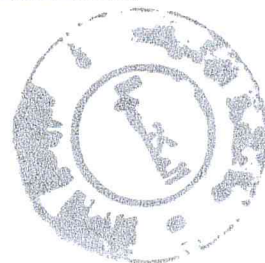


**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB DE BLIDA**



Faculté des Sciences

Département de Chimie

Mémoire Présenté par

**DIDANE Soraya**



**En vue d'obtenir le diplôme de Master**

Domaine      Science de la matière  
Filière        Chimie  
Option        Chimie des substances naturelles

Titre

**Contribution à l'étude chimique de l'huile essentielle de  
*Tetraclinis articulata* et détermination de l'activité  
antimicrobienne**

Soutenue le 04 juillet 2011, devant le jury composé de :

|              |      |           |                     |
|--------------|------|-----------|---------------------|
| O. MOHAMMEDI | Pr.  | Président | Université de Blida |
| A. BADIS     | MCA. | Examineur | Université de Blida |
| N. BOUZIDI   | MCB. | Examineur | Université de Blida |
| M. EL HATTAB | MCA. | Promoteur | Université de Blida |

# Remerciements



*Ce travail a été réalisé principalement entre le laboratoire de Chimie des Substances Naturelles à l'université de Blida, le Centre de Recherches et de Développement (C. R. D) SAIDAL (Alger) et le Laboratoire MAPIEM de l'Université du Sud Toulon-Var (France). Nombreux sont ceux qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre à l'aboutissement de ce mémoire. Mes remerciements vont en particulier à :*

*Docteur EL HATTAB Mohamed, responsable du Master Chimie des Substances Naturelles, pour avoir accepté de m'encadrer, pour m'avoir guidé, encouragé et pour ses précieux conseils et ses critiques qui m'ont aidé tout au long de ce travail. Qu'il trouve ici ma gratitude et ma déférence. Je loue aussi son moral et sa ténacité face à la rudesse de ses missions.*

*Mes vifs remerciements à Monsieur Gérald CULIOLI, Maître de conférences à l'université du Sud Toulon-Var (France), qui nous a accueillis au sein du Laboratoire MAPIEM, pour la grande aide qu'il nous a apporté, pour sa grande générosité, sa gentillesse et sa modestie.*

*Je ne remercierai jamais assez AKKACHE Lynda, biologiste et REDJALA Amine, chimiste au C. R. D. SAIDAL pour toute leurs disponibilité et leurs aide.*

*Je tiens à remercier Professeur MOHAMMEDI Ourida pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. C'est un très grand honneur et un très grand plaisir pour moi.*

*A Monsieur BADIS A. et Madame BOUZIDI N., maitres de conférences à l'université de Blida, j'exprime ma sincère reconnaissance pour l'honneur qu'ils me font de juger ce travail et de faire partie du jury. Qu'ils soient assurés de mon entière reconnaissance.*

*Je tiens à exprimer mon éternelle reconnaissance et ma profonde gratitude à mes parents et à tous les membres de ma famille pour m'avoir soutenu et encouragé, aussi à TSALAMLAL Y. qui a rendu le temps que j'ai passé à l'université un pur plaisir, sans oublier tous mes chers amis pour les bons moments passés ensemble.*

## RESUME

La famille des *Cupressacées* est l'une des plus importantes familles de conifères contenant plus de 130 espèces à travers le monde. *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters (une espèce de la famille des *Cupressacées*) est répandue dans l'Afrique du Nord, mais peut rarement être trouvée dans le sud-ouest de l'Europe. Différentes parties de *Tetraclinis articulata* sont utilisées dans la médecine traditionnelle en raison de ses multiples effets thérapeutiques.

La présente étude se concentre sur la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* récoltés en Algérie et la détermination de son activité microbiologique. Les huiles essentielles ont été obtenues par distillation à la vapeur avec un rendement moyen de 0,8% et analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS). Quarante-six composés qui représentent 96% de la composition chimique total ont été identifiés suivant la base des données spectrales et la masse spectrale des produits purs donnés dans la littérature. Les principaux composants sont: monoterpènes (30%), la trans-pinocarveol, 2-pinène-4-one et 2-pinène-4-ol. A noter également la présence d'hydrocarbures sesquiterpènes (19%) et sesquiterpènes oxygénés (11%), un diterpène (5,7%) et des acides gras (9%).

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été effectuée par la méthode de diffusion des disques et a montré une très forte activité contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* et *Escherichia coli* et contre les levures *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*. L'étude quantitative a permis la détermination de la CMI, CMB et CMF.

**Mots-clés:** *Tetraclinis articulata*, huiles essentielles, composition chimique, propriétés antimicrobiennes, terpènes.

## ABSTRACT

The *Cupressaceae* is one of the most important families of conifers containing over 130 species around the world. *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters (a species of the Cupressaceae family) is endemic to North Africa, but can rarely be located in southwestern Europe. Different parts of *Tetraclinis articulata* are used in popular medicine because of its multiple therapeutic effects.

The present study focuses on the chemical composition of the essential oils of *tetraclinis articulata* harvested in Algeria and the determination of its microbiological activity. Essential oils was obtained by steam distillation with an average yield of 0.8% and analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC / MS). Forty six compounds representing 96% of the total chemical composition were identified based on spectral databases and mass spectra of pure products given in the literature. The major components are mainly monoterpenes (30%) such as trans-pinocarveol, 2-pinene-4-one and 2-pinene-4-ol. Also note the presence of hydrocarbon sesquiterpenes (19%) and oxygenated sesquiterpenes (11%), one diterpene (5.7%) and fatty acids (9%).

The evaluation of antimicrobial activity was performed by the disk diffusion method and showed very high activity against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* and *Escherichia coli* and against the yeasts *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. The quantitative study allowed the determination of MIC, MBC and MFC of the essential.

**Keywords:** *Tetraclinis articulata*, essential oils, chemical composition, antimicrobial properties, terpenes.

## ملخص

كبيريساسي واحدة من أهم عائلات الصنوبريات، تحتوي على أكثر من 130 نوع في جميع أنحاء العالم. تيتراكلينيس ارتيكلاتا (فال) ماسترس نوع من العائلة كبيريساسي يتواجد في شمال أفريقيا، ولكن نادرا ما يمكن أن نجدها في جنوب غرب أوروبا. تستخدم أجزاء مختلفة من تيتراكلينيس ارتيكلاتا في الطب التقليدي لما له من آثار علاجية متعددة.

هذه الدراسة تركز على التركيب الكيميائي للزيوت الأساسية لتيتراكلينيس ارتيكلاتا المحصودة في الجزائر و تحديد نشاطها الميكروبيولوجي. تم الحصول على الزيوت الأساسية عن طريقة التقطير البخار بمرود قدره 8.0 % وتحليلها بواسطة الكروماتوغرافيا الطور الغازي مقرونة بمطيافية الكتلة. وتم تحديد ستة و أربعين مركب يمثلون 96 % من إجمالي التكوين الكيميائي على أساس البيانات الطيفية و الأطياف الكتلية. المكونات الأساسية هي مونوتربان (30%)، ترانس-بينوكارفيول، 2-بينان-4-اون و 2-بينان-4-اول . نلاحظ أيضا وجود سيسكيتربان الهيدروكربونية (19%) و سيسكيتربان الأوكسجينية (11%)، ديتربان واحد (5.7%) وأحماض دهنية (9%).

تم تقييم النشاطات المضادة للميكروبات كمي و نوعيا باستعمال طريقة الانتشار القرصي و قد أظهرت وجود نشاط عال جدا ضد ستافيلوكوكيس أوريوس، باسيليس سيبتيليس، ميكروكوكيس لوتيس و إيشيريشيا كولي ، وضد الخميرتين كونديدا أليكانس و ساكارومييساس سيريفيسيا. سمحت الدراسة الكمية بتحديد التركيز الأدنى المثبط ، التركيز الأدنى المبيد للفطريات و التركيز الأدنى المبيد للجراثيم.

الكلمات المفتاحية:

تيتراكلينيس ارتيكلاتا، الزيوت الأساسية، التركيب الكيميائية، الخصائص المضادة للميكروبات، تربان.

## LISTE DES TABLEAUX

*p. 19 - Tableau 1 : Comparaison entre la composition de l'huile essentielle des feuilles de *Tetraclinis articulata* issu du Maroc et de Tunisie.*

*p. 34 - Tableau 2 : Liste des microorganismes testés.*

*p. 38 - Tableau 3 : Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata*.*

*p. 38 - Tableau 4 : Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata*.*

*p. 39 - Tableau 5 : Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Tetraclinis articulata*.*

*p. 56 - Tableau 6 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle de feuilles de *Tetraclinis articulata*.*

*p. 56 - Tableau 7 : Valeurs des CMI, CMB et CMF (en%) de l'huile essentielle contre les différentes souches bactériennes testées.*

## LISTE DES FIGURES

- p. 14- Figure 1 : Différentes parties de *Tetraclinis articulata*.
- p. 15 - Figure 2 : Arbre de *Tetraclinis articulata*.
- p. 18 - Figure 3 : Métabolites secondaires isolés des extraits lipidiques de *T. articulata*.
- p. 25 - Figure 4 : Montage de l'hydrodistillation.
- p. 26 - Figure 5 : Extraction liquide/liquide de l'huile essentielle de *T. articulata* et séchage sur du sulfate de magnésium.
- p. 27 – Figure 6 : Pycnomètre.
- p. 28 - Figure 7 : Réfractomètre.
- p. 28 - Figure 8 : Polarimètre.
- p. 29 - Figure 9 : Différentes étapes de la détermination de l'indice d'acide.
- p. 31 - Figure 10: Différentes étapes de la détermination de l'indice d'ester.
- p. 32 - Figure 11 : Appareil de chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectroscopie de masse.
- p. 34 - Figure 12: Illustration de la méthode des antibiogrammes.
- p. 35 - Figure 13 : Bactéries et levures vues sous microscope.
- p. 43 - Figure 14 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata*
- p. 44 - Figure 15 : profil chromatographique d'analyse de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata*.
- p. 45 - Figure 16: Agrandissement et numérotation des pics du chromatogramme de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata*.

- p. 46 - Figure 17: Spectre de masse de elemol  $C_{15}H_{26}O$
- p. 47 - Figure 18 : Spectre de masse de camphene  $C_{10}H_{16}$
- p. 48 - Figure 19 : Spectre de masse de alpha-amorphe
- p. 49 - Figure 20 : Spectre de masse de **trans-pinocarveol**  $C_{10}H_{16}O$
- p. 50 - Figure 21 : Spectre de masse de l'oxyde de manoyle  $C_{20}H_{34}O$
- p. 52 - Figure 22 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition des bactéries.
- p. 53 - Figure 23 : Zones d'inhibition de l'huile essentielle testée sur *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*.
- p. 54 - Figure 24 : Zones d'inhibition de l'huile essentielle testée sur *Escherichia coli* et *Micrococcus luteus*.
- p. 55 - Figure 25 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition des levures.
- p. 56 - Figure 26 : Zones d'inhibition de l'huile essentielle testée sur *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*



# TABLE DES MATIERES

|  |           |
|--|-----------|
| REMERCIEMENT .....   | 1         |
| RESUME .....   | 2         |
| ABSTRACT .....   | 3         |
| ملخص.....  | 4         |
| LISTE DES TABLEAUX .....   | 5         |
| LISTE DES FIGURES .....  | 6         |
| INTRODUCTION .....   | 11        |
| <br>   |           |
| <b>Chapitre I : Synthèse bibliographique .....</b>   | <b>13</b> |
| I.1 Introduction .....   | 14        |
| I.2 Position systématique de <i>Tetraclinis articulata</i> .....                               | 14        |
| I.3 Distribution géographique .....  | 16        |
| I.4 Etudes chimiques sur l'espèce <i>Tetraclinis articulata</i> .....                          | 16        |
| I.4.1 Etude chimique des extraits lipidiques de <i>Tetraclinis articulata</i> .....            | 16        |
| I.4.1.1 Métabolites secondaires isolés des extraits lipidiques de <i>T. articulata</i> .....   | 16        |
| I.4.1.2 Activités biologiques des extraits lipidiques de <i>Tetraclinis articulata</i> .....   | 17        |
| I.4.2 Etude chimique des huiles essentielles de <i>Tetraclinis articulata</i> .....            | 19        |
| I.4.2.1 La composition chimique des huiles essentielles de <i>Tetraclinis articulata</i> ..... | 19        |
| I.4.2.1 Activités biologiques des huiles essentielles de <i>Tetraclinis articulata</i> .....   | 21        |
| <br>   |           |
| <b>Chapitre II : Travail expérimental.....</b>   | <b>23</b> |
| <br>   |           |
| <b>II. Partie 1 : Matériels et méthodes .....</b>  | <b>24</b> |
| II.1.1 Introduction .....  | 24        |
| II.1.2 Lieu et date de récolte de l'espèce étudiée.....  | 24        |
| II.1.3 Protocole expérimental d'extraction de l'huile essentielle .....                        | 25        |
| II.1.3.1 Description du dispositif d'extraction .....  | 25        |
| II.1.3.2 Extraction liquide-liquide de l'huile essentielle .....                               | 26        |

|  |           |
|--|-----------|
| II.1.3.3 Rendement en huile essentielle .....  | 27        |
| II.1.4 Analyses physio-chimiques de l'huile essentielle de <i>Tetraclinis articulata</i> .....                       | 27        |
| II.1.4.1 Mesure des indices physiques .....  | 27        |
| II.1.4.1.1 Détermination de la densité .....   | 27        |
| II.1.4.1.2 Détermination de l'indice de réfraction .....   | 28        |
| II.1.4.1.3 Détermination du pouvoir rotatoire .....  | 28        |
| II.1.4.2 Mesure des indices chimiques .....  | 28        |
| II.1.4.2.1 Détermination de l'indice d'acide.....  | 28        |
| II.1.4.2.2 Détermination de l'indice d'ester.....  | 30        |
| II.1.5 Analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ..... | 32        |
| II.1.5.1 Description de l'appareil .....   | 32        |
| II.1.5.2 Conditions opératoires .....  | 32        |
| II.1.6 Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de <i>Tétraclinis articulata</i> .....             | 33        |
| II.1.6.1 Etude qualitative de l'effet antimicrobien .....  | 33        |
| II.1.6.1.1 L'aromatogramme .....   | 33        |
| II.1.6.1.2 Souches microbiennes choisies .....   | 34        |
| II.1.6.1.3 Protocole expérimental .....  | 36        |
| II.1.6.2 Etude quantitative de l'effet antimicrobien .....   | 37        |
| II.1.6.2.1 Détermination des CMI .....   | 37        |
| II.1.6.2.2 Détermination des CMB/CMF .....   | 38        |
| <br>   |           |
| <b>Partie 2 : Résultats et Discussions .....</b>   | <b>39</b> |

## INTRODUCTION

L'utilisation des plantes à des fins thérapeutiques remonte à la nuit des temps, puisque l'homme les a toujours utilisés pour guérir ses maux. La phytothérapie, s'est lentement élaborée au fond des grottes des premiers humanoïdes, pour devenir jusqu'au moyen âge l'unique moyen de guérir malades, égotants, souffreteux et autres valétudinaires [1].

Si au début cro-Magnon ou Neandertal ont manipulé des plantes de manière presque instinctive, l'homme a appris par la suite à en faire des tisanes, décoctions, et autres infusions jusqu'à arriver à en extraire des huiles essentielles. Cette dernière nécessita un matériel relativement élaboré car elle ne peut être obtenue sans distillation, et donc sans alambic. Cet appareil sophistiqué n'a été définitivement mis au point que vers l'an 1 000 après J.-c. par Avicenne, et a été importé en Europe au douzième siècle.

Mais c'est surtout en Mésopotamie et en Egypte ensuite que l'usage des huiles essentielles est devenu une pratique courante. Les égyptiens recouraient à l'embaumement de leurs défunts en utilisant des huiles essentielles afin de les préserver des dégradations du temps. Il existe aussi des papyrus dits « ebers » (2800 avant J. -C.) qui parlent des préparations de fleurs et d'essences et témoignent des propriétés de la marjolaine, de l'origan, de la cannelle, de la menthe, du genévrier... [2]

Ce dernier (du nom latin *Juniperus*), fait partie des 30 genres appartenant à la famille des *Cupressacées* répartis un peu partout dans le monde, et qui sont à leur tour largement utilisés depuis longtemps puisque les fouilles pratiquées sur des sites archéologiques ont révélé qu'ils étaient déjà appréciés des Helvètes lacustres. Au début de notre ère, le géographe grec Strabon rapportait que les Gaulois du Sud les utilisaient pour embaumer les têtes coupées. Une équipe de chercheurs allemands a identifié en 2003 des composés phénoliques du cèdre de l'Atlas dans les résines d'embaumement des Egyptiens anciens.

Les nombreuses propriétés médicinales des *Cupressacées* leurs ont valu jusqu'au XIXe siècle une réputation méritée de panacée.

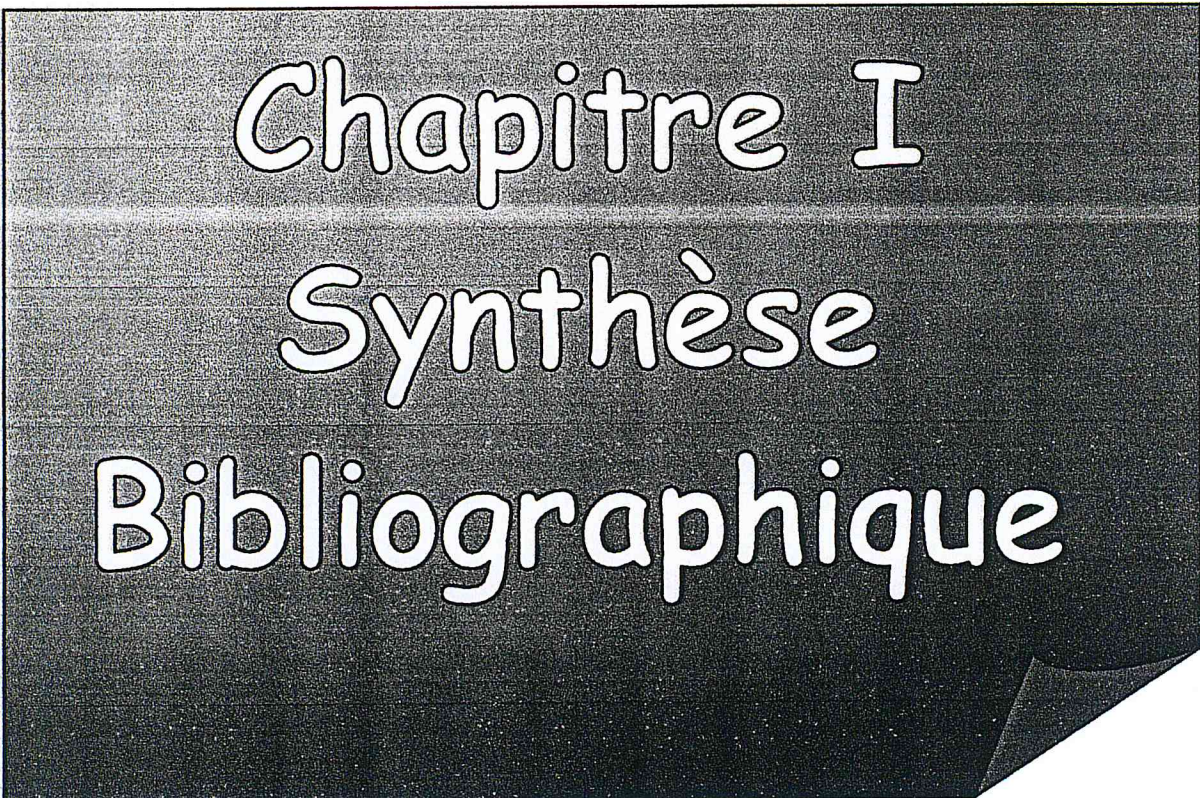
Ils peuvent – entre autres – soulager les infections urinaires ou cutanées, l'arthrose, l'asthme ou la migraine. Ils ont aussi une action stimulante sur le système rénal. En usage externe, ils améliorent l'irrigation de la peau, ce qui permet d'atténuer les douleurs rhumatismales. Puissants antiseptiques, ils furent employés en fumigation jusqu'au XIXe siècle: on en brûlait dans les maisons et les lieux publics lors des épidémies. Ils furent également préconisés contre les morsures d'animaux venimeux, ce qui valut à l'extrait de genièvre, par exemple, le nom de «thériaque des paysans» [3].

