

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة امحمد بوقرة بومرداس

UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA DE BOUMERDES
Faculté Des Sciences
Département de Biologie

Mémoire de Master Académique

Filière *Sciences Biologique*
Spécialité Biologie des populations et des organismes

THÈME

Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles
d'une plante médicinale de la famille des *Euphorbiaceas*

AZZEDINE Nassima *Présenté par* **NADJI Tinhinane**
et

Membres du jury :

M ^m BENHABYLES. N	MAA	Présidente	FS-UMBB
M ^r ARAB. K	PROFESSEUR	Promoteur	FS - UMBB
M ^m LAOUFLI.R	MAA	Examinatrice	FS-UMBB
M ^m Boumaza. S	Doctorante	Co-promotrice	FS - UMBB

Année universitaire 2016/2017

Remerciements

Tout d'abord nous remercions le bon Dieu tout puissant de la bonne santé, la volonté et la patience qu'il nous a donné tout le long de la période de nos études.

Nous exprimons nos sincères remerciements :

A notre promoteur Pr ARAB.K

A notre Co-promotrice Mme BOUMAZA.S pour sa confiance, son soutien, son attention, ses bons conseils, et sa disponibilité pour l'encadrement de ce travail.

On a eu la chance et le plaisir d'effectuer un stage pratique au laboratoire « Bactériologie » à l'hôpital de Thenia. On tient à exprimer nos profonds remerciements au médecin microbiologiste Mme Amraoui pour son chaleureux accueil au sein du laboratoire, pour sa confiance et sa permission de réaliser ce travail dans les meilleures conditions. Pour son aide et pour les discussions enrichissantes malgré toutes ses responsabilités et ses nombreuses occupations.

A tous les membres du laboratoire bactériologie de l'hôpital de Thenia pour leur soutien et les facilités accordées pour la réalisation de ce travail.

Aux membres du jury qui ont bien voulu consacrer une partie de leur temps pour juger ce travail :

M^m Benhabyles. N pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de notre Soutenance.

M^m Laoufi. R pour l'honneur qu'il nous a accordé en acceptant d'examiner notre mémoire.

A tous Les collègues de la promotion BPO 2016-2017 pour les sympathiques moments qu'on a passés ensemble.

Enfin un énorme Merci à tous ceux qui nous ont aidé, conseillé, et ouvert leurs portes, parfois même avec un sourire, et qui se reconnaîtront certainement.

Dédicace

Tout d'abord, je remercie mon «Dieu» tout puissant qui m'a donné, la volonté, le courage, la patience et l'endurance et qui a guidé mes pas vers le droit chemin pour réaliser ce travail.

Je dédie ce mémoire :

A ceux qui m'ont tout donné sans rien attendre en retour

A ceux qui m'ont encouragée et soutenue durant toutes mes années d'études : mes parents tout les mots sont insuffisants pour exprimer ma gratitude, ma reconnaissance et mon amour. Que le tout puissant les garde et les protégé

A notre promotrice Mme Boumaza

A mes chères sœurs : Abla et Racheda

A mes chères frères : Djelali et Adel

A mes amis : Ichrak, Drifa, Nesrine, Sihem,

Zohra, Houda , Hayet, Soumia, Bouchra

A ma chère binôme Tina et sa Famille

Sima

Dédicace

Je dédie ce travail à tout ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans mes

Moments les plus difficiles

Et à ceux qui je dois tant

A mes chers parents, Autant de phrases et d'expressions ne sauraient exprimer ma gratitude. Vos conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Votre patience sans fin, votre compréhension et votre encouragement sont pour moi le soutien indispensable que vous avez toujours su m'apporter.

A mes adorable sœurs : Kahina, Hanane, Sarah, Magdoula et Yasmine, Merci d'être toujours à mes côtés, par votre présence, par votre amour dévoué et votre tendresse, ainsi à mes beaux frères : Hakim, Nourdine, Djamel eddine et Zakaria.

A tous les membres de ma famille en particulier ma chère grand-mère et mes adorable tantes, vous avoir à mes cotés représente un bonheur pour moi.

Et surtout à mes nièces Nourssine et Hadil ainsi que notre petit chou Soliman eddine qui sont les bijoux de notre petite famille.

A notre promotrice Mme BOUMAZA.S pour son encouragement et sa présence.

A ma chère Simma Votre amitié est un honneur et une fierté pour moi. Je vous remercie pour les moments inoubliables que nous avons partagés ensemble, Que notre amitié soit éternelle.

A tous mes amis avec lesquelles j'ai partagé les meilleurs moments de ma jeunesse : Nadia, Zina, Kahina, Ichrak et Assia.

A la mémoire de mon oncle Nabil Qui a été toujours dans mon esprit et dans mon cœur, je te dédie aujourd'hui ma réussite. Que Dieu, t'accueille dans son éternel paradis.

Enfin, à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.

Merci, merci, merci



Tina

Sommaire

Liste des abréviations.....	
Liste des figures et planches.....	
Liste des tableaux.....	
Introduction.....	1
Chapitre I. Partie bibliographique	
I. 1 Description, composition et activité de la plante.....	3
I .1.1 Description botanique.....	3
I.1.2 Taxonomie et systématique.....	4
I.1.3 Répartition géographique.....	5
I.1.4 Usage d' <i>Euphorbia sp.</i>	5
I.1.4.1 Utilisation traditionnelle.....	5
I.1.4.2 Utilisation contre les bactéries.....	5
I.1.4.3 Utilisation contre les insectes.....	6
I.1.5 Composition phytochimique et application pharmacologique d' <i>Euphorbia sp.</i>	6
I.1.6 Toxicité d' <i>Euphorbia sp.</i>	7
I. 2. Les substances actives : Huiles essentielles.....	7
I.2.1 Historique.....	7
I.2.2 Définition.....	7
I.2.3 Répartition et localisation.....	8
1.2.3.1 Répartition.....	8
I.2.3.2 Localisation.....	8
I.2.4 Composition chimique.....	9
I.2.4.1 Les composés terpéniques.....	9
I.2.4.1.1 Les monoterpènes.....	10
I.2.4.1.2 Les sesquiterpènes.....	10

I.2.4.2 Les composés aromatiques dérivés du phenylpropane.....	10
I.2.4.3 Les composés d'origines diverses.....	11
I.2.5 Propriétés et caractéristique des huiles essentielles.....	12
I.2.5.1 Propriétés physicochimiques.....	12
I.2.5.2 Propriétés pharmacologiques et activités biologiques.....	13
I.2.5.2.1 Pouvoir Antibactérien.....	13
I.2.5.2.2 Pouvoir antivirale.....	14
I.2.5.2.3 Pouvoir antifongique.....	14
I.2.5.2.4 Pouvoir antiparasitaires.....	14
I.2.5.2.5 Pouvoir antiseptiques.....	14
I.2.5.2.6 Pouvoir insecticides.....	15
I.2.5.2.7 Pouvoir anti-inflammatoire	15
I.2.5.2.8 Pouvoir antispasmodique.....	15
I.2.5.2.9 Pouvoir calmant, anxiolytique.....	15
I.2.5.2.10 Pouvoir cicatrisant.....	15
I.2.6 Caractérisation phytochimiques des huiles essentielles.....	15
I.2.6.1 Chromatographie en phase Gazeuse (CPG/DIF).....	16
I.2.6.2 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/SM).....	16
I.2.7 Procédés d'extraction des huiles essentielles.....	16
I.2.7.1 L'hydrodistillation.....	17
I.2.7.2 L'entraînement à la vapeur d'eau	18
I.2.7.3 L'hydrodiffusion.....	18
I.2.7.4 L'expression à froid.....	19
I.2.7.5 L'extraction par solvants.....	19
I.2.7.6 L'extraction par micro-ondes.....	19
I.3 Généralités sur les bactéries pathogènes d'origine tellurique.....	20
I.3.1 Principales bactéries pathogènes du sol.....	20
I.3.2 Infection bactérienne d'origine tellurique.....	21
I.3.3 Transmission des bactéries pathogènes du sol à l'homme.....	22
I.3.4 Isolement et identification des bactéries pathogènes du sol.....	22
I.4 Lutte biologique contre les bactéries pathogènes telluriques.....	22

Chapitre II. Matériel et méthodes

II.1 Matériel.....	24
II.1.1. Matériel biologique.....	24
II.1.1.1. Matériel végétal.....	24
II.1.1.2. Matériel microbiologique.....	24
II.1.2. Matériel non biologique.....	24
II.2. Méthodes d'étude.....	25
II.2.1. Séchage.....	26
II.2.2. Broyage et de conservation de la poudre.....	26
II.2.3 Tests phytochimiques (Screening phytochimique).....	26
II.2.4. Extraction des huiles essentielles.....	29
II.2.4.1. Rendement de l'extraction.....	30
II.2.5. Isolement des souches bactériennes.....	30
II.2.5.1. Prélèvement du sol.....	30
II.2.5.2. Préparation des dilutions.....	30
II.2.5.3. Ensemencement dans une gélose nutritive.....	31
II.2.5.4. Repiquage.....	31
II.2.5.5. Identification des souches isolées.....	31
II.2.5.5.1. Examen macroscopique.....	31
II.2.5.5.2. Examen microscopique (coloration de Gram).....	31
II.2.5.5.3. Recherche des caractères biochimiques.....	32
II.2.6. Sensibilité aux antibiotiques.....	34

II.2.7. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	35
II.2.7.1. Revivification et repiquage des espèces bactériennes.....	35
II.2.7.2 Préparation de l'inoculum.....	35
II.2.7.3 Préparation des disques.....	35
II.2.7.4. Préparation des milieux de culture.....	35
II.2.7.5. Ensemencement.....	36
II.2.7.6. Expression des résultats	36

Chapitre III. Résultats

III.1. Screening phytochimique.....	37
III.2. Extraction des huiles essentielles.....	41
III.3. Identification des souches microbiennes isolées.....	42
III.4. Tests de sensibilité aux antibiotiques.....	45
III.5. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d' <i>Euphorbia</i> <i>Sp</i>	46
III.5.1. Densités optiques des suspensions bactériennes.....	46
III.5.2. Etude qualitative.....	46

Chapitre IV. Discussion

IV.1. Tests phytochimiques.....	50
IV.2. Rendement en huiles essentielles.....	50
IV.3. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	51
IV.4. Sensibilité aux antibiotiques.....	52
Conclusion	53
Références bibliographiques	55
Annexes	

Liste des abréviations

ATB : Antibiotique

API : Appareillage et procédés d'identification

CPG : Chromatographie en phase gazeuse.

CuSO₄ : Sulfate de cuivre

CT : Colistine

Cit : Citrate de Simmons.

Cat : Catalase.

Coa : Coagulase.

°C : Degré Celsius.

DIF : Détecteur à ionisation de flamme.

DMI : Dose minimale d'inhibition

DO : Densité Optique.

E. coli : Escherichia coli.

Esc : Esxuline.

FeCl₃ : Chlorure de ferrique.

g : Gramme.

HE : Huile essentielle.

H₂O : L'eau.

H₂O₂ : Eau oxygénée.

HCl : Acide chlorhydrique.

H₂SO₄ : Acide sulfurique

H₂S : Thiosulfate de sodium.

Ind : Indole

Liste des abréviations

IRTF : spectrométrie infrarouge par transformée de Fourier

KOH : Hydroxyde de potassium

IPM : Imipénème

Lac : Lactose

Mg : magnésiums

Nm : Nanomètre.

NaOH : Hydroxyde de sodium

NA : Acide nalidixique

O₂ : Oxygène

RM : Rouge de Méthyle

RMN : Résonance magnétique nucléaire

Sp : Espèce

S aureus : Staphylococcus aureus

SM : Spectromètre de masse

S : Souche

S : Sensible

SCN : Staphylococcus a coagulase négatif

TSI : Triple sugar iron

V/V : Volume par volume

VA : Vancomycine.

Vp : Vosges Prauskauer.

Liste des figures

Figure.1 : Port de l'espèce, tige fleurie, détail d'une fleur d' <i>Euphorbia sp</i>	4
Figure.2 : Structure chimique de quelques composés des huiles essentielles.....	12
Figure.3 : Montage d'hydrodistillation.....	17
Figure.4 : Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante.....	18
Figure.5 : Principe schématisé de l'appareillage d'hydrodistillation sous micro-ondes.....	20
Figure.6 : Schéma général des différentes étapes du travail.....	25
Figure.7 : Poudre végétale.....	26
Figure.8 : Dispositif de l'hydrodistillation.....	29
Figure.9 : Echantillonnage en « zigzag ».....	30

Liste de planches

Planche 01 : activité antibactérienne des huiles essentielles d' <i>Euphorbia sp</i>	48
---	----

Liste des tableaux :

Tableau I : Sensibilité des bactéries aux antibiotiques.....	34
Tableau II : Résultats des tests phytochimiques.....	37
Tableau III: Extraction de l'huile essentielle.....	42
Tableau IV: Identification bactérienne.....	43
Tableau V : Tests de sensibilité aux antibiotiques.....	45
Tableau VI : Résultats de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d' <i>Euphorbia</i> <i>Sp</i>	47

Introduction

Introduction

Depuis l'antiquité, l'homme utilise les plantes pour lutter contre diverses maladies qui guettent sans cesse sa vie. De nos jours, une large couche de la population mondiale, notamment celle des pays en voie de développement, utilise les plantes médicinales du fait de son incapacité à accéder, voire bénéficier des vertus de la médecine moderne (Haba, 2008).

Actuellement, les plantes aromatiques possèdent un atout considérable grâce à la découverte progressive des applications de leurs huiles essentielles (Tchamdja, 1995). Les huiles essentielles et les plantes aromatiques en général sont utilisées pour leurs importantes propriétés médicinales principalement les propriétés anti-inflammatoires, antiseptiques, antivirales, antifongiques, bactéricides, antitoxiques, insecticides, tonifiantes, stimulantes, calmantes, etc. (Nicolas, 1991 ; Mishara et Dubey al., 1994).

L'Algérie est un pays connu pour sa biodiversité, il dispose d'une flore particulièrement riche et variée. On compte environ 3000 espèces dont 15 % endémiques et appartenant à plusieurs familles botaniques (Quenzel et Santa, 1963). Bien que le Sahara algérien soit connu pour son hostilité, et son grand potentiel floristique constitué de plantes médicinales, toxiques, et condimentaires, cette richesse connaît une dégradation intense depuis quelques décennies. Les espèces évoluant dans ce milieu tels que les Euphorbiaceae renferment diverses familles de composés chimiques tels que les alcaloïdes (Nazaré et al., 2005), les saponines (Tripathi et al., 1980), les terpènes (Mazoir et al., 2008), les flavonoïdes, les composés cyanogéniques (Hunsa et al., 1995).

Ce mémoire est consacré à évaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'une plante médicinale *Euphorbia sp* sur les bactéries pathogènes d'origine tellurique.

La stratégie expérimentale de notre travail sera présentée comme suit :

- ❖ Une partie théorique citant des généralités sur la plante, les huiles essentielles et les bactéries pathogènes du sol.
- ❖ Partie pratique comportant :
 - 1- La récolte de la plante *Euphorbia sp* et son identification.
 - 2- Séchage, broyage et conservation de la poudre végétale pour l'extraction des huiles essentielles.

- 3- Extraction des huiles essentielles.
 - 4- Prélèvement des échantillons de différents sols.
 - 5- Identification des souches bactériennes prélevées.
 - 6- Evaluation de l'effet des huiles essentielles extraites sur les souches identifiées.
- ❖ Une conclusion.

Chapitre I

Synthèse

bibliographique

I.1 Description et composition d'*euphorbia* sp

I .1.1 Description botanique

La famille des *Euphorbiaceae*, avec ses 5000 à 10000 espèces regroupées dans près de 300 genres (**Spichiger, 2000**) est l'une des familles les plus vastes et les plus cosmopolites que compte le sous embranchement des Angiospermes. Paradoxalement, il s'agit de l'une des moins connue du point de vue systématique. Deux explications peuvent être apportées à cet état de fait ; premièrement sa distribution, puisque elle est principalement localisée en des zones tropicales, mais aussi en raison de l'existence de « fleurs minutes » chez certains de ses représentants ne facilitant évidemment en rien toute étude botanique (**Webster, 1987**). Cette famille est très hétérogène. Les plantes qui la constituent varient à la fois par leur appareil végétatif ainsi que par la structure de leurs fleurs (**Ozenda, 1991 ; Bruneton, 1996**).

Les feuilles de formes très variables, sont en général longuement pétiolées, alternes, voire plus rarement opposées, simples ou composées, palmatinervées ou pennatinervées (**Ozenda, 1991 ; Spichiger et al., 2000**). Pour certaines espèces, elles sont réduites à des épines. Le limbe est le plus souvent denté. Des glandes sécrétrices sont généralement présentes sur le pétiole, le limbe et la marge du limbe.

Les inflorescences sont très variables puisqu'il s'agit de cymes, de thyrses, de grappes, d'épis ou de panicules, généralement bisexués.

Les fleurs sont déclines et rarement isolées, plus souvent groupées en grappes et chez certains genres réunies pour former un dispositif appelé cyathe, comme dans le genre *Euphorbia*. La fleur est cyclique, achlamyde ou haplochlamyde et dans ce cas, actinomorphe et sépaloïde, trimère ou pentamère, hypogyne et unisexuée. Les sépales sont libres ou soudés par la base. La fleur mâle, souvent exempte de pétales, contient de 0 à un nombre indéfini de sépales et de 1 à un nombre indéfini d'étamines. Les anthères présentent une déhiscence qui peut être longitudinale, transversale ou encore poricide. Un ovaire rudimentaire est parfois présent. La fleur femelle ne contenant pas de pétales, peut compter de 0 à un nombre indéfini de sépales et 3 carpelles. L'ovaire, la plupart du temps tricarPELLÉ et triloculaire, est surmonté de 3 styles libres ou partiellement soudés à la base, eux même surmontés de 3 stigmates.

Le fruit est une capsule tricoque à déhiscence loculicide, septicide ou encore un schizocarpe à déhiscence explosive. La graine est albuminée et caronculée (**Ozenda, 1991 ; Spichiger et al., 2000**).



Fig.1 : Port de l'espèce, tige fleurie, détail d'une fleur d'*Euphorbia sp.*
(Ionut-Florin, 2016).

I.1.2 Taxonomie et systématique

D'après les classifications botaniques classiques, les Euphorbiacées sont classées dans les dicotylédones (Quenzel, 1963). Webster en 1987 propose une classification et reconnaît cinq sous-familles des Euphorbiaceae: phyllanthoïdeae, oldfieldioideae, Acalyphoideae, crotonoideae et Euphorbiadeae. Le genre *Euphorbia* est ainsi classée (Ozenda, 1991; Spichiger RE, 2000; Bruneton, 1996):

Règne : Plantae

Embranchement : Magnoliophyta

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Magnoliopsida-dicotylédones

Ordre : Malpighiales

Famille : Euphorbiaceae

Genre : *Euphorbia*

La majorité des Euphorbes sont connue par leur noms vernaculaires « bouhliba », qui signifie plante à sève laiteuse (**Bellakhdar, 1997**), car les euphorbes contiennent un suc laiteux (liquide blanc) collant et irritant appelée latex. Ce latex provoque des irritations pour les peaux sensibles, et il est capable de provoquer de grave dégâts des muqueuses buccales et digestives, et qui peut causer au contact des yeux une cécité temporaire (**Bruneton b, 1999**).

I.1.3 Répartition géographique

Les plantes du genre *Euphorbia* existe dans les endroits sableux et au littoral, communes dans tout le Sahara septentrional et les régions pré-désertiques et peut s'observer même en Europe (**Haba, 2008**).

I.1.4 Usage d'*Euphorbia* sp

De nombreuses populations mondiales utilisent les Euphorbiacées dans le traitement de plusieurs affections telles que les maladies gastro-intestinales et la migraine (**Singla et Pathak, 1990**). Les espèces de cette famille, possèdent des propriétés anti-cicatrisantes, antibactériennes, antifongiques, anti-inflammatoires, anti-tumorale et antivirale (**Hernandez et al., 2003; Mavar et al., 2004 ; LI et al., 2008**).

