

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique



UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA



Faculté des Sciences

Département de Chimie

Mémoire Présenté par

M^{elle} BECHKOUR Dalila.

En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine Science de la matière
Filière Chimie
Option Chimie des Substances Naturelles

Titre

**Extraction et étude de l'activité antimicrobienne et
antioxydante de l'huile essentielle d'*Inula viscosa* L
de la région de Blida.**

Dirigée par :

Dr. K. BOUTEMAK.

Dr. Z. CHEMAT.

Année : 2011-2012

Remerciements

J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements et ma vive reconnaissance à madame K.BOUTEMAK d'avoir accepté de diriger ce mémoire au sein du laboratoire de chimie des Substances Naturelles à l'Université SAAD DAHLAB de BLIDA.

Je tiens à remercier également madame Z.CHEMAT de m'avoir aidé pour la réalisation de ce travail.

J'adresse mes remerciements à Professeur M. El Hattab à l'Université Saad Dahlab de Blida pour l'honneur qu'il m'a fait de présider ce jury.

Je tiens à remercier les membres de jury de mon mémoire : Professeur Y. Daghbouche et Dr N. Bouzidi, maitres de conférences à l'université de Blida de m'avoir honoré de leurs présences et accepter de juger ce travail.

Mes remerciements les plus sincères vont à madame lasas de l'unité de bactériologie clinique de laboratoire centrale de l'Etablissement Public Hospitalier de BOUFARIK. Sans oublier de remercier M^{elle} F. Labгаа , K. Elhouari, N. Ighili, S. Hamiche et H. Cherfi.

Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance pour tous les enseignants qui ont contribué à ma formation et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail, tout d'abord à mes parents

A ma sœur et mes frères

A ma nièce et mon neveu

A mes amies

Dalila

ملخص

عملنا يتركز على استخراج الزيوت الأساسية و دراسة النشاط المضاد للأكسدة والمضاد للميكروبات لنبات (مقرمان) اخترنا هذه النبتة نظرا لتواجدها بشكل واسع في الجزائر بشكل عام، في منطقة بوقرة (ولاية البليدة) بشكل خاص. المقرمان من النباتات العطرية المعروفة منذ فترة طويلة في الطب التقليدي و لا تزال تستخدم في الطب الشعبي يتم استخدامها نظرا لخصائصها العلاجية المتنوعة و أنشطتها: المضادة للالتهابات، المضادة لمرض السكر، خافض للحرارة، مطهر. تم استعمال تقنية التقطير في بخار الماء لاستخراج الزيوت الأساسية، وتم تعيين المدة المثلى لاستخراج الزيوت ب 3 ساعات بمردود يقدر ب 0.14%.

كشف الفحص الكيميائي للزيت الأساسي لنبات المقرمان بواسطة (الكروماتوغرافيا الغازية/الوصف الكمي) المركبات الرئيسية التالية : حمض 3- فينيل بروبانويك، 2- تتراهدروفوريل ميثيل استر (44.65%) ، تخونس (2-كلوروفنيل) ثلاثي ميثيل سيلاني (10.08%) ، وحمض 3،3،8،8-رباعي ميثيل-تريسيكلو [5،1،0،0] (2،4) اکت-5-أن-5 بروبانويك (9.74%).

تم إجراء تقييم لنشاط مضادات الميكروبات من خلال طريقة النشر على الوسط الصلب لسلاطات الجراثيم: ستافيلوكوكيس اوريبس ، الإشريشيا كولي، بسودوموناس ايريجينوزا ، ، كونديدا البيكانس و كونديدا دوبلنسيس وأظهرت أنها مقاومة للزيت الأساسي أما ستافيلوكوكيس اوريبس فقد أظهرت حساسية للزيت . تطور النشاط المضاد للأكسدة مع طريقة DPPH

كلمات البحث: مقرمان ، الزيوت الأساسية ، التقطير في بخار الماء ، التركيب الكيميائي عن طريق (الكروماتوغرافيا الغازية/الوصف الكمي) مضاد للفطريات مضادة للجراثيم ، نشاط مضادات الأكسدة.

Résumé

L'objectif de notre travail est l'extraction de l'huile essentielle et l'étude de l'activité antimicrobienne et antioxydante de l'espèce *Inula viscosa*.

L'espèce *Inula viscosa* sur laquelle est porté notre choix est une plante très répandue en Algérie en général et à Bougara (wilaya de Blida) en particulier. Elle est très utilisée en médecine populaire. Son histoire thérapeutique est très diversifiée et connue depuis longtemps dans les médications traditionnelles. Elle est largement utilisée pour ses activités : anti-inflammatoires, antidiabétiques, antipyrétiques et antiseptiques.

Nous avons réalisé un montage d'entraînement à la vapeur d'eau pour faire l'extraction de l'huile essentielle, la durée optimale de l'extraction est fixée à 3h et un rendement optimal égal à 0.14%.

La composition chimique de l'huile essentielle d'*Inula viscosa* a été déterminée par GC-MS, les composés majoritaires sont : Acide 3-phenyl propanoïque, 2-tetrahydrofurylméthyl ester (44,65%), Trans-(2-chlorovinyl)-triméthyl silane (10,08%), Acide 3,3,8,8-tétraméthyl-tricyclo [5,1,0,0(2,4)]oct-5-ène-5-propanoïque (9.74%).

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été effectuée par la méthode d'aromatogramme pour les souches microbiennes : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*. Les résultats ont montré que l'huile essentielle d'*Inula viscosa* présente une sensibilité moyenne seul avec la souche bactérienne *Staphylococcus aureus*.

L'activité antioxydante déterminée avec la méthode de DPPH a montré que l'huile essentielle présente un pouvoir réducteur.

Mots clés : *Inula viscosa*, huile essentielle, entraînement à la vapeur d'eau, chromatographie en phase gazeuse -spectrométrie de masse, activité antimicrobienne, activité antioxydante.

Abstract

The objective of our work is the extraction of essential oil and the study of the antioxidant and antimicrobial activity of the species *Inula viscosa*.

The specie *Inula viscosa* on which is the subject of our choice is a very common plant in Algeria in general and in Bougara (Blida) in particular. It is widely used for its activities: anti-inflammatory, antidiabetic, antipyretic and antiseptic.

We have realised a montage of steam distillation to extract the essential oil. The optimal duration of extraction is fixed at 3H and optimal yield obtained is 0,14%.

The chemical composition of the essential oil of *Inula viscosa* was determined by CG-MS. The major components are: 3-phenylpropionic Acid, 2-tetrahydrofuryl methyl ester (44,65%), Trans-(2-chlorovinyl)-trimethyl silane (10,08%), 3,3,8,8-tetramethyl, tricyclo [5,1,0,0(2,4)]oct-5-ene-5-propanoic acid (9.74%).

The evaluation of the antimicrobial activity was performed by the method of aromatogram for microbials strains: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*. The results revealed that the essential oil of *Inula viscosa* has an average sensivity only with the bacterial strain *Staphylococcus aureus*.

The antioxidant activity determined with DPPH method showed that the essential oil has a reducing power.

Keywords: *Inula viscosa*, essential oil, steam distillation, Gas chromatography-mass spectrometry, antimicrobial activity, antioxidant activity.

Liste des abréviations

HE	Huile essentielle
OMS	Organisation mondiale de la santé
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse
AFNOR	Association Française de Normalisation
°C	Degré Celsius
D	La densité
I_A	Indice d'acide
I_E	Indice d'ester
I_S	Indice de saponification
M_{HE}	Masse d'huile essentielle
M_{MV}	Masse de la matière végétale
R	Rendement en huile essentielle
t	Temps
IC₅₀	Concentration inhibitrice de 50%
%	Pourcentage

Liste des figures

Figure 1 : l'espèce <i>Inula viscosa</i> L.....	06
Figure 2 : Structure des flavonoïdes isolés d' <i>Inula viscosa</i> L.....	12
Figure 3 : Structure des terpènes isolés d' <i>Inula viscosa</i> L.....	13
Figure 4 : Structure des sesquiterpènes lactones d' <i>Inula viscosa</i>	13
Figure 5 : structures de quelque substance rencontre dans l'huile essentielle.....	21
Figure 6 : La plante <i>Inula viscosa</i>	26
Figure 7 : Schéma directeur de l'expérimentation.....	27
Figure 8 : Montage d'entraînement a la vapeur.....	28
Figure 9 : Extraction liquide- liquide de l'huile essentielle d' <i>inula viscosa</i>	30
Figure 10 : Evaporateur rotatif.....	30
Figure 11 : pycnomètre.....	31
Figure 12 : Réfractomètre.....	32
Figure 13 : les différentes étapes d'indice d'acide.....	33
Figure 14 : Aromatogramme sur boite de pétri à diffusion linéaire à partir d'un disque imprégné d'huile essentielle.....	36
Figure 15 : Représentation de l'étude antimicrobienne.....	38
Figure 16 : Gélose fusionne dans des biotes de pétri.....	39
Figure 17 : Agitation de la solution bactérienne avec un vortex.....	40
Figure 18 : mesure de densité avec un Densitomètre.....	40
Figure 19 : Ensemencement de la suspension bactérienne sur les milieux gélosés.....	40
Figure 20 : Dépôt des disques sur le milieu gélosé.....	41

Figure 21 : Imbibé de l'huile essentielle <i>d'Inula viscosa</i>	41
Figure 22 : Forme libre et réduite de DPPH.....	42
Figure 23 : Représentation de l'étude du pouvoir antioxydant.....	45
Figure 24 : Evolution du rendement de l'huile essentielle d' <i>Inula viscosa</i> En fonction de la durée d'extraction.....	48
Figure 25 : Huile essentielle de l' <i>Inula viscosa</i>	49
Figure 26 : Chromatogramme de l'huile essentielle de l' <i>Inula viscosa</i>	52
Figure 27 : l'effet de l'huile essentielle <i>d'Inula viscosa</i> sur <i>Escherichia coli</i>	54
Figure 28 : l'effet de l'huile essentielle <i>d'Inula viscosa</i> sur <i>Staphylococcus aureus</i>	54
Figure 29 : L'effet de l'huile essentielle <i>d'Inula viscosa</i> sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	54
Figure 30 : L'effet de l'huile essentielle <i>d'Inula viscosa</i> sur <i>Candida albicans</i>	55
Figure 31 : L'effet de l'huile essentielle <i>d'Inula viscosa</i> sur <i>Candida dubliniensis</i>	55
Figure 32 : Histogramme des diamètres d'inhibition des bactéries et des levures.....	56
Figure 33 : Pourcentages de réduction du radical libre DPPH de l'huile essentielle <i>d'Inula viscosa</i>	57
Figure 34 : Pourcentages de réduction du radical libre DPPH de l'Acide Ascorbique.....	58

Liste des tableaux

Tableau 1 : les flavonoïdes isolés <i>d'Inula viscosa</i> L.....	09
Tableau 2 : les Acides Sesquitérpeniques <i>d'Inula viscosa</i> L.....	10
Tableau 3 : les triterpènes esters <i>d'Inula viscosa</i>	11
Tableau 4 : la composition chimique de l'huile essentielle <i>d'Inula viscosa</i> obtenu par hydrodistillation et entrainement a la vapeur d'eau.....	14
Tableau 5 : Caractéristiques des souches microbiennes testées.....	37
Tableau 6 : Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle <i>d'Inula viscosa</i>	49
Tableau 7 : Propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle <i>d'Inula viscosa</i>	50
Tableau 8: Constituants majoritaires de l'huile essentielle <i>d'Inula viscosa</i> analysée par CG/MS.....	51
Tableau 9: Diamètre d'Inhibition des souches bactériennes par l'huile essentielle <i>d'Inula viscosa</i>	53
Tableau 10: Relation entre le diamètre d'inhibition et la sensibilité des souches.....	53

TABLE DES MATIERES

Introduction générale :.....	1
Partie théorique	
Chapitre 1 : l'espèce <i>Inula viscosa</i> .	
1.1. Présentation de la plante <i>Inula viscosa</i> L.....	5
1.1.1. Classification systématique.....	5
1.1.2. Noms vernaculaire.....	5
1.1.3. Description botanique de l'espèce <i>Inula viscosa</i>	5
1.2. Répartition géographique et écologique.....	7
1.3. Parties utilisées.....	7
1.4. Utilisation de l'espèce <i>Inula viscosa</i>	7
1.4.1. Usage Médicinal.....	7
1.4.2. Usages en lutte biologique.....	8
1.5. Quelques travaux déjà réalisés sur l'espèce <i>Inula viscosa</i>	8
1.5.1. Etude des métabolites secondaire isolés <i>d'Inula viscosa</i>	8
1.5.2. Etude de la composition chimique de l'huile essentielle <i>d'Inula viscosa</i> L13	
1.5.3. Autres composés <i>d'Inula viscosa</i>	15
1.5.4. Etude de l'activité antibactérienne de <i>Inula viscosa</i>	16
Chapitre 2 : Généralité sur les huiles essentielles	
2.1. Définition des huiles essentielles.....	18
2.2. Répartition et localisation des huiles essentielles.....	18

2.3. Propriétés physico-chimique des huiles essentielles.....	19
2.3.1. Propriétés organoleptiques.....	19
2.3.2. Propriétés physiques.....	19
2.3.3. Propriétés chimiques.....	19
2.4. Les paramètres influençant les huiles essentielles.....	20
2.5. Composition chimique.....	20
2.6. Activité biologique des huiles essentielles.....	22
2.7. Les méthodes d'extraction de l'huile essentielle.....	22
2.7.1. L'hydrodistillation.....	22
2.7.2. Entraînement a la vapeur d'eau.....	23
2.7.3. Expression à froid.....	23

Partie Expérimentale.

Chapitre 3 : Matériels et Méthodes

3.1. Matériel Végétal.....	26
3.2. Extraction de l'huile essentielle de l'espèce étudiée.....	28
3.2.1. Appareillage.....	28
3.2.2. Protocole expérimental.....	29
3.3. Calcul du rendement en huile essentielle.....	30
3.4. Etude de la cinétique d'extraction de l'huile essentielle.....	31
3.5. Propriétés physico-chimiques et organoleptiques de l'huile essentielle <i>d'Imula viscosa</i>	31
3.5.1. Mesure des grandeurs physique	31
3.5.2. Mesure des indices Chimique.....	32
3.5.3. Propriétés organoleptiques.....	34
3.6. Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle par (GC-MS) ..	34
3.7. Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle <i>d'Imula viscosa</i> ...	35

3.7.1. Principe générale.....	35
3.7.2. Matériels utilisés.....	36
3.7.3. Protocole expérimental.....	39
3.8. Etude de pouvoir antioxydant de l'huile essentielle d' <i>Inula viscosa</i> par la méthode de radicales libre DPPH.....	42
3.8.1. Matériels utilisés.....	43
3.8.2. Mode opératoire.....	43
3.8.2.1. Préparation de la solution DPPH.....	43
3.8.2.2. Préparation des échantillons.....	43
3.8.2.3. Préparation de la solution de vitamine C.....	43
3.8.2.4. Méthode au DPPH.....	43
3.8.2.5. Expression des résultats.....	44

Chapitre 4 : Résultats et discussions

4.1. Extraction de l'huile essentielle d' <i>Inula viscosa</i> par entraînement à la vapeur d'eau.....	47
4.2. Rendement en huile essentielle d' <i>Inula viscosa</i>	47
4.3. Variation du rendement en huile essentielle en fonction de la durée d'extraction	47
4.4. Caractérisation de l'huile essentielle d' <i>Inula viscosa</i>	49
4.4.1. Caractéristique organoleptiques.....	49
4.4.2. Caractéristique physico-chimiques de l'huile essentielle d' <i>Inula viscosa</i>	50

4.5. Analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	51
4.6. Activité antimicrobienne de l'huile essentielle <i>d'Inula viscosa</i>	53
4.7. Evaluation de l'activité antioxydante	57
Conclusion.....	60



Introduction

Générale

Introduction

La région méditerranéenne, d'une manière générale et l'Algérie en particulier, avec son climat doux et ensoleillé, recèle d'importantes potentialités en matière de plantes aromatiques et médicinales. La flore Algérienne est caractérisée par sa diversité estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, ce qui a donné à la pharmacopée traditionnelle une richesse non négligeable.

