

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE
LABORATOIRE SCIENCES ET TECHNIQUES DE L'ENVIRONNEMENT



Mémoire du Projet de Fin d'Etudes
Pour l'obtention du Diplôme d'Ingénieur d'Etat en
Génie de l'Environnement

SUJET

**Extraction de Composés Végétaux à
Propriétés Biocides**

Présenté par :

BOUKROUFA Meriem

Jury :

Présidente :	HELLAL. A	Professeur, ENP
Directrice :	BOUTEKEDJIRET. C	Professeur, ENP
Co-directrice :	BERTOUCHE. S	Doctorante, ENP
Examinatrice :	SAHRAOUI. N	MAA, USTHB

Promotion JUIN 2012

ENP 10, Avenue Hassen Badi, 16200 El Harrach, ALGER

DEDICACES

Je dédie ce travail à mes parents, à mes deux grands frères Tarik et Malik, mes belles sœurs Amira et Sihame ainsi qu'à mon amie d'enfance Nawel et à toutes les personnes qui me sont chères.

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord ma promotrice **M^{lle} BOUTEKEDJIRET Chahrazed**, Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique (ENP), pour m'avoir si bien suivie et encadrée tout au long de mon travail.

Mes sincères remerciements à **M^{me} A. HELLAL** Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique pour l'honneur qu'elle nous fait de présider le jury ainsi qu'à **M^{me} N. SAHRAOUI** Chargée de Cours à l'Université des Sciences et de la Technologie HOUARI BOUMEDIENE pour avoir accepté de juger ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à ma Co-promotrice **M^{me} S. BERTOUCHE**, pour son aide, son orientation et ses conseils.

Mes remerciements vont aussi vers tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Le pin d'Alep : Pinus halepensis</i>	3
<i>Figure 2 : Forêt de Bainem</i>	6
<i>Figure 3:Forêt de MaktaaKheira</i>	7
<i>Figure 4: Forêt du parc zoologique de Ben Aknoun</i>	8
<i>Figure 5:Forêt de Zéralda</i>	9
<i>Figure 8 : Evolution du rendement en fonction du temps pour différents débits</i>	31
<i>Figure 9 : Evolution du rendement en huile essentielle en fonction du temps</i>	32
<i>Figure 10 : Evolution de $-\ln\left[1 - \frac{R_{HE}}{R_{HE\infty}}\right]$ en fonction du temps</i>	33
<i>Figure 11 : Evolution du rendement en fonction du temps pour différents débits</i>	33
<i>Figure 12 : Evolution du rendement en huile essentielle en fonction du temps</i>	34
<i>Figure 13 : Evolution de $-\ln\left[1 - \frac{R_{HE}}{R_{HE\infty}}\right]$ en fonction du temps</i>	35
<i>Figure 14 : Evolution du rendement en fonction du temps pour différentes puissances</i>	36
<i>Figure 19 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition des souches bactériennes en fonction des huiles essentielles étudiées</i>	44
<i>Figure 20 : Evolution de la croissance de Salmonella typhimurium en fonction de la concentration en huile essentielle.</i>	45
<i>Figure 21 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition des souches fongiques en fonction des huiles essentielles étudiées</i>	46

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau I : Répartition des espèces de pin dans l'algérois</i>	5
<i>Tableau II : Composition de l'huile essentielle de quelques espèces de pin</i>	12
<i>Tableau III : Domaine de variation des paramètres opératoires</i>	25
<i>Tableau IV : Influence de la puissance micro-ondes sur le rendement en huile essentielle</i>	37
<i>Tableau V : Rendement, durée d'extraction et constante de vitesse de l'HE de pin par EV, EVMO, HD et HDMO</i>	37
<i>Tableau VI : Antibiogramme</i>	42
<i>Tableau VII : Paramètres de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles testées</i>	45

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
-----------------------------	---

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. DESCRIPTION BOTANIQUE.....	3
II. BIOGEOGRAPHIE ET REPARTITION	4
III. ESPECES DE PINS EXISTANTES EN ALGERIE	5
IV. UTILISATIONS DU PIN	10
V. DEFINITION DES HUILES ESSENTIELLES	10
VI. TRAVAUX ANTERIEURS.....	11
VII. LES PROCEDES D'EXTRACTION	15
VIII. GENERALITES SUR LES MICROORGANISMES PATHOGENES	16
IX. GENERALITE SUR LES MICRO-ORGANISMES PATHOGENES ETUDIEES	17
X. LEVURES ETUDIEES	19
XI. MOISSURES ETUDIEES	19
XII. ACTIVITE ANTIBACTERIENNE.....	20
XIII. ACTIVITE ANTIFONGIQUE	22

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES

I. MATERIELS BIOLOGIQUES	23
II. INSTALLATIONS EXPERIMENTALES	24
III. METHODES DE CALCUL ET DE MESURE.....	25
IV. ACTIVITE ANTIOXYDANTE.....	26
V. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE	26

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. EXTRACTION PAR ENTRAINEMENT A LA VAPEUR D'EAU.....	29
II. EXTRACTION PAR HYDRODISTILLATION	31
III. EXTRACTION PAR ENTRAINEMENT A LA VAPEUR ASSISTE PAR MICRO-ONDES.....	34
IV. EXTRACTION PAR HYDRODISTILLATION ASSISTEE PAR MICRO-ONDES	36
V. ETUDE COMPARATIVE DES QUATRE PROCEDES D'EXTRACTION.....	37
VI. DETERMINATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE	38
VII. EXTRACTION PAR SOLVANT	38
VIII. DOSAGE DES POLYPHENOLS DES EXTRAITS ETHANOLIQUES.....	40
IX. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE.....	41
X. DETERMINATION DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE.....	46
CONCLUSION GENERALE.....	47
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	48

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

Dans une ère industrielle faste et remplie d'espoir pour l'humanité, l'homme s'est rendu compte de l'envers de la médaille en constatant les méfaits, d'un progrès rapide et efficace certes, mais entraînant de graves dommages pour la santé et l'environnement.

Actuellement l'Humanité s'oriente de façon croissante vers les produits naturels, biologiques en remplacement des produits synthétiques avec un souci d'efficacité et de rentabilité au moins égales.

L'ère du "Bio" s'imposant, les recherches scientifiques s'intensifient dans ce sens pour trouver des produits naturels dits "Bio" afin de les substituer (dans les aliments, les médicaments...) aux substances chimiques, à l'origine de désagréments graves pour la santé et l'environnement. La valorisation des espèces végétales est l'une de ces alternatives. En effet, les ressources de la flore constituent un immense gisement de molécules actives qui sont loin d'être totalement inventoriées. Or la valorisation de cette flore passe par une étape primordiale qui est l'extraction de ces molécules actives. Aussi, la recherche de techniques performantes en terme d'amélioration de rendement, de réduction de temps de traitement, de coût, mais aussi en œuvrant vers une chimie «verte» par la réduction de la consommation de l'énergie, la diminution des rejets et l'absence de solvants est toujours d'actualité.

L'Algérie possède un patrimoine végétal très riche mais très peu exploité. Parmi la large gamme de choix de plantes qu'elle offre, notre intérêt s'est porté sur le pin d'Alep, arbre très répandu en Algérie et connu pour ses propriétés antibactériennes et anti oxydantes.

Le travail que nous allons entreprendre portera sur la valorisation des aiguilles de pin par l'extraction de composés à propriétés biocides. Pour ce faire, notre intérêt s'est porté sur l'extraction de l'huile essentielle ainsi que de la concrète des aiguilles de pin.

Pour extraire l'huile essentielle, quatre procédés vont être étudiés : l'entraînement à la vapeur d'eau, l'entraînement à la vapeur d'eau assisté par micro-ondes, l'hydrodistillation et l'hydrodistillation assistée par micro-ondes, alors que pour récupérer la concrète, nous utiliserons l'extraction en batch ou macération.

L'objectif de notre travail est :

- L'étude des différents procédés d'extractions afin d'approcher les conditions opératoires nécessaires à une extraction optimale des composés recherchés,
- L'évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne de ces composés.

Le mémoire se compose de trois parties :

- La première partie est consacrée à une étude bibliographique qui portera sur la matière végétale, son utilisation et les différents travaux dont elle a fait l'objet. Des généralités sur les procédés d'extractions et les méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne seront également abordées.
- La seconde partie portera sur les installations expérimentales et les méthodes de calculs et de mesures utilisées pour réaliser cette étude.
- Les résultats obtenus et leurs interprétations seront présentés dans la troisième partie, suivis d'une conclusion.

Partie I :

Etude bibliographique

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. DESCRIPTION BOTANIQUE

Les pins de la région circum-méditerranéenne sont des arbres de taille moyenne ne dépassant pas 30 m de hauteur, à tronc généralement sinueux, à écorce d'abord écailleuse d'un gris argenté ou rougeâtre puis à rhytidome crevassé. Les aiguilles sont fasciculées par deux, fines de 1 mm environ d'épaisseur, souples de 6 à 15 cm de longueur et de couleur vert clair ou foncé.

Les pousses vigoureuses sont polycycliques donnant aux arbres une cime diffuse. Les cônes sont pédonculés (pin d'Alep) ou non (pin Brutia), isolés ou par petits groupes, ovoïdes-coniques à écusson peu proéminent et toujours longuement persistants [1].

Pinushalepensis Mill. Ou Pin d'Alep, objet de notre étude est aussi appelé : Pin de Jérusalem, Pin blanc (Provence), Aleppo Pine, Pinocarrasco, AleppoIiefer, Sanaoubarhalabi (Syrie, Liban). Ce Pin fut décrit pour la première fois par DUHAMEL, en 1755, sous le nom de *Pinoshiero, soliviitana*. MILLER l'a redécrit plus tard, en 1768, sous le nom de *Pinus halepensis*[2]. Il affectionne plus particulièrement les substrats marneux ou calcaire-marneux dans lesquels son enracinement profond peut s'étendre. Il se rencontre aussi sur des substrats schisteux ou mica schisteux [3].

C'est un arbre assez élevé, à écorce d'abord d'un gris-argenté, à bourgeons non visqueux ; 2 aiguilles, rarement 3 dans chaque gaîne, longues de 6-10 cm, d'un vert clair; cônes oblongs-coniques aigus, longs de 8-12 cm, rouge-brun luisant, à pédoncule très épais [4].



Figure 1 : Le pin d'Alep : *Pinus halepensis*

II. BIOGEOGRAPHIE ET REPARTITION

En dépit de son nom commun, *P. halepensis* n'est pas originaire de la région d'Alep de Syrie. Il est principalement une espèce de l'Ouest de la Méditerranée, mais se retrouve également dans les Balkans, en Libye et dans les pays du Levant. *P. halepensis* est la seule espèce de pins indigène en Israël, bien qu'il y ait débat quant à l'étendue de sa distribution originale. Les exigences de température et des précipitations généralement le limitent à des zonesthermo-et méso-méditerranéennes (températures minimales supérieures à 0° C) et les régions sub-humides à arides (précipitations annuelles de 600 à 800 à 100-400mm, la sécheresse estivale de 2-3 à 7-11 mois), avec une préférence pour les sols marneux et calcaire [5].

Son aire de répartition a été précisée par de nombreux auteurs et en particulier par NAHAL (1962). C'est une essence fréquente surtout en région méditerranéenne occidentale, mais qui se rencontre également en divers points du bassin méditerranéen oriental. Ses forêts occupent sans doute au total plus de 33 millions d'hectares.

Les pays du Maghreb constituent la zone où il offre son plus grand développement puisqu'on le rencontre à peu près partout sur les massifs montagneux, à l'exception cependant du Maroc atlantique ainsi que des zones littorales du Tell constantinois et de Kroumirie (en Tunisie).

Au Maroc, le pin d'Alep est rare. Il constitue toutefois quelques peuplements généralement isolés sur le pourtour des grands massifs montagneux et en particulier du Rif où il est relativement fréquent sur le versant méditerranéen du Moyen-Atlas (régions d'Azrou, Ahermoumou et versant moulouyen des hautes chaînes orientales), et aussi du Haut Atlas où il est assez répandu dans les vallées internes du versant septentrional jusqu'au sud-ouest de Marrakech. Il existe encore quelques colonies isolées sur le versant saharien de la chaîne. Il forme enfin quelques peuplements dans le Maroc Oriental et en particulier sur les monts Debdou [6].

La superficie qu'occupe le Pin d'Alep en Algérie est de 792.000 ha soit 35,5 % de la superficie totale des forêts Algériennes [1].

III. ESPECES DE PINS EXISTANTES EN ALGERIE

Le tableau I montre la répartition des pins aux alentours d'Alger

Tableau I : Répartition des espèces de pin dans l'algérois

Forêts	Essences	Espèces
Forêt de Bainem	Résineux	Pin d'Alep Pin Maritime Thuya
Forêt du parc Zoologique de Ben Aknoun	Résineux	Pin Maritime Pin d'Alep Pin pignon Thuya
Forêt de Bouchaoui	Résineux	Pin d'Alep Pin pignon Thuya Pin des canaris
Forêt de MaktaaKheira	Résineux	Pin d'Alep Thuya
Forêt de Sidi-Fredj	Résineux	Pin d'Alep Pin maritime

Les figures 2 à 5 illustrent la répartition géographique des différentes espèces de pin aux alentours d'Alger.

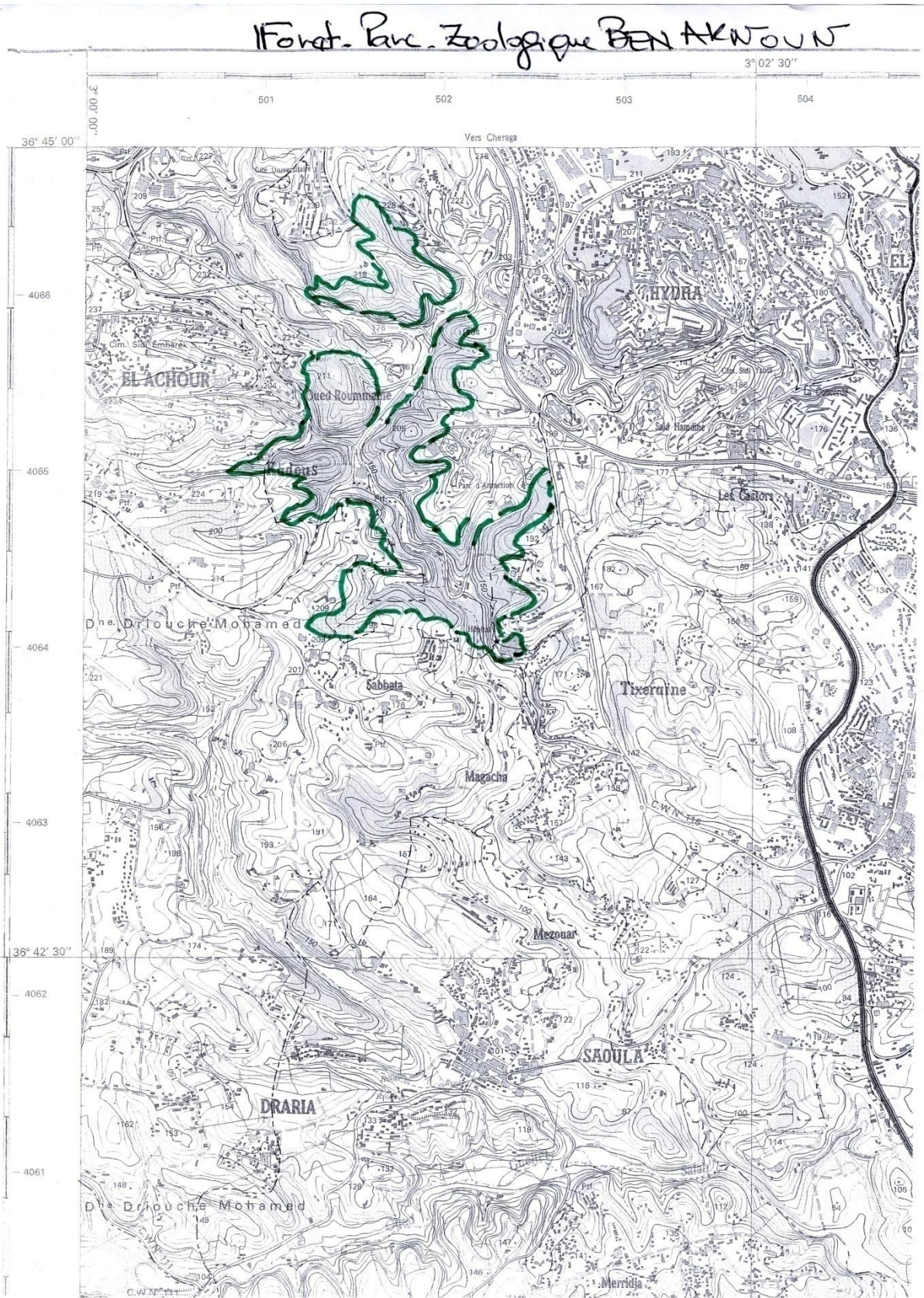


Figure 4: Forêt du parc zoologique de Ben Aknoun

Residence School

Forêt des Planteurs
Cité ZERALDA



Figure 5:Forêt de Zéralda

IV. UTILISATIONS DU PIN

IV. 1. Utilisations traditionnelles

En médecine traditionnelle, la résine de pin est utilisée dans le traitement des ulcères ; en cataplasme, les raclures du pin sont préconisées pour le traitement des colopathies sanglantes ; et la fumigation d'écorce de pin est employée dans les affections gynécologiques.