I.1.4.1 Utilisation traditionnelle

Les Euphorbes ont de multiples utilisations, à titre médicinal, elles sont employées comme purgatif ou vésicant, contre les parasites intestinaux, l'asthme, les bronchites chroniques, la migraine (**Chaabi, 2007**), pour traiter les morsures de serpent, dans le traitement de la dysenterie, du choléra, et de la syphilis. Le latex des euphorbes est parfois employé pour pêcher en le jetant dans l'eau pour empoisonner les poissons. Il a été aussi exploité pour produire du caoutchouc (**Karharo, 1974**).

I.1.4.2 Utilisation contre les bactéries

Plusieurs plantes médicinales ont été utilisées comme agent antimicrobien et s'avère être très efficace. Concernant le genre *Euphorbia*, très peu d'étude ont été réalisée pour la mise en évidence de cette activité et ce avec des extraits polyphénoliques mais rarement avec des extraits d'huiles essentielles. En outre, l'évaluation de l'activité antibactérienne de deux extraits d'*Euphorbia* sp (Méthylène chloride-Méthanol, et le n-butanol) a été réalisée contre quelques souches bactérienne ; soit : *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Klepsiella pneumoniae*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, et a donné des résultats satisfaisants. (**Zellagui et al., 2012**).

I.1.4.3 Utilisation contre les insectes

Dans l'objectif de découvrir de nouvelles techniques pour lutter contre les insectes nuisibles, l'utilisation des substances secondaires des plantes, a suscité de nombreux chercheurs, les travaux les plus récents sont ceux de **Kemassi et al (2014)** où ils ont démontrés que les extraits aqueux d'*Euphorbia sp* exerçait sur les larves comme sur les adultes des insectes (*schistocerca gregaria*) ont une action sur leur prise de nourriture manifestée par une diminution significative et une abstinence de la prise alimentaire, une action sur la croissance pondérale et enfin une action sur la mortalité.

I.1.5 Composition phytochimique et application pharmacologique d'*Euphorbia sp*

Les plantes du genre *Euphorbia* ont fait l'objet de nombreuses investigations phytochimiques et pharmacologiques. Ces études qui concernent particulièrement leur latex, ont permis l'isolement et la caractérisation d'un nombre important de métabolites secondaires (**Haba, 2008**).

Les composés identifiés et souvent présents dans les plantes du genre *Euphorbia* appartiennent à trois classes de métabolites secondaires : les diterpènes, les triterpènes et les stéroïdes. Ils se répartissent comme suit : (**Haba, 2008**)

- un diterpène polycyclique nouveau à squelette tigliane, dérivé du phorbol
- un diterpène macrocyclique à squelette jatrophone
- deux diterpènes de type abiétane lactone appartenant à la série *ent*
- un diterpène à squelette *ent*-atisane.
- un triterpène de type cycloartane nouveau
- quatre triterpènes tétracycliques à squelette cycloartane
- deux triterpènes tétracycliques à squelette lanostane
- un triterpène tétracyclique à squelette euphane
- un triterpène tétracyclique à squelette tirucallane
- deux triterpènes pentacycliques à squelette multiflorane
- un triterpène pentacyclique à squelette taraxerane
- un triterpène acyclique
- deux stéroïdes.

Cette étude montre la richesse des plantes du genre *Euphorbia* en métabolites secondaires de type diterpènes et triterpènes particulièrement tétracycliques. Ces derniers sont d'ailleurs utilisés comme marqueurs chimiotaxonomiques.

I.1.6 Toxicité d'*Euphorbia* sp

Le genre *Euphorbia* contient du caoutchouc et des quantités importantes de résine, mais le point principal commun de ce genre est la présence de la sève blanche, qui apparaît à la cassure (tiges, feuilles, fruit et racines). La toxicité du latex d'*Euphorbia* sp est due à la présence de l'Euphorbone (C₁₅H₂₄O) (**Berthelot, 1912**), les esters diterpéniques (les esters de phorbol) à titre d'exemple sont un mélange complexe de dérivés acylés et acétylés en 12 et 13 (ou l'inverse) du phorbol, ingénol et du myrsinol. Le pouvoir irritant s'accroît lorsque la longueur de la chaîne augmente (**Bruneton a, 1999**).

I.2 Les substances actives : Huiles essentielles

I.2.1. Historique

Les huiles essentielles ont, à toutes époques, occupées une place importante dans la vie quotidienne de l'homme dont il se servait pour se parfumer, aromatiser sa nourriture ou même se soigner. La connaissance des huiles essentielles remonte à fort longtemps puisque l'homme préhistorique pratiquait déjà, à sa manière, l'extraction des principes odorants des plantes. Il plongeait, dans un récipient rempli d'eau, des plantes odorantes et des pierres brûlantes. La vapeur dégagée entraînait les molécules volatiles, puis le tout était recueilli à l'aide d'une peau d'animal dont l'essorage donnait quelques gouttes d'huile essentielle (**Robert, 2000**).

Au fil des siècles, l'extraction et l'usage des principes odorants des plantes se sont développés, notamment par les civilisations arabe et égyptienne, qui leurs attribuaient avant tout un usage religieux (**Sell, 2006**). Puis progressivement, ces huiles essentielles se font connaître pour leurs vertus thérapeutiques et deviennent alors des remèdes courants de médecine traditionnelle. (**Buchbauer et al., 1993**). De nos jours, la médecine moderne utilise les vertus thérapeutiques des huiles essentielles et de leurs constituants. En effet, de nombreux composés volatils sont aujourd'hui des ingrédients courants des préparations pharmaceutiques (**Pauli, 2001**).

I.2.2 Définition

Les huiles essentielles encore appelées essences ou huiles volatils, sont des substances huileuses, volatiles, d'odeur et de saveur généralement fortes, extraites à partir des différentes parties de certaines plantes aromatiques, par des méthodes de distillation, d'enfleurage,

d'expression par solvant ou par d'autres méthodes (**Belaiche, 1979 ; Valnet, 1984 ; Wichtel et al., 1999**).

D'après **Bruneton a (1999)**, les essences sont «des produits de compositions généralement assez complexes renfermant des principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation».

La norme française **AFNOR NF T75-006** définit l'huile essentielle comme: «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 Citrus, et qui sont séparés de la phase aqueuse par procédés physiques » (**Garnero, 1996**).

I.2.3 Répartition et localisation

On rencontre les huiles essentielles dans diverses familles botaniques elles se localisent dans toutes les parties vivantes de la plante et se forment dans le cytoplasme des cellules spécialisées (**Degryse et al., 2008**).

I.2.3.1 Répartition

Les huiles essentielles sont largement répandues dans le règne végétal principalement chez les végétaux supérieurs, il existe environ 17500 espèces aromatiques dans le monde.

Les familles botaniques capables d'élaborer les constituants qui composent les huiles essentielles sont réparties dans un nombre limité de familles, Exemple : *Myrtaceae* (Girofie), *Lauraceae* (laurier), *Rulaceae* (citron), *Lamiaceae* (Menthe), *Apiaceae* (Coriandre), *Zingiberaceae* (Gingembre) ... etc (**Bellakhdar, 1997**).

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes de la plante, tels que les sommités fleuries (Menthe, Lavande), les feuilles (Eucalyptus, Laurier), les rhizomes (Gingembre), les fruits (agrumes, badiane, anis), les racines (Vétiver), les graines (Muscades), et plus rarement les écorces (Cannelier) (**Bellakhdar, 1997**).

I.2.3.2 Localisation

Les huiles essentielles sont élaborées par des glandes sécrétrices qui se trouvent sur presque toutes les parties de la plante. Elles sont sécrétées au sein du cytoplasme de certaines cellules où elles se rassemblent sous formes de petites gouttelettes comme la plupart des substances lipophiles (**Gonzalez-Trujano et al., 2007**).

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structures histologique spécialisé, souvent localisée sur ou à proximité de la surface de la plante. Ces structures peuvent être des cellules à huiles essentielles (*Lauraceae*) ; des poils

sécréteurs (*Laminaceae*), des poches sécrétrices (*Myrtaceae*, *Rutaceae*, *Laminaceae*), et des canaux sécréteurs qui existent dans de nombreuses familles. Il est intéressant de citer que les organes d'une même espèce peuvent renfermer des huiles essentielles de composition différente selon leurs localisations dans la plante (**Degryse et al., 2008**).

I.2.4 Composition chimique

Comme toute substance, les huiles essentielles se caractérisent par une composition chimique analysable et très variable. Le nombre de composants isolés est de plusieurs milliers et il en reste beaucoup à découvrir (**Bruneton b, 1999**). Ces constituants appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes, caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes (les composés terpéniques) et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, moins fréquents. Elles peuvent également renfermer d'autres composants non volatils issus des processus de dégradation (**Bruneton c, 1999**).

I.2.4.1 Les composés terpéniques

Les terpènes constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétal. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à cinq atomes de carbone (C_5H_8) reconnue par **Wallach** dès **1887** (**Lamarti et al., 1994**). Cet isoprène est à la base du concept de la «règle isoprénique» énoncée en **1953** par **Ruzicka** (**Lamarti et al., 1994**). Cette règle considère le diphosphate d'isopentényle (IPP), désigné sous le nom d'isoprène actif comme le véritable précurseur de la molécule terpénique. Les systèmes enzymatiques responsables de cette conversion (IPP en composés terpéniques dans les trois compartiments: cytoplasmes, mitochondries et plastes) sont hydrosolubles ou membranaires. Ces derniers permettent l'élongation de la chaîne isoprénique conduisant à tout l'éventail des composés terpéniques à 10, 15, 20 et 30 atomes de carbones (**Lamarti et al., 1994**). Seuls les terpènes dont la masse moléculaire est relativement faible (mono – et sesquiterpènes) sont rencontrés dans les huiles essentielles (**Bruneton b, 1999**), représentant la base de leurs propriétés olfactives, en leur conférant un caractère volatil (**Pibiri, 2006**).

Il convient de souligner que la synthèse des terpènes n'est pas propre aux végétaux. Le squalène, est un terpène abondant chez les requins. Des sesquiterpènes et des diterpènes se rencontrent également chez les spongiaires et les coelentérés (**Guignard, 2000**).

Les terpènes sont constitués d'un mélange d'hydrocarbures et de composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures. Dans certaines huiles essentielles, les hydrocarbures

prédominant (comme l'essence de Térébenthine), dans d'autres, la majeure partie de l'essence est constituée de composés oxygénés. Il est à noter que l'odeur et le goût des huiles essentielles sont donnés par ces composés oxygénés. Parmi ces composés, on note les alcools (géraniol, linalol), les esters (acétate de linalyle), les aldéhydes (menthone, camphre, thuyone), les cétones, les éthers, les phénols et les peroxydes (**Paris et al., 1981; Svoboda et al., 1999**).

I.2.4.1.1 Les monoterpènes

Les composés monoterpéniques sont constitués de deux unités d'isoprène, leur formule chimique brute est $C_{10}H_{16}$ (**Rahal, 2004**). Ces composés peuvent être: des monoterpènes acycliques (myrcène, ocimènes), monoterpènes monocycliques (α - et γ -terpinène, p-cymène) et des monoterpènes bicycliques (pinènes, Δ^3 -carène, camphène, sabinène). Selon **Bruneton b (1999)**, la réactivité des cations intermédiaires justifie l'existence de nombreuses molécules caractérisées par différentes fonctions: alcools, cétones, esters, aldéhydes, éthers, peroxydes et phénols.

I.2.4.1.2 Les sesquiterpènes

Ils comportent trois unités d'isoprène, leur formule est $C_{15}H_{24}$ soit une fois et demie (sesqui) la molécule des terpènes (**Belaiche, 1979**). Ils présentent une grande variété dans les structures conduisant à un nombre élevé de possibilités, ce qui a retardé l'élucidation de leurs structures (**Rahal, 2004**). Les sesquiterpènes peuvent être également, comme les monoterpènes, acycliques (farnésol), monocycliques (humulène, α -zingibèrene) ou polycycliques (matricine, artéannuine, β ,artémisinine). Ils renferment aussi des fonctions comme les alcools (farnésol, carotol, β -santalol, patchoulol), les cétones (nootkatone, cis-longipinane-2.7-dione, β -vétivone), les aldéhydes (sinensals), et les esters (acétate de cédryle) (**Bruneton b, 1999 ; Laouer, 2004**).

I.2.4.2 Les composés aromatiques dérivés du phenylpropane

En plus des terpènes, les huiles essentielles renferment aussi des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (C_6-C_3), mais qui sont beaucoup moins fréquents que les terpènes et dont la biogenèse est totalement différente (**Paris et al., 1981**). **Bruneton c (1999)** considère que ces composés sont très souvent des allyl- et propenyl phénols, parfois des aldéhydes, caractéristiques de certaines huiles essentielles d'Apiacées (Anis, Fenouil: anéthole, anisaldehyde, méthyl-chavicol=estragole. Persil : apiole) mais aussi de celles du Girofle (eugénol), de la Muscade (safrol, eugénol), de l'Estragon (eugénol), du Basilic (eugénol), de

l'Acore (asarones) ou des Cannelles (cinnamaldéhyde eugénol safrol). On peut également selon le même auteur, rencontrer dans les huiles essentielles des composés en C₆-C₁ comme la vanilline (assez fréquente) ou l'antranilate de méthyle. Les lactones dérivées des cinnamiques (par exemple les coumarines) étant, au moins pour les plus simples d'entre elles, entraînaibles par la vapeur d'eau, sont également présentes dans certaines huiles essentielles.

I.2.4.3 Les composés d'origines diverses

Ce sont des produits résultant de la transformation de molécules non volatiles entraînaibles à la vapeur d'eau. Il s'agit de composés issus de la dégradation d'acides gras et de terpènes. D'autres composés azotés ou soufrés peuvent subsister mais sont rares. Enfin, il n'est pas rare de trouver dans les concrètes, des produits de masses moléculaires plus importantes non entraînaibles à la vapeur d'eau, mais extractibles par les solvants tels que les homologues des phénylpropanes, diterpènes, etc... (**Bruneton c, 1999**). **Abou Zeid (1988)** signale que le composé soufré le plus rencontré est l'allyl-isothiocyanate issu de la dégradation d'un glucoside sinigraside qui se trouve dans les graines de moutarde noire. Ce composé est incolore, fluide et de saveur piquante. Certaines plantes aromatiques produisent des huiles essentielles dont les composés terpéniques renfermant l'élément nitrogène. Parmi ces composés on cite l'indole, qui se trouve dans l'huile essentielle du citron et des fleurs de jasmin.

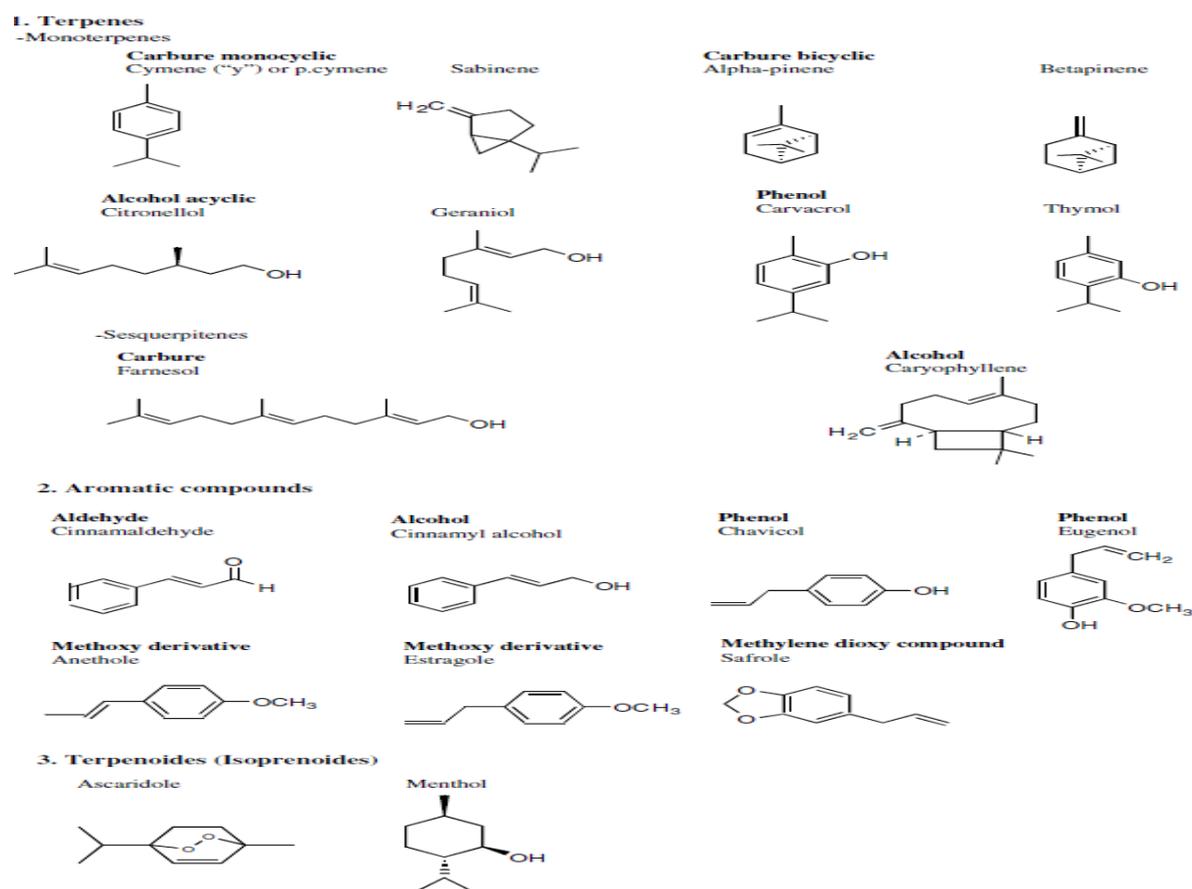


Fig.2: Structure chimique de quelques composés des huiles essentielles
(Bakkali *et al.*, 2008)

I.2.5 Propriétés et caractéristique des huiles essentielles

I.2.5.1 Propriétés physicochimiques

Les principales caractéristiques physicochimiques communes des huiles essentielles sont (Bruneton a, 1999) :

- Liquides à température ambiante ;
- Elles n'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes ;
- Elles sont volatiles et très rarement colorées ;
- Les huiles essentielles à forte teneur en monoterpènes ont une densité faible ;
- Leur indice de réfraction vari essentiellement en fonction de la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé, cependant une teneur élevée en dérivés oxygénés produira l'effet inverse ;
- Elles sont solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé et dans la plupart des solvants organiques mais peu solubles dans l'eau ;

- Elles sont dotées d'un pouvoir rotatoire puisqu'elles sont formées principalement de composés asymétriques ;
- Elles sont très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux, il convient alors de les conserver à l'abri de la lumière et de l'humidité (Zabeirou *et al.*, 2005).

I.2.5.2 Propriétés pharmacologiques et activités biologiques

Depuis leur découverte les huiles essentielles sont très utilisées dans les préparations pharmaceutiques, grâce aux diverses activités biologiques qu'elles possèdent (Luque de Castro *et al.*, 1999). En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses, cependant, elles possèdent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants entant qu'agents antimicrobiens à large spectre (Hammoudi, 2008; Ferhat *et al.*, 2009).

I.2.5.2.1 Pouvoir Antibactérien

De nombreuses études ont été réalisées en vue de l'estimation du pouvoir antiseptique des huiles essentielles depuis très longtemps, par exemple en 2000, Dorman et Deans ont étudié l'activité de l'HE du poivre (*Piper nigrum*), du géranium (*Pelargonium graveolens*), d'origan (*Origanum vulgare*) et du thym (*Thymus vulgaris*) sur 25 genres différents de bactéries. Les huiles volatiles ont montré des effets inhibiteurs considérables contre tous les microorganismes testés, alors que leurs constituants majeurs ont montré des degrés différents au niveau de la culture bactérienne.

Hammer *et al.* (1999) ont conduit une étude qui portait sur l'activité antimicrobienne de 47 huiles essentielles contre 10 microorganismes dont une levure (*Candida albicans*), tous les microorganismes sont inhibés par les huiles essentielles de *Cymbopogon citratus*, *Origanum vulgare* et de *Pimenta racemosa* à des concentrations inférieures ou égales à 2% par contre ces microorganismes ne sont pas inhibés par l'huile essentielle de *Salvia officinalis* à la concentration de 2%. Ohno *et al.* (2003), ont trouvé que les huiles essentielles de la citronnelle et du citronnier, empêchent la croissance de *Helicobacter pylori* (même les souches résistantes) et réagissent même dans des conditions d'acidité. D'après Mohammadi (2006) l'essence des feuilles de *Lavandula. stoechas* est un agent antibactérien efficace contre *Klebsiella pneumoneae*, *Proteus mirabilis* et *E. coli*. Tandis que, l'huile de *Cistus ladaniferus* s'est avérée efficace contre *Listeria monocytogenes*.