L'utilisation des plantes médicinales comme source de remède pour se soigner ou prévenir des maladies est originaires des millénaires jusqu'à la récente civilisation chinoise, Indienne et du Proche-Orient. Elle est devenue certainement un art. L'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites. Cette source semble inépuisable puisque seule une petite partie des 400000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans phytochimiques et pharmacologiques, et que chaque espèce puisse contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents.

Selon l'organisation mondiale de la santé (O.M.S); la médecine traditionnelle se définit comme l'ensemble de toutes les connaissances pratiques explicables ou non pour diagnostiquer ou éliminer un déséquilibre physique, mental en s'appuyant exclusivement sur l'expérience vécue et l'observation, transmises de génération en génération (oralement ou par écrit).

Ces dernières années, nous avons assisté à un regain d'intérêt des consommateurs pour les produits naturels. On estime que 80% de la population mondiale dépend directement des plantes médicinales pour ses soins de santé. C'est pour cela, les industriels développent de plus en plus des procédés mettant en œuvre des extraits et principes actifs d'origine végétale. Les huiles essentielles ont été particulièrement étudiées en raison de leur utilisation dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires pour leurs effets bénéfiques pour la santé.

La valorisation des plantes médicinales de la flore nationale sera d'un grand apport pour l'industrie pharmaceutique Algérienne et aura un impact économique certain. Dans ce cadre et pour notre part, nous avons choisi d'étudier l'espèce végétale *Inula viscosa L.* en fixant comme principal objectif, l'extraction, la séparation et l'identification de l'huile essentielle de la partie aérienne de cette espèce et déterminer leurs pouvoir antimicrobien et antioxydant. Le choix de cette plante a été motivé par le fait qu'elle est très utilisée dans la médecine traditionnelle algérienne. En effet, l'espèce *Inula viscosa L.* est connue pour ses propriétés antidiabétiques et anti-inflammatoires.

Pour réaliser cet objectif, nous avons structuré le travail comme suite :

- La première partie est une synthèse bibliographique dans laquelle, on présentera la matière végétale, son utilisation et les travaux dont elle a fait l'objet et des généralités sur les huiles essentielles.
- La seconde partie est subdivisée à une étude expérimentale consacrée à :
 - Extraction de l'huile essentielle de l'espèce étudiée et calcul du rendement.
 - Etude de la cinétique d'extraction de l'huile essentielle.
 - Analyse physico-chimique de l'huile essentielle
 - Détermination de la composition chimique de l'huile essentielle par GC-SM.
 - Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant de l'huile essentielle.
 - Par la suite de cette même partie, des résultats avec discussions seront exposés.

Et nous terminons par une conclusion générale.



Partie Théorique

Chapitre N° 1

L'espèce Inula viscosa

Chapitre 1 : L'espèce *Inula viscosa* L.

1.1. Présentation de la plante *Inula viscosa* L.

1.1.1. Classification systématique

Embranchement	⇒	<i>Spermaphytes</i> [1].
Sous-embranchement	⇒	<i>Angiospermes</i> [1].
Classe	⇒	<i>Dicotyledones</i> [1].
Sous classe	⇒	<i>Gamopetales</i> [1].
Ordre	⇒	<i>Campunulales</i> [1].
Famille	⇒	<i>Astéracée (Compositae)</i> [2].
Genre	⇒	<i>Inula (Dittrichia)</i> [2].
Espèce	⇒	<i>Inula viscosa</i> L Aiton [3].
Synonyme	⇒	<i>Dittrichia Viscosa</i> L Aiton [3].

1.1.2. Noms vernaculaires

- Français : *Inule visqueuse*
- Anglais: Woody fleabane [2,3].
- Arabe: Magramane, Bagramane, Amagramane ou Terhâla [4].

1.1.3. Description botanique de l'espèce *Inula viscosa* L

Inula viendrait du grec : Inéo qui signifié « je purge ». (Allusion à une propriété thérapeutique de la plante). *Viscosa* veut dire visqueuse.

Inula viscosa appartient à la grande famille des composées, cette famille est l'une des plus distribuées dans le règne végétal et représentée principalement dans les régions tempérées et froides du globe.

Cette grande famille comprend plus de 13 tribus répartis en 1500 genres et 23000 espèces. En Algérie, il en existe 109 genres répartis en 408 espèces. Parmi les genres appartenant à la famille compositae, le genre *Inula* comprend une variété d'environ 90 espèces [5]. Il est largement distribué dans le bassin méditerranéen. Ce sont des plantes herbacées vivaces [6], à feuilles alternes. Capitules jaunes, contenant à la fois des fleurs tubuleuses et des fleurs ligulées. Elles sont Bractées en plusieurs séries. Fleurs périphériques pistillées, à ligules tridentées. Anthères sagittées à la base. Achaines munis de côtes [5].

Quezel et Santa (1963) a décrit *Inula viscosa* comme une plante annuelle herbacée, pérenne ou vivace où les branches ligneuses bourgeonnent à chaque printemps [1]. C'est une plante fréquente dans la région méditerranéenne, ligneuse à sa base (forte racine pivotante lignifiée pouvant atteindre 30 cm de long), Tiges de 5-10 dm [2, 4,7]. Les feuilles sont sessiles, ondulées, dentées, aiguës, glanduleuses sur les deux faces et elles dégagent pendant la phase végétative une odeur forte et âcre [1,2]. La plante peut atteindre 120 cm de hauteur. Les fleurs sont de couleurs jaunes, caractérisées par une forte odeur rayonnantes .Elles sont regroupées en capitules d'environ 10-20 mm de diamètre et rassemblées en inflorescences en longues grappes pyramidales. (Voir figure 1). *L'Inula viscosa* L fleurit à la fin de l'été et au début de l'automne [4]. Les fruits sont des akènes velus à aigrette grisâtre [1].



Figure 1 : l'espèce *Inula viscosa* L.

1.2. Répartition géographique et écologique

L'espèce *Inula viscosa* est présente dans les Alpes-Maritimes, aux Pyrénées-Orientales [2,8], dans certains pays d'Europe comme l'Espagne, la France, l'Italie [6] etc., Elle se trouve aussi dans les pays de l'Asie tels que : La Chine, le Japon, la Korea etc... Elle est commune dans l'ensemble du pays du Maghreb : l'Algérie, la Tunisie et le Maroc, dans les rivages méditerranéens jusqu'au cœur du Sahara. Elle se trouve aussi en Egypt [5]. Cette plante est distribuée sur les sols salés, les prairies humides et les bords de cours d'eau. En Algérie, cette espèce apparaît dans les rocailles et dans les terrains argileux [1].

1.3. Parties Utilisées

Les parties aériennes de la plante, feuilles et tiges et les fleurs séchées [1] et rarement les racines.

1.4. Utilisation de l'espèce *Inula viscosa* L

1.4.1. Usage Médicinal

L'Inule visqueuse est une plante aromatique et médicinale, très anciennement connue et largement réputée pour ses vertus thérapeutiques où elle a été utilisée dans la médecine traditionnelle pour ses effets astringentes et vulnérinaires [9]. Elle est aussi utilisée comme antiseptique au niveau de l'appareil génital [1]. Elle possède des propriétés anti-inflammatoires [4, 9,10], antipyrétiques [5], antiseptiques [10], anti-gale [11] et antidiabétiques. Elle est connue dans le traitement les troubles gastroduodénaux [12] et elle améliore l'appétit, elle est aussi antiémétique [1].

Il a été rapporté aussi que la poudre d'*Inula viscosa* de la partie aérienne est utilisée dans le traitement des mycoses cutanées [1]. La plante est aussi dotée de propriétés antioxydants [5,11] et du pouvoir cicatrisant [11].

En Italie, la médecine traditionnelle rapporte et reconnaît à *Inula viscosa* des propriétés balsamiques, antipyrétiques, antiphlogistiques et aussi antiseptiques [1]. En Espagne, la plante est utilisée dans la médecine populaire pour traiter les troubles gastriques [13].

En Jordanie, la médecine traditionnelle attribue plusieurs usages à *Inula viscosa* comme vermifuge, expectorante, diurétique, dans le traitement de la bronchite, la tuberculose, l'anémie et comme cataplasme pour les douleurs rhumatismales [8].

Dans le Nord de l'Afrique et le pourtour méditerranéen, l'*Inule visqueuse* occupe une place appréciable dans la médecine traditionnelle, elle est connue pour ses propriétés anthelminthiques, vermifuge [1]. Elle est largement présente dans la pharmacopée traditionnelle marocaine pour traiter la bronchite, le diabète, les blessures et les troubles gastriques intestinaux [4].

En Algérie, elle est largement répandue dans le traitement de diverses maladies : telles que la bronchite, le diabète et les rhumatismes [14].

L'huile essentielle d'*Inula viscosa* peut être utilisée dans le traitement de l'ulcère gastrique [5] et l'extrait aqueux (EA) des feuilles d'*Inula viscosa* est utilisé pour le traitement des maladies HTA (L'hypertension artérielle) [15].

1.4.2. Usages en lutte biologique

L'espèce *Inula viscosa* utilisée par voie biologique pour empêcher l'implantation zygote chez les mammifères et empêcher la croissance des champignons pathogènes [13]. Cette plante est réputée être un "insecticide végétal" qui combat la Mouche de l'Olive [5]. L'huile essentielle de la partie fleurie d'*Inula viscosa* possède un pouvoir antifongique [5].

1.5. Quelques travaux antérieurs déjà réalisés sur l'espèce *Inula viscosa* L

Différents travaux de recherche ont été menés sur *Inula viscosa* dont parmi eux sont :

1.5.1. Etude des métabolites secondaires isolés d'*Inula viscosa* L

Les travaux de Benayache et coll (1991) [2] rapportent que les parties aériennes d'*Inula viscosa* contiennent des Flavonoïdes, des acides sesquiterpéniques et des triterpènes esters. Les tableaux suivants regroupent des exemples de chaque classe [2].

Tableau 1 : les flavonoïdes isolés *d'Inula viscosa L.*

Nom du flavonoïde
7- Méthyléther Naringénine (Sakuranétine)
7- O-méthyl aromadendrine
3- O-acétyl taxifoline
3- O-acétyl padmatine
4, 7,4'- Trihydroxyflavone (Apigénine)
6- Méthyl éther scrutellareine (Hispiduline)
5, 7,3',4' Tétrahydroxyflavone (Lutéoline)
5, 7,3',4'- Tétrahydroxy –3,6- Diméthoxyflavone
5, 7,3',4' – Tétrahydroxy –6,3- Diméthoxyflavone
5, 6,3',4' – Tétrahydroxy –3,7- Diméthoxyflavone
7-Glucosyl –5, 6,3',4'-Tétrahydroxy-3-Méthoxyflavone
5, 7,4'-Trihydroxy –3,3'-Diméthoxyflavone
(2S)-5, 7,4' – Trihydroxyflavone (Naungénine)
(2S)-5,4'- Dihydroxy-Méthoxyflavone
(2R) (3R)-5, 7,3',4 – Tétrahydroxyflavone
(2R) (3R)- 5,3',4-Trihydroxy –7- Méthoxyflavone
(2R) (3R)- 3, 5,4'-Trihydroxy –7-Méthoxyflavone
(2R) (3R)- 3-0- Acétoxy – 5, 7,4'-Trihydroxyflavone
(2R) (3R)- 3-0- Acétoxy-5,4'-Dihydroxy –7-Méthoxyflavone
(2R) (3R)- 3, 5, 7,3',4'-Pentahydroxyflavone
(2R)(3R)-3, 5,3',4'-Tétrahydroxy-7-Méthoxyflavone
(2R)(3R)-3-0-Acétoxy-5,3',4'-Trihydroxy-7- Méthoxyflavone
3-Méthyl éther kaempférol (isokaempféride)
3-Méthyl quercétine
3-Méthoxyquercétine
3-Méthoxy quercétine-7-Glucoside
3- Méthyl éther quercétine
7- Méthyl éther quercétine (Rhamnétine)
3'-Méthyl éther quercétine (Isoramnétine)

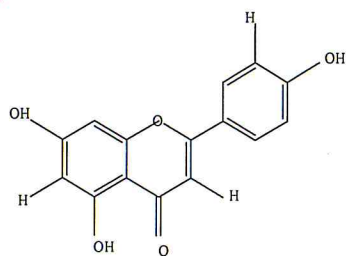
3,3'-Diméthyl éther quercétine
3,6-Diméthyl éther quercétagine (Axillarine)
6,3'-Dithyl éther quercétagine (Spinacétine)
Eriodictyol
7-Méthyl éther Eriodictyol
3-Acétate aromadendrine
7-Méthyl éther aromadendrine
3-Acétate taxifoline
7-Méthyl éther taxifoline
7-Méthyl éther -3- Acétate taxifoline
Aromadendrine (dihydrokaempférol)
Taxifoline (dihydroquercétine)

Tableau 2 : les Acides Sesquitérpéniques *d'Inula viscosa L.*

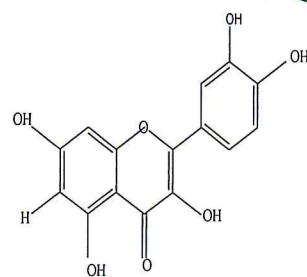
Acides Sesquitérpéniques
Acide eudesma-3,11 (13) – diène –12 oïque
12- Carboxyeudesma -3,11 (13) diène
2-Déacétoxy-inviscolide, Xanthinin
Gérmacranolides
Acide ilicique
Acide 3a – Hydroxycostique
Acide 3a - Dyoxy-3,4-Dahydro 4,5- Dihydrocostique
Acide costique A
Acide isocostique A
Acide ilicique A
Acide viscique A
Acide viscosique A
Inviscolide

Tableau 3 : les tritèrènes esters *d'Imula viscosa*

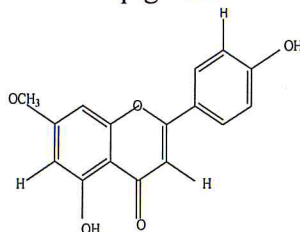
Tritèrènes esters
Acétate de dammaradiényl
Acétate de taraxastéryle
Acétate de pseudataraxastérite
Fridelin
3- Epifridelinol
20(29) Lupène – 3,16, <i>b</i> – diol
3 <i>b</i> -monoacétate de tritèrène diol
Y -Acétate de taraxastérole
3,16-Dihydroxylupéol 3- Palmitate
3,16- Dihydroxylupéol 3- Myristate
Esters de l' <i>a</i> – Amyrine
Isobutyrate de 3- Méthoxy –para-cymène-7yle
Isovatérate du 3-Métoxy-para-cymène-7yle
Nérotidol