Les bourgeons sont considérés comme balsamiques, béchiques, émollients et sédatifs de la toux, ils sont diurétiques ; alors que les aiguilles sont utilisées en balnéothérapie et l'huile comme liniment. La partie interne de l'écorce de pin permettait de faire une espèce de pain pendant les périodes de disette.

IV. 2. En pharmacologie

L'huile essentielle est responsable d'activités antimicrobiennes et expectorantes et induit une hyperémie locale.

Les monoterpènes, sesquiterpènes et esters de l'huile essentielle sont antiseptiques des voies respiratoires dans les gripes et les bronchites et décongestionnants des voies respiratoires hautes (sinusites). L'huile essentielle stimule la circulation périphérique, elle est sécrétolytique et corticostimulante. Elle exerce également une activité génotoxique in vitro sur des lymphocytes humains [7].

IV. 3. Utilisation commerciale

La principale utilisation commerciale du pin est la transformation en bois de construction. Il est surtout utilisé comme :

- bois de charpente,
- poteaux pour les fils électriques,
- poutres pour la construction de chemins de fer ou de chalets,
- bois pour les papetières.

La térébenthine extraite à partir des pins est utilisée comme solvant pour les cires, la composition de vernis et comme diluant pour les peintures.

V. DEFINITION DES HUILES ESSENTIELLES

Le terme «Huile essentielle» est un terme générique qui désigne les composants liquides et hautement volatiles des plantes, marqués par une odeur forte et caractéristique. Elles sont par définition des métabolites secondaires produits par les plantes comme moyen de défense contre les ravageurs phytophages.

La norme AFNOR NFT 75-006, de Février 1998 [8], a défini l'huile essentielle comme étant un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citruses, soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques pour les deux premiers modes d'obtention. Elle peut subir des traitements physiques, par exemple, redistillation, aération ..., n'entraînant pas de changements significatifs de sa composition.

On distingue plusieurs essences selon le domaine de leur application : parfumerie, industrie ...

- Essences concrètes (ou encore concrètes) : elles sont obtenues par extraction, à l'aide d'un solvant de substances végétales fraîches.
- Résinoïdes : ils sont obtenus par extraction, à l'aide de solvants, de substances végétales desséchées, de résines, de gommes résines ou de baumes.
- Essences déterpénées : elles sont obtenues par distillation sous pression réduite des concrètes, ce qui permet d'éliminer les fractions les plus volatiles, terpéniques, irritantes et de mauvaise conservation [9].

VI. TRAVAUX ANTERIEURS

Le pin a fait l'objet de plusieurs études. En effet, outre ses propriétés antioxydantes et antimicrobiennes, le pin a fait l'objet d'autres études:

Sasipawanet al. [10] ont effectué une étude sur les effets des extraits de *Pinus kesiya* contre la leucémie chez l'être humain.

Nunoet al. [11] ont étudié les aiguilles de pin comme bio-échantillonneurs passifs pour la détermination des polybromodiphényléthers dans l'atmosphère.

VI .1. Composition chimique du pin

La composition des huiles essentielles diffère en fonction de plusieurs paramètres tels que le lieu géographique, la saison de cueillette, les données climatiques et le procédé d'extraction.

Le tableau II résume la composition chimique de quelques espèces de pins.

Tableau II : Composition de l'huile essentielle de quelques espèces de pin

Espèce	Pays	Composés majoritaires (%)	Référence
<i>Pinus pinaster</i>	Maroc (Région de Rabat)	β -caryophyllène (22,2) α -pinène (21,4) γ -Muuroolène(7,0)	[12]
<i>Pinus pinaster</i>	Italie (Montemarcello) (La Spezia)	β -Caryophyllène(13,2) α -pinène (29) β -pinène (22)	[13]
<i>Pinus pinaster</i>	Grèce	β -caryophyllène(15) α -pinène (21) Germacrène-D (19,2)	[14]
<i>Pinus pinaster</i>	France	β -caryophyllène(6,4; 13,0) α -pinène (43,4) β -pinène (25,1; 16,0) Germacrène-D (11,5)	[15]
<i>Pinus pinaster</i>	Portugal	α -pinène (27,3) β -pinène (20,2) Limonène (7,6)	[16]
<i>Pinus pinaster</i>	Allemagne	α -pinène (44,1) β -pinène (29,5) Myrcène(4,7)	[17]
<i>Pinus pinaster</i>	Algérie	β -caryophyllène(26,6) allo- aromadendrène(12,5) γ -Humulène(4,3)	[18]
<i>Pinus Caribaea</i>	Vénézuéla	β -phéllandrène(39,70) β -caryophyllène (15,70) germacrène-D (14,15) α -pinène(8,25)	[19]
<i>Pinus radiata</i>		β -pinène (35,21) Aromadendrène(4,01) α -terpinéol (3,01)	[20]
<i>Pinus strobus</i>	Pologne (Gdan'sk)	α -pinène (17,7) Germacrène-D (12,2) β -pinène (7,9)	[21]
<i>Pinus ponderosa</i>	Pologne (Gdan'sk)	α -pinène (10,2) β -pinène (45,7) 3-carène (8,4)	

<i>Pinus resinosa</i>	Pologne(Warsovie)	α -pinène	(23,3)	
		β -pinène	(42,4)	
		Myrcène	(14,5)	

VI.2. Activités antimicrobiennes

Les propriétés antibactériennes et antifongiques des pins, attribuables à la présence d'un grand nombre de phytoalexins, suscitent beaucoup d'attention dans la littérature scientifique.

Le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de pin contre les bactéries à Gram négatif tel qu'*Escherichia coli* et les bactéries à Gram positif tel que *Staphylococcus aureus* a été démontré par plusieurs auteurs.

Les résultats de ces études ont tous convergé vers une sensibilité plus ou moins importante de ces souches. En effet, **Monica et al. [22]** ont montré par la méthode de diffusion des disques que l'huile essentielle extraite des cônes de *P. brutia* présente une inhibition des agents pathogènes à Gram négatif, tels que *Escherichia coli* (zone d'inhibition supérieure à 52 mm) et à Gram positif tel que *Staphylococcus aureus* (zone d'inhibition de 10 mm) ainsi que *Bacillus subtilis* (zone d'inhibition de 12 mm).

Smith et al. [23], quant à eux ont montré grâce à une étude sur les extraits de jeunes arbres de *Pinus nigra* qu'ils possédaient une activité antibactérienne sur deux types de staphylocoques résistants aux antibiotiques avec une concentration minimale d'inhibition de 32 à 64 $\mu\text{l/mL}$.

Les huiles essentielles obtenues à partir des aiguilles de trois autres espèces de pin, *Pinus densiflora*, *Chamae cyparissobtusa* et *Pinus koraiensis* avaient des effets antibactériens mais avec un diamètre d'inhibition moins important (14mm) contre une souche de *staphylococcus aureus*, tandis que les huiles essentielles de *Pinus koraiensis* et *Chamae cyparissobtusa* possédaient un pouvoir antifongique avec un diamètre d'inhibition de 12 mm sur la souche *Candida albicans*[24].

Les composés responsables de l'activité antibactérienne (le pinosylvin et le pinosylvin monométhyl) des extraits de la résine de différents pins (*P. sylvestris*, *P. resinosa*, *P. contorta*, *P. banksiana*) ont été découverts par **Lindberg et al. [25]** suite à des tests antibactériens sur des souches pouvant poser problèmes dans l'industrie papetière (*Bacilluscoagulans*, *Burkholderiamultivorans*, *Alcaligenesxylosoxydans*). Ils ont en conclu que ces extraits avaient un fort potentiel pour une utilisation comme biocide naturel.

Osmanet al. [26], ont montré que les huiles essentielles de *P. brutia*, *P. halepensis*, *P. nigra*, *P. pinea* et *P. sylvestris* ainsi que le pycnogénol (extrait éthanolique-aqueux des écorces de *Pinus maritima*) ont un effet inhibiteur de la cholinestérase ; et que les principaux composants phénoliques isolés de l'écorce de pin, étaient efficaces contre la formation de la prostaglandine E-2, médiateur pro-inflammatoire, mais ne présentent aucun effet antimutagène.

VI. 3. Activité antioxydante :

L'oxydation des lipides représente un problème important pour certaines industries, puisqu'elle est responsable de la baisse de qualité et de la diminution de la durée de conservation des produits cosmétiques et alimentaires. Ce phénomène conduit à l'odeur rance des nourritures en putréfaction.

L'addition des antioxydants permet de limiter l'oxydation de ces derniers selon deux mécanismes :

1- Ils neutralisent les radicaux libres et empêchent les réactions en chaîne initialisées par ces derniers.

2- Les antioxydants détruisent les hydroperoxydes (composés intermédiaires formant des radicaux libres en interrompant la liaison O-O), diminuant ainsi la vitesse de formation de radicaux libres.

Gianni et al. [27], ont montré que l'huile essentielle du *Pinus nigra* possède une activité antioxydante relativement faible avec une inhibition moyenne inférieure à 25% en comparaison avec l'activité antioxydante de *Thymus vulgaris*. D'autres auteurs tels que **Hsu et al. [28]**, ont montré que l'extrait des aiguilles de pin avait la meilleure activité antioxydante lors d'une étude sur la capacité de piégeage des radicaux libres de différentes parties de *Pinus morrissonicola* (aiguille, écorce et cône). Néanmoins, cette activité peut être variable en fonction de l'environnement dans lequel il se trouve comme le montrent **Stanistawa et al. [29]**. En effet, ces auteurs ont remarqué une augmentation de l'activité antioxydante en fonction du degré de pollution suite à l'étude de l'activité antioxydante de 3 échantillons de pin sylvestre prélevés à proximité de trois sites industriels. Ils ont conclu que cette augmentation était un moyen de défense de la plante contre la présence de polluant dans l'environnement.

Grassmann et al. [30], ont montré par leurs études sur la capacité antioxydante des huiles essentielles du pin Mugo dans plusieurs systèmes biochimiques que l'huile présente une faible activité lorsqu'elle est testée dans un environnement aqueux. En revanche elle présente une très forte activité antioxydante lorsqu'elle est testée sur un environnement lipophile.

Vuorela et al. [31], ont évalué l'activité d'extrait phénolique du pin sylvestre pour sa propriété antioxydante, et ont montré que les composés phénoliques de l'écorce du pin étaient de très bons agents contre l'oxydation de la membrane phosphatidylcholine (liposomes).

Jung et al. [24], ont évalué l'activité antioxydante du *Pinus densiflora* pour son potentiel d'inhibition des radicaux hydroxyles ainsi que l'inhibition totale des dérivés réactifs de l'oxygène, et ont découvert que les extraits méthanoliques de ce dernier possédaient une forte activité antioxydante due à la présence d'un flavonoïde : le kaempferol 3-O-beta-galactopyranoside

Des études **[32]**, ont mis en évidence l'activité antiradicalaire du pycnogenol sur les dérivés réactifs de l'oxygène (espèces chimiques oxygénées rendus chimiquement très réactifs par la

présence d'électrons de valence non appariés) et les espèces azotées ainsi que sa participation dans le réseau antioxydant cellulaire par sa capacité à régénérer le radical ascorbyle et de protéger ainsi la vitamine E et le glutathion endogène contre le stress oxydatif. **Osmanet al. [26]**, ont ensuite montré que ce dernier pourrait être considéré comme agent neuro-protecteur naturel par son effet inhibiteur d'enzyme et ses caractéristiques antioxydantes.

VII. LES PROCÉDES D'EXTRACTION

VII.1. L'entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur est la méthode d'extraction permettant d'obtenir une **huile essentielle** à partir d'un végétal. De la vapeur d'eau est injectée au bas de la charge végétale. Chargée en molécules volatiles, elle est récupérée au sommet de la charge, et est ensuite condensée. Par décantation, une fraction hydrophobe se sépare de la phase aqueuse : il s'agit de l'huile essentielle [33].

VII. 2. L'hydrodistillation

L'échantillon à extraire est dispersé dans de l'eau et placé dans un ballon qui est chauffé directement. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau, qui est ensuite condensée. L'huile essentielle est collectée par simple décantation.

Ces techniques sont généralement utilisées pour l'extraction des huiles essentielles et des arômes de végétaux, en particulier des plantes aromatiques et des épices [33].

VII. 3. L'extraction assistée par micro-ondes

Dans le cas des plantes à huile essentielle superficielle, les micro-ondes permettent d'obtenir un éclatement des glandes à huile essentielle. Si la plante est suffisamment riche en eau, les micro-ondes permettent de chauffer la matière première et d'extraire l'huile essentielle en utilisant seulement l'eau de constitution du végétal.

Dans le cas des plantes à huile essentielle non superficielle, l'utilisation des micro-ondes permet d'obtenir un gradient thermique inversé par rapport à celui obtenu par injection de vapeur. Ce gradient thermique inversé accélère la diffusion des molécules d'huile essentielle et leur extraction.

Quel que soit le mécanisme impliqué, l'extraction sous micro-ondes est caractérisée par des vitesses d'extraction supérieures à celles de l'extraction traditionnelle et qui peuvent, dans certains cas, s'accompagner d'une modification de la sélectivité de l'extraction [33].

Chemat et al. [34], ont prouvé que l'extraction par hydrodistillation assistée par micro-ondes (MASD) de l'huile essentielle de lavande est meilleure en termes d'économie d'énergie, de rapidité (10 min au lieu de 90 min), de rendement, et de qualité des huiles obtenues comparée à l'extraction par hydrodistillation conventionnelle.

Dans deux autres études sur les fleurs de lavande et les écorces d'oranges, **Sahraoui et al.** [35, 36], ont montré que l'entraînement à la vapeur d'eau assisté par micro-ondes était plus performant que l'entraînement à la vapeur d'eau conventionnel avec des durées d'extraction nettement plus faibles : 6 minutes contre 30 minutes pour la lavande et 120 minutes pour l'orange.