Parmi les genres de la famille des *Cupressacées*, on peut citer le genre *Tetraclinis* qui renferme une seule espèce : l'*articulata* plus communément appelé «*Le Thuya de Berberie* ou *Araar* », endémique au nord de l'Afrique mais que l'on peut aussi trouver en Espagne et à Malte [4]. Il constitue un élément important de la végétation magrébine [5].

Différentes parties de *Thuya* sont employées en médecine populaire en raison de ses multiples effets thérapeutiques. Il est principalement utilisé contre les fièvres enfantines, les infections respiratoires et intestinales, les douleurs gastriques, le diabète et l'hypertension [6,7].

Le présent travail entre dans le cadre de la valorisation de l'espèce *Tetraclinis articulata* et est réparti en deux chapitres :

- Chapitre I : Synthèse bibliographique ;
- Chapitre II : travail expérimental dans lequel on procède à l'étude de l'huile essentielle (extraction et analyse) ainsi qu'à la détermination des tests d'activités microbiologiques.



Chapitre I  
Synthèse  
Bibliographique

## I.1 Introduction

Les *Cupressacées*, avec 29 genres et près de 130 espèces différentes, forment une des familles les plus importantes de conifères ou résineux. Ses arbres et arbustes ont des feuillages et des écorces riches en composés aromatiques. La majorité de ces plantes sont persistantes. Les *Cupressacées* sont aujourd'hui abondamment utilisées en aromathérapie et en cosmétique [3].

Parmi ces espèces, existe le *Tetraclinis articulata*, endémique à l'Afrique du nord mais que l'on peut aussi rarement trouver en Europe sud-occidentale. [4] Grâce à ses différents effets thérapeutiques, toutes les parties de cette espèce sont employées en médecine traditionnelle [6,7].

## I.2 Position systématique de *Tetraclinis articulata*

Selon Meyer et al. [8], *Tetraclinis articulata* est répertoriée comme suit

**Règne :** *Plantae*

**Division :** *Pinophyta*

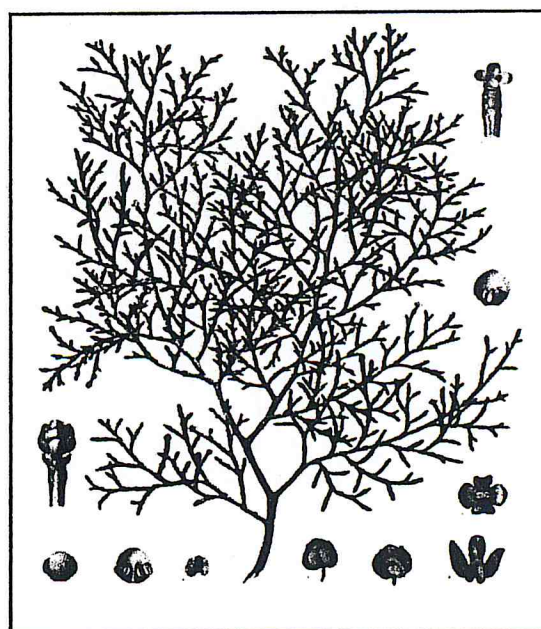
**Classe :** *Pinopsida*

**Ordre :** *Pinales*

**Famille :** *Cupressaceae*

**Genre :** *Tetraclinis*

**Espèce :** *articulata*

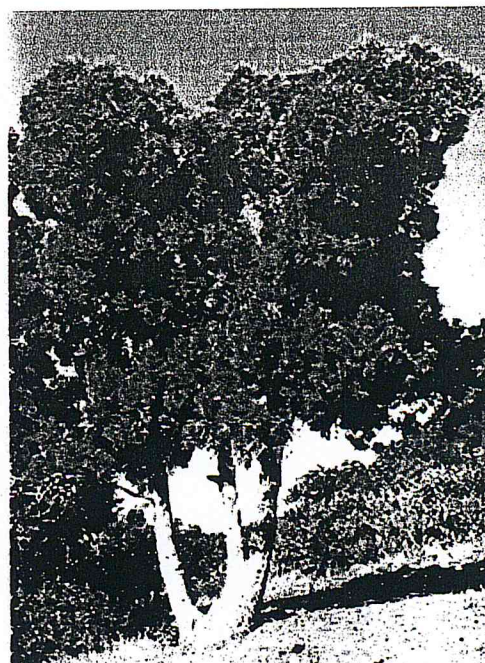
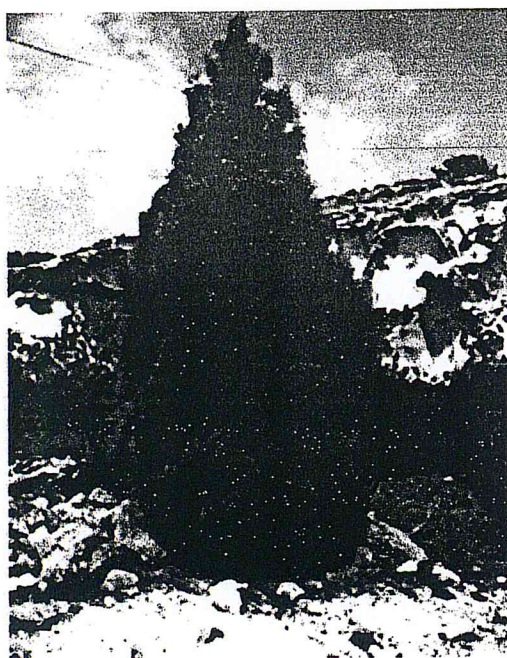


**Figure 1 :** Différentes parties de *Tetraclinis articulata*

*Tetraclinis articulata* est un conifère résineux appartenant à la famille des *Cupressacées* plus communément appelé « *sandarac* », « *thuya de Berberie* » ou « *Araar* ». C'est un arbre pouvant atteindre 6 à 8 m de haut et 0,30 m de diamètre en moyenne. Il existe néanmoins quelques peuplements difficiles d'accès où les dimensions peuvent être plus importantes (12 m pour 0,50 m).

On a également observé quelques vieux sujets allant jusqu'à 20 m de haut pour 1m de diamètre mais cela reste très rare (arbre marabout). Il possède souvent deux ou plusieurs troncs à la base [9].

L'arbre (figure 2) fleurit en automne (octobre) et fructifie l'été suivant (juin-juillet). Cette fructification démarre vers l'âge de 15 ans et se répète tous les deux à trois ans jusqu'à un âge très avancé. L'ouverture des cônes, qui reste comme pour beaucoup d'espèces conditionnée par la chaleur, n'a lieu qu'à la fin de l'été [9].



**Figure 2 : Arbre de *Tetraclinis articulata***

## **I.3 Distribution géographique**

Le *thuya de Berbérie* (*Tetraclinis articulata*), espèce résineuse de la famille des *Cupressacées*, constitue un élément important de la végétation Nord africaine (Maroc, Algérie, Tunisie), puisqu'il couvre plus d'un million d'hectares [10]. En dehors de son aire nord-africaine, on ne rencontre que deux stations limitées, l'une dans la province de Carthagène en Espagne et l'autre à Malte [4]. Il est généralement localisé dans les étages semi arides entre le niveau de la mer et 1500 m. le froid, surtout en présence d'humidité, l'empêche de s'élever plus haut. On le trouve à la fois sur sol calcaire et sur sol siliceux. [11]. En Algérie, il occupe une superficie estimée à 160 000 ha, localisée en majorité dans la région ouest du pays [12].

La quasi-totalité des peuplements se présente sous forme de taillis. Leur âge s'échelonne entre 10 à 60 ans avec un accroissement moyen en volume possible de 2 à 3 m<sup>3</sup>/ha/an dans les meilleures stations [10].

## **I.4 Etudes chimiques de l'espèce *Tetraclinis articulata***

### **I.4.1 Etude chimique des extraits lipidiques de *Tetraclinis articulata***

#### **I.4.1.1 Métabolites secondaires isolés des extraits lipidiques de *Tetraclinis articulata***

Depuis les années 50, plusieurs travaux ont été effectués sur les extraits lipidiques des différentes parties de *Tetraclinis articulata* en utilisant, entre autres, l'hexane ou l'acétate d'éthyle comme solvant [13]. Ces études ont mené à l'isolement de plusieurs nouvelles molécules de différentes classes.

Il s'agit notamment de monoterpènes [21], diterpènes [13, 16, 17, 19, 23, 24], sesquiterpènes [14, 15], mais aussi d'acides résiniques [18, 20] qui sont des acides terpéniques non volatils présents dans les résines des plantes. Ce sont des agents protecteurs et de préservation du bois.



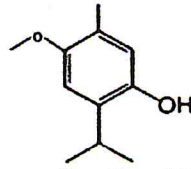
Parmi les composés isolés des extraits lipidiques de *Tetraclinis articulata*, on peut aussi citer les lignanes [22] ; ces derniers sont des composés phénoliques formés de deux unités monolignols. Ces mêmes unités de base servent aussi aux végétaux pour synthétiser un long polymère ramifié, Il existe de très nombreux lignanes, qui diffèrent par le type de liaison entre les deux unités et les modifications qui interviennent après la dimérisation.

La figure 3 illustre des exemples de molécules des différentes classes de molécules isolées de *Tetraclinis articulata*.

#### **I.4.1.2 Activités Biologiques des extraits lipidiques de *Tetraclinis articulata***

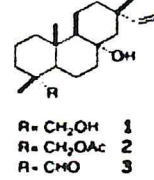
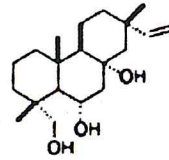
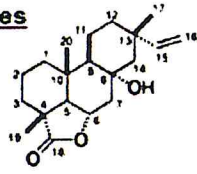
Des travaux consacrés à l'activité biologique de *Tetraclinis articulata* ont porté sur l'évaluation de certains dérivés pimaranes sur l'inhibition de différentes fonctions des leucocytes humains tels que le processus de dégranulation, et la production de superoxyde, qui sont des phénomènes impliqués dans un grand nombre de fonctions physiopathologiques [25,26], et leurs effets sont considérés comme une stratégie intéressante dans la lutte contre les troubles inflammatoires [20].

**Monoterpène**

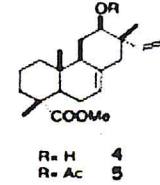


**p-methoxythymol[21]**

**Diterpènes**



R = CH<sub>2</sub>OH 1  
R = CH<sub>2</sub>OAc 2  
R = CHO 3



R = H 4  
R = Ac 5

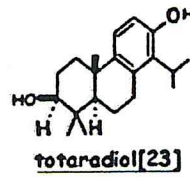
**Dérivés pimaranes [13]**



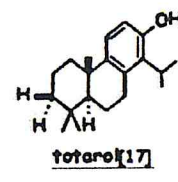
**totarolane[17]**



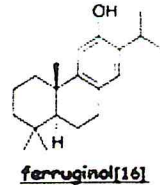
**totarolenone[24]**



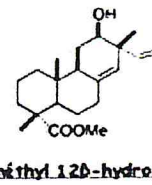
**totaradiol[23]**



**totarol[17]**

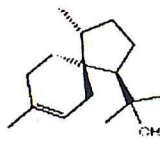


**ferruginol[16]**

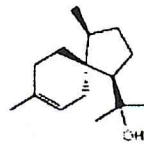


**méthyl 12b-hydroxy  
sandarecopimarate[19]**

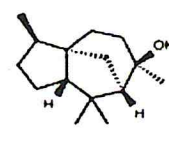
**Sesquiterpènes**



**α-Acorenol[15]**

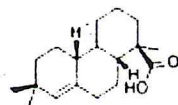


**β-Acorenol[15]**

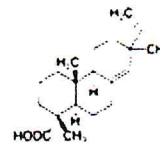


**Cedrol[14]**

**Acides résiniques**



**acide sandarecopimerique[20]**



**acide isopimarique[18]**

**Lignane**



**deoxypodophyllotoxin[22]**

**Figure 3: métabolites secondaires isolés des extraits lipidiques de *Tetraclinis articulata***

## I.4.2 Étude chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata*

### I.4.2.1 Composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata*

Les huiles essentielles des différentes parties de *Tetraclinis articulata* et provenant de différents pays (autres que l'Algérie) ont fait l'objet de plusieurs études [27, 28] et ont mené à l'identification de la composition chimique, ainsi que différentes activités biologiques [32, 33, 34]

La composition des huiles essentielles des parties aériennes de *T. Articulata* de Malte a montré la présence de dix huit composés de nature terpénique dont les principaux sont:  $\alpha$ -pinène (31-68.2%), limonène (3.8-25.3%), germacrène D (1.6-5%), camphre (1.1-18.1%) et l'acétate de bornyl (1.8-19.9%) [27].

Les études sur les huiles essentielles du bois et des branches du *T. articulata* marocain, quant à eux, ont révélé la présence de l' $\alpha$ -pinène (3.8-9.7%) et le limonène (1.5-8.5%). Toutefois, le camphre, le bornéol et l'acétate de bornyl se trouvent uniquement dans les branches avec des teneurs respectives de 23.5%, 13.2% et 31.1%) [28].

Cependant, d'autres recherches ont été faites sur les mêmes parties de *T. articulata* issu du Maroc et ont montré une absence de l' $\alpha$ -pinène et de limonène ainsi qu'une diminution dans les proportions du camphre (branches 19.1%), bornéol (branches 9.6%) et l'acétate de bornyl (branches 16.5%). Le cedrol (28.2%) et le 1,7-di-épi-cedrol (17.9%) ont été retrouvés dans le bois [29].

Cette variabilité dans la composition de l'huile essentielle est probablement due aux lieux et aux périodes de récolte qui doivent être différents.

Les substances volatiles obtenus séparément des branches, rameaux, feuilles, cônes et des racines de *Tetraclinis articulata* recueillies en Tunisie ont été analysés par GC et GC-MS. Des différences remarquables ont été observées entre les pourcentages constitutifs des différentes parties étudiées.

Les principaux composés dans les huiles essentielles des rameaux et des feuilles récoltés en Tunisie sont le naphthalene (6.6%), Z-muurolene (29%). Alors que le camphène (43.2%), Z- $\beta$ -ocimene (11.7%), nonanol (5.3%) et un composé non-identifié (12%) sont les produits majoritaires des branches. Dans l'huile essentielle des baies, les composés les plus importants sont : trans-pinocarveol (6.1%), p-cymene-8-ol (10.4%), fenchyl acetate (5.1%),  $\beta$ -phellandrene (8.1%) et le carvone (5.3%). Enfin, le constituant majeur dans l'huile essentielle des racines est le camphène (70.2%) [30].

Le tableau 1 montre la composition chimique des huiles essentielles des feuilles de *Tetraclinis articulata* récoltés au Maroc et en Tunisie.

**Tableau 1 : Comparaison entre la composition de l'huile essentielle des feuilles de *Tetraclinis articulata* issu du Maroc et de Tunisie**

| Composés                       | Maroc<br>[31] | Tunisie<br>[30] | Composés                | Maroc<br>[31] | Tunisie<br>[30] |
|--------------------------------|---------------|-----------------|-------------------------|---------------|-----------------|
| 4,6-Dimethyl-octane-3,5-dione  | /             | 22,42           | Piperitone oxide        | /             | 3,37            |
| Acétate d' $\alpha$ -terpinyle | 0,6           | /               | p-Mental-7,2-diene-8-ol | /             | 1,64            |
| Acétate de bornyle             | 30,6          | 0,12            | Sabinène                | 0,2           | /               |
| Acetate de géranyl             | /             | 0,28            | Terpinèn-4-ol           | 1             | /               |
| Acetate de linalyl             | /             | 0,65            | Terpinolene             | /             | 0,2             |
| Acetate de linalyl             | /             | 0,65            | Thuja-2,4(10)-diène     | 0,6           | /               |
| Allo-Ocimene                   | /             | 0,27            | trans-Carvéol           | 0,7           | /               |
| Bornéol                        | 4,7           | 0,24            | Trans-Pinocarveol       | /             | 1,73            |
| Camphène                       | 2,2           | 0,57            | trans-Verbénol          | 0,6           | /               |
| Camphene hydrate               | /             | 0,27            | Tricyclène              | 2             | /               |
| Camphre                        | 18,6          | /               | undecanal               | /             | 0,22            |
| Carvone                        | 0,4           | /               | Undecane                | /             | 0,53            |
| epi-cubénol                    | 0,5           | /               | undecanol               | /             | 1,07            |
| Fenchyl acetate                | /             | 1,16            | Verbénone               | 1,3           | /               |

| Composés           | Maroc<br>[31] | Tunisie<br>[30] | Composés              | Maroc<br>[31] | Tunisie<br>[30] |
|--------------------|---------------|-----------------|-----------------------|---------------|-----------------|
| géraniol           | /             | 1,86            | Z-Muurolene           | /             | 29,03           |
| Germacrène         | 0,3           | /               | Z- $\beta$ -Ocimene   | /             | 1,64            |
| Limonène           | 5,7           | 0,33            | $\alpha$ -Campholénal | 0,6           | /               |
| Linalool           | /             | 0,18            | $\alpha$ -Copaène     | 0,3           | /               |
| Myrcène            | 2             | 1,46            | $\alpha$ -Pinène      | 16,8          | /               |
| Myrtenal           | 0,3           | 1,46            | $\alpha$ -Terpinéol   | 0,4           | 1,62            |
| naphtalene         | /             | 6,62            | $\beta$ -Patchoulene  | /             | 0,32            |
| Nerol              | /             | 1,39            | $\beta$ -Phellandrene | /             | 1,73            |
| n-Nonanal          | /             | 0,94            | $\beta$ -Pinène       | 0,4           | /               |
| para-Cymène        | 0,6           | /               | $\gamma$ -cadinène    | 0,4           | /               |
| Pinocarvone        | 1             | /               | $\gamma$ -Terpinène   | 0,3           | /               |
| $\delta$ -cadinène | 0,8           | /               |                       |               |                 |

L'examen du tableau 1 révèle que la composition des huiles essentielles des feuilles de *Tetraclinis articulata* du Maroc et de Tunisie est très différente et que seulement 7 composés sont communs aux deux espèces, à savoir : l'Acétate de bornyle, le Bornéol, le Camphène, le Limonène, l' $\alpha$ -Terpinéol, le Myrtenal, et le Myrcène. Cette variation dans la composition montre la diversité chimique due à l'influence des facteurs environnementaux et écologiques.

#### I.4.2.2 Activités biologiques des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata*

Les études effectuées sur les huiles essentielles de différentes parties de *Tetraclinis articulata* ont montré qu'elles sont très actives, puisqu'elles manifestent un important potentiel antioxydant supérieur à celui du composé de référence (BHT). Elle présente aussi une activité anti-inflammatoire exploitable [34].

L'huile essentielle de la sciure de bois du tronc de *Tetraclinis articulata* a également montré une forte activité antibactérienne et antifongique contre les bactéries *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus*, mais également vis-à-vis des champignons *Trametes pini*, *Penicillium parasiticus* et *Aspergillus niger* [33]. Cependant, Seuls *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus* ont été inhibés à des concentrations élevées de l'ordre de 1/250 et 1/100 (v/v), respectivement, par l'huile essentielles des rameaux de Thuya de Berberie [32].

