

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



Université Dr. Moulay Tahar de Saïda  
Faculté des Sciences  
Département De Biologie



Laboratoire de Biotoxicologie, Pharmacognosie et Valorisation  
biologique des Plantes

**MEMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME  
DE MASTER EN BIOLOGIE**

Option : **Microbiologie appliquée**

Présenté par :  
**M<sup>elle</sup>. KHETTAB Nour el- houda**  
**M<sup>elle</sup>. KNANJA Hadjira**

Sur le thème intitulé :

**Etude des propriétés cosméceutiques des  
extraits de la plante *Nerium oleander***

Soutenu publiquement le : **23 Juin 2020**

Devant le jury :

---

<b>M. ADLI Djallal Eddine Houari</b>	<b>Maître de conférences -A-</b>	<b>U T. M. de Saïda</b>	<b>Président</b>
<b>M. GHELLAI Lotfi</b>	<b>Maître de conférences -A-</b>	<b>U T. M. de Saïda</b>	<b>Examineur</b>
<b>M. HALLA Noureddine</b>	<b>Maître de conférences -B-</b>	<b>U T. M. de Saïda</b>	<b>Encadreur</b>

**Année universitaire : 2019/2020**



## *Remerciements*

*Avant toute chose, nous remercions Allah, le tout puissant, de nous avoir donné la force et la patience pour achever ce mémoire.*

*La première personne que nous tenons à remercier est **M. HALLA Noureddine**, d'avoir accepté de nous encadrer, tout en y gardant un œil critique et avisé. Merci pour votre rigueur scientifique et vos conseils toujours judicieux et aussi d'avoir eu la patience de corriger notre mémoire et de nous avoir responsabilisées du début jusqu'à la fin de notre travail.*

*Nous exprimerons toute notre gratitude à **M. ADLI Djalal Eddine Houari**, Maître de conférences classe A, à l'Université de Saida, pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury.*

*Nous remercions vivement **M. GHALLAI Lotfi**, Maître de conférences classe A, à l'Université de Saida, d'avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Nous remercions étroitement **M. ZERAGUI Bankkadour**, de nous avoir toujours aider et encouragée durant la réalisation de ce travail.*

*Je remercier tous les membres de l'équipe de laboratoires pédagogique au département de biologie à la faculté des sciences de l'université **Dr. Moulay Tahar de Saida**.*

*Sans oublier tous les enseignants du département de biologie à la faculté des sciences de l'université **Dr. Moulay Tahar de Saida**. Enfin, nos remerciements s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.*

## *Dédicace*

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut ..., tout les mots ne sauraient exprimer la gratitude .L' amour, Le respect, La reconnaissance .... , Aussi, c'est tout simplement que .....*

*Je dédie cette mémoire .....*

**Au meilleur des pères Mr. Khettab El hadj, **Ma très chère**  
**Mère Mme. Hamdi maghnia****

*Aucune dédicace, aucun mot, ne saurait exprimer réellement, mon profond amour, mon respect et ma reconnaissance pour tous les sacrifices que tu as prodigué pour ma formation et ma réussite.*

*Vous étiez toujours là quand j'avais besoin de vous et sans quoi, je ne serai arrivée à ce que je suis aujourd'hui.*

*Ce travail et le fruit des sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation le long de ces années.*

**A mes très cher frères et soeurs : Yacine, Anas, Assmaa, Douaa**  
**et Imane**

*Je vous souhaite une vie pleine de bonheur, de prospérité, de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protège, vous garde et éclaire votre chemin.*

**A ma Grand-Mère «Hadja Zahra», que Dieu lui prête bonne santé et**  
**longue vie.**

**A toute mes chères amies**

**A tous mes maitres de l'enseignement**

**Primaire, de l'enseignement secondaire, et de l'enseignement**  
**supérieur, En témoignage de mon affection et respect.**

*Nour el\_Houda*

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail à toute ma famille et mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.*

**Ma mère !** *Ton soutien et tes bénédictions m'ont toujours accompagné. Depuis mon enfance, tu t'es efforcée de m'inculquer les valeurs morales qui sont les tiennes. J'espère que je suis à la hauteur de tes attentes. Que Dieu te bénisse et te donne longue vie afin que tu bénéficies des fruits de l'arbre que tu as planté et entretenu. Je voudrais, à travers ce travail qui est l'aboutissement de ton dévouement constant et de tes nombreuses privations, te rendre un vibrant hommage et t'exprimer mes sentiments d'amour filial et de respect. Que Dieu te garde encore longtemps auprès de nous.*

*Aux personnes dont j'ai bien aimé la présence dans ce jour, à mes frères et ma sœurs ,a mes oncle , mes cousines paternelle Zahira ,Soumia,Nabila,Asma et ma copine ikram , je dédie ce travail dont le grand plaisir leurs revient en premier lieu pour leurs conseils, aides, et encouragements.*

*A mes amies, en particulier : Amina, Sihem, Asma, Nour el houda, Imen, Hadjira, avec les quelles j'ai partagé des moments inoubliables*

*Hadjira*

## Résumé

Les plantes médicinales ont toujours une place importante dans l'arsenal thérapeutique pour l'humanité. L'objectif de la présente étude était d'évaluer les propriétés cosméceutique et les activités biologiques des extraits de *Nerium oleander*, qui est une plante largement utilisée dans la médecine traditionnelle. Dans cette contribution nous sommes intéressés à déterminer la composition phytochimique de l'extrait hydrométhanolique de *Nerium oleander* et d'étudier leurs activités biologiques. Les activités biologiques consistent en une évaluation de l'activité antioxydante (capacité antioxydante totale et le de piégeage du radical DPPH), une évaluation de l'activité antimicrobienne.

Les résultats des tests phytochimiques ont montré que la plante *Nerium oleander* récoltée dans la région de sidi- maâmar et la forêt El-Okbane wilaya de Saida, avait une composition phytochimique comprise tanins, composés réducteurs, quinones, stérols et les triterpènes ... . Dans le même contexte, L'extrait de *Nerium oleander* préparé par la macération a fourni un rendement moyen de 15.47 % obtenus à partir d'une seule extraction.

Les activités biologiques étudiées consistent : une détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricide (CMB) ou fongicide (CMF) vis-à-vis 2 souches fongiques ainsi que 7 souches bactériennes de références. Les zones d'inhibition obtenues par la méthode des puits ont révélé que *Bacillus cereus* ATCC 11778 était la plus sensible vis-à-vis de l'extrait hydrométhanolique par un diamètre de 12,5 mm. Les valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI) enregistrées par l'extrait étudié varient de 125 mg/ml à 1000 mg/ml, En conclusion, les résultats ont montré justifiés l'importance des plantes médicinales dans la vertu thérapeutique.

**Mots clés :** Cosmétique, plante médicinale, *Nerium oleander*, extrait, Activités biologiques, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

## Abstract

Medicinal plants still have an important place in the therapeutic arsenal for humanity. The object of the present this study was to evaluate the cosmeceutic properties and the biological activity of *Nerium oleander* hydromethanolic extract, which is a plant widely used in the traditional medicine. In the contribution we are interested in determining the phytochemical composition and instructs of *Nerium oleander* and studying their biological activities. The biological activities consist of *Nerium oleander* an evaluation of the antioxidant activities (total antioxidant capacity and the trapping of the DPPH radical) and an evaluation of the antimicrobial activity.

The results of Phytochemical tests have shown that the plant *Nerium Oleander* harvested in the region of Sidi- Maâmar and El-Okbane wilaya Saida.

Had a Phytochemical composition included, tannins, reducing compounds, quinones, sterols and triterpènes. In the same context the extract of *Nerium oleander* prepared by maceration has provided an average yield of 15.47% obtained from a single extraction.

The biological activities studied consist of determining the minimum inhibitory (MIC) and bactericidal (CMB) concentrations or fungicide (CMF) against 2 fungal strains as well 7 reference bacterial strains. The zones f inhibition obtained by the well methods revealed that bacillus cereus ATCC 11778 was the most sensitive to hydromethanolic of 12.5 mm. the minimum inhibitory concentration values (MIC) recorded by the extracts studied really from 125mm/ml, in conclusion, the results showed justified the importance of medical plants in therapeutic virtue.

**Keywords:** cosmetic, medical plants, *Nerium oleander*, extract, biological activities, antimicrobial activities.

## ملخص

النباتات الطبية لا تزال تحتل مكانة في الترسنة العلاجية للبشرية. هدف الدراسة الحالية هو تقييم الخصائص التجميل الفعالة و النشاط البيولوجي للمستخلص الميثانو-مائي لأزهار *Nerium oleander* والتي تعتبر نبات مستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي، في هذه المساهمة نحن مهتمون بتحديد التركيب الكيميائي النباتي لمستخلص الدفلة وأنشطتها البيولوجية، النشاطات الحيوية المتوافقة مع مضادات الأكسدة (السعة المضادة للأكسدة الكلية و المضادة للجذور DPPH) و تقييم التأثير المضاد للمكروبيين.

أظهرت نتائج الفحوصات الكيميائية النباتية أن النبات تم جمعه من منطقة سيدي معمر وغابة العقبان لولاية سعيدة يحتوي على تركيبة كيميائية نباتية متضمنة التانينات، المركبات الرجعية، الكينونات، الستيروول و التاربان. و في نفس السياق، فإن المستخلص *Nerium oleander* الذي تم تحضيره بواسطة النقع قد قدم متوسط مردود يبلغ 15,47 و التي تم الحصول عليه من مستخلص واحد.

تتضمن الأنشطة البيولوجية التي تمت دراستها ما يلي: تحديد الحد الأدنى من تركيزات MIC و الجراثيم و مبيدات الفطريات ضد سلالتين فطريتين بالإضافة إلى سبعة سلالات بكتيرية مرجعية، حيث كشفت مناطق التنشيط التي تم الحصول عليها بواسطة طرق البئر أن *Bacillus cereus* هي الأكثر حساسية لمستخلص الميثانو-مائي بقطر 12,5 مم، الحد الأدنى لقيم التركيز المثبط MIC سجلت المستخلصات التي تمت دراستها حقا من 125 مجم/مل إلى 1000 مجم/مل، في الختام، أظهرت النتائج ما يبرر أهمية النباتات الطبية في الفصيلة العلاجية.

## كلمات مفتاحية :

مستحضرات تجميل، نباتات طبية، *Nerium oleander*، مستخلص، الأنشطة البيولوجية، أنشطة مضادات الأكسدة، أنشطة مضادات الميكروبات.

## Table Des Matières

<b>Remerciement.....</b>	<b>I</b>
<b>Dédicace.....</b>	<b>II</b>
<b>Résumé.....</b>	<b>IV</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>V</b>
<b>ملخص.....</b>	<b>VI</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>VII</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>IIIX</b>
<b>Liste d'abréviation .....</b>	<b>IX</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>01</b>
<b>Chapitre I : Généralités sur la cosmétique et sa conservation.....</b>	<b>04</b>
1. Définition et réglementation .....	<b>05</b>
2. Frontières entre cosmétique et médicament .....	<b>06</b>
3. Sécurité microbiologique des produits cosmétiques .....	<b>06</b>
4. La contamination microbienne des produits cosmétique .....	<b>07</b>
4.1. Origine de la contamination .....	<b>08</b>
4.2. Les germes contaminants .....	<b>08</b>
5. Les conservateurs antimicrobiens .....	<b>09</b>
5.1. Les différents types de conservateur en cosmétique .....	<b>10</b>
5.1.1. Conservateurs synthétiques .....	<b>10</b>
5.1.2. Conservateurs naturels .....	<b>12</b>
5.2. Les mécanismes d'action des conservateurs .....	<b>14</b>
<b>Chapitre II : Généralités sur les plantes médicinales et leur application en cosmétique.....</b>	<b>15</b>
1.Plante médicinale .....	<b>16</b>
2. La Phytothérapie .....	<b>16</b>
3. Phytocosmétologie.....	<b>17</b>
4. Principes actifs des plantes médicinales .....	<b>18</b>
5. Classification des métabolites secondaires chez les plantes médicinales .....	<b>19</b>
5.1. Phénols, polyphénols et tanins .....	<b>19</b>
5.2. Terpènes .....	<b>21</b>
5.3. Les Alcaloïdes.....	<b>22</b>
<b>Chapitre III: La plante étudiée (<i>Nerium oleander</i>).....</b>	<b>24</b>
1. Description botanique.....	<b>26</b>
2. Taxonomie.....	<b>26</b>
3. Noms communs.....	<b>27</b>
4. Constituants phytochimiques .....	<b>27</b>
5. Activité pharmacologique.....	<b>28</b>
5.1. Activité antibactérienne .....	<b>28</b>
5.2. Activité hépatoprotectrice et antioxydante .....	<b>28</b>
5.3. Activité anti-inflammatoire .....	<b>29</b>
5.4. <i>Nerium oleander</i> dans les cosmétiques.....	<b>29</b>
6. Toxicité .....	<b>29</b>
<b>Matériel et Méthodes.....</b>	<b>31</b>
1. Matériels.....	<b>32</b>
1.1. Matériel végétal .....	<b>32</b>
1.2. Microorganismes .....	<b>33</b>