Il a été montré également que certaines huiles essentielles ne manifestent aucun pouvoir antimicrobien, citons celle de *Cupressus dupreziana*, testée par **Ramdani et al. (2007)** qui s'est montrée complètement inactive contre trois souches bactériennes: *E. coli*, *S. aureus* et *P. aeruginosa*. De même l'huile de *Marrubium deserti* étudiée par **Benalia (2008)** a été inactive vis-à-vis plusieurs bactéries et deux champignons.

I.2.5.2.2 Pouvoir antivirale

Les huiles essentielles détruisent les agents pathogènes responsables de l'infection (microbes, champignons, virus, toxines infectieuses). Elles sont donc utilisées dans le traitement des affections virales, telles que la grippe, l'herpès, le zona, le sida et la poliomyélite. Elles parviennent à chasser les déchets accumulés dans le corps et qui n'ont pu être évacués par les voies naturelles d'élimination, tout en respectant la flore. Elles renforcent également les défenses immunitaires du corps. Les molécules aromatiques qui agissent dans ce sens sont ; les monoterpénols (sans effet secondaire) (**Sylvie, 2001**).

Plusieurs huiles essentielles possèdent des propriétés antivirales. Nous pouvons citer l'huile essentielle de *Ravintsara*, l'huile essentielle de Bois de Hô, et l'huile essentielle de Cannelle de Ceylan (**Purchon, 2001 ; Willem, 2002**).

I.2.5.2.3 Pouvoir antifongique

Les huiles essentielles agissent très bien sur différentes mycoses. Il est important de savoir que celles-ci ne se développent pas sur un terrain acide. Ainsi, en alcalinisant un terrain non acide mais prédisposé aux mycoses, il est tout à fait possible d'éviter les infections fongiques (**Sylvie, 2001**).

Parmi les huiles essentielles ayant un pouvoir antifongique, on peut citer celle de *Melaleuca alternifolia* (tea tree), de *Syzygium aromaticum* (giroflie) ou encore de *Cinnamomum verum* (cannelle de Ceylan) (**Bruneton, 2009**).

I.2.5.2.4 Pouvoir antiparasitaires

Les huiles essentielles du thym à linalol, et de la sarriette des montagnes sont d'excellentes antiparasitaires (**Purchon, 2001 ; Willem, 2002**).

I.2.5.2.5 Pouvoir antiseptiques

Les propriétés antiseptiques et désinfectantes sont souvent retrouvées dans les huiles essentielles possédant des fonctions aldéhydes ou des terpènes comme l'huile essentielle d'*Eucalyptus radiata* (**Purchon, 2001 ; Willem, 2002**).

I.2.5.2.6 Pouvoir insecticides

Certaines huiles essentielles sont insectifuges ou insecticides telles que celles possédant des fonctions aldéhydes comme le citronnellal contenu dans l'Eucalyptus citronné ou la citronnelle (**Purchon, 2001 ; Willem, 2002**).

I.2.5.2.7 Pouvoir anti-inflammatoire

Les huiles essentielles possédant des aldéhydes ont des propriétés actives contre l'inflammation par voie interne comme l'huile essentielle du Gingembre (**Purchon, 2001 ; Willem, 2002**).

I.2.5.2.8 Pouvoir antispasmodique

Les huiles essentielles possédant des esters ou des éthers possèdent une action sur les spasmes des muscles lisses ou striés comme l'huile essentielle de l'Hélichryse (**Purchon, 2001 ; Willem, 2002**).

I.2.5.2.9 Pouvoir calmant, anxiolytique

Les aldéhydes de type citrals contenu par exemple dans l'huile essentielle de Mélisse ou celle de la Verveine citronnée favorisent la détente et le sommeil (**Purchon, 2001 ; Willem, 2002**).

I.2.5.2.10 Pouvoir cicatrisant

Les huiles essentielles cicatrisantes sont les huiles essentielles de Ciste (*Cistus ladaniferus*), de Lavande vraie (*Lavandula vera*), d'Immortelle (*Helichrysum italicum*), et de Myrrhe (*Commiphora myrrha*). On utilise souvent un mélange de plusieurs huiles essentielles cicatrisantes avec une huile végétale comme l'huile d'amande douce (**Purchon, 2001 ; Willem, 2002**).

I.2.6 Caractérisation phytochimiques des huiles essentielles

L'instrumentation moderne est progressivement confrontée à des analyses de plus en plus complexes, liées au nombre important de constituant présents et aux quantités extrêmement faibles à détecter. En effet l'analyse d'une huile est complexe, de par son très grand nombre de constituants chimiques volatils mais aussi, souvent, de par l'importance des composés à l'état de traces qui font le caractère spécifique de l'huile essentielle (**France-Ida, 1998**).

La technique incontournable pour individualiser les constituants d'un mélange reste la chromatographie en phase gazeuse (CPG). Son couplage à un détecteur à ionisation de flamme (DIF) permet la quantification des constituants et le calcul de leur indice de rétention.

La CPG est souvent combinée avec une technique d'identification spectrale. Généralement la spectrométrie de masse (SM) ou la spectrométrie infrarouge par transformée de Fourier (IRTF). Une nouvelle voie d'analyse est le recours à la RMN du carbone-13 décrite par Formacek et Kubeczka et développée par Casanova et coll (**Julien, 2005**). Elle permet d'identifier les constituants d'un mélange complexe sans individualisation et sans séparation préalable.

I.2.6.1 Chromatographie en phase Gazeuse (CPG/DIF)

Cette technique permet l'analyse qualitative des mélanges très complexes de composés gazeux ou susceptibles d'être vaporiser par chauffage sans décomposition.

La CPG repose sur le principe de migration différentielle des constituants d'un mélange à travers une phase stationnaire. Elle est basée sur la partition des composés injectés entre une phase stationnaire (liquide ou solide) et une phase mobile gazeuse (**Castello, 1999**).

I.2.6.2 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/SM)

L'idée de coupler une autre méthode physique d'investigation après séparation chromatographique, dans le but d'ajouter à la chromatographie une deuxième dimension analytique, s'est concrétisée dès 1960 dans la combinaison entre la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse CPG-SM (**De Maack et al., 1994**).

Le principe de cette méthode consiste à transférer par le gaz vecteur (phase mobile) les composés séparés par chromatographie en phase gazeuse dans le spectromètre de masse au niveau duquel, ils vont être fragmentés en ions de masse variables dont la séparation sera en fonction de leur masse. La comparaison informatique du spectre d'un pic inconnu avec une ou plusieurs bibliothèques de référence permet son identification à condition que la similitude des spectres, inconnus et référence, soit suffisant et que les indices de rétention soient identiques, dans des conditions opératoires comparables (**Desjobert et al., 1997; Bruneton c, 1999**).

I.2.7 Procédés d'extraction des huiles essentielles

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. En général le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ...), de la nature des composés (par exemple, les l'huile essentielles, huiles lourdes....), du rendement en huile et de la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées (**Marie Elisabeth et al., 2005**).

Les étapes de l'extraction des huiles essentielles d'origine végétale restent identiques quelque soit le type d'extraction utilisé. Il est nécessaire dans un premier temps d'extraire de la matière végétale les molécules aromatiques constituant l'huile essentielle, puis dans un second temps de séparer ces molécules du milieu par distillation (Marie, 2005). Parmi les méthodes d'extraction, nous citons :

I.2.7.1 Montage L'hydrodistillation

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène qui met en jeu l'application de deux lois physiques (loi de Dalton et loi de Raoult). Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à ébullition. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau grâce à la différence de densité (Pavida *et al.*, 1976). Au laboratoire, le système équipé d'une cohobe généralement utilisé pour l'extraction des huiles essentielles est le Clevenger (fig3)

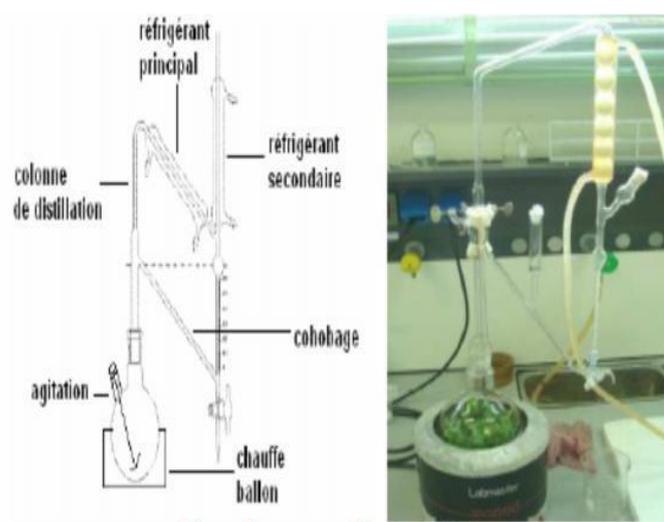


Fig.3 : Montage d'hydrodistillation (Pavida *et al.*, 1976)

Les eaux aromatiques ainsi prélevées sont ensuite recyclées dans l'hydrodistillateur afin de maintenir le rapport plante/eau à son niveau initial. La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'extrait (Pavida *et al.*, 1976).

I.2.7.2 L'entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique qui est l'huile essentielle. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile (Marie, 2005).

I.2.7.3 L'hydrodiffusion

L'hydrodiffusion (fig4) est une variante de l'entraînement à la vapeur. Dans le cas de l'hydrodiffusion, le flux de vapeur n'est pas ascendant mais descendant. Cette technique exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau. Le principe de cette méthode réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange « Vapeur d'eau + huile essentielle » dispersé dans la matière végétale. Comme pour l'entraînement à la vapeur d'eau, l'hydrodiffusion présente l'avantage de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau. De plus, l'hydrodiffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur (Marie, 2005).

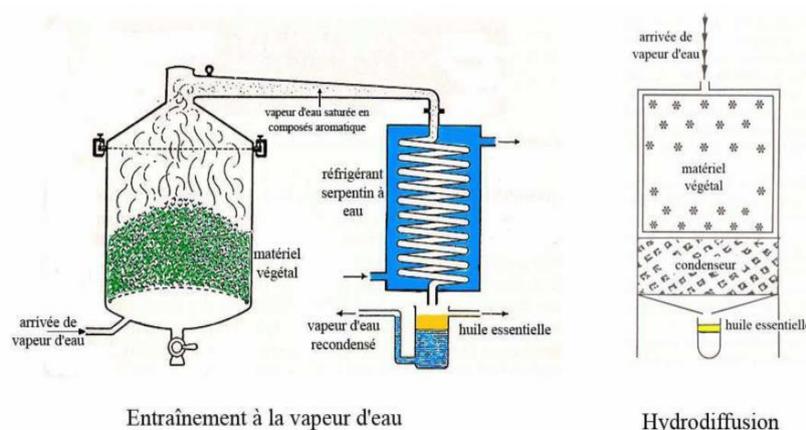


Fig.4: Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante (Marie, 2005)

I.2.7.4 L'expression à froid

Elle constitue le plus simple des procédés, mais ne s'applique qu'aux agrumes dont l'encore des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences. Ce procédé consiste à broyer, à l'aide de presses, les zestes frais pour détruire les poches afin de libérer l'essence. Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence, car il n'a subi aucune modification chimique (**Roux, 2008**).

I.2.7.5 L'extraction par solvants

La méthode de cette extraction est basée sur le fait que les essences aromatiques sont solubles dans la plupart des solvants organiques. L'extraction se fait dans des extracteurs de construction variée, en continu, semi-continu ou en discontinu. Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui par la suite, sera éliminé par distillation sous pression réduite. L'évaporation du solvant donne un mélange odorant de consistance pâteuse dont l'huile est extraite par l'alcool. L'extraction par les solvants est très coûteuse à cause du prix de l'équipement et de la grande consommation des solvants. Un autre désavantage de cette extraction est leur manque de sélectivité; de ce fait, de nombreuses substances lipophiles (huiles fixes, phospholipides, caroténoïdes, cires, coumarines, etc.) peuvent se retrouver dans le mélange pâteux et imposer une purification ultérieure (**Brian, 1995**).

I.2.7.6 L'extraction par micro-ondes

C'est un procédé utilisant les micro-ondes et les solvants transparents aux micro-ondes pour extraire de façon rapide et sélective des produits chimiques de diverses substances (**Paré, 1997**). Le matériel végétal est immergé dans un solvant transparent aux micro-ondes de manière à ce que seul le végétal soit chauffé. Les micro-ondes vont chauffer l'eau présente dans le système glandulaire et vasculaire de la plante, libérant ainsi les produits volatils qui passent dans le solvant (non chauffé). On filtre et on récupère ensuite l'extrait. L'extraction par micro-ondes a le grand avantage de réduire le temps d'extraction à quelques secondes (**Fig5**) (**France, 1996**). Ce procédé très rapide et peu consommateur d'énergie, livre un produit qui, est le plus souvent, de qualité supérieure à celle du produit d'hydrodistillation traditionnelle (**Bruneton a, 1999**). Par ailleurs, l'analyse des huiles essentielles obtenues par cette méthode a montré selon **Scheffer** (1996) que la composition qualitative des huiles essentielles était la même que celle des huiles obtenues par distillation mais le pourcentage des constituants variait de manière significative.

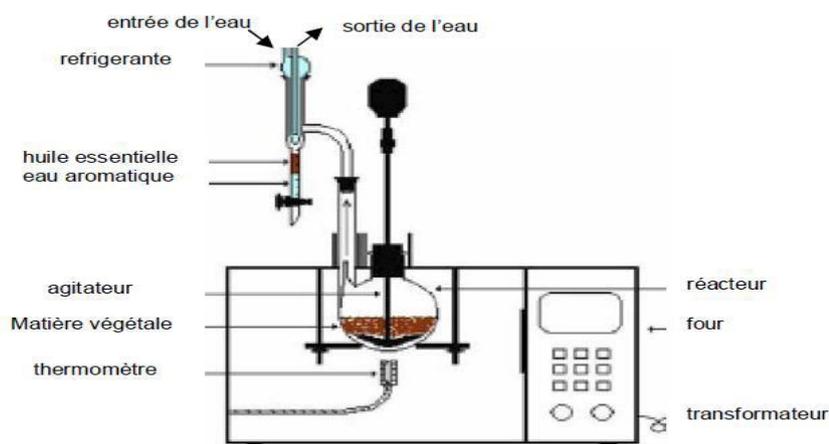


Fig.5 : Principe schématisé de l'appareillage d'hydrodistillation sous micro-ondes (**Lagunez-Rivera, 2006**).

I.3 Généralités sur les bactéries pathogènes d'origine tellurique

I.3.1 Principales bactéries pathogènes du sol

Dans le sol, les microorganismes représentent la majorité des organismes vivants et constituent une importante part de la diversité génétique de la planète. Il a été estimé qu'un gramme de sol contenait de 10^{10} à 10^{11} bactéries (**Horner-Devine et al., 2003**), de 6000 à 50000 espèces bactériennes (**Curtis et al., 2002**) et jusqu'à 200 milles hyphes fongiques (**Leake et al., 2004**). Les bactéries, représentent le groupe le plus nombreux et le plus varié, puisque leur densité peut s'élever de dix millions à un milliard par gramme de sol. Du fait de leur petite taille, leur poids reste inférieur à une tonne par hectare de sol. Ce qui donne aux bactéries une place importante dans le sol, c'est leur extraordinaire variabilité biochimique qui leur permet de transformer toutes les substances du sol et de les faire entrer dans le monde vivant (**Claude et al., 2008**).

Au sein des communautés microbiennes du sol, certains microorganismes peuvent se révéler pathogènes pour l'homme, les animaux et même les plantes. Le sol est un habitat naturel pour certaines bactéries pathogènes primaires et opportunistes. Les bactéries opportunistes telles que *Burkholderia* spp, *Ochrobactrum* spp et *Stenotrophomonas* spp sont présentes dans la rhizosphère (**Berg et al., 2005**). *Pseudomonas aeruginosa* est aussi rencontrée dans les sols (**Colinon et al., 2013**).

Les bactéries pathogènes primaires du genre *Bacillus*, telles que *Bacillus cereus* et *Bacillus anthracis* sont des habitants naturels du sol (**Ticknor et al., 2001; Granum, 2005**).

Clostridium botulinum et *Clostridium tetani* sont également des bactéries telluriques hautement pathogènes de l'homme (Smith, 1978; Smith, 1979). *Listeria monocytogenes* est également une bactérie pathogène qui a une vie saprophyte dans le sol (Freitag *et al.* 2009).

I.3.2 Infection bactérienne d'origine tellurique

Les bactéries pathogènes peuvent être isolées du sol, des eaux douces, marines ou saumâtres, de l'air, des profondeurs océaniques, des déchets radioactifs (Fredrickson *et al.*, 2004). Le sol est une source importante d'espèce pathogènes à l'origine de nombreuses maladies infectieuses tel que le choléra, la syphilis, la peste, l'anthrax, la tuberculose (Kumar et Tuteja, 2009 ; Xu *et al.*, 2010).

La plupart des maladies provoquées par les bactéries pathogènes telluriques sont de nature digestive. Elles peuvent être bénignes (troubles intestinaux, nausées) ou plus graves (dysenteries). Citons comme exemple la *Salmonella* spp l'agent qui provoque le taux d'hospitalisation le plus élevé et aboutit au plus fort taux de mortalité (Scallan *et al.*, 2011). La *Listeria monocytogenes* est également une bactérie pathogène qui entraîne de forts taux de mortalité parmi les personnes infectées. En revanche l'incidence de la listériose est plus faible que celle des salmonelloses (EFSA, 2011; Goulet *et al.*, 2012). Ces deux bactéries manifestent leur symptomatologie par une gastroentérite chez les hôtes sains mais les symptômes peuvent être plus graves (septicémies, méningites) chez les personnes immunodéprimées (Sindic, 2002).

Enterococcus faecalis et *Escherichia coli* sont aussi des bactéries pouvant être isolées du sol, elles font partie de la flore intestinale des individus et sont inoffensives chez un sujet sain. En revanche, chez un sujet immunodéprimé, elles peuvent induire une infection dont les symptômes sont variés et non spécifiques de la bactérie (Sindic, 2002).

Les bactéries d'origine tellurique peuvent provoquer différents symptômes, qui diffèrent d'une bactérie à une autre, ces derniers peuvent apparaître assez rapidement, de quelques heures à quelques jours après le contact, cependant de nombreux facteurs peuvent intervenir, parmi ces facteurs (Sindic, 2002) :

- La résistance des bactéries ;
- leur capacité à se multiplier ;
- la dose minimale infectante (DMI : quantité minimale de pathogènes absorbée par une personne pour que les symptômes de la maladie se manifestent),
- la réponse de la personne contaminée, qui varie selon l'âge, le sexe et l'état de santé

I.3.3 Transmission des bactéries pathogènes du sol à l'homme

Les sols, soumis à des actions anthropiques (agriculture, industrie, urbanisation), peuvent voir la composition de leurs communautés bactériennes modifiée. En agriculture, le recyclage de produits résiduels organiques (fumiers, lisiers, boues de station d'épuration) comme fertilisants des sols peut introduire dans ceux-ci des bactéries potentiellement pathogènes de l'homme telles que *Salmonella* spp, *Escherichia coli* et *Listeria monocytogenes*. Le sol est l'unique support des productions végétales composant l'alimentation humaine. La présence de bactéries pathogènes dans le sol peut altérer la qualité des productions agricoles et avoir de graves répercussions sur la santé humaine (Aude, 2013). Les êtres vivants sont exposés aux microorganismes pathogènes en ingérant des particules de sol, des fruits ou des légumes mal lavés, une mauvaise hygiène (mains sales), ou une inhalation, lors d'activités en plein air, des particules de sol polluées en suspension ou lors d'une manipulation des matières organiques brutes (lisiers, fientes, fumiers, boues d'épuration urbaine).

