1-en-1-yl]-1H-benzimidazole

2.7 Evaluation de l'activité antimicrobienne des HEs testées

2.7.1 Méthode de l'aromatogramme

La lecture des résultats se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition. L'échelle de mesure de l'activité antimicrobienne est répartit en 4 classes : ⁵⁸

- Fortement inhibitrice : lorsque le diamètre est $> 28\text{mm}$;
- Modérément inhibitrice : le diamètre de la zone est compris entre 16mm et 28mm ;

- Légèrement inhibitrice : le diamètre de la zone est compris entre 10mm et 16mm ;
- Non inhibitrice : lorsque le diamètre de la zone est <10mm

Les résultats obtenus relatifs aux diamètres des zones d'inhibition en utilisant le test de l'aromatogramme sont regroupés dans le tableau ci-dessous. (Voire annexe)

Tableau 2.8 : Les zones d'inhibitions des microorganismes pour les échantillons à l'état purs et diluer

Micro-organismes Les concentrations		Les zones d'inhibitions (mm)			
		<i>E.coli</i>	<i>Pseudomonas aerogenosa</i>	<i>Staphilococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
HE de cumin	100%	20	20	35	/
	50%	15	14	12	/
HE de cumin velu	100%	20	19	25	/
	50%	19	13	13	/
Composé A	100%	>40	>40	>40	30
	50%	17	15	19	12
Composé B	100%	>40	>40	33	30
	50%	13	29	17	17

Les résultats montrent que les deux huiles essentielles testées possèdent une forte activité antibactérienne, cette activité augmente avec l'augmentation de sa concentration. Le plus grand diamètre d'inhibition a été observé avec l'HE du cumin pure pour la souche gram positive *Staphilococcus aureus* que les grams négative *Pseudomonas aerogenosa* et *E.coli* qui ont été moins sensible, par contre la souche fongique *candida albicans* a montré une résistance avec les deux HEs testées.

On conclure que l'HE à son l'état pure du cumin est fortement inhibitrice que l'HE du cumin velu.

Une amélioration de l'activité de ces HES avec tous les germes testées a été observée on utilisant leurs hydrazones purs correspondant, les diamètres d'inhibition ont augmentés de 35 à 60 mm avec la souche *Staphilococcus*, de 20 à 60 avec la souche *E.coli* et de 20 à 43 mm avec la souche *Pseudomonas*, il a été reporté aussi que les deux hydrazones ont fourni une forte activité antifongique avec la souche *candida albicans*. Ceci est dû à la présence d'azote qui est plus réactive que l'oxygène.

2.7.2 Méthode atmosphérique

Tableau 2.9 : Effet inhibiteur des huiles essentielles

		Effet inhibiteur		
Les huiles	Les souches	<i>E.coli</i>	<i>Pseudomonace Aeregenosa</i>	<i>Staphilococcus Aureus</i>
	HE de cumin		+	-
HE de cumin velu		+	-	+

D'après les résultats obtenus, on remarque que l'activité microbiologique des HES testés par la méthode micro atmosphère est plus importante que celle avec la méthode de diffusion sur disque chez les souches *E.coli* et *Staphilococcus*, et elle ne présente aucune activité avec *Pseudomonace*, qui est due à la résistance de cette souche aux molécules volatils. (Voire annexe)

2.7.3 Méthode de la CMI

Afin de confirmer les résultats trouvés précédemment dans l'étude qualitative de l'activité antimicrobienne, nous avons procédé à la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des deux HES et des hydrazones.

Les valeurs des CMI des HES et des hydrazones testées vis-à-vis des souches microbiennes sensibles sont représentées dans le tableau (2.10)

Tableau 2.10 : Les CMI avec les huiles et les hydrazones

Les souches Echantillons	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Pseudomonace Aeregenosa</i>	<i>Staphilococcus Aureus</i>	<i>Candida Albicans</i>
HE de cumin	5%	10%	14%	/
HE de cumin velu	5%	9%	13.3%	/
Composé A	1.6%	5%	8.3%	3.3%
Composé B	2.3%	8.3%	11.6%	3.3%

Les deux huiles présentent une bonne activité antimicrobienne à travers une CMI de 5% dans le cas d'*E.coli*.

Pseudomonace et *Staphilococcus* montrent les souches les plus résistantes avec des CMI de 10%, 14% et 9%, 13.3% pour l'HE du cumin et du cumin velu respectivement.