2. Méthodes .....	34
2.1. Préparation de la matière végétale .....	34
2.2. Extraction à froid .....	35
2.3. Calcul de rendement .....	37
2.4. Screening phytochimique .....	37
2.4.1. Tanins.....	38
2.4.2. Quinones .....	38
2.4.3. Composés réducteurs .....	38
2.4.4. Saponines indice de mousse.....	38
2.4.5. Flavonoïdes .....	39
2.4.6. Anthocynes .....	39
2.4.7. Triterpene et stérols .....	39
2.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	39
2.5.1. Préparation de la solution mère de l'extrait.....	39
2.5.2. Préparation de l'inoculum .....	40
2.5.2.1. Préparation de pré-culture .....	40
2.5.2.2. Préparation de la suspension bactérienne .....	40
2.5.3. Essais antibactériens .....	40
2.5.3.1. Etude de la sensibilité des germes vis-à-vis l'extrait testé .....	40
2.5.3.2. Etude de la sensibilité des germes aux antibiotiques .....	41
2.5.3.3. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice(CMI).....	42
<b>Résultats et discussion.....</b>	<b>44</b>
1. Rendement de l'extrait .....	45
2. Screening phytochimique.....	45
3. Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion des puits ou des disques.....	46
3.1. Etude de la sensibilité des bactéries à l'extrait végétal .....	46
3.2. Etude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques .....	50
3.3. Comparaison de l'activité d'extraits à celle d'antibiotiques témoins.....	52
4. Evaluation des concentrations minimales inhibitrices (CMI) .....	53
<b>Conclusion.....</b>	<b>56</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>58</b>

## Liste des tableaux

<b>Le tableau 01 :</b> montre quelques exemples des produits cosmétiques contaminés par les microorganismes.....	<b>07</b>
<b>Tableau 02 :</b> Bactéries potentiellement pathogènes isolées à partir de préparations cosmétiques.....	<b>09</b>
<b>Tableau 03 :</b> Origine des conservateurs utilisés dans les principaux labels bio (Cohen <i>et al.</i> , 2009) .....	<b>13</b>
<b>Tableau 04 :</b> Squelettes structuraux des composés phénoliques et polyphénoliques (Selles, 2012).....	<b>20</b>
<b>Tableau 05:</b> Classification de <i>Nerium oleander</i> (Chaudhary et Prasad, 2014).....	<b>27</b>
<b>Tableau 06 :</b> Origine et caractéristique du matériel végétal.....	<b>33</b>
<b>Tableau 07 :</b> Différentes souches utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne et antifongique.....	<b>34</b>
<b>Tableau 08 :</b> Rendement massique d'extrait.....	<b>45</b>
<b>Tableau 09:</b> Groupes chimiques du macéré hydrométhanolique des fleurs de <i>Nerium oleander</i> .....	<b>46</b>
<b>Tableau 10:</b> Diamètres des zones d'inhibition obtenues par la méthode de diffusion des puits d'extrait de <i>Nerium oleander</i> vis-à-vis des souches microbiennes.....	<b>47</b>
<b>Tableau 11 :</b> Diamètres des zones d'inhibition obtenues par les antibiotiques standards témoins positifs vis-à-vis des souches microbiennes.....	<b>50</b>
<b>Tableau 12 :</b> Effet des dilutions du macéré hydrométhanolique sur la croissance bactérienne dans les puits des plaques de microtitration d'extrait.....	<b>54</b>
<b>Tableau 13 :</b> Concentrations Minimales Inhibitrices du macéré hydrométhanolique.....	<b>55</b>

## Listes des figures

<b>Figure 01</b> : Structures chimiques de certains conservateurs autorisés en Europe ( <b>Halla et al., 2018</b> ).....	<b>11</b>
<b>Figure 02</b> : Fréquence d'utilisation des conservateurs dans les produits cosmétiques en 2015 .....	<b>12</b>
<b>Figure 03</b> : squelettes structuraux de quelques terpènes.....	22
<b>Figure 04</b> : Structure chimique de la Pyridine ( <b>Ouahas, 1996</b> ).....	<b>23</b>
<b>Figure 05</b> : <i>Nerium oleander</i> .....	26
<b>Figure 06</b> :Structure de <i>l'oléandrine</i> .....	<b>30</b>
<b>Figure 07</b> : Carte géographique représente la zone de la récolte.....	32
<b>Figure 08</b> : Fleurs de la plante <i>Neriumoleander</i> après séchage.....	<b>35</b>
<b>Figure 09</b> : Fleurs de la plante <i>Neriumoleander</i> après broyage.....	35
<b>Figure 10</b> : Montage d'extraction utilisé pour l'extraction des fleurs du <i>Nerium oleander</i> .....	36
<b>Figure 11</b> :Montage de deuxième filtration utilisée 'sousvide' pour récupérer le filtrat de macération.....	36
<b>Figure 12</b> : Montage RotaVap utilisé pour l'évaporation des solvants de l'extrait hydromethanolique.....	37
<b>Figure 13</b> : Utilisation de la microplaque (la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide).....	43
<b>Figure 14</b> : Effet d'extrait de <i>Nerium oleander</i> vis-à-vis les souches bactériennes et les levures.....	48
<b>Figure 15</b> :Résultats de tests de diffusion des puits de différentes concertations d'extraits de <i>Nerium oleander</i> sur <i>Bacillus cereus</i> .....	49
<b>Figure 16</b> :Résultats de tests de diffusion des puits d'extraits de <i>Nerium oleander</i> sur les levures.....	49
<b>Figure 16</b> : Résultats de tests de diffusion des différents disques d'antibiotique sur les bactéries.....	51
<b>Figure 17</b> : Résultats de tests de diffusion des différents disques d'antibiotique sur les levures .....	<b>51</b>
<b>Figure 18</b> : Effet antimicrobien d'antibiotique Gentamicine et les déférentes concentrations .....	52

# ABRIVIATION

- Liste d'abréviations
- $\mu$ l : microlitre
- ATCC : American type culture collection
- C : Celsius
- CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
- DMSO : Diméthylsulfoxyde
- DPPH : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle
- h : heures
- km : kilomètre
- mg : Milligramme
- MH : Mueller Hinton
- min : minute ml : Millilitre
- UFC : Unité formant colonies
- Mm : méli mètre
- Ml : méli litre
- UV :ultra visible

# *Introduction*

La cosmétologie est indissociable de l'histoire des civilisations. De tout temps, hommes et femmes ont cherché à protéger, embellir et soigner leur apparence. Les plus anciens récipients de produits cosmétiques retrouvés à ce jour datent d'environ 7.000 ans. La demande en produits cosmétiques ne cesse de croître dans nos sociétés où le paraître et le bien-être ont une place prépondérante. L'offre des produits cosmétiques s'est donc développée de façon exponentielle depuis quelques années grâce notamment à la recherche scientifique et à la demande des consommateurs. L'innovation est la ligne de conduite des laboratoires qui vont toujours plus loin dans la recherche. Parallèlement à ces avancées techniques, des polémiques se sont développées concernant les substances chimiques présentes dans ces produits cosmétiques.

Aujourd'hui, les produits cosmétiques sont exposés facilement aux contaminations microbiennes. Dans le but de palier à ce phénomène qui pose un réel problème, ces produits sont supplémentés des conservateurs chimiques qui ont pour rôle principale l'inhibition de la croissance des microorganismes. Malheureusement, ces conservateurs sont à l'origine de phénomènes toxiques très sévères. Le réservoir végétal reprend toute sa valeur bien qu'il soit exploité depuis longtemps : on s'aperçoit qu'il est toujours capable d'apporter des solutions intéressantes aux problèmes modernes.

Les végétaux constituent depuis toujours une importante ressource naturelle pour les sociétés humaines. Ils servent à la fois pour l'alimentation et la confection d'autres biens de consommations nécessaires aux sociétés. Les plantes fournissent également de nombreux composés, tels que les arômes, les antioxydants, les huiles, les parfums, les cosmétiques et les molécules actives (médicaments). Ce sont des ressources renouvelables ; malheureusement certaines espèces sont en danger (**Sato et al., 2001**). Selon l'OMS, près de 80% des populations des pays en voie de développement de la région d'Afrique ont recours à la médecine traditionnelle (**OMS, 2000**).

Dans le cadre de nos travaux relatifs aux plantes aromatiques et médicinales, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de quelques activités biologiques des extraits de *Nerium oleander* récoltée à Saida.

Les principaux chapitres de la synthèse bibliographique sont :

- Le premier chapitre, nous étudierons les généralités sur la cosmétique et sa conservation
- Dans le deuxième chapitre, nous étudierons des généralités sur les plantes médicinales

- Le troisième chapitre est consacré à présenter une monographie sur la plante étudiée *Nerium oleander*.

Le matériel végétal a été récolté dans des zones différentes. Les fleurs de *Nerium oleander* ont été récoltées dans la région de sidi- maâmar et la forêt El-Okbane, à la wilaya de Saida. L'extrait hydrométhanolique est réalisé par la macération. Aussi, nous avons caractérisé cet extrait en composition chimique. Ensuite, nous avons évalué les activités biologiques suivantes :

- Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode

Des micro-dilutions sur milieu liquide et les concentrations minimales bactéricides (CMB) ou fongicide (CMF) vis-à-vis deux (2) souches fongiques ainsi que sept (7) souches bactériennes de références.

# *Chapitre I : Généralités sur la cosmétique et sa conservation*

## Chapitre I : Généralités sur la cosmétique et sa conservation

### 1. Définition et réglementation :

Le mot cosmétique vient du grec *kosméticos* de *kosmos*, qui veut dire la beauté, l'ordre, l'ornement, la parure et la belle apparence (Soulaymani-Bencheikh, 2011). Un mot qui, dans l'antiquité grecque, ne s'appliquait pas qu'au ciel, mais servait à évoquer la beauté de l'ordre d'une armée prête à la bataille, et qui pouvait donc impressionner l'ennemi (Anne-Marie, 2016). Selon la définition donnée par le Code de la Santé Publique, dans l'article L. 5131-1 : « On entend par produit cosmétique toute substance ou mélange destiné à être mis en contact avec les parties superficielles du corps humain (l'épiderme, les systèmes pileux et capillaire, les ongles, les lèvres et les organes génitaux externes) ou avec les dents et les muqueuses buccales, en vue, exclusivement ou principalement, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect, de les protéger, de les maintenir en bon état ou de corriger les odeurs corporelles» (Martini *et al.*, 2006).

Cette définition n'est pas nouvelle puisqu'elle a été établie à peu près sous cette forme lors de la rédaction de la loi française de 1975 imposant une réglementation des produits cosmétiques à la suite de la tragique affaire du talc Mohrange (Pochet *et al.*, 2006). 36 enfants décédés et 168 autres gravement intoxiqués, suite à une erreur de manipulation lors de la fabrication du produit (Belaoufi, 2016). Un an après, une Directive européenne relative aux produits cosmétiques munie d'annexes voyait le jour. Elle a donné lieu à de nombreuses interprétations : la phrase « destinée à être mise en contact avec les diverses parties superficielles du corps humain » était censée séparer distinctement le produit cosmétique de la définition du médicament (Pochet *et al.*, 2006).

La création de l'Union Européenne (UE) a nécessité l'élaboration et l'adoption de textes réglementaires au niveau européen avec pour objectif d'harmoniser les législations ; la réglementation des cosmétiques n'échappe pas à ce phénomène. Dès 1976 la réglementation sur les cosmétiques a été mise en place par la directive 76/768/Commission Européenne d'étiquetage (CEE1), inspirée du modèle français. Depuis, cette réglementation n'a cessé d'évoluer, de se complexifier, en se précisant au fil des amendements, pour en 2003 conduire à une impasse sur l'expérimentation animale qui a été résolue temporairement par la directive 2003/15/ Commission Européen (CE) (Directive 2003/15/CE JOCE L66 du 11/03/2003).

## 2. Frontières entre cosmétique et médicament :

Le cosmétique, dont la fonction première est de nettoyer et d'embellir, a été longtemps considéré sans activité thérapeutique curative (**Bernier, 2018**). Généralement, un produit cosmétique est utilisé dans le traitement direct de la surface externe du corps humain afin de remplir les quatre fonctions suivantes : (1) entretien en bon état ; (2) changement d'apparence ; (3) la protection ; et (4) correction de l'odeur corporelle (**Halla et al., 2018**).

La différenciation sera néanmoins toujours délicate, les critères de définition du médicament pouvant s'appuyer sur la présentation, la fonction, la composition, le vocabulaire employé. Selon les revendications, un produit pourrait donc être cosmétique ou médicament. Ainsi, un produit anti-acnéique est un médicament, l'acné étant une pathologie; la même formule considérée comme « régulatrice de la sécrétion sébacée » représenterait un produit cosmétique (**Belaoufi, 2016**).