I.3.4 Isolement et identification des bactéries pathogènes du sol

Les espèces bactériennes peuvent être identifiées de leurs caractères soit biochimique ou antigéniques, pathogénique (classification en parhotype ou pathovars), enzymatiques, de sensibilité aux antibiotiques, de sensibilité aux bactériophages.

D'autres critères se basent sur la composition de la paroi après application du protocole de Gram, la morphologie micro ou macroscopique, la mobilité, la capacité à sporuler, la température de croissance, les besoins nutritionnels, le mode respiratoire, la capacité de photosynthèse, l'utilisation des différentes sources de carbone ou d'azote.

La notion d'espèce bactérienne ne peut être déterminée seulement par l'utilisation de ces critères, mais aussi les propriétés génomiques qui sont principalement le rapport entre les bases guanines, cytosines, adénine et thymine dans la séquence d'ADN et la similarité de séquences d'ADN obtenue par la technique d'hybridation ADN-ADN (Oren, 2004).

I.4 Lutte biologique contre les bactéries pathogènes telluriques

L'utilisation des antibiotiques à long terme a conduit à la sélection de populations microbiennes résistantes. Cette résistance est due à des mutations chromosomiques ou à l'acquisition de gènes de résistance portés par des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages). Ces résistances ont conduit à chercher de nouveaux agents antimicrobiens possédant une efficacité plus importante que les médicaments synthétiques d'une part et bien accepté

par l'organisme d'autre part (sans exercer des effets délétères sur la santé humaine) (**Garcia-Ruiz et al., 2008 ; Kempf et Zeitouni, 2009**).

Beaucoup d'études ont essayé d'évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de plantes médicinales telles que le fenouil (*Foeniculum vulgare*), la menthe poivrée (*Mentha piperita*), le thym (*Thymus vulgaris*), elles ont trouvé que ces extraits sont actifs non seulement contre les bactéries mais aussi contre les champignons, les levures et les virus (**Jürgen et al., 2009**).

D'autres groupes de chercheurs ont franchi une étape plus loin, ils ont isolé et identifié les métabolites responsables de l'activité antimicrobienne des extraits des plantes, cette étape constitue une plateforme pour plusieurs implications incluant l'industrie pharmaceutique, la médecine alternative, et la thérapie naturelle (**Huang et al., 2008**).

Chapitre II

Matériels et méthodes

Notre travail consiste en une étude phytochimique, suivi d'une évaluation de l'activité antibactérienne des substances bioactives (huiles essentielles) d'une plante médicinale de la famille des *Euphorbiaceae* et du genre d'*Euphorbia* sur des bactéries pathogènes d'origine tellurique.

Ce présent travail a duré environ quatre mois, du mois de Février jusqu'à la fin du mois de Mai. Il a été réalisé au niveau du laboratoire de biologie des populations et des organismes (BPO) de l'université de M'hamed Bouguera Boumerdes (UMBB), et au laboratoire de bactériologie de l'Etablissement Publique Hospitalier de Thenia.

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé est constitué d'un matériel végétal représenté par la plante du genre *Euphorbia*, et d'un matériel microbiologique constitué d'une vingtaine de souches bactériennes.

II.1.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de toutes les parties de la plante *Euphorbia sp* (aérienne et souterraine) dont la récolte a été faite en mois de Février 2017 dans la région de Ghardaïa avec l'aide d'un herboriste de cette région.

II.1.1.2. Matériel microbiologique

Le support microbien utilisé est composé de vingt souches microbiennes isolées d'un sol de culture de pomme de terre de la région de Ain timouchent et d'un sol d'une écurie de la région de Corso (Boumerdès) puis conservées dans de la gélose nutritive à une température de 4°C.

II.1.2. Matériel non biologique

Afin de réaliser cette étude un ensemble de matériel classique composé d'appareils, de réactifs, de produits chimiques et de verreries ont été utilisés, celui-ci est décrit en annexe 1.

II.2. Méthodes d'étude

Notre travail a été réalisé en quatre étapes :

- Un screening phytochimique de la poudre végétale de la plante
- Une extraction des huiles essentielles
- Un isolement et une identification des bactéries pathogènes prélevées du sol
- Une Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles sur les bactéries isolées

L'ensemble des étapes de ce travail est résumé dans le diagramme ci-dessous : **(fig 6)**

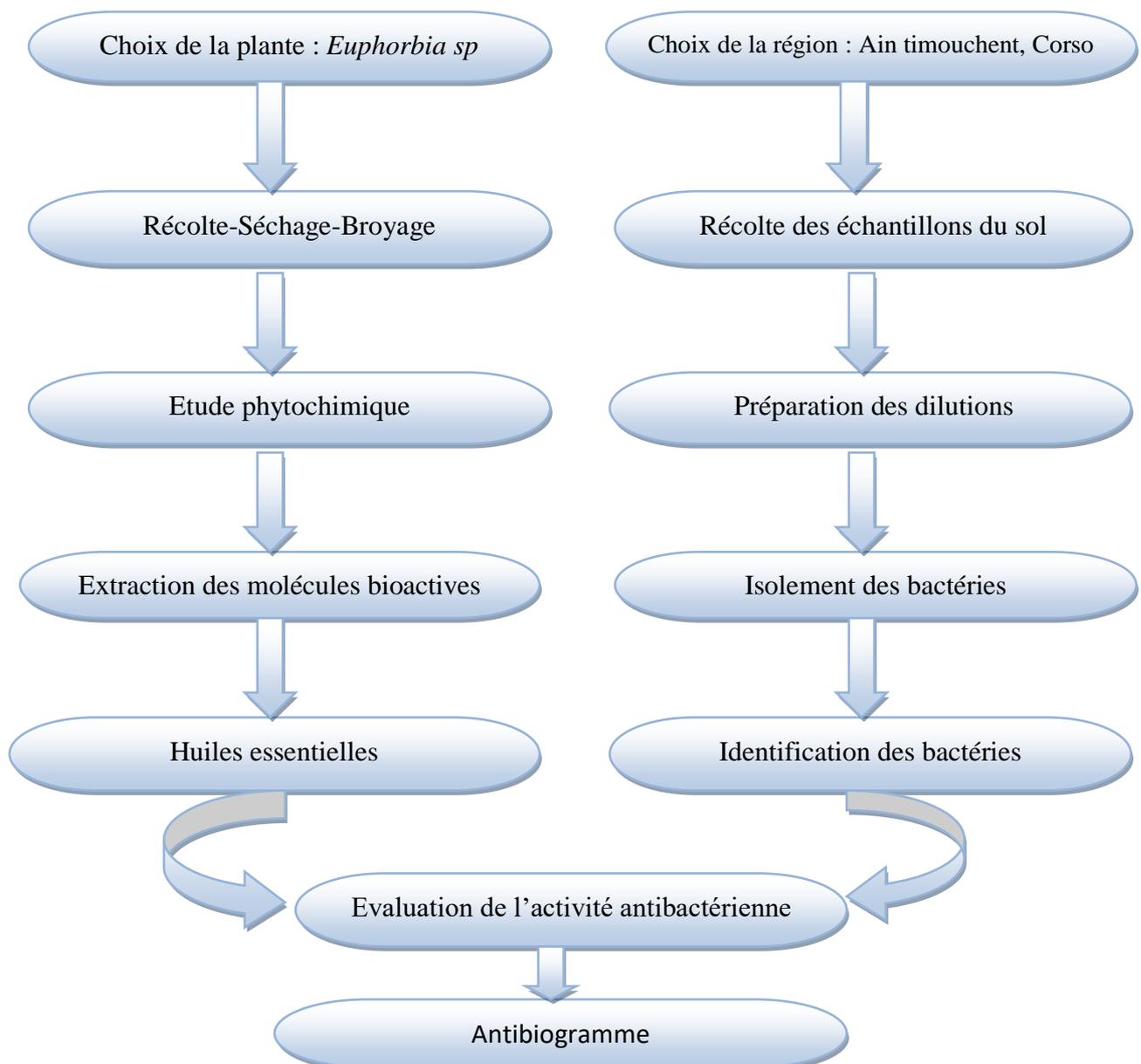


Fig.6 : schéma général des différentes étapes du travail.

II.2.1. Séchage

Cette étape est réalisée dans l'objectif d'abaisser la teneur en eau des feuilles de la plante et d'empêcher ainsi les réactions d'altération qui peuvent se produire. Ceci limite la prolifération des microorganismes. La plante est séchée à température ambiante et à l'abri des rayons solaires pendant deux semaines.

II.2.2. Broyage et conservation de la poudre

Le matériel végétal séché est réduit en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique. La poudre obtenue est conservée à l'abri de l'air et de l'humidité, dans des bocaux en verre hermétiquement fermés. Le broyat va constituer la matière sèche qui sera utilisée pour les tests phytochimiques.



Fig.7 : poudre végétale

II.2.3. Tests phytochimiques (Screening phytochimique)

Les tests phytochimiques réalisés sur la plante ont pour objectif de rechercher les substances bioactives existantes chez cette dernière. Ils sont effectués soit sur la poudre de la plante, soit sur son infusé à 5 %. Les méthodes de caractérisation utilisées dérivent de celle décrites par Paris et Nothis (1978) ; Tona *et al.*, (1998) et LONGANGA *et al.* (2000).

II.2.3.1. Préparation de l'infusé à 5%

L'infusé à 5% de la poudre végétale est préparé par l'ajout de 5g de cette dernière à 100 ml d'eau distillée chaude. Après 15 à 20 mn de contact, la solution est filtrée à l'aide d'un papier filtre, puis le filtrat obtenu est ajusté à 100ml d'eau distillée.

II.2.3.2. Identification des anthocyanes

Cette identification est réalisée par l'addition de quelques gouttes d'HCl à 5 ml de l'infusé. L'apparition d'une coloration rouge est signe de la présence de ces métabolites dans la plante.

II.2.3.3. Identification des leuco-anthocyanes

Pour ce métabolite, 2 g de la poudre végétale sont additionnée à 20 ml d'un mélange de Propanol/Acide chlorhydrique (v/v). Le mélange est porté à ébullition dans un bain marie pendant 15 min. Le développement d'une coloration rouge indiquera la présence des leuco-anthocyanes.

II.2.3.4. Identification des tanins

À 5 ml de l'infusé, on ajoute quelques gouttes d'une solution de FeCl_3 à 5 % (Annexe 13). La coloration bleuâtre ou bleue noire indique la présence des tanins.

II.2.3.5. Identification des tanins catéchiques

L'identification des tanins catéchiques se fait par l'ajout de 15 ml d'infusé à 7 ml de réactif de Stiansy (Annexe 13). Une coloration rouge se traduit par la présence de ces métabolites.

II.2.3.6. Identification des tanins galliques

2 g d'acétate de sodium et quelques gouttes de FeCl_3 sont ajoutés à 5 ml de l'infusé. En présence de tanins gallique la réaction donne une coloration bleu foncé.

II.2.3.7. Identification des quinones libres

2 g de la poudre humectés par 2 ml d'HCl, sont mis en contact avec 20 ml de chloroforme pendant 3 heures. Le filtrat est agité avec 5 ml d'ammoniaque 1/2. Une coloration rouge indique la présence des quinones libres.

II.2.3.8. Identification des saponosides

L'identification des saponosides nécessite l'addition de quelques gouttes d'acétate de plomb à 2 ml d'infusé. La formation d'un précipité blanc indique l'existence des saponosides.

II.2.3.9. Identification des alcaloïdes

5 g de poudre humectés avec l'ammoniaque 1/2 sont macérés pendant 24h dans 50 ml d'un mélange éther-chloroforme (3v/v). Le filtrat est épuisé par l'acide chlorhydrique 2N. Des réactions de précipitations sont réalisées sur la solution chlorhydrique puis on rajoute quelques gouttes de solution Dragendroff (Annexe 13). Ce dernier donne un précipité rouge en présence des alcaloïdes.

II.2.3.10. Identification des coumarines

2 g de poudre sont bouillis dans 20 ml d'alcool éthylique pendant 15 mn puis filtrer. 10 gouttes de la solution alcoolique de KOH à 10% (Annexe 13) plus quelques gouttes d'HCl à 10% sont rajoutées à 5 ml du filtrat. La formation d'un trouble indique l'existence des coumarines.

II.2.3.11. Identification de l'amidon

À 2 g de poudre végétale, on rajoute quelques gouttes d'iode (I_2). Une coloration bleue violette indique la présence d'amidon.

II.2.3.12. Identification des flavonoïdes

5 ml d'HCL, un copeau de Mg et 1 ml d'alcool iso-amylique sont ajoutés à 5 ml d'infusé. La présence de flavonoïdes se manifeste par une coloration rouge.

II.2.3.13. Identification des mucilages

Ajouter 5 ml d'alcool absolu à 1 ml d'infusé. La présence de mucilage se traduit par l'apparition d'un précipité floconneux.

II.2.3.14. Identification des irridoides

À 2 ml de l'infusé, on rajoute quelques gouttes de l'acide chlorhydrique et on chauffe le mélange sur une plaque chauffante. L'existence des irridoides se manifeste par l'apparition d'une coloration bleue.

II.2.3.15. Recherche des Protéines

1g de poudre végétale est dissoute dans 2 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 20% (Annexe 13), Rajouter quelques gouttes de $CuSO_4$ à 2%. La réaction donne une coloration violette avec une teinte rougeâtre en présence des protéines.

II.2.3.16. Recherche des Lipoides

5 g de poudre végétale sont macérés dans 30 ml d'éther de pétrole pendant 30 minutes. Après filtration, évaporer le filtrat sur plaque chauffante. Ajouter au résidu graisseux 3 gouttes de H_2SO_4 . Une coloration violette signifie une réaction positive.

II.2.3.17. Recherche des Sucres réducteurs

5 ml de réactif de Fehling sont ajoutés à 5ml de l'infusé. La formation d'un précipité rouge brique après 3 min de chauffage au bain-marie indique une réaction positive.

II.2.3.18. Recherche des Glucosides

Quelques gouttes de H_2SO_4 sont additionnées à 2 g de poudre végétale. La formation d'une

coloration rouge brique ensuite violette indique la présence des Glucosides.

II.2.3.19. Recherche des Caroténoïdes

A 10 ml de l'infusé, on ajoute 3 ml d'HCl et 3 ml de H₂SO₄. La présence de Caroténoïdes se traduit par une coloration Vert-bleu.

II.2.3.20. Recherche des Polyphénols

Une goutte de chlorure ferrique (FeCl₃) à 2% est ajoutée a 2 ml d'infusé. La présence des polyphénols se traduit par une coloration bleue-noirâtre ou vert foncé.

II.2.4. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles à partir de la matière végétale fraîche est réalisée par hydrodistillation. 60g de la matière végétale constituée de différentes parties de la plante (feuille, tige, fleur, racine) est introduite dans un ballon d'un litre rempli de 600ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition pendant 2h à 3h. Durant cette opération, la vapeur chargée d'eau et d'huile traverse un réfrigérant incliné et se condense. Le distillat s'écoule goutte à goutte et est recueilli dans une ampoule à décanter. La séparation entre la phase organique représentée par l'huile essentielle et la phase aqueuse représentée par l'eau aromatique est réalisée en ajoutant l'éther di-éthylique. Enfin, l'huile essentielle est récupérée dans un flacon en verre stérile enveloppée avec papier aluminium et conservée au réfrigérateur à une température comprise entre 4 et 6°C pour éviter toute dégradation des huiles essentielles.



Fig.8 : dispositif d'hydrodistillation

II.2.4.1. Rendement de l'extraction

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante utilisé (Bekhichi, 2001). Le rendement, exprimé en pourcentage, est calculé par la formule suivante :

$$R\% = (P_B/P_A) \times 100$$

- R : rendement de l'huile en %
- P_B : poids de l'huile en g
- P_A : poids de la plante en g

II.2.5. Isolement des souches bactériennes

II.2.5.1. prélèvement du sol

Le prélèvement a été réalisé dans deux sols différents (sol de culture de pomme de terre et un sol d'écurie) selon la méthode « zigzag » (Fig. 09), 03 échantillons ont été prélevés sur une surface de 1,5 m² à 15 cm de profondeur pour chaque sol, les échantillons de chaque sol sont mélangés. Les deux échantillons ainsi obtenues subissent un tamisage dans l'objectif d'éliminer les grosses molécules telles que les agrégats et les débris, et d'avoir un sol fin et une solution homogène. (Chaussoud *et al.*, 1992 ; Fardoux *et al.*, 2000).

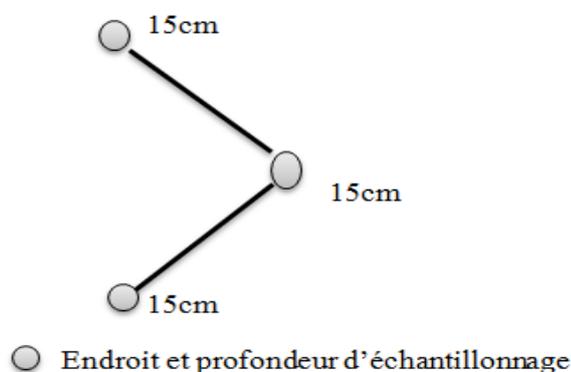


Figure 09 : Echantillonnage en « zigzag »

II.2.5.2. préparation des dilutions

Les dilutions sont réalisées dans l'objectif d'obtenir le maximum de microorganisme dans le sol, 1 gramme de chaque échantillon de sol est dilué dans 9mL d'eau physiologique ce qui

représente la solution mère. Les suspensions de sol sont agitées pendant 15 minutes, après décantation, une série de dilutions est réalisée jusqu'à 10^{-6} à partir de chaque solution mère (Bettache, 2013).

II.2.5.3. Ensemencement dans une gélose nutritive

1 ml de chaque dilution est ensemencé dans une boîte de Pétri contenant de la gélose nutritive, et incubé à 37°C pendant 24 h. L'ensemencement a été fait dans des conditions d'asepsie totale à l'aide d'une anse de platine (Solbi, 2013).

II.2.5.4. Repiquage

Le repiquage des bactéries ainsi isolées est nécessaire dans le but de purifier l'espèce. Il s'agit de prélever une petite partie d'une culture bactérienne pour la transplanter sur un milieu neuf où elle continuera sa croissance (Place *et al.*, 2004).

II.2.5.5. Identification des souches isolées

L'identification des bactéries se fait en trois étapes :

II.2.5.5.1. Examen macroscopique

Cet examen nous permet d'observer à l'œil nu quelques caractères de la colonie, il s'agit de son aspect, sa couleur, sa forme, sa taille, et son relief.

II.2.5.5.2. Examen microscopique (coloration de Gram)

La coloration de Gram est utilisée dans l'objectif de différencier les bactéries en deux groupes distincts, celui des Gram positif et celui des Gram négatif. Cette coloration différentielle repose sur l'aptitude ou non de la paroi bactérienne à s'opposer à la coloration par éthanol. Les bactéries dites Gram positif possèdent une paroi épaisse, composée de peptidoglycane en leur donnant une imperméabilité à l'éthanol, alors que les bactéries Gram négatif ne contiennent qu'une fine couche de peptidoglycane et surtout de lipide en quantité importante ce qui va rendre la décoloration effective.

Mode opératoire

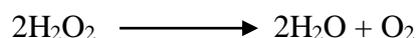
- A l'aide d'une anse de platine on prélève une colonie qu'on dépose sur une lame et qu'on étale pour constituer un frotti. Une goutte d'eau distillée est déposée sur ce frotti qui sera séché puis fixé à la flamme bleue.
- Recouvrir le frottis avec le violet de gentiane pendant 1 min.
- Rincer délicatement à l'eau du robinet. Faire égoutter pour enlever l'excès d'eau.

- Recouvrir le frottis avec une solution de Lugol pendant 1 min afin de consolider la fixation du premier colorant sur la paroi.
- Rincer délicatement à l'eau du robinet et égoutter.
- Différencier à l'alcool éthylique à 95% pendant 5 à 10 seconde pour éliminé le violet de gentiane jusqu'à décoloration totale.
- Colorer le fond à la fuchsine phéniquée pendant 20 à 30 secondes.
- Rincer la lame sous le robinet, et sécher a l'air libre.
- Observer au microscope optique en ajoutant une goutte de l'huile à immersion (objectif×100) (Bouadjaib Sarah., 2013).