VII.4. Extraction par fluides supercritiques

L'extraction par fluide supercritique a pris ces dernières années, beaucoup d'essor concernant l'extraction des extraits végétaux. Le principal avantage de cette technique est celui de combiner les caractéristiques des gaz et des liquides pendant le processus d'extraction. En outre, tous les processus de dégradation possibles tels que l'oxydation ou l'isomérisation sont réduits au minimum du fait que le temps d'extraction est réduit.

VII. 5. L'extraction par solvant

Ce procédé est utilisé pour l'extraction des concrètes ou oléorésines, de résinoïdes et d'absolues, quand une partie de l'arôme ou du parfum n'est pas volatile ou peu entraînable par la vapeur d'eau. Son principe consiste à épuiser la matière végétale de ses constituants odorants généralement à température ambiante par un solvant volatil.

Le mélange solvant-extrait, appelé miscella est ensuite séparé du solvant par évaporation sous vide afin d'éviter la dégradation thermique des molécules odorantes.

VIII. GENERALITES SUR LES MICROORGANISMES PATHOGENES

VIII.1. Définition générale

Les bactéries sont des organismes procaryotes sans noyau différencié, sans mitochondries, avec un génome habituellement circulaire formé d'une double hélice d'ADN codant le plus souvent pour 1000 à 4000 gènes, avec une paroi rigide formée de peptidoglycane. Les eucaryotes ont un noyau avec membrane nucléaire, des mitochondries. Elles possèdent une taille moyenne de 0.5 à 2.0 μm de large et 2-6 μm de long. Elles sont de formes variées (coques, bacilles, ...) dues à la structure de la paroi et au mode de séparation propre à chaque espèce bactérienne.

Les bactéries se scindent en deux catégories d'après la coloration de Gram on distingue selon les propriétés tinctoriales les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif [37].

Omniprésents dans l'environnement, les champignons sont des saprophytes primaires, c'est-à-dire qu'ils utilisent la matière organique morte comme source nutritive pour leur croissance et leur reproduction. Plusieurs vivent dans les sols et prennent une part active dans la décomposition de la matière organique. Les humains seraient exposés couramment à plus de 200 espèces d'entre eux, dont plusieurs prolifèrent bien dans un environnement intérieur humide.

IX. GENERALITE SUR LES MICRO-ORGANISMES PATHOGENES ETUDIEES

IX.1. Les bactéries à Gram positif

IX.1.1. *Staphylococcus aureus*

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont des coques (cocci) à Gram positif, isolés ou groupés en amas ayant la forme de grappes de raisin de 0,8 à 1 μ de diamètre, immobiles, non sporulés, La grande majorité des souches sont capsulées, mais les souches peuvent perdre leur capsule par culture.

Cette bactérie est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux il est très souvent retrouvé au niveau : du nez, le pharynx, les aisselles, le périnée, le vagin, le tube digestif (quelquefois). Il peut toutefois devenir pathogène à la suite de diverses circonstances et peut provoquer des infections

Il peut aussi entraîner la formation d'abcès isolés du rein ou des phlegmons périnéphrétiques[38].

IX. 1.2 *Micrococcus luteus*

Micrococcus est un genre représenté par des bactéries à coloration de Gram positive appartenant à la famille des *Micrococcaceæ*. Les cellules sont des coques de 0,5 à 2 μ m de diamètre, fréquemment groupées en paire ou en tétrade, le plus souvent immobile. Ce sont des bactéries aérobies, à métabolisme oxydatif, possédant une catalase, chimio-organotrophe.

Ces bactéries ont pour habitat le sol, les eaux douces, les aliments ; elles sont habituelles sur la peau de l'Homme et des animaux et pourraient être un pathogène émergent engendrant des maladies nosocomiales ainsi que des infections cutanées chez des patients immunodéprimés.

IX. 1.3. *Listeria monocytogenes*

Le genre *Listeria* regroupe de petits bacilles à Gram positif de forme régulière, courts, à bouts arrondis parfois incurvés (0,4-0,5 x 0,5-2 μ m) isolés ou en courtes chaînes présentant un arrangement en palissade et en lettres comme les corynébactéries, avec parfois des formes filamenteuses. Ils sont non sporulés, non capsulés et mobiles à 20-25°C par des flagelles péritriches. C'est une bactérie saprophyte et ubiquitaire. Largement répandue dans la nature : dans le sol, l'eau, les végétaux mais aussi dans le lait, la viande de poulet, les légumes (choux) et dans les matières fécales de sujets sains (homme et nombreuses espèces animales). La bactérie survit dans l'environnement naturel, résiste à des conditions hostiles et peut s'y multiplier même à basse température.

L'infection par *L. monocytogenes* ou listériose, est une **saprozoonose**. La contamination humaine est le plus souvent réalisée par voie digestive et plus rarement par voie oculaire, respiratoire ou cutanée [38].

IX.1. 4. *Enterococcus faecalis*

Les entérocoques se présentent sous forme de cocci à Gram positif. La taille de chaque élément est inférieure à 2 µm. Les cocci sont ronds ou ovalaires, le grand axe étant alors dans le sens de la chaînette. En cas de souffrance (antibiotiques, mutants déficients) des formes pseudo bacillaires ou monstrueuses peuvent être observées. Les éléments sont groupés en chaînettes plus ou moins longues (de 2 à plus de 50 cocci).

Les entérocoques sont des bactéries intestinales, mais sont également trouvés sur les muqueuses génitales, l'oropharynx ainsi que la peau.

Les infections les plus fréquentes sont des infections urinaires (près de 70%), suivies des bactériémies (13%), elles peuvent aussi être à l'origine d'infections biliaires et abdominales et d'endocardites [38].

IX.2. Les bactéries à Gram négatif

IX. 2.1. *Salmonella typhimurium*

Les *Salmonella typhimurium* sont des bacilles à Gram négatif de 2 à 4 µm long sur 0,4 à 0,6 µm de large. Elles possèdent très grande mobilité.

Les *Salmonella* sont essentiellement des bactéries de l'intestin des animaux vertébrés. Elles peuvent être disséminées dans l'environnement par les excréta. Les salmonelloses provoquées sont les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes dues à *S.typhi*, *S. Paratyphi A*, *B* et rarement *C*. Ce sont des septicémies à point de départ lymphatique. Elles provoquent aussi des gastro-entérites et des toxi-infections alimentaires collectives.

Le principal mode de contamination chez l'homme est l'ingestion à partir de l'eau (*S.typhi* surtout), des aliments (ex. produits laitiers, œufs, viande) ou d'animaux familiers porteurs (tortues)[38].

IX. 2.2. *Escherichia coli*

Espèce de bactérie appartenant à la famille des entérobactéries. Elle se présente sous forme de bâtonnet à extrémités arrondies ; elle mesure au plus 2 à 3 µm de long pour 0,5 µm de large. Elle est entourée de nombreux longs cils péritriches, d'où une relative mobilité cohérente (16µm/s). C'est une espèce commensale du tube digestif de l'homme et des animaux. Dans l'intestin, *E. coli* est l'espèce aérobie quantitativement la plus importante.

La présence de ces bactéries sous leurs formes pathogènes peut provoquer des infections extra-intestinales telles que des infections urinaires et des Méningites néo-natales [38].

IX. 2.3. *Klebsiella pneumoniae*

Les Klebsielles sont des bacilles à Gram négatif, en forme de bâtonnet court de 1 à 2 µm sur 0,3, toujours immobiles et très souvent encapsulés. Cette capsule est absente chez près de 5% des *K.pneumoniae*, et donne l'aspect muqueux assez typique des colonies. En 24 heures à 37°C, sur milieu ordinaire ou sélectif, les Klebsielles donnent des colonies de 3 – 4 mm, rondes, muqueuses, bombées, translucides, fermentant le glucose et le lactose en produisant du gaz. Elles sont présentes dans la flore fécale de l'homme et sont souvent commensales de la peau, des muqueuses et des voies respiratoires.

Elles sont responsables de broncho-pneumopathies aiguës ou subaiguës, mais aussi d'infections urinaires, hépato-biliaires ou de pus divers[39].

IX. 2.4. *Aeromonas*

Les *Aeromonas* sont des bacilles à Gram négatif de 1-4 μm /0,6 μm mobiles par ciliature polaire, habituellement monotriches ou immobiles. Ils peuvent prendre un aspect coccobacillaire ou en courtes chaînettes. Ce sont des germes aéro-anaérobies.

Les *Aeromonas* sont isolés fréquemment dans les eaux douces (bactéries dulçaquicoles), dans les eaux stagnantes, les eaux courantes, les eaux de boisson et les eaux de mer.

Les infections sont le plus souvent d'origine hydrique, plaie profonde après baignade dans une rivière, immersion, noyade... ou consécutives à l'ingestion d'aliments contaminés [38].

IX. 2.5. *Pseudomonas aeruginosa*

Ces bactéries se présentent sous forme de bâtonnets droits et fins 0,5 à 1,3 μm . elles possèdent la structure des bacilles à Gram négatif, pas de différence significative dans la structure du peptidoglycane de la paroi avec une mobilité très vive en aérobiose. Elles sont parfois entourées d'une pseudo-capsule appelée **slime** qui peut jouer un rôle important dans la pathogénicité de cette bactérie. Produisant souvent des pigments diffusibles et naturellement résistants à de très nombreux antibiotiques. Cette bactérie peut vivre en commensale dans le tube digestif de l'homme et de divers animaux.

Considérée comme une bactérie pathogène opportuniste c'est le germe-type des infections hospitalières ou nosocomiales [38].

X. LEVURES ETUDIÉES

X. 1. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae, appelée levure de boulanger ou levure de bière est une levure formant des cellules libres et ovalaires de 1 à 6 μm de large pour 7 à 50 μm de long.

Elle forme 1 à 4 spores, peut assimiler 95% de sucre (glucose) selon l'unique voie de la glycolyse en anaérobiose. Son activité fermentaire est maximale à PH compris entre 4,5 et 5 [39].

XI. MOISSISURES ETUDIÉES

XI. 1. *Aspergillus niger*

Aspergillus niger, champignon ascomycète, est une moisissure à thalle mycélien cloisonné dont les nombreux conidiphores dressés et non ramifiés, elles sont souvent terminées de vésicules. C'est un contaminant banal et très répandu.

On peut la trouver aussi bien sur les sols glacés, dans les environnements marins que dans les steppes, pâturages, forêts et dunes. Mais c'est une espèce plus courante en zones sèches et dans les sols. C'est une espèce toxique et pathogène, elle provoque des otomycoses (mycoses pulmonaires) chez l'homme et les oiseaux. Elle peut provoquer l'aspergillose du conduit auditif externe chez les sujets présentant une lésion préalable ou une malformation

anatomique du conduit auditif. Cependant, elle possède des toxines à propriété insecticide, actives sur les moustiques responsables de la fièvre jaune [39].

XI.2. *Rhizopus stolonifer*

Rhizopus stolonifer est une moisissure (Zygomycètes) Mucorale du sol et de nombreux milieux des régions tempérées dont la croissance du thalle est particulièrement rapide. Elle forme des stolons ; sporanges sphériques dressé ; spores rondes ; rhizoïdes. C'est un agent de toxicoses, il donne aux produits alimentaires colonisés un aspect cotonneux parsemés de sporanges noirs [40].

XII. ACTIVITE ANTIBACTERIENNE

Le terme antimicrobien se rapporte aux substances naturelles et synthétiques, telles que les antibiotiques et les désinfectants, qui arrêtent ou inhibent la croissance des micro-organismes. La résistance aux antimicrobiens (RAM) survient lorsqu'une substance ou un agent antimicrobien ne peut plus arrêter ou inhiber la croissance d'un micro-organisme.

XII .1. Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne

XII.1.1. L'antibiogramme

Des disques de papier buvard, imprégnés des antibiotiques à tester, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. Dès l'application des disques, les antibiotiques diffusent de manière uniforme si bien que leurs concentrations sont inversement proportionnelles à la distance du disque. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture. Lorsque la technique est parfaitement standardisée, les diamètres des zones d'inhibition dépendent uniquement de la sensibilité du germe [41].

XII. 1. 2. L'aromatogramme

Il existent plusieurs méthodes pour l'évaluation des activité antimicrobienne des huiles essentielles .le choix d'une méthode ou d'une autre est conditionné par l'insolubilité des huiles essentielles dans les milieux aqueux, leurs volatilité , et la nécessité de les tester à de faibles concentrations.

L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale : antibiogramme ou méthode de diffusion en milieu gélosé.

a. Méthode des disques

La technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différentes substances à tester, puis les déposer à la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Après incubation, des colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones vierges autours des disques appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de la zone est grand plus la souche est sensible à la substance testée ;le diamètre de

ces zones d'inhibitions sont proportionnelles à l'activité bactériostatique de l'huile essentielle sur le germe testé[41].

b. Méthode de diffusion en puits

La méthode de diffusion en puits a été proposée pour la première fois par Cooper et Wood man en 1946 et a été reprise par Shroeder et Messing en 1949.

Elle assure une diffusion radiale de l'huile essentielle à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire facilement mesurable. La méthode consiste à découper un puits circulaire dans la gélose et y verser une solution d'huile essentielle de concentration connue. L'huile essentielle diffuse de façon radiale en donnant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablement ensemencée avec une suspension bactérienne [42].

c. Méthode de dilution

Les huiles essentielles à tester peuvent également être directement mélangées en concentration connue en milieu de culture qu'elle soit solide ou liquide (exige la dispersion homogène par un émulsifiant).Le milieu est ensuite inoculé à un taux déterminé de microorganismes, après incubation, on note la présence ou l'absence de culture.

La lecture peut être visuelle ou à l'aide d'un spectrophotomètre, le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu [43].

d. Méthode de micro atmosphère

Cette technique consiste à cultiver les microorganismes à tester dans les boîtes Pétri sur milieu de culture approprié .La différence réside principalement dans la position du disque imprégné d'huile essentielle qui est déposé au centre du couvercle de la boîte de pétri, renversée après fixation de l'huile essentielle sur le disque. Celui-ci n'est donc pas en contact avec le milieu gélosé. L'huile s'évapore dans l'atmosphère de la boîte, elle peut exercer son effet inhibiteur sur les microorganismes testés [44].

XII.2. Détermination de l'effet bactériostatique et bactéricide

La détermination de l'effet bactéricide ou bactériostatique d'une huile essentielle est réalisée en procédant à un repiquage des zones d'inhibitions formées et ne présentant aucune croissance bactérienne à l'œil nu sur milieu de culture

- S'il y'a croissance bactérienne, l'huile essentielle a un effet bactériostatique sur la souche testée.
- S'il n'y a aucune croissance bactérienne, cette dernière présente un effet bactéricide vis-à-vis de la souche utilisé

La CMI est définie comme étant la plus basse concentration capable d'empêcher une croissance bactérienne visible. Elle n'est pas totalement bactéricide et une partie de l'inoculum est capable de se développer après disparition du composé inhibiteur.

La CMB est la plus petite concentration de l'agent inhibiteur ne laissant subsister que 0,01% ou moins de survivant de l'inoculum initial après 18 heures de culture à 37°C. Cette valeur caractérise l'effet bactéricide de l'huile essentielle [45].

XII.3. Activité liée à la composition chimique

L'efficacité d'une huile essentielle dépend de sa richesse en composés phytochimiques, plus l'huile essentielle est riche en substance active, plus son activité est importante.

L'activité biologique d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique, aux groupements fonctionnels des composés majoritaires (alcool, phénols, les compositions terpéniques et cétoniques).

Les composés minoritaires jouent aussi un rôle important dans cette activité et semblent agir en synergie avec les composés principaux [46].