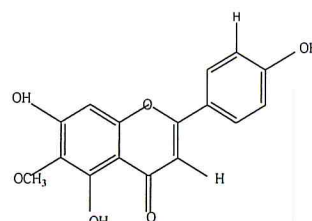
Apigénine



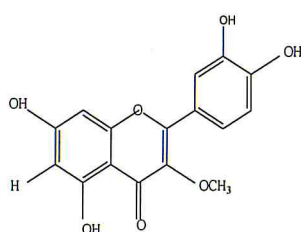
Quercét



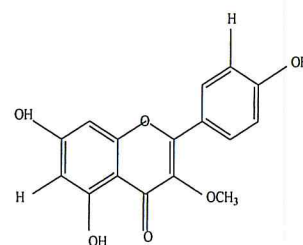
Genkwanin



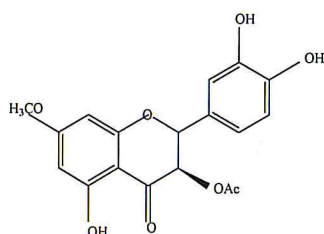
Hispiduline



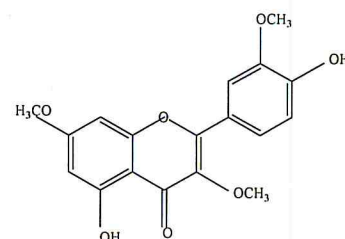
3-O-méthylquercétine



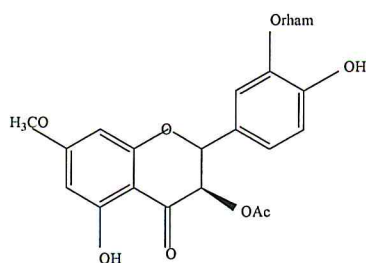
3-O-méthylKaempferol



3-O-acétylpadmatine

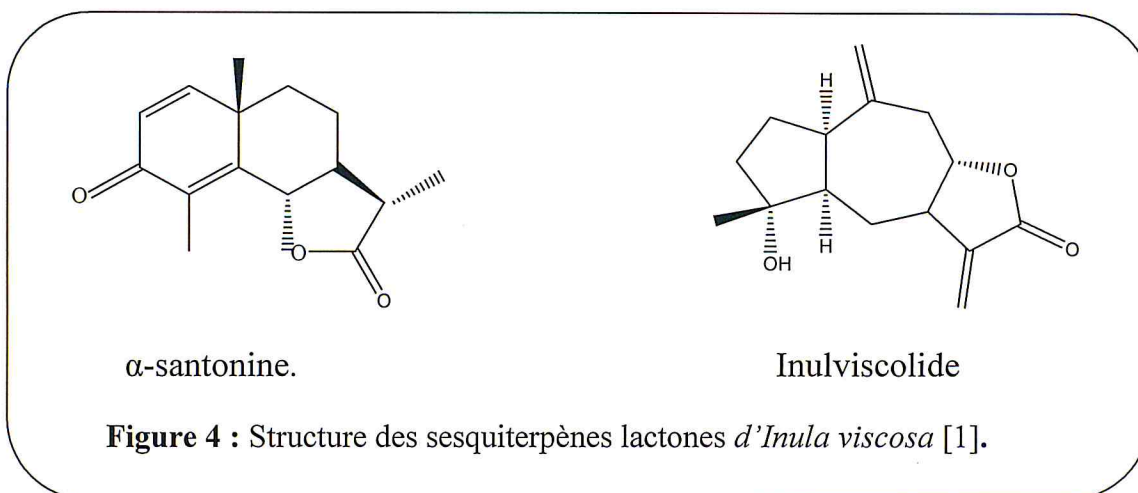
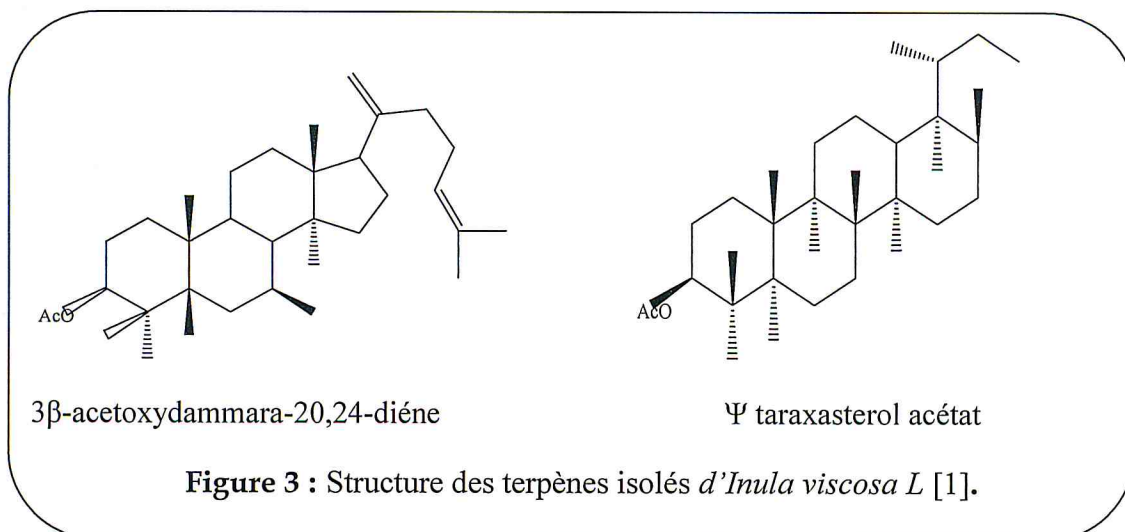


3, 3', 7-triméthoxyquercétine



3' rhamnosyl 3-O-acétylpadmatine

Figure 2 : Structure des flavonoïdes isolés d'*Inula viscosa L* [1].



1.5.2. Etude de la composition chimique de l'huile essentielle d'*Inula viscosa* :

En 2011 I. Haoui et coll [14] ont étudié l'analyse de la composition chimique des huiles essentielles à partir de l'espèce algérienne *Inula viscosa* (L.) Aiton avec deux méthodes d'extraction : l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur d'eau (R=0.148%, R= 0.453%). L'étude a montré que les sesquiterpènes oxygénés présentent la fraction importante pour les deux méthodes d'extraction : hydrodistillation et par entraînement à la vapeur d'eau.

La composition chimique de l'huile essentielle est représentée dans le tableau suivant [14] :

Tableau 4 : la composition chimique de l'huile essentielle *d'Inula viscosa* obtenu par Hydrodistillation et entrainement a la vapeur d'eau.

Composés	Hydrodistillation %	Distillation a la vapeur %
Menthol	0.22	-
1, 6,10-Dodecatrien-3-ol, 3, 7,11-trimethyl	0.63	-
Oxide caryophyllene	0.17	-
Fokienol	3.37	1.89
C ₁₅ H ₂₂ O	1.79	-
C ₁₅ H ₂₄	0.14	-
C ₁₅ H ₂₂ O	1.14	-
Cubenol	-	0.29
C ₁₅ H ₂₄	0.77	-
C ₁₅ H ₂₂	0.32	-
C ₁₅ H ₂₄ O	0.52	-
C ₁₅ H ₂₂ O	0.89	-
Isobutyrate de 3- me'thoxycuminyll	0.71	-
C ₁₅ H ₂₄ O	0.33	-
3, 7,11-Trimethyl dodeca- 1, 6,10 trie`ne, 3,9-diol	0.85	-
C ₁₅ H ₂₂ O	0.85	-
Phytone	0.31	-
C ₁₅ H ₂₂ O ₂	4.65	8.11
Acide Pentadecanoique	1.85	-
12-Carboxyeudesma-3,11 (13) diene	28.88	56.81
Acide 2,3- Dihydrocostique	-	3.25
Acide n-Hexadecanoique	5.38	1.91

Phytol	2.96	0.28
Acide 9,12-Octadecadienoïque	2.03	-
Acide Linoléique	7.80	0.74
Acide Octadécanoïque	-	0.75
Tricosane	1.50	0.80
Tétracosane	0.80	0.78
Eicosanol	2.46	-
Pentacosane	5.43	2.31
Hexacosane	0.89	1.02
Heptacosane	4.82	2.09
Sesquiterpènes hydrocarboniques	1.23	-
Sesquiterpènes oxygénés	46.7	72.98
Acides gras	17.06	3.4
Alcanes	13.44	7
Alcools	6.9	0.28
Autres	1.24	-
Totals	86.57	83.66

1.5.3. Autres composés d'*Inula viscosa* L :

Les travaux d'Abu Zarga et *al* ont décrit la présence en plus de 14 composés identifiés dans l'huile essentielle d'*I. viscosa* de la région jordanienne, 6 nouveaux sesquiterpéniques de type eudesmane. Ces composés sont l'acide 3-hydroxyilicique, l'acide 3-hydroxy épilicique, l'acide 2-hydroxyilicique, l'acide 9-hydroxy-2-oxoisocostique, l'acide 1 hydroxyilicique et l'acide 2-hydroxyilicique [4,12].

La plante contient d'autres substances dites mineures comportant des résines et des pectines constituant une matière noirâtre : la Phytomélanine [1]

1.5.4. Etude de l'activité antibactérienne de l'*Inula viscosa* L

En 2009 F.Bssaibis et coll [4] ont étudié l'activité antibactérienne d'*Inula viscosa*. Cette activité a été étudiée sur les extraits préparés à partir des feuilles et des fleurs dans (l'éthanol, méthanol et l'acétone) où les meilleurs rendements d'extraction ont donné respectivement : 31.62% et 28.82%. Ils ont suggéré que ces activités soient attribuées aux différents métabolites secondaires de la plantes tels que : les phénols et les terpènes [4].



Chapitre N° 2

Généralités sur

les huiles essentielles

Chapitre 2 : Généralités sur les huiles essentielles

Les plantes sont dites médicinales lorsque l'un de leurs organes possède des activités pharmacologiques pouvant conduire à des emplois thérapeutiques. Les plantes sont capables de produire de substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires, ils accumulent des métabolites secondaires parmi lesquels, on trouve les huiles essentielles, très utilisées par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire.

2.1. Définition des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges de composés aromatiques des plantes, ne se compose que de substances aromatiques volatiles, elle est soluble dans l'huile et dans l'alcool mais pas dans l'eau. [15,16]. Selon la pharmacopée française, les huiles essentielles sont : « des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatiles contenu dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation » [16].

Selon AFNOR : ce sont des produits obtenus soit à partir de matières premières naturelles par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau, soit à partir des fruits de Citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques. [17]

2.2. Répartition et localisation des HE

Les substances aromatiques naturelles, appelées essences, sont produites dans des glandes spécialisées de différentes parties des plantes [15], Se rencontrent dans tous les organes végétaux

- Écorce: cannelier
- Rhizomes: gingembre
- Racines: vétiver
- Bois: camphrier
- Sommités fleuries: lavande
- Fruit : citron.
- Graines : coriandre.

Elles peuvent être présentes à la fois dans différents organes la composition de l'huile peut varier d'un organe à l'autre.

Elles peuvent être localisées dans :

- Des cellules sécrétrices
- Des poils sécréteurs
- Des poches sécrétrices
- Des canaux sécréteurs [18].

2.3. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

2.3.1. Propriétés organoleptiques

- aspect: état liquide à température ambiante
- odeur: volatilité (caractère odorant)
- couleur: incolore à brun foncé [18]

2.3.2. Propriétés physiques

- densité ou masse spécifique ; elles ont généralement une densité inférieure à celle de l'eau ($d < 1$). [17, 18,19]
- déviation polarimétrique. [17]
- indice de réfraction généralement élevé. [17,18]
- insoluble dans l'eau, oxydent avec la lumière et en contact de l'air. [19]
- Solubles dans les solvants organiques, les huiles, la vaseline et les alcools de titre élevé (éthanol). [19]
- généralement liquide à la température ambiante. [19]

2.3.3. Propriétés chimiques

- indice d'acide ;
- indices d'esters ;
- indice de saponification [17,19]

2.4. Les paramètres influençant la qualité des huiles essentielles

La composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant diverses conditions : l'environnement, origine géographique, la période de récolte, le séchage, lieu de séchage, la température étudiée de séchage. Les conditions principales requis pour une production rentable en huiles essentielles sont : bon matériel végétal, variété de la plante, le sol, équipement de distillation et le climat [16].

2.5. Composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes pouvant contenir plus de 300 composés différents, les constituants sont principalement des composés terpéniques soit les monoterpènes (myrcène, α -pinène, γ -terpinène, sabinène, etc) et les sesquiterpènes (β -caryophyllène, α -humulène, β -bisabolène, etc) de formule générale $(C_5H_8)_n$, les composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures incluant des alcools, des aldéhydes, des esters, des éthers, des cétones, des phénols et des oxydes.

La figure 5 présente la structure de quelques composants retrouvés dans l'huile essentielle. [16,20]

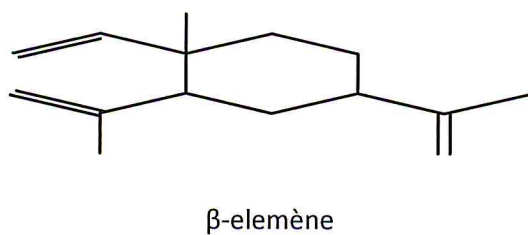
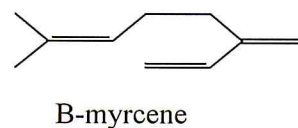
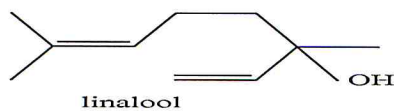
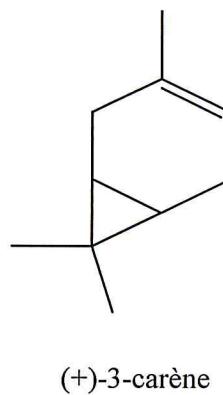
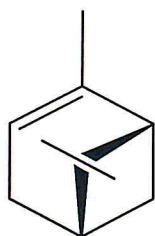
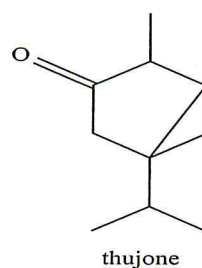
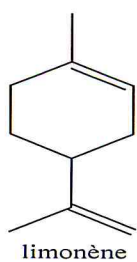
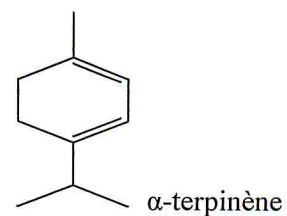
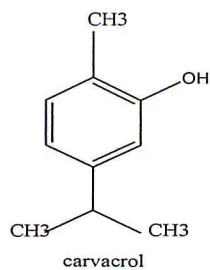
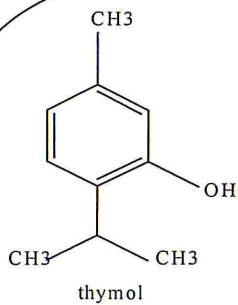


Figure 5 : structures de quelque substance rencontre dans l'huile essentielle.

2.6 Activité biologique des huiles essentielles

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne et d'origine fongique. Cependant, elles possèdent également, des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre. Dans les domaines phytosanitaires et agro-alimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires. Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques appartiennent à la famille des *Labiatae* : thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge, etc... L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique et les possibles effets synergiques entre ses composants [21,22].

2.7. Les méthodes d'extraction d'huile essentielle

2.7.1. L'hydrodistillation

L'hydrodistillation est la technique de référence dans l'étude des composés volatiles d'une plante dans le domaine de la recherche. L'hydrodistillation est la méthode normée pour l'extraction des huiles essentielles à partir des épices sèches, ainsi que pour le contrôle de qualités des huiles essentielles au laboratoire. Son principe consiste à immerger la matière végétale dans un bain d'eau, ensuite l'ensemble est porté à ébullition sous pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau un mélange azéotropique. Ensuite, ce mélange azéotropique « eau + huile essentielle » est condensé, refroidi et récupéré dans un essencier ou vase florentin [23.24].

L'huile essentielle étant plus légères que l'eau (sauf quelques rares exceptions) elle surnage au dessus de l'hydrolat cette technique a été appliquée dans des nombreuses travaux [20].