# Chapitre II

## Etude

### Expérimentale

# Partie 1 : Matériels et méthodes

## II.1.1 Introduction

Ce chapitre est consacré à l'étude chimique et des activités microbiologiques de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata*. Il est reparti en quatre parties : L'extraction de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata* par hydrodistillation, l'analyse de sa composition chimique par CG/SM, la détermination des indices physico-chimiques, et enfin l'étude de l'activité antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle.

L'extraction de l'huile essentielle et la détermination des indices physico-chimiques ont été réalisés au laboratoire de chimie des substances naturelles (département de Chimie de l'Université Saad Dahlab de Blida), alors que l'analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a été effectuée au sein du laboratoire MAPIEM de l'Université du Sud Toulon-Var (France).

Les tests d'activité antimicrobienne ont été réalisés au sein de l'unité microbiologique du Centre de Recherche et de Développement (CRD) du laboratoire SAIDAL (Alger).

## II.1.2 Lieu et date de récolte de l'espèce étudiée

Les feuilles de *Tetraclinis articulata* utilisées dans cette étude ont été récoltées en septembre 2010 à Hassi El Fdoul (Ain Ouassera) dans la wilaya de Djelfa. Elle est située dans les hauts-plateaux, à 300 km au sud d'Alger et d'une superficie de 32 256 km<sup>2</sup>.

Elle possède un climat continental, humide et froid en hiver et sec et chaud en été. La forêt occupe 8% de son territoire.



## II.1.3 Protocole expérimental d'extraction de l'huile essentielle

### II.1.3.1 Description du dispositif d'extraction

On introduit la matière végétale dans un ballon de 2l (figure 4), puis on ajoute de l'eau distillée jusqu'à la couvrir complètement. On porte à ébullition le mélange, ce qui provoque la formation d'un hétéroazéotrope eau-huile essentielle, dont les vapeurs sont condensées au niveau du réfrigérant pour donner un distillat. Ce dernier est constitué d'eau et d'huile essentielle à l'état liquide. L'opération dure 4h.

L'huile essentielle étant immiscible avec l'eau, le mélange forme un liquide légèrement trouble et sur lequel surnage une fine couche huileuse.

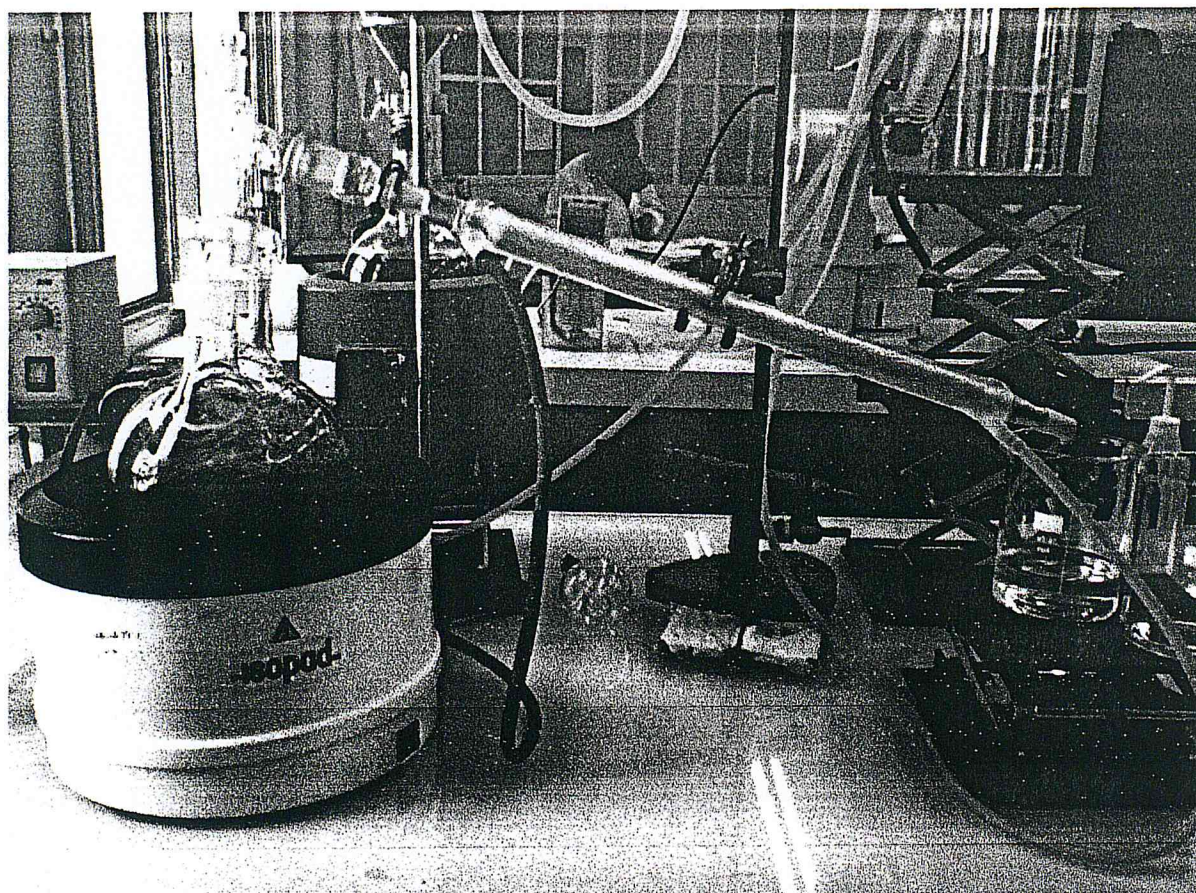


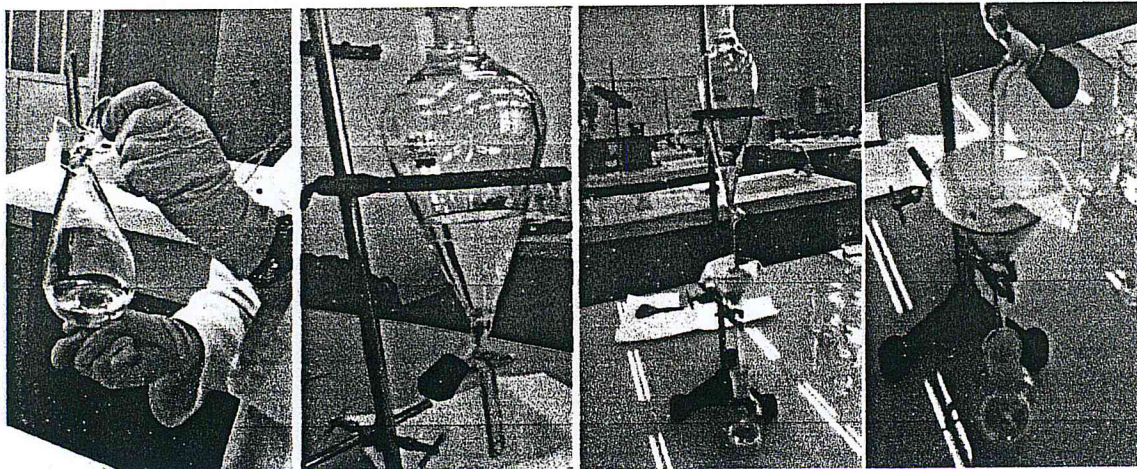
Figure 4 : Montage de l'hydrodistillation

### II.1.3.2 Extraction liquide-liquide de l'huile essentielle

L'hydrolat recueilli est extrait avec un volume d'éther diéthylique, on obtient alors deux phases : une phase organique contenant l'huile essentielle et une phase aqueuse. Cette opération est répétée deux fois afin d'épuiser complètement l'huile essentielle. Les phases organiques obtenues de chaque extraction sont regroupées et filtrées sur du sulfate de magnésium ( $MgSO_4$ ) afin d'éliminer toute traces d'eau (Figure 5). On procède alors à l'évaporation du solvant.

L'huile essentielle ainsi obtenue, est conservée dans des flacons hermétiquement fermés et stocké dans un endroit sombre à 4°C.

La différence de poids des flacons vides et ceux remplis d'huile essentielle constitue la masse de l'huile essentielle.



**Figure 5 : extraction liquide/liquide de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata* et séchage sur du sulfate de magnésium**

### II.1.3.3 Rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle est estimé par le rapport des masses d'huile essentielle et de la matière végétale utilisée. Il est exprimé en pour cent (%) et calculé par la formule suivante :

$$\eta (\%) = \frac{M_{HE}}{M_{MV}} \times 100$$

$\eta$  (%): Rendement en huile essentielle (%)

$M_{HE}$ : Masse de l'huile essentielle (g)

$M_{MV}$ : Masse de la matière végétale utilisée (g)

### II.1.4 Analyses physico-chimiques de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata*

#### II.1.4.1 Mesure des indices physiques

##### II.1.4.1.1 Détermination de la densité

La densité est définie comme étant la masse volumique de l'huile essentielle rapportée à celle de l'eau pour une température donnée. Elle est mesurée à l'aide d'un pycnomètre d'un volume de 10 ml (Figure 6).



Figure 6: Pycnomètre

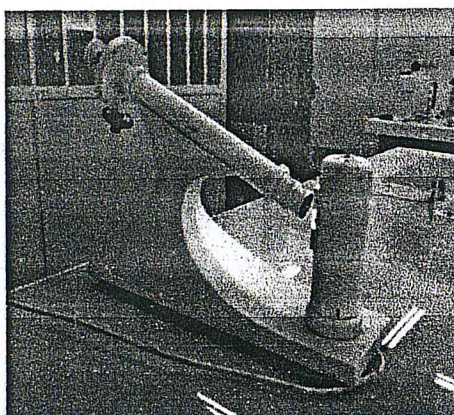
#### II.1.4.1.2 Détermination de l'indice de réfraction (AFNOR NF T75-112:1999)[35]

C'est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante. La mesure a été effectuée en utilisant un réfractomètre (figure 7).



Figure 7: Réfractomètre

#### II.1.4.1.3 Détermination du pouvoir rotatoire (AFNOR NF ISO 592:1999)



C'est l'angle, exprimé en milliradians et/ou degrés d'angle, dont tourne le plan de polarisation d'une radiation lumineuse de longueur d'onde de  $589.3 \text{ nm} \pm 0.3 \text{ nm}$ , correspondant aux raies D du sodium, lorsque celle-ci traverse une épaisseur de 100 mm de l'huile essentielle dans des conditions déterminées de température. Le polarimètre utilisé pour la détermination du pouvoir rotatoire est illustré sur la figure 8.

Figure 8: Polarimètre

#### II.1.4.2 Mesure des indices chimiques

##### II.1.4.2.1 Détermination de l'indice d'acide (AFNOR NF T 75-103:1999)[35]

C'est le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'huile essentielle. Les acides libres sont neutralisés par une solution d'hydroxyde de potassium KOH éthanolique. La figure 9 montre les différentes étapes de la détermination de l'indice d'acide.

L'indice d'acide (IA) est calculé par la relation :

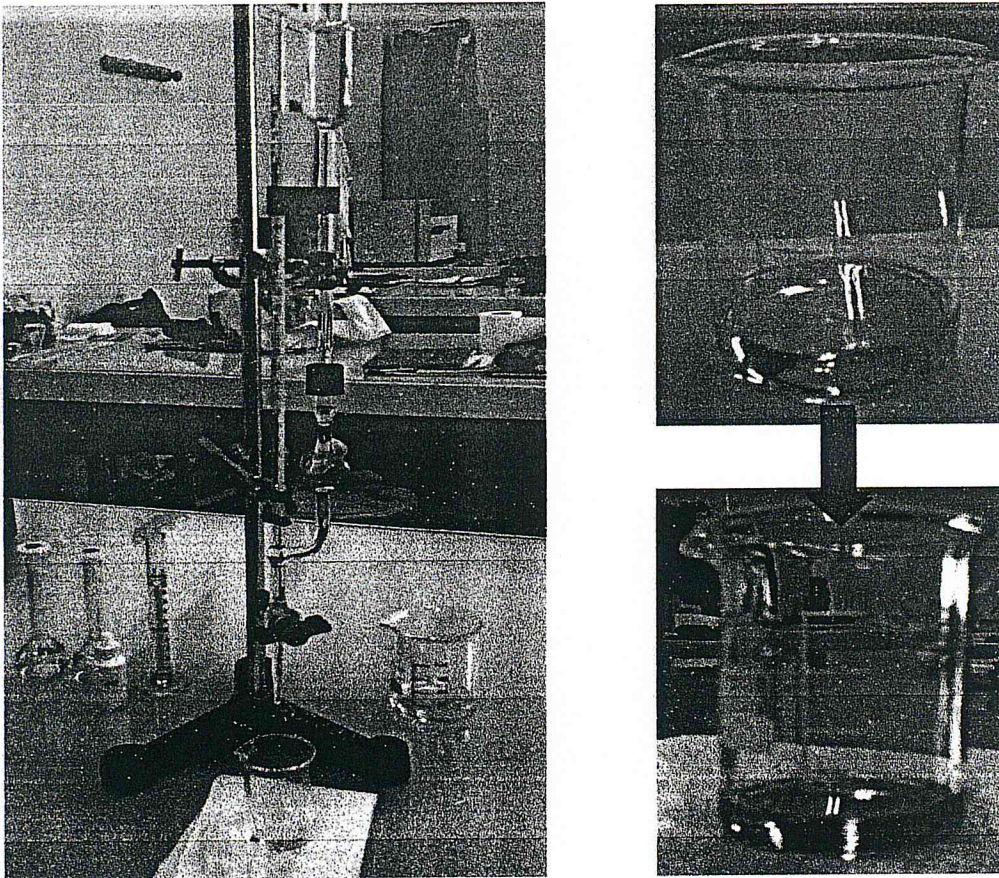
$$IA = V.C. \frac{56,11}{m}$$

IA : indice d'acide

V : est le volume, en ml, de solution de KOH utilisé pour le titrage ;

C : est la concentration exacte, en moles par litres, de la solution de KOH ;

m : est la masse, en grammes, de l'huile essentielle.



**Figure 9: Différentes étapes de la détermination de l'indice d'acide**

### II.1.4.2.2 Détermination de l'indice d'ester (AFNOR NF T 75-104:1994)[35]

C'est le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans 1g d'huile essentielle. L'hydrolyse des esters présents dans l'huile essentielle se fait par chauffage, dans des conditions définies, en présence d'une solution d'hydroxyde de potassium éthanolique et dosage en retour de l'excès d'alcali par une solution d'acide chlorhydrique HCl. La figure 10 illustre les différentes étapes de la détermination de l'indice d'ester.

L'indice d'ester (IE) est donné par la formule suivante :

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

Où :

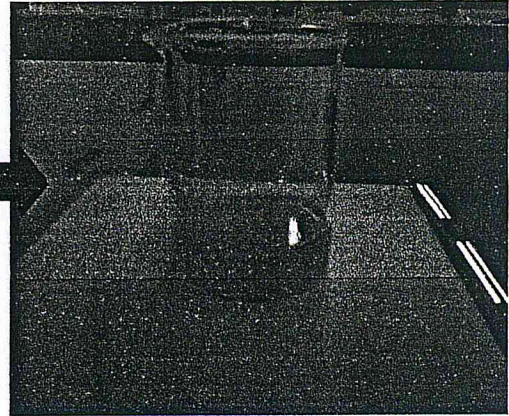
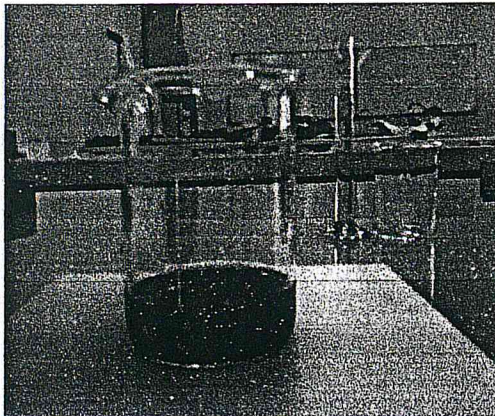
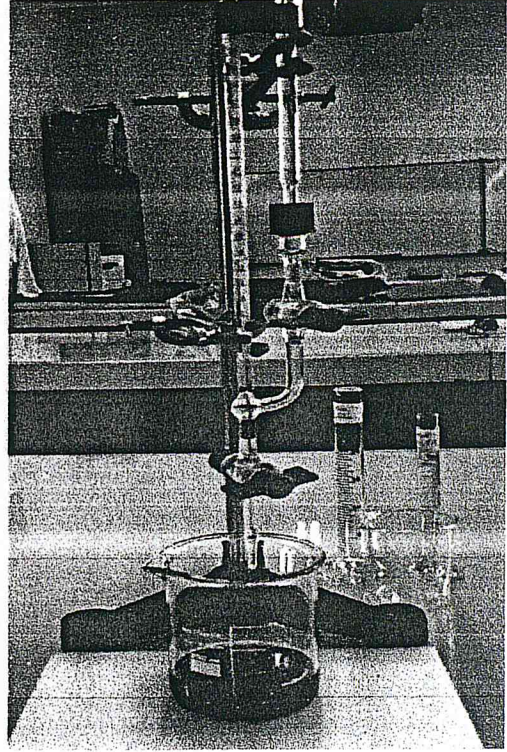
IE : Indice d'ester ;

$V_0$  : est le volume, ml, de la solution de HCl utilisé pour l'essai à blanc ;

$V_1$  : est le volume, ml, de la solution de HCl utilisé pour la détermination ;

m : est la masse, en grammes, de l'huile essentielle ;

IA : est la valeur de l'indice d'acide déterminé selon la norme NF T 75-103



**Figure 10: Différentes étapes de la détermination de l'indice d'ester**

## II.1.5 Analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

### II.1.5.1 Description de l'appareil

L'analyse qualitative de la composition chimique de l'huile essentielle extraite par hydrodistillation a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse « CG-SM » (figure 11). L'identification des différents composés est effectuée en se basant sur les banques de données spectrales Wiley 7n et NBS 75k.l. (comprenant, respectivement, des spectres de masse de 250000 et 75000 molécules), avec un taux de similitude supérieure ou égal à 90%.

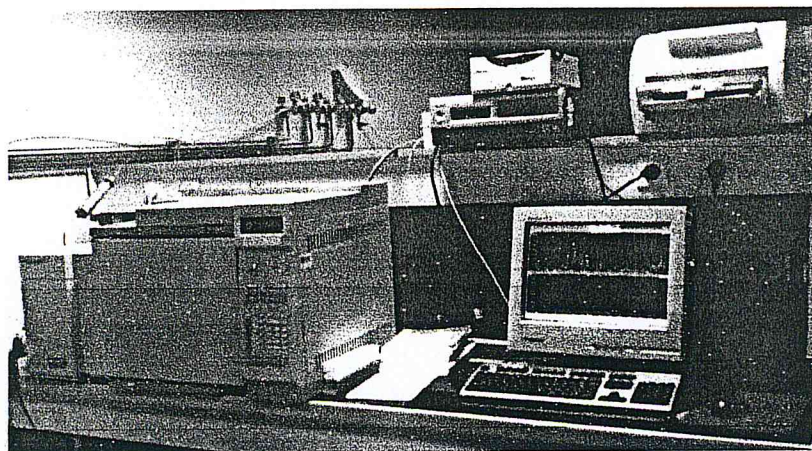


Figure 11: Appareil de chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectroscopie de masse

### II.1.5.2 Conditions opératoires

L'analyse est effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse HEWLETT-PACKARD-HP-6890 couplé à un spectromètre de masse HP 5972, dans les conditions suivantes :

- ✓ Une colonne capillaire de type HP1 (polydiméthylsiloxane 100%), de longueur 30m d'un diamètre interne de 0.25 mm et une épaisseur du film de 0.25  $\mu\text{m}$ .
- ✓ un gaz vecteur (hélium) d'un débit de 0.3 ml/mn.
- ✓ Un potentiel d'ionisation du spectromètre de masse égale a 70 eV.



- ✓ La programmation du four est : 90°C (3') - 2°/mn - 250°C (10') - 10°/mn - 280°C.
- ✓ Injection d'une quantité de 1 µl en mode Split : 1/90.
- ✓ Les échantillons de l'huile essentielle sont dilués dans l'acétate d'éthyle à 1%.