XII.4. Mécanismes d'action antibactérienne

Les mécanismes d'action par lesquelles les huiles essentielles exercent leur activité antibactérienne sont mal connus. Du fait de la complexité de leur composition chimique, il est difficile de donner une idée précise sur le mode d'action des huiles essentielles. Il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire.

Lorsque l'on parle d'activité antimicrobienne, on distingue deux sortes d'effets : une activité létale ou bactéricide et une inhibition de la croissance ou activité bactériostatique. Le plus souvent l'action des huiles essentielles est assimilée à un effet bactériostatique. Cependant, certains de leurs constituants chimiques semblent avoir des propriétés bactéricides.

Plusieurs études ont ainsi montré l'apparition de fuites d'ions potassium dans des cellules microbiennes (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) en contact avec de l'huile essentielle. Cette fuite de potassium est la toute première preuve de l'existence de lésions irréversibles au niveau de la membrane de la bactérie. Le thymol, le carvacrol, des composants actifs d'huiles essentielles, rendent perméable la membrane des bactéries, un effet précurseur de leur mort [47].

XIII. ACTIVITE ANTIFONGIQUE

Les antifongiques ou fongicides sont des produits ayant la capacité de tuer les champignons. Les fongistatiques sont également considérés comme des antifongiques à la limite parce qu'ils ne détruisent pas les champignons mais limitent leur développement.

Ils sont utilisés pour le traitement des mycoses ainsi que dans l'agroalimentaire contre le développement mycélien [39].

Partie II :

Matériel et méthodes

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES

I. MATERIELS BIOLOGIQUES

I.1. Matière végétale

La matière végétale utilisée a été cueillie au niveau de la forêt de Bainem située à 15 km à l'Ouest d'Alger dans le massif forestier de Bouzaréah. Elle a été séchée à l'air libre et à l'abri du soleil. Les taux d'humidité déterminés par la méthode de Dean et Starck, pour les trois échantillons de plante récoltée sont de 28,94 %, 22,95 % et 10 %.

I.2. Souches microbiennes

L'étude de l'activité antimicrobienne a été effectuée sur les souches bactériennes et fongiques suivantes :

Bactéries Gram +

- *Staphylococcus aureus*.
- *Micrococcus luteus*.
- *Enterococcus faecalis*.
- *Streptococcus faecalis*

Bactéries Gram –

- *Escherichia coli*.
- *Escherichia coli*
- *Salmonella typhimurium*.
- *Pseudomonas aeruginosa*.
- *Klebsiella pneumoniae*.

Levures

- *Saccharomyces cerevisiae*

Moisissures

- *Aspergillus niger*.
- *Rhizopus stolonifer*.

Les souches sont fournies par l'institut pasteur d'Alger sauf pour *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer* (souches fournies par le laboratoire de Sciences et Techniques de l'Environnement de l'ENP). Elles sont conservées au réfrigérateur à une température de 4°C sur gélose inclinée de conservation.

Les antibiotiques utilisés pour le screening sont :

- Penicilline
- Amoxicilline
- Streptomycine
- Colistine
- Metronidazole
- Ampicilline

II. INSTALLATIONS EXPERIMENTALES

L'étude expérimentale portera sur quatre procédés d'extraction dans le but d'effectuer une étude comparative entre ces procédés à savoir :

- L'entraînement à la vapeur d'eau (EV),
- L'hydrodistillation (HD),
- L'entraînement à la vapeur assisté par micro-ondes (EVMO),
- L'hydrodistillation assistée par micro-ondes (HDMO).

II.1. Entraînement à la vapeur d'eau

Le dispositif expérimental utilisé pour l'entraînement à la vapeur d'eau comprend un chauffe ballon, un ballon de deux litres, une colonne ou réacteur dans laquelle est introduite la matière végétale, un réfrigérant relié à la colonne servant à condenser le mélange vapeur d'eau huile-essentielle et un vase florentin pour récupérer le distillat.

II.2. Hydrodistillation

Le dispositif expérimental utilisé pour l'hydrodistillation est composé d'un chauffe ballon, un ballon de deux litres dans lequel est introduite la matière végétale, un réfrigérant servant à la condensation du mélange vapeur-huile essentielle. La récupération de l'huile se fait dans un vase florentin.

II.3. Entraînement à la vapeur d'eau assisté par micro-ondes

Le dispositif expérimental utilisé pour l'entraînement à la vapeur d'eau assisté par micro-ondes est le même que celui utilisé pour l'entraînement à la vapeur conventionnel, la seule différence est que dans ce cas la colonne contenant la matière végétale est à l'intérieur du four micro-ondes.

II.4. Hydrodistillation assistée par micro-ondes

Le même dispositif expérimental utilisé pour l'hydrodistillation conventionnelle est utilisé pour l'hydrodistillation assistée par micro-ondes, dans ce cas le ballon contenant l'eau et la matière végétale est placé dans le four micro-ondes.

Afin d'aboutir au meilleur rendement en huile essentielle, une optimisation des paramètres opératoires est impérative ; pour cela une étude paramétrique a été effectuée pour les procédés étudiés.

Les paramètres opératoires choisis sont : le temps d'extraction, le débit de vapeur d'eau et la puissance de chauffe par micro-ondes. Les domaines de variations de de ces paramètres sont résumés dans le tableau III.

Tableau III : Domaine de variation des paramètres opératoires

Procédé	Débit Q (g/min)	Puissance P (W)
Entraînement à la vapeur d'eau	2 – 4 – 6 – 8-10	/
Hydrodistillation	2 – 6 – 8	/
Entraînement à la vapeur d'eau assistée par micro-ondes	16	300 – 400 -500 – 700
Hydrodistillation assistée par micro-ondes	/	300 – 400 -500 – 700

II.5. Extraction par solvant

L'extraction se fait en batch (macération). L'appareillage est constitué d'un ballon thermostaté surmonté d'un réfrigérant. L'extrait est récupéré après évaporation du solvant. Le calcul du rendement se fait de la même manière que pour l'extraction de l'huile essentielle.

III. METHODES DE CALCUL ET DE MESURE

III.1. L'échantillonnage

Cette méthode est très ancienne et facile à réaliser. Il suffit d'étaler le lot de plante sur une surface plane en forme de carré qui sera par la suite divisé par des diagonales en quatre lots triangulaires. Les triangles opposés seront retenus pour former le nouvel échantillon. Ce dernier sera étalé et partagé comme précédemment et ainsi de suite jusqu'à l'obtention de plusieurs échantillons homogènes. C'est la méthode du quartage.

III.2. Rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après extraction et la masse de matière végétale sèche utilisée. Il est calculé par la relation suivante :

$$R_{HE} (\%) = \frac{M_{HE}}{M_S} \times 100$$

M_{HE} : La masse d'huile essentielle (g)

M_S : La masse de la matière végétale sèche (g)

IV. ACTIVITE ANTIOXYDANTE

L'activité antioxydante a été évaluée pour les huiles essentielles et les extraits par solvants.

L'étude de l'activité antioxydante des huiles essentielles a été réalisée selon la méthode de piégeage des radicaux libres à l'aide du DPPH.

Pour les extraits par solvant, l'évaluation de l'activité antioxydante a été réalisée par la méthode de dosage des phénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu.

V. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

V.1. Préparation des huiles

Les huiles essentielles n'étant pas miscibles dans l'eau, elles sont diluées dans de l'éthanol.

V.2. Préparation de l'inoculum

a) Préparation des bactéries

Avant la réalisation des tests antibactériens, un repiquage des souches de référence est effectué. Ce repiquage est effectué sur milieu solide (gélose inclinée) puis incubé à 37°C. Après 24 h d'incubation, ces tubes sont conservés au réfrigérateur à une température de 4°C.

À partir de cette culture bactérienne fraîche, on prélève quelques colonies que l'on mélange avec 10 ml de bouillon nutritif stérile que l'on incube à 37°C pendant 24h la veille de la réalisation du test antibactérien.

b) Préparation des moisissures

Les moisissures sont ravivées en prélevant une quantité de moisissure que l'on dilue dans 10 ml de milieu liquide YM. On obtient ainsi une suspension de moisissures à partir de

laquelle on ensemence les boîtes de Pétri coulées au préalable et conservées au réfrigérateur à une température de 4°C.

c) Préparation des levures :

Une petite quantité de levure (*saccharomyces cerevisiae*) est diluée dans 10 ml de bouillon YM. On obtient ainsi une suspension de levure à partir de laquelle on ensemence les boîtes de Pétri coulées au préalable et conservées au réfrigérateur à une température de 4°C.

**V.3. Détermination de la sensibilité des souches aux antibiotiques testés
« Antibiogramme »**

Les boîtes de Pétri contenant le milieu de culture sont ensemencées en surface par la souche microbienne.

Après quelques minutes, la surface des géloses devient sèche, trois disques d'antibiotiques sont alors déposés sur la surface à distance égale et les plus éloignés possible les uns des autres.

L'estimation de l'activité antimicrobienne est basée sur la lecture des diamètres des zones d'inhibitions formées par l'antibiotique.

V.4. Détermination de la sensibilité des souches microbiennes aux huiles essentielles du pin « Aromatogramme »

L'activité antimicrobienne est réalisée selon la méthode par diffusion selon le protocole décrit par Meena et Sethi (1994).

L'estimation de l'activité antimicrobienne est basée sur une échelle de mesure qui classe le pouvoir antimicrobien, en fonction des diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne, en 4 classes [48].

- Fortement inhibitrice : $D > 28\text{mm}$
- Modérément inhibitrice : $16 < D < 28\text{mm}$
- Légèrement inhibitrice : $10 < D < 16\text{ mm}$
- Non inhibitrice : $D < 10\text{ mm}$

V.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La détermination de la CMI et CMB s'est faite suivant un protocole utilisé par la pharmacopée Française pour l'étude de l'activité des antibiotiques. Ce protocole a été

adapté pour permettre l'étude des huiles essentielles [50].

V.5.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI

La CMI est la concentration d'huile essentielle la plus faible ne laissant pas de culture microbienne visible (pas de croissance de la population) [48].

V.5.2. Détermination de la CMB

Protocole expérimental

Après la détermination de la CMI, prélever à l'anse de platine à partir de tous les tubes où aucune culture ne s'est développée (tubes restés clairs de concentration > CMI) et ensemercer sur des boîtes Pétri qui sont mises ensuite à incuber 24h à 37°C.

Lire la CMB par comparaison à la numération initiale réalisée avec les boîtes témoins et en comparant la densité des colonies obtenue à partir des tubes restés clairs de la CMI avec la densité en colonies des boîtes témoins :

- Pur (Inoculum pur), il y'a 100% de survivants ;
- Dilué au 1/10, il y'a 10 % de survivants ;
- Dilué au 1/100 ; il y'a 1% de survivants ;
- Dilué au 1/1000, il y'a 0,1 % de survivants ;
- Dilué au 1/10000 ; il y'a 0,01% de survivants.

La CMB est définie par la concentration ne laissant persister que 0,1 % de survivant au plus [50].

Partie III :

Résultats et discussions

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

Dans ce chapitre nous présenterons les résultats de l'extraction de l'huile essentielle de pin par les quatre procédés étudiés, de l'extraction des résidus d'extraction et des activités antioxydante et antimicrobiennes des huiles et extraits récupérés.

I. EXTRACTION PAR ENTRAÎNEMENT A LA VAPEUR D'EAU

L'étude effectuée pour l'extraction de l'huile essentielle de pin par entraînement à la vapeur d'eau a porté sur l'évaluation de l'influence du temps d'extraction, ainsi que du débit de vapeur d'eau sur le rendement en huile essentielle pour une masse végétale de 100 g.

I.1. Influence du temps d'extraction

Le rendement en huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau varie entre 0,27% et 0,61%. La représentation des variations du rendement en huile essentielle en fonction du temps (figure 6), nous permet de remarquer que le rendement augmente rapidement durant les 15 premières minutes, son évolution est plus lente par la suite pour se stabiliser au bout de 3 heures.

La durée d'extraction a donc été fixée à 3 heures pour tous les essais suivants.

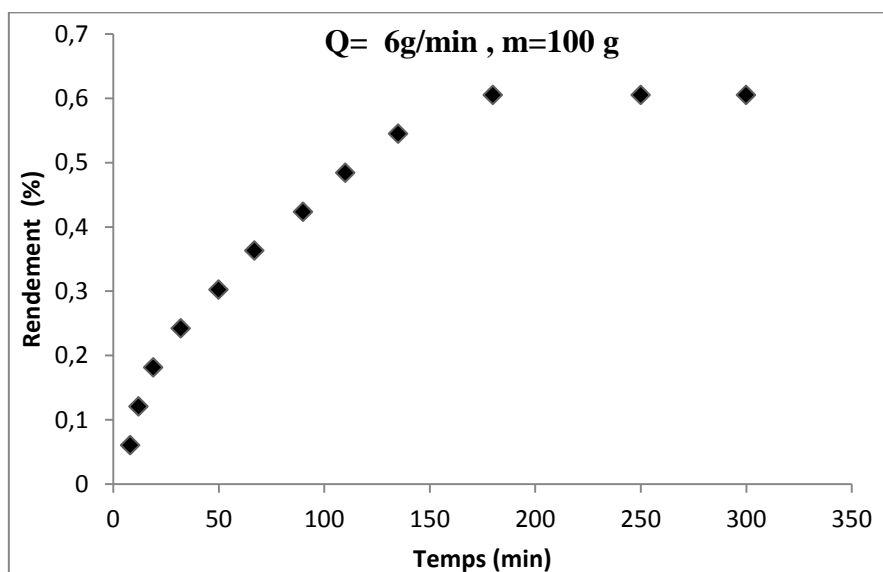


Figure 6 : Evolution du rendement en huile essentielle en fonction du temps

Afin de déterminer l'ordre de la cinétique d'extraction de l'huile essentielle, nous avons supposé que cette dernière suit une loi du premier ordre où la vitesse d'extraction s'écrit comme suit :

$$-\ln\left[1 - \frac{R_{HE}}{R_{HE\infty}}\right] = k_E t$$

Où :

k_E : la constante de vitesse d'extraction,

$R_{HE\infty}$: le rendement en huile essentielle au temps infini,

R_{HE} : le rendement en huile essentielle au temps t .

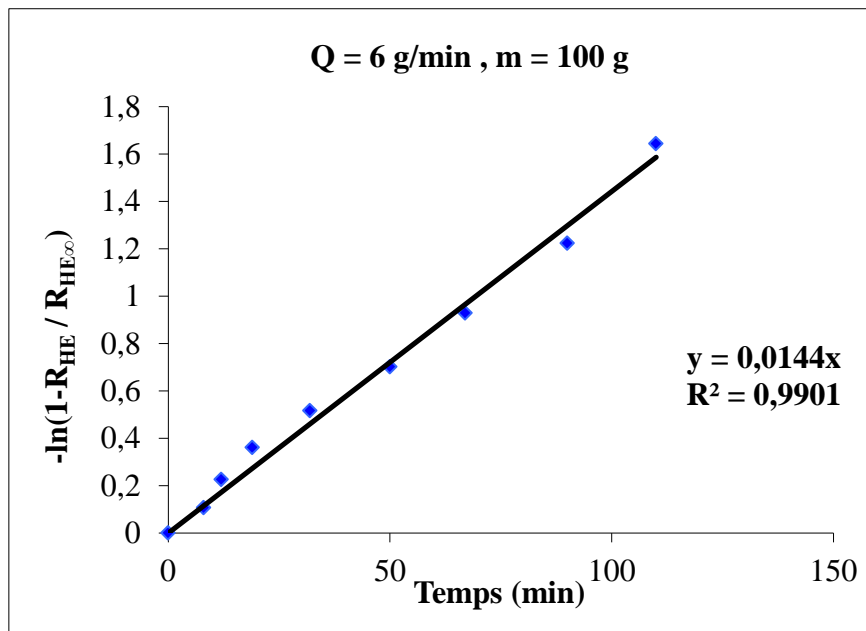


Figure 7 : Evolution de $-\ln\left[1 - \frac{R_{HE}}{R_{HE\infty}}\right]$ en fonction du temps

La figure 7 met en évidence une droite de pente $k = 0,014 \text{ min}^{-1}$, ce qui nous permet de confirmer que la cinétique d'extraction de l'huile essentielle évolue selon l'ordre 1.