2.7.2. Entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'un des procédés d'extraction les plus anciens et l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est soumis à l'action d'un flux de vapeur descendant ou ascendant sans macération préalable. Le plus souvent, de la vapeur d'eau est injecté au bas d'une charge végétale. Les vapeurs chargées en composés volatils sont condensées avant d'être décantées et récupérées dans un essencier (vase de décantation pour les huiles essentielles) [25].

2.7.3. Expression à froid

Les huiles essentielles d'agrumes sont les seules à être extraites par le procédé d'expression à froid, qui est basé sur la rupture des péricarpes riches en huiles essentielles. L'huile essentielle ainsi libérée est entraînée par un courant d'eau. Une émulsion constituée d'eau et d'essence se forme. L'essence est alors isolée par décantation. Diverses techniques manuelles ou mécaniques, traitant le fruit entier ou seulement les écorces, sont utilisées [26].

Il existe d'autres méthodes des huiles essentielles moins utilisés telles que : l'extraction au CO₂ supercritique, l'extraction par micro-ondes, l'enfleurage, la macération...etc [19].



Partie expérimentale



Chapitre N^o 3

Matériels et méthodes

Chapitre 3: Matériels et Méthodes

3.1. Matériel Végétal

L'espèce *Inula viscosa* (figure 6) étudiée provient de la région de Bougara de la wilaya de Blida, située à 30 Km du sud est d'Alger. Cette région est située à un étage bioclimatique sub-humide à hiver froid, localisée à une altitude de 950 m, 36°27 de latitude et de 2°52 de longitude, caractérisée par un sol est siliceux, pauvre en calcaire et la matière organique se minéralise lentement [27].

L'identité et la systématique de la plante ont été confirmées au niveau du laboratoire de botanique du Jardin d'Essais d'El Hama (Alger).

Les parties de la plante utilisées pour l'extraction de l'huile essentielle sont les parties aériennes, constituées des feuilles et des tiges. Elle a été cueillie durant le mois d'Avril et de Mai 2012. Cette période correspond au stade du développement végétatif de la plante durant la période printanière.



Figure 6 : La plante *Inula viscosa*.

Le schéma directeur des différentes étapes de notre étude est illustré par l'organigramme suivant :

3.2. Extraction de l'huile essentielle de l'espèce étudiée

Nous avons réalisé l'extraction de l'huile essentielle d'*Inula viscosa* à l'échelle laboratoire en utilisant le procédé entraînement à la vapeur d'eau où nous avons étudié l'influence de la durée d'extraction sur le rendement en huile essentielle. Pour ce faire, nous avons procédé à l'extraction de l'HE de la matière végétale en réalisant des essais en fonction du temps.

3.2.1. Appareillage

L'extraction de l'huile essentielle d'*Inula viscosa* par entraînement à la vapeur d'eau en utilisant le dispositif expérimental schématisé dans la figure 8.

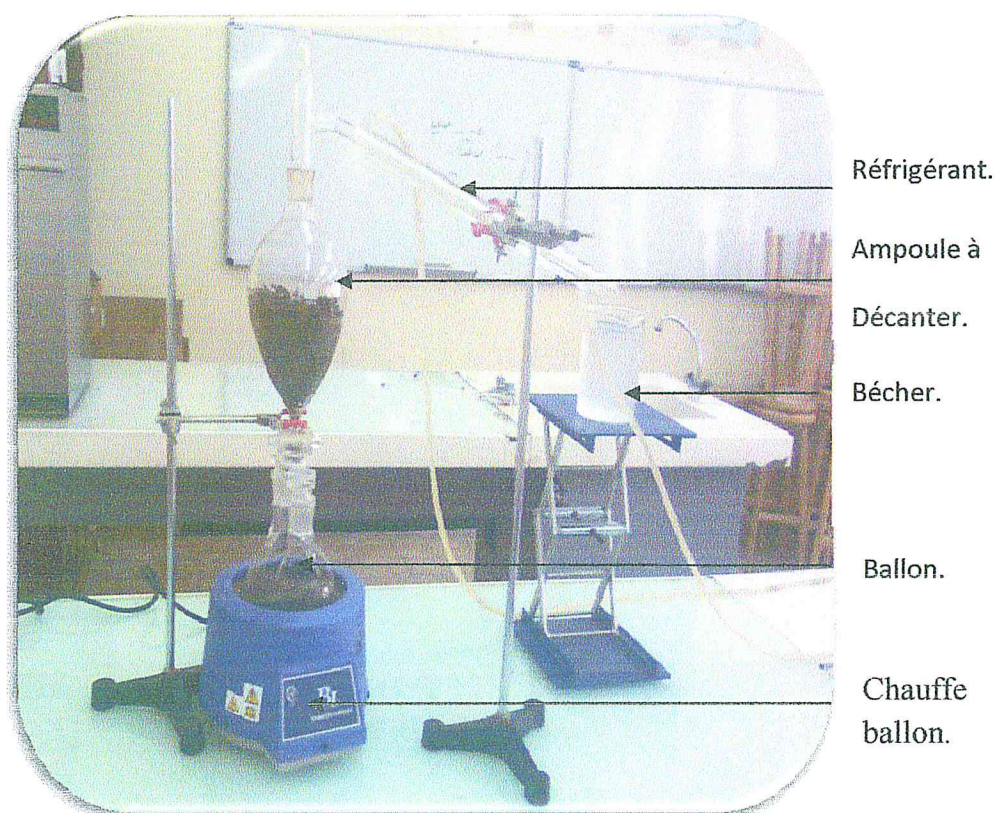


Figure 8 : Montage d'entraînement a la vapeur.

Il est composé de :

- Une source de chaleur (chauffe ballon).
- Un ballon de capacité de 1000 ml rempli au 2/3 d'eau surmonté par une ampoule à décanter contenant la matière végétale.
- Un coude reliant l'ampoule au réfrigérant.
- Le réfrigérant est alimenté par un système de refroidissement.
- Un bécber pour la récupération du distillat (HE +eau).

3.2.2. Protocole expérimental

- La matière végétale, préalablement pesée, est introduite dans l'ampoule à décanter. De la vapeur d'eau issue de l'ébullition de l'eau dans le ballon, traverse la matière végétale, et endommage la structure des cellules végétales, entraînant ainsi l'huile essentielle. Les vapeurs chargées en composés volatils sont condensées dans le réfrigérant et le mélange « eau –huile » est récupéré dans un vase de décantation (bécber). L'huile essentielle est récupérée par extraction liquide –liquide du distillat avec l'éther diéthylique (figure 9). Eliminer la phase aqueuse et filtrer la phase organique à travers un papier filtre contenant un sel de sulfate de magnésium ($Mg SO_4$) pour éliminer les traces d'eau.

L'huile essentielle est récupérée après évaporation de l'éther diéthylique dans un évaporateur rotatif (figure 10).

L'huile essentielle est conservée au réfrigérateur à l'abri de la lumière et à une température de 4°C.

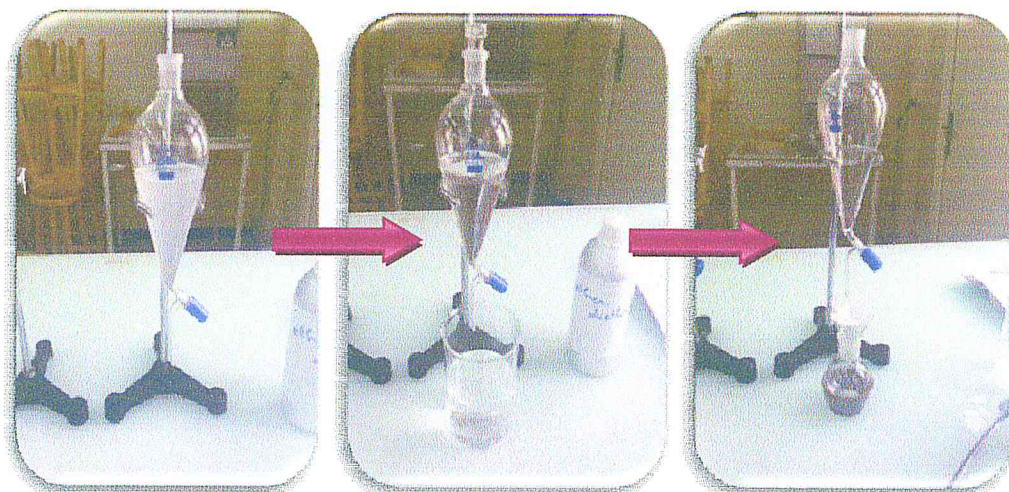


Figure 9: Extraction liquide- liquide de l'huile essentielle *d'imula viscosa*.

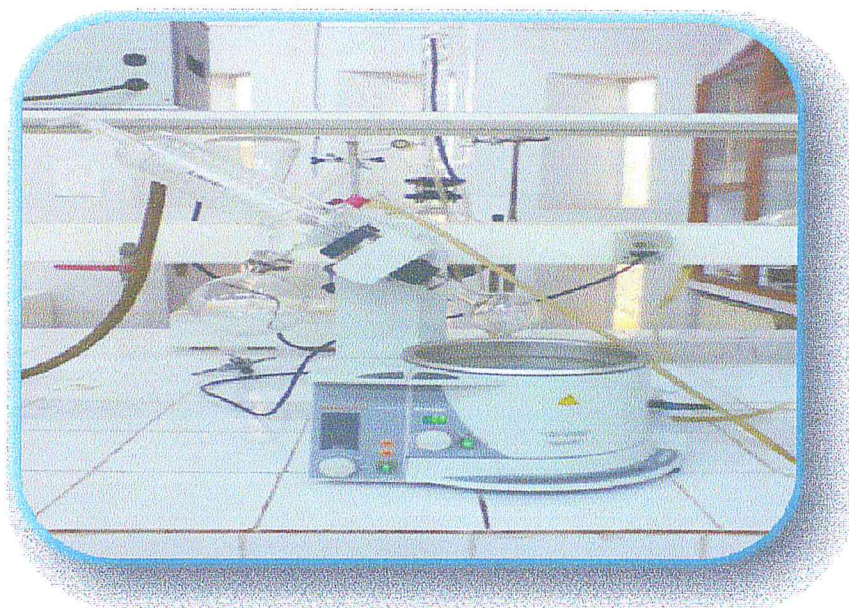


Figure 10 : Evaporateur rotatif

3.3. Calcul du rendement de l'huile essentielle

Le rendement en HE est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile récupérée (M_{HE}) en (g) et la masse de la matière végétale (M_{MV}) sèche utilisée en (g) multiplié par 100 [28].

$$R\% = (M_{HE}/M_{MV}) \times 100$$

3.4. Etude de la cinétique d'extraction de l'huile essentielle

La cinétique d'extraction permet de suivre et de comprendre le mécanisme du procédé d'extraction entraînement à la vapeur d'eau afin de déterminer le rendement optimal et la durée d'extraction optimale.

Pour ce faire, l'étude de cinétique d'extraction de l'huile essentielle est réalisée à partir de la plante sèche, où des prélèvements séquentiels de distillat sont effectués à différents intervalles de temps, ce qui nous a permis de tracer la courbe du rendement en fonction du temps d'extraction.

3.5. Propriétés physico-chimiques et organoleptiques de l'huile essentielle *d'Inula viscosa*

La qualité d'une huile essentielle et sa valeur commerciale sont établies par des normes spécialisées et portant sur les indices physico-chimiques.

Dans cette partie, nous avons déterminé les différentes propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau, suivant la norme A.F.N.O.R.

3.5.1. Mesure des grandeurs physiques

➤ Détermination de la densité

C'est le rapport de la masse d'un certain volume d'HE à la masse d'un volume égal d'eau à pour une température constant. Elle est mesurée à l'aide d'un pycnomètre (Figure 11).



Figure 11 : pycnomètre.

➤ **Détermination de l'indice de réfraction (Norme NF T 75-112) [29]**

C'est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'HE maintenue à une température constante.

On mesure l'indice de réfraction à l'aide d'un réfractomètre (figure 12) à la température ambiante puis ramenés à 20°C par la formule :

$$I_{20} = I_t + 0,00045 (T - 20^\circ\text{C})$$

I_{20} : indice à 20°C.

I_t : indice à la température ambiante ou de mesure.

T : Température ambiante ou de mesure.



Figure 12 : Réfractomètre.

3.5.2. Mesure des indices chimiques

➤ **Détermination de l'indice d'acide (Norme NF T 75-103) [29]**

C'est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans un gramme d'huile essentielle.

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

$$I_A = V.C.56.11/m$$

V : le volume, en mg de la solution KOH utilisée pour le titrage.

C : la concentration exacte en moles par litres de la solution KOH.

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

La figure suivante représente les différentes étapes de la détermination d'indice d'acide.

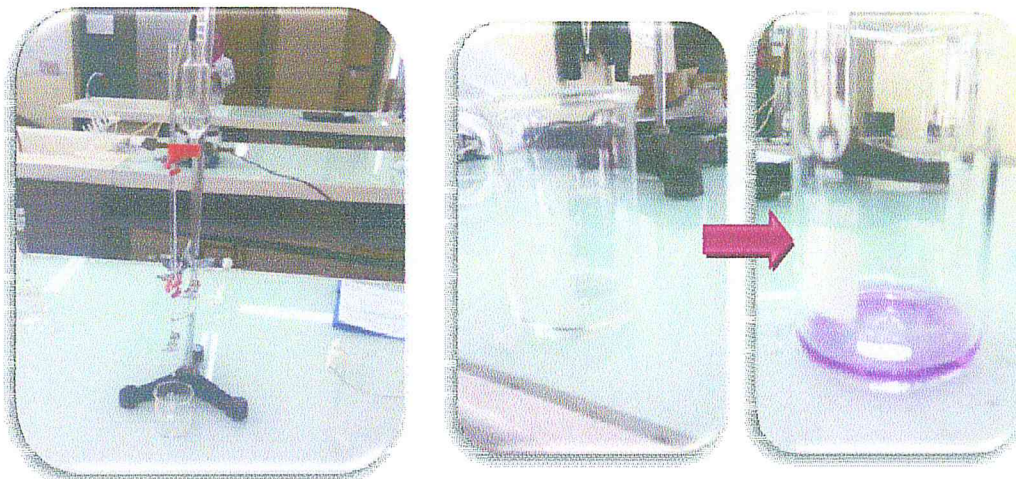


Figure 13 : les différentes étapes d'indice d'acide

➤ **Détermination de l'indice d'ester (Norme NF T 75-104) [29].**

C'est le nombre de milligramme d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans un gramme d'huile essentielle.

$$I_E = 28.05/m (V_0 - V_1) - I_A.$$

V_0 : le volume en ml, de la solution d'acide chlorhydrique utilisé pour l'essai à blanc.

V_1 : le volume en ml de la solution d'acide chlorhydrique utilisé pour la détermination.

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

3.5.3. Propriétés organoleptiques

Les propriétés organoleptiques de l'huile essentielle concernent la détermination de l'aspect, la couleur et l'odeur.

3.6. Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS).

L'huile essentielle d'*Inula viscosa* a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, en utilisant un chromatographe Hewlett packard série Agilent 6890 N, couplée à un spectromètre de masse Hewlett packard, série Agilent 5973 dans les conditions opératoires suivantes :

- Colonne capillaire HP5-MS de longueur 30m, 0,25mm de diamètre et d'épaisseur 0,25mm.
- Phase stationnaire : (5%-phényl) méthyl polysiloxane.
- Gaz vecteur : Hélium.
- Débit du gaz vecteur : 0,5ml/min
- Température de l'injecteur : 250°C
- Température du four : 60°C pendant 8min, de 60°C jusqu'à 280°C à raison de 2°C/min, 10min à 280°C.
- Quantité injectée : 0,2µl. Mode d'injection : split 20/1
- Détecteur : MS.
- Mode : SCAN.
- Température de l'interface : 280°C.
- Type d'ionisation : électronique.
- Intensité du filament : 70ev.
- Type de l'analyseur de masse : Quadripôle.
- Température du quadripôle : 150°C.
- Température de la source : 230°C.