## **II.1.6 Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Tétraclinis articulata***

Cette partie consiste à mettre en évidence le pouvoir antiseptique de l'huile essentielle à l'aide de deux méthodes qualitative et quantitative, en procédant à des tests sur une sélection de souches de référence bactérienne et fongique connues et qualifiées comme étant dangereuses et pathogène pour l'homme et l'animal.

### **II.1.6.1 Etude qualitative de l'effet antimicrobien**

#### **II.1.6.1.1 L'aromatogramme**

L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée « antibiogramme » ou « méthode par diffusion en milieu gélosé » ou encore « méthode des disques ».

Cette méthode a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des antibiotiques testés, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes, et d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiale [36].

Il s'agit d'une méthode en milieu gélosé à l'agar réalisé dans une boîte de pétri (in vitro). Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque absorbant sur lequel on dépose une quantité donnée d'huile essentielle.

#### **➤ Principe :**

La technique consiste à utiliser des disques de papier absorbants stériles (de 9 mm de diamètre) imprégnés d'une quantité d'huile essentielle pure et déposés à la surface d'une gélose inoculée et uniformémentensemencée par la suspension bactérienne à étudier. La diffusion de l'HE à partir du disque au sein de la gélose détermine un gradient de concentration.

Les micro-organismes poussent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'huile essentielle suffisante pour inhiber leur croissance dont on observe après incubation tout autour des disques une zone circulaire claire indemne de colonies, appelée « zone d'inhibition » (Figure 12).

Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'huile essentielle. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante [36].

Cette méthode est tirée du principe du titrage des antibiotiques « pharmacopée européenne 2002 », et son application pour les huiles essentielles a été validée par le département de microbiologie du Centre de Recherche et de Développement SAIDAL, elle a été aussi utilisée par plusieurs auteurs [37, 38, 39,40].

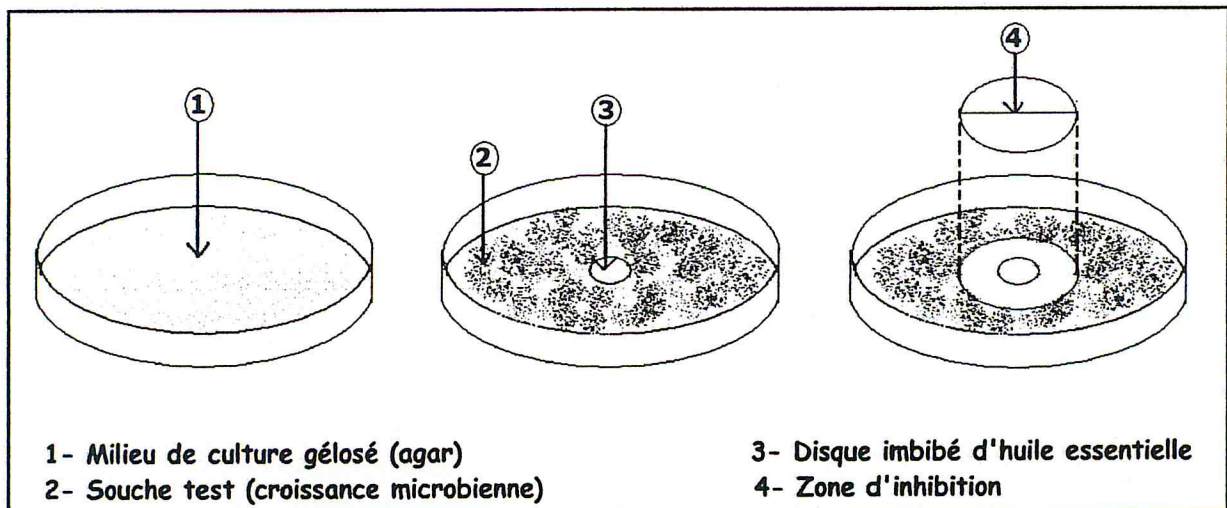


Figure 12 : Illustration de la méthode des antibiogrammes

### II.1.6.1.2 Souches microbiennes choisies

Les souches bactériennes utilisées proviennent de la collection de référence ATCC du laboratoire de microbiologie du Centre de Recherche et de Développement SAIDAL dont le fournisseur est le laboratoire d'antibiothérapie et d'hygiène de l'institut Pasteur d'Alger agréé par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé). Le nombre sélectionné est de 06 : 04 souches bactériennes et 02 levures.

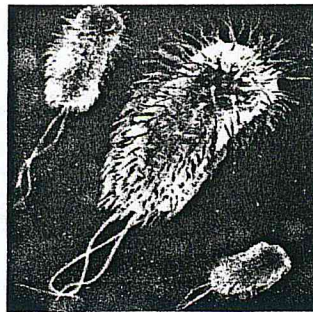
L'essai d'inhibition est réalisé sur des cultures jeunes. La liste des souches est regroupée dans le tableau 2. Les microorganismes testés vus sous microscope sont illustrés dans la figure 13.

**Tableau 2: liste des microorganismes testés**

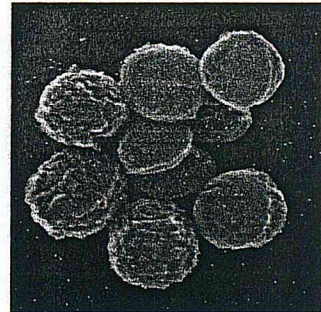
| <b>Bactéries</b>                                  |
|---|
| <i>Staphylococcus aureus</i> (Gram <sup>+</sup> ) |
| <i>Bacillus subtilis</i> (Gram <sup>+</sup> )     |
| <i>Micrococcus luteus</i> (Gram <sup>+</sup> )    |
| <i>Escherichia coli</i> (Gram <sup>-</sup> )      |
| <b>Levures</b>                                    |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                   |
| <i>Candida albicans</i>                           |



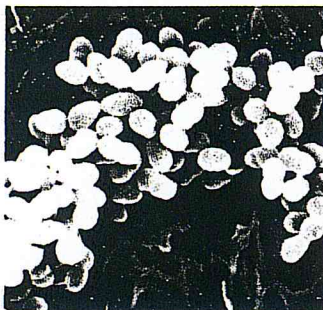
*Bacillus subtilis*



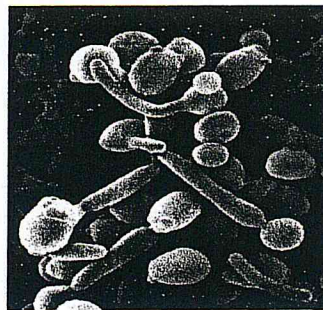
*Escherichia coli*



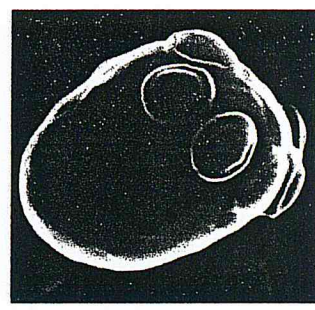
*Micrococcus luteus*



*Staphylococcus aureus*



*Candida albicans*



*Saccharomyces cerevisiae*

**Figure 13 : bactéries et levures vues sous microscope**

### II.1.6.1.3 Protocole expérimental [41]

#### ➤ Préparation de l'inoculum

Les suspensions bactériennes ont été réalisées par prélèvement de 3 à 5 colonies bien isolées et identiques d'une culture jeune de 18h pour les bactéries et 48h pour les levures, les mettre ensuite dans 9 ml d'eau physiologique stérile, puis agiter au vortex pendant quelques secondes.

La lecture de la densité optique est effectuée en utilisant un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620 nm ; et doit être comprise entre 0.22 et 0.32 pour les bactéries sauf pour *Staphylococcus aureus* qui doit être comprise entre 0.3 et 0.4 ; et entre 2 et 3 pour les levures, ce qui correspond à une concentration optimale de  $10^7$  à  $10^8$  germes/ml.

#### ➤ Préparation des milieux de culture

Verser les milieux gélosés déjà liquéfiés dans un bain marie (Muller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les levures) sur des boîtes de pétri à raison de 15 ml par boîte.

#### ➤ Préparation de la deuxième couche du milieu

- Remplir des flacons stériles avec 50 ml de Muller-Hinton pour les bactéries, et avec 50 ml de Sabouraud pour les levures, ceci pour chacune des souches,
- Ensemencer les milieux de culture avec 200  $\mu$ L de chaque suspension,
- Transvaser rapidement 4 ml de chaque milieu inoculé en deuxième couche sur la surface des boîtes contenant déjà la première couche de gélose,
- Etaler rapidement la seconde couche en faisant pivoter la boîte sur elle-même pour avoir une surface uniforme et laisser solidifier sur la paillasse.

#### ➤ Dépôt des disques

Les disques en cellulose stériles, imbibés d'une quantité d'huile essentielle, sont déposés sur la surface de la gélose, puis laisser diffuser sur la paillasse pendant 30 minutes. L'incubation s'effectue à 37°C pendant 24 H pour les bactéries et 25°C pendant 48 H pour les levures.

#### ➤ Lecture

Mesurer le diamètre des zones claires autour des disques (zone d'inhibition) à l'aide d'un pied à coulisse.

## **II.1.6.2 Etude quantitative de l'effet antimicrobien**

Cette étude nous permettra de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI), les concentrations minimales bactéricides (CMB) et les concentrations minimales fongicides (CMF) de la collection de souches testées.

### **II.1.6.2.1 Détermination des CMI**

#### ➤ Principe

Cette méthode a comme principe d'effectuer des dilutions de l'huile essentielle dans le milieu gélosé solide MH pour les bactéries et SAB pour les levures, puis inoculer ce milieu avec les souches testées ; grâce à ces dilutions on pourra définir la plus faible concentration qui inhibera la croissance des microorganismes.

#### **II.1.6.2.1.1 Protocole expérimental**

##### ➤ Préparation de l'inoculum

- A partir des jeunes cultures (18h à 24h pour les bactéries et 48h pour les levures), on réalise des suspensions de  $10^8$  germes/ml pour chaque souche testée,
- Réaliser une série de dilution allant de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ ,
- La dilution utilisée pour la réalisation de la CMI est de  $10^{-4}$  germes/ml.

##### ➤ Préparation de la gamme de dilution de l'huile essentielle. On procède suivant ces étapes :

- Liquéfaction de 200 ml du milieu à  $95^{\circ}\text{C}$  dans un bain marie, en lui additionnant 1 ml de Tween 80,
- Préparation d'une dilution de 1% de l'huile essentielle à tester en diluant 0.5 ml de notre huile essentielle dans 50 ml du milieu,
- Bien homogénéiser le 1<sup>er</sup> flacon puis verser 25 ml de son contenu dans une boîte pétri puis ajouter 25 ml de milieu pour avoir la dilution 0.5% puis continuer ainsi jusqu'à ce qu'on obtienne la dilution 0.015% et laisser solidifier,
- Partager chaque boîte en deux parties :
  - ✓ Ensemencer une partie par spotage à l'aide d'une microseringue de 3  $\mu\text{l}$  de chaque suspension microbienne de la dilution  $10^{-4}$  germes/ml,
  - ✓ Pour la détermination des CMB et CMF, on dépose les disques celluloseux imbibés avec 3  $\mu\text{l}$  des suspensions microbiennes de la dilution  $10^{-4}$  germes/ml,

- Laisser les boîtes sur les paillasses 30 minutes pour la diffusion,
- Incuber à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 25°C pendant 48h pour les levures,
- Préparer les boîtes contenant le milieu MH avec le tween 80.

➤ Lecture

On parlera de CMI là où aucune croissance visible n'est constatée au niveau des spots tout en sachant que la présence d'une ou deux colonies n'est pas prise en considération.

### **II.1.6.2.2 Détermination des CMB/CMF**

Après repérage des disques ou aucune croissance n'est présente lors de la détermination des CMI, l'expérimentation se poursuit en vue de la détermination des CMB et CMF.

Cette partie consiste à déterminer la plus faible concentration en huile essentielle où aucune subcroissance microbienne n'est visible après subculture dans un milieu indemne de l'huile essentielle à 37°C pendant 24 H pour les bactéries et 25°C pendant 48 H pour les levures.

#### **II.1.6.2.2.1 Protocole expérimental**

- Liquéfier les milieux MH pour les bactéries et SAB pour les levures dans un bain marie à 95°C,
- Couler les boîtes de pétri et laisser solidifier,
- Avec une pince stérile, on prélève aseptiquement les disques correspondant aux concentrations de l'huile essentielle où aucune croissance n'est observée pour chaque souche lors de la détermination des CMI,
- On replace les disques dans des boîtes de pétri déjà préparées,
- Incuber à 37°C pendant 24 H pour les bactéries et 25°C pendant 48 H pour les levures,
- On effectue une lecture à l'œil nu, la CMB et CMF sera là où aucune subcroissance d'une souche donnée n'est constatée après subculture,

## Partie 2 : Résultats et Discussions

### II.2.1 Rendement en huile essentielle de *Tetraclinis articulata*

Dans le but d'obtenir une masse d'huile essentielle suffisante pour effectuer toutes les analyses physico-chimiques et microbiologiques, nous avons réalisé une série d'extraction de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata*. La moyenne des rendements obtenus exprimée en pourcentage est de 0.18%. Cette valeur étant supérieure à celle obtenue sur l'espèce d'origine tunisienne (0.13%) et inférieure à celle provenant du Maroc (0.22%).

### II.2.2 Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata*

L'huile essentielle des feuilles de *Tetraclinis articulata* obtenue par hydrodistillation présente les caractères organoleptiques regroupés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata*

| Aspect  | Couleur  | Odeur                          |
|---------|----------|--------------------------------|
| liquide | jaunâtre | très forte odeur<br>balsamique |

### II.2.3 Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata*

Les résultats des analyses physico-chimiques sont donnés par le tableau 4.

Tableau 4 : Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata*

|                      |                |
|----------------------|----------------|
| Densité              | 0.912          |
| Indice de réfraction | 1.487 à 29.7°C |
| Pouvoir rotatoire    | -0.73          |
| Indice d'acide       | 19.01          |
| Indice d'ester       | 25,067         |

## II.2.4 Etude analytique de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

L'huile essentielle de *Tetraclinis articulata* extraite par hydrodistillation a fait l'objet d'une analyse chromatographique.

L'analyse par CG/SM dans les conditions citées auparavant (§II.1.5.2) a permis l'identification des composés regroupés dans le tableau 5. Les profils chromatographiques sont présentés sur les figures 15 et 16.

**Tableau 5 : Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Tetraclinis articulata*.**

| Ordre d'éluion | Nom du composé                              | Formule moléculaire                            | Temps de rétention (min) | % de l'aire |
|----------------|---|--|--------------------------|-------------|
| 1              | Acide isovalérique                          | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>  | 2.391                    | 1,80%       |
| 2              | Acide butanoïque                            | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>  | 2.459                    | 0,34%       |
| 3              | α-pinene                                    | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>                | 3.592                    | 1,92%       |
| 4              | Acide hexanoïque                            | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>  | 4.000                    | 2,03%       |
| 5              | Oxyde de trans-linalol                      | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> | 6.040                    | 0,59%       |
| 6              | Aldéhyde fencholénique                      | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O              | 6.346                    | 0,43%       |
| 7              | linalol                                     | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O              | 6.708                    | 2,06%       |
| 8              | 2,3,3-triméthyl-3-cyclopentene acétaldéhyde | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O              | 7.434                    | 2,80%       |
| 9              | Trans-pinocarveol                           | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O              | 8.125                    | 9,73%       |
| 10             | 2-pinen-4-ol                                | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O              | 8.272                    | 7,11%       |
| 11             | pinocarvone                                 | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O              | 8.623                    | 3,10%       |
| 12             | p-mentha-1,5-dien-8-ol                      | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O              | 8.873                    | 5,86%       |
| 13             | Bornéol                                     | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O              | 9.054                    | 1,01%       |
| 14             | p-cymen-8-ol                                | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O              | 9.235                    | 2,38%       |
| 15             | p-cymene-8-ol                               | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O              | 9.394                    | 2,29%       |



| Ordre d'élution | Nom du composé                   | Formule moléculaire                            | Temps de rétention (min) | % de l'aire |
|-----------------|----------------------------------|--|--------------------------|-------------|
| 16              | Myrtenal                         | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O              | 9.836                    | 3,32%       |
| 17              | 2-pinen-4-one                    | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O              | 10.233                   | 6,99%       |
| 18              | carveol                          | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O              | 10.890                   | 3,04%       |
| 19              | citronellol                      | C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O              | 11.343                   | 1,51%       |
| 20              | Oxyde de acetoxycis-linalol      | C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> | 12.284                   | 0,31%       |
| 21              | Acétate de linalyle              | C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> | 12.522                   | 0,62%       |
| 22              | cyclodecene                      | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub>                | 12.624                   | 0,60%       |
| 23              | Acetate d'isopalegol             | C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> | 13.315                   | 0,32%       |
| 24              | NI*                              | /  | 13.802                   | 0,75%       |
| 25              | 2-Undecanone                     | C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O              | 14.119                   | 2,00%       |
| 26              | Acide α-campholenique            | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> | 14.935                   | 0,70%       |
| 27              | Camphene                         | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>                | 17.032                   | 2,64%       |
| 28              | elemene                          | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 19.717                   | 0,44%       |
| 29              | Caryophyllene                    | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 21.202                   | 0,55%       |
| 30              | α-amorphe                        | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 24.114                   | 0,67%       |
| 31              | β-selinene                       | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 24.601                   | 0,37%       |
| 32              | (+)-Epi-bicyclosquiphellanderene | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 24.828                   | 0,29%       |
| 33              | α-muurolene                      | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 25.417                   | 0,31%       |
| 34              | NI*                              | /  | 25.791                   | 0,65%       |
| 35              | γ-Cadinene                       | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 26.052                   | 0,47%       |
| 36              | Cis-Calamenene                   | C <sub>15</sub> H <sub>22</sub>                | 26.290                   | 2,12%       |
| 37              | Δ-Cadinene                       | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 26.585                   | 2,53%       |
| 38              | Trans-β-farnesene                | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 27.038                   | 0,72%       |
| 39              | Alpha-calacorene                 | C <sub>15</sub> H <sub>20</sub>                | 27.230                   | 0,61%       |
| 40              | elemol                           | C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O              | 27.616                   | 2,01%       |
| 41              | Non identifié                    | /  | 27.922                   | 0,99%       |
| 42              | Oxyde de Caryophyllene           | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O              | 29.316                   | 5,02%       |
| 43              | Cedrol                           | C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O              | 30.324                   | 0,51%       |

| Ordre d'élution | Nom du composé  | Formule moléculaire               | Temps de rétention (mn) | % de l'aire |
|-----------------|---|-----------------------------------|-------------------------|-------------|
| 44              | Humulene epoxyde 2  | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O | 30.630                  | 1,52%       |
| 45              | Iso-spathulenol   | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O | 31.797                  | 0,98%       |
| 46              | cedrene   | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | 31.911                  | 3,42%       |
| 47              | NI*   | /                                 | 32.511                  | 0,51%       |
| 48              | B-Eudesmol  | C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O | 32.840                  | 1,12%       |
| 49              | ([2R-(2.alpha.,4a.alpha.,8a.beta.)]-.alpha.,alpha.,4a,8-Tétraméthyl-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydronaphtalène-2-méthanol) | C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O | 33.112                  | 1,12%       |
| 50              | Oxyde de manoyle  | C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O | 50.180                  | 5,75%       |

\*NI : Non Identifié

L'huile essentielle des feuilles de *Tetraclinis articulata* s'est révélée être très riche puisqu'elle contient plusieurs classes de composés chimiques (figure 14). En effet, son analyse par GC/MS a permis de mettre en évidence 46 composés représentant plus de 96% de la composition globale. Cette dernière est largement dominée par des monoterpènes oxygénés avec 19 composés (54.174%) tel que le Trans-pinocarveol (9.727%) ou le p-mentha-1,5-dien-8-ol (5.858%).