Les composés A et B présentent une excellente activité antimicrobienne vis-à-vis *E.coli* et *Candida* avec des CMI les plus faibles. Pour *Pseudomonace* et *Staphilococcus* ; le composé A montre une CMI moyenne de 5% et 8.3% alors que avec le composé B montre un pouvoir très moyen voir faible de 8.3% et 11.6% respectivement contre ces deux bactéries.

D'après les résultats obtenus, *Staphilococcus Aureus* est la souche la plus résistante vis-à-vis des HEs étudiées et même pour les hydrazones, alors que *E.coli* s'est avéré être la plus sensible. Par contre la souche fongique ne possède aucune activité avec ces deux huiles, ce qui confirme les résultats de l'aromatogramme. (Voire annexe)

Conclusion

Le travail que nous avons entrepris avait pour objectif la valorisation via l'hémi-synthèse des huiles essentielles du *Cuminum cyminum* et d'*Ammodaucus leucotrichus* dans le but d'améliorer leurs activités antimicrobienne.

L'extraction des huiles essentielles de *Cuminum cyminum* et d'*Ammodaucus leucotrichus* riche en cuminaldéhyde et en périllaldéhyde par hydrodistillation a fournit une huile de couleur jaune clair avec un rendement de **2.15%** pour le cumin, et une huile bleue avec un rendement de **2.52%** pour le cumin velu.

La modification chimique de ces HEs par hydrazine monohydrate sur les aldéhydes à conduit à la formation de leurs hydrazones correspondant avec des rendements de **91.55%** et de **91.30%** pour le cumin et le cumin velu respectivement, cette modification a été observé par la disparition du groupement carbonyle dans leurs spectres ATR-IRTF et l'apparition des liaisons C=N et NH₂, ces résultats ont été confirmé par l'analyse CG/SM.

L'hémi-synthèse des benzimidazoles par action de l'o-phenylenediamine sur les HEs du cumin et du cumin velu a été réalisé avec des rendements de **63.64%** et de **64%** respectivement et leurs structures chimiques ont été confirmées par UV-vis, ATR-IRTF et RMN H¹ et C¹³.

Les testes du pouvoir antimicrobien par la méthode d'aromatogramme et micro-atmosphérique montrent que les HEs du cumin et du cumin velu présentent une activité antibactérienne contre deux souches à gram (-) *E.coli* et *Pseudomonace*, et une souche à gram (+) *Staphiloccocus*. Cette activité a été amélioré en utilisant les mêmes doses des huiles essentielles modifiés, ils ont été aussi reporté une forte activité antifongique des hydrazones contre *Candida albicans* a cause de l'introduction de l'atome d'azote à la place d'oxygène ; ces résultats ont été confirmé par l'étude de la CMI.

En perspective il est recommandé de faire une étude systématique pour améliorer les rendements des réactions. Il est aussi recommandé d'étudié l'activité microbiologique des benzimidazoles ; les hydrazones possèdent plusieurs activités biologiques, ils peuvent être aussi étudiés.