L'identification des composés est confirmée par comparaison de leurs spectre de masse ion fragment caractéristiques obtenus expérimentalement à ceux inventoriées dans la banque de bibliothèques spectrales (Chemstation (Nist 98)).

3.7. Etude de l'activité antimicrobienne d'HE d'*inula viscosa*

Les plantes aromatiques et médicinales ont un spectre d'action très large du point de vue d'activité antimicrobienne car elles possèdent le pouvoir d'inhiber la croissance des bactéries, des moisissures et des levures. Les tests ont été réalisés au niveau de l'unité de bactériologie clinique de laboratoire centrale de l'Etablissement Public Hospitalier de BOUFARIK. Les tests biologiques sont effectués sur cinq souches microbiennes pathogènes 3 bactéries : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, et 2 levures : *Candida albicans*, *candida dubliniensis* par la méthode de diffusion sur milieu solide (gélose).

3.7.1. Principe générale

L'aromatogramme qui est l'équivalent de l'antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par les huiles essentielles. L'aromatogramme est un test qui permet de mesurer la capacité d'une HE à inhiber la croissance bactérienne.

Cette méthode appelée méthode par diffusion consiste à déposer un disque stérile en cellulose (diamètre : 9 mm) imprégnés avec une quantité d'huile essentielle.

Les disques sont déposés sur la surface d'une gélose uniformément ensemencé d'une suspension de bactérie à étudier (0.5 MCF).

Pendant l'incubation l'huile essentielle va diffuser à partir du centre du disque. La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre en (mm) de la zone claire autour du disque, appelée : zone d'inhibition (diamètre d'inhibition), cette dernière est le critère qui détermine la résistance ou la sensibilité de la bactérie vis-à-vis de la substance antibiotique. [30,31]

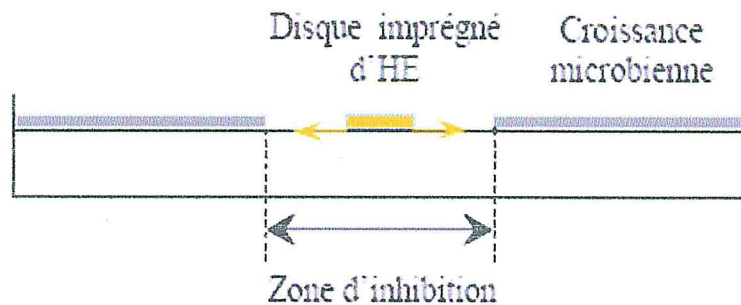


Figure 14: Aromatogramme sur boîte de pétri à diffusion linéaire à partir d'un disque imprégné d'huile essentielle

3.7.2. Matériels utilisés

- Les souches microbiennes référencées ATCC (American Type Culture Collection) proviennent de l'unité de bactériologie clinique de laboratoire centrale de l'Établissement Public Hospitalier de BOUFARIK. Le tableau regroupe les références.
- Les milieux de culture utilisés sont Muller Hinton pour les bactéries *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et Sabouraud pour les levures : *Candida albicans* et *Candida dubliniensis*.
- les disques stériles de papier de Wathman de 9 mm de diamètre.

Les caractéristiques des différentes souches utilisées sont représentées dans le tableau suivant.

Tableau 5 : Caractéristiques des souches microbiennes testées.

Nom de la souche	N° ATCC	Gram	Principale infections causées	
<i>Escherichia coli</i>	25922	-	-Diarrhées dysentériques. -Gastro-entérites.	Bactéries
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	+	-Infections urinaires. -Gastro-entérites. -L'ostéomyélite et l'arthrite.	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	-	-Crampes abdominales. -Troubles digestifs.	
<i>Candida albicans</i>	-		-Lésions cutanées. -Infections œsophagiennes. -Infections génitales.	Levures
<i>Candida dubliniensis</i>	-			

Les différentes étapes de cette étude sont illustrées par la figure 15.

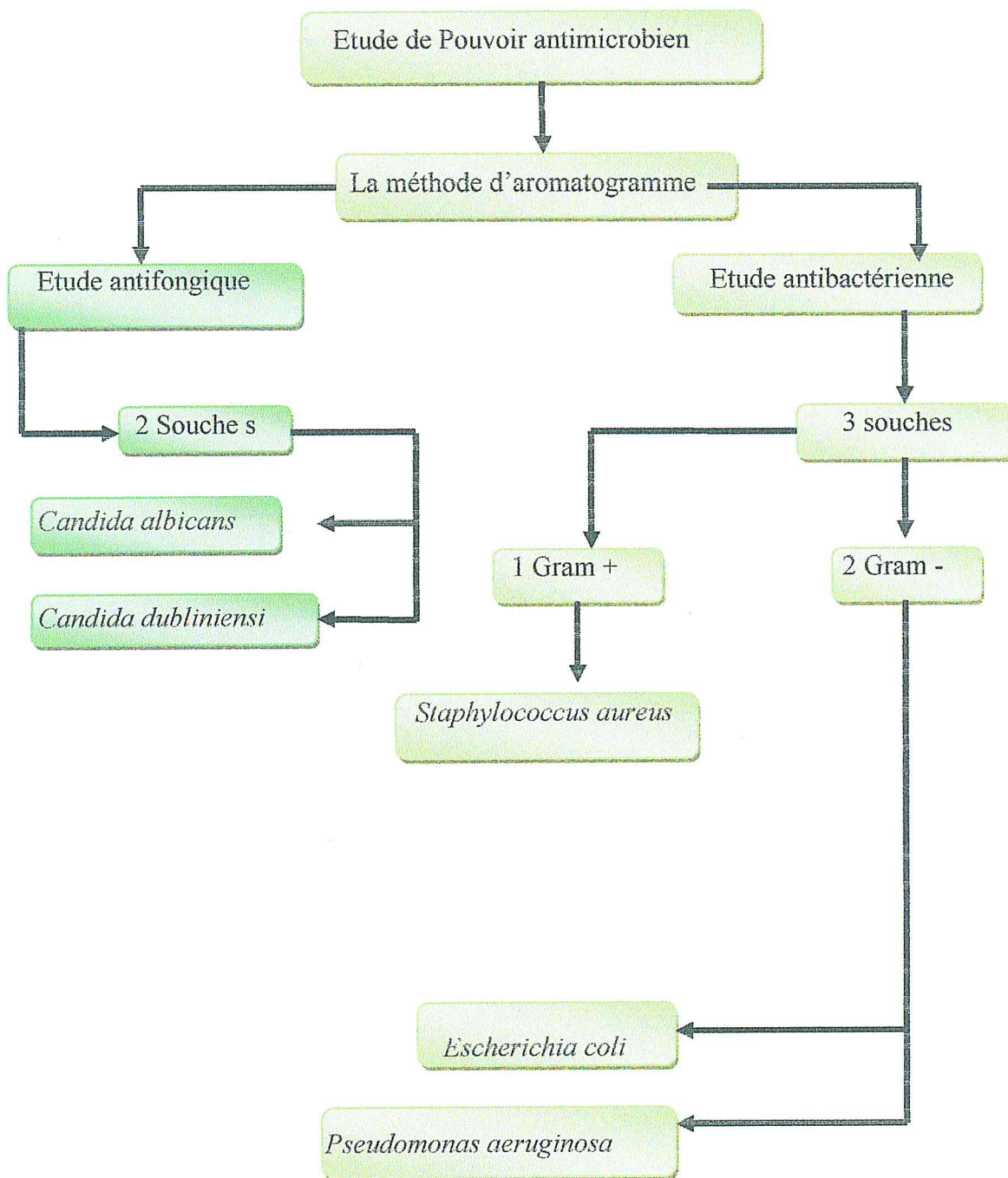


Figure 15: Représentation de l'étude antimicrobienne.

3.7.3. Protocole expérimental

➤ Préparation des milieux de culture

Dans un bain Marie infuser les milieux gélosée (Muller Hinton : MH pour les bactéries et Sabouraud : SAB pour les levures)

Couler le milieu dans des boîtes de pétri de 90mm avec une profondeur de 4mm.

Bien sécher les boîtes avant utilisation 10-20mn/35°C (figure16).



Figure 16: Gélose fusionne dans des boîtes de pétri.

➤ Préparation de l'inoculum

Les suspensions bactériennes ont été réalisées par prélèvements de 3 à 4 colonies isolées d'une culture pure de 18h pour les bactéries et 48h pour les levures. Elles sont diluées dans un 10ml d'eau physiologique stérile, puis agiter au vortex pour obtenir une suspension légèrement opale ensuite leurs densités optiques (DO) ont été mesurées à 625 nm. la densité optique des suspensions est fixée à 0,1 qui est l'équivalent de 0.5Mc Farland.



Figure 17: Agitation de la solution bactérienne avec un vortex.



Figure 18: mesure de densité avec un Densitomètre.

➤ **Ensemencement**

A l'aide d'un écouvillon stérile trempé dans la solution bactérienne, étaler la surface gélosée (figure 19).



Figure 19 : Ensemencement de la suspension bactérienne sur les milieux gélosés.

➤ Dépôts des disques

Des disques stériles de 9 mm du diamètre, imbibés d'une quantité d'huile essentielle *d'Inula viscosa*, sont déposés sur la surface gélifiée. Après diffusion de l'HE dans la gélose pendant 30min à température ambiante, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et à 25°C pendant 48 heures pour les levures (Figure20, 21).

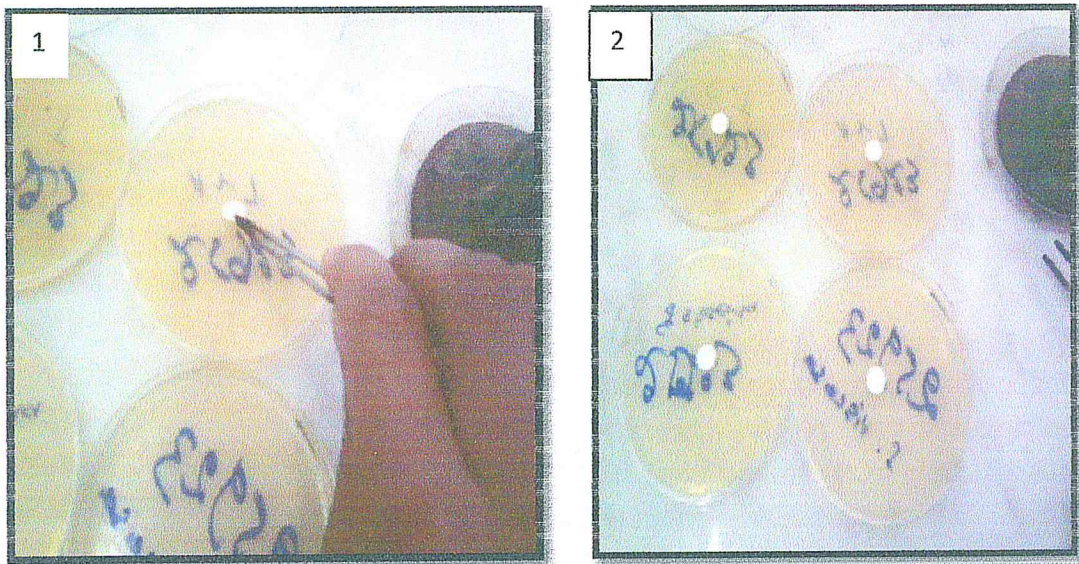


Figure 20 : Dépôt des disques sur le milieu gélifié.

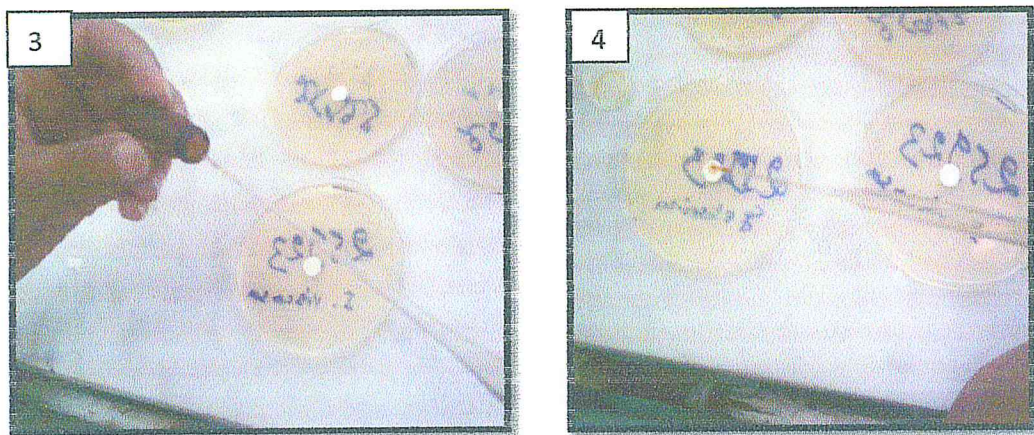


Figure 21: Imbibé de l'huile essentielle *d'Inula viscosa*.

➤ Lecture

La lecture s'effectue après 24h d'incubation par la mesure du diamètre de zone d'inhibition. Plus la zone d'inhibition est grande, plus la bactérie est sensible vis-à-vis l'huile essentielle.

3.8. Etude de pouvoir antioxydant de l'huile essentielle *d'inula viscosa* par la méthode de radicale libre DPPH.

Pour évaluer l'activité antioxydant, nous avons utilisé la méthode du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) selon le protocole décrit par la littérature [19, 32-35]

Dans ce test les antioxydants réduisent le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune [36], le piégeage du radical DPPH+ est suivi par la diminution de l'absorbance à 517nm qui est due à la réduction du radical par l'antioxydant contenu dans les échantillons (figure22).

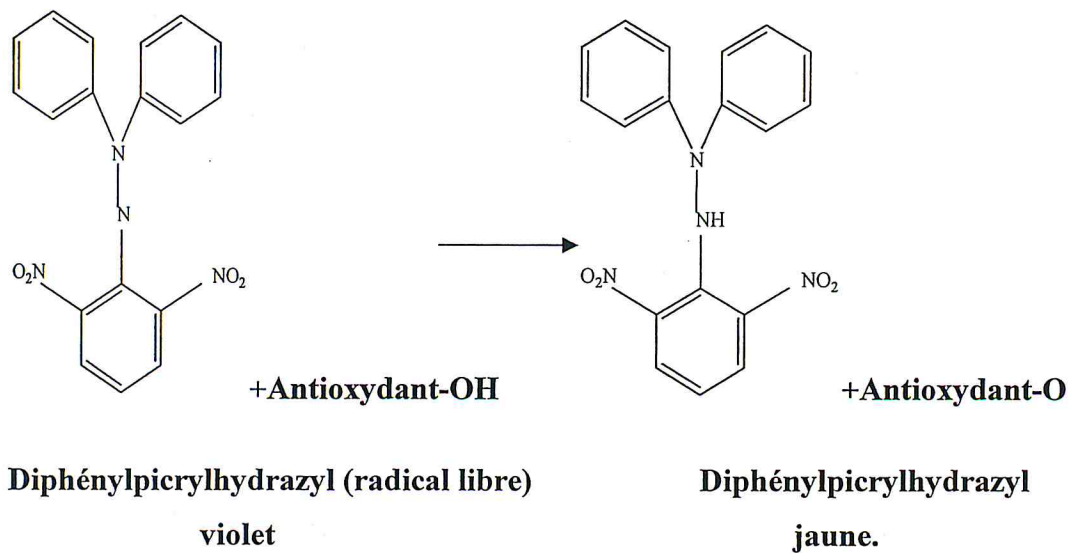


Figure 22 : Forme libre et réduite de DPPH.