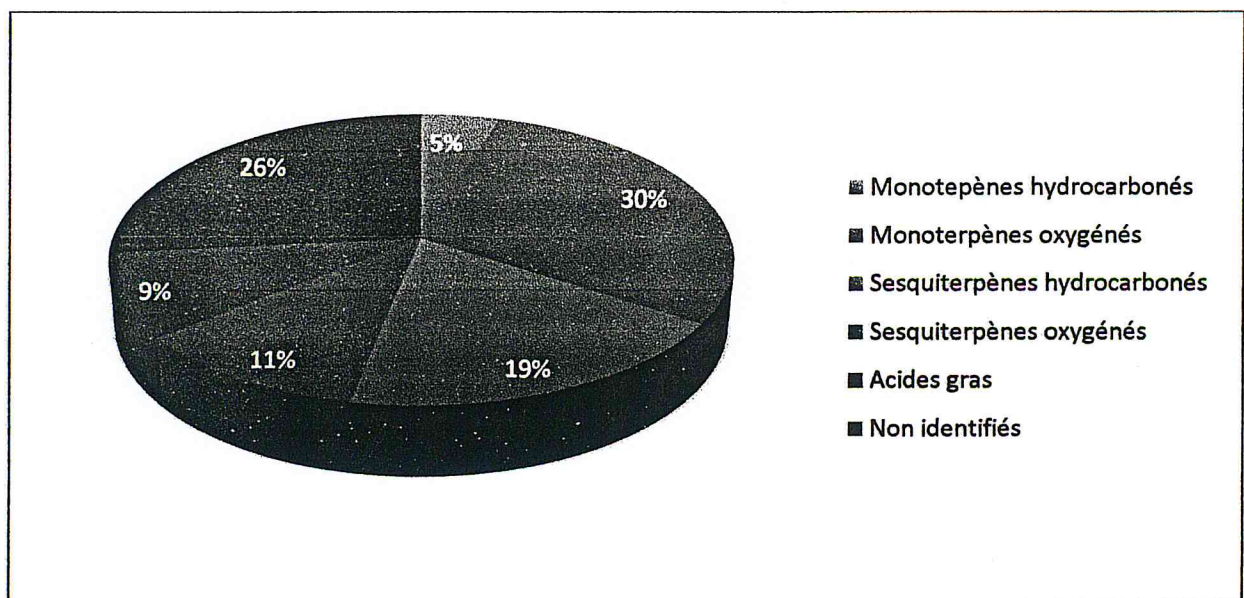
Les sesquiterpènes (hydrocarbonés et oxygénés) occupent une fraction importante, puisqu'ils représentent environ 25%, on peut citer l'oxyde de Caryophyllene (5.018%) ou le cedrene (3.419%). On note également la présence en faible proportion de monoterpènes hydrocarbonés (5.163%) et d'acides gras (6.168%). Nous n'avons enregistré qu'un seul diterpène oxygéné qui est l'oxyde de manoyle (5.753%).

Les spectres de masses des principaux produits, à savoir : l'elemol, le camphene, l'alpha-pinene, le trans-pinocarveol et l'oxyde de manoyle, avec les principales fragmentations sont données respectivement par les figures 17, 18, 19, 20, 21.

Comparée aux huiles essentielles issues du Maroc et de Tunisie, notre échantillon renferme les mêmes familles de composés chimiques, mais pas les mêmes molécules. A titre d'exemple, les produits majoritaires de l'huile essentielle des feuilles de Thuya de Berberie provenant du Maroc sont : l'acétate de bornyle (30,74 %), l' $\alpha$ -pinène (23,54 %) et le camphre (17,27 %)[47], et l'espèce de Tunisie est dominée par le Z-muuroolene (29.03%), le 4,6-dimethyl-octane-3,5-dione (22.42%)[30]. Tandis que, l'huile essentielle de *T.articulata* algérien présente une composition dont les principaux composés sont : le trans-pinocarvéol (9.727%), 2-pinen-4-ol (7.114%) ou le 2-pinen-4-one (6.991%).

Notons aussi que l'huile essentielle des différentes régions compte aussi des composés communs tel que le Camphene, le Bornéol ou encore le Myrtenal.

La composition chimique de l'huile essentielle du Thuya pourrait dépendre de facteurs écologiques et environnementaux et de facteurs génétiques, en accord avec d'autres travaux sur les Cupressacées [32].



**Figure 14 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata***

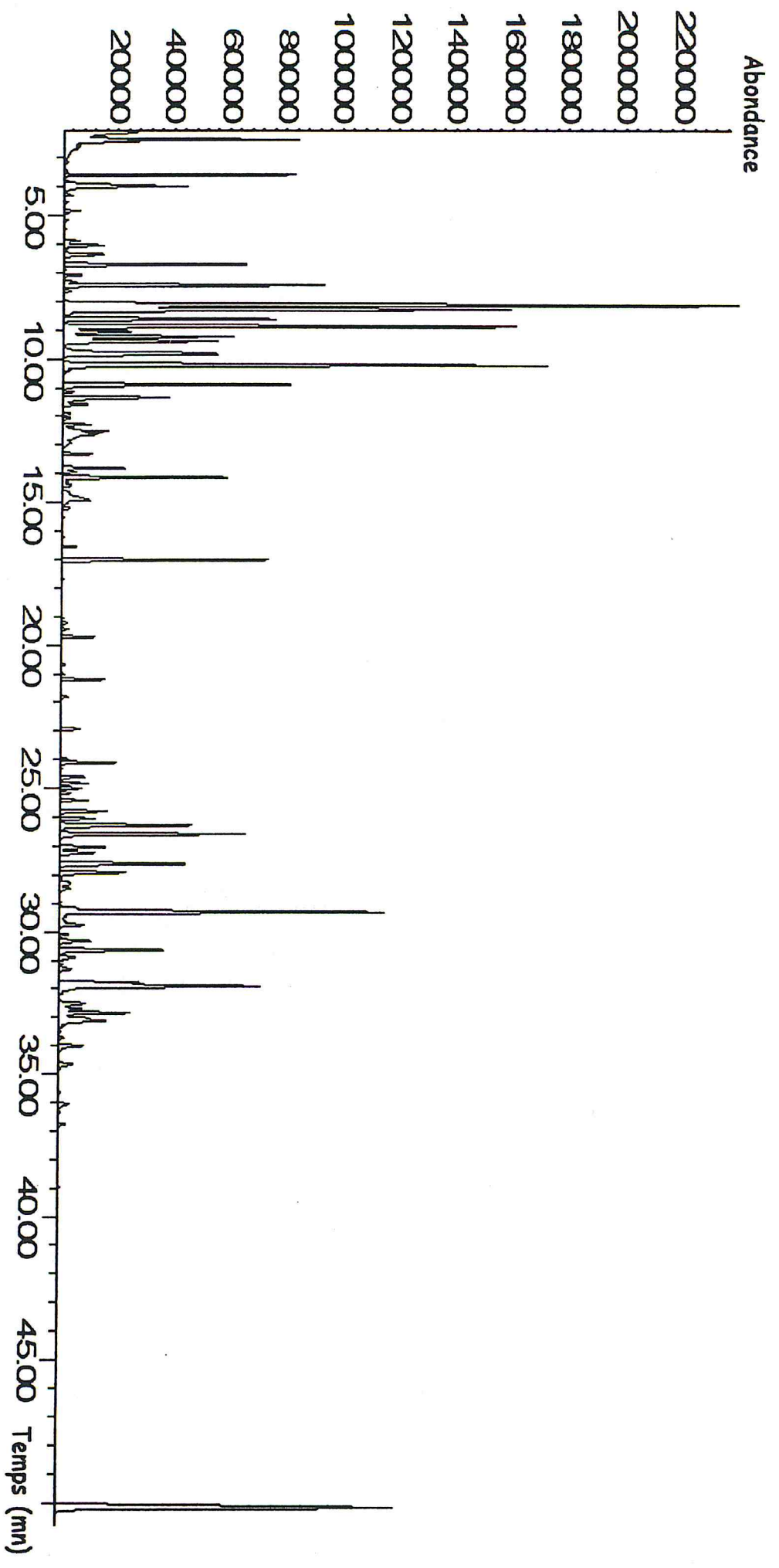


Figure 15: profil chromatographique d'analyse de l'huile essentielle de *Tetractinus articulata*

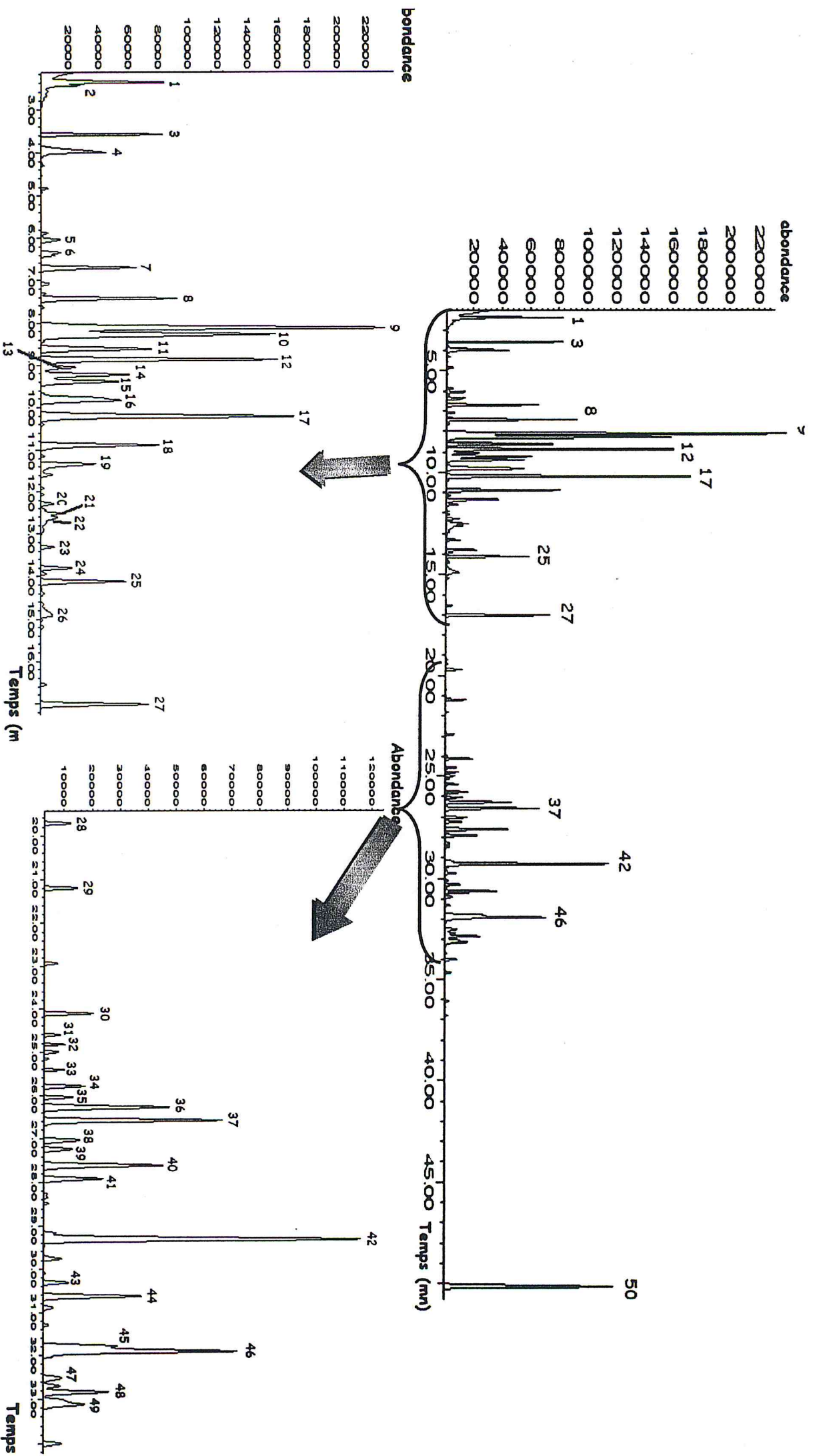


Figure 16: agrandissement et numérotation des pics du chromatogramme de l'huile essentielle de *Tetractinus articulata*

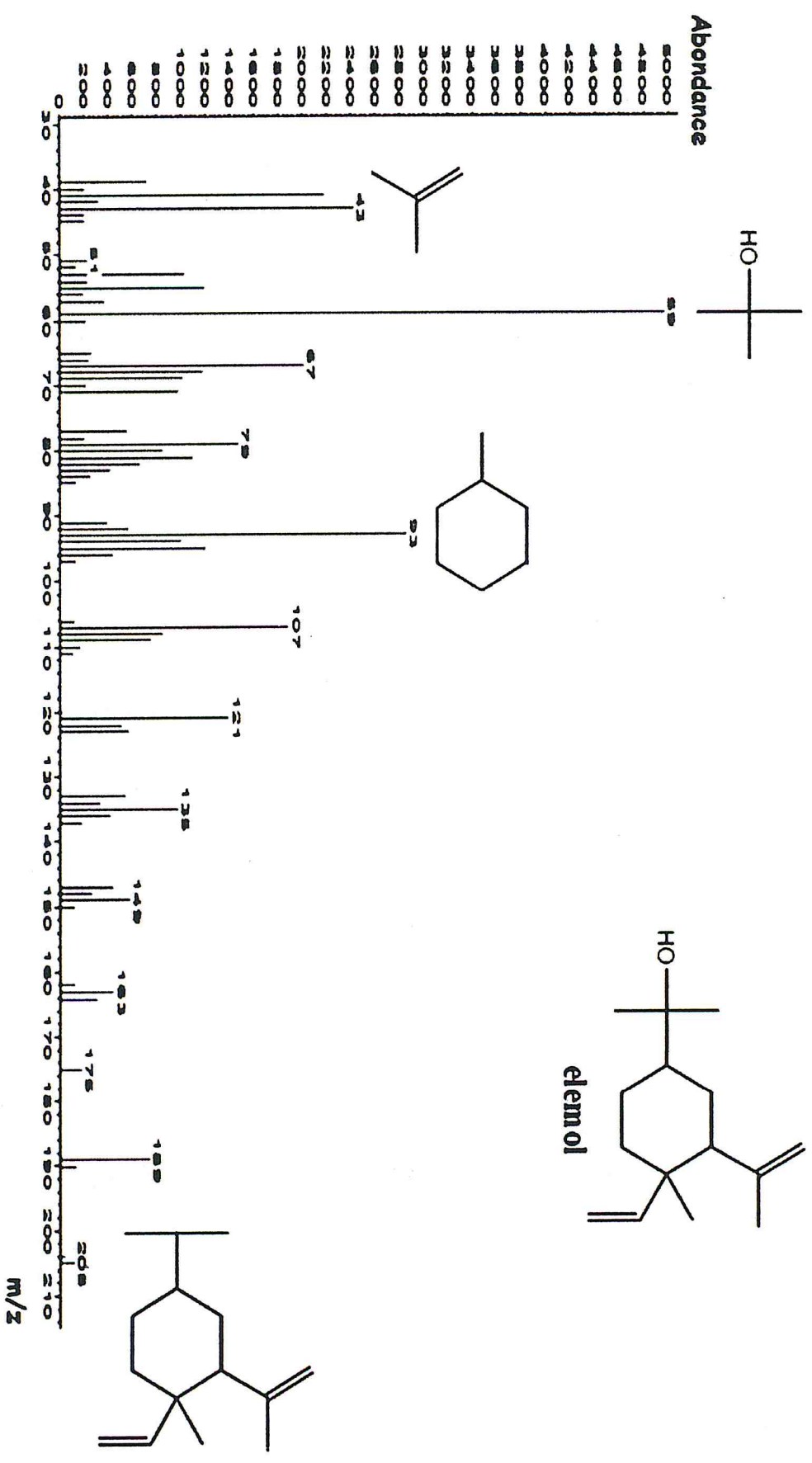


Figure 17: Spectre de masses de elemol  $C_{15}H_{26}O$

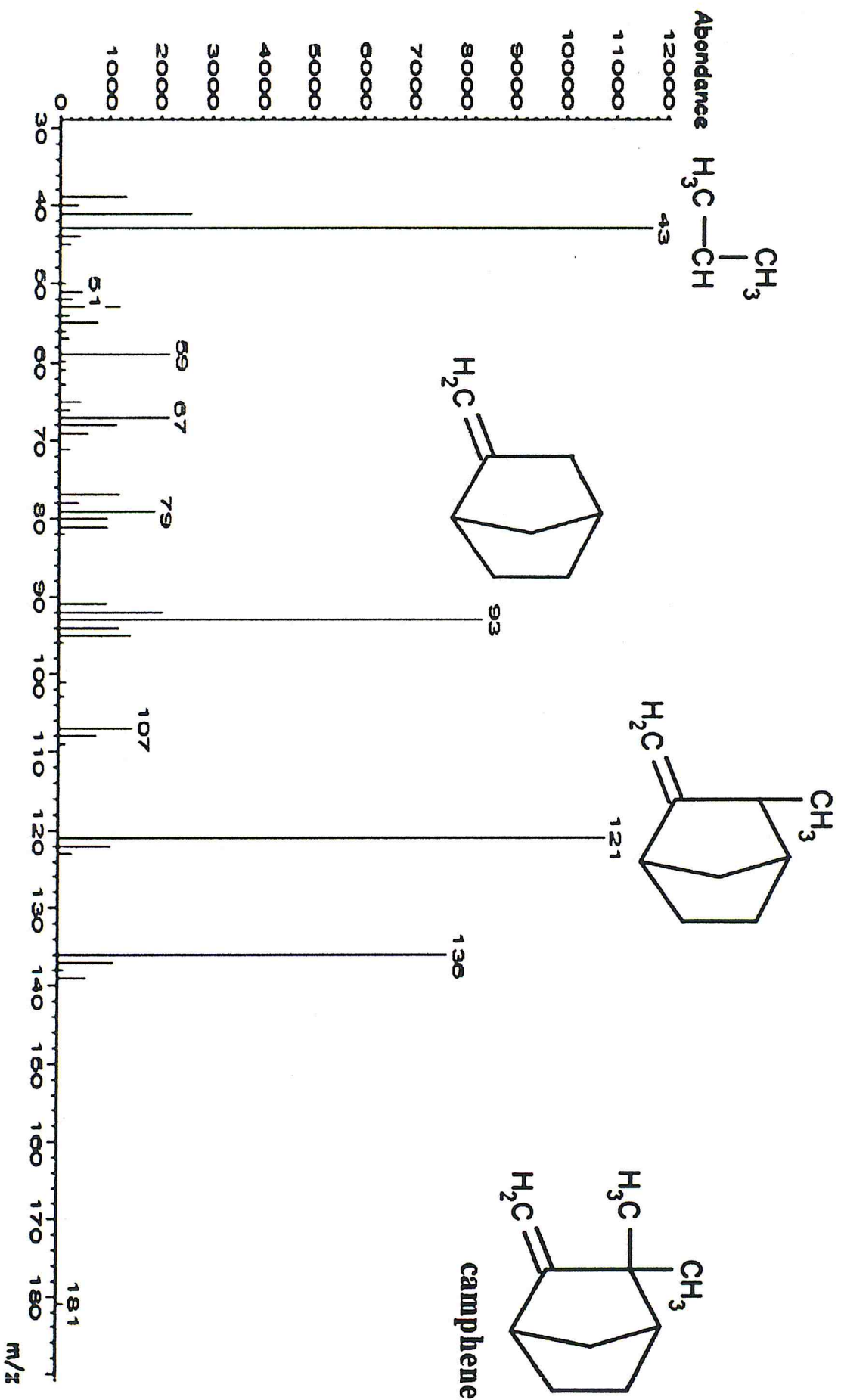


Figure 18: Spectre de masse de camphene C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>