## 3. Sécurité microbiologique des produits cosmétiques :

La sécurité microbiologique des produits cosmétiques a toujours été d'un intérêt particulier pour les industries car la détérioration microbienne peut entraîner une dégradation du produit ou, dans le cas d'agents pathogènes, un contact intime avec une peau cassée ou endommagée peut entraîner un danger pour la santé du consommateur et potentiellement propager une infection (**Lemini et al., 2003**). D'une manière générale, tous les produits, y compris les cosmétiques, contenant de l'eau et des composés organiques/inorganiques dans des conditions physicochimiques appropriées, sont exposés à une contamination microbienne. Cela justifie pourquoi ces produits nécessitent une protection efficace et adéquate contre la prolifération des micro-organismes (**Halla et al., 2018**). De nombreuses questions se sont posées concernant la sécurité des conservateurs traditionnels/chimiques. Les parabènes, les conservateurs les plus utilisés dans le monde, ont de faibles propriétés de type œstrogène (**Lemini et al., 2003**). En décembre 2005, la *Cosmetic Ingredient Review* a rouvert l'évaluation de l'innocuité des parabènes car un lien entre la présence de parabènes dans les tissus mammaires et le cancer du sein avait été suggéré (**Darber et al., 2004; Epstein, 2006**). Les principes de la technologie d'autoconservation sont: 1-Bonnes pratiques de fabrication (BPF) ; 2 -Emballage approprié ; 3- Forme d'émulsion ; 4- Activité ; 5-Contrôle du pH ; 6- Ingrédients antimicrobiens multifonctionnels (**Varvaresou et al., 2009**).

#### 4. La contamination microbienne des produits cosmétique :

Les industriels doivent contrôler la qualité microbiologique et la composition des produits cosmétiques qu'ils fabriquent. En conséquence ils sont amenés à vérifier la contamination des produits, ou l'absence de bactéries pathogènes, ou encore le taux de bactéries commensales. (Flavie, 2011). Le tableau 01 montre quelques exemples des produits cosmétiques contaminés par les microorganismes.

**Tableau 01 : Exemple des produits contaminés microbiologiquement (Edlira et al., 2016).**

Produit contaminé	Microorganismes	UFC/g	Pays d'origine
Beurre de karité	<i>P. aeruginosa, S. aureus, C. albicans</i>	1000	Allemagne
Kit de maquillage pour enfant	Micro-organisme aérobie mésophile	1300	Hong Kong
Produit éclaircissant pour la peau	Flore mésophile aérobie	1083	Espagne
Démaquillant	<i>Burkholderia cepacia</i>	Non précise	L'Autriche
Crème de massage	<i>S. aureus</i>	Non précise	L'Autriche
Lait démaquillant	Mésophile aérobie total (levure et moisissure)	430 000/820 000/6 000 000/7 500 000	Italie
Teinture capillaire naturelle	Micro-organisme aérobie mésophile	140 000/19 000/26 000	République Tchèque
Lotion pour la peau	<i>P. aeruginosa</i>	19000 000	Hongrie
Gel de massage	<i>Enterobacteriaceae</i>	5100 000	Thailan
Shampooing / gel douche	<i>E. cloaceae, C. freundii, P. putida, K. pneumonia</i>	1.100.000 / 19.000.000	Allemagne
Maquillage pour les yeux	Flore mésophile aérobie	5000	Pakistan

Les contaminations primaires peuvent être la conséquence des matières premières utilisées, des locaux, du matériel ou encore du personnel chargé de la fabrication. Les contaminations secondaires résultent quant à elles de l'utilisation du produit par le consommateur (Boukhaira, 2017).

Si les produits cosmétiques ne sont pas correctement conservés, la contamination microbienne peut entraîner des altérations dans la composition, l'odeur ou la couleur du produit (**Alvarez et al., 2008**). La majorité de ces produits ont un pH presque neutre. Bien que ces produits soient conservés efficacement, il existe des risques de contamination. Les résultats d'une telle contamination peuvent ne pas être bons pour la santé (**Saba et al., 2017**).

#### 4.1. Origine de la contamination :

La contamination microbiologique des produits cosmétiques peut se dérouler en deux étapes: soit lors de leur fabrication ou de leur remplissage, soit lors de l'utilisation du cosmétique par le consommateur (**Janetos et al., 2018 ; Lundov et al., 2008**).

Lors des étapes de production, les cosmétiques peuvent être contaminés par différentes sources : les matières premières (ingrédients actifs, eau, agents colorants), les emballages primaires (contenants), l'atmosphère des locaux de production, et le personnel. Lors de leur utilisation, ils sont soumis au contact de la salive, des mains, de l'eau et de l'air qui sont autant de sources potentielles de contamination microbienne (**Florence, 2018**).

La principale matière première concernée est l'eau, d'où l'attention particulière qui doit être apportée à sa production et à son contrôle. Sont également particulièrement à surveiller les matières premières d'origine biologique, mais aussi d'origine végétale (surtout les eaux florales, par exemple) et d'origine minérale (bentonites, etc.) (**Cohen et al., 2009**).

Il ya plusieurs catégories de matière première tel que Eau Acides, alcalis, sels ;Huiles, cires, paraffine Acides gras, alcool, esters Tensioactifs, émulsifiant Talc, argile Protéines, amidons, plantes, gomme et résine Humectants Couleur et pigments Conservateurs, antioxydants et agents chélateurs Parfums, huiles essentielles (**Abaas et al., 2013**).

#### 4.2. Les germes contaminants :

Les micro-organismes susceptibles de contaminer les produits cosmétiques sont donc ceux faisant partie de notre environnement au quotidien (**Prescott et al., 2003**). Des études ont montré que les micro-organismes les plus fréquemment trouvés dans les cosmétiques sont *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus cepacia*, *Staphylococcus aureus* *Escherichia coli*, *Candidat albicans*, *Enterobacter gergoviae* et *Salmonella marcescens*, mais aussi d'autres bactéries, champignons et levures (Tableau 02) (**SCCP, 2015**). Le micro-

organisme le plus fréquemment trouvé était le *Pseudomonas aeruginosa* pathogène (35,48%) (Edlira *et al.*, 2016).

**Tableau 02 : Bactéries potentiellement pathogènes isolées à partir de préparations cosmétiques (Abaas *et al.*, 2013)**

	Espèce bactérienne	Type respiratoire
<b>Bactéries Gram+/-</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Aéro anaérobies facultatives
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Anaérobies facultatives
	<i>Clostridium spp.</i>	Strictement anaérobies
<b>Bactéries Gram-/-</b>	<i>Serratia liquefaciens</i>	Anaérobies facultatives
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Aérobies stricts
	<i>Pseudomonas cecropia</i>	Aérobies stricts
	<i>Proteus vulgaris</i>	Aéro-anaérobies
	<i>Providencia stuartii</i>	Aéro-anaérobies
	<i>Morganella morganii</i>	Aéro-anaérobies facultatives
	<i>Klebsiella pneumonia</i>	Anaérobies facultatifs
	<i>Hafnia alvei</i>	Anaérobies
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Aérobies
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	Anaérobies facultatifs
<i>Citrobacter diversus</i>	Anaérobies facultatifs capable de respiration aérobie.	

## 5. Les conservateurs antimicrobiens :

Les conservateurs sont des produits chimiques antimicrobiens ajoutés aux cosmétiques pour les protéger contre les agressions microbiennes causées par les matières premières, la fabrication et l'utilisation par les consommateurs (Lemini *et al.*, 2003). La réglementation cosmétique ((CE) n°1223/2009) définit par « agents conservateurs les substances qui sont exclusivement ou principalement destinées à empêcher le développement de micro-organismes dans le produit cosmétique » (Neacsu *et al.*, 2013). Un conservateur est une substance d'origine naturelle ou synthétique destinée à inhiber le développement des micro-organismes. Cette inhibition doit être efficace sur un large spectre d'activité et devrait avoir une durée plus longue que le produit cosmétique lui-même, étant équivalente à la durée de conservation prévue plus le temps d'utilisation (Halla *et al.*, 2018). Le conservateur idéal doit

être incolore, inodore, hydrosoluble, non toxique, non allergène, efficace sur un large éventail de bactéries à des pH très différents (**Giménez et al., 2010**). Les conservateurs protègent les produits cosmétiques des contaminations apportées lors de la fabrication par :

- Les matières premières (l'eau, les principes actifs d'origine biologique, les colorants, le talc...);
- Les articles de conditionnement ;
- L'atmosphère des ateliers
- Le personnel

Ils ont aussi un rôle protecteur lors de l'utilisation par le consommateur qui pollue le produit au moment du prélèvement (**Martini et al., 2008**).

### 5.1. Les différents types de conservateur en cosmétique :

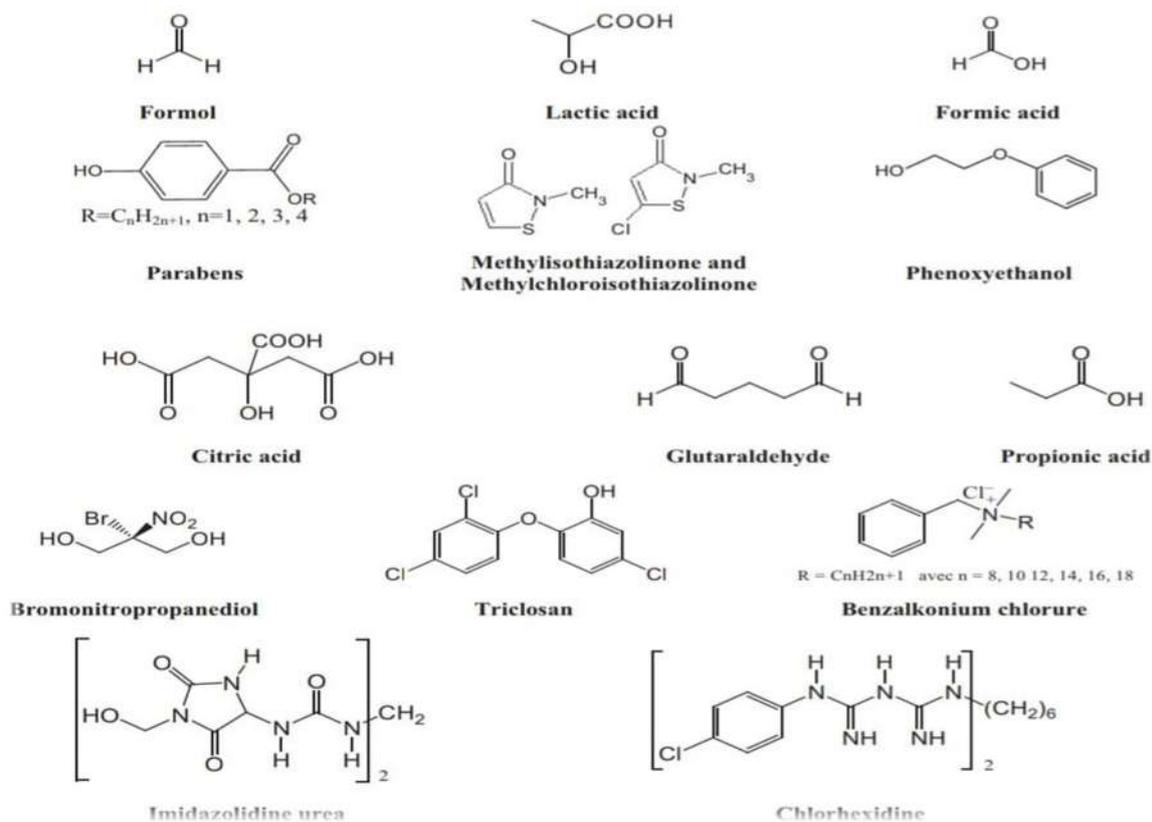
La conservation est l'un des sujets les plus difficiles de la cosmétique sont de telle sorte que la plupart des efforts dans la recherche sur la formulation sont consacrés à cet objectif. Deux grandes classes des conservateurs sont utilisés dans l'industrie des cosmétiques, il s'agit des conservateurs synthétiques et ceux naturels (**Dweck et al., 2001**).

#### 5.1.1. Conservateurs synthétiques :

En Europe, le règlement cosmétique (CE 1223/2009) a autorisé l'utilisation de 56 conservateurs synthétiques pour lutter contre la croissance des micro-organismes (**ERCPR 1223, 2009**). Les esters d'acide p-hydroxybenzoïque (parabens) (figure 01) sont les conservateurs les plus fréquemment utilisés, provoquant une irritation sensorielle de la peau en cosmétique (**Eunyoung et al., 2007**). Les parabènes sont une famille d'esters de l'acide parahydroxybenzoïque. Les plus courants à ce jour sont le méthylparabène (MP), l'éthylparabène (EP), le propylparabène (PP) et le butylparabène (BP) (**Edlira et al., 2016**). D'autres conservateurs synthétiques utilisés pendant des décennies tels que acide p-hydroxybenzoïque, phénoxyéthanol et imidazolidinylurée (**Audrey et al., 2016**).

Le phénoxyéthanol (PE), un conservateur à l'éther aromatique, est utilisé en cosmétique. Selon le schéma de classification du rapport Cosmetic Ingredient Review, le PE est pratiquement non toxique pour l'homme lorsqu'il est administré par voie orale ou percutanée. La chlorphénésine (CPN) est un puissant agent antibactérien et antifongique pour les dermatophytes courants, avec une faible toxicité. Le PE et le CPN sont utilisés avec d'autres

conservateurs tels que les parabens en raison d'activités antimicrobiennes relativement faibles (Eunyoung *et al.*, 2007).