Bibliographie

- ¹ Beloued, A. (1998), « *Plantes médicinales d'Algérie* », OPU, Algérie, 277p.
- ² Lafon, J.P. ; Tharaud-Prayer, C. et Lévy, G. (1988), « *Biologie des plantes cultivées. Tome I : organisation, physiologie de la nutrition* », Editions Tec & Doc Lavoisier, Paris, 240p
- ³ Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D. and Idaomar, M. (2008), *Food Chem. Toxicol.*,46, 446-475p.
- ⁴ Asjel, S. «*Etude Phytochimique et Biologique d 'Ammodaucus leucotrichus* », Thèse pour obtenir du diplôme de magister en chimie, université d'Oran ES-SENIA.
- ⁵ Dhandapani, S., Subramanian, V.R., Rajagopal, S., Namasivayam, N.(2002) « *Hypolipidemic effect of cuminum cyminum L. on alloxan-induced diabetic rats* ». *Pharmacological research.* 46: 251-255p.
- ⁶ Ould El Hadj M.D., Hadj-Mahammed M. et Zabeirou H., 2003. « *Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouargla (Sahara Septentrional Est)* ». *Courrier du savoir.* **3** : 47-51p.
- ⁷ Yahyaoui N, (2005) « *Extraction, analyse et évaluation de l'effet insecticide des huiles essentielles de Menthe Spicata L sur Rhyzoperlhu dominicu (F)* »
- ⁸ AFNOR, (2000). Association française de normalisation. Normes française: huiles essentielles. Ed. Afnor, Paris.
- ⁹ Bernard, T.,Perineau, F., Bravo, P., Delmas, M. et Gaset, A. Oct, (1988) « *Information chimie* » n°298, 179-184p.
- ¹⁰ Guignard, J.L. (1997), « *Biochimie végétale* », Ed. Masson, Paris 2000, p166.
- ¹¹ Bruneton, J. « *Eléments de phytochimie et pharmacologie* », Edition Tec & Doc Lavoisier, Paris, 405-426p.
- ¹² Fernandez, X.; Chemat, F. et Tien Do, T.K. « *Les huiles essentielles –Vertus et applications* », Ed. Vuibert, Paris 2012, 160p.
- ¹³ Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A., 2003. « *Principe d'analyse instrumentale* »; Paris, De Boeck université, 956p.
- ¹⁴ Chalchat, J.K., Carry, L. P C., Menut, G., Lamaty, R. Malhuret. And Chopineau, J, (1997), « *Correlation between chemical composition and antimicrobial activity* ». VI. Activity of some African essential oils. *J. Essent. Oil Res.* 9: 67-75.
- ¹⁵ Schwedt, G. (1993), « *Méthodes d'analyse* ». Ed. Flammarion.
- ¹⁶ www.perkinelmer.com
- ¹⁷ file:///D:/Fin%20d'étude/Partie%20expéri%20M2/uv%20visible.pdf
- ¹⁸ Gherib. M. Thèse de magister, (11/06/2009) « *Etude des activités antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielle et des flavonoïdes d'Artemisia herba alba Asso; Artemisia*

judaica .L. *ssp.sahariensis*; *Artemisia campestris* L; *Herniaria mauritanica* Murb et *Warionia saharae* Benth. et Cou.le ». 50p

- 19 Franchomme, P.; Jollois, R.; Penoel, D.; (2001) « *L'aromathérapie exactement : Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles* ». Editions Jollois.
- 20 Djeridane A., (2008). « *Evaluation du pouvoir antioxydant et de l'inhibition d'enzymes (la Carboxylestérase et l'Acylase) par des extraits phénoliques de dix-neuf plantes médicinales locales* ». Thèse de doctorat en sciences École Normale Supérieur de Kouba, Alger.
- 21 Quezel, P., Santa, S., (1963) « *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales* », Tome II, édition centre national de la recherche scientifique, Paris. 640-660p
- 22 Vican, P., (2001) « *Encyclopédie des plantes médicinales* ». Larousse (Ed). Paris, 355p.
- 23 Bremness, L. (2002) « *Plantes aromatiques et médicinales* ». Bordas (Ed). Paris, 303 p.
- 24 Singh, K.K.; Goswami, T.K. (1998) « *Mechanical Properties of Cumin Seed (Cuminum cyminum Linn.) under Compressive Loading* ». J Food Engineering. **36**: 311-321p.
- 25 Behera, S.; Nagarajan, S.; Rao, L.J.M. (2004) « *Microwave heating and conventional roasting of cumin seeds (Cuminum cyminum L.) and effect on chemical composition of volatiles* ». Food Chem. **87**: 25-29p.
- 26 Bellakhdar, J. (1997) « *La pharmacopée marocaine traditionnelle* ». Ibis Press (Ed). Paris, 764 p.
- 27 Teles Andrade, B.F.M.; Barbosa, L.N.; da Silva Brobst, I. and Fernandes, Gunior A.J. Essent. Oil Res. (2014), 26, 34-40p.
- 28 Dridi F., (2005). « *Extraction et analyse de l'huile essentielle de cumin formulation d'une pommade décongestionnante* ».Mémoire pour l'obtention du diplôme de magister en Chimie Appliquée, Université M'Hamed Bouguerra BOUMERDES.
- 29 Hajlaoui, H. et al., « *Chemical composition and biological activities of Tunisian Cuminum cyminum L. essential oil: A high effectiveness against Vibrio spp. strains* » Food Chem. Toxicol., vol. 48, no. 8–9, Aug. (2010). 2186–2192p.
- 30 Ould El Hadj M. D., Hadj-Mahammed M. et Zabeirou H., (2003). « *Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouargla (Sahara Septentrional Est)* ». Courrier du savoir ; 3 : 47-51p.
- 31 Ozenda, P., (1977) « *Flore de Sahara septentrional et central, Centre national de la recherché scientifique* », Paris.
- 32 Bramwell, D.E.L., Branwell, Z., (2001) « *Flores Silvestres de las Islas Canarias* », Madrid.
- 33 Adams, R. P., (1995) « *Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography-Mass Spectroscopy* », Allured Publ., Illinois, IL.