3.8.1. Matériels utilisés

- Une fiole de 100 ml pour la solution DPPH.
- Papier aluminium.
- Pipettes de 1 ml et une micropipette.
- Des tube à essaie.
- Un spectrophotomètre UV-visible.
- Une Balance.

3.8.2. Mode opératoire

3.8.2.1. Préparation de la solution DPPH

La solution de DPPH a été préparée avec 4mg de DPPH dissout dans 100 ml de méthanol absolu, a une concentration de 0.004%.

3.8.2.2. Préparation des échantillons

Pour le test échantillons ont été préparés par dissolution dans le méthanol absolu. On prépare des solutions dans du méthanol absolu à raison de 0.5mg de l'huile essentielle *d'Inula viscosa* dans 1 ml de méthanol, ces solution dites solution mères, en suite en faire des dilutions pour en avoir différentes concentration de l'ordre de mg par ml.

3.8.2.3. Préparation de la solution de vitamine C

Préparées par dissolution de 0.2 mg de la vitamine C dans 1ml de méthanol et en fait des dilutions. L'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon testé.

3.8.2.4. Méthode au DPPH

Dans des tubes secs et stériles, on introduit 1ml du méthanol et les différentes concentrations de la solution à tester, on ajoute 1 ml de la solution DPPH. Après agitation, les tubes sont placés à l'obscurité, à une température ambiante (25°C)

pendant 30 min. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 517 nm après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. La lecture est effectuée par la mesure d'absorbance à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible.

3.8.2.5. Expression des résultats

Le pourcentage de réduction du radical libre DPPH est exprimé par la formule suivante [32] :

$$AA\% = [(Abs\ c - Abs\ e) / Abs\ c] \times 100$$

AA%: Activité antioxydant.

Abs : Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm.

Abs c : Absorbance du contrôle.

Abs e : Absorbance de l'échantillon testé.

Nous avons déterminé la valeur Ic_{50} de l'huile essentielle qui représente la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH.

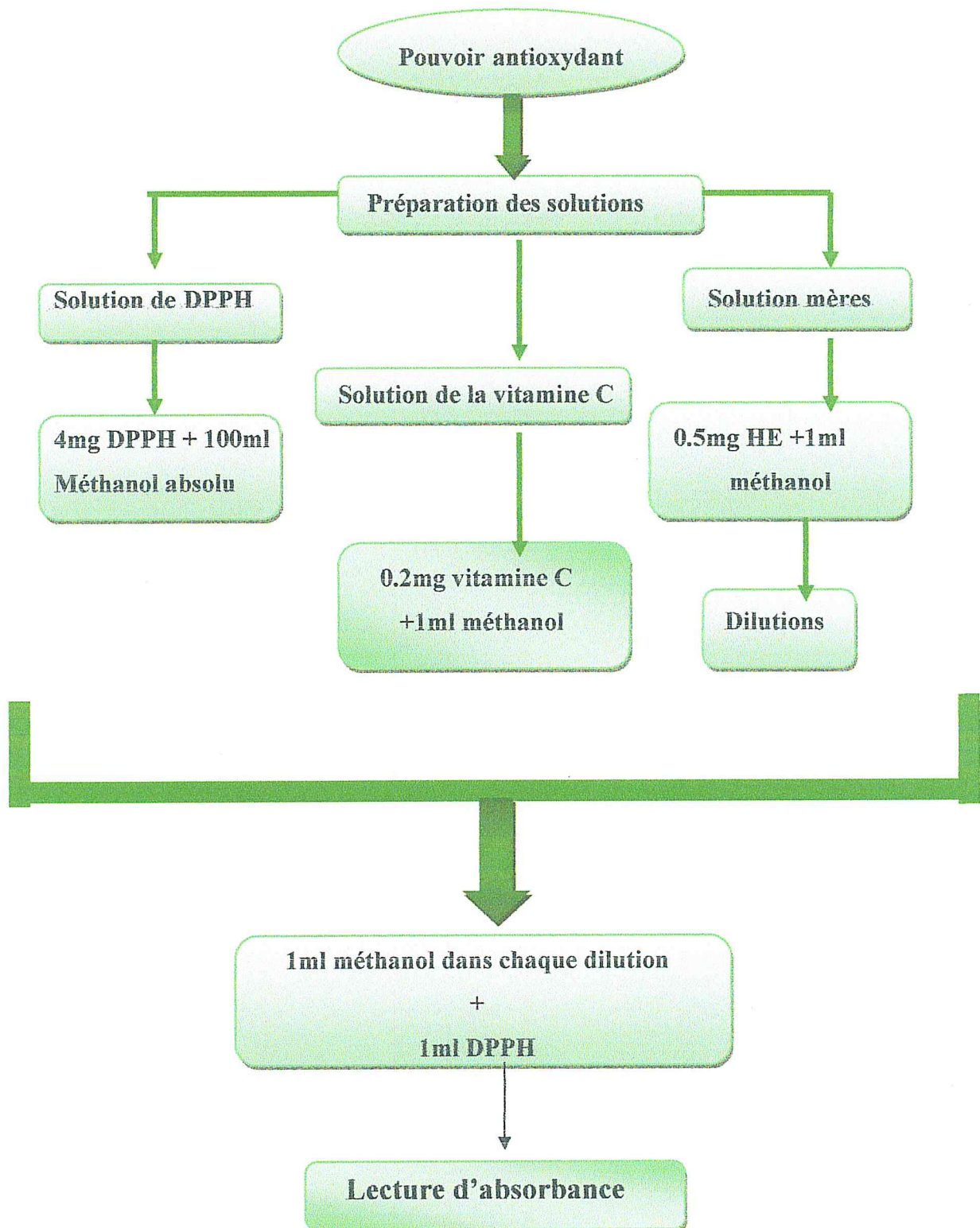


Figure 23 : Représentation de l'étude du pouvoir antioxydant.



Chapitre N° 4

Résultats et discussions

Chapitre 4: Résultats et discussions

4.1. Extraction de l'huile essentielle d'*Inula viscosa* par entraînement à la vapeur d'eau

L'huile essentielle de la partie aérienne d'*Inula viscosa* a été extraite par entraînement à la vapeur d'eau à l'échelle laboratoire. L'étude du rendement a été effectuée en fonction de la durée d'extraction, paramètre pouvant influencer le rendement en huile essentielle.

4.2. Rendement en huile essentielle d'*Inula viscosa*

Nous avons réalisé une série d'extraction de l'huile essentielle d'*Inula viscosa* par entraînement à la vapeur d'eau, le rendement en huile essentielle varie entre 0.108% et 0.182%. Le rendement moyen en huile essentielle obtenu est de l'ordre de 0.144%. Cette valeur est comparativement faible à celle citée déjà dans la partie bibliographique (0.453%). Ceci est peut être du à d'autres facteurs pouvant influencer le rendement tels que : la durée de séchage, l'origine de l'espèce, la période de récolte.

4.3. Variation du rendement en huile essentielle en fonction de la durée d'extraction

Lors de cette étude, un suivi cinétique a été réalisé sur l'extraction de l'huile essentielle de la partie aérienne de l'espèce étudiée.

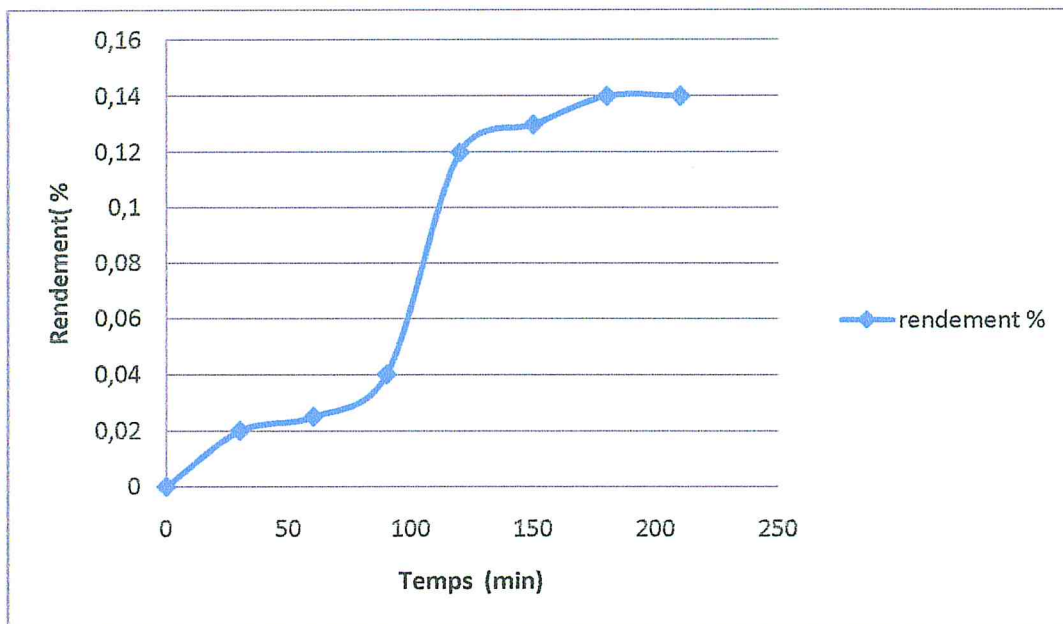


Figure 24 : Evolution du rendement de l'huile essentielle d'*Inula viscosa*
En fonction de la durée d'extraction

D'après les résultats obtenus, on remarque que :

La première goutte d'huile essentielle est récupérée au bout d'un temps égal à 30 min.

L'allure générale de la courbe représentant le rendement en fonction du temps est croissant. Il augmente progressivement jusqu'à atteindre un maximum égal à 0,14%. Au bout de 180 min, un palier est enregistré et au-delà de ce temps, la variation du rendement est négligeable.

Cette courbe suggère trois étapes :

- Une première étape, lente allant du début d'extraction jusqu'à 90 minutes et un rendement très faible.
- Une seconde étape, où plus de 90% de l'HE est extraite, cette étape est légèrement rapide entre 100 et 180 minutes.

- Une troisième étape correspond à une ligne horizontale qui enregistre la fin de l'extraction et à la cour de cette étape la courbe tend vers un pallier qui correspond au rendement maximal possible.

4.4. Caractérisation de l'huile essentielle d'*Inula viscosa*

Dans cette partie, nous avons déterminé les propriétés organoleptiques et physico-chimiques. Ces propriétés constituent un moyen de vérification et de contrôle de qualité de l'huile essentielle.

4.4.1. Caractéristiques organoleptiques

Les différentes caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur et odeur) de l'huile essentielle ont été notées à l'issue de sa récupération.

Tableau 6: Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle d'*Inula viscosa*

Aspect	Couleur	Odeur
Liquide, visqueuse, mobile	Marron	Forte odeur, herbacée Caractéristique

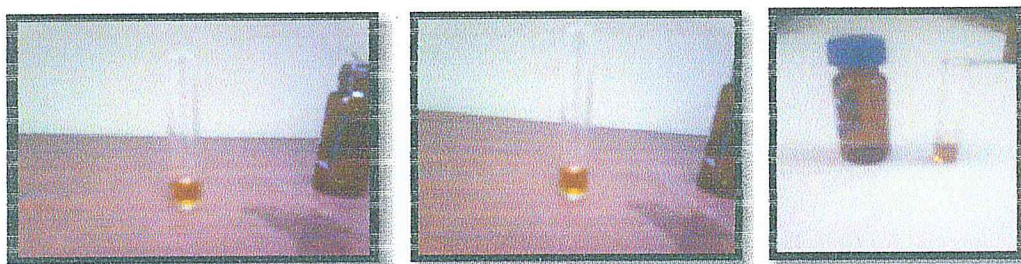


Figure 25 : Huile essentielle de l'*Inula viscosa*.

4.4.2. Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle *d'Inula viscosa*

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 7 : propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle *d'Inula viscosa*

	Densité (d_{20})	Indice de réfraction à 20°C	Indice d'acide (I_A)	Indice d'ester (I_E)	Indice de saponification (I_S)
HE <i>d'Inula viscosa</i>	0.98	1.363	11.22	49.03	60.25

➤ La valeur d'indice de réfraction mesurée est légèrement supérieure à l'indice de réfraction de l'eau à 20°C (1,333). Le faible indice de réfraction de l'HE indique leur faible réfraction de la lumière, ce qui pourrait favoriser leur utilisation dans les produits cosmétiques [37].

➤ L'indice d'acide (I_A) montre le taux des acides libres dans l'HE. Une valeur élevée indique une dégradation d'HE (hydrolyse des esters) durant sa conservation. Inversement, un I_A inférieur à 2 est un indice de bonne conservation de l'HE [38]. La valeur de l'indice d'acide I_A obtenue montre que notre huile essentielle est stable et ne provoque pas d'oxydation inquiétante (bonne conservation des HE extraite) [39].

➤ L'huile extraite est caractérisée par un indice d'ester élevé ce qui ne permet pas une longue durée de conservation.

La détermination des propriétés physico-chimiques est une étape nécessaire mais demeure non suffisante pour caractériser l'huile essentielle. Il est primordial de déterminer le profil chromatographique de l'huile essentielle.

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

54 composants, représentant 96% de l'huile essentielle d'*Inula viscosa* sont identifiés. Les composés obtenus de l'huile essentielle à plus de 1% sont listés dans le tableau 8. Le chromatogramme de l'huile essentielle obtenue est donné dans la figure 26.

Tableau 8 : Constituants majoritaires de l'huile essentielle d'*Inula viscosa* analysée par CG/MS.