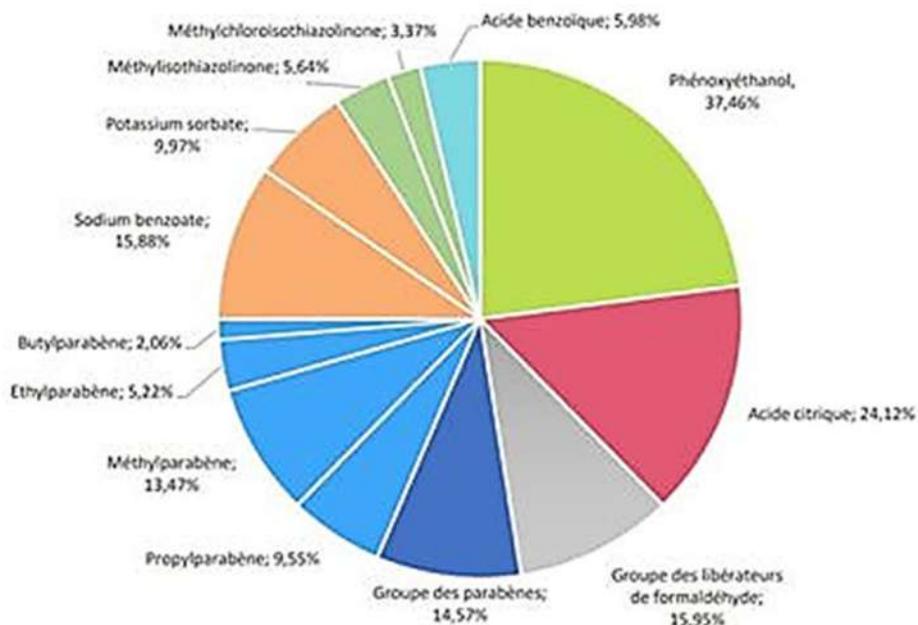


**Figure 01 :** Structures chimiques de certains conservateurs autorisés en Europe (Halla *et al.*, 2018)

Le choix du conservateur (ou mélange de conservateurs) utilisé pour protéger un produit cosmétique se fait selon les critères suivants (Figure 02) (Fourniat *et al.*, 2006):

- Spectre d'activité
- Compatibilité avec le procédé de fabrication,
- Solubilité dans l'eau pH de la formulation
- Coefficient de partage huile/eau
- Compatibilité avec les autres ingrédients
- Compatibilité avec les matériaux de conditionnement (Ibarra *et al.*, 2008;

Varvaresou *et al.*, 2010).



**Figure 02 :** Fréquence d'utilisation des conservateurs dans les produits cosmétiques en 2015 (Pastor-Nieto *et al.*, 2017)

### 5.1.2. Conservateurs naturels :

Parmi les extraits naturels possédant un potentiel antimicrobien, on peut distinguer les huiles essentielles et les extraits bruts de plantes (Fernandez *et al.* ;2012). Il existe un certain nombre d'huiles essentielles et d'extraits d'origine végétale qui possèdent d'excellentes activités antimicrobiennes et qui ont été utilisés seuls ou en combinaison avec des conservateurs chimiques pour la conservation des produits cosmétiques (Patrone *et al.*, 2010).

#### a. Les huiles essentielles :

Les mécanismes par lesquels les huiles essentielles exercent leur activité antibactérienne sont incomplètement compris, mais il y a un certain nombre de mécanismes proposés (Holley *et al.*, 2005). Leur utilisation comme agents de conservation est due à la présence de composés ayant de propriétés antimicrobiennes et antioxydantes (Kehal, 2013). Les huiles essentielles peuvent agir selon deux modes en fonction des microorganismes concernés et du type de molécules qu'elles contiennent. Elles peuvent soit inhiber la multiplication cellulaire microbienne et ainsi avoir un effet microbiostatique; soit entraîner la mort des microorganismes et ainsi avoir un effet microbicide (Liang *et al.*, 2011; Oyedemi *et al.*, 2009).

**b. Extraits bruts :**

Les extraits sont des mélanges complexes de composés, non aromatiques, isolés de diverses parties de la plante par extraction avec les solvants et les techniques appropriés (Vania *et al.*, 2009).

Les extraits naturels présentent une grande complexité chimique; leur composition chimique n'est souvent pas bien connue. Un certain nombre d'extraits végétaux ont été étudiés pour leurs propriétés antimicrobiennes et sont aujourd'hui présents sur le marché de la cosmétique, tels que l'extrait de pépins de pamplemousse ou l'extrait de lichen (Karagöz *et al.*, 2009; Bolzinger *et al.*, 2006).

**Tableau 03 : Origine des conservateurs utilisés dans les principaux labels bio (Cohen *et al.*, 2009)**

Agent conservateur	Exemple de présence dans la nature	Label qui autorise son utilisation
Acide benzoïque et ses sels	Retrouvés dans le benjoin	BDIH, Ecocert, Natrue
Acide formique et son sel de sodium	Retrouvés dans les orties et les aiguilles de sapin	Natrue, Ecocert
Acide propionique et ses sels	Transformation des hydrates de carbone en acide propionique par <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Bacillus subtilis</i> ou <i>Propionibacterium pentosaceum</i>	Natrue, Ecocert
Acide salicylique et ses sels	Retrouvés sous forme d'hétérosides dans la reine des prés	BDIH, Natrue, Ecocert, Nature et Progrès
Acide sorbique et ses sels	Retrouvés dans les graines du sorbier des oiseleurs	BDIH, Natrue, Ecocert
Alcool benzylique et ses sels	Retrouvés dans l'huile essentielle de fleurs de jasmin et d'Ylang Ylang	BDIH, Natrue, Ecocert

**5.2. Les mécanismes d'action des conservateurs :**

Les conservateurs antimicrobiens sont utilisés pour pallier toute contamination ou prolifération microbienne. Pour résister à ce problème, une large gamme de conservateurs est développée (NakiSiviri *et al.*, 2006).

Les conservateurs peuvent cibler les bactéries (antibactériens) et/ou les levures et moisissures (antifongiques). Ils peuvent avoir deux modes d'actions : soit ils éliminent les microorganismes de manière irréversible (bactéricides ou fongicides), soit ils inhibent la multiplication des micro-organismes sans les éliminer (bactériostatiques ou fongistatiques) (Cohen *et al.*, 2009).

En effet, les conservateurs peuvent agir en dénaturant les protéines situées au niveau de la paroi cellulaire bactérienne, sur les membranes, la synthèse des protéines ou encore en altérant les systèmes enzymatiques et en dénaturant les acides nucléiques pour modifier le système de reproduction des cellules eucaryotes (Mussard *et al.*, 2006).

Les conservateurs doivent protéger la formulation contre plusieurs bactéries, levures, moisissures et contre le stress oxydatif. Ils doivent être stables et actifs pendant la durée de conservation des cosmétiques et compatibles avec les autres ingrédients de la formulation (Amaral *et al.*, 2011).

Les conservateurs peuvent agir à différents niveaux du métabolisme ou de la structure du microorganisme. En revanche, on ne sait pas précisément comment fonctionne chacun des conservateurs utilisés, il est dans tous les cas nécessaires de réaliser des contrôles de l'efficacité de la protection antimicrobienne. Il existe plusieurs méthodes par exemple : les méthodes dites de surinfection ou de challenge-test permettent de contrôler in situ l'efficacité du système de conservation d'une préparation. Le principe général est identique : il consiste en la contamination du produit par un inoculum déterminé de micro-organismes tests et au suivi de l'évolution de la population viable dans le produit contaminé par dénombrement des germes revivifiables dans des échantillons prélevés à intervalles de temps donnés (Martini *et al.*, 2006).

***Chapitre II : Généralités sur  
les plantes médicinales et leur  
application en cosmétique***

**Chapitre II : Généralités sur les plantes médicinales et leur application en cosmétique**

**1. Plante médicinale :**

Les végétaux constituent depuis toujours une importante ressource naturelle pour les sociétés humaines. Ils servent à la fois pour l'alimentation et la confection d'autres biens de consommations nécessaires aux sociétés. Les plantes fournissent également de nombreux composés, tels que les arômes, les antioxydants, les huiles, les parfums, les cosmétiques et les molécules actives (médicaments). Ce sont des ressources renouvelables ; malheureusement certaines espèces sont en danger. Cela peut être dû à la destruction de leurs habitats naturels, mais aussi à une sur- exploitation des ressources en lien avec des difficultés techniques de cultures. L'ensemble de ces facteurs aggravants conduit à une réduction de la diversité végétale **(Sato et al., 2001)**.

Selon la définition de la Pharmacopée Française (11ème édition en vigueur) : «Les plantes Médicinales sont des drogues végétales au sens de la Pharmacopée Européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses» **(Hordé, 2014)**.

L'Algérie, grâce à sa situation géographique particulière, sa superficie étendue et son relief, bénéficie d'une gamme très variée de climats et de sols, favorisant le développement d'une flore riche et diversifiée. En effet, le territoire Algérien couvre d'importantes ressources végétales réparties sur les zones côtières, les massifs montagneux, les hauts plateaux, la steppe et les oasis sahariennes. Donc une source de matière médicale riche et abondante, représentée par 3000 espèces **(Cheriti et al., 2012)**.

Dans le monde, les plantes ont toujours été utilisées comme médicaments. Les médicaments à base de plantes sont considérés comme peu toxiques et doux par rapport aux médicaments pharmaceutiques **(Dibong et al., 2011)**. Après avoir combattu la médecine traditionnelle pendant longtemps, les médecins et organismes de santé reconnaissent désormais la valeur et l'efficacité des traitements par les plantes **(Jiofack et al., 2010)**.

**2. La Phytothérapie :**

La phytothérapie est un terme d'origine grecque « *phytotherapeuo* » ; « *phytos* » qui signifie plante et « *therapeuo* » qui signifie traiter ou soigner. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), la phytothérapie est le traitement médical le plus utilisé dans le monde **(Gazengel, 2013)**.

La phytothérapie est l'utilisation des plantes médicinales à des fins thérapeutiques. C'est une pratique aussi vieille que l'histoire de l'humanité puisque et depuis des millénaires, tous les peuples ont élaboré des recettes selon leur intelligence, leur génie, leur conception culturelle de la santé, de la maladie et les rapports qu'ils entretenaient avec leur environnement (**Leslie, 2004**).

Les produits naturels présentent un grand intérêt comme matière première destinée aux différents secteurs d'activité tels que : la cosmétique, la pharmacie, l'agroalimentaire, le phytosanitaire et l'industrie. Ainsi, l'utilisation des remèdes à base de plantes connaît dernièrement un engouement sans précédent. De plus en plus de gens sont à la recherche de médicaments "naturels" et il semblerait même que les cosmétiques et les produits d'entretien à base de plantes soient aujourd'hui de plus en plus utilisés. Selon l'OMS, près de 80% des populations des pays en voie de développement de la région d'Afrique ont recours à la médecine traditionnelle (**OMS, 2000**).

### **3. Phytocosmétologie:**

La nature, qui a abondamment pourvu le règne animal de plumages, de pelages, de cris, de chants, et d'odeurs spéciales en vue de la séduction, n'a rien procuré de ce genre aux humains. Aussi ont-ils cherché depuis les temps les plus reculés à se rendre plus brillants, plus attirants, en changeant la couleur de leur teint, en rendant leurs lèvres plus colorées, leurs yeux plus lumineux, leur odeur plus agréable. Puis, ce qui est aussi particulier à race humaine, elle s'est appliquée par tous les moyens à retarder l'apparition des signes inexorables de vieillesse. Les fards, les masques de beauté, les parfums existent depuis la plus haute antiquité ; ce sont les plantes qui ont fourni les ancêtres de nos poudres, de teintures et de pommades, nom que portaient dans le passé les crèmes de beauté, dont le premier support fut la pulpe de pomme, crue ou cuite (**Reader's Digest, 1986**).

Les produits que nous proposent les industriels de la beauté ont presque tous perdu leur support végétal. Les détergents des shampooings, les antiseptiques sont chimiques, les essences et les colorants sont le plus souvent synthétiques. Ils sont devenus des maux courants les éruptions, l'eczéma, les photosensibilisations, ainsi que l'intolérance aux teintures, d'où la recommandation obligatoire d'un essai préalable sur une mèche de cheveux. Même les savons et leurs parfums artificiels provoqués des dermatoses. Il est évidemment difficile de prendre la décision de se passer de ces produits, qui sont d'un emploi quotidien, dont la conservation est

facile et qui ne moisissent, ni ne rancissent, ni ne fermentent, alors que les produits à base de plantes fabriqués à la maison doivent être conservés au réfrigérateur, utilisés rapidement, jetés au moindre soupçon d'altération. Il faut savoir que les déodorants, les teintures, les anti-transpirants, les dentifrices, les shampooings, les masques de beauté, les lotions toniques, les démaquillants peuvent être naturels (**Reader'sDigest, 1986**).