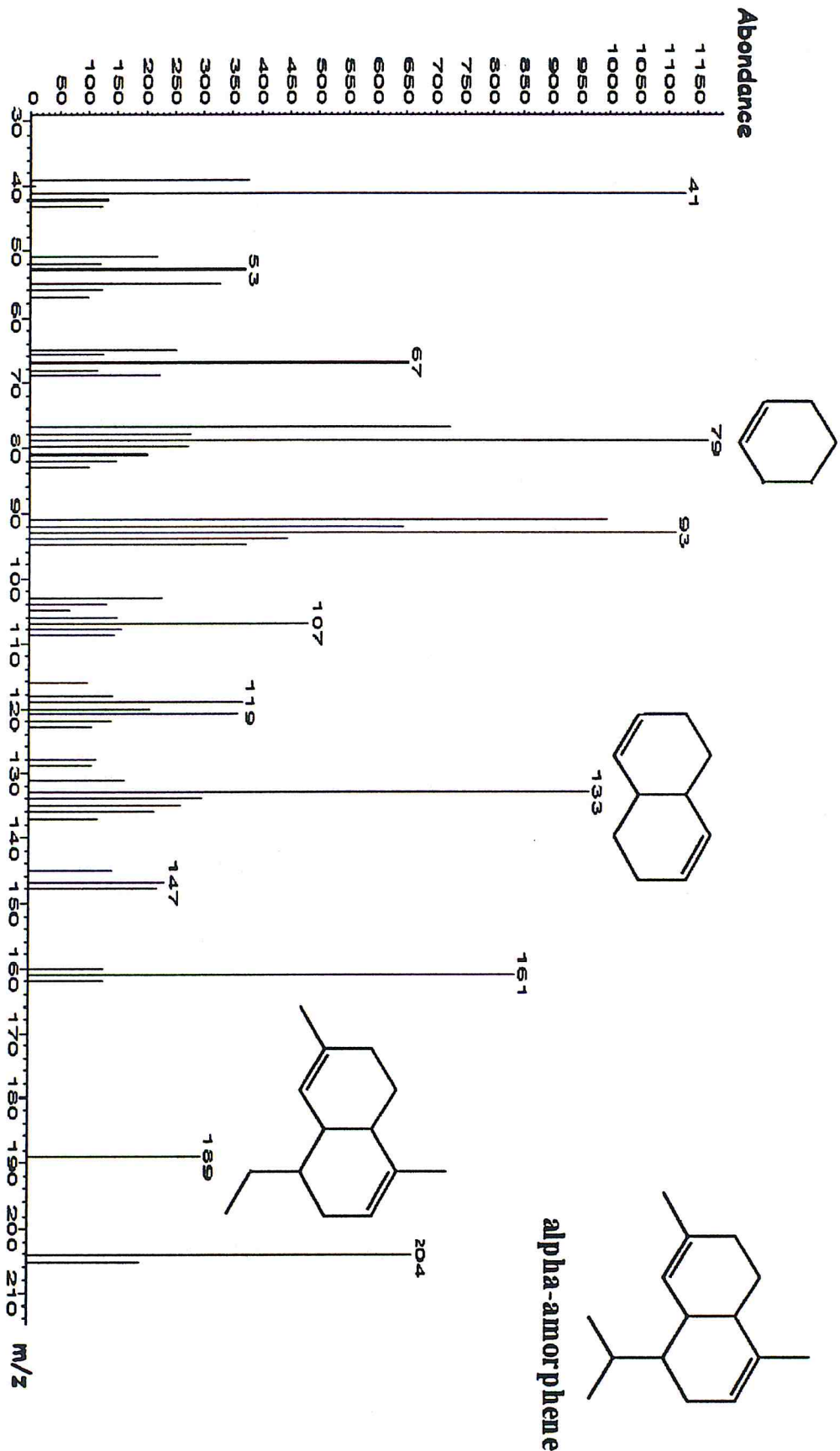


Figure 19: Spectre de masse de alpha-amorphene C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>



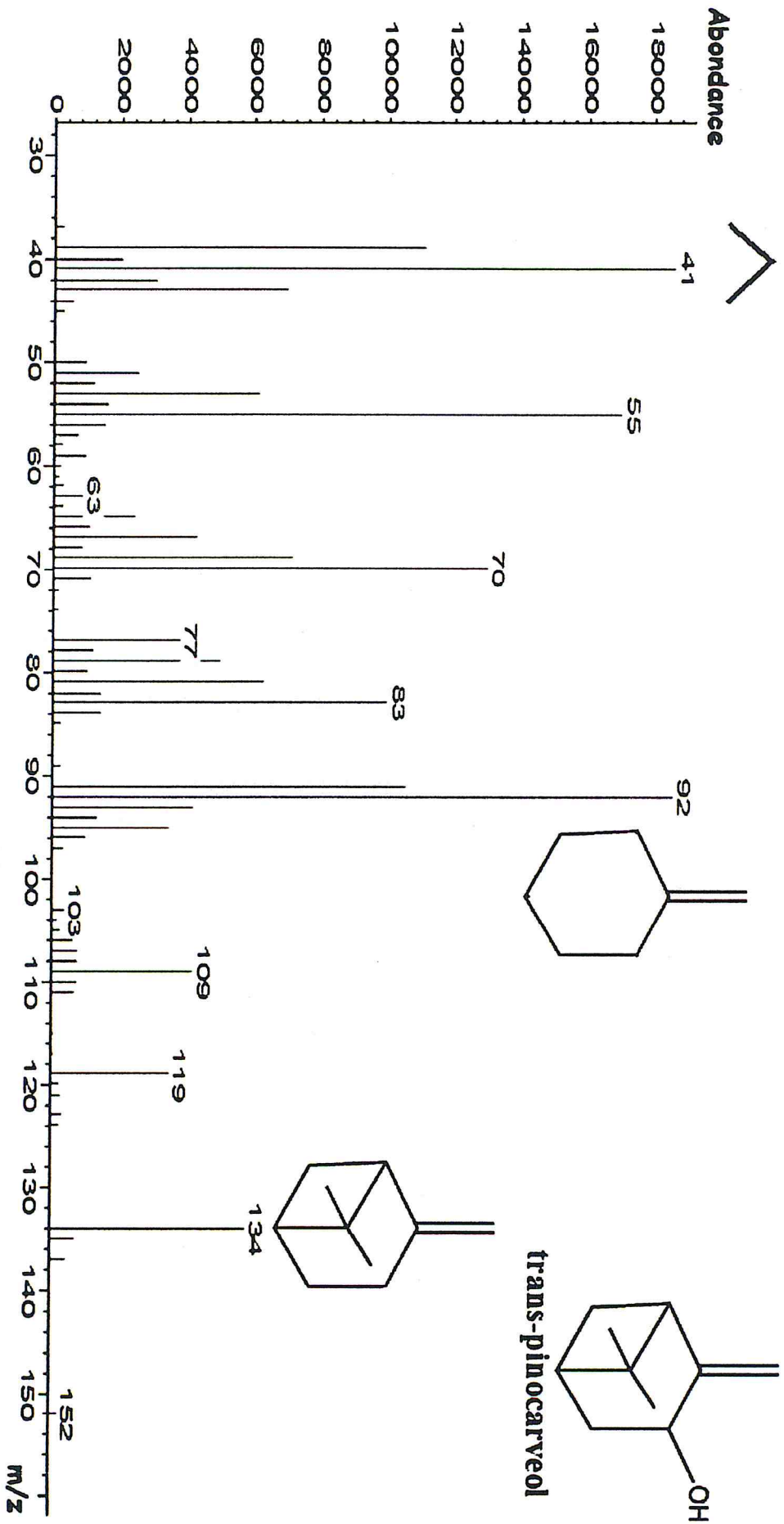


Figure 20: Spectre de masse de trans-pinocarveol  $C_{10}H_{16}O$

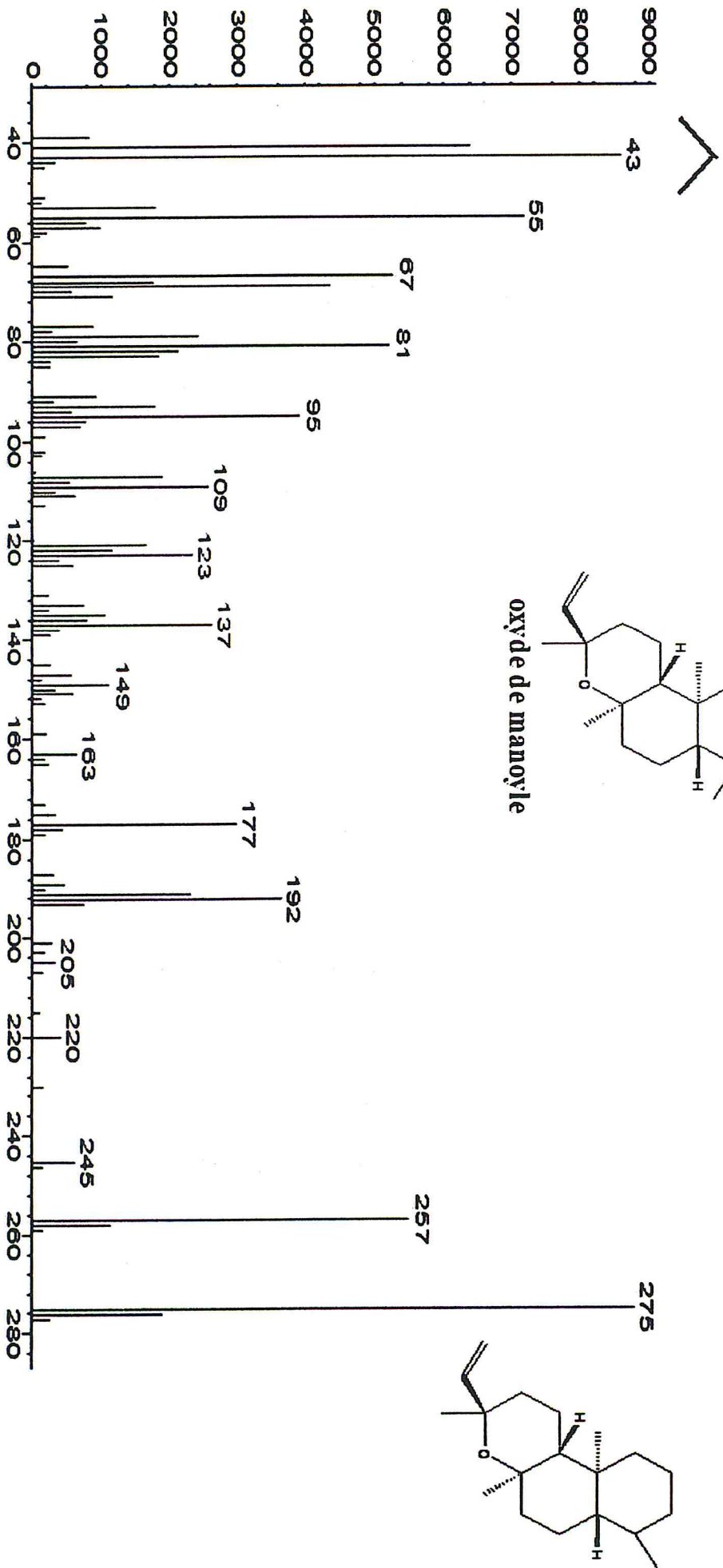


Figure 21: Spectre de masse de l'oxyde de manoyle  $C_{20}H_{34}O$

## **II.2.5 L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata***

### **II.2.5.1 Résultats de l'étude qualitative de l'activité antimicrobienne**

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle est évaluée en fonction du diamètre (mm ou cm) des zones d'inhibition de la croissance microbienne [41].

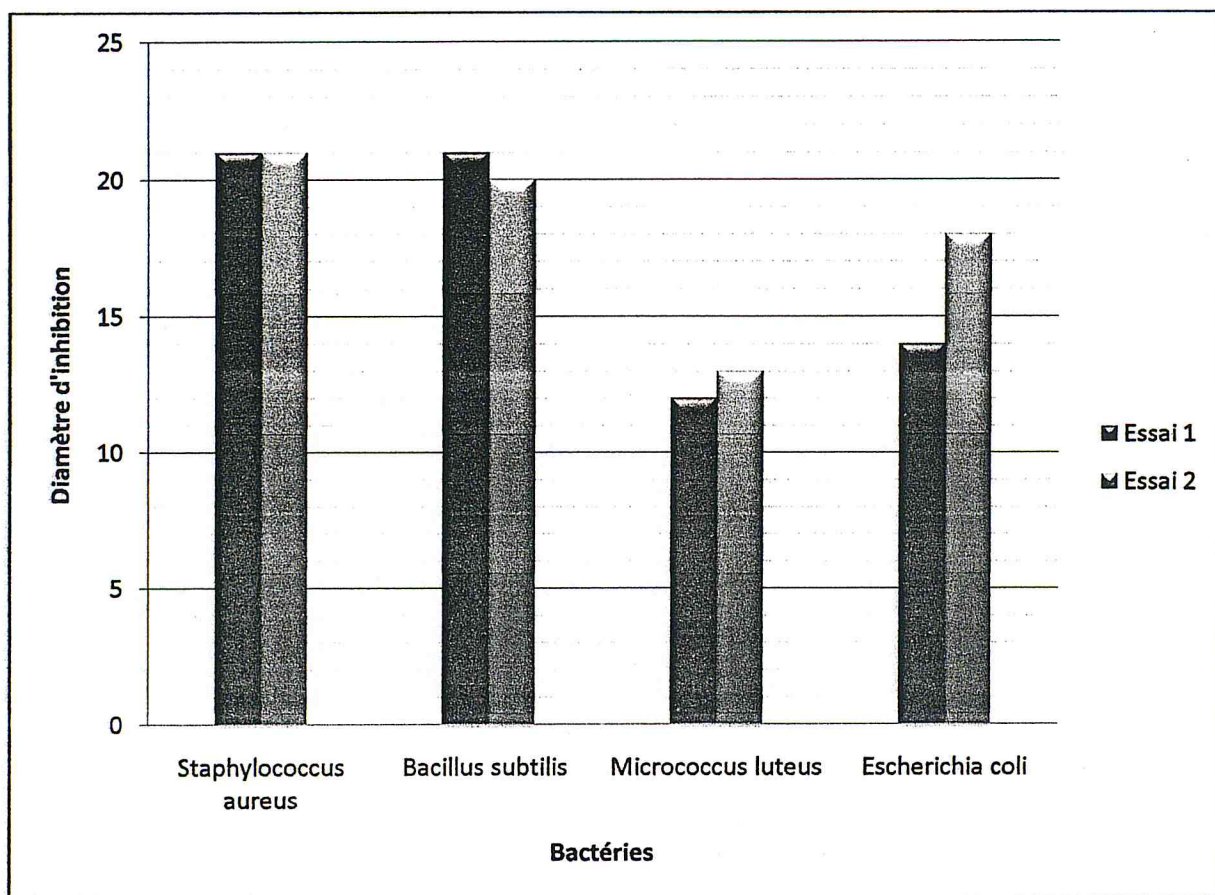
L'estimation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est basée sur une échelle de mesure mise en place par Meena et al. (1994) [42], ils ont classé le pouvoir antimicrobien, en fonction des diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne, en 04 classes :

- Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieure à 28 mm.
- Modérément inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition varie entre 16 et 28 mm.
- Légèrement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition varie entre 10 et 16 mm.
- Non inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est inférieure à 10 mm.

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle des feuilles de *Tetraclinis articulata* obtenus par mesure des diamètres d'inhibition de la croissance des microorganismes sont illustrés graphiquement par la figure 22.

#### **II.2.5.1.1 Détermination des CMI contre les bactéries**

Selon l'échelle de mesure de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles [42], on peut déduire que l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata* a une action modérément inhibitrice sur les bactéries *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli*. Toutefois, elle est légèrement inhibitrice sur la bactérie *Micrococcus luteus*.



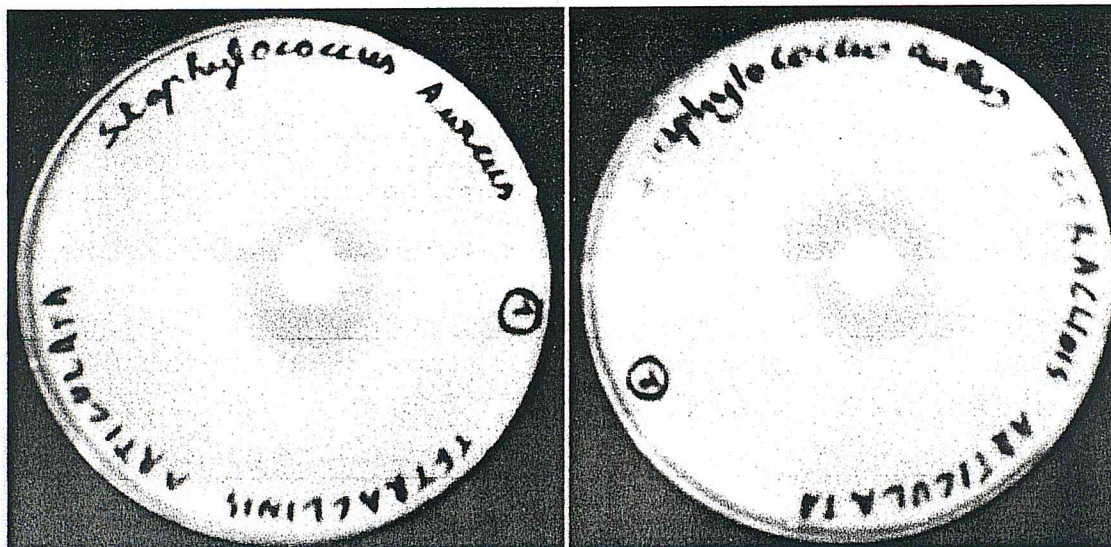
**Figure 22 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition des bactéries**

On peut constater d'après l'histogramme représenté par la figure 22 que parmi les bactéries testées, les souches *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* se sont révélées les plus sensibles envers notre huile essentielle. Contrairement à *Micrococcus luteus* qui s'est avérée légèrement résistante.

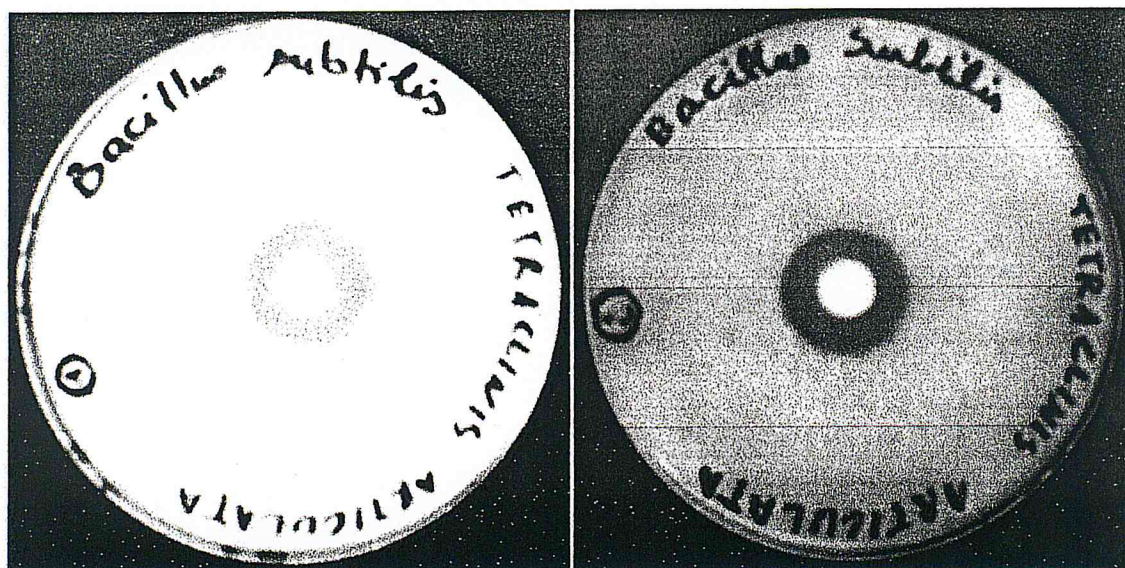
Les figure 23 et 24 montrent les photographies des résultats obtenus sur les boîtes de Pétri de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle testée sur les bactéries après 24 h d'incubation.