N°	Temps de rétention (min)	Teneur relative (%)	Nom des composés	Formule
1	2,73	2,36	Méthyl-cyclopentane	C ₆ H ₁₂
2	51,98	1,19	1,6,10-dodécatrien-3-ol,3,7,11-triméthyl	C ₁₅ H ₂₆ O
3	52,97	2,81	Oxyde de caryophyllène	C ₁₅ H ₂₄ O
4	54,19	10,08	[(E)-2-Chlorovinyl](triméthyl)silane	C ₅ H ₁₁ ClSi
5	55,09	3,13	Selina-6-én-4-ol	C ₁₅ H ₂₆ O
6	55,69	2,08	3,4-diméthyl,3-cyclohexén-1-carboxaldéhyde,	C ₉ H ₁₄ O
7	58,29	1,76	Acide acétique, 10,11-dihydroxy-3,7,11-triméthyl-dodeca-2,6-diényl ester.	C ₁₇ H ₃₀ O ₄
8	66,70	2,96	1-Isopropyl-pyrimidin-2(1H)-one	C ₇ H ₁₀ N ₂ O
9	70,51	44,65	acide 3-phényl propionique,2-tetrahydrofurylméthyl ester	C ₁₄ H ₁₈ O ₃
10	70,79	9,74	Acide 3,3,8,8-tétraméthyl-tricyclo[5,1,0,0(2,4)]oct-5-ène-5-propanoïque	C ₁₄ H ₂₀ O ₂

Abundance

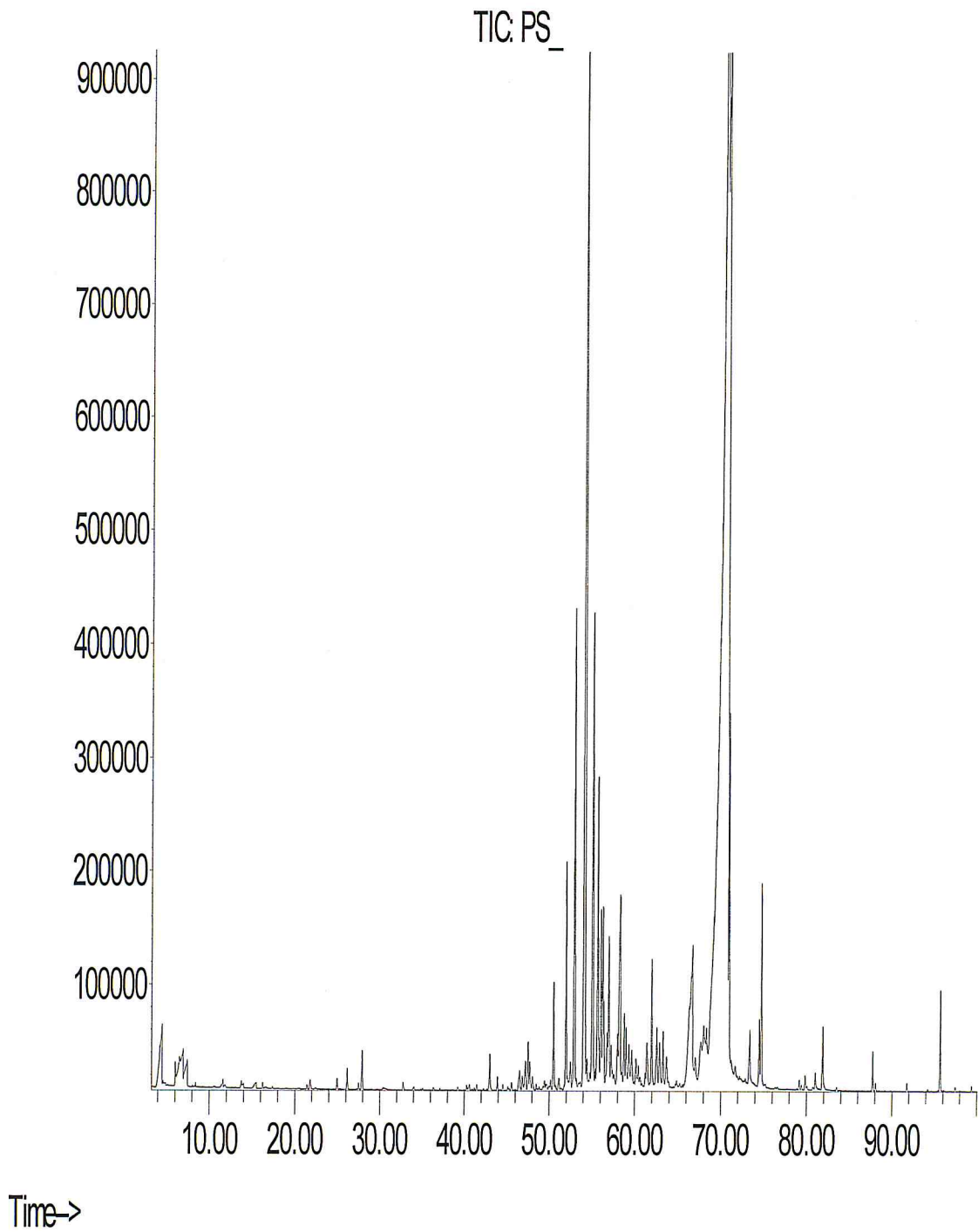


Figure 26 : Chromatogramme de l'huile essentielle de l'*Imula viscosa*

4.6. Activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*Inula viscosa*

Les tests de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de la plante *Inula viscosa* ont été effectués vis-à-vis de trois souches bactériennes et deux levures par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 9 : Diamètre d'Inhibition des souches bactériennes par l'huile essentielle d'*Inula viscosa*

Souche microbienne	Diamètre d'inhibition
<i>Escherichia coli</i>	< 9mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	14mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	< 8mm
<i>Candida albicans</i>	9mm
<i>Candida dubliniensis</i>	< 8mm

La sensibilité des souches aux différents agents antimicrobiens a été classifiée par le diamètre de la zone d'inhibition représenté dans le tableau suivant :

Tableau 10 : Relation entre le diamètre d'inhibition et la sensibilité des souches [40]

Diamètre	Sensibilité
$D > 20\text{mm}$	Extrêmement sensible
$15\text{mm} < D < 19\text{mm}$	Sensible
$9\text{mm} < D < 14\text{mm}$	Intermédiairement
$D < 8\text{mm}$	Non sensible (résistante)

Les résultats obtenus sont aussi présentés sur les figures suivantes :



Figure 27 : l'effet de l'huile essentielle d'*Inula viscosa* sur *Escherichia coli*.

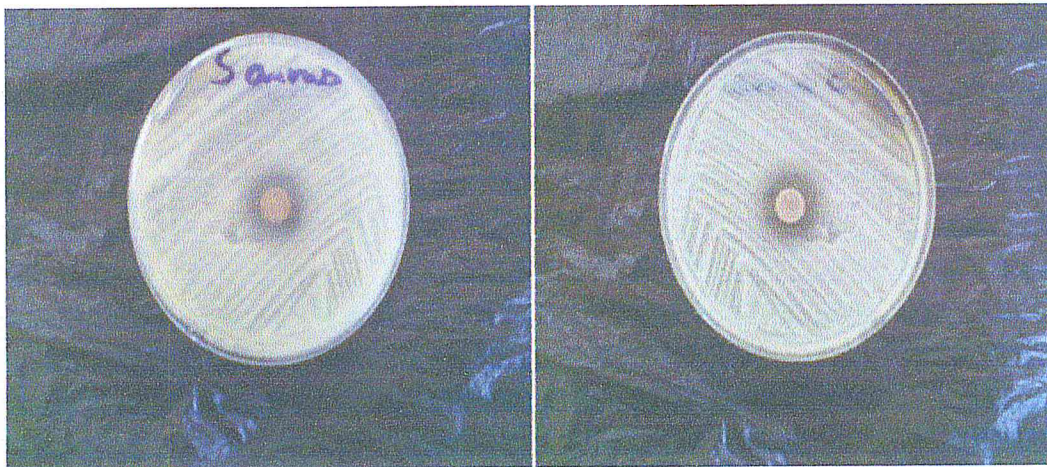


Figure 28: l'effet de l'huile essentielle d'*Inula viscosa* sur *Staphylococcus aureus*

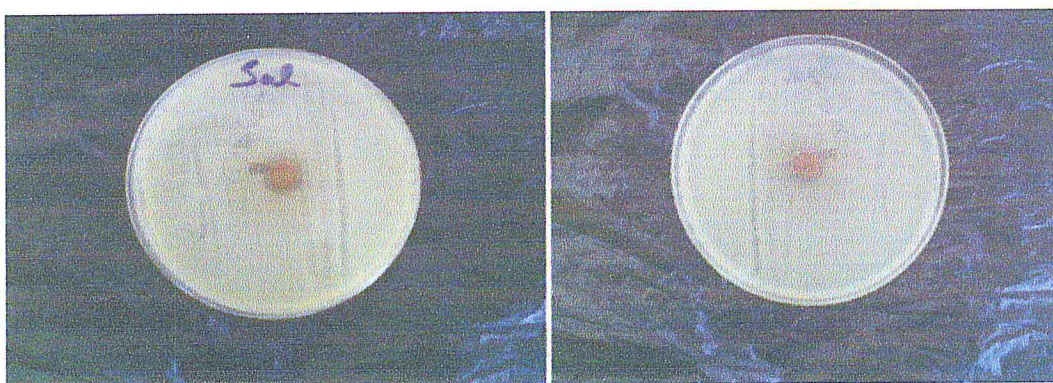


Figure 29 :L'effet de l'huile essentielle d'*Inula viscosa* sur *Pseudomonas aeruginosa*



Figure 30 : L'effet de l'huile essentielle d'*Inula viscosa* sur *Candida albicans*



Figure 31 : L'effet de l'huile essentielle d'*Inula viscosa* sur *Candida dubliniensis*

Les résultats obtenus montrent que la *Staphylococcus aureus* a donné une zone d'inhibition de diamètre égale à 14 mm. Cette souche bactérienne est moyennement sensible à l'HE de l'*Inula viscosa*.

Par contre, une résistance est observée avec les deux souches bactériennes : *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* qui n'ont aucune sensibilité vis-à-vis l'HE et aucune zone d'inhibition n'est observée.

Les deux levures utilisées : *Candida albicans* et *Candida dubliniensis* ont montré une grande résistance à l'huile essentielle avec une absence totale de zone d'inhibition. Ces deux levures ne présentent aucune sensibilité vis-à-vis l'huile essentielle d'*Inula viscosa*.

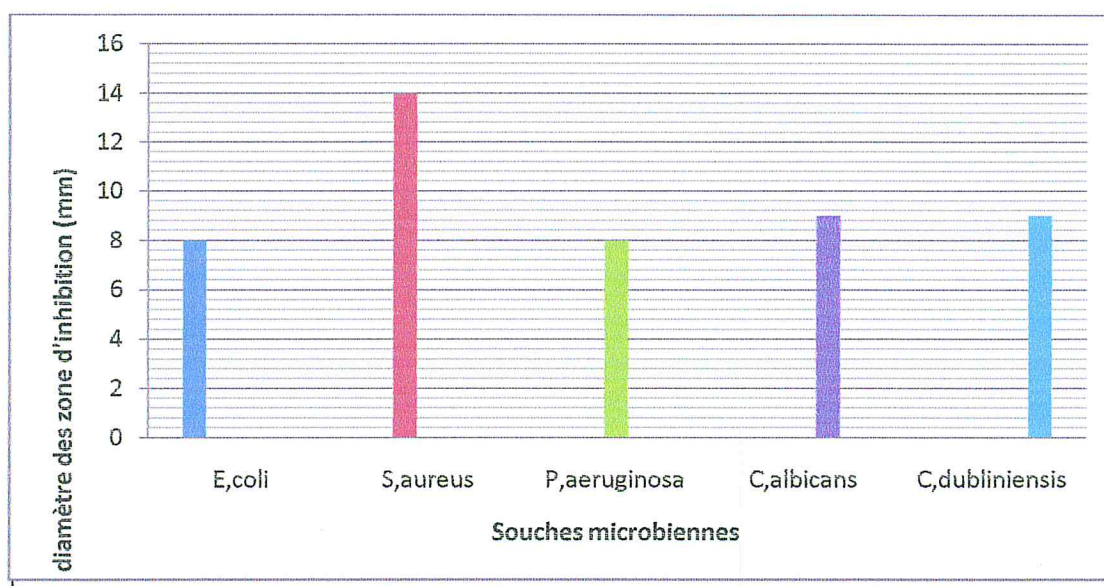


Figure 32 : Histogramme des diamètres d'inhibition des bactéries et des levures.

Selon les résultats, la bactérie *Staphylococcus aureus* est la bactérie la plus sensible à l'HE, elle a donné une zone d'inhibition la plus importante et notre huile essentielle d'*Inula viscosa* possède une activité antibactérienne vis-à-vis cette bactérie.

En comparant nos résultats avec une autre étude déjà effectuée au Maroc [5] sur l'activité antibactérienne de l'extrait des feuilles et des fleurs d'*Inula viscosa*. Il a

été démontré que les souches : *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* présentent une sensibilité maximale et n'ont aucune résistance sur l'extrait d'*Inula viscosa* provenant du Maroc.

4.7. Evaluation de l'activité antioxydante (test au DPPH) :

L'activité antioxydante exprime la capacité de la réduction des radicaux libres pour l'huile essentielle. Nous avons utilisé la méthode au DPPH, ce radical libre présente une coloration violet sombre, lors qu'il est piégé par des substances antioxydantes et présente une coloration jaune pale dans sa forme réduite. Le virage de la couleur violet vers le jaune pale et l'intensité du changement de la couleur dépend de la nature, de la concentration et de la puissance de la substance antiradicalaire. Le pouvoir antioxydant des HE dépend largement de sa Composition chimique et des conditions de manipulation des tests.

Pour l'évaluation de cette activité, on a préparé une gamme de dilutions pour l'acide ascorbique

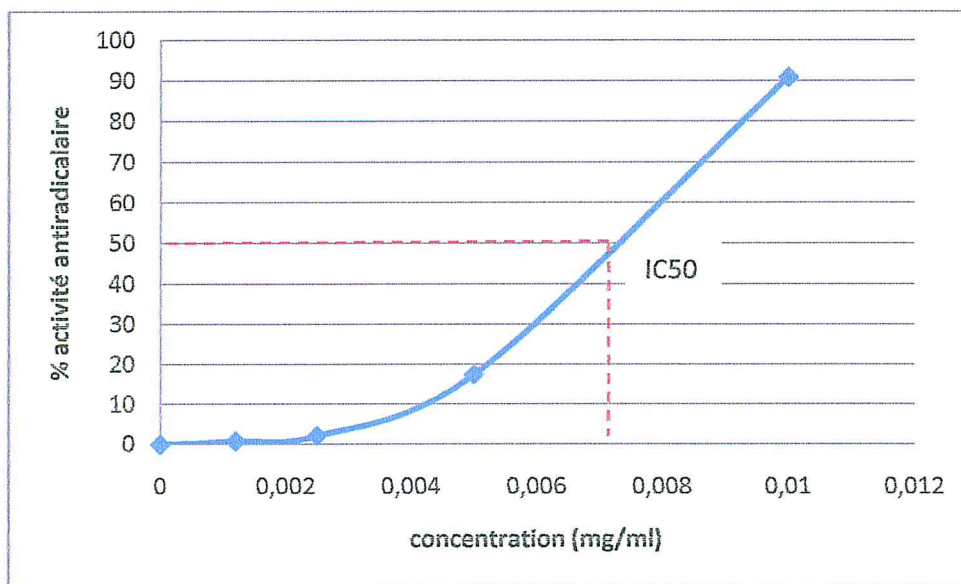


Figure n° 33: Pourcentages de réduction du radical libre DPPH de l'huile essentielle d'*Inula viscosa*.

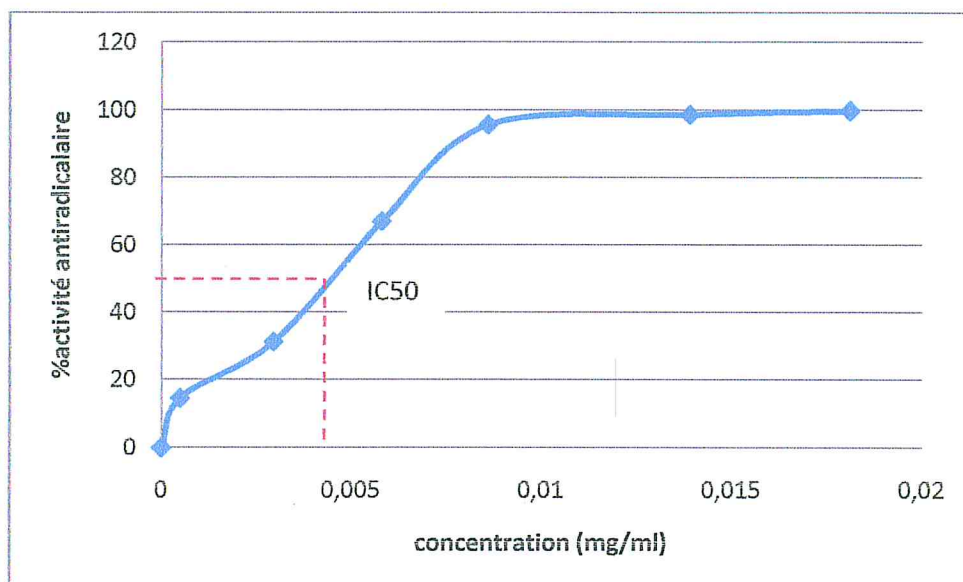


Figure 34 : Pourcentages de réduction du radical libre DPPH de l'Acide Ascorbique.