**Exemple sur l'utilisation des plantes médicinales dans cosmétique : Les crèmes et pommades :**

Les pommades sont des préparations de consistance semi-solide permettant une pénétration percutanée de principes actifs. Elles sont réalisées à l'aide d'un excipient à phase unique c'est-à-dire soit hydrophobe soit hydrophile, contrairement aux crèmes qui sont multi phases Parmi les excipients utilisés nous pouvons citer : cires, huiles végétales, glycérine, hydrolat ou encore alcool. Sont ajoutés des principes actifs qui sont dissous ou dispersés en leur sein. On peut y mélanger entre autres des huiles essentielles, des teinture-mère, des extraits fluides ou des plantes fraîches. Il conviendra de conseiller au patient de bien appliquer la crème en massage ce qui permettra une action en profondeur des principes actifs (**Charrié et al., 2017**).

**4. Principes actifs des plantes médicinales :**

Les plantes biosynthétisent une gamme très vaste de composés organiques qui sont traditionnellement considérés comme métabolites primaires et secondaires, bien que les limites précisées entre les deux groupes peuvent, dans certains cas, être un peu ambiguës (**Crozier et al., 2006**).

Les métabolites primaires sont des produits issus directement des photoassimilats (sucres simples, acides aminés, protéines, acides nucléiques et organiques), qui participent à la structure de la cellule végétale ainsi qu'à son fonctionnement de base (**Hopkins, 2003**). Par opposition, les métabolites secondaires (MII) ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais sont synthétisés à partir des métabolites primaires et résultent de réactions chimiques ultérieures (**Croteau et al., 2000 ; Raven et al., 2000**).

Ces molécules bioactives sont produites à différents endroits de la cellule dans des parties spécifiques de la plante en fonction du stade de développement. De façon générale, le rôle du métabolite secondaire est en lien avec sa localisation au sein de la plante (**Zobel et Brown, 1990**).

Les métabolites primaires sont les composés qui ont des rôles essentiels liés à la photosynthèse, la respiration et la croissance et le développement. Il s'agit notamment des phytostérols, des lipides acyles, des nucléotides, des acides aminés et les acides organiques. Les autres composés phytochimiques, dont beaucoup s'accumulent en concentrations étonnamment élevées chez certaines espèces, sont considérés comme des métabolites secondaires. Ceux-ci ont des structures diverses et nombreuses et sont repartis entre un nombre très limité d'espèces dans le règne végétal (**Wink, 2010**).

Bien ignoré pendant longtemps, leur fonction dans les plantes attire de plus en plus l'attention car certains métabolites semblent avoir un rôle clé dans la protection des plantes contre les herbivores et les infections microbiennes, comme attractifs pour les pollinisateurs (**Croteau et al., 2000**).

Les métabolites secondaires sont également d'un intérêt en raison de leur utilisation comme colorants, fibres, colles, huiles, cires, agents aromatisants, des médicaments et des parfums, et ils sont considérés comme des sources potentielles de nouveaux médicaments naturels, des antibiotiques, insecticides et les herbicides (**Dewick, 2002**).

## **5. Classification des métabolites secondaires chez les plantes médicinales :**

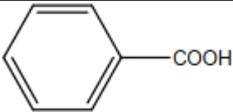
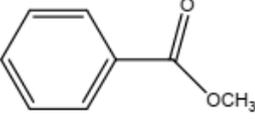
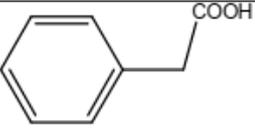
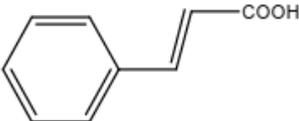
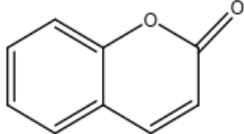
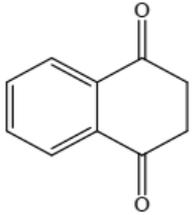
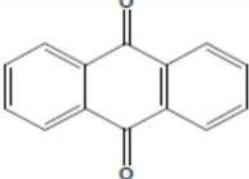
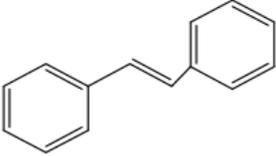
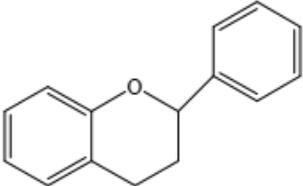
Chez les végétaux, ces composés secondaires regroupent des dizaines de milliers de molécules différentes classées en familles chimiques telles que les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes etc... (**Elkholli, 2016**).

### **5.1. Phénols, polyphénols et tanins :**

Les composés phénoliques sont caractérisés par au moins un cycle aromatique avec un ou plusieurs groupes hydroxyles attachés. Plus de 8000 structures phénoliques ont été rapportées et ils sont largement dispersés dans le règne végétal (**Strack, 1997**). Le tableau 04 figure quelques exemples des polyphénols.

Les composés phénoliques vont du simple, de faible poids moléculaire, à un seul cycle aromatique jusqu'aux tanins volumineux et complexes et les dérivés polyphénoliques. Ils peuvent être classés en fonction du nombre et de l'arrangement de leurs atomes de carbone et on les trouve couramment conjugués à des sucres et des acides organiques. Les composés phénoliques peuvent être classés en deux groupes : les flavonoïdes et les non flavonoïdes (**Monica et al., 2010**).

**Tableau 04 :** Squelettes structuraux des composés phénoliques et polyphénoliques (Selles, 2012).

Nombre de carbones	Squelette	Classification	Exemple	Structure de base
7	C6-C1	Acides phénoliques	Acide gallique	
8	C6-C2	Acétophénonnes	Gallacétophénone	
8	C6-C2	Acide phénylacétique	Acide p-hydroxyphénylacétique	
9	C6-C3	Acides Hydroxycinnamiques	Acide p-coumarique	
9	C6-C3	Coumarines	Esculetin	
10	C6-C4	Naphthoquinones	Juglone	
13	C6-C1-C6	Xanthones	Mangiferin	
14	C6-C2-C6	Stilbènes	Résveratol	
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes	Naringénine	

Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques comportant quinze atomes de carbone, avec deux cycles aromatiques reliés par un pont à trois carbones. Les flavonoïdes sont responsables de la couleur variée des fleurs et des fruits, sont présents en concentrations élevées dans l'épiderme des feuilles et représentent une source importante d'antioxydants dans notre alimentation (**Monicaet al., 2010**). Ils forment une sous-classe des polyphénols. Il y en a plus de 6000 à avoir été décrits chez les plantes (**Bruneton, 2009**).

C'est la famille des composés phénoliques la plus nombreuse. Chez les plantes, les flavonoïdes jouent un rôle dans la protection de la plante contre les Ultra-violets et de défense contre les pathogènes et les insectes ravageurs. Elles sont aussi impliquées dans la pigmentation, la stimulation de fixation de l'azote et la résistance aux maladies (**Pierpoint, 2000**).

## **5.2. Terpènes :**

Les terpènes, ou isoprenoïdes, ou terpénoïdes sont l'une des classes les plus diverses de métabolites secondaires. Il a été répertorié plus de 30 000 composés dont la très grande majorité est spécifique du règne végétal et qui englobe les arômes et parfums, les antibiotiques, les hormones végétales et animales, les lipides des membranes... (**Buckingham, 2004**).

Les terpènes sont des constituants habituels des cellules végétales, impliqués ou non dans des fonctions métaboliques essentielles. La plupart des terpènes ont des structures cycliques. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbone ( $C_5H_8$ ) (figure 03). Les divers squelettes terpéniques sont classés par le nombre de chaînons isopréniques qui les composent :

\_ Monoterpènes  $C_{10}$

\_ Sesquiterpènes  $C_{15}$

\_ Diterpènes  $C_{20}$

\_ Triterpènes  $C_{30}$

Ainsi, les monoterpènes sont constitués par 10 atomes de carbone ou deux unités isopréniques. Ils sont volatils, entraînés à la vapeur d'eau, d'odeur souvent agréable et représentent la majorité des constituants des huiles essentielles (Lamarti *et al.*, 1994).

Sur le plan économique et santé humaine, l'importance des terpènes des plantes ne cesse de croître (Sangwan *et al.*, 2001). La culture du matériel végétal spécifiquement pour sa teneur en terpènes est maintenant une activité économique majeure. D'autre part, un nombre croissant de terpènes ont une activité antibactérienne et des propriétés anticancéreuses. La toxicité des monoterpènes et des caroténoïdes notamment est relativement faible et leur biodisponibilité dans le régime alimentaire est élevée, ce qui rend ces composés intéressants comme agents thérapeutiques potentiels (Croteau *et al.*, 1999).

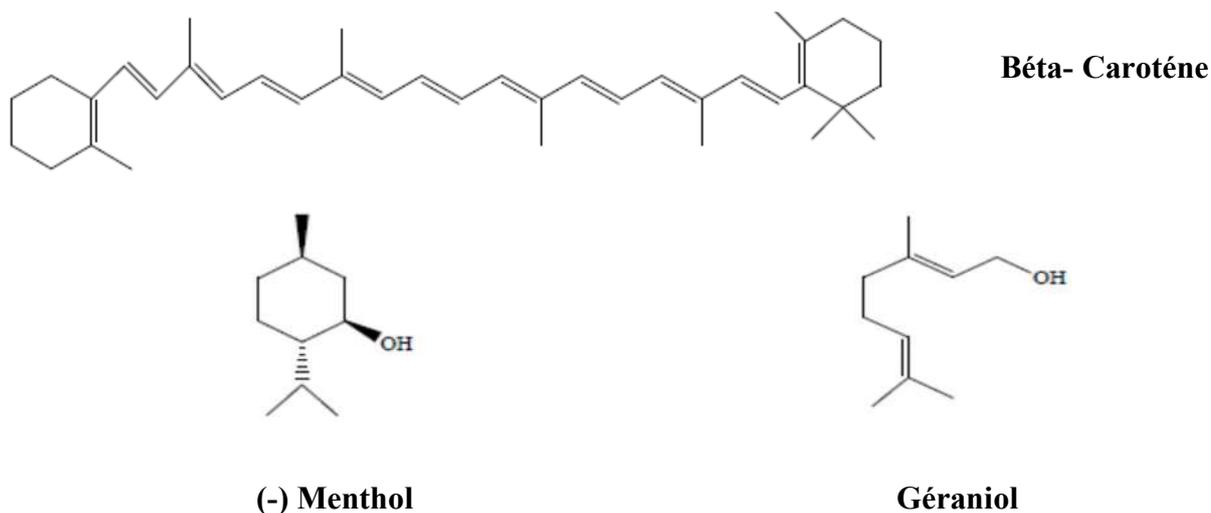
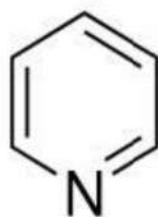


Figure 03 : squelettes structuraux de quelques terpènes.

### 5.3. Les Alcaloïdes :

Ils sont des composés azotés complexes généralement d'un effet physiologique puissant (exemple : Pyridine, figure 04). Ce sont pour la plupart des poisons végétaux très actifs, dotés d'une action spécifique. Les alcaloïdes sont des hétérocycliques à caractère alcalin contenus essentiellement dans les plantes (Gazengel et Orecchioni, 2013).

Ils possèdent une activité pharmacologique et thérapeutique significative notamment au niveau de système nerveux central, système nerveux autonome et du système cardiovasculaire, jouent un rôle écologique de défense contre des herbivores (Khenaka, 2011).



Pyridine

---

**Figure 04 :** Structure chimique de la Pyridine (Ouahas, 1996)

***Chapitre III : La plante  
étudiée (Nerium oleander)***

**La plante étudiée : *Nerium oleander***

*Nerium oleander* est originaire d'Asie mineure, le Laurier rose est spontané dans tous les pays autour du bassin méditerranéen. Il est très commun dans toute l'Algérie, surtout au bord des oueds et des rocailles humides. Il s'adapte aux endroits secs (GIFA, 2009).

**1. Description botanique :**

*Nerium oleander* (figure 05) est un arbuste toxique à tiges nombreuses pouvant atteindre 5 m de haut. Les feuilles longuement lancéolées sont opposées, coriaces et persistantes. Leur face inférieure, à forte nervure principale, est vert pâle (GIFA, 2009). Les fleurs poussent en grappes à la fin de chaque branche ; ils sont blancs, roses à rouges, 2,5–5 cm de diamètre, avec une corolle frangée profondément à 5 lobes autour du tube central de la corolle (Chaudhary et Prasad, 2014). Elle fleurit du printemps à la fin de l'été (Bakkali *et al.*, 2010). Le fruit est une longue capsule étroite de 5–23 cm de long, qui se divise à maturité pour libérer de nombreuses graines duveteuses (Khare, 2004).



**Figure 05 :** *Nerium oleander* ([http://www.flowersinisrael.com/Neriumoleander\\_page.htm](http://www.flowersinisrael.com/Neriumoleander_page.htm))

**2. Taxonomie :**

*Nerium oleander* est la seule espèce actuellement classée dans le genre *Nerium* (Al- Obaidi, 2014). La classification est résumée dans le tableau 05.

Tableau 05 : Classification de *Nerium oleander* (Chaudhary et Prasad, 2014).