II.2.5.5.3. Recherche des caractères biochimiques

a- Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme qui décompose l'eau oxygéné en eau et en oxygène gazeux. Le principe consiste à mettre dans une lame quelques gouttes de H₂O₂ additionnées d'une colonie bactérienne. Le test de la catalase se base sur la recherche d'un dégagement de gaz (Jacques et André., 2004), selon la réaction suivante :



b- Galerie biochimiques classique

L'identification biochimique est un examen qui permet d'identifier une bactérie en s'appuyant sur ces caractères biochimiques.

➤ Urée-Indole

Une suspension dense de bactéries est introduite dans 0,5 ml de milieu Urée-Indole, et incubé à 37°C pendant 24 à 48 h.

Lecture

- Un virage de milieu au rouge violacé ou au rouge rose indique une réaction d'uréase positive.

- Deux gouttes de réactif de Kovacs sont additionnées. L'apparition d'un anneau rouge indique une réaction d'indole positif (**Marchal et al., 1991**).

➤ **VP/RM**

Deux tubes contenant chacun 0,5 ml du milieu Clark et Lubs sont ensemencés puis incubés à 37°C pendant 18 à 48 h. Après incubation deux gouttes de réactif VP sont ajoutées dans l'un des deux tubes et deux gouttes de réactif RM dans l'autre.

Lecture

- Un anneau rouge indique une réaction VP positive.

- Une coloration rose fuchsia indique une réaction RM positive (**Marchal et al., 1991**).

➤ **TSI (Gélose Glucose-Lactose-Saccharose-H₂S)**

A l'aide d'une pipette contenant des colonies prélevées, on ensemence la pente puis le culot d'un tube TSI par piqûre centrale. L'incubation se fait à 37°C pendant 48 à 72 h.

Lecture

- Une coloration jaune de la pente indique un lactose positif.

- Une coloration jaune du culot indique un glucose positif.

- Une coloration jaune de la zone intermédiaire indique un saccharose positif.

Ce test permet également de confirmer ou non la production de H₂S (noircissement de la zone joignant la pente et le culot) et du Gaz (bulles dans la gélose) (**Marchal et al., 1991**).

➤ **Citrate de Simmons**

Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone: le citrate. Seules les bactéries possédant une citrate-perméase sont capables de se développer sur ce milieu. La pente du milieu est ensemencée en stries longitudinales à l'aide d'une pipette contenant une colonie et incubé à 37°C pendant 24h.

Lecture

- Citrate-positif : culture avec alcalinisation du milieu (virage de l'indicateur au bleu).

- Citrate-négative : pas de culture (coloration verte de milieu inchangée) (**Marchal et al., 1991**).

➤ **Esculine**

La pente du milieu est ensemencée par piqure centrale à l'aide d'une pipette contenant des colonies puis incubés à 37°C pendant 48 à 72 h.

Lecture

- L'hydrolyse de l'esculine (ou aesculine) qui rompt la liaison glucosidique et libère du glucose et de l'escultine donne une coloration noire en présence de citrate de fer ammoniacal. Un résultat positif se traduit donc par un noircissement du milieu (**Marchal et al., 1991**).

➤ **Recherche de la coagulase**

La coagulase libre est présente chez les *S.aureus*, mais elle peut également être produite par les *S. intermedius* ou les *S.hyicus*. Ce test consiste à mettre en évidence la coagulase libérée dans le milieu extérieur (**Garnier et Denis., 2007**).

La détection de cette coagulase s'effectue en ajoutant dans un tube à hémolyse 0.5 ml de plasma humain et 0.5 ml d'une culture de staphylocoques de 24h en bouillon. Le mélange est placé à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. Les souches de *S aureus* provoquent la coagulation du plasma le plus souvent les trois premières heures.

Lecture

- Un test positif se traduit par la formation d'un coagulum.

II.2.6. Sensibilité aux antibiotiques

Dans le but de comparer l'effet de l'extrait et celui des antibiotiques auxquels les bactéries isolées sont sensibles, quelques antibiotiques ont aussi été testés sur ces dernières (Tableau .I)

Tableau I : Sensibilité des bactéries aux antibiotiques

Souches ATB	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	<i>Bacillus</i> <i>sp</i>	<i>Enterococcus</i> <i>sp</i>	<i>SCN</i> <i>sp</i>
VA	(R)	(S)	(R)	(S)	(S)	(S)
CT	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)	(S)
IPM	(S)	/	/	/	/	/
NA	(S)	/	/	(S)	/	/

(S) : sensible (R) : Résistant

II.2.7. Evaluation de l'activité antibactérienne

La technique utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne de notre extrait est l'antibiogramme ou la méthode de diffusion en milieu gélosé en utilisant des disques stériles (Cavallo *et al.*, 2006). Cette méthode permet de déterminer l'activité inhibitrice de l'agent antibactérien, par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour du disque imprégné de l'extrait à tester. Les principales étapes sont :

II.2.7.1. Revivification et repiquage des espèces bactériennes

La revivification des souches bactériennes est une étape nécessaire avant leur utilisation car leur activité est nulle à l'état conservé. Elle a pour objectif l'obtention d'une culture jeune et pure et des colonies bien isolées qui vont servir à préparer l'inoculum. Pour cela les souches sont ensemencées par des stries dans des boîtes de pétries et incubées à 37°C pendant 24 heures.

Les souches bactériennes obtenues sont repiquées dans des boîtes de pétries renfermant le milieu Muller-Hanton par la méthode des stries, puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

II.2.7.2 Préparation de l'inoculum

L'inoculum est préparé à partir de colonies jeunes de bactérie dans de l'eau physiologique stérile (0,9%). Les colonies sont prélevées à l'aide d'une anse de platine et homogénéisées dans de l'eau physiologique. Il faut noter que pour l'obtention de la suspension 10^8 germes par ml, l'absorbance à 620nm doit être comprise entre 0,2 et 0,3.

II.2.7.3 Préparation des disques

Des disques de papier Whatman de 6 mm de diamètre, stériles (stérilisation à 120°C pendant 15 min par autoclavage), sont chargés de l'extrait naturel à tester à raison de 5µl par disque, des disques d'antibiotiques spécifiques pour chaque bactérie sont aussi utilisés.

II.2.7.4. Préparation des milieux de culture

La gélose Muller Hinton stérile prête à l'usage sont coulée dans des boîtes de Pétri stériles de 90 mm de diamètre en raison de 4mm d'épaisseur répartie uniformément dans les boîtes. Laisser solidifier les boîtes leur emploi.

II.2.7.5. Ensemencement

Des boîtes de Pétri stériles préalablement préparées, ont été ensemencées par étalement à l'aide d'un râteau stérile, l'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries. À l'aide d'une pince stérile, les disques contenant les produits à tester sont déposés à la surface de la gélose inoculée au préalable et le tout est incubés à 37°C pendant 24h.

II.2.7.6. Expression des résultats

Après l'achèvement de la période d'incubation, la lecture du diamètre de la zone d'inhibition se fait comme suit (**Moreira et al., 2005**):

- Non sensible (**R**) pour un diamètre de 10mm.
- Sensible (**S**) pour un diamètre entre 10 et 14mm.
- très sensible pour un diamètre entre 15 et 19mm.
- extrêmement sensible pour un diamètre plus de 20 mm.

Chapitre III

Résultats

Dans ce chapitre, nous avons exposé les résultats obtenus. Ces derniers sont subdivisés en quatre parties. La première traite les résultats des tests phytochimiques, la deuxième comprend ceux concernant l'extraction des huiles essentielles, la troisième traite les résultats de l'identification des bactéries pathogènes isolées du sol. Enfin, les résultats de l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles sont mentionnés dans la quatrième partie.

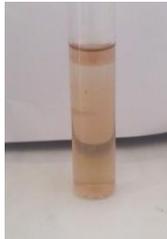
III.1. Screening phytochimique

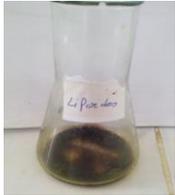
Les résultats des tests phytochimiques réalisés sur la poudre végétale de la plante *Euphorbia sp* sont mentionnés dans le tableau suivant (Tableau .II).

Tableau II : résultats des tests phytochimiques

Composés chimiques	Résultats positifs	Résultats obtenus
Anthocyanes	Coloration rouge	 -
Leuco-anthocyanes	Coloration rouge	 -
Tannins totaux	Coloration bleue noire	 ++

Tannins catéchiques	Coloration rouge	 -
Tannins galliques	Coloration bleu foncé	 -
quinones libres	Coloration rouge	 -
Saponosides	Précipité blanc	 +++
Alcaloïdes	Précipité rouge	 +++

Coumarines	La formation d'un trouble	 ++
l'amidon	Coloration bleue violette	 -
Flavonoïdes	Coloration rouge	 ++
Mucilages	Précipité floconneux	 ++
Irridoïdes	Coloration bleue	 -

Protéines	Coloration violette avec une teinte rougeâtre	 -
Lipoides	Coloration violette	 +++
Sucres réducteurs	Précipité rouge brique	 +++
Glucosides	Coloration rouge brique ensuite violette	 +++
Caroténoïdes	coloration vert-bleu	 -

<p style="text-align: center;">Polyphénols</p>	<p style="text-align: center;">coloration bleu-noirâtre ou vert foncé</p>	<div style="text-align: center;">  <p style="margin-top: 10px;">++</p> </div>
---	---	--

Avec : (-) : Absence de substance active

(+) : présence de substance active

D'après le tableau, on constate que les principaux composés présents en quantités importantes dans la poudre de la plante *Euphorbia sp* sont les saponosides, les alcaloïdes, les lipoides, les glucosides, les sucres réducteurs. Les tannins totaux, les coumarines, les flavonoïdes, les mucilages, et les polyphénols sont moyennement présents. Les autres composants à savoir les anthocyanes, les leuco-anthocyanes, Tannins catéchiques, les tanins galliques, les quinones libres, l'amidon, irridoïdes, protéines, caroténoïdes sont totalement absents.

III.2. Extraction des huiles essentielles

L'huile essentielle d'une plante est le sec huileux qu'on peut extraire d'un végétal et qui contient de très nombreuse espèces chimique dont certaines sont responsable du parfum dégagé par la plante. L'espèce majoritaire est appelée principe actif de l'huile essentielle (**Aristidou et pentilla, 2000**).

La technique utilisée dans notre travail est l'hydrodistillation par entrainement a la vapeur d'eau permettant l'extraction de l'huile essentielle (ou distillat) par différence de densité (**Aristidou, 2000**). Nous avons effectué plusieurs hydrodistillations sur la plante *Euphorbia sp*, afin d'obtenir une quantité suffisante de l'huile, les résultats sont exprimés dans le tableau III.

Tableau III: Extraction de l'huile essentielle.

Opération	Durée de distillation (h)	Matière Végétal (g)	Eau distillée utilisée (ml)	Volume de l'H.E (ml)	Rendement (%)
01	3 heures	60	600	4,9 ml	0,04
02		60	600		
03		60	600		
04		60	600		

L'huile essentielle a été récupérée et conservé au sec, à l'abri de la chaleur et de la lumière.

Il ressort du tableau III, que le rendement en huiles essentielles est de l'ordre de 0,5% pour une extraction.

III.3. Identification des souches microbiennes isolées :

Les résultats obtenus lors de l'identification des bactéries isolées sont représentés dans le tableau suivant(IV) :

Tableau IV: Identification bactérienne

Aspect	Coloration Gram	Test Biochimiques											Numéro de souche et le nom du germe
		Cit	Gaz	Lac	H ₂ S	Vp	Rm	Urée	Ind	Cat	Esc	Coa	
Colonie fine couleur brillante grisâtre	Cocci Gram +	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	/	(S ₁) AH ₂
Colonie fine Couleur blanche	Cocci Gram +	+	-	-	-	+	-	-	-	+	/	-	(S ₂) TN
Colonie fine couleur brillante grisâtre	Cocci Gram +	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	/	(S ₃) AH ₂
Colonie fine Couleur blanche	Bacille Gram -	-	-	+	-	+	-	-	-	+	/	-	(S ₄) TN
Colonie fine couleur brillante grisâtre	Cocci Gram +	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	/	(S ₅) AH ₂
Colonie fine Couleur jaunâtre	Cocci Gram +	-	-	-	-	+	-	-	-	+	/	+	(S ₆) CH ₃
Colonie fine couleur brillante grisâtre	Cocci Gram +	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	/	(S ₇) AH ₂
Colonie Platte Couleur Foncée	Bacille Gram +	-	-	+	-	-	+	-	-	-	/	/	(S ₈) E ₄
Colonie Platte Couleur Foncée	Bacille Gram +	-	-	+	-	-	+	-	-	+	/	/	(S ₉) E ₄
Colonie moyenne couleur jaune	Bacille Gram -	-	-	+	-	-	+	-	+	+	/	/	(S ₁₀) AH ₈
Colonie fine couleur brillante grisâtre	Cocci Gram +	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	/	(S ₁₁) AH ₂
Colonie fine couleur brillante grisâtre	Cocci Gram +	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	/	(S ₁₂) AH ₂

Colonie fine couleur brillante grisâtre	Cocci Gram +	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	/	(S ₁₃) AH ₂
Colonie fine couleur brillante grisâtre	Cocci Gram +	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	/	(S ₁₄) AH ₂
Colonie fine Couleur blanche	Cocci Gram +	-	-	-	-	-	+	-	-	+	/	-	(S ₁₅) TN
Colonie fine couleur brillante grisâtre	Cocci Gram +	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	/	(S ₁₆) AH ₂
Colonie fine Couleur blanche	Cocci Gram +	-	-	+	-	+	-	+	-	+	/	-	(S ₁₇) TN
Colonie fine Couleur blanche	Cocci Gram +	-	-	+	-	+	-	-	-	+	/	-	(S ₁₈) TN
Colonie fine Couleur blanche	Cocci Gram+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	/	-	(S ₁₉) TN
Colonie plate couleur transparente	Bacille Gram -	+	-	-	-	+	-	-	-	+	/	/	(S ₂₀) T ₁

Avec : (+) : présence.

: (-) : absence

Pour toutes les souches bactériennes, le milieu Hektoen a été utilisé comme milieu d'enrichissement, puis la gélose nutritive afin d'obtenir des colonies jeunes et pures. L'incubation a été faite à 37°C pendant 24h.

III.4. Tests de sensibilité aux antibiotiques

Les antibiotiques sont par définition, des produits microbiens, ou leurs dérivés, capables de tuer les micro-organismes sensibles ou d'inhiber leur croissance (Prescott *et al.*, 1995). L'étendue de l'activité antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre d'action. Plus un antibiotique agit sur des espèces bactériennes différentes, plus son spectre est large. Les

résultats de l'effet des antibiotiques synthétiques sur les souches isolées sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau V : Tests de sensibilité aux antibiotiques

Souches		Diamètre d'inhibition par les antibiotiques (mm)			
		VA	CT	IPM	NA
<i>AH₈</i>	10	6 (R)	15 (S)	32(S)	26(S)
<i>CH₃</i>	6	37 (S)	14 (S)	/	/
<i>T₁</i>	20	6 (R)	15 (S)	/	/
<i>E₄</i>	8	22 (S)	8 (R)	/	19(S)
	9	34 (S)	18 (S)	/	17(S)
<i>AH₂</i>	1	26 (S)	8 (R)	/	/
	3	48 (S)	6 (R)	/	/
<i>TN</i>	15	49 (S)	16 (S)	/	/
	17	31 (S)	17 (S)	/	/
	19	33 (S)	14 (S)	/	/

Avec : (S) : Sensible.

(R) : Résistant.

III.5. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Euphorbia sp*

III.5.1. Densités optiques des suspensions bactériennes

Les densités optiques des suspensions bactériennes ont été mesurées par le spectrophotomètre UV/Visible à une longueur d'onde 620 nm.

III.5.2. Etude qualitative

L'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Euphorbia sp* a été réalisée sur 10 bactéries classées en six genres (*AH₂*, *TN*, *CH₃*, *E₄*, *AH₈*, *T₁*).

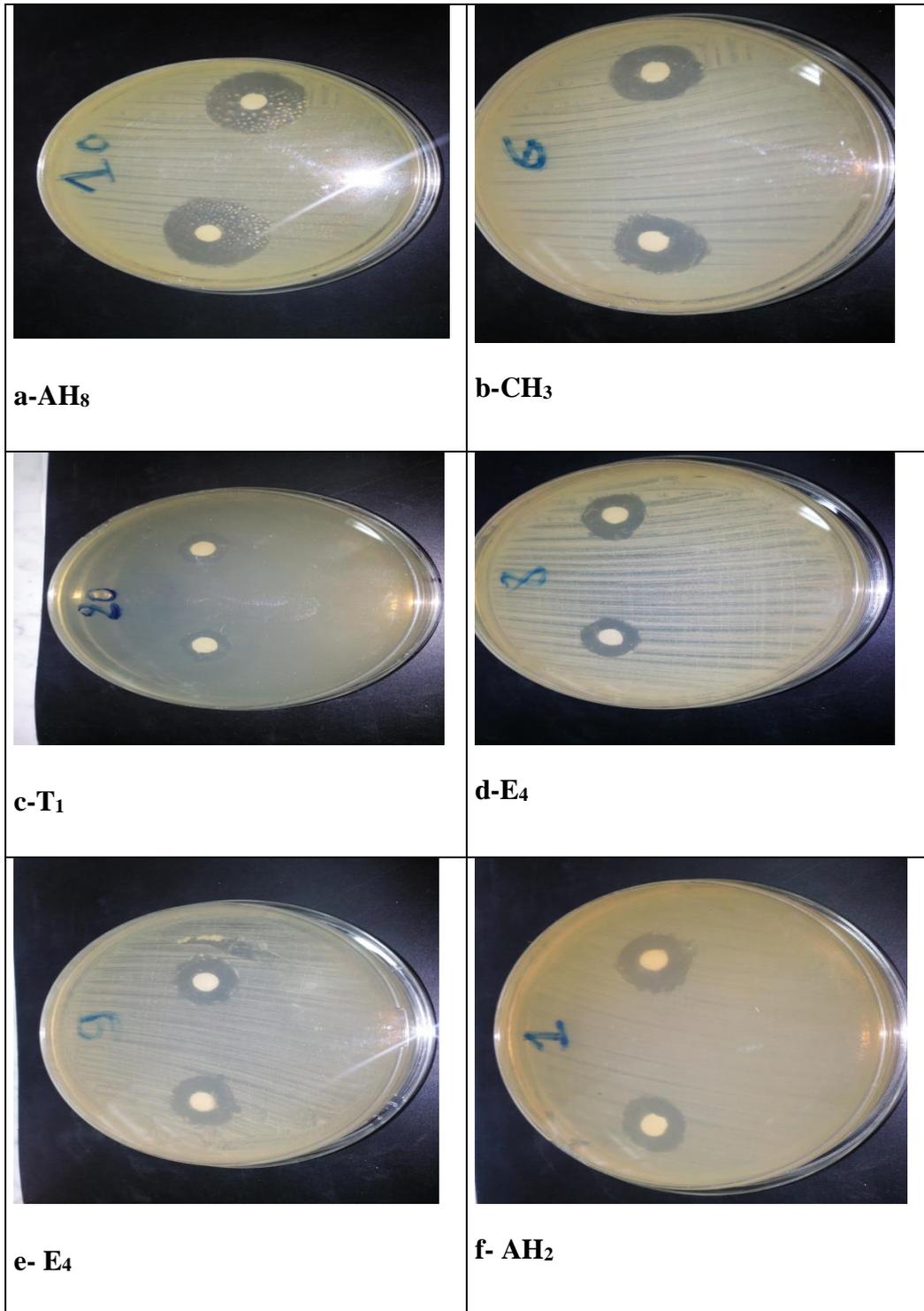
Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau VII

Tableau VI : Activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Euphorbia Sp*

Souches bactériennes		Nombre d'essai	Diamètres de la zone d'inhibition (mm)	Moyenne (mm)	
<i>AH₈</i>	10	2	25	26	
			27		
<i>CH₃</i>	6	2	17	17.5	
			18		
<i>T₁</i>	20	2	13	12.5	
			12		
<i>E₄</i>	8	2	14	14.5	15.25
			15		
	9	2	17	16	
<i>AH₂</i>	1	2	16	16	16
			16		
	3	2	17	16.5	
<i>TN</i>	15	2	18	16	15.33
			14		
	17	2	19	16	
			13		
	19	2	15	14	
		13			

A partir de ces résultats et les diamètres d'inhibition obtenus, il ressort que : *AH₈* est extrêmement sensible (26 mm), *CH₃* est fortement sensible (17.5 mm), *AH₂*, *TN sp* et *E₄* sont sensibles (15 à 16 mm), *T₁* est faiblement sensible (12.5 mm).