- ³⁴ Belboukhari N., Bourmita Y., Cheriti A., Mir K., (2013). « *Profil phytochimique et évaluation médicinale d'une préparation traditionnelle saharienne* ». *PhytoChem & BioSub Journal*, (7):2.
- ³⁵ Halla, N. *et al.*, April (2018) « *Chemical profile and bioactive properties of the essential oil isolated from Ammodaucus leucotrichus fruits growing in Sahara and its evaluation as a cosmeceutical ingredient* » *Ind. Crops Prod.*, vol. 119, 249–254p.
- ³⁶ Al-Jaber, H. I. *et al.*, (2013), « *Chemical Composition, Antimicrobial and Antitumor Activities of Essential Oil of Ammodaucus leucotrichus Growing in Algeria* », *J. Biol. Act. Prod. from Nat.*, vol. 3, 224–231p.
- ³⁷ Sadaoui, N. *et al.*, July (2018), « *The essential oil of Algerian Ammodaucus leucotrichus Coss. & Dur. and its effect on the cholinesterase and monoamine oxidase activities* », *Fitoterapia*, vol. 130, 1–5p.
- ³⁸ Mayer, F. (2012), « *Utilisation thérapeutiques des huiles essentielles : étude de cas enmaison de retraite* », thèse pour obtenir le diplôme d'état de docteur en Pharmacie, université de LORRAINE.16-26p.
- ³⁹ El-Sawi, S.A.; Mohamed, M.A.; (2002), « *Cumin herb as a new source of essential oils and its response to foliar spray with some micro-elements* ». *Food Chem.* **77**: 75-80p.
- ⁴⁰ Sagdic, O.; Ozcan, M.; (2003), « *Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols* ». *Food Control.***14**, 141-143p.
- ⁴¹ Sean, K. « *Natural Products Research* ». *Nat. Prod. Chem. Res.*, vol. 1, no. 1, 2014.
- ⁴² Boyraz, N.; Ozcan, M.; (2005), « *Antifungal effect of some spice hydrosols* ». *Fitoterapia.***76**, 661- 665p.
- ⁴³ Bose, D. July (2018), « *Potentials of Cuminum cyminum in Microbial Control* ».
- ⁴⁴ Mayer, F. (2012), « *Utilisation thérapeutiques des huiles essentielles : étude de cas enmaison de retraite* », thèse pour obtenir le diplôme d'état de docteur en Pharmacie, université de LORRAINE.16-26p.
- ⁴⁵ "Aldéhyde." [Online]. Available: <http://www.aromacopa.com/aldehyde.php>. [Accessed: 21-Feb-2019].
- ⁴⁶ C. Organique, (2007), « *Composés carbonylés : aldéhydes et cétones* », 1–17p.
- ⁴⁷ Simon.HADROT, « *Développements méthodologiques dans la chimie des hydrazones et des isonitriles* », Thèse de Doctorat, Ecole polytechnique ENSTA, Soutenue le 7 décembre2006, p 2.
- ⁴⁸ Schoderet M. et collaborateurs, (1989). *Pharmacologie « Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques* ». Ed. Frison et Roche Paris, vol.2, 509-918p
- ⁴⁹ Vicini. P. Zani. F. Doytchinova.I. (2002) « *Hydrazones of 1,2-benzisothiazole hydrazides, synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations* », Vol 37, 553-564p.