Règne	Plantae
Classe	Subphyllum –Angiospermes
Série	Eudicots
Ordre	Gentianales
Famille	Apocynaceae
Genre	<i>Nerium</i>
Espèce	<i>oleander</i>

### 3. Noms communs :

- ✓ **Arabe:** Deffla
- ✓ **Anglais:** Rose-bay, oleander
- ✓ **Français:** Laurier rose, Nérion, Oléandre
- ✓ **Kabyle :** Illili (Bayer *et al.*, 2005 ; Orecchio et Amorello, 2010).

### 4. Constituants phytochimiques :

Siddiqui *et al.* (2012) ont signalé un tri terpène pentacyclique, de l'acide oleandérocinolique, des glycosides flavonoïdes, de la quercétine-5-O- [ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl- (1  $\rightarrow$  6)] - du  $\beta$ -D-glucopyranoside et du kaempférol-5-O- [ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl- (1  $\rightarrow$  6)] -  $\beta$ D-glucopyranoside et un cardénolide, oléandigolide provenant des feuilles de *Nerium oleander* la croissance des activités inhibitrices et cytotoxiques de composés ont été étudiées contre MCF-7, des lignées cellulaires de cancer du sein humain en utilisant le dosage de la sulforhodamine B.

D'autre part, Sharma *et al.* (2012) ont enregistré deux nouveaux composés, l'heptacosane-3-ényl-5-hydroxyhexanoate et le 4- oxooctyl-2-hydroxyundécanoate provenant des tiges de *Nerium oleander*. L'extrait éthanolique des feuilles de *N. oleander* contiennent des glucides, des protéines, des acides aminés, des alcaloïdes et des glycosides cardiaques. Les flavonoïdes et les terpénoïdes étaient absents (Santhi *et al.*, 2011). En plus, Luay *et al.* (2011) ont

rapporté que les cardénolides monoglycosidiques de *Nerium oleander* possédant la structure 3 $\beta$ , 14 $\beta$ -dihydroxy-5 $\beta$ -card-20 (22) -enolidestructure avec ou sans groupe acétoxy en C-16 présentait activité anticancéreuse importante. Les résultats indiquent que les effets cytotoxiques sont induits par l'inhibition de la membrane plasmique liée à Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATPase.

Les études préliminaires ont signalé la présence d'alcaloïdes, de glycosides, de tanins et composés phénoliques pour l'extrait méthanolique de *N. indicum* (Chaudhary et Prasad, 2014), et aussi de la paraffine, de l'acide ursolique, de la vitamine C et une huile essentielle (Hakimi, 2004)

### 5. Activité pharmacologique :

Cette plante a des propriétés antimicrobiennes (EISawi *et al.*, 2010), antifongique (Siddiqui *et al.*, 2016), insecticides (Bagari *et al.*, 2013) et une activité antioxydant (Mohadjerani, 2012).

#### 5.1. Activité antibactérienne :

Les feuilles de *Nerium oleander* possèdent une activité antibactérienne dans des extraits sélectionnés de benzène et d'éthanol contre le micro-organisme Gram positif *Bacillus subtilis* mais une activité négligeable contre le micro-organisme Gram positif *E-coli*. Une étude comparative de l'activité antibactérienne des deux extraits avec l'antibiotique standard Ofloxacin a montré une zone d'inhibition relativement plus élevée pour l'extrait éthanolique que l'extrait benzénique, donc l'extrait éthanolique possède une activité antibactérienne potentielle par rapport à l'extrait benzénique contre *Bacillus subtilis* (Doijad *et al.*, 2013)

L'activité antibactérienne des extraits de plantes a été étudiée contre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* et *Streptococcus mutans*. Selon les résultats, l'extrait méthanolique était plus efficace que le chloroforme ou l'hexane (Chauhan *et al.*, 2013).

#### 5.2. Activité hépatoprotectrice et antioxydante :

*Nerium oleander* possède une activité hépatoprotectrice et antioxydant de l'extrait méthanolique de fleurs de *Nerium oleander* contre les lésions hépatiques induites par CC<sub>4</sub> chez le rat (Singhal et Gupta, 2012)

### 5.3. Activité anti-inflammatoire :

**Nurgun et al. (2003)** ont signalé une activité anti-inflammatoire et anti nociceptive in vivo à partir des extraits éthanoliques de fleurs séchées et fraîches de *N. oleander* contre le modèle d'œdème de la patte arrière induit par le carraghénane chez la souris sans induire de dommages gastriques.

### 5.4. *Nerium oleander* dans les cosmétiques :

La gamme de soins de la peau 'Nerium AD' pour le traitement anti-âge est connue pour ses propriétés antioxydants. Deux produits sont dans la gamme : crème de nuit Nerium AD et crème de jour Nerium AD. L'ingrédient principal est *Nerium oleander* dans ces préparations. Ces préparations sont utilisées pour le vieillissement et les dommages cutanés, l'hyperpigmentation, les ridules et les rides et la texture inégale de la peau (**Chaudhary et Prasad, 2014**).

Elle est aussi utilisée contre les caries dentaires et pour le nettoyage et l'assouplissement des pieds (peau) (**Meftah, 2003**). Le fruit est un remède pour les maladies de la peau. Les extraits du laurier rose possèdent une activité anti-inflammatoire prononcée et calment les douleurs du rhumatisme et de l'eczéma (**Erdemoglu et al., 2003**).

### 6. Toxicité :

Le laurier rose ou *Nerium oleander* est un petit arbuste connu par ses risques de toxicité systémique en cas de prise par voie orale à cause de la présence d'hétérosides cardiotoniques dont le principal est l'oléandrine (figure 06) (**Langford, 1996**). Les mécanismes responsables de la toxicité des cardénolides du laurier rose sont identiques à ceux des glucosides de la digitale classique agissant principalement sur l'inhibition de l'activité Na-K ATPase membranaire et par l'élévation du calcium intracellulaire (**Bakkali, 2010**). La toxicologie du laurier rose se rapproche donc de celle des digitaliques, tant pour la symptomatologie que pour la thérapeutique. Il en résulte des effets inotropes positifs de ces composés au niveau du cœur et une toxicité potentielle au niveau des cellules (**Charnot, 1945**).

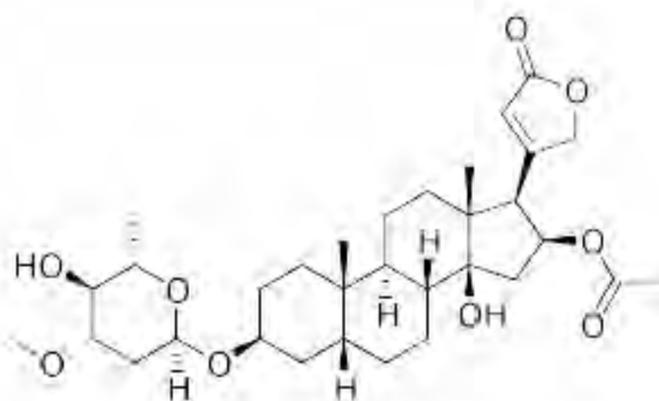


Figure 06 : Structure de l'oléandrine (Bruneton, 2005)

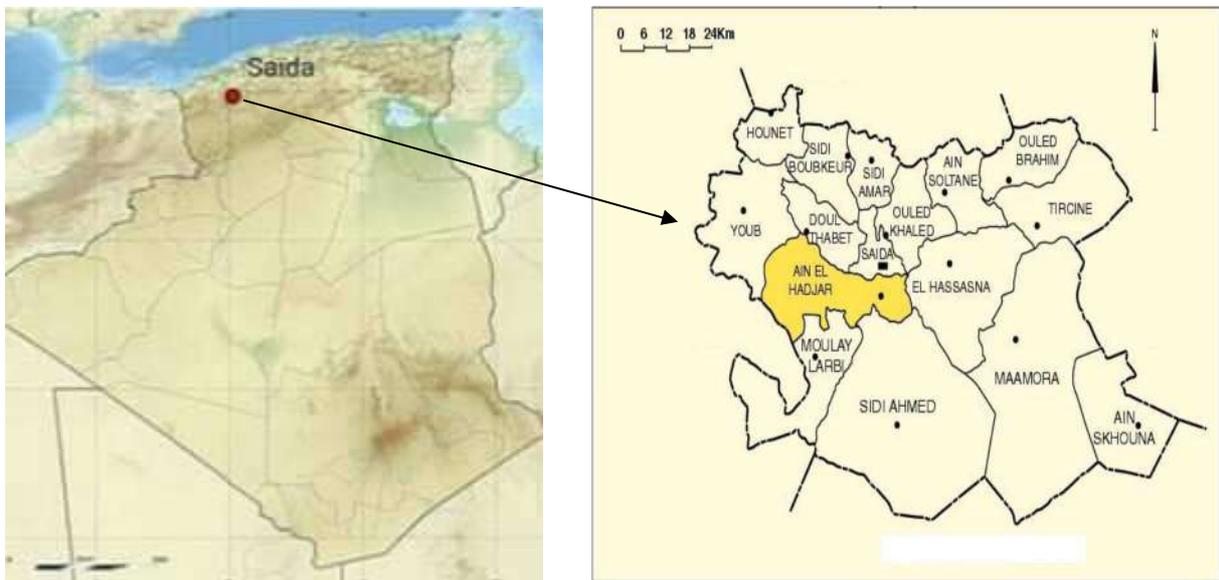
# *Matériel et Méthodes*

Ce travail a été effectué au laboratoire de Biotoxicologie, Pharmacognosie et Valorisation Biologiques des Plantes (LBPVBP) et le laboratoire pédagogique au département de biologie à la faculté des sciences de l'université Dr. Moulay Tahar de Saïda.

## 1. Matériels :

### 1.1. Matériel végétal :

Les fleurs de *Nerium oleander* ont été récoltées dans la région de Sidi-Maâmar à côté d'oued sidi Mamer située à 4Km du chef-lieu de la wilaya de Saïda et la forêt El-Okbane, située à la sortie sud de la ville de Saïda (Wilaya de Saïda) (Figure 07). La plante étudiée a été récoltée durant le mois de novembre de l'année 2019.



**Figure 07 :** Carte géographique représente la zone de la récolte

**Tableau 06 : Origine et caractéristique du matériel végétal**

<b>Lieu de récolte</b>	Saida (sidi maâmar /Forêt el -Okbane)
<b>L'origine de la plante</b>	Saida
<b>Durée de séchage</b>	Un mois
<b>Partie utilisée</b>	Aérienne
<b>Etat</b>	Sec
<b>Latitude</b>	34 .7587
<b>Longitude</b>	0.144367
<b>Altitude</b>	868 m Min .730m Max .1230m Moyenne 980m
<b>Coordonnées géographiques</b>	34°45'31Nord, 0°8'40' Est
<b>Climat</b>	Climat semi –aride sec et froid (classificaton de köppen : BSK)

### **1.2. Microorganismes :**

Sept bactéries et deux levures ont été l'objet de l'étude de l'activité antibactérienne et antifongique (**Tableau 07**). La conservation des souches bactériennes se fait dans des tubes de gélose nutritive (GN) inclinée et les levures dans des tubes de sabouroud gélosé inclinée à une température de 4°C.

**Tableau 07 :** Différentes souches utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne et antifongique

Microorganisme	Référence	Gram	
Bactéries	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC25923	Gram +
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922	Gram -
	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC11778	Gram+
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC27853	Gram -
	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC49452	Gram +
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC70603	Gram -
	<i>Salmonella monteridea</i>	ATCC3581	Gram -
Levures	<i>Candida albicans</i>	ATCC10231	
	<i>Candida albicans</i>	IP444	

## 2. Méthodes :

Notre étude expérimentale comporte trois grandes parties :

- Préparation et extraction du matériel végétal de *Nerium oleander* (la partie florale)
- Etude phytochimique ; quantitative et qualitative.
- Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait obtenu

**Partie I :** préparation et extraction du matériel végétal de *Nerium oleander* (la partie florale)

### 2.1. Préparation de la matière végétale :

Le séchage consiste à abaisser la teneur en eau contenue dans la plante étudiée. La plante (Figure 08) était séchée à l'air libre et à l'abri de la lumière pour préserver au maximum l'intégrité des molécules, en évitant les altérations et la prolifération des microorganismes, dans un endroit sec, à température ambiante et aéré pendant un mois. Après le séchage, la plante est finement broyée en poudre à l'aide d'un broyeur électrique (figure 09) puis stockée dans des bocaux en verre jusqu'à l'utilisation.



**Figure 08 :** Fleurs de la plante *Nerium oleander* après séchage



**Figure 09 :** Fleurs de la plante *Nerium oleander* après broyage

## **2.2. Extraction à froid :**

Les techniques d'extraction séparent le métabolisme végétal soluble par l'utilisation sélective de solvants. Le processus d'obtention d'extraits de plantes comprend plusieurs étapes - collecte et authentification du matériel végétal, séchage, réduction de la taille, extraction, filtration, concentration, et les étapes finales sont un séchage et une reconstitution ultérieurs (**Handa et al., 2008**).

L'extraction veut dire la séparation des parties actives de tissus végétaux des composants actifs ou inertes et les retirer à l'aide de l'eau ou des solvants sélectifs ont des polarités différentes. Les produits obtenus sont relativement sous forme de liquides, semi-solides ou poudres exclusivement destinées à un usage oral ou externe. Il s'agit de préparations connues comme les tisanes et les huiles médicinales (**Handa, 2008**).