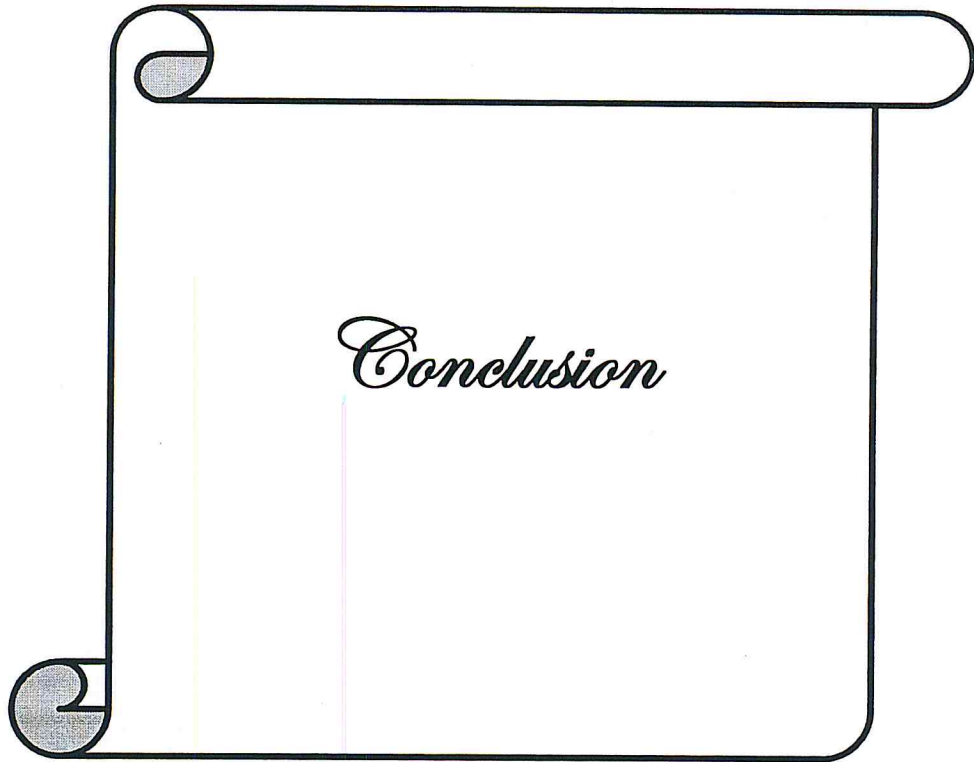
IC50 de la vitamine C : 0.0045 mg/ml.

IC50 d'HE : 0.0072 mg/ml.

L'activité antioxydante est exprimée en IC50, ce paramètre définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte 50% de l'activité de DPPH.

La valeur d'IC50 de l'HE est proche à la valeur de l'acide ascorbique et la concentration de l'HE d'*Inula viscosa* étudiée augmente avec la concentration de l'acide ascorbique.

On peut conclure que l'HE d'*Inula viscosa* présente un pouvoir réducteur et elle a une activité antioxydante.

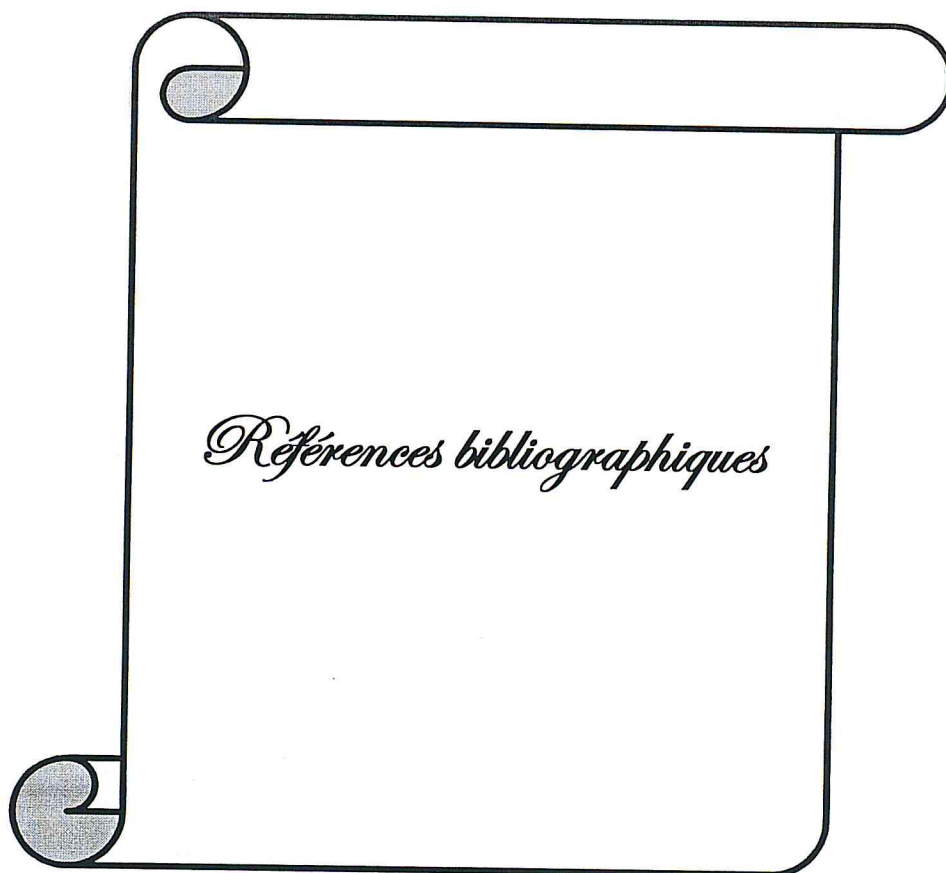


Conclusion

Cette étude a été réalisée à fin de mieux connaître une des plantes les plus utilisées dans la pharmacopée traditionnelle Maghrébine, c'est l'*Inula viscosa*. Nous nous sommes intéressés à l'extraction, l'analyse et l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et de cette plante.

L'extraction de l'huile essentielle à partir de la partie aérienne a été réalisée par le procédé entraînement à la vapeur d'eau.

- Le rendement obtenu est de 0.14%. la cinétique d'extraction de l'*Inula viscosa* nous a permis de déduire qu'après 3H d'extraction, la totalité de l'HE est récupérée.
- Une étude analytique a permis de caractériser l'huile essentielle par ses indices physico-chimique. Du point de vue qualitatif, la composition chimique de l'huile essentielle a été déterminée par l'analyse CG/MS qui a révélé l'existence de différents composés parmi lesquels : acide 3-phényl propionique, 2-tetrahydrofurylméthyl ester (44.65%), Trans-(2-chlorovinyl)-triméthyl silane (10.08), Acide 3, 3,8,8-tétraméthyl-tricyclo[5,1,0,0(2,4)]oct-5-ène-5-propanoïque (9.74%), Selina-6-én-4-ol (3.13%).
- Les résultats des tests d'activités antimicrobiennes de l'huile essentielle avec les souches bactériennes : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* les levures : *Candida albicans* et *Candida dubliniensis*. La sensibilité des microorganismes testés vis-à-vis l'HE ont montré que seul la souche bactérienne *Staphylococcus aureus* présente une sensibilité moyenne avec une zone d'inhibition qui est de l'ordre de 14mm.
- HE d'*Inula viscosa* a présenté une activité et un pouvoir antioxydante avec une valeur de IC50 égal à 0,0072 mg/ml relativement supérieure à IC50 de l'acide ascorbique qui est égal à 0.0045 mg/ml.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] A. Benguerba. Etude phytochimique et de la phase butanolique de l'espèce *Inula crithmoides* L. Thèse de magister. Université Mentouri-Constantine, faculté des sciences exactes, département de chimie, Mai 2008.
- [2] L. Benseguenib-tounsi, Etude in vitro de l'effet antibactérien et antifongique d'*I.viscosa* – *lawsonia* – *inermis* – *Asphodeluse* – *Microcarpus* – *Aloe vera* – *Juniperus oxycedrus*, Thèse de magister, Université de Constantine, faculté des sciences, département vétérinaire, 2001.
- [3] *Dittrichia viscosa subsp Viscosa*. <http://www.tela-botanica.org>. Décembre, 2011.
- [4] W. Wang, B. H. Ben-Daniel, Y. Cohen, Control of Plant Diseases by Extracts of *Inula viscosa*, *Phytopathology*, 2004.
- [5] F. Bssaibis, N. Gmira, M. Meziane, Activité antibactérienne de *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter, *Microbiol. Ind. San et Environn*, 3, pp 44-55, 2009.
- [6] Marta Marin, Rosa M. Giner, M. Carmen Recio, Salvador Manez, Phenylpropanoid and phenylisoprenoid metabolites from Asteraceae species as inhibitors of protein carbonylation, *Phytochemistry*, 2011.
- [7] N. De Laurentis, V. Losacco, M. Milillo, O. Lai. Chemical investigations of volatile constituents of *Inula viscosa* (L.) Aiton (Asteraceae) from different areas of Apulia, Southern Italy, *Delpinoa*, 44, pp115-119. 2002.
- [8] E. Mamoci, I. Cavoski, M. Andres, C. Elisa Díaz, A. Gonzalez-Coloma. Chemical characterization of the aphid antifeedant extracts from *Dittrichia viscosa* and *Ferula communis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, pp101–107.2012.
- [9] Plantes mellifères l'inule visceuse. <http://luirig.altervista.org>. Abeilles & Fleurs. Octobre 2010.
- [10] N. Al-Dissi, A. Salhab, H. Al-Hajj, Effects of *Inula viscosa* leaf extracts on abortion and implantation in rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 77, pp 117-121, 2001.
- [11] S. Máñez, V. Hernández, R. Giner, J. Ríos, M. Recio, Inhibition of pro-inflammatory enzymes by inuviscolide, a sesquiterpene lactone from *Inula viscosa*, *Fitoterapia*, 78, pp329-331, 2007.

- [12] V. Hernández, M. Carmen Recio, S. Máñez. Effects of naturally occurring dihydroflavonols from *Inula viscosa* on inflammation and enzymes involved in the arachidonic acid metabolism. Science direct, pp480–488, 2007.
- [13] O. Danino, H. E. Gottlieb, S. Grossman, M. Bergman. Antioxidant activity of 1, 3-dicaffeoylquinic acid isolated from *Inula viscosa*. Food Research International, 42, pp 1273-1280, 2009.
- [14] N. Benhammou, F. Atik Bekkara, Contribution à l'étude du pouvoir antifongique de l'huile essentielle d'*Inula viscosa*, Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen. Laboratoire de produits naturels, Département de Biologie, 2005.
- [15] T. Aşkin Çelik, Ö. Sultan Aslantürk. Evaluation of Cytotoxicity and Genotoxicity of *Inula viscosa* Leaf Extracts with Allium Test. Journal of biomedicine and biotechnology, 2010.
- [16] I. E. Haoui , R. Derriche , L. Madani , Z. Oukali, Analysis of the chemical composition of essential oil from Algerian *Inula viscosa* (L.) Aiton. Arabian Journal of Chemistry, 2011.
- [17] J. Kattouf1, M. Belmoukhtar, H. Harnafi, H. Mekhfi, A. Ziyat, M. Aziz1, M. Bnouham, A. Legssyer. Effet antihypertenseur des feuilles d'*Inula viscosa*. Pharmacognosie, 7, pp 309–312, 2009.
- [18] Les huiles essentielles, [http : www.centre- de-formation- massage.org](http://www.centre-de-formation-massage.org).
- [19] Z. Mohammedi. Etude de pouvoir Antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse de magistère. Université Abou bekr belkaid Tlemcen. Faculté des sciences. Département de biologie. 2006.
- [20] J. GARNERO. Huiles essentielles. <http://www.swisseo.org/rubrique>. Avril 2008.
- [21] H. Ibelaiden. Extraction et étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et des flavonoides de l'artemisia campestris L des hauts plateaux Algériens. Mémoire de Master 2. Université de Blida. Faculté des sciences de L'Ingénieur 2011.

- [22] F. Baba aissa. La flore et la végétation de l'Afrique tropicale. 2ème partie Ed.Gautier-Villars, 1976.
- [23] J. Smadja. Les Huiles Essentielles. Université de La Réunion. Juillet 2009.
- [24] N. Tabti. Contribution à l'étude de l'extraction des huiles essentielles de *Myrtus Communis* L. Thèse de magistère. Université Saad Dahlab de Blida. Département de chimie industrielle. Novembre 2010.
- [25] N. Mebarki. Extraction de huiles essentielles de *Thymus fontanesii* et application de la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne. Thèse de magistère. Université M'hamede Bougara Boumerdes 2010.
- [26] M. E. Lucchesie, Extraction sans solvant assistée par micro-ondes : Conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat de l'Université de la Réunion, 2005.
- [27] M. Hamimeche. relation végétation- avifaune dans le secteur est (Hammam Melouane) du parc national de chréa (wilaya de Blida) , thèse de magistère en science agronomiques option biodiversité et biotechnologies végétales, institut national agronomiques, El Harrach-Alger, juillet 2007.
- [28] P. Caree, Précis de Technologie et de Chimie Industrielle, T3, 1953.
- [29] AFNOR. Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 2. Monographies relatives aux huiles essentielles. AFNOR, Paris, 661-663, 2000.
- [30] J. L. Fauchère , J. L Avril , Bactériologie générale et médicale, Ed. Ellipses, 2002.
- [31] M. S. Ali-Shtayeh , R. M. R. Yaghmour, Y. R Faidi, K. Salem, M. A Al-Nuri, Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area, 1998.
- [32] S. O. Oyedemi, A. J. Afolayan, Antibacterial and antioxidant activities of hydroalcoholic stem bark extract of *Schotia latifolia* Jacq, Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, pp952-958, 2011.
- [33] S. Bounatirou, S. Smiti , M. G. Miguel , L. Faleiro , M. N. Rejeb , M. Neffati , M. M. Costa, A. C. Figueiredo, J. G. Barroso, L. G. Pedro, Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated

- from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. ET Link. Food Chemistry, 105, 146–155, 2007.
- [34] F. Candan, M. Unlu, Bekta, Tepe, D. Daferera, M. Polissiou, A. Sökmen, H. A. Akpulat, Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae), Journal of Ethnopharmacology, 87, 215–220, 2003.
- [35] H. P. Singh, S. Mittal, S. Kaur, D. R. Batish, R. K. Kohli, Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from residues of *Artemisia scoparia*, Food Chemistry, 114, pp 642–645, 2009.
- [36] N. Bougandoura, Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits d'espèces végétales *Satureja calamintha* (nabta) et *Ajugaiva* L. (Chendgoura) de l'ouest d'Algérie, thèse de magistères en biologie, Université Abou Bakr Belkaid-Tlemcen, 2011.
- [37] C. Kango, B. E. H Sawalihou, S. Kone, G. Koukoua, Y. T. N'Guessan, Étude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus*, Comptes rendus Chimie, 7, pp 1039-1042. 2004
- [38] D. S. S Kpoviessi, G. C Accrombessi, C Kossouh, M. M Soumanou, M Moudachirou, Propriétés physico-chimiques et composition de l'HE non conventionnelle de poughère (*Jatropha curcas*) de différentes régions du Bénin, Comptes Rendus Chimie, 7, pp1007-1012. 2004.
- [39] M. N. Boukhtem, M. S. HAMAIDI, F. SAIDI, Y. HAKIM, Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie), Nature et Technologie, pp 37-45, 2010.
- [40] A. Akroul, H. El Jani, S. Amouri, Neffati. Screening of antiradical and antibacterial activities of essential oils of *Artemisia campestris* L, *Artemisia herba alba* Asso, *Thymus capitatus* Hoff. Et Link. Growing wild in the southern of Tunisia. Recent research in science and technology. pp 29-39, 2010.