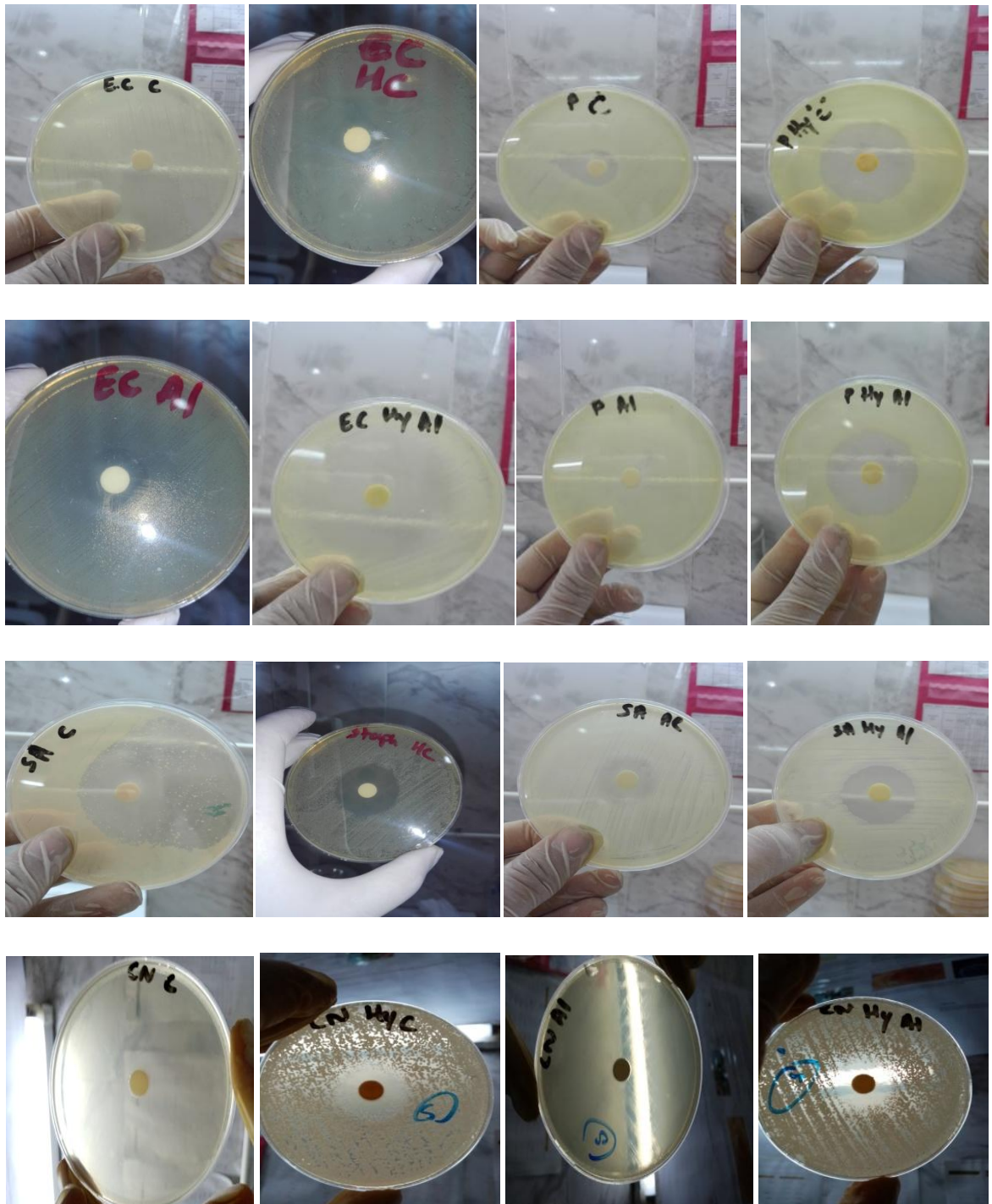
- ⁵⁰ Sondhi. S, Dinodia. M.,Kumar. A, (2006) « *Synthesis, anti-inflammatory and analgesic activity evaluation of some amidine and hydrazine derivatives* ».Bioorg. Med. Chem. Vol 14 4657–4663p
- ⁵¹ Paola.Vicini, Matteo.Incerti, Irini A. Doytchinova, Paolo La Colla, Bernadetta Busonera, Roberta Loddo, « *Synthesis and antiproliferative activity of benzo[d]isothiazole hydrazones* », 2006, 626p.
- ⁵² Metwally.K.A, Abdel-Aziz. L.M, Lashine. E.M, Hussein. M.I et Badawy. R.H, (2006) « *Hydrazones of 2-aryl-quinoline-4-carboxylic acid hydrazides synthesis and preliminary evaluation as antimicrobial agents* », Vol 14, 8675-8682p.
- ⁵³ Shatha I A.,(2017) « *Synthetic approaches to benzimidazoles from o-phenylenediamine: A literature review* ». King Saud University, Journal of Saudi Chemical Society. 21, 229-237p.
- ⁵⁴ Shaharyar M., Mazumder A., et Salahuddin, (2017) « *Benzimidazoles: A biologically active compounds* ». King Saud University, Arabian Journal of Chemistry. 10, 157-173p.
- ⁵⁵ Chao S. C., Oberg G.J., (2000). « *Screening for inhibitory activity of Essential Oils on selected Bacteria, Fungi and viruses* ». J.Essent. Oil Res., vol.12, 639-649p.
- ⁵⁶ Pibiri MC, (2005). « *Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle* ». Thèse de Doctoral. Polytechniques Fédérale de Lausanne.
- ⁵⁷ Hulin V., Mathot A.G., Mafart P., et Dufosse L., (1998). « *Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'aromes* ». Sciences des aliments, vol.18, 563-582p.