I.2. Influence du débit de vapeur d'eau

Afin de déterminer l'influence du débit de vapeur d'eau sur le rendement en huile essentielle, des essais à différents débits de vapeur d'eau ont été effectués. Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 8.

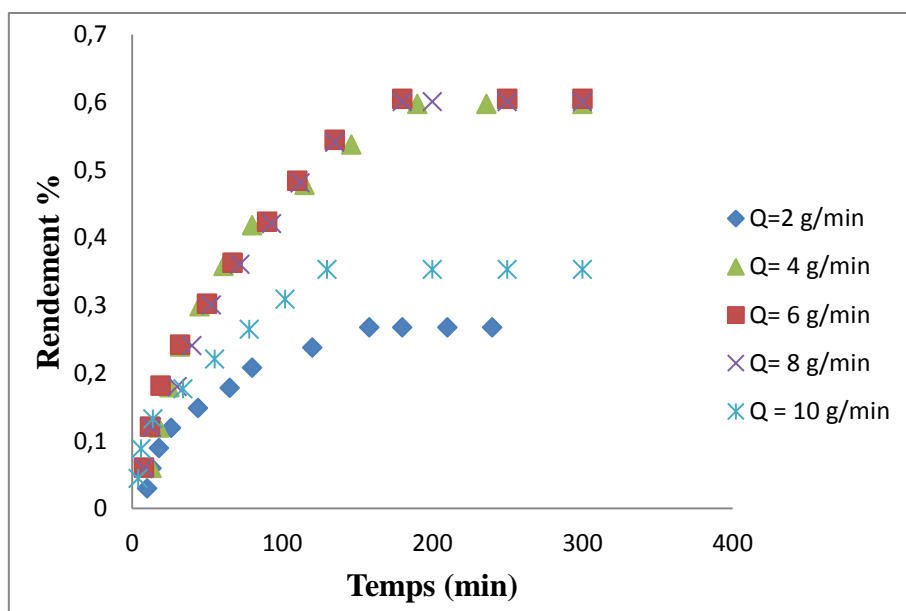


Figure 8 : Evolution du rendement en fonction du temps pour différents débits

D'après la figure 8, nous pouvons remarquer que le maximum d'huile essentielle extraite (0,61%) est obtenu pour un débit de 6 g/min. Des rendements proches de ce dernier sont observés pour les débits de vapeurs égaux à 4 g/min et 8 g/min (0,60%).

Nous remarquons aussi que pour un débit de 2 g/min, le rendement en huile essentielle est le plus faible (0,27 %) ; cela pourrait être expliqué par le fait que pour un faible débit, la vapeur d'eau n'est pas suffisante pour entraîner l'huile essentielle.

La diminution du rendement pour le plus fort débit (10 g/min) pourrait s'expliquer par la création de chemins préférentiels. Une partie de la matière végétale n'est pas en contact avec la vapeur et l'huile n'est donc pas extraite.

II. EXTRACTION PAR HYDRODISTILLATION

Le second procédé étudié est l'extraction par hydrodistillation. La procédure adoptée est la même que pour l'entraînement à la vapeur d'eau. La seule différence est que dans ce cas la masse de plante utilisée a été fixée à 50 g en raison du réacteur qui ne pouvait contenir plus de cette masse.

II.1. Influence du temps d'extraction

L'extraction par hydrodistillation donne un rendement en huile essentielle qui varie entre 0,1 % et 0,57 %. La figure 9 représentant les variations du rendement en huile essentielle en fonction du temps montre que le rendement augmente graduellement et est stable après trois heures d'extraction. La durée d'extraction a donc été fixée à 3 heures pour les essais suivants.

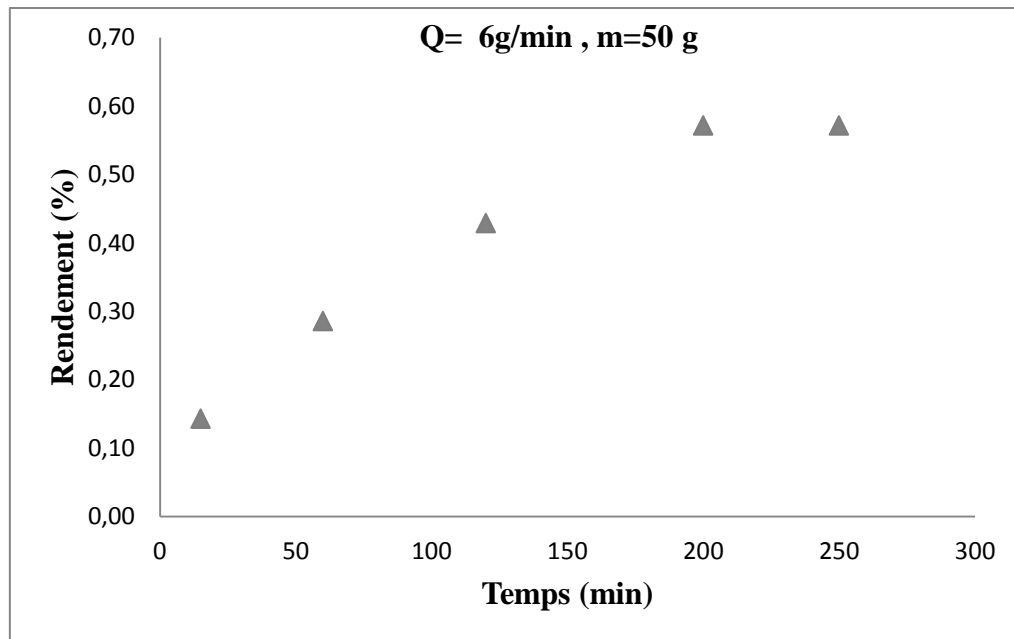


Figure 9 : Evolution du rendement en huile essentielle en fonction du temps

Comme pour l'entraînement à la vapeur d'eau, nous avons supposé que la cinétique d'extraction par hydrodistillation suit une loi du premier ordre où la vitesse d'extraction est donnée par l'expression suivante :

$$-\ln \left[1 - \frac{R_{HE}}{R_{HE\infty}} \right] = k_E t$$

k_E : la constante de vitesse d'extraction,

$R_{HE\infty}$: le rendement en huile essentielle au temps infini,

R_{HE} : le rendement en huile essentielle au temps t.

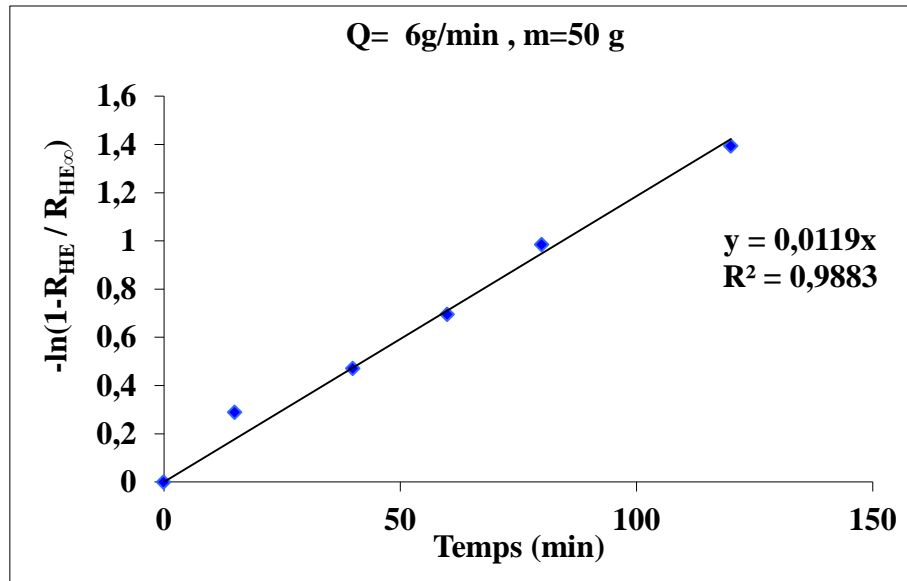


Figure 10 : Evolution de $-\ln\left[1 - \frac{R_{HE}}{R_{HE\infty}}\right]$ en fonction du temps

La figure 10 met en évidence une droite de pente $k = 0,011 \text{ min}^{-1}$, ce qui nous permet de conclure que la cinétique d'extraction de l'huile essentielle évolue selon l'ordre 1 avec une vitesse de $0,011 \text{ min}^{-1}$.

II. 2. Influence du débit de vapeur d'eau

Pour déterminer l'influence du débit de vapeur d'eau sur le rendement en huile essentielle, des extractions ont été effectuées à différents débits de vapeurs d'eau : 2, 4, 6 et 8 g/min. Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 11.

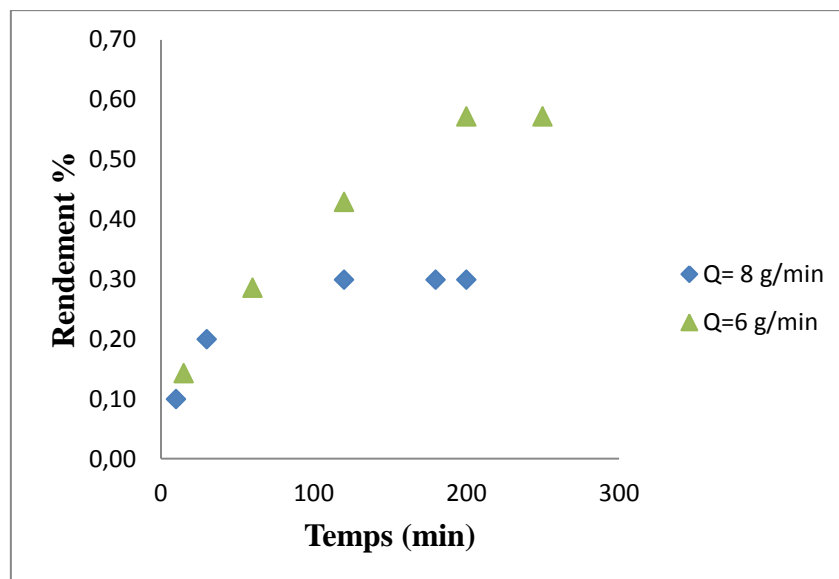


Figure 11 : Evolution du rendement en fonction du temps pour différents débits

Notons que pour les débits de 2 et 4 g/min, nous n'avons pas obtenu d'huile. Il semble que la quantité de vapeur est insuffisante pour l'extraire de la plante.

Le rendement augmente graduellement et se stabilise autour de 2 h pour le débit de 8 g/min et 3h30 pour un débit de 6 g/min. Comme pour l'entraînement à la vapeur d'eau, le meilleur rendement est obtenu pour ce dernier débit. La diminution du rendement pour un débit de 8 g/min pourrait s'expliquer d'une part par la création de chemins préférentiels, de ce fait une partie de la plante n'est pas traversée par la vapeur et d'autre part par une solubilisation partielle de l'huile essentielle dans l'eau pendant l'hydrodistillation.

III. EXTRACTION PAR ENTRAINNEMENT A LA VAPEUR ASSISTE PAR MICRO-ONDES

L'étude effectuée pour l'extraction de l'huile essentielle de pin par entraînement à la vapeur d'eau assisté par micro-ondes a porté sur l'évaluation de l'influence sur le rendement en huile essentielle du temps d'extraction, ainsi que de la puissance de chauffe par micro-ondes..

III.1. Influence du temps d'extraction

L'extraction par entraînement à la vapeur d'eau assisté par micro-ondes donne un rendement en huile essentielle qui varie entre 0,07 % et 0,44 %. La figure 12 représentant les variations du rendement en huile essentielle en fonction du temps montre que le rendement augmente rapidement et que la totalité de l'huile est récupérée au bout de 40 minutes. Cette durée a été fixée pour les essais suivants.

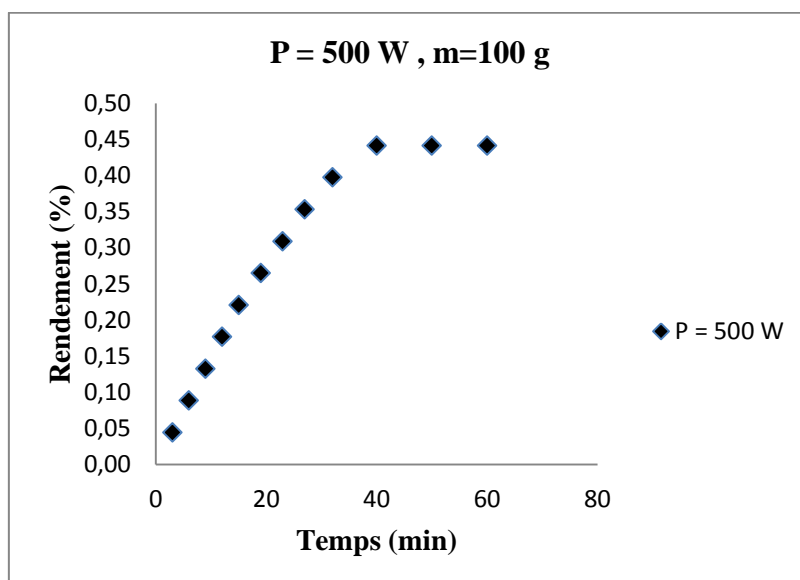


Figure 12 : Evolution du rendement en huile essentielle en fonction du temps

Comme pour les procédés précédents, nous avons supposé que la cinétique d'extraction suit une loi du premier ordre. Nous avons donc représenté les variations de $-\ln\left[1 - \frac{R_{HE}}{R_{HE\infty}}\right]$ en fonction du temps (figure 13).

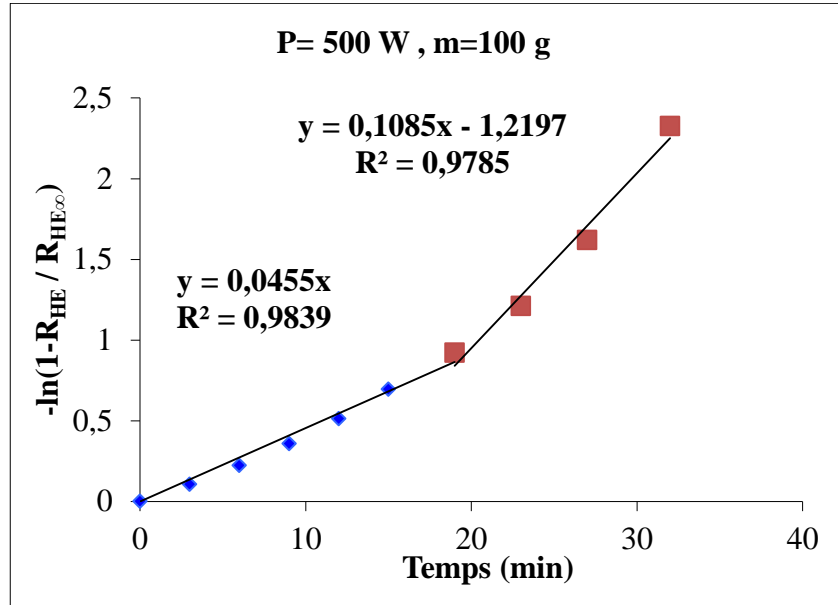


Figure13 : Evolution de $-\ln\left[1 - \frac{R_{HE}}{R_{HE\infty}}\right]$ en fonction du temps

La figure 13 met en évidence deux droites, la première de 0 à 20 min de pente k_1 égale à $0,045 \text{ min}^{-1}$, et la seconde de 20 à 35 min de pente k_2 égale à $0,108 \text{ min}^{-1}$, ce qui nous permet de conclure que la vitesse d'extraction de l'huile essentielle évolue selon l'ordre 1. L'existence de deux droites laisse supposer que la cinétique se fait en deux étapes. Une première qui correspondrait à la mise en chauffe de la matière végétale par les micro-ondes. Les sites d'huile étant endogènes leur accès est difficile, ce qui explique la faible valeur de la vitesse d'extraction. Au bout de 20 min d'exposition aux micro-ondes, la structure de la plante serait expansée et les sites éclatés, l'huile est alors plus accessible à la vapeur qui l'entraîne plus facilement, la vitesse d'extraction est alors plus importante.