Essai 1

Essai 2



Staphylococcus aureus

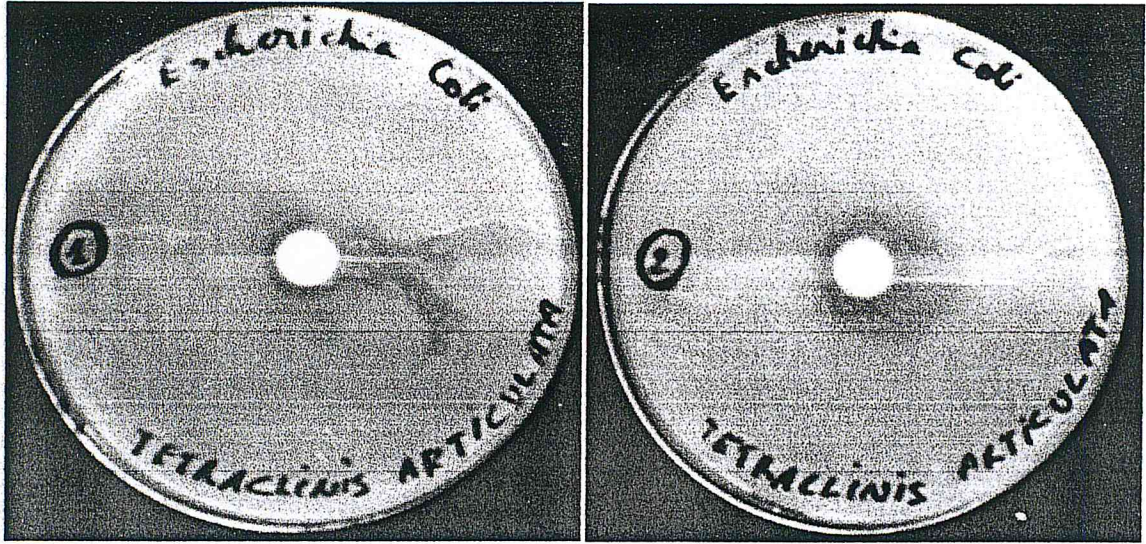


Bacillus subtilis

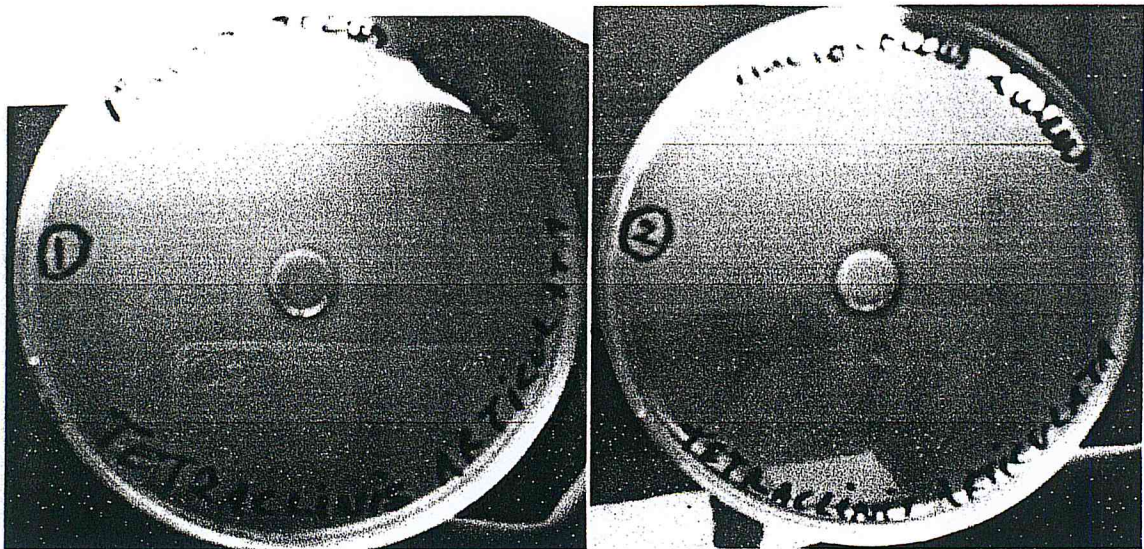
Figure 23 : Zones d'inhibition de l'huile essentielle testée sur *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*

Essai 1

Essai 2



Escherichia coli



Micrococcus luteus

Figure 24 : Zones d'inhibition de l'huile essentielle testée sur *Escherichia coli* et *Micrococcus luteus*

### II.2.5.1.2 Détermination des CMI contre les levures :

D'après les résultats obtenus, et en se référant toujours à l'échelle élaborée par Meena et Sethi, on peut conclure que l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata* a une action modérément inhibitrice sur les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*.

Les diamètres des zones d'inhibitions obtenues dans le cas des levures sont représentés sous forme d'histogramme sur la figure 25

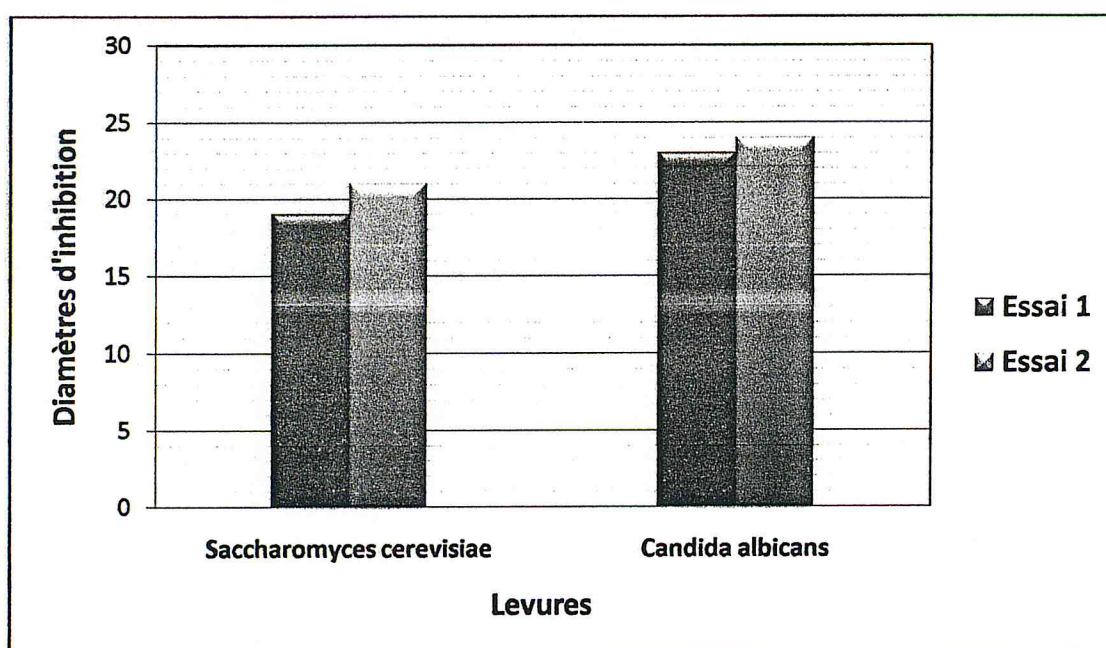


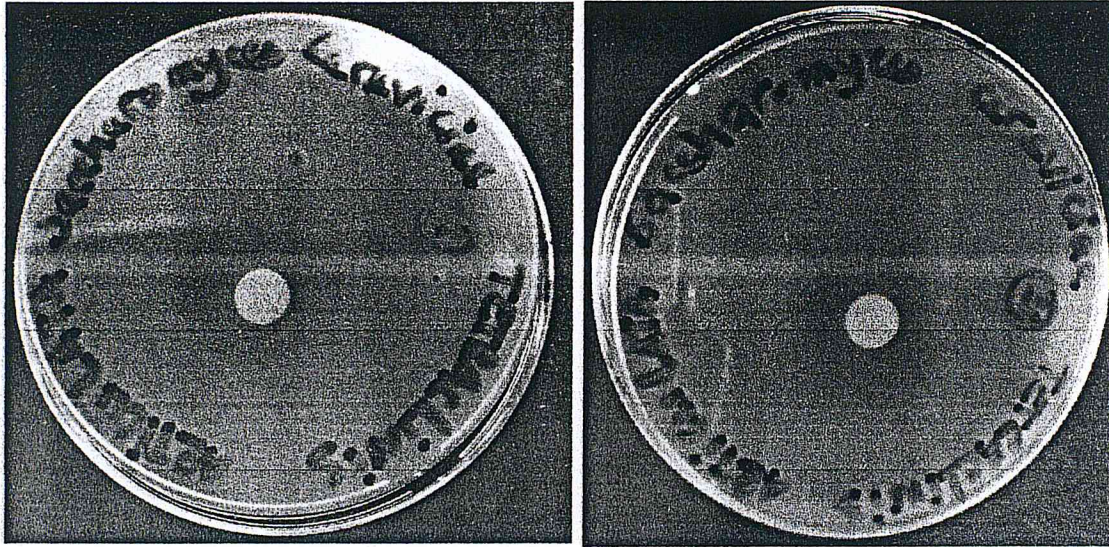
Figure 25 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition des levures

L'histogramme précédent montre lisiblement la sensibilité des levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans* vis-à-vis de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata*.

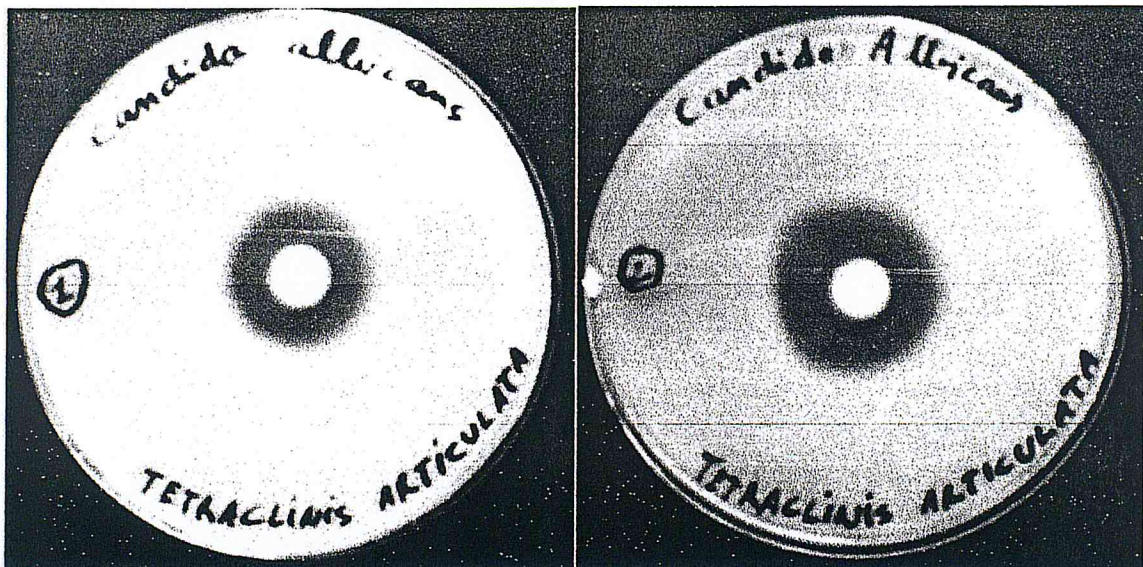
La figure 26 montre les photographies des résultats obtenus sur boîtes de Pétri de l'activité antimicrobienne de notre huile essentielle sur les levures après 48 h d'incubation.

Essai 1

Essai 2



*Saccharomyces cerevisiae*



*Candida albicans*

Figure 26 : Zones d'inhibition de l'huile essentielle testée sur *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*



## II.2.5.2 Résultats de l'étude quantitative de l'activité antimicrobienne

Les valeurs des CMI (concentration minimale inhibitrice), CMB (concentration minimale bactéricide) et CMF (concentration minimale fongicide) de l'huile essentielle étudiée vis-à-vis des souches microbiennes testées sont représentés dans les tableaux suivants :

**Tableau 5 : activité antibactérienne de l'huile essentielle de feuilles de *Tetraclinis articulata***

| Microorganismes |                                 | Concentration en huile essentielle |       |       |        |       |      |    |
|-----------------|---------------------------------|------------------------------------|-------|-------|--------|-------|------|----|
|                 |                                 | 0.015%                             | 0.03% | 0.06% | 0.125% | 0.25% | 0.5% | 1% |
| Bactéries       | <i>Escherichia coli</i>         | +                                  | +     | +     | +      | +     | +    | +  |
|                 | <i>Staphylococcus aureus</i>    | +                                  | +     | -     | -      | -     | -    | -  |
|                 | <i>Bacillus subtilis</i>        | +                                  | -     | -     | -      | -     | -    | -  |
|                 | <i>Micrococcus luteus</i>       | +                                  | +     | +     | +      | +     | -    | -  |
| Levures         | <i>Candida albicans</i>         | +                                  | +     | +     | +      | +     | -    | -  |
|                 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | +                                  | +     | +     | +      | -     | -    | -  |

(+) : croissance (-) : inhibition

**Tableau 6 : Valeurs des CMI, CMB et CMF (en%) de l'huile essentielle contre les différentes souches bactériennes testées**

|                                 | CMI (%) | CMB/CMF (%) |
|---------------------------------|---------|-------------|
| <i>Escherichia coli</i>         | >1%     | >1%         |
| <i>Staphylococcus aureus</i>    | 0.06%   | 0.125%      |
| <i>Bacillus subtilis</i>        | 0.03%   | 0.5%        |
| <i>Micrococcus luteus</i>       | 0.5%    | 0.5%        |
| <i>Candida albicans</i>         | 0.5%    | >1%         |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 0.125%  | 0.5%        |

D'après les tableaux 5 et 6, on constate que :

- Les CMI et CMB/CMF obtenues varient en fonction des souches testées.
- Toutes les souches se sont inhibées à des concentrations comprises entre 0.03% et 0.125% excepté *Escherichia coli* qui nécessite une concentration supérieure à 1%.
- Contrairement à toutes les souches testées, *Escherichia coli* s'est montré comme étant la bactérie la plus résistante avec une CMI et une CMB supérieure à 1%.
- La plus faible CMI enregistrée est de 0.03% obtenue avec *Bacillus subtilis* qui s'est avéré la plus sensible par rapport aux souches testées (voir annexe).

### II.2.5.3 Discussion des résultats de l'activité antimicrobienne

L'ensemble des souches testées dans notre étude ont montré un degré de sensibilité non négligeable à notre huile essentielle et ont subi une action bactériostatique et bactéricide/fongicide mais à des concentrations différentes, excepté *Escherichia coli* qui s'est montré relativement plus résistante. Le résultat obtenu avec cette dernière, rejoint celui déjà trouvé en testant l'effet de l'huile essentielle de *T. articulata* issu du Maroc sur plusieurs souches microbiennes [31].

Parmi les bactéries testées, la Gram<sup>+</sup> *Bacillus subtilis* s'est avérée la plus sensible à l'action de notre huile essentielle avec une CMI de 0.03% et une CMB de 0.5%, alors que le *T. articulata* d'origine marocaine montre une forte activité sur *Staphylococcus aureus*[31].

Dans notre étude, l'huile essentielle a montré une meilleure activité sur les bactéries de Gram<sup>+</sup> que celle de Gram<sup>-</sup>. Ce résultat confirme les recherches de Marino et al. [43] et Mangena et Muyima [44] qui ont signalé que les bactéries Gram<sup>+</sup> sont plus sensibles aux huiles essentielles que les bactéries Gram<sup>-</sup>.

La faible sensibilité des bactéries Gram<sup>-</sup> à l'action des huiles essentielles serait due à la présence d'une seconde membrane qui possède des chaînes hydrophiles de polysaccharides (LPS) jouant un rôle de barrière vis-à-vis des huiles essentielles qui ont un caractère hydrophobe[45, 46,47].

D'autres travaux [48, 49] sont en désaccord avec ce rapport, car il est très difficile de généraliser ces résultats parce que chaque huile essentielle est unique dans sa composition et chaque bactérie Gram<sup>+</sup> diffère considérablement en structure et fonctionnalité.

L'importante action antibactérienne démontrée par l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata* est en relation avec sa teneur en monoterpènes oxygénés (Trans-pinocarveol, 2-pinen-4-ol, p-mentha-1,5-dien-8-ol...ect.) qui sont réputés pour avoir une grande action antibactérienne. Pris à l'état pur, ils sont aussi considérés comme étant des composés chimiques très efficaces et dotés d'un large spectre d'activité antimicrobienne comparable aux composés phénoliques tel que le carvacrol ou le thymol [50].

## CONCLUSION

Le présent travail est consacré à l'extraction par hydrodistillation, l'étude de la composition chimique de par CG/SM ainsi que la détermination des activités antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata* provenant de la région de Djelfa (Algérie).

Le rendement moyen en huile essentielle est 0,18 %. L'analyse chimique, par CG/SM, a permis d'identifier environ 96 % de la composition globale. Le trans-pinocarveol (9.727%), le 2-pinen-4-ol (7.114%), le 2-pinen-4-one (6.991%) et le p-mentha-1,5-dien-8-ol (5.858%), constituent les principaux composés identifiés parmi les quarante six caractérisés. L'huile essentielle est dominée par les monoterpènes (pinocarvone 3.1%,  $\alpha$ -pinen 1.917%) et les sesquiterpènes (camphene 2.643%, oxyde de Caryophyllene 5.018%). Nous avons également relevé la présence d'un diterpène qui est l'oxyde de manoylé (5.753%).

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que l'huile essentielle des feuilles de *Tetraclinis articulata* présente une activité assez importante, *in vitro*, sur les quatre bactéries et deux levures testés. Elle serait due principalement à sa richesse en monoterpènes oxygénés qui sont bien connus pour leurs propriétés antimicrobiennes.

Les performances antibactérienne et antifongique mises en évidence ainsi que d'autres activités biologiques méritent d'être étudiées avec plus de détails afin d'envisager des perspectives d'application plus larges de cette essence.

En vue de la valorisation de cette espèce, il convient d'envisager une étude plus approfondie, tel que l'étude saisonnière et géographique et leur influence sur sa diversité chimique. Également, on peut envisager l'étude chimique des extraits lipidiques afin d'isoler des structures originales, éventuellement bioactives.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Piolé N., Se soigner grâce aux Huiles essentielles, Ed. City, 288 pages, (2010).
2. Grosjean N., Huiles essentielles Se soigner par l'aromathérapie, Ed. Eyrolles, 192 pages, (2004).
3. Dobbertin M. K. et Häne K., Les arbres en question, La Forêt, 20 pages, (2006).
4. Achhal A., Barrero M., Ech-Chamikh S., Productivité du thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters) dans le bassin versant du N'fis, Ecologia Mediterranea, Tome XI, Fascicule 2/3, (1985).
5. Haddad A., Lachenal D., Marechal A., Kaid-Harche M. et Janin G., Caractéristiques papetières de la pâte de bois de thuya de Berberie (Algérie) (*Tetraclinis articulata* Vahl) obtenue par un procédé soude-anthraquinone, For. Sci 63: 493–498, (2006).
6. Touayli J., Valorisation des sous-produits du thuya de Berberie (*Tetraclinis articulata* Vahl) du Maroc, Mémoire 3ème Cycle, Université de Rabat, Maroc, (2002).
7. Ziyat A., Legssyer A., Mekhfi H., Dassouli A., Serhrouchni M., et Benjelloun W., Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco, J. Ethnopharmacol 58: 45–54, (1997).
8. MEYER M. et al., The Oligocene Bridge Creek flora of the John Day Formation, the Geological Sciences, 141:1-195, (1997).
9. Hadjadj Aoul S., Chouieb M. & Loisel R., Effet des facteurs environnementaux sur les premiers stades de la régénération naturelle de *Tetraclinis articulata* (Vahl, Master) en Oranie, Ecologia mediterranea, 35:19-31, (2009).
10. Benabid A., Étude sylvo-pastorale de la tétraclinaie de l'Amsittène (Maroc), Ecologia Mediterranea, 3:125, (1977).
11. Frank White, La végétation de l'Afrique, Ed. ORSTOM, p384, (1986).
12. Boudy P., Économie Forestière Nord Africaine, Monographie et traitement des essences forestières, Fascicule I, Ed. Larose, p878, (1950).
13. Alejandro F. Barrero et al., Diterpenoids from *Tetraclinis articulata* that Inhibit Various Human Leukocyte Functions, J. Nat. Prod., 66:844-850, (2003).