Annexe :

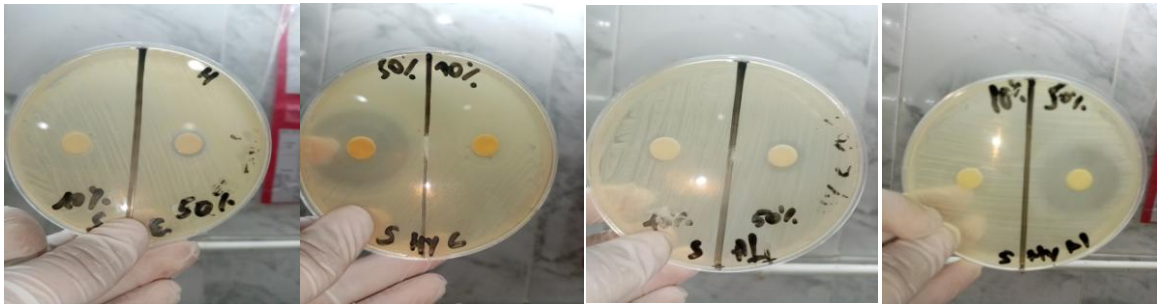
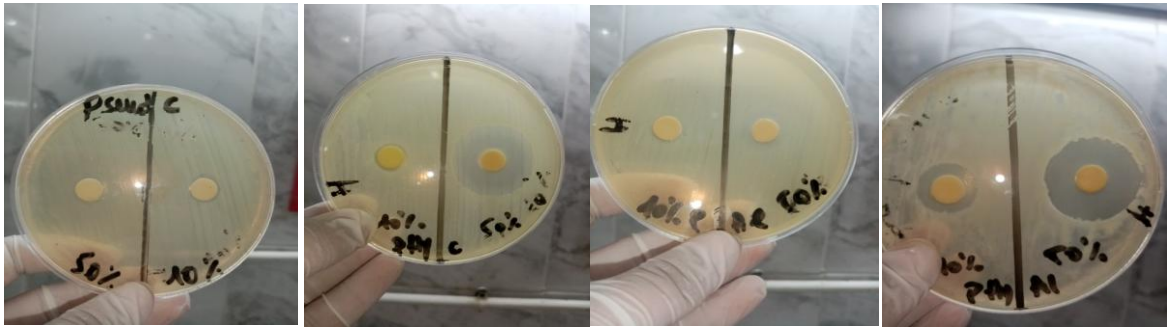
➤ **Aromatogramme des produits purs**

E.C: *Echerechia coli*; P : *Pseudomonas aeruginosa*; S : *Staphylococcus aureus*; CN : *Candida Albicans*

C: HE du *Cuminum*; Al : HE d'*Ammodaucus*; Hy C : Hydrazone du *Cuminum*; Hy Al : Hydrazone d'*Ammodaucus*

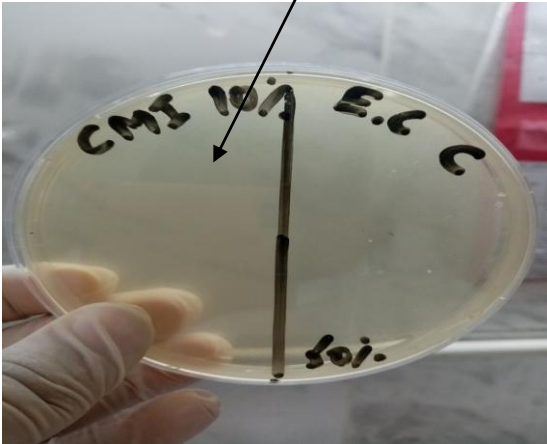


➤ Aromatogramme des produits à 50 et 10%



➤ La CMI

Un effet inhibiteur



Pas d'effet inhibiteur