On remarque que l'huile essentielle d'*Euphorbia sp* présente en général une action inhibitrice sur la croissance de toutes les bactéries.



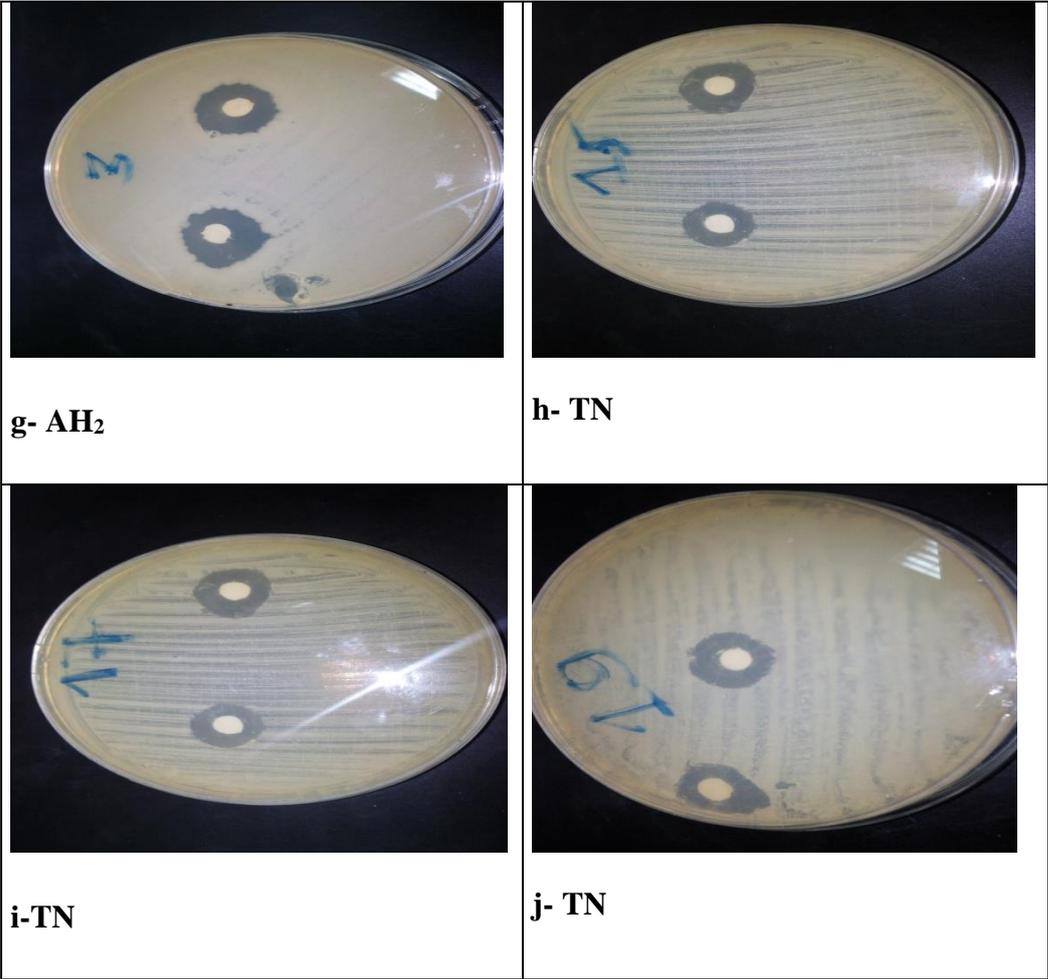


Planche 01 : activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Euphorbia sp*

Chapitre IV

Discussion

IV.1. les tests phytochimiques

L'étude phytochimique de la plante *Euphorbia sp* a révélé une grande diversité en substances bioactives. Les plus abondantes sont les saponosides, les alcaloïdes, les lipoïdes, les glucosides, les sucres réducteurs, suivis par les coumarines, les flavonoïdes, Les tannins totaux, les mucilages, et les polyphénols. En revanche elle ne renferme pas les anthocyanes, les leuco-anthocyanes, les tannins catéchiques, les tanins galliques, les quinones libres, l'amidon, irridioïdes, protéines, caroténoïdes. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par plusieurs auteurs, qui mentionnent que la famille des *Euphorbiaceae* renferment diverses composés chimiques tels que les flavonoïdes responsables des activités anti-malariques (**Liu et al., 2007**) et anti inflammatoires (**Ekpo et Pretorius, 2007**), les alcaloïdes qui possèdent des propriétés anti-microbiennes (**Dias et al., 2007**) et anti-tumorales (**Suarez et al., 2004**), les saponosides porteurs d'activités cytotoxiques (**Kiem et al., 2009**) et anti-ulcéreuses (**Ukwe, 1997**), les tanins avec des propriétés anti-virales (**Bessong et al., 2006 ; Liu et al., 1999**), antimutagéniques (**Rossi et al., 2003**) et anti-fongiques (**Hwang et al., 2001**), les polyphénols aux propriétés anti-tumorales (**Yu et al., 2005**) et anti-oxydantes (**Yang et al., 2007**) et enfin les coumarines (**Aynehchi et al., 1978**).

IV.2. le rendement en huiles essentielles

Les *Euphorbiaceae* sont connus pour leur richesse en huiles essentielles (**Kouamé, 2012**). Dans notre étude le rendement obtenu pour une extraction à partir de 60g de matière végétal d'*Euphorbia sp* est de 0.5%. En comparant ce rendement avec ceux rapportés dans la littérature, nous constatons que nos résultats sont proche de ceux obtenus par **De Lima et al., (2012)** qui mentionnent que le rendement des feuilles de *Croton hirtus* (*Euphorbiaceae*) en huiles essentielles est de 0.3% à 0.4%. En revanche il existe d'autres espèces du genre *Croton* connues pour leur très faible rendement en huile essentielle. Ce dernier vari de 0.12 à 0.14 % pour *C. adenocalyx* Baill (**Sidney et al., 2010**), de 0.25% pour *C. antanosiensis*, de 0.19% (tiges) et 0.29% (feuilles) pour *C. decaryi* Leandri, de 0.32% pour *C. geayi* Leandri et enfin le rendement en huiles essentielles est de 0.15% (Tiges) et 0.38% (feuilles) pour *C. sakamaliensis*.

Les différences de rendement en huiles essentielles d'un genre à un autre et d'une espèce à une autre ont été rapportées. Selon plusieurs auteurs, l'origine de récolte de l'espèce, la période de récolte, l'organe de la plante, la durée de séchage et la méthode d'extraction sont des facteurs parmi d'autres qui peuvent aussi avoir un impact direct sur les rendements en

huile essentielle (**Russo et al., 1998 ; Tonzibo, 1998 ; Vekiari et al., 2002 ; Karousou et al., 2005 ; Kouamé, 2012**).

IV.3. l'évaluation de l'activité antibactérienne

Les huiles essentielles ont été considéré comme agents antimicrobiens les plus efficaces dans les plantes médicinales, la première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (**Boyle, 1995**). Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes (**Burt, 2004**).

L'activité antibactérienne est variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (**Kalemba, 2003 ; Oussou, 2009 ; Avlessi, 2012**).

Dans ce présent travail, nous avons évalué l'activité antibactérienne des huiles essentielles sur 20 souches bactériennes classées en six genres (AH_8 , TN, AH_2 , E_4 , T_1 , CH_3).

Le pouvoir antibactérien le plus élevé de l'extrait huileux est observé pour AH_8 avec une zone d'inhibition de 26mm et le plus faible est celui de T_1 avec une zone d'inhibition de 12.5mm, tandis que pour CH_3 , AH_2 , E_4 et TN, les zones d'inhibitions sont respectivement de 17.5, 16, 15.25, 15.33mm.

Babili et al. (2009) ont montré que l'huile essentielle des feuilles de *Croton campestris* (*Euphorbiaceae*) inhibe la croissance de CH_3 . Une autre étude réalisée par **Matias et al.** (2010) à également mis en évidence les propriétés antibactériennes de l'extrait des feuilles de *C. campestris* sur CH_3 . En plus des CH_3 ; **Thiago et al.** (2013) ont montré que l'huile essentielle de *C. campestris* inhibe aussi la croissance T_1 . Par ailleurs **Rodrigues et al.** (2009), ont montré que l'huile essentielle de *Croton zehntneri* exerce une activité inhibitrice sur la croissance de CH_3 et de T_1 . Ceci est en accord avec nos résultats obtenus pour CH_3 et T_1 . Pour AH_8 à Gram négatif, nos résultats montrent que c'est la bactérie la plus sensible à l'action de l'huile essentielle tandis que **Burt (2004)** mentionne que les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif. Toutefois, les bactéries à Gram négatif paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la nature de leur paroi cellulaire. Cette différence peut être due selon **Surk (2003)** aux méthodes utilisées pour l'évaluation antibactérienne qui donnent parfois des résultats différents selon les conditions opératoires expérimentales pour chaque manipulateur, ce qui laisse conclure que les techniques utilisées ont une grande influence sur les résultats.

IV.4. la sensibilité des antibiotiques

La zone d'inhibition d'un bon agent antibactérien diffère d'un auteur à un autre, d'après **pereira et al (2006)** la zone d'inhibition doit être égale ou supérieure à 10mm. Pour **vieira et al (2001)** elle est de 13mm et selon **seokwon kim et al (2006)** elle doit être supérieure à 6mm.

AH₈:

Le diamètre d'inhibition de la Colistine, de l'imipénème et de l'acide nalidixique varie entre 15 et 32 mm ce qui permet de classer AH₈ dans la classe des microorganismes sensibles pour ces antibiotiques. Pour la Vancomycine le diamètre d'inhibition est de 6 mm, ce qui classe la bactérie dans les microorganismes résistants à cet antibiotique.

CH₃:

Les diamètres d'inhibition de la Vancomycine et de la Colistine sont de 37-14 mm respectivement, cela permet de classer CH₃ dans la classe des microorganismes sensibles pour ces deux antibiotiques.

T₁:

Le diamètre d'inhibition de la Colistine est de 15 mm ce qui permet de classer T₁ dans la classe des microorganismes sensibles pour cet antibiotique. Pour la Vancomycine le diamètre d'inhibition est de 6 mm, ce qui classe la bactérie dans les microorganismes résistants à cet antibiotique.

E₄:

La moyenne des diamètres d'inhibition de la Vancomycine, de la Colistine et de l'acide nalidixique est respectivement de 28-13-18 mm, la bactérie est donc sensible à ces antibiotiques.

AH₂:

La moyenne des diamètres d'inhibition de la Vancomycine est de 37 mm cela permet de classer AH₂ dans la classe des microorganismes sensible à cet antibiotique. Pour la Colistine la moyenne des diamètres d'inhibition est de 7 mm, ce qui classe la bactérie dans les microorganismes résistants à cet antibiotique.

TN:

La moyenne des diamètres d'inhibition de la Vancomycine, et de la Colistine est de 37-15 mm cela permet de classer TN dans la classe des microorganismes sensible pour ces deux antibiotiques.

*Conclusion et
perspective*

Les extraits aromatiques des plantes ont été utilisés dans différentes formulations, comme les médicaments et la parfumerie. Les huiles essentielles ont été considéré comme agents antimicrobiens les plus efficaces dans ces plantes.

Le manque d'étude sur les activités biologiques des espèces d'*Euphorbiaceae* à suscité l'intérêt de cette étude.

L'objectif de notre travail consiste à étudié l'effet des huiles essentielles d'*Euphorbia sp* sur la croissance de certains souches bactériennes pathogènes d'origine tellurique isolées de deux régions ; Ain timouchent et Boumerdes.

Le screening phytochimique de la plante montre que la poudre végétale est très riche en saponosides, alcaloïdes, lipoïdes, glucosides, sucres réducteurs. Elle est moyennement riche en tannins totaux, coumarines, flavonoïdes, mucilages, polyphénols. Cependant elle est dépourvue d'anthocyanes, de leuco-anthocyanes, de Tannins catéchiques, de tanins galliques, de quinones libres, d'amidon, d'irridoïdes, de protéines et de caroténoïdes. Le rendement d'extraction en huile essentielle obtenu par hydrodistillateur est de 0.5%.

L'étude microbiologique du sol a permis d'identifier 10 souches bactériennes classées en six genres : *AH₈*, *TN*, *AH₂*, *E₄*, *T₁*, *CH₃*.

L'activité antibactérienne a été étudiée sur les 10 souches identifiées selon la méthode de diffusion sur milieu gélosé. L'analyse et l'interprétation des résultats de l'effet des huiles essentielles d'*Euphorbia sp* sur la croissance des différentes souches bactériennes testés, nous a permis de conclure que toutes les bactéries testées sont sensibles a l'huile essentielle de la plante dont le germe le plus sensible est *AH₈* avec une zone d'inhibition de 26mm.

A la lumière des résultats obtenus dans cette étude, on peut conclure que les huiles essentielles d'*Euphorbia sp* présentent un bon effet antibactérien vis-à-vis de certaines souches bactériennes.

En perspective, il serait souhaitable de :

- Identifier des souches bactériennes par Galerie API.
- Déterminer la composition chimique d'huiles essentielles d'*Euphorbia sp*.

- Tester l'effet des huiles essentielles sur une large gamme de microorganismes (bactéries, champignons et virus).

Références
Bibliographiques

. A.

- **Amara Imene et Khaldi Zohra., 2015.** Isolement, identification et étude de l'antibiorésistance des souches bactériennes isolées à partir de services de réanimation et d'hémodialyse de CHU Ouargla. Thèse de doctorat P 55.
- **Aude L., 2013.** Prévalence de pathogènes humains dans les sols français, effet des facteurs pédoclimatiques, biologiques et du mode d'utilisation des sols. Thèse de doctorat. université de BOURGOGNE. P 188.
- **Avlessi F., Alitonou G.A., Djenontin T S., Tchobo F., Yèhouéno B., Menut C. & SohounhlouéD., 2012.** Chemical composition and Biological activities of the Essential oil extracted from the Fresh leaves of *Chromolaena odorata* (L. Robinson) growing in Benin. *ISCA Journal of Biological Sciences*, 1(3): 7-13.
- **Aynehchi Y., Hakimzadeh MZ., 1978** Chemical examination of *Euphorbia falcata* L. *Q J Crude Drug Res*; 16 : 163-6.

. B.

- **Babili F.E., Moulis C., Bessiere J.M., Roques C. & Haddioui L., 2009.** Essential oil leaves of *Croton campestris* St. Hilaire, its secretory elements, and its biological activity. *Journal of Essential Oil Research*. 21: 272–275.
- **Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. et Idaomar M., 2008.** Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475.
- **Bekhichi C., et Abdelouahid D., 2001.** Les huiles essentielles. Ed. Tec et Doc, 50p.
- **Belaiche P., 1979.** Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1 : l'aromatogramme .éd. Maloine. Paris.
- **Bellakhdar J., 1997.** La pharmacopée marocaine traditionnelle. Idis PRESS (Ed). Paris, p. 764.
- **Benalia Y., 2008.** Valorisation des ressources végétales steppiques par l'étude des huiles essentielles. Cas : *Marrubium deserti* DeNoé. Mémoire de Magistère, Département de biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif.
- **Berg G., Eberl L. & Hartmann A., 2005.** The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology* 7, 1673-1685.
- **Berthelot A., et Bertband D.M., 1912.** *The Intestinal Flora, Isolation of a Microbe Capable of Producing P-Iminazolylet hylamine from Histidine*. *J. vegetable physiology and agriculture*, 1912. P: 668-679.

- **Bessong P., Rojas L., Obi L., Tshisikawe P., Igunbor E., 2006.** Further screening of venda medicinal plants for activity against HIV type 1 reverse transcriptase and integrase. *Afr. J. Biotechnol.* 5, 526-528.
 - **Bettache A., 2013.** Isolement et sélection d'actinomycètes producteurs d'enzymes cellulolytiques. Thèse de doctorat.32p.
 - **Bossi E., Lemanceau P., Latour X., and Gardan L., 2000.** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* .20: 51-63.
 - **Bouadjaib Sarah., 2013.** Etude physico-chimique du produit laitier traditionnel du Sud algérien «Jben» Recherche du pouvoir antimicrobien des bactéries lactiques. P 93.
 - **Boyle W., 1955.** Spices and essential oils as perspectives. *American Perfumer Essential Oil Review.*66: 25-28.
 - **Bruneton J., 1996.** Plantes toxiques : Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. Technique et documentation, Paris.
 - **Bruneton J., 1999a.** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Ed. (3). Techniques et documentation, Paris.
 - **Bruneton J., 1999b.** Pharmacognosie, phytochimie ,plantes médicinales.3éme Edition. *Tec & Doc (Ed) .Paris,p.575.*
 - **Bruneton J., 1999c.** *Plantes toxiques végétaux dangereux pour l'homme et les animaux.* 3eme edition, P: 290-303.
 - **Bruneton J., 2009.** *Pharmacognosie : Phytochimie : Plantes médicinales.* 4e éd. Paris : Tec & Doc, 1269 p.
 - **Brian M.L., 1995.** The isolation of aromatic materials from plant product, R.J. Reynolds Tobacco Company, Winston- Salem (USA), p.57-148.
 - **Buchbauer G., Jäger W., Jirovetz L., Ilmberger J., Dietrich H., 1993.** Therapeutic properties of essential oils and fragrances. In: *Bioactive Volatile Compounds from Plants*, (R Teramishu, R G Buttery and H Sugisawa, eds). ACS Symposium Series 525 Washington DC: American Chemical Society. 159-165.
 - **Burt S., 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - areview. *International Journal of Food Microbioly.* 94, 223-253.
- . C .
- **Castello G., 1999.** Retention index systems: alternatives to n-alkanes as calibration standards *journal of Chromatography A*, 842:51-64.

- **Cavallo J.D., Chardon H., Chidias C., Choutet P., Courvalin P., 2006.** Communiqué de la Comité Française de l'Antibiogramme. Société Française de Microbiologie. 2eme Ed. 65-145 P.
 - **Chaabi M., Freund-Michel V., Frossard N., Randriantsoa A., Andriantsitohaina R., Lobstein A., 2007.** Anti-proliferative effect of *Euphorbia stenoclada* in human airway smooth muscle cells in culture. *J. Ethnopharmacology*, 2007. 109 (1). P: 134-139.
 - **Chaussod R., Zuvia M., BREUIL M., HETIER J., 1992.** Biomasse microbienne et statut organique des sols tropicaux : exemple d'un sol vénézuélien des llanos sous différents systèmes de culture. *cahiers. Orstom pédologie*, 28, 1, 59-67.
 - **Claude et Lydia Bourguignon., 2008.** Le sol la terre et les champignons pour retrouver une agriculture saine. P68-83
 - **Colinon C., Deredjian A., Hien E., Brothier E., Bouziri L., Cournoyer B., Hartman A., Henry S., Jolivet C. & Ranjard L., 2013.** Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in soil and manure assessed by an ecfX qPCR assay. *Journal of applied microbiology*.
 - **Correia H., et al., 2006.** Polyphenolic profile characterization of *Agrimonia eupatoria* L. by HPLC with different detection devices. *Biomedical chromatography*. 20: p. 88-94.
 - **Curtis T., Sloan W. and Scannell J., 2002.** Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99: 10494-10499.
- . D .**
- **Degryse A., Delpla I., Voinier M., 2008.** Risque et bénéfices possibles des huiles essentielles. Ingénieure du Génie Sanitaire, atelier santé environnement.
 - **De Lima S., Medeiros L., Cunha C., Silva D., Da D., Neto J., Moita L., Steffen R., Araújo B. & Reis F.A.M., 2012.** Chemical composition of essential oils of *Croton hirtus* L'Her from Piauí (Brazil) *Journal of Essential Oil Research*. 24 (4) : 371.
 - **De Maack F., Sablier M., 1994.** Couplage chromatographiques avec la spectrométrie de masse. Dossier: P2614. vol papier n°:TA3 Bases documentaires Techniques d'analyse.
 - **De Nazaré D., Sebastião F., Palmeira J., Conserva L. and Lyra Lemos R., 2005.** Quinoline alkaloids from *Sebastiania corniculata* (Euphorbiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 33 (5): 555-558.