14. Joseph-Nathan P., Santillan R. L., Gutierrez A.,  $^{13}\text{C}$  nmr study of cedrol, 6-isocedrol and  $\alpha$ -cedrene, *J. Nat. Prod.*, 47: 924-933, (1984).
15. Tomita B.; Hirose Y., acoradiene and acorenol, key intermediates of cedrane group sesquiterpenoid, and their transformation into (-)- $\alpha$ -cedrene, *Tetrahedron Lett.*, 10: 143-144, (1970).
16. Fang, J. M.; Sou, Y. C.; Chiu, Y. H.; Cheng, Y. S., diterpenes from the bark of *Juniperus chinensis*, *Phytochemistry*, 34: 1581-1584, (1993).
17. Chow Y. L.; Erdtman H., Totarolone, a new diterpene ketophenol from heartwood of *Tetraclinis articulata*, *Acta Chemica Scandinavica*, 8-1852-1853, (1960).
18. Antkowiak W., Apsimon J. W., Edwards, O. E., structure of isopimaric acid, *J. Org. Chem.*, 27: 1930-1931, (1962).
19. Apsimon J. W., Edwards O. E., sandarac acids: 6 $\beta$ -Hydroxysandaracopimaric acid *Can. J. Chem.*, 39: 2543-2548, (1961).
20. Fang J. M., Lee C. K., Cheng Y., diterpenes from Leaves of *Juniperus chinensis*, *Phytochemistry*, 33: 1169-1172, (1993).
21. Zavarin E., Anderson A. B. J., extractive components from incense-cedar heartwood (*Libocedrus decurrens* Torrey). II. Occurrence and synthesis of p-methoxythymol and p-methoxycarvacrol, two new phenolic compounds, *J. Org. Chem.*, 20: 443-447, (1955).
22. San Feliciano A., Miguel del Corral J. M., Gordaliza M., Castro A., Lignans from *Juniperus sabina*, *Phytochemistry*, 29: 1335-1338, (1990).
23. Ying B. P., Kubo I., complete  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR assignments of totarol and its derivatives, *Phytochemistry*, 30:1951-1955, (1991).
24. Doi K., Shiyuba T., Diterpenes of *Juniperus conferta*, *Phytochemistry*, 11:1175, (1972).
25. Smith J. A., Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword, *J. Leukoc. Biol.*, 56:672-686, (1994).
26. Laskin D. L.; Pendino K. J., Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 35:655-677, (1995).
27. Buhagiar J., Camilleri Podesta M. T., Cioni P. L., Flamini G. et Morell I., Essential oil composition of different parts of *Tetraclinis articulata*, *J. Essent. Oil Res.*, 12: 29-32, (2000).
28. Ait Igri M. M., Holeman A., Ildrissi Berrada M., contribution to the essential oil chemical study of *Tetraclinis articulata* terminal branches and wood, *Plant. Med. Phytothér.*, 24: 36-43 (1990).

29. Barrero A.F., Herrado M.M., Arteaga P.Q., Lez J., Ahssira M., Mellouki F., Akkad S., Chemical composition of the essential oils of leaves and wood of *Tetraclinis articulata* (Vahl.) masters, 17: 166-168, (2005).
30. Tékaya-Karoui A., Ben Jannet H., Mighri Z., Essential oil composition of terminal branches, cones and roots of *Tetraclinis articulata* from Tunisia, Pakistan Journal of Biological Sciences, 10:2495-2499, (2007).
31. Bourkhiss M., Hnach M., Paolini J., Costa J., Chaouch A., composition chimique des huiles essentielles de la sciure de bois et de feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters du Maroc, Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, 78:281-289, (2009).
32. Bourkhiss B., Ouhssine M., Hnach M., Bourkhiss M., Satrani B., Farah A., composition chimique et bioactivité de l'huile essentielle des rameaux de *tetraclinis articulata*, Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 146:75-84, (2007).
33. Bourkhiss M., Hnach M., Lakhlifi T., Bourkhiss B., Ouhssine M., Satrani B., production et caractérisation de l'huile essentielle de la sciure de bois de *tetraclinis articulata* (vahl) masters, Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, 79:4-11, (2010).
34. Bourkhiss M., Hnach M., Paolini J., Costa J., Farah A., Satrani B., propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles des différentes parties de *Tetraclinis articulata* (vahl) masters du Maroc, Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, 79:141-154, (2010).
35. AFNOR, Recueil de normes: les huiles essentielles. Tome 2. Monographies relatives aux huiles essentielles, AFNOR, 661-663, (2000).
36. Fauchère J.-L., Avril J.-L., Bactériologie générale et médicale, Ed. Ellipses, 365 pages, (2002).
37. Deans S.G. et Ritchie G., Antibacterial properties of plant essential oils, International Journal of Food Microbiology, 5:165–180, (1987).
38. Carson C.F. et Riley T.V., Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*, Journal of applied bacteriology, 78:264-269, (1995).
39. Faleiro M. L., Miguel M. G., Ladeiro F., Venancio F., Tavares R., Brito J. C., Figueiredo A. C., Barroso J. G. et Pedro L. G., Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of Thymus, Letters in Applied Microbiology, 36:35–40, (2003).

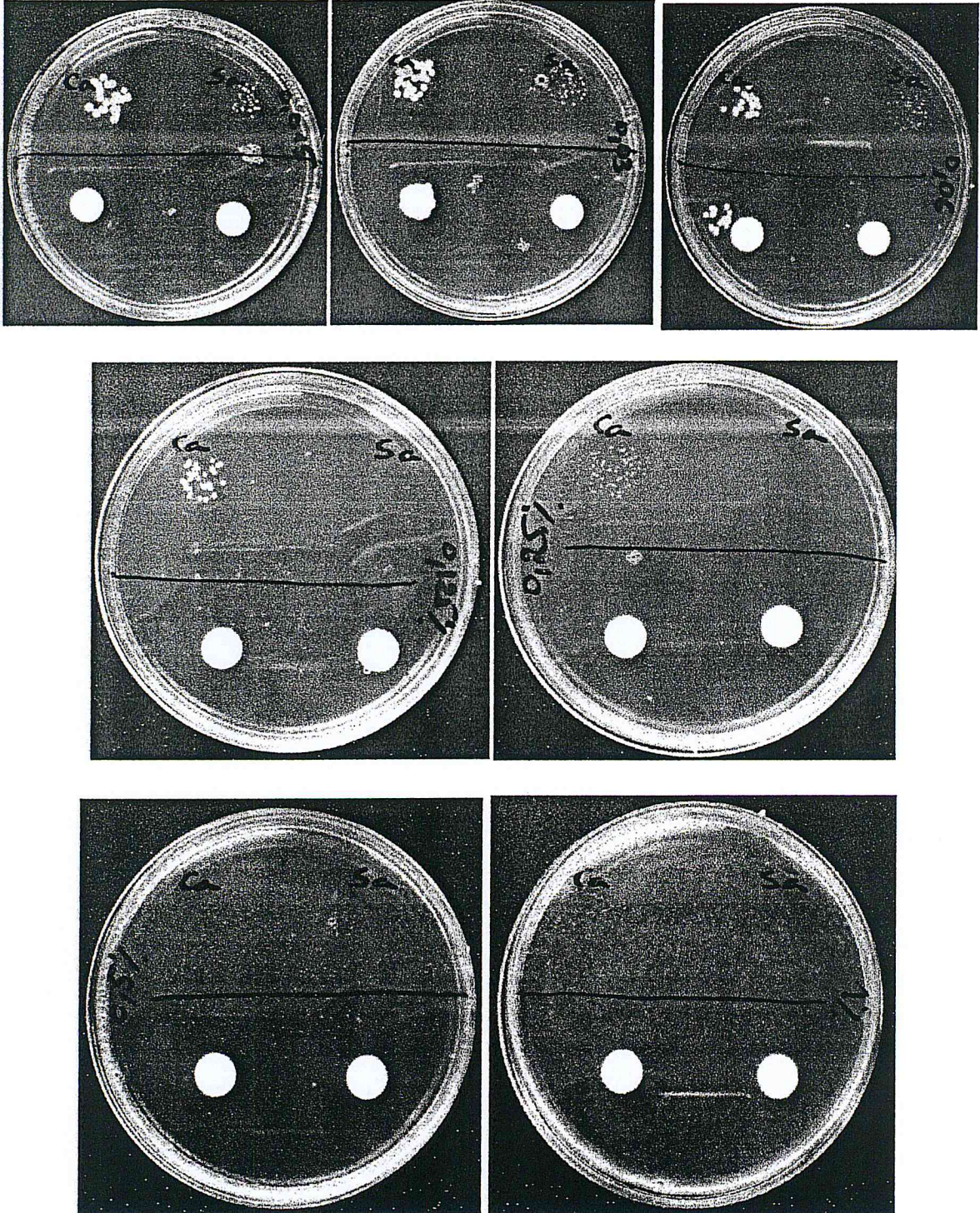
40. Kunle O, Okogun J, Egamana E, Emojevwe E, Shok M., Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract, *Phytomedicine*, 10: 59 – 61, (2003).
41. Pharmacopée européenne, Direction de la qualité du médicament, Council of Europe, 2623 pages 2002.
42. Meena M.R. Sethi V., antimicrobial activity of the essential oils from spices, *Journal of Food Science and Technology Mysore*, 31 :68-70, (1994).
43. Marino M, Bersani C, Comi G., Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method, *J Food Prot.*, 62:1017-1023, (1999).
44. Mangena T., Muyima NY., Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains, *Lett Appl Microbiol.*, 28:291-296, (1999).
45. Tassou C.C., Drosinos E.H. et Nychas G.J.E., Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella Enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 and 10°C, *Journal of Applied Bacteriology*, 78 :593-600, (1995).
46. Chao S.C., Young D.G., Oberg C.J., Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses, *Journal of Essential Oil Research*, 12:639-649, (2000).
47. Mann C.M., Cox C.D., Markham J.L., The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), *Lett. Applied Microbiol.*, 30: 294-297, (2000).
48. Elgayyar M., Draughon FA., Golden DA., Mount JR., Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms, *J. Food Prot*, 64: 1019-24, (2001).
49. Delaquis P. J., Stanich K., Girard B., Mazza G., Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils, *International Journal of Food Microbiology*, 74:101–109, (2002).
50. Dorman HJ., Deans SG., Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils, *J Appl Microbiol.*, 88:308-16, (2000)
51. Bourkhiss M., Hnach M., Bourkhiss B., Ouhssine M. et Chaouch A., Composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc, *Afrique Science*, 3 :232 – 242, (2007).



52. Angioni A., Barra A., Russo M.T., Coroneo V., Dessi S., Cabras P., Chemical composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity, *J. Agric. Food Chem.*, 51:3073-3078, 2003.

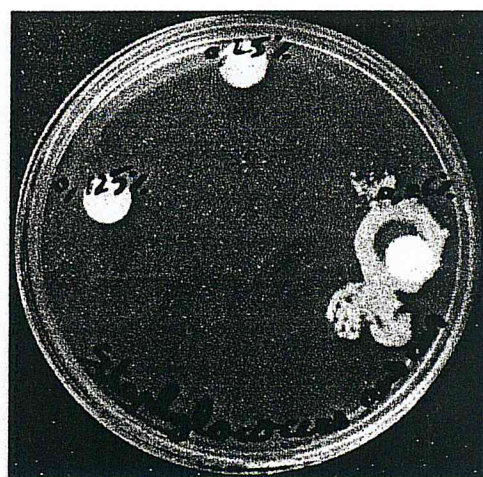
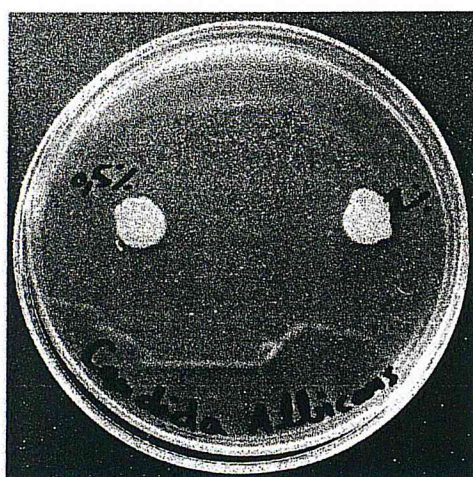
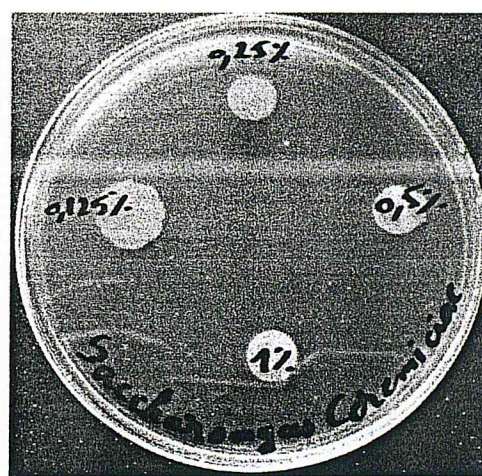
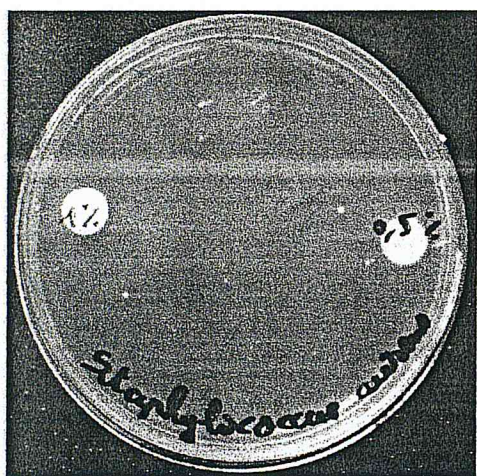
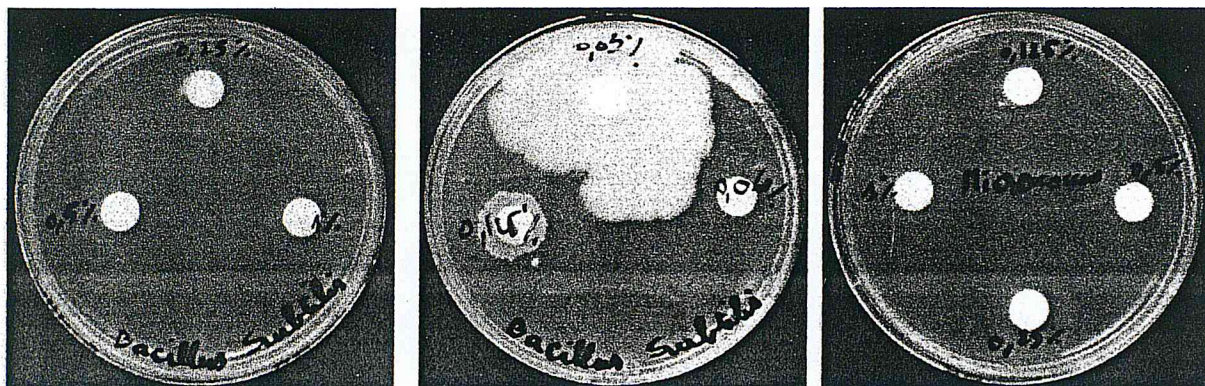
# ANNEXES

## Annexe 1



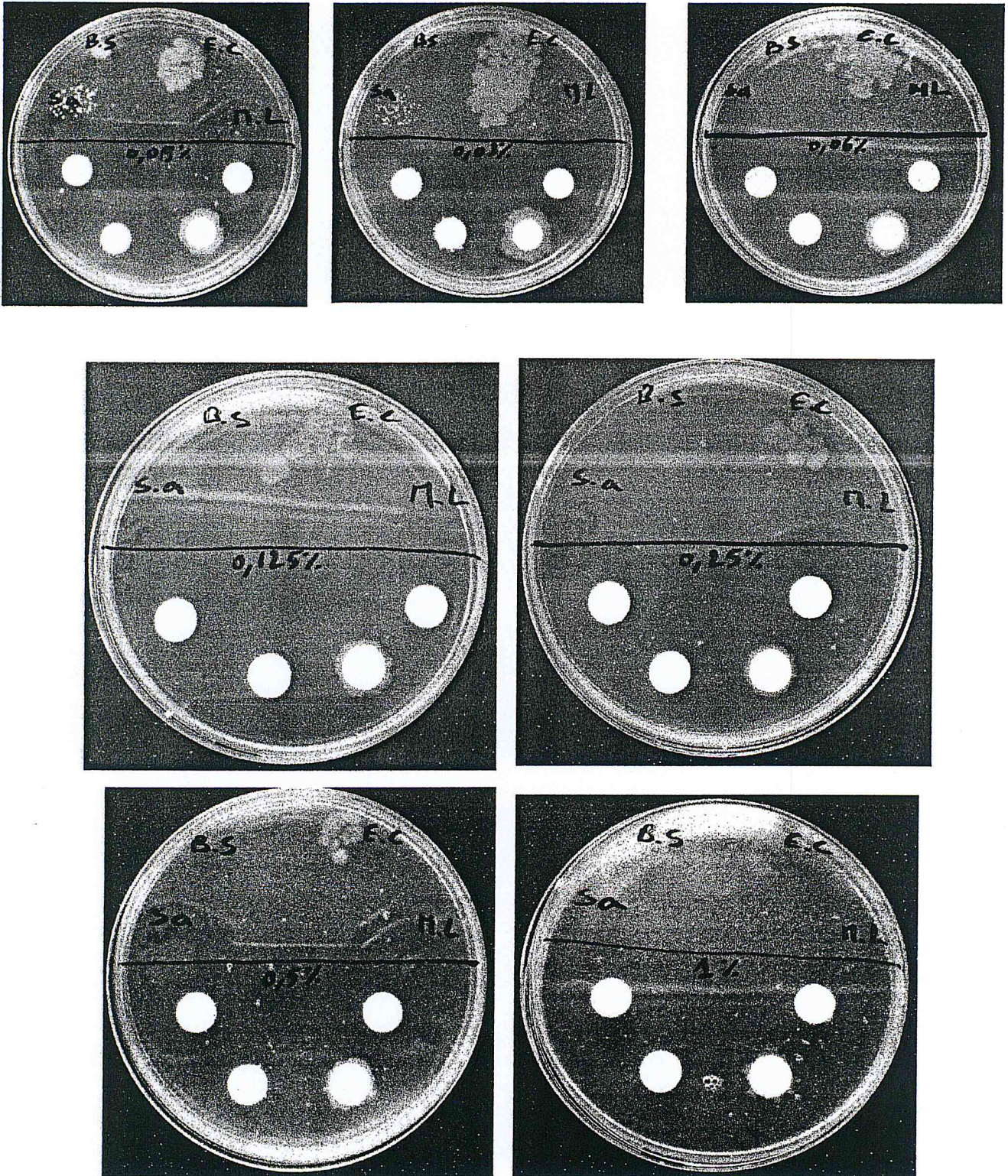
**Détermination des CMI de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata* vis-à-vis des levures *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae***

## Annexe 2



Détermination des CMB/CMF de l'huile essentielle de l'huile essentielle  
de *Tetraclinis articulata*

### Annexe 3



Détermination des CMI de l'huile essentielle vis-à-vis des bactéries