III.2. Influence de la puissance de chauffe par micro-ondes

Pour déterminer l'influence de la puissance de chauffe par micro-ondes sur le rendement en huile essentielle, des extractions ont été effectuées à différentes puissances (300, 400, 500 et 700W). La masse de matière végétale a été fixée à 100 g et le débit de vapeur à 16 g/min, valeur limitée par l'installation utilisée. Les résultats obtenus sont représentés à la figure 14.

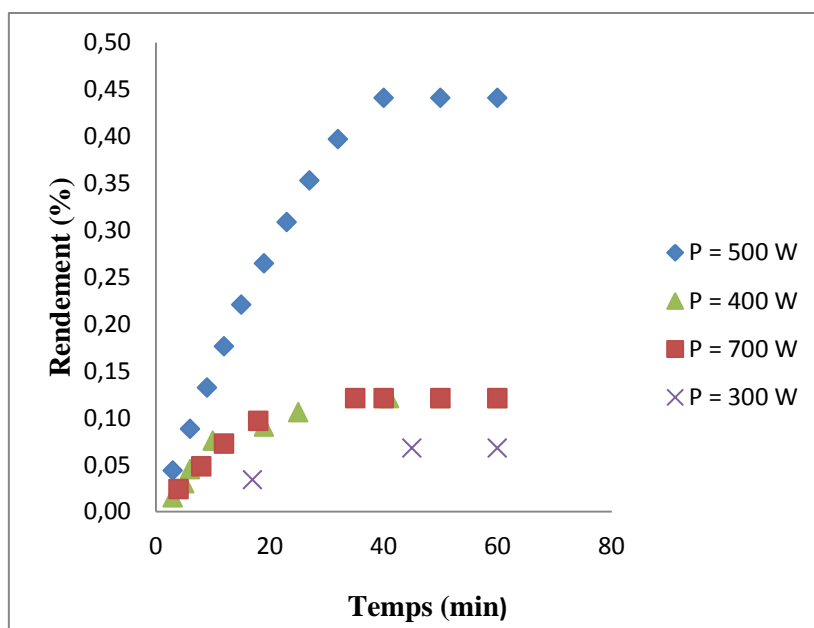


Figure 14 : Evolution du rendement en fonction du temps pour différentes puissances

L'examen de la figure 14, montre que la quantité maximale d'huile essentielle est extraite pour une puissance de 500 W. Les rendements en huile essentielle obtenus pour les puissances de 300W et de 400 W sont beaucoup moins importants. Ceci peut s'expliquer par le fait que la chaleur générée par ces puissances n'est pas suffisante pour faire éclater les cellules sécrétrices d'huile essentielle, et donc une partie de cette dernière n'est pas extraite.

En revanche, pour une puissance de 700 W, nous observons une diminution du rendement. La chaleur générée par cette puissance étant très importante, une partie de l'huile est probablement perdue par évaporation.

IV. EXTRACTION PAR HYDRODISTILLATION ASSISTEE PAR MICRO-ONDES

VI.1. Influence de la puissance de chauffe par micro-ondes

Comme pour l'entraînement à la vapeur d'eau, nous avons évalué l'influence de la puissance de chauffe par micro-ondes sur le rendement en huile essentielle. Les essais ont été réalisés en fixant la masse de matière végétale à 50 g. Les quantités d'huile obtenues étant très faibles il n'a pas été possible de suivre la cinétique d'extraction. Par conséquent la durée d'extraction a été fixée à 90 min, durée à partir de laquelle nous n'avons plus observé d'huile dans le distillat.

Les résultats obtenus pour l'étude de la variation de la puissance micro-ondes sont donnés dans le tableau IV.

Tableau IV : Influence de la puissance micro-ondes sur le rendement en huile essentielle

Puissance P (W)	Rendement en huile R_{HE} (%)
300	0,01
400	0,13
500	0,16
700	0,05

Nous remarquons que le rendement optimal est obtenu pour une puissance de 500 W. Pour une puissance de 300 W ; le rendement en huile essentielle est pratiquement nul. Cette puissance serait insuffisante pour récupérer l'huile de la plante. Par contre pour 700 W, la faible valeur du rendement serait due à des pertes d'huile par évaporation.

V. ETUDE COMPARATIVE DES QUATRE PROCÉDES D'EXTRACTION

Les résultats obtenus par les quatre procédés étudiés sont résumés dans le tableau V.

Tableau V : Rendement, durée d'extraction et constante de vitesse de l'extraction de l'HE de pin par EV, EVMO, HD et HDMO

Procédé	EV	EVMO	HD	HDMO
Rendement R_{HE} (%)	0,61	0,44	0,57	0,16
Durée d'extraction (min)	180	40	180	90
Constante de vitesse (min⁻¹)	0,014	K ₁ = 0,045 K ₂ = 0,108	0,011	-

L'examen de ce tableau nous permet de tirer les conclusions suivantes :

- Les rendements obtenus par les procédés conventionnels (EV et HD) sont du même ordre de grandeur et plus importants que ceux obtenus par les procédés assistés par micro-ondes. Cependant, il faut noter que ces derniers n'ont pas été optimisés, vu que la valeur maximale de débit délivrée par l'installation utilisée était limitée à 16 g.min⁻¹. Cette valeur est insuffisante pour extraire la totalité de l'huile de la plante. Une étude approfondie avec des débits plus importants doit être entreprise pour optimiser ce paramètre.
- Les durées d'extraction relatives aux procédés assistés par micro-ondes sont nettement plus courtes, ce qui est en accord avec la littérature. Ceci est confirmé par

les constantes de vitesse qui sont plus importantes pour ces procédés. Les durées d'extraction pourraient encore être réduites une fois le débit de vapeur optimisé.

VI. DETERMINATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE

L'étude de l'activité antioxydante a été réalisée selon la méthode de piégeage des radicaux libres à l'aide du DPPH pour l'huile essentielle extraite par entraînement à la vapeur d'eau et entraînement à la vapeur d'eau assisté par microondes. Pour l'HD et l'HDMO, les quantités d'huile étaient insuffisantes pour les tests. Les résultats obtenus sont illustrés sur la figure 15.

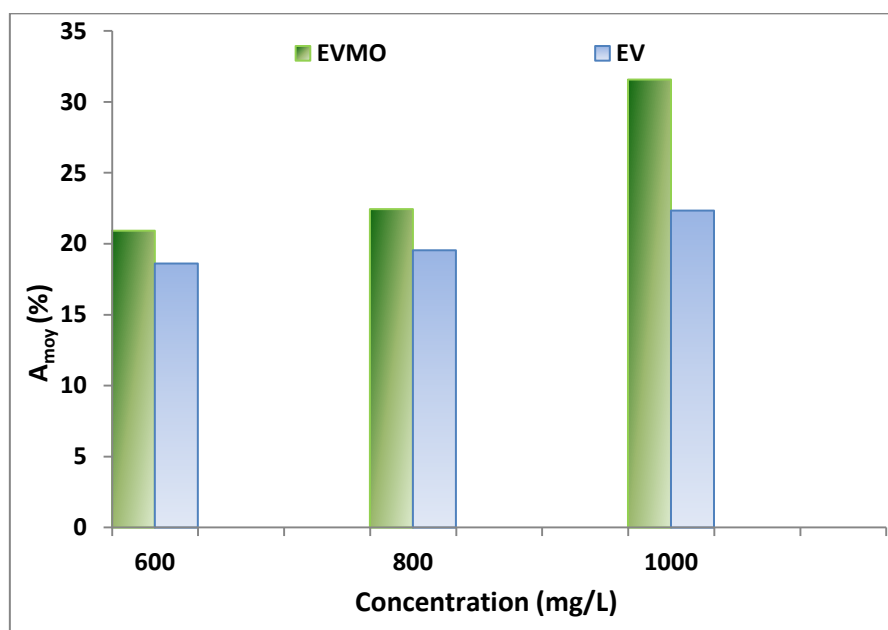


Figure 15 : Activité antioxydante des HE de pin extraites par EVMO et EV

Nous pouvons constater que l'activité antioxydante de l'huile essentielle de pin extraite par les deux procédés considérés est relativement faible en comparaison avec les huiles essentielles extraites d'autres plantes telle que le thym qui peut atteindre une activité de 90% pour une concentration de 1000 mg.L⁻¹. Nous remarquons aussi qu'on obtient une meilleure activité pour l'huile essentielle extraite par micro-ondes. Cette différence d'activité serait probablement liée à des différences dans les compositions chimiques des deux huiles.

VII. EXTRACTION PAR SOLVANT

Afin d'évaluer la teneur en phénols totaux des aiguilles de pins, les résidus de plante obtenus après extraction de l'huile essentielle par les quatre procédés étudiés ont subi une extraction à l'éthanol. Les essais ont porté sur 20 g de plante entière ou broyée macérée dans 400 ml d'éthanol pendant 3 heures.

Les rendements en extrait obtenus après évaporation de l'éthanol sont illustrés sur la figure 16.

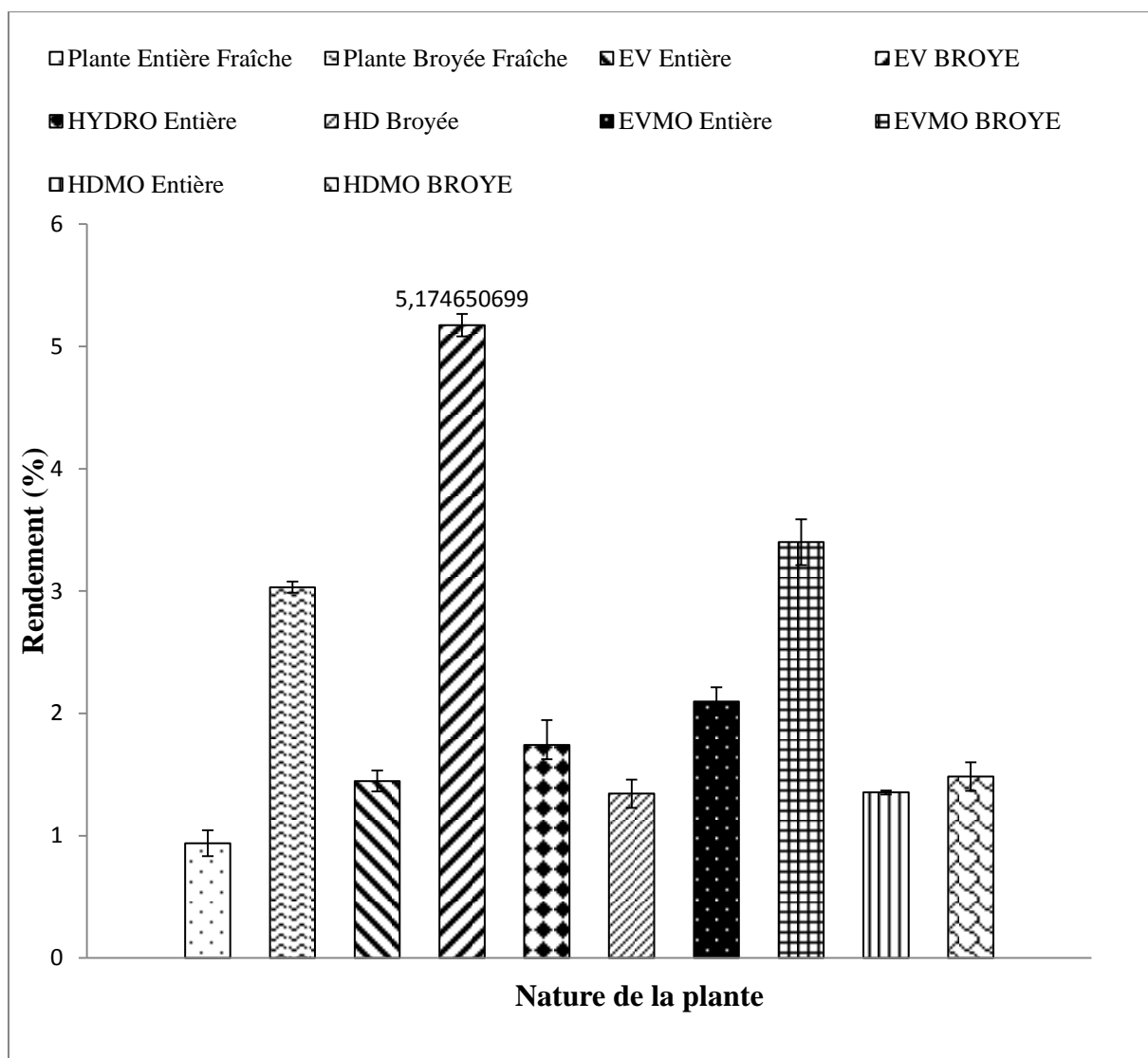


Figure 16 : Rendement en extrait éthanolique en fonction de la nature de la plante

L'examen de cette figure nous permet de tirer plusieurs conclusions :

- A l'exception du résidu de l'HD et l'HDMO où les résultats sont comparables, la plante broyée donne de meilleurs rendements que la plante entière pour tous les autres cas. Ceci est expliqué par le fait que le broyage augmente la surface d'échange entre le solide (plante) et le solvant et donc le transfert de l'extrait du solide vers le solvant est amélioré. Dans le cas de l'hydrodistillation, il est possible qu'une partie de ces extraits se soient déjà solubilisés dans l'eau lors de l'extraction de l'huile essentielle, ce qui explique également les faibles rendements en extraits éthanoliques par rapport à ceux obtenus pour les autres échantillons.

- Les rendements en extraits des résidus de l'EV et l'EVMO sont supérieurs à ceux de la plante fraîche (n'ayant pas subi d'extraction de l'huile essentielle). Il est possible que les composés solubles dans l'éthanol soient présents sous une forme liée (glycosides) dans la plante fraîche et ne sont donc pas extraits sous cette forme par l'éthanol. L'intervention de la vapeur lors de l'extraction de l'huile essentielle libère ces composés qui sont alors facilement extraits par l'éthanol.
- Le rendement en extrait du résidu de l'EVMO plus faible que celui obtenu pour le résidu de l'EV pourrait être dû à une perte de composés suite à l'action des micro-ondes.

Il est à noter que l'analyse des extraits pour déterminer leurs compositions chimiques reste le seul moyen qui puisse nous permettre de confirmer ou d'infirmer toutes les suppositions émises pour expliquer ces résultats.

VIII. DOSAGE DES POLYPHENOLS DES EXTRAITS ETHANOLIQUES

Afin d'avoir une première estimation qualitative de la nature des extraits éthanoliques récupérés, nous avons procédé au dosage de leur teneur en phénols totaux. Les résultats obtenus exprimés en milligrammes d'acide gallique par gramme de concrète utilisée sont représentés à la figure 17.