- **Desjobert J., Bianchini A., Tommy P., Costa J. et Bernardini A., 1997.** Etude d'huiles essentielles par couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse. Application à la valorisation des plantes de la flore Corse. *Analysis*, 25 (6): 13-16.
 - **Dias G., Porto C., Stuker C., Graessler V., Burrow R., Dacol I., da Silva U., Morel A., 2007.** Alcaloids from *Melochia chamaedrys*. *Planta Med.* 73, 289-292.
- . E .
- **EFSA., 2011.** The European Union summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks 2009. *EFSA Journal* 9.
 - **Ekpo O.E., Pretorius E., 2007.** Asthma, *Euphorbia hirta* and its anti-inflammatory properties. *S. Afr. J. Sci.* 103(5/6), 201-203.
- . F .
- **Fabian D., Sabol M., Domaracké K., Bujnéková D., 2006.** Essential oils - their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicol. in vitro* 20,1435-1445.
 - **Fardoux J., Fernandes P., Niane-Badiane A., Chotte J., 2000.** Effet du séchage d'échantillons d'un sol ferrugineux tropical sur la détermination de la biomasse microbienne comparaison de deux méthodes biocidales de référence. étude et gestion des sols, 7, 4, 2000:385-394.
 - **Ferhat M., kadi I. et lahouaou. 2009.** recherche de substances bioactives de l'espèce *centaurea microcarpa* Con et Dus. Le Diplôme des études supérieures en biologie (DES). Université Mohamed Boudiaf –M'sila. Faculté des sciences et des sciences de l'ingénieur. Département de biologie.
 - **France-Ida J., 1998.** Comment s'assurer de la pureté d'une huile essentielle? *Info – essences.* 7 : 1-2.
 - **France-Ida J., 1996.** Bref survol de diverses méthodes d'extraction d'huiles essentielles. *Info-essence.* 3 : 5-6.
 - **Freitag N., Port G. & Miner M., 2009.** *Listeria monocytogenes* - from saprophyte to intracellular pathogen. *Nature Reviews Microbiology* 7, 623-628.
 - **Fredrickson JK., Zachara JM., Balkwill DL., et al., 2004.** Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the Hanford site, Washington State. *Appl environ microbial.* 70: 4230-4241.

. G .

- **Garcia-Ruiz A., Bartolomé B., Martinez-Rodriguez A.J., Pueyo E., Martin-Alvarez P., and Moreno-Arribas M., 2008.** Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*. 19:835_841.
- **Garnero J., 1996.** Huiles essentielles. Dossier : K345. Base documentaire: Constantes physico-chimiques. vol. papier n°: K2.
- **Garnier F., Denis F., 2007.** Bactériologie médical : Techniques usuelles : Cocci à Gram positif. Masson. Chapitre 29. 251,254.
- **GONZELEZ-TRUJANO M E. et al., 2007.** Evaluation of antinociceptive effect of *Romarin officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J theopharmacol.* 111:476-482.
- **Goulet V., Leclercq A., Laurent É., King L., Chenal-Francisque V., Vaillant V., Letort M.- J., Lecuit, M. & de Valk H., 2012.** Surveillance de la listériose humaine en France, 1999-2011. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation no 50 / Spécial Risques alimentaires Microbiologiques.*
- **Granum P., 2005.** *Bacillus cereus*. In *Foodborne pathogens: microbiology and molecular biology*. Edited by P. M. Fratamico, A. K. Bhunia & S. J. L.
- **Guignard J., 2000.** Biochimie végétale. 2ème Ed. De l'abrégé Dunod, Paris, pp.177-185.

. H .

- **Haba H., 2008.** Etude phytochimique de deux Euphorbiaceae sahariennes : *Euphorbia guyoniana* Boiss. et Reut. et *Euphorbia retusa* Forsk. Thèse de doctorat. Université de Batna. 305p.
- **Haba H., 2008.** Etude phytochimique de deux Euphorbiaceae sahariennes *Euphorbia guyoniana* Boiss. et Reut. et *Euphorbia retusa* Forsk., Thèse de doctorat. Université El Hadj Lakhdar Batna, 2008. 287 pages.
- **Hammer K., Carson C. and Riley T V., 1999.** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts *Journal of Applied Microbiology*. 86: 985–990.
- **HAMOUDI R., 2008.** Contribution à la mise en évidence de principes actifs de plantes *Teurium polium geryrii* provenant de la région Tamanrasset. Magister. Université Kasdi Merbah Ouargla, P. 15-43.
- **Hernandez T., Canales M., Avila J., Duran A., Caballero J., Romo De Vivar A. and Lira R., 2003.** Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán De Las Salinas (Mexico); *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 88 (2): 181-188.

- **Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J. and Williams, S., 1994.** Genus *Pseudomonas*. In: Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T.; Williams, S.T. (Eds) Bergey's manual of determinative bacteriology, Williams and Wilkins, pp. 93-94.
 - **Horner-Devine M., Leibold M., Smith V. and Bohannon B., 2003.** Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecol. Lett.* 6: 613-622.
 - **Huang Guangrong., Jiang Jiabin and Dai Dehui., 2008.** Antioxidative and antibacterial activity of the methanol extract of *Artemisia anomala* S. Moore. *African Journal of Biotechnol.* 7 (9): 1335-1338.
 - **Hunsa P., Chulabhorn M., Ruchirawat S., Prawat U., Tuntiwachwuttikul P., Tooptakong U., Taylor W. C., Pakawatchai C., Brian W., Skelton and Allen H., 1995.** White Cyanogenic and non-cyanogenic glycosides from *Manihot esculenta*. *Phytochemistry*, vol. 40 (4): 1167-1173.
 - **Hwang E., Ahn B., Lee H., Kim Y., Lee K., Bok S., Kim Y., Kim S., 2001.** Inhibitory activity for chitin synthase II from *Saccharomyces cerevisiae* by tannins and related compounds. *Planta Med.* 67, 501-504.
- . I .
- **Ionut-Florin P., 2016.** Valorisation des Activités biologiques de certaines espèces végétales sahariennes Nord-africaines. Thèse de doctorat. Université de bordeaux. 152p.
- . J .
- **Jacques B., André R. 2004.** Biochimie métabolique Ed ellipses. Paris. Pp : 217-219-220-223-225.
 - **Jourdan-Da Silva N. & Le Hello S., 2010.** Salmonelloses en France, 2002-2010 : tendances en épidémiologie humaine, émergence de la souche monophasique, principaux aliments impliqués dans les dernières épidémies. In *Bulletin épidémiologique - santé animale-alimentation*, pp. 31-35.
 - **Julien P., 2005.** Caractérisation des huiles essentielles par CPG/IR, CPG/SM- (IE et IC) et RMN DU CARBONE-13 de *cistus albidus* et de deux *asteracea* endémiques de corse : *eupatorium cannabinum* subsp. *Corsicum* et *doronicum corsicum*- docteur de l'Université de Corse-.
 - **Jürgen R., Paul S., Ulrike S., and Reinhard S., 2009.** Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties— an Overview: *Forsch Komplementmed.* 16: 79–90.

. K .

- **Kalemba D., Kunicka A., 2003.** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10: 813-829.
- **Karousou R., Koureas D., Kokkini S., 2005.** Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Saturejathymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Photochemistry*, 66: 2668-2673.
- **Kemassi A., 2014.** Toxicité comparée des extraits d'*Euphorbia guyoniana* (Stapf.) (Euphobiaceae), *Cleome arabica* L. (Capparidaceae) récoltés de la région de Ghardaia(Sahara septentrional) sur les larves du cinquieme stade et les adultes de *Schistocerca gregaria* (Forskal, 1775) (Orthoptera-Cyrtacanthacridinae). These de doctorat en sciences biologique. Univ. KASDI merbah, OUARGLA, Algeria, 230p.
- **Kempf S., Zeitouni., 2009.** Cout biologique de la résistance aux antibiotiques, analyse et conséquences pathologie biologie: article in press.
- **Kerharo J., J. méd. Phar. Dakar., 1974** Guichard, F. and Bouquet, A., *Les végétaux Ichtyotoxiques (Poisons de pêche)*. P: 355-387.
- **Kiem P., Thua V., Yen P., Nhien N., Tung N., Cuong N., Minh C., Huong H., Hyun J., Kang H., Kim Y., 2009.** New triterpenoid saponins from *Glochidion eriocarpum* and their cytotoxic activity. *Chem. Pharm. Bull.* 57, 102-105.
- **Kouamé-Bi K., 2012.** Valorisation de quatre plantes médicinales Ivoiriennes : étude phytochimique. Thèse de doctorat, chimie organique, Université de Nantes et de l'Université de Cocody-Abidjan. 180 p.
- **Kumar S ET Tuteja U., 2009.** Detection of virulence-Associated Genes in Clinical Isolates of *Bacillus anthracis* by Multiplex PCR and DNA Probes. *J Microbiol Biotechnol.* 19:1475-1481.

. L .

- **Lagunez-Rivera L., 2006.** Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- **Lamarti A., Badoc A., Deffieux G., Carde J., 1994.** Biogénèse des monoterpènes I-localisation et sécrétion. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 133 :69-78
- **Laouer H., 2004.** Inventaire de la flore médicinale utilisée dans les régions de Sétif, de Bejaia, de Msila et de Djelfa, composition et activité antimicrobienne des huiles

essentielles d'*Ammoides pusilla* et de *Magydaris pastinacea*. Thèse de Doctorat d'état, Département de Biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif.

- **Leake J., Johnson D., Donnelly D., Muckle G., Boddy L., Read D., 2004.** Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Can. J. Bot.* 82: 1016-1045.
- **Li F., Awale S., Tezuka Y., Kadota S., 2008.** Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure- activity relationship. *Bioorganic & Medicinal chemistry* 16: 5434 - 5440.
- **Liu K., Lin M., Lee S., Chiou J., Ren S., Lien E., 1999.** Antiviral tannins from two *Phyllanthus* species. *Planta Med.* 65, 43-46.
- **Liu Y., Murakami N., Ji H., Abreu P., Zhang S., 2007.** Antimalarial flavonoglycosides from *Euphorbia hirta*. *Pharm. Biol.* 45, 278-281.
- **Longaga A., Vercruyse A., Foriers A., 2000.** Contribution to the ethnobotanical, phytochemical and pharmacological studies of traditionally used medicinal plants in the treatment of dysentery and diarrhea in Lomola area, Democratic Republic of Congo. *J. Ethnopharmacol*, 71 : 411-423.
- **Luque de Castro M., Jiménez C., Fernández P., 1999.** Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. *Trends in Analytical Chemistry*, 18 (11): 708-716.

. M .

- **Marchal N., Bourdon J., Richard CL. 1991.** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3 ème Ed. , Doin éditeurs, Paris.
- **Marie E., Faride C., and Jacqueline S., 2004.** Flavour And Fragrance Journal *Flavour Fragr. J.*; 19: 134-138. MEYER, WARNOD.
- **Marie E., 2005.** Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles : p 17 ; 23,52.
- **Matias E., Santos K., Costa J., Coutinho H., 2010.** Light-enhanced antibiotic activity of Brazilian medical plants (*Croton campestris*, *Ocimum gratissimum* and *Cordia verbenaceae* DC). *Asian Biomed*, 1 :183–186.
- **Mavar M., Brick D., Marie D., Quetin-Leclercq J., 2004.** In vivo anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) (Euphorbiaceae) ; *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 92 (2-3): 209-214.

- **Mazoir N., Benharref A., Bailén M., Reina M., and González-Coloma A., 2008.** Bioactive triterpene derivatives from latex of two *Euphorbia* species. *Phytochemistry*, vol. 69, 1328–1338.
- **Mead P., Slutsker L., Dietz V., McCaig L., Bresee J., Shapiro C., Griffin P., Tauxe R., 1999.** Food-related illness and death in the United States. *Emerging infectious diseases* 5, 607-625.
- **Mishara A., Dubey N., 1994,** Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(4):1101-1105.
- **Mohammedi Z., 2006.** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de Magistère, Département de biologie, Faculté des sciences, UABB de Tlemcen.
- **Moreira M., Ponce A., Del Valle C., Roura S., 2005.** Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT- Food Science and Technology*, 38(5): 565-570.

. N .

- **Nicolas V., 1991.** Huiles essentielles: Production mondiale, échanges internationaux et évaluation des prix. 10^{ième} journée internationale des huiles essentielles. Actes, Ravista italiana Eppos ; numéro spécial 02/1992 : 534-539.

. O .

- **Ohno T., Kita M., Yamaoka Y., Imamura S., Yamamoto T., Mitsufuji S., Kodama T., Kashima K., Imanishi J., 2003.** Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 8 (3): 207-215.
- **Oren A., 2004.** Prokaryote diversity and taxonomy: current status and future challenges. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 359 : 623-638.
- **Oussou K., 2009.** Etude chimique et activités biologiques des huiles essentielles de sept plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. Thèse de Doctorat. Université de Cocody-Abidjan, 241p.
- **Ozenda P., 1991.** *Flore et végétation du Sahara. 3ème édition.* CNRS Paris.

. P .

- **Paré J., 1997.** Procédé assisté par micro-ondes. Info-essences, Bulletin sur les huiles essentielles, 4 :p.4.
- **Paris M., Hurabielle M., 1981.** Abrégé de matière médicale (pharmacognosie) Tome 1. Ed. Masson p.339.

- **Paris R., Nothis A., 1978.** plantes médicinales, phytothérapie. Ed. Masson, Paris.
- **Pauli, A., 2001.** Antimicrobial properties of essential oil constituents. *Int J.Aromather.* 11, 126-133.
- **Pavida D., Lampman G., Kriz., 1976.** Introduction to organic laboratory Techniques. WB. Saudres CO. Philadelphia. USA. 567-573.
- **Pereira S et al., 2006.** antimicrobial activity of *indigofera suffruticosa*.
- **Pibiri M., 2006.** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse Doctorat, EPFL Lausanne, p.161.
- **Place N., Veziris A., Aubry W., Sougakoff C., Truffot-Pernot V., Jarlier., 2004.** Des outils moléculaires dans le diagnostic, Le traitement et L'épidémiologie des infections à Mycobactéries *Med Trop*; 64 : 243-250.
- **Prescott L., Harley J., Klein D., 1995.** Microbiologie. De Boeck ed p 1014.
- **Purchon N., 2001.** La bible de l'aromathérapie. Edition Marabout.

. Q .

- **Quezel P., Santa S., 1963.** Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. In : CNRS (Ed.), Vol. 1-2. Paris.

. R .

- **Rahal S., 2004.** Chimie des produits naturels et des êtres vivants. O.P.U. Edition. p.162.
- **Ramdani M., Rached O., Laouer H., El Kolli M., Lograda T., 2007.** Chemical composition and antimicrobial activity of *Cupressus dupreziana* A. Camus. *Natural Product Communication.* 2 (9): 945-949.
- **Robert G., 2000.** Les Sens du Parfum. Osman Eroylls Multimedia. Paris. 224 p.
- **Rodrigues F., Costa J., Coutinho H., 2009.** Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*. *Phytomedicine*, 16:1052–1055.
- **Rossi D., Bruni R., Biachi N., Chiarabelli C., Gambari R., Medici A., Lista A., Paganetto G., 2003.** Evaluation of mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of *Croton lechleri* (Muell. Arg.) latex. *Phytomed.* 10, 139-144.
- **Roux R., 2008.** conseil en aromathérapie. 2eme edition, pro-officia. P. 187. Their main components upon *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia.* 128. P. 151-153.
- **Russo M., Galletti G., Bocchini P., Carnacini A., 1998.** Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link): a preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 3741-3746.

. S .

- **Scallan E., Hoekstra R., Angulo F., Tauxe R., Widdowson M., Roy S., Jones J., Griffin P., 2011.** Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. *Emerging infectious diseases* 17, 7.
- **Scheffer J., 1996.** Various methods for the isolation of essential oils. *Phytother. Res.*, 10:S6-S7.
- **Sell C., 2006.** The Chemistry of Fragrance. From Perfumer to Consumer. 2nd edition. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. 329 p.
- **Seokwon kim et al., 2006.** Antibacterial and antifungal activity of sulfur-containing compounds from *petiveria alliacea l.*
- **Sidney G., De Lima ., Antônia M. Citó., José A., Lopes José M., Neto Mariana H., Chaves Edilberto R., Silveira., 2010.** Fixed and volatile constituents of genus croton plants: *C. adenocalyx*. *Revista Latinoamericana de Química*. 3: 133-144.
- **Sindic C., 2002.** *Neuro-infectiologie*: Wolters Kluwer France.
- **Singla AK., Pathak k., 1990.** Phytoconstituents of *Euphorbia* species. *Fitoterapia*; 6: 483-516
- **Smith, L., 1978.** The occurrence of *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani* in the soil of the United States. *Health laboratory science* 15, 74.
- **Smith, L., 1979.** *Clostridium botulinum*: Characteristics and occurrence. *Review of Infectious Diseases* 1, 637-641.
- **Solbi S., 2013.** Effet du repiquage de *Pseudomonas aeruginosa* sur les caractères morphologiques, biochimiques et sensibilité aux antibiotiques. Thèse de doctorat.
- **Spichiger R., 2004.** Botanique systématique des plantes à fleurs. Ed. Presses polytechniques et universitaires. Romandes.
- **Spichiger R., Savolainen V., Figeat M., 2000,** *Botanique systématique des plantes à fleurs*. Ed. Presse polytechniques et universitaires Romandes, Lausanne.
- **Suarez A., Blanco Z., Delle Monache F., Compagnone R., Arvelo F., 2004.** Three new glutarimide alkaloids from *Croton cuneatus*. *Nat. Prod. Res.* 18, 421-426.
- **Surk K., Nielsen P., 2003.** Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal Applied Microbiology*; 99: 665-674.
- **Svoboda K., Hampson J., 1999.** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities.

- **Sylvie Verbois., 2001.** Huiles Essentielles et Parfums qui Guérissent et qui Relaxent, La Voie De l'Ayurveda, Ed. Trajectoire.

. T .

- **Tchamdjak M., 1995.** Etude de performance d'un extracteur artisanal pour la production d'essence de citronnelle. Mémoire d'ingénieur des travaux biologiques, ESTBA, UB, 95 p.4.
- **Thiago S., João B., Fabíola F., Adriana R., José G., 2013.** Chemical composition, antibacterial and antibiotic modulatory effect of Croton. *Industrial Crops and Products*, 44 : 630– 633.
- **Ticknor L., Kolsto A., Hill K., Keim P., Laker M., Tonks M., Jackson P., 2001.** Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of Norwegian *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* soil isolates. *Applied and environmental microbiology* 67, 4863-4873.
- **Tona L., Kambu K., Ngimbi N., Cimanga K. et Vlietinck A.J., 1998.** Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *J. Ethnopharmacol*, 61 (1) : 57-65.
- **Tonzibo Z.F., 1998.** Contribution à l'étude des huiles essentielles des espèces acclimatées en Côte d'Ivoire. *Eucalyptus citrodora*, *Ocimum gratissimum* et *Ocimum basilicum*. Thèse de 3eme cycle, chimie organique, Université de Cocody-Abidjan, Côte d'Ivoire, 136 p.
- **Tripathi R and Tiwarik P., 1980-** Genticulatin, a triterpenoidsaponin from *Euphorbia geniculata*. *Phytochemistry*, Vol. 19 (10):2163-2166.

. U .

- **Ukwe C.V., 1997.** Antiulcer activity of aqueous stem bark extract of *Hymenocardia acida* TUL (Euphorbiaceae). *Int. J. Pharmacogn.* 35, 354-357.

. V .

- **Valnet J., 1984.** Aromathérapie. Traitement des maladies par les essences des plantes. Maloine S.A. éditeur. Paris p 544.
- **Vekiari S., Protopapadakis E., Papadopoulou P., Papanicolaou D., Panou C. & Vamvakias M., 2002.** Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a lemon variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5(1): 147-153.

- **Vieira et al., 2001.** microbiacidal effect of medicinal plant extracts upon bacteria isolates from fish muscle and known to induce diarrhea in children.

. W .