Dans notre étude, l'extraction est effectuée par l'utilisation de deux solvants polaires mélangés : un solvant organique 'le méthanol' et l'eau. Cet extrait hydrométhanolique est obtenu par la macération. Cette méthode d'extraction a été choisie selon les informations d'une étude ethno pharmacologique (n'est pas mentionnée ici dans ce mémoire). Une quantité de 90 gramme (g) du matériel végétal broyé est mis à macérer dans 600 millilitres (ml) d'un mélange méthanol/eau (80/20 : v/v) sous agitation magnétique pendant 24 heures (h) à température ambiante (**figure 10**).



---

**Figure 10 :** Montage d'extraction utilisé pour l'extraction des fleurs du *Nerium oleander*

Le macérat hydrométhanolique obtenu soumis à la filtration sur papier-filtre Whatman (numéro) n° 1 pendant 24 h, ensuite une deuxième filtration est réalisée sous vide (**figure 11**).



---

**Figure 11 :** Montage de la deuxième filtration utilisée 'sous vide' pour récupérer le filtrat de macération

Le solvant est récupéré du filtrat par évaporation dans un évaporateur rotatif, à une température de 55°C (**figure 12**). Après séchage à l'étuve (45 °C) pendant 48 h, pour évaporer les molécules de l'eau, l'extrait sec obtenu était utilisé pour les tests phytochimiques et biologiques.



---

**Figure 12** : Montage RotaVap utilisé pour l'évaporation des solvants de l'extrait hydromethanolique

### **2.3. Calcul de rendement :**

Le rendement (Rdt) en extrait sec de la plante est déterminé en calculant le rapport suivant

**(Hadri, 2015) :  $Rdt \% = [(P1-P2)/P3] \times 100$**

- P1 : poids du ballon après évaporation.
- P2 : poids du ballon avant évaporation.
- P3 : poids de la matière végétale de départ.

**Partie II** : l'étude phytochimique ; quantitative et qualitative.

### **2.4. Screening phytochimique :**

Le screening phytochimique ne renseigne pas sur la structure d'une molécule bien déterminée. Il comporte des tests qualitatifs qui permettent de caractériser les différents groupes chimiques contenus dans une matière végétale. Il y a lieu de vérifier la présence des métabolites secondaires (saponosides, alcaloïdes, flavonoïdes, tanins, composés réducteurs et autres). Les résultats sont évalués comme suit : + : positif ; - : Négatif ; ND : non déterminé.

#### **2.4.1. Tanins :**

Dans un tube à essai, introduire 0,5 ml d'extrait à analyser, ajouter 1 ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution aqueuse de FeCl<sub>3</sub> diluée à 1%. En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre.

- L'apparition d'une coloration vert foncé ou bleu-verte indique la présence des tanins.
- L'apparition d'une coloration vert foncé indique la présence des tanins catéchiques.
- L'apparition de la coloration bleu-verte indique la présence des tanins galliques (Karumi *et al.*, 2004).

#### **2.4.2. Quinones :**

Les substances quinoniques sont recherchées par le réactif de Bornstraëgen. 0,5 ml de chaque extrait est évaporé à sec. Le résidu est trituré dans 2,5 ml d'acide chlorhydrique 37% au 1/5. Le triturât est versé dans un tube à essai et porté ensuite au bain-marie pendant 30 min. Après refroidissement, il est extrait par 20 ml de chloroforme. L'ammoniaque diluée 2 fois (0,5 ml) est ajouté à la solution chloroformique. L'apparition d'une coloration rouge ou violette confirme la présence de quinones (Cavé, 1993).

#### **2.4.3. Composés réducteurs :**

Nous avons introduit 2 ml d'extrait dans un tube, puis nous avons ajouté 2 ml de liqueur de Fehling (1ml réactif A et 1ml réactif B) et incubé l'ensemble 8 min dans un bain marie bouillant. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs (Trease et Evans, 1987).

#### **2.4.4. Saponines indice de mousse :**

Dans une série de 10 tubes à essai numérotés de 1 à 10, il a été introduit respectivement 1, 2, 3,...,10ml d'extrait puis rajuster le volume de chaque tube à 10 ml avec de l'eau distillée. Agitation de chaque tube dans le sens sa longueur pendant 15 secondes à raison de 02 agitations par seconde. Après repos de 15 min, la hauteur de la mousse produite dans chaque tube est mesurée. L'indice de mousse (I) est calculé par la formule suivante :  $I = 1000 / N$  où N est le numéro du tube où la hauteur de mousse est égale à 01 centimètre (cm) d'après la formule de Cheicktraoré (2006).

#### **2.4.5. Flavonoïdes :**

A 0,5 ml d'extrait à tester, ajouter, 1 ml d'alcool iso amylique, quelques copeaux de magnésium et quelques gouttes d'acides chlorhydrique (HCl). L'apparition d'une coloration rose ou rouge indique la présence des flavonoïdes (**Karumi et al., 2004**).

#### **2.4.6. Anthocynes :**

A 01mL de l'extrait, nous avons ajouté 05ml d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) à 10% puis de l'hydroxyde d'ammonium (NH<sub>4</sub>OH) à 25%. Si la coloration s'accroît par acidification, puis vire au bleu-violacée en milieu basique, cela permet de conclure en la présence des anthocyanes (**Derbray et al., 1971**).

#### **2.4.7. Triterpene et stérols :**

Evaporer à sec 5 ml de la solution à analyser, dissoudre le résidu dans 1 ml d'anhydride acétique puis 1 ml de chloroforme. A l'aide d'une pipette ajouter 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré au fond du tube sans agiter. Laisser reposer 30 minutes. La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et une coloration violette de la couche sur nageant révèlent la présence de stérols et triterpènes (**Bruneton, 1999**).

**Partie III :** évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait obtenu

### **2.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne :**

#### **2.5.1. Préparation de la solution mère de l'extrait :**

Le test antibactérien a pour but de rechercher l'activité biologique de chaque extrait vis-à-vis de différentes souches bactériennes. Les extraits actifs pourraient ainsi justifier l'usage en médecine traditionnelle des plantes dont ils sont extraits et permettraient d'ouvrir d'autres pistes à la recherche. Les extraits ont été solubilisés dans du 2,2- Diphényle-1- Picrylhydrazyl (DMSO) (**Rota et al., 2008**).

Nous avons préparé une solution mère (4ml), 2g d'extrait ont été dissous dans 400microlitre (µl) du DMSO et complétés par le bouillon Mueller-Hinton (MHB) jusqu'au volume de 4 ml, ensuite nous avons agité à l'aide d'un vortex pendant 10 min jusqu'à la solubilité.

## **2.5.2. Préparation de l'inoculum :**

### **2.5.2.1. Préparation de pré-culture :**

Les tests de l'activité antimicrobienne doivent être réalisés à partir des cultures jeunes de (18 à 24 h) en phase exponentielle de la croissance. La réactivation des souches s'effectue par ensemencement de l'espèce bactérienne ou fongique dans un milieu de culture liquide (bouillon nutritif ou bouillon Sabouraud, respectivement). Après incubation de 24 h à 37°C (bactéries) ou 48 h à 30°C, un deuxième repiquage est réalisé sur des boîtes de pétri contenant de la gélose nutritive, GN (bactéries) ou Sabouraud gélose (levures) puis, incubées à 37°C ou 30°C pendant 18 h ou 24 h, respectivement (Hellal, 2011).

### **2.5.2.2. Préparation de la suspension bactérienne :**

A partir des cultures jeunes sur la gélose nutritive (bactéries) ou (Sabouraud) gélose (levures), nous avons prélevé cinq (05) colonies bien isolées et identiques dans 5 ml d'eau physiologie stérile, agitées manuellement pendant quelques secondes. L'ajustement de la charge bactérienne à  $10^6$  Unités Formant Colonies (UFC)/ml, est réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 625 nanomètre (nm). Selon la standardisation de Mc Farland, nous admettons une Densité Optique (DO) comprise entre 0.08 et 0.1 correspond à une concentration de  $10^8$  UFC/ml; la suspension d'inoculum est diluée à 1/100ème dans le milieu de culture pour avoir une concentration de  $10^6$  UFC/ml (Hellal, 2011).

## **2.5.3. Essais antibactériens :**

### **2.5.3.1. Etude de la sensibilité des germes vis-à-vis l'extrait testé :**

Nous avons mis à profit la méthode de diffusion en milieu gélosé à partir de puits (Shan *et al.*, 2007).

La sensibilité des souches à l'extrait de notre plante a été étudiée par la technique de diffusion en milieu gélosé. Les milieux de Mueller Hinton ont été ensemencés par inondation. L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum. Il est réalisé par écouvillonnage sur des boîtes de pétri.

-Plonger un écouvillon stérile dans l'inoculum et bien l'essorer sur les rebords du tube.

- Frotté l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées.
- L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de Pétri à 60° à chaque fois.

L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri. Les boîtes de pétri contenant de l'inoculum sont laissées reposer 20 min devant un bec bunsen. A l'aide de pipette Pasteur, des puits de 6 mm de diamètre ont été creusés dans de la gélose Mueller Hinton étalée en boîtes de Pétri. Chaque puits reçoit 50 µl d'extrait à tester à différentes concentrations.

Après 30 min de diffusion à la température ambiante, les boîtes de Pétri ont été incubées à 37 °C pendant 18 à 24 h. La présence ou non d'une zone d'inhibition a été observée (**Bssaibis, 2009**).

#### **2.5.3.2. Etude de la sensibilité des germes aux antibiotiques :**

Nous avons mis à profit la méthode de diffusion en milieu gélosé préconisée **par Vandepitte et al. (1994)**.

Une suspension bactérienne du germe à tester est ensemencée dans des boîtes de Pétri contenant la gélose Mueller Hinton. Des disques d'antibiotiques sont ensuite déposés sur la gélose ; puis les boîtes de Pétri sont mises à incuber à 37°C en étuve. Après 24 h d'incubation, l'on procède à la lecture des résultats ; celle-ci consiste à mesurer le diamètre de chaque zone d'inhibition.

Les mesures des diamètres des zones d'inhibition sont effectuées à l'aide d'une règle millimétrée sur la surface inférieure de la boîte, sans ouvrir le couvercle. Appropriés prêts à l'emploi ont été utilisés pour la comparaison avec les résultats de l'extrait testé. Finalement, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 18 à 24h à 37°C. La lecture des antibiogrammes a été faite par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions au tour des disques.

La sensibilité ou la résistance des souches est évaluée conformément à l'échelle de **Barros et al. (2007)**. Ce classement est basé sur le diamètre de la zone (halo) d'inhibition obtenue autour des disques. Les résultats sont évalués par +/- qui représentent le degré de sensibilité des souches :

- (-) Non sensible ou résistante : diamètre  $\rightarrow$   $< 7$  mm (aucune activité antimicrobienne).
- (+) : 07 mm  $\rightarrow$   $<$  diamètre  $<$  diamètre  $<$  11.9 mm (activité antimicrobienne modeste).
- (++) : 10 mm  $<$  diamètre  $<$  11.9 mm (activité antimicrobienne modeste)
- (+++) : 12 mm  $\rightarrow$   $<$  diamètre  $<$  15 mm (activité antimicrobienne élevé).
- (++++) : diamètre  $\rightarrow$   $>$  15 (activité antimicrobienne forte).