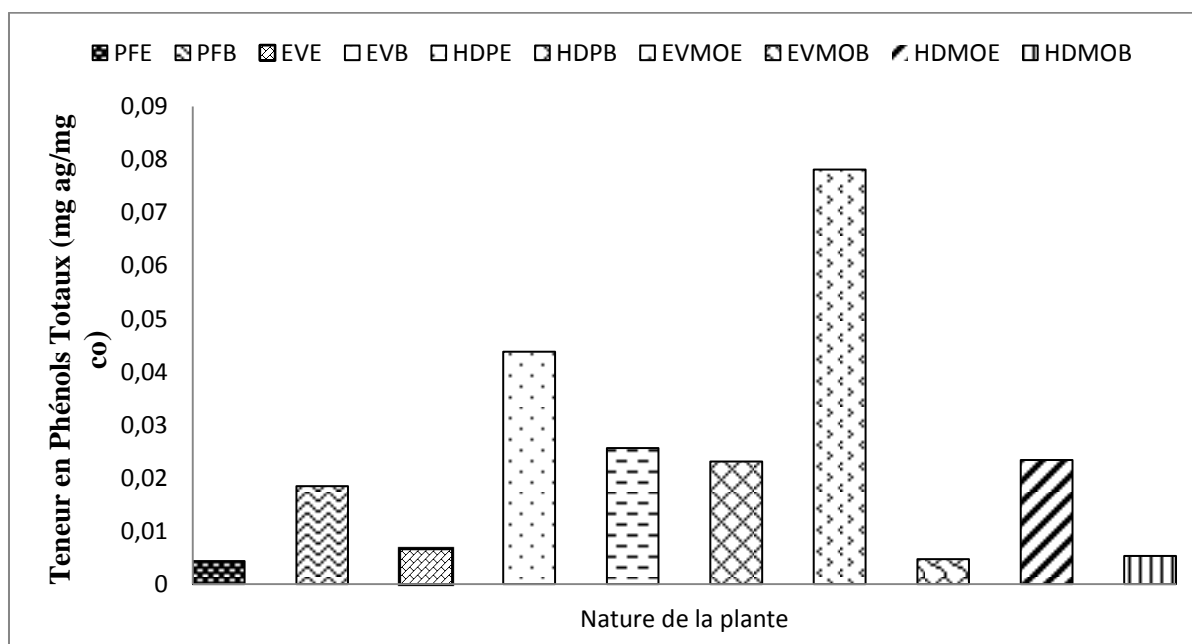


Figure 17 : Teneur en phénols totaux des extraits éthanoliques de la plante fraîche et des résidus de distillation

A partir de la figure 17, nous constatons que pour les résidus des procédés conventionnels ainsi que pour la plante fraîche la quantité de polyphénols extraite est supérieure quand la plante est broyée ce qui confirme que les sites sont plus accessibles. Par contre pour les procédés assistés par micro-ondes on observe le phénomène inverse. En effet, les concentrations en polyphénols sont beaucoup plus importantes pour la plante entière.

L'hypothèse émise est que la matière végétale soumise à l'action des micro-ondes lors de l'extraction de l'huile essentielle subie des modifications et sa structure est expansée. Bien qu'elle soit entière, les sites contenant les extraits sont facilement accessibles au solvant, par conséquent les rendements sont élevés. Le broyage de la plante expansée entraîne une perte de composés ayant pour conséquence une diminution des rendements en extrait.

Pour confirmer ces hypothèses d'autres essais ainsi que des coupes histologiques de la matière végétale doivent être entrepris.

IX. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

L'étude de l'activité antimicrobienne a porté sur l'évaluation de la sensibilité des souches microbiennes vis-à-vis de l'huile essentielle de pin extraite par deux procédés différents à savoir : l'entraînement à la vapeur d'eau et l'entraînement à la vapeur d'eau assisté par microondes.

IX.1.Détermination de la sensibilité des souches aux antibiotiques testés « Antibiogramme »

Afin d'évaluer la sensibilité et la résistance aux antibiotiques des souches étudiées, un antibiogramme a été réalisé ; les diamètres des zones d'inhibitions sont portés sur le tableau VI:

Tableau VI : Antibiogramme

	Souche bactérienne	Diamètres moyen d'inhibition (mm)					
		P ¹	AMX ²	MTR ³	S ⁴	AM ⁵	Cs ⁶
Bactéries Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	20±0	25,33±1,52	6±0	8,33±0,57	6±0	6±0
	<i>Micrococcus luteus</i>	22,66±3,21	27±1,73	6±0	7±0	23±1	6±0
	<i>Enterococcus faecalis</i>	15,33±0,57	29±1	6±0	10±0	25±3	6±0
	<i>Streptococcus faecalis</i>	12,33±0,57	19,33±1,54	6±0	8,66±0,57	21,66±0,57	6±0
Bactéries Gram -	<i>Escherichia coli</i>	13,66±0,57	15,66±0,57	6±0	10,6±0,57	19,33±1,15	7±0
	<i>Escherichia coli Ala</i>	9±0	6±0	9±0	7±0	6±0	7±0
	<i>Salmonella typhimurium</i>	11,33±0,57	23±1	6±0	9,33±0,57	19,66±0,57	8±0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23,33±0,57	22,66±3,21	6±0	10±0	25±1	6±0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6±0	6±0	6±0	18±1	6±0	6±0

La mesure des diamètres tient compte du diamètre du puits qui est de 6 mm.

Ces résultats montrent que les souches bactériennes étudiées sont sensibles aux antibiotiques choisis.

La figure 18 illustre les diamètres d'inhibition obtenus pour l'antibiogramme

¹Pénicilline

²Amoxicilline

³Metronidazole

⁴Streptomycine

⁵Ampicilline

⁶Colistine

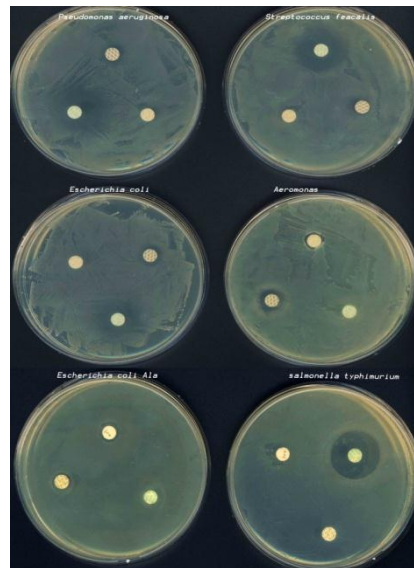


Figure 18 : sensibilités des quelques souches bactériennes aux antibiotiques testés
« Antibiogramme »

IX.2. Détermination de la sensibilité des souches microbiennes aux huiles essentielles du pin « Aromatogramme »

L'étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de pin a été effectuée en réalisant un aromatogramme.

Les mesures des diamètres des zones d'inhibitions sont représentées sur la figure 19 (la mesure des diamètres tient compte du diamètre du puits qui est de 6 mm).

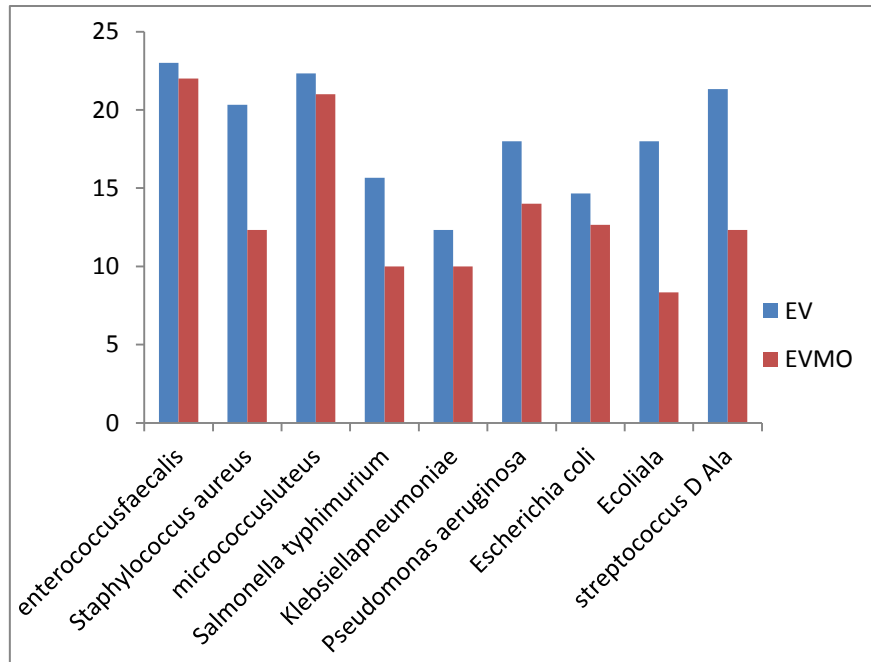


Figure 19 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition des souches bactériennes en fonction des huiles essentielles étudiées

A partir de la figure 19 nous remarquons que pratiquement toutes les souches bactériennes étudiées ont une sensibilité avérée vis-à-vis des deux huiles essentielles testées. Cependant, pour l'huile extraite par un même procédé ; les souches bactériennes à Gram positif possèdent un diamètre d'inhibition moyen plus important que ceux des bactéries à Gram négatif ; ceci confirme les résultats des études antérieures. En effet, comme l'ont démontrés **Monicaet al. [22]**, par la méthode de diffusion des disques, l'huile essentielle extraite des cônes de *P. brutia* présente une inhibition des agents pathogènes à Gram positif tel que *Staphylococcus aureus* (zone d'inhibition de 10 mm) tandis que nos résultats montrent que le diamètre d'inhibition représente le double pour l'extraction à la vapeur d'eau conventionnelle. **Hong et al. [24]**, ont confirmé que les huiles essentielles à partir des aiguilles de ces espèces avaient des effets antibactériens avec un diamètre d'inhibition (14mm) contre une souche de *staphylococcus aureus*.

Pour les bactéries à Gram négatif ; **Monicaet al. [22]** ont montré que l'huile essentielle extraite des cônes de *P. brutia* présente une inhibition des agents pathogènes à Gram négatif, tels que *Escherichia coli* (zone d'inhibition supérieure à 52 mm).

Pour les huiles essentielles extraites par le procédé d'entraînement à la vapeur assisté par micro-ondes, nous distinguons des zones d'inhibitions inférieures à celles trouvées pour les huiles extraite par le procédé classique. Ceci peut être expliqué par le fait que la chaleur exercé par les micro-ondes sur la matière végétale au cours de l'extraction de l'huile essentielle a changé la composition de cette dernière et a donc détérioré les composés responsables de son activité antimicrobienne.

IX.3.Détermination des paramètres de l'activité antimicrobienne

La méthode utilisée pour la détermination des paramètres de l'activité antimicrobienne a porté sur la détermination de la CMI et la CMB décrite dans le chapitre matériel et méthodes. Cette étude a porté sur deux souches bactériennes : *Salmonella typhimurium* et *Micrococcus luteus*. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau VII.

Tableau VII : Paramètres de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles testées

Souche bactérienne	EV		EVMO	
	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>Salmonella typhimurium</i>	Dilution 1/32	Dilution 1 /4	Dilution 1 /32	Dilution 1 /4
<i>Micrococcusluteus</i>	Dilution 1 /32	Dilution 1 /4	Dilution 1 /32	Dilution 1/4

Nous constatons que les concentrations minimales inhibitrices ainsi que les concentrations minimales bactéricides sont les mêmes pour les deux huiles testées avec une CMI de 15µl/ml.

La figure 20 illustre l'évolution de la croissance de la souche bactérienne *Salmonella typhimurium* en fonction de la concentration en huile essentielle.

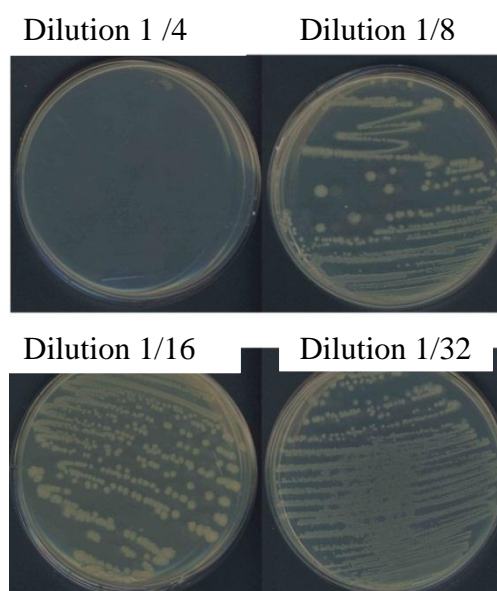


Figure20 : Evolution de la croissance de *Salmonella typhimurium* en fonction de la concentration en huile essentielle.

X. DETERMINATION DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE

L'étude de l'activité antifongique de l'huile essentielle de pin a été réalisée par la méthode des puits en utilisant 25 μl d'huile essentielle pour 100 μl de suspension bactérienne. Les diamètres d'inhibition obtenus sont représentés sur l'histogramme de la figure 21 (la mesure des diamètres tient compte du diamètre du puits qui est de 6 mm).

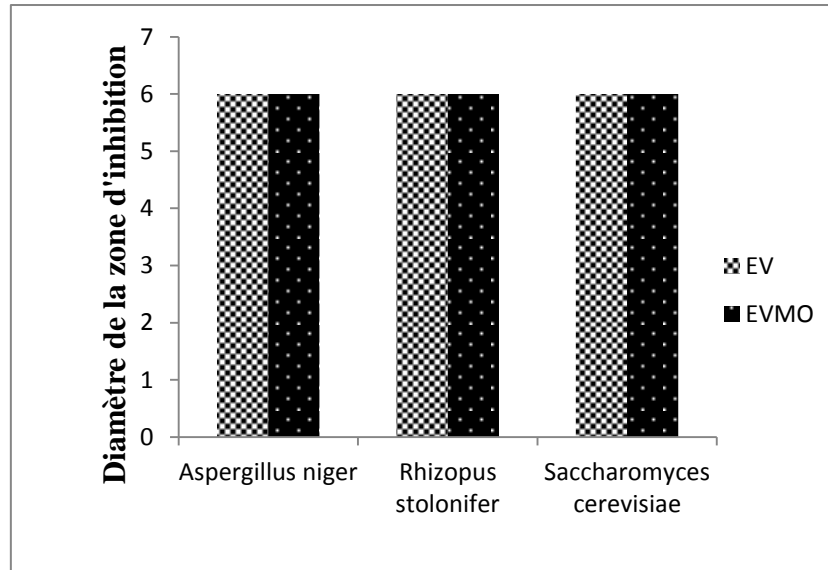


Figure 21 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition des souches fongiques en fonction des huiles essentielles étudiées

En se référant à l'histogramme de la figure 21, nous pouvons constater que les souches fongiques étudiées ne présentent aucune sensibilité aux huiles essentielles de pin testées (absence de zone d'inhibition).

Ceci est dû à la composition de l'huile essentielle. En effet, les principaux composés responsable d'une grande activité antifongique et antibactériennes sont généralement dû à la présence de thymol et du carvacrol ,ce qui a été prouvé par par **Rasooli et al.[51]** en étudiant l'inhibition de la croissance de l'*Aspergillus parasiticus* exposé aux huiles essentielles extraites de deux variétés de thym : *Thymus eriocalyx* et *Thymus x-porloc*.

Conclusion générale

CONCLUSION GENERALE

L'objectif de ce travail était d'extraire l'huile essentielle de *Pinus halepensis* par quatre procédés d'extractions à savoir : l'entraînement à la vapeur d'eau, l'hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur d'eau assisté par micro-ondes et l'hydrodistillation assistée par micro-ondes, d'évaluer ses propriétés antimicrobienne et antioxydante et de quantifier la teneur en phénols totaux des aiguilles de pin.