- **Webster G., 1987.** *The saga of the spurge: a review of classification and relationships in the Euphorbiales.* Botanical Journal of Linnean Society, P: 94, 3-44.
- **Wichtel M. et Anton R., 1999.** Plantes thérapeutiques: tradition, pratiques officinales, science et thérapeutiques. Ed. Tec et Doc.
- **Willem J., 2002.** Le guide des huiles essentielles pour vaincre vos problèmes de santé. Editions LMV.

. X .

- **Xu X., Stern A., Liu Z., Kan B ET Zhu J., 2010.** Virulence regulator AphB enhances toxR transcription in *Vibrio cholera*. BMC Microbiology. 10:3.

. Y .

- **Yang X., Wang J., Ma Y., Xiao H., Zuo Q., Lin H., He H., Li L., Hao X., 2007.** Bioactive Phenols from the leaves of *Baccaurea ramiflora*. *Planta Med.* 73, 1415-1417.
- **Yu F., Lian X., Guo H., McGuire P., Li R., Wang R., Yu F., 2005.** Isolation and characterization of methyl esters and derivatives from *Euphorbia kansui* (Euphorbiaceae) and their inhibitor effects on the human SGC-7901 cells. *J. Pharm. Sci.* 8,528-535.

. Z .

- **Zabeirou., 2005.** Étude comparative entre les Huiles essentielles de la Menthe Verte (*Mentha Spicata L*) et de la Poivree (*Mentha Piperita L*) dans la région d'Ouargla .Mémoire de DES Biochimie —Université de Kasdi Merbbah _Ouargla pl 6.
- **Zellagui A., Noamane S et al., 2012.** Phytochemical screening of five Algerian plants and the assessment of the antibacterial activity of two euphorbia guyoniana extracts, *Der Pharmacia Lettre*, 4(5): 1438-1444.

Annexes

Annexe 1 : appareillage et matériel utilisé au laboratoire

Equipements et appareils	Verreries et petits matériels
Agitateur magnétique	Anse de platine
Autoclave	Béchers
Balance de précision	Boîte de Pétri
Bain marie	Ciseau
Bec benzène	Disques d'antibiogramme vierges
Broyeur	Disques d'antibiotiques
Etuve	Entonnoirs
Hôte	Eprouvettes graduées
Hydrodistillateur	Erlenmeyer
Microscope optique	Flacon en verre
Plaque chauffante	Micropipettes
Réfrigérateur	Pipettes Pasteur
Spectrophotomètre	Pince
	Papier filtre
	Portoir
	Tubes à essai
	Tubes secs
	Spatule

Annexe 2 : réactifs et produits chimiques

Réactifs et produits chimique pour le screening phytochimique	Réactifs et produits chimiques pour l'identification bactérienne
Acide sulfurique : H_2SO_4	Fushine Basique Phéniquée
Acide chlorohydrique : HCL	Kovacs
Acétate de plomb : $C_4H_6O_4Pb$	Lugol
Acétate de sodium : $C_4H_6O_4Na$	RM Rouge de méthylène
Alcool éthylique :	Réactif 1 de voges proskauer VP 1
Alcool isoamylique : $C_5H_{12}O$	Réactif 2 de voges proskauer VP 2
Ammoniaque : NH_4OH	Violet De Gentiane
Coupeau de Mg	
Chlorure ferrique : $FeCl_3$	
Chloroforme : $CHCl_3$	
Ether : $C_4H_{10}O$	
Ether di-Ethylique : $C_4H_{10}O$	
Ether de pétrole : $CH_3-(CH_2)_n-CH_3$	
Hydroxyde de sodium : NaOH	
Hydroxyde de potassium : KOH	
Iode : I_2	
Propanol : C_3H_8O	
Réactif de Fehling	

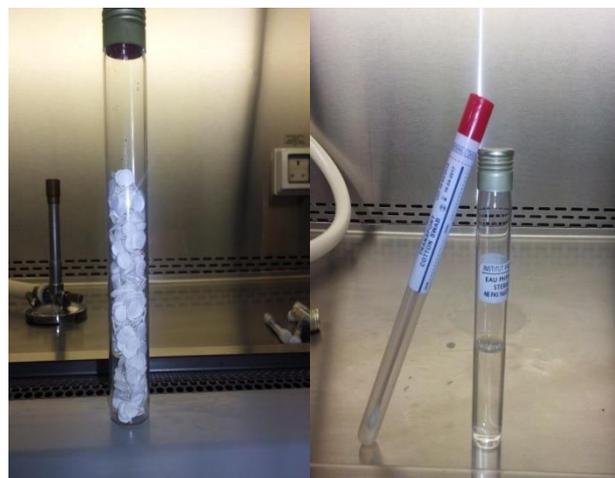
Annexe 3 : Spectrophotomètre



Annexe 4 : Disques d'antibiotiques



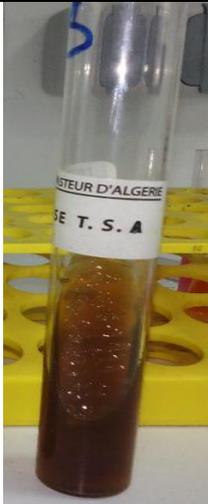
Annexe 5 : Disque stérile + Ecouvillon+ Eau Physiologique



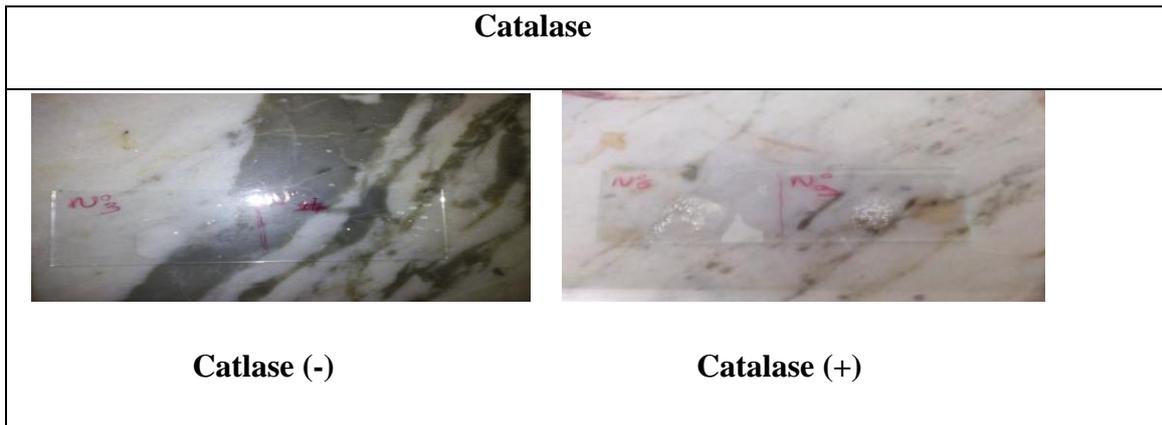
Annexe 6 : Suspension Bactériennes



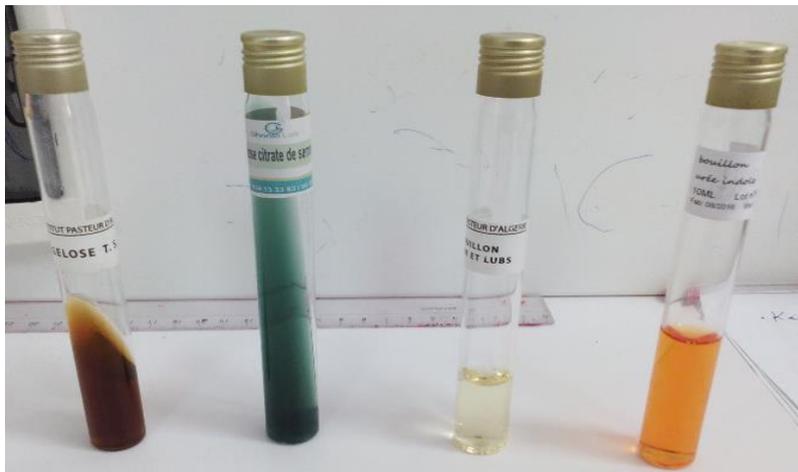
Annexe 7 : Galerie classique

Citrate		TSI	
			
Citrate (-)	Citrate (+)	Lac (-)	Lac (+)

RM	Esculine
 <p data-bbox="260 943 357 976">RM (-)</p> <p data-bbox="483 943 580 976">RM (+)</p>	 <p data-bbox="1018 936 1179 969">Esculine (+)</p>
VP	Coag
 <p data-bbox="268 1839 355 1872">VP (-)</p> <p data-bbox="496 1839 584 1872">VP (+)</p>	 <p data-bbox="858 1839 970 1872">Coag (-)</p> <p data-bbox="1066 1839 1177 1872">Coag (+)</p>



Annexe 8 : Milieux utilisés dans la galerie classique



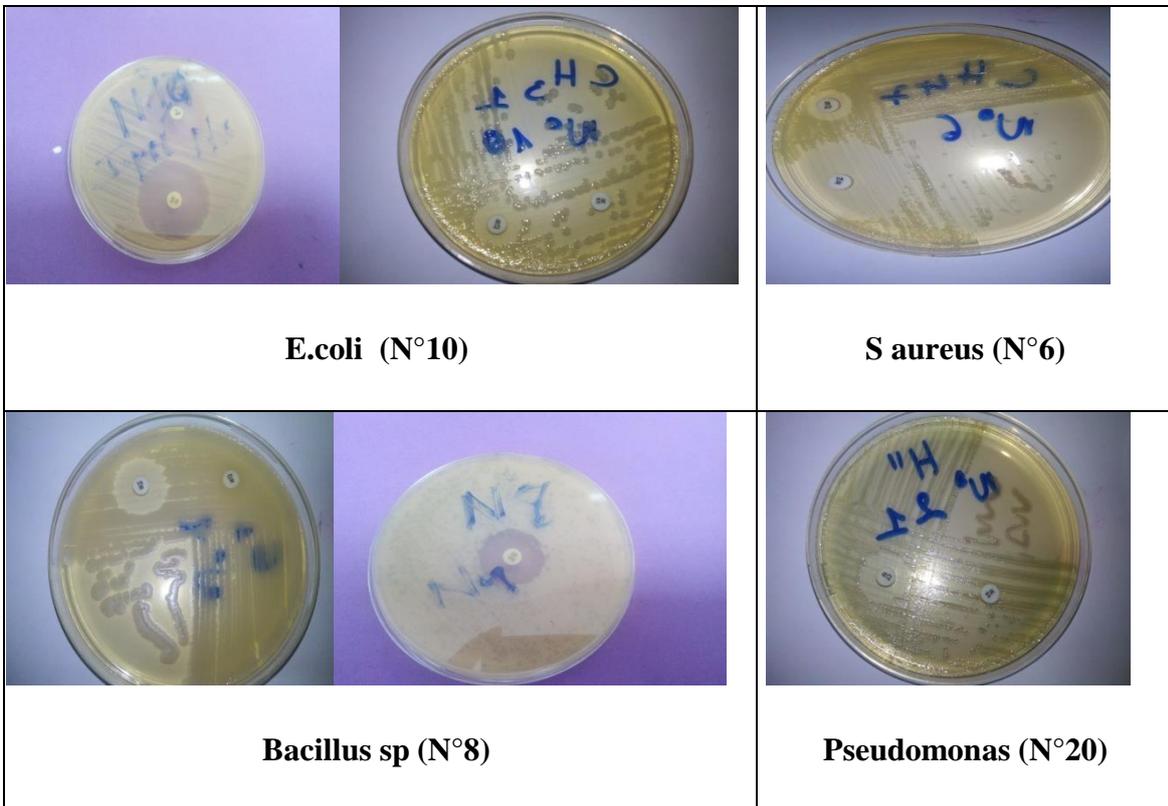
Annexe 9 : Réactif utilisés dans la galerie classique

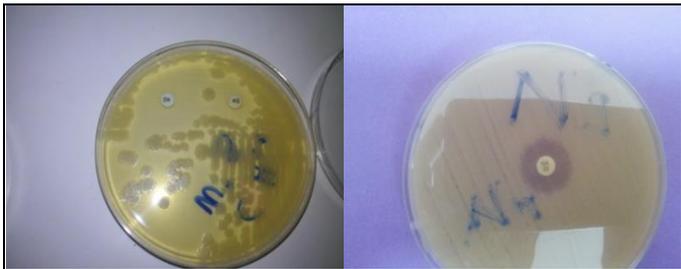


Annexe 10 : Réactif utilisés dans la coloration de Gram



Annexe 12 : Tests de sensibilité aux antibiotiques



 <p>Bacillus sp (N°9)</p>	 <p>Enterococcus sp (N°1)</p>
 <p>Enterococcus sp (N°3)</p>	 <p>SCN (N°15)</p>
 <p>SCN (N°17)</p>	 <p>SCN (N°19)</p>

Annexe 13: Fiches techniques des réactifs et solutions utilisés.

Fiche technique 1 : chlorure de fer anhydre à 5%
FeCl ₃10g.
L'eau distillée.....200g.
Fiche technique 2 : Hydroxyde de sodium à 20%
Hydroxyde de sodium.....20g.
Eau distillée.....100ml.
Fiche technique 3 : Hydroxyde de potassium à 10 %
Hydroxyde de potassium....10g.
Eau distillée.....100ml.
Fiche technique 5 : réactif de Drangendroff
Solution a : 0.85 g de nitrate de bismuth+ 40 ml d'eau distillée+ 10ml d'acide acétique.
Solution b : 8g d'iode de potassium+ 2 ml d'eau distillée.
On mélange a et b :
15 ml de mélange + 20 ml d'acide acétique puis compléter avec l'eau distillée.
Fiche technique 4 : réactif de stiansy
2 volume de formol.....50ml.
1 volume de HCl 1N....25ml.
Fiche technique 6 : Eau physiologique
Sodium chloride.....9g.
Eau distillée.....1000ml.

Annexe 14 : Composition des milieux de culture

Milieu de culture	Composition
<p align="center">Gélose nutritive</p>	<p>Hydrolysate trypsique de caséine2,5g Extrait de viande5g Glucose1g Extrait de la levure 2,5g Agar15g Eau distillé q.s.p 1000 ml pH=7±0.2 à 37°C (Bouadjaib Sarah, 2013)</p>
<p align="center">Gélose Mueller-Hinton</p>	<p>Infusion de viande de boeuf..... 300ml Peptone de caséine.....17.5g Amidon de mais.....1.5g Agar.....10.0g pH= 7.4 (Bouadjaib Sarah, 2013)</p>
<p align="center">Hektoen</p>	<p>Protease- peptone12,0g Extrait de levure.....3,0g Lactose.....12,0g Saccharose.....12, 0g Salicine.....2, 0g Citrate de fer III et d’ammonium1,5g Sels biliaire.....9,0g Fuschine acide.....0,1g Bleu de bromothymole.....0,065g Chlorure de sodium.....5,0g Thiosulfate de sodium.....5,0g Agar.....13,0g pH = 7.5 (Amara et Khaldi , 2015)</p>

Annexe 15 : Composition des milieux d'identification

milieux d'identification	Composition
TSI	Extrait de viande de bœuf3 g Extrait de levure 3 g Peptone20 g Chlorure de sodium 5 g Citrate ferrique 0,3 g Thiosulfate de sodium 0, 3 g Lactose10 g Glucose1 g Saccharose..... 10 g Rouge de phénol0,05 g Agar.....12 g Eau distillée q.s.p1000 ml pH=7,4 (Bouadjaib Sarah, 2013)
Clark et Lubs	Peptone tryptique ou poly peptone 5 – 7 g Glucose5 g Phosphate dipotassique5 g Eau distillée q.s.p1000 ml pH =7 (Bouadjaib Sarah, 2013)
Urée –Indole	L-tryptophane3 g KH ₂ PO ₄1 g K ₂ PO ₄1 g NaCl5 g Urée20 g Alcool à 95°10 ml Rouge de phénol à 1%2,5 ml Eau distillée q.s.p 1000 ml

Annexe Bibliographique

	(Bouadjaib Sarah, 2013)
Esculine	Polypeptone10g Extrait de levure 5g Acétate de sodium5g Tween 801 ml Mg SO40.05g Mn SO4 0.2 g Esculine5g Citrate de fer ammoniacal0.5 g pH = 6.5 (Bouadjaib Sarah, 2013)
Citrate de simmons	Chlorure de sodium.....5g Sulfate de magnésium7H ₂ O.....0.2g Phosphate di potassique PO ₄ H ₂2g Citrate trisodique.....2g Solution bleu de bromothymol 1%.....8ml Agar.....15g Eau distillé.....1000ml Ph = 7 (Bouadjaib Sarah, 2013)

Résumé

Les plantes médicinales offrent une source antibactérienne naturelle, dans ce contexte le présent travail repose essentiellement sur l'étude de l'effet des huiles essentielles d'une plante appartenant à la famille des Euphorbiaceae, très répandue au sud algérien et utilisée en médecine traditionnelle, sur des bactéries pathogène isolées de différents sols.

L'analyse phytochimique montre qu'*Euphorbia sp* est riche en saponosides, alcaloïdes, lipoïdes, glucosides et sucres réducteurs. L'extraction des huiles essentielles effectuées par hydrodistillation, nous a permis d'obtenir un rendement de 0.5 %.

vingt souches bactériennes ont été isolées à partir d'un sol d'une écurie et d'un sol de culture de pomme de terre, identifiées par des galeries biochimiques et classées en six genres : AH_8 , TN, AH_2 , E_4 , T_1 , CH_3 . L'activité antibactérienne a été déterminée sur ces bactéries selon la méthode de diffusion sur milieu solide. La sensibilité des bactéries à l'extrait est représentée selon l'ordre suivant : $AH_8 > CH_3 > AH_2 > TN > E_4 > T_1$.

Mots clés : plante médicinale, Euphorbiaceae, huiles essentielles, activité antibactérienne, bactéries pathogènes.

ملخص

تعتبر النباتات الطبية مصدرا طبيعيا مضادا للبكتيريا ، و في هذا الصدد يستند هذا العمل على دراسة تأثير الزيوت الأساسية الموجودة في النبتة التي تنتمي إلى عائلة *Euphorbiaceae*، الموجودة على نطاق واسع في جنوب الجزائر وتستخدم في الطب التقليدي، على البكتيريا المسببة للأمراض معزولة من أنواع مختلفة من التربة.

يظهر التحليل الكيميائي النباتي أن *Euphorbia sp* غني ب: saponoside ,alcaloïdes ,lipoïdes ,glucosides ,sucres réducteurs. استخراج الزيوت الأساسية عن طريق عملية التقطير بالبخار ، سمح لنا بالحصول على المرود الذي يقدر ب 0.5%.

تم عزل عشرين سلالة بكتيرية من تربة مزروعة بالبطاطا و تربة إسطلب و التي حددت عن طريق المعارض البيوكيميائية و رتبت إلى ستة أنواع: AH_8 , TN, AH_2 , E_4 , T_1 , CH_3 .

تم تحديد النشاط المضاد للبكتيريا على هذه البكتيريا وفقا لطريقة نشر القرص. و يمثل حساسية هذه البكتيريا في الترتيب التالي:

$AH_8 > CH_3 > AH_2 > TN > E_4 > T_1$.

كلمات البحث: النباتات الطبية، *Euphorbiaceae*، الزيوت الأساسية، بكتيريا ممرضة النشاط المضاد للبكتيريا.

Abstract

Medicinal plants offer a natural antibacterial source, in this context the present work relies essentially on the study of the effect of the essential oils of a plant belonging to the family Euphorbiaceae, very widespread in the south of Algeria and used in traditional medicine, on pathogenic bacteria isolated from different soils.

Phytochemical analysis shows that *Euphorbia sp* is rich in saponins, alkaloids, lipoids, glucosides and reducing sugars. The extraction of the essential oils carried out by hydrodistillation, allowed us to obtain a yield of 0.5%.

Twenty bacterial strains were isolated from soil in a stable and potato soil identified by biochemical galleries and classified into six genres: AH_8 , TN, AH_2 , E_4 , T_1 , CH_3 . The antibacterial activity was determined on these bacteria according to the diffusion method on solid medium. The sensitivity of the bacteria to the extract is shown in the following order: $AH_8 > CH_3 > AH_2 > TN > E_4 > T_1$.

Key words: medicinal plant, *Euphorbiaceae*, essential oils, antibacterial activity, pathogenic bacteria.