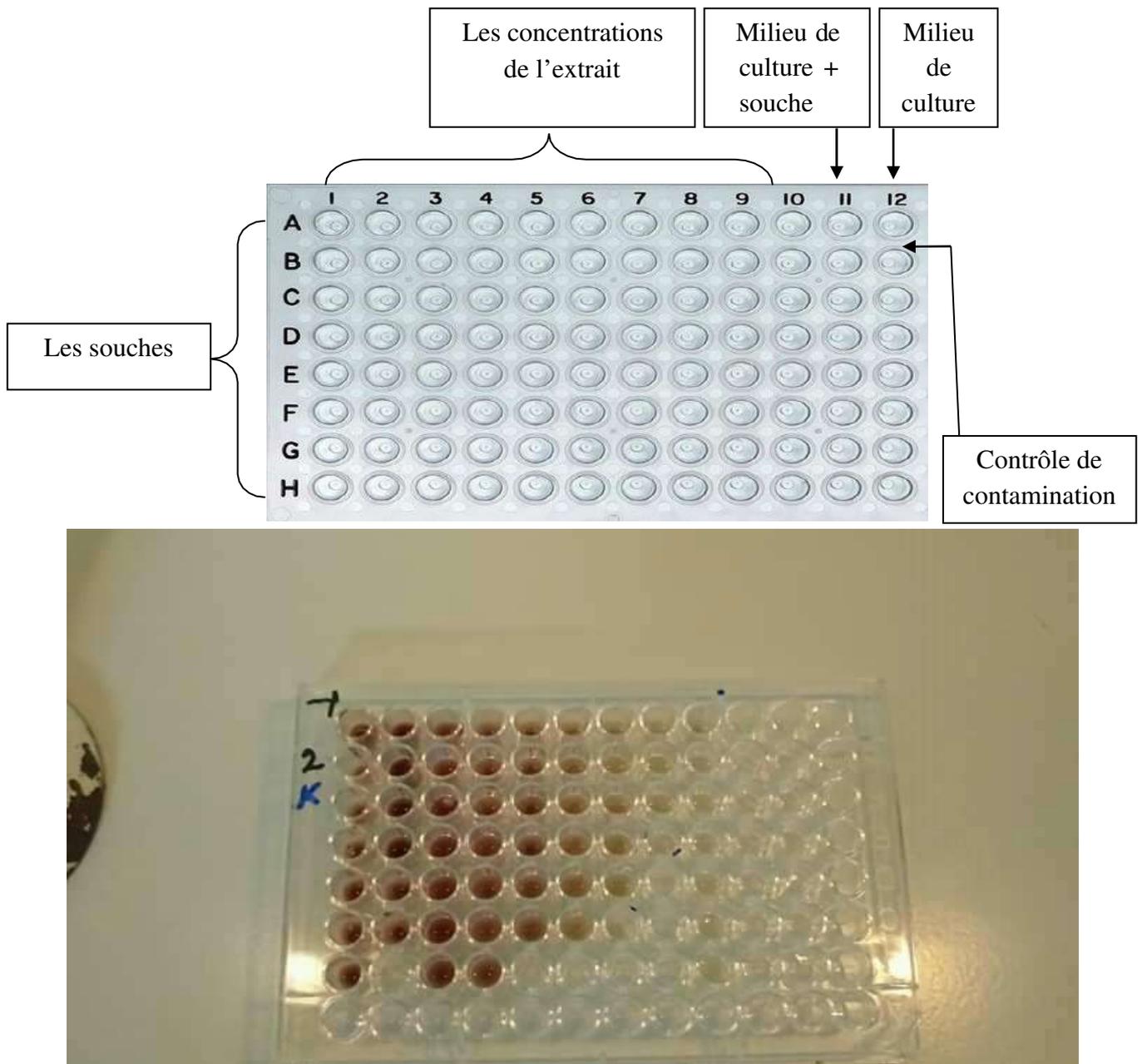
### **2.5.3.3. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) :**

La concentration minimale inhibitrice est la plus faible concentration d'extrait qui inhibe les bactéries testées. La détermination de la CMI est réalisée par la technique de dilution en milieu liquide, en utilisant une microplaque stérile de 96 puits (8  $\times$  12 puits). La technique utilisée a été décrite par CLSI en 2006, elle est basée sur la capacité des microorganismes à produire une croissance visible à l'œil nu au sein d'une série de dilutions de la substance antimicrobienne (CLSI-M7-A7, 2006).

Dix (10) concentrations de l'extrait testé étaient préparées à partir de la solution mère (de 100 mg/ml à 0.19 mg/ml). Tout d'abord désinfecter tous les instruments et la paillasse utilisée pour éviter la contamination et homogénéiser les extraits et la suspension microbienne en les passant au vortex avant chaque dépôt dans les puits.

Les souches sont réensemencées sur boîte de pétrie contenant du (Sabouraud) (levure) à 35°C pendant 20h et gélose nutritif (bactéries) à 37°C pendant 18 à 24h. Nous avons prélevé 05 colonies de 05 mm de diamètre que nous avons placé dans un tube à essai contenant 05 ml de bouillon nutritif stérile. La concentration cellulaire de cette solution est ensuite ajustée à  $10^8$  cellules/ml,  $\lambda_{\max} = 625$  nm) ensuite une dilution au 1/100ème est effectuée (une DO de 0.08 à 0.1) pour avoir un inoculum final de  $10^6$  cellules/ ml.

Déposer, stérilement 50  $\mu$ l de milieu MH dans le puits n°11 qui représente le témoin de culture des bactéries et 100  $\mu$ l dans le puits n°12 qui représente le témoin de stérilité de milieu de culture MH. 50  $\mu$ l de chaque concentration est déposé dans les puits de 1 à 9. 50  $\mu$ l de la suspension microbienne dans les puits 1 à 9 et 11 pour obtenir un volume final de 100  $\mu$ l La microplaque est couverte et incubée à 37 °C pendant 24h pour les bactéries et à 35°C pendant 48 pour les levures. La lecture est effectuée à l'œil nu et la CMI est la plus faible concentration de l'extrait à laquelle aucun trouble n'est observé (Figure 13) (Eloff, 1998).



**Figure 13** : Utilisation de la microplaque (la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide)

# *Résultats et discussion*

### 1. Rendement de l'extrait :

L'extraction a été réalisée sur la poudre des fleurs de *Nerium oleander* en utilisant deux solvants polaires, le méthanol et l'eau distillée. La quantité obtenue de résidus secs pour le macéré hydrométhanolique était de l'ordre de 13.925 g, pour une quantité de 90g de la matière sèche des fleurs de notre plante. L'extrait hydrométhanolique de *Nerium oleander* préparé par la macération a fourni un rendement moyen de 15.47 % (Tableau 08). L'obtention d'un bon rendement d'extrait peut être expliquer par l'utilisation de méthanol qui il est un solvant très polaire et peut donner un rendement important. Ainsi, la méthode d'extraction dépend de plusieurs facteurs à savoir le temps de macération, la température, le solvant d'extraction et la nature chimique de l'échantillon (Su *et al.*, 2006).

**Tableau 08** : Rendement massique d'extrait

Espèce	Partie utilisée	RDT (%)
<i>Nerium oleander</i>	Fleurs	15.47

### 2. Screening phytochimique :

La phytochimie qualitative basée sur des réactions colorées ou de précipitation par des réactifs chimiques spécifiques réalisée sur l'extrait obtenu à partir de la poudre de l'échantillon végétal génère pour une première estimation des données préliminaires sur les constituants de l'extrait. Le résultat de ce criblage phytochimique est résumé dans le **tableau 09**. Il révèle la présence (+) ou l'absence (-) d'un groupe de métabolites secondaires. Les tests phytochimiques ont été réalisés sur les fleurs de *Nerium oleander* en utilisant des solvants différents et des réactifs spécifiques de révélation. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité, un changement de couleur spécifique.

Le screening phytochimique a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau de la plante comprenant les quatre groupes chimiques, les tannins, les composés réducteurs, les quinones, les stérols et triterpènes. En revanche, nous avons enregistré l'absence des saponines (indice de mousse), les flavonoïdes et les anthocyanines.

**Tableau 09** : Groupes chimiques du macéré hydrométhanolique des fleurs de *Nerium oleander*.

Métabolites secondaires	Résultat
Tanins	+
Quinones	+
Composés réducteurs	+
Saponines indice de mousse	-
Flavonoïdes	-
Anthocyanines	-
Stérols et triterpènes	+

En comparant nos résultats avec d'autres études effectuées dans d'autres région, nous trouvons que notre espèce a marqué une absence des Saponines, flavonoïdes, et des anthocyanines à celle étudiée par **Kadri et al (2015)** récoltée à Constantine, Eloued et Mila. Nous avons noté que la plante *Nerium oleander* est très riche en métabolites secondaire : les tanins, saponines, stérols et triterpènes et les flavonoïdes.

### **3. Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion des puits ou des disques :**

#### **3.1. Etude de la sensibilité des bactéries à l'extrait végétal :**

Les résultats sont exprimés par des diamètres de zones d'inhibition exercées par la méthode de diffusion des puits par les différentes concentrations d'extrait hydrométhanolique de *Nerium oleander*, et des disques d'antibiotiques standards utilisés comme témoins positif (Gentamicine, Lincomycine, Amoxiciline et Ampiciline). La lecture a été faite par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque puits à l'aide d'une règle.

A différentes concentrations testées d'extrait de *Nerium oleander*, nous avons observé des zones d'inhibition différentes pour une seule souche (*Bacillus cereus*). Les résultats obtenus de l'étude de l'activité antibactérienne des différentes concentrations d'extrait étudiée sont présentés dans le tableau 10.

**Tableau 10 :** Diamètres des zones d’inhibition obtenues par la méthode de diffusion des puits d’extrait de *Nerium oleander* vis-à-vis des souches microbiennes

Les souches		Concentrations en extrait hydrométhanolique (mg/ml)			
		Solution mère	125	50	25
<b>Gram+</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0
	<i>Bacillus cereus</i>	12.5	11.5	11	12
	<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0	0
<b>Gram+</b>	<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0
	<i>Klebsiella pneumonia</i>	0	0	0	0
	<i>Salmonella monteridea</i>	0	0	0	0
<i>Candida albicans</i> ATCC10231		0	0	0	0
<i>Candida albicans</i> IP 444		0	0	0	0

**0:** aucune zone d’inhibition

Les résultats figurés dans le tableau 10 ont montré que l’extrait hydrométhanolique des fleurs de *Nerium oleander*, à différentes concentrations testées, a une activité inhibitrice sur une seule souche bactérienne. Elle s’agit de *Bacillus cereus*. Alors que le reste des souches bactériennes n’avaient aucuns résultats. Au vu des résultats, la croissance de la souche *Bacillus cereus* ATCC 11778 a été inhibée par des concentration d’extrait 125,50 ,25(mg/ml) par une zone d’inhibition de l’ordre de 12.5 mm à la concentration mère.

Peu d’études ont été effectuées sur l’extrait hydromethanolique des fleurs de *Nerium oleander*. Par conséquent, nos résultats pourraient enrichir le profil de l’étude des sensibilités antimicrobienne d’extrait de *Nerium oleander*.

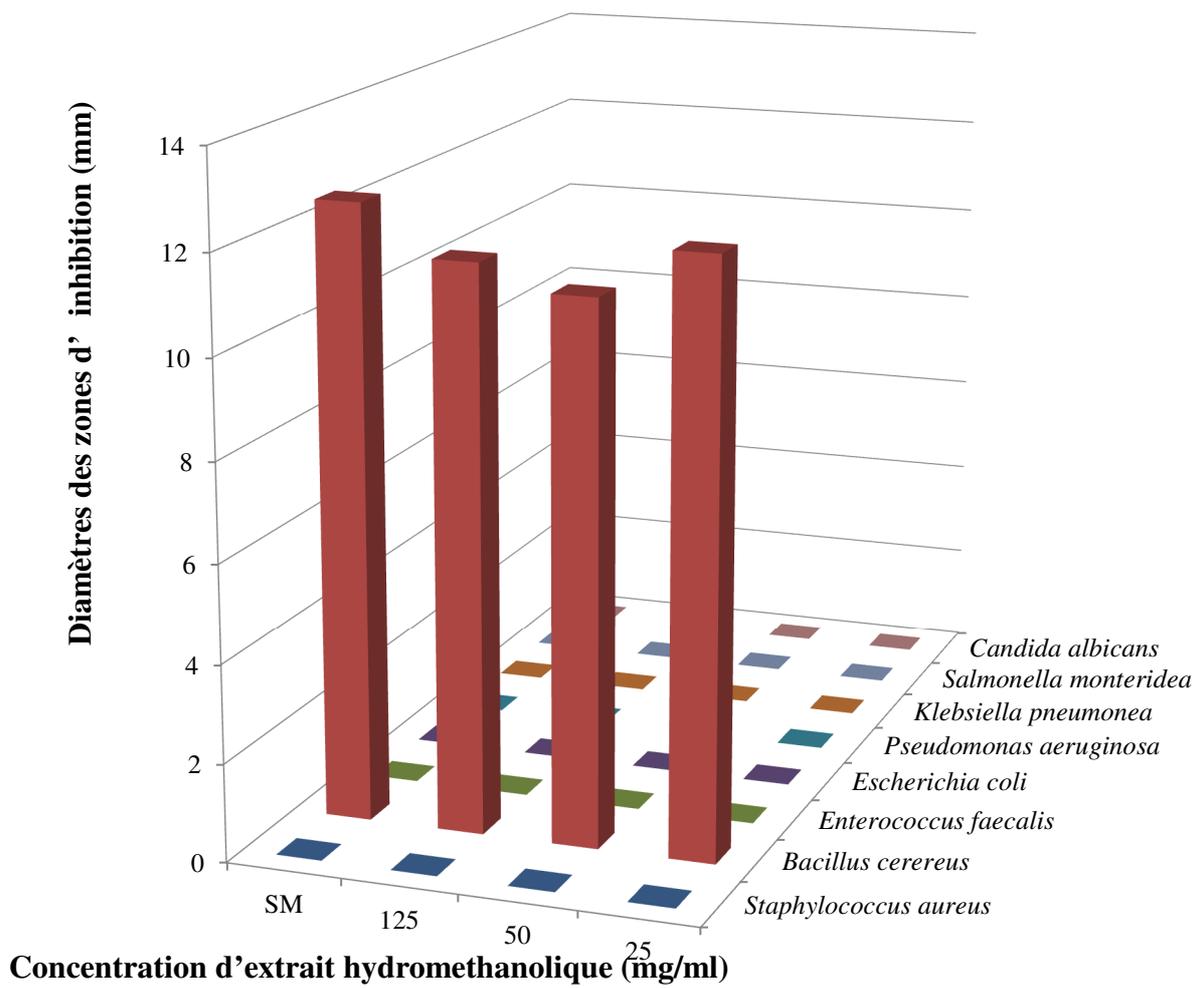