Les rendements obtenus par les procédés conventionnels sont comparables (0,61% pour l'EV et 0,57 % pour l'HD) et supérieurs à ceux des procédés assistés par micro-ondes (0,44% pour l'EVMO et 0,16 % pour l'HDMO). Cependant, l'optimisation de ces derniers n'est pas complète car elle n'a porté que sur la puissance. La valeur optimale du débit n'a pu être déterminée en raison de l'installation expérimentale qui était limitée à 16 g.min⁻¹, valeur insuffisante pour extraire la totalité de l'huile de la plante. Malgré ce handicap, la durée d'extraction a été nettement diminuée avec un gain de temps de plus de 77 % pour l'EVMO et 50 % pour l'HDMO. Une étude approfondie utilisant des débits plus importants devrait être entreprise pour optimiser ce paramètre ce qui permettrait de réduire d'avantage les durées d'extraction.

L'étude l'activité antioxydante de l'huile essentielle de pin extraite par EV et EVMO a montré une activité relativement faible en comparaison avec les huiles essentielles extraites d'autres plantes telle que le thym qui peut atteindre une activité de 90% pour une concentration de 1000 mg.L⁻¹. Cependant, les résultats obtenus pour la teneur en phénols totaux des extraits éthanoliques des résidus d'extraction sont très intéressants, particulièrement pour le résidu de l'EVMO où le rendement en phénol totaux et de l'ordre de 0,08 mg d'acide gallique/mg de concrète.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites par EV et EVMO a montré que l'huile essentielle de pin possédait une activité antimicrobienne certaine envers des bactéries aussi bien à Gram négatif que celles à Gram positif. Cette activité est moins importante pour l'huile essentielle extraite par entraînement à la vapeur d'eau conventionnel. L'hypothèse émise est que les composés extraits par entraînement assisté par micro-ondes sont différents de ceux extraits par le procédé conventionnel.

Cette étude, loin d'être achevée a permis d'approcher en partie les conditions optimales de l'extraction de l'huile essentielle du *Pinus halepensis*. Elle mériterait d'être approfondie pour compléter l'optimisation des procédés assistés par micro-ondes. Il est aussi primordial de caractériser les huiles essentielles ainsi que les extraits phénoliques par la détermination de leurs compositions chimiques et l'identification des principes actifs pour une éventuelle utilisation dans divers domaines tels que les industries agroalimentaire, parapharmaceutique, cosmétologique...

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Kadik, B.
Contribution à l'étude du pin d'Alep (*Pinus halepensis* MILL.) en ALGERIE :
Ecologie dendrométrie morphologie, Alger, Algérie, 1987.
- [2] Nahal, I.

Annales de l'école nationale des eaux et forêts et de la station de recherches et
expériences Tome XIX, Nancy, France, 1962.
- [3] <http://documents.irevues.inist.fr/bitstream/handle/2042/40440/152.pdf>
- [4] <http://www.tela-botanica.org>
- [5] Weinstein-Evron, M. et Lev-Yadun, S.

Palaeoecology of *Pinus halepensis* in Israel in the light of palynological and
archaeobotanical data. Leiden, Backhuys, 119-130, 2000.
- [6] Quezel, P.

Les pins du groupe "*Halepensis*" Ecologie, Végétation, Ecophysiologie. Paris:
CIHEAM, 1985.
- [7] Billerbeck, V.G.

Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques, *Phytothérapie*, 5, 249–
253, 2007.
- [8] Association Française de Normalisation, Recueil de normes Françaises "Huiles
essentielle", AFNOR, Paris. AFNOR NF T 75-06, 1986.
- [9] [http://www.scd.uhp-
nancy.fr/docnum/SCDPHA_T_2010_GIRARD_GERALDINE.pdf](http://www.scd.uhp-nancy.fr/docnum/SCDPHA_T_2010_GIRARD_GERALDINE.pdf)
- [10] Sasipawan, M. Natthida, W. Sahapat, B. Kanjana, T. et Waraporn, T.

Microspectroscopy discriminates anticancer action on human leukemic cells by
extracts of *Pinus kesiya*; *Cratogeomys formosum* ssp *pruniflorum* and *melphalan*.
Talanta, 93, 371– 382, 2012.
- [11] Nuno, R. Arminda, A. Lúcia, S. et Silvia, L.

Pine needles as passive bio-samplers to determine polybrominated diphenyl ethers.
Chemosphere, 85, 247–252, 2011.
- [12] Hmamouchi, M. Hamamouchi, J. Zouhdi, M. Et Bessiere, J. B.

- Chemical and antimicrobial properties of essential oils of five Moroccan pinaceae. *Journal of Essential Oil Research*, 13, 298 ,2001.
- [13] Macchioni, F. L. Cioni, P. Flamini, G. Morelli, I. Maccioni ,S. et Ansaldi ,M.
Chemical composition of essential oils from needles, branches and cones of *Pinus pinea*, *P. halepensis*, *P. pinaster* and *P. nigra* from central Italy. *Flavour Fragr. J.*, 18, 139,2003.
- [14] Petrakis ,P. V. Tsitsimpikou ,C. Tzakou ,O. Kouladis, M. Vagias ,C. et Roussis,V.
Seasonal variation of oleoresin terpenoids from *Pinus halepensis* and *Pinus pinea* and host selection of the scale insect *Marchalina hellenica* (Homoptera, Coccoidea, Margarodidae, Coelostonidiinae). *Flavour Fragr. J.*, 16, 249,2001.
- [15] Chalchat ,J. C. Ph. Garry ,R. Michet ,A. Bastide ,P. et Malhuret ,R.
Sesquiterpenes of the essential oil of *pinus-sylvestris* .*Plantes Med. Phytother.*, 4, 305 ,1989.
- [16] Carmo, M. M. Et Frazao,S.
The essential oil of Portuguese pine needles. In: *Progress in Essential Oil Ressearch*,Walter de Gruyter, Berlin, 169 ,1986.
- [17] Kubeczka, K. H. Et Schultze ,W.
Progress in essential oil Research.*Flavour Fragr. J.*, 2, 137 ,1987.
- [18] Dob, T.; Berramdane ,T. et Chelghoum C.
Analysis of essential oil from the needles of *pinus pinaster* growing in algeria. *Chemistry of Natural Compounds*, 41, 545, 547, 2005.
- [19] Barnola, L., Cedenoi, A. et Hasegawa, M.
Intraindividual Variations of Volatile Terpene Contents in *Pinus caribaea* Needles and its Possible Relationship to *Atta laevigata* Herbivory . *Biochemical Systematics and Ecology*, 25, 8, 707-716,1997.
- [20] Sacchetti,G. Maietti, S. Muzzoli, M. Scaglianti, M. Manfredini, S. Radice M. et Bruni R.
Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods; *Food Chemistry* 91,621–632, 2005
- [21] Krauze-Baranowska, M. Mardarowicz, M. Wiwartc, M. Poblóckaa, L. et Dynowskad, M.

- Antifungal Activity of the Essential Oils from Some Species of the Genus *Pinus*. *Z. Naturforsch* , 57, 478-482 ,2002.
- [22] Loizzo, Mr. Saab, Am. Tundis, R. Menichini, F. Bonesi, M. Statti, Ga. Giancarlo, A. et Menichini, F.
Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Pinus brutia* (calabrian pine) growing in Lebanon. *Chemistry of Natural Compounds*,44,6,784-786,2008.
- [23] Smith, E. Williamson, E. Zloh, M. et Gibbons, S.
Isopimaric Acid from *Pinus nigra* Shows Activity against Multidrug-resistant and EMRSA Strains of *Staphylococcus aureus*. *Phytotherapy Research*: 19, p. 538-542, 2005.
- [24] Hong, E. J. Na, K. J. Choi, I. G. Choi, K. C et Jeung, E. B.
Anticacterial and Antifungal Effects of Essentials Oils from Coniferous Trees. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*: 27 (6), 863-866, 2004.
- [25] Lindberg, L. E. Willfôr, S. M. et Holmbom, B. R.
Antibacterial effects of knotwood extractives on paper mill bacteria. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*: 31 (3), p. 137-147, 2004.
- [26] Ustun, O. Sezer Senol, F. Kurkcuoglu, M. Erdogan Orhan,I. Kartal, M. Husnu, K. Baser, C.
Investigation on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant activities of extracts and essential oils of Turkish *Pinus* species and pycnogenol: *Industrial Crops and Products* 38,115– 123, 2012.
- [27] Sacchetti ,G. Maietti ,S. Muzzoli, M. Scaglianti, M. Manfredini, S. et Radice, M.
Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods, 91, 4,621–632 ,2005.
- [28] Hsu, T. Y. Sheu, S. C. Liaw, E. T. Wang, T. C et Lin, C. C
Anti-oxidant Activity and Effect of *Pinus morrisonicola* Hay, on the Survival of Leukemia Cell Line U937. *Phytomedicine*: 12, p. 663-669, 2005.
- [29] Pukacka S. et Pukacki P. M.
Seasonal changes in antioxidant level of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles exposed to industrial pollution. II. Enzymatic scavengers activities *ACTA PHYSIOLOGIAE PLANTARUM* , 22, 4, 457-464, 2000.
- [30] Grassmann, J. Hippeli, S. Vollmann, R. et Wlstner, E. F.

- Antioxidative Properties of the Essential Oil from *Pinus mugo*. Journal of Agricultural and Food Chemistry: 51, p.7576-7582,2003.
- [31] Vuorela, S. Kreander, K. Karonen, M. Nieminen, R. Hämäläinen, M. Galkin, A. Laitinen, L. Salminen, J. P. Moilanen, E. Pihlaja, K. Vuorela, H. Vuorela, P. et Heinonen, M.
- Preclinical Evaluation of Rapeseed, Raspberry, and Pine Bark Phenolics for Health Related Effects. Journal of Agricultural Food and Chemistry: 53, p. 5922-5931, 2005.
- [32] Packer, L. Rimbach, G. et Virgili, F.
- Antioxidant Activity and biologic Properties of a Procyanidin-rich Extract from Pine (*Pinus maritima*) bark, Pycnogenol. Free Radical Biology and Médecine: 27, p. 704-724, 1999.
- [33] Technique de l'ingénieur
- Référence F3060 | Date de publication : 10 mars 2003 | Jean-Yves Anizon, Benoît Lemaire et Michel Surbled
- [34] Chemat, F. Lucchesi, M.E. Smadja, J. Favretto, L. Colnaghi, G. et Visinoni, F.
- Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach. Analytica Chimica Acta, 555, 157–160, 2006.
- [35] Sahraoui, N. Abert Vian, M. El Maataoui, M. Boutekedjiret, C. et Chemat ,F.
- «Valorization of citrus by-products using Microwave Steam Distillation (MSD)».
- Innovative Food Science and Emerging Technologies. 12, 163-170, 2011.
- [36] Sahraoui, N. Abert Vian, M. Bornard, I. Boutekedjiret, C. et Chemat, F.
- Improved microwave steam distillation apparatus for isolation of essential oils. Comparison with conventional steam distillation. Journal of Chromatography A, 1210, 229–233, 2008.
- [37] Berche, P. Kayal , S. Poyart , C. et Nassif,X.
- Bactériologie Générale,2002/2003.
- [38] Avril,L. Dabernat , H. Denis ,F. et Monteil ,H.
- Bactériologie Clinique .Ed ellipses, France ,1992.
- [39] Bugnicourt M.
- Dictionnaire de microbiologie générale. Ellipses édition marketing SA ,1995.
- [40] E.Köhler F.

- Köhlers Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen und kurz erläuterndem Texte, Gera ,1883-1914.
- [41] Guerin-Faubleee V. et Carret G.
L'antibiogramme, principes, méthodologie, intérêt et limites. Journées Nationales GTV-INRA,5-12, 1999.
- [42] Eymard S.
Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conversation et de la transformation de chinchard (Trachurus) ; choix des procédés. Thèse de Doctorat en Génie des procédés (Ecole Doctorale en Génie des Procédés : Spécialité Biochimie, Nante , France, 2003.
- [43] Robert-Demuet S.
Méthodes de dilutions. In Antibiotiques et antibiogrammes,131-137 ,Montréal-Canada,1995.
- [44] Pibiri M.C.
Assainissement microbiologique de l'air et des systemes de ventilation au moyen d'huile essentielle. Thèse de Doctoral. Polytechnique Fédérale de Lausanne ,2005.
- [45] Haddouchi F. Lazouni H. Ahmmer K .A. Carson C.F. et Riley T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of applied microbiology, 86,985-990,1999.
- [46] Zhiri A.
Les huiles essentielles un pouvoir antimicrobien avéré. Nutra News. Science, Nutrition, Prévention et santé. Edité par la foundation pour le libre choix,12,8 , 2006.
- [47] Dorman H.J.D. et Deans S.G.
Antimicrobial agent from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of applied Microbiology,88(2),308-316, 2000.
- [48] Meena M.R. et Sethi V.
Antimicrobial activty of essential oils from species. Journal of Food Science and Technology Mysore,31,68-70,1994.
- [49] Joffin, J-N. et Leyral G.
Microbiologie technique tome I, dictionnaire des techniques. Centre régionale de documentation pédagogique d'Aquitaine, 32,2006.
- [50] Courvalin P. Leclercq R. et Bingen E.

Antibiogramme. EDITION ESKA, 2006.

[51] Rasooli, I. Bagher Rezaei, M. Allameh, A.

Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. Food Control, 17, 359-364, 2006.

الملخص

يندمج العمل الحاضر في تقييم إبر الصنوبر باستخلاص مركبات ذات خصائص مبيدات حيوية. ولهذا لقد تم استخلاص الزيوت الأساسية لنبته الصنوبر الحلبي وكذلك دراسة صلابة إبر الصنوبر. لقد تم استرجاع الزيوت الأساسية عبر أربعة طرق و هي التقطير المائي , السحب ببخار الماء, السحب ببخار الماء بوجود المايكروويف وأخيرا التقطير المائي بوجود المايكروويف. كما تم استرجاع الخرسانة عن طريق استخلاص بدفعة أو بنقاعة. دراسة خصائص المبيدات الحيوية تمت على مستوى نشاطاتها المضادة للأكسدة و الضد بكتيريا. الزيت النباتي له نشاط ضد بكتيري جد مرتفع بينما نشاطه المضاد للأكسدة فهو منخفض.

Résumé

Le présent travail est une contribution à la valorisation des aiguilles de pin (*Pinus halepensis*) par l'extraction de composés à propriétés biocides. Pour ce faire, l'extraction de l'huile essentielle ainsi que la concrète des aiguilles de pin a été abordée. La récupération de l'huile essentielle a été réalisée par quatre procédés : l'entraînement à la vapeur d'eau avec et sans micro-ondes et l'hydrodistillation avec et sans micro-ondes ; la concrète a été récupérée par une extraction en batch ou macération. L'étude des propriétés biocides des extraits a porté sur l'évaluation de leurs activités anti-oxydante et antimicrobienne. L'huile essentielle présente une activité antimicrobienne assez intéressante alors que son activité antioxydante est relativement faible.

Abstract

This work is a contribution to the valorization of needles pine (*Pinus halepensis*) by extraction of compounds with biocides properties. For this, extraction of essential oil and concrete of the pine needles was investigated. The recovery of essential oil was carried out by four processes: steam distillation with and without microwaves, and hydrodistillation with and without microwaves; concrete was recovered by an extraction in batch or maceration. The study of the biocides properties of the extracts related to the evaluation of their antioxidant and antimicrobial activities. Essential oil presents a rather interesting antimicrobial activity whereas its antioxidant activity is relatively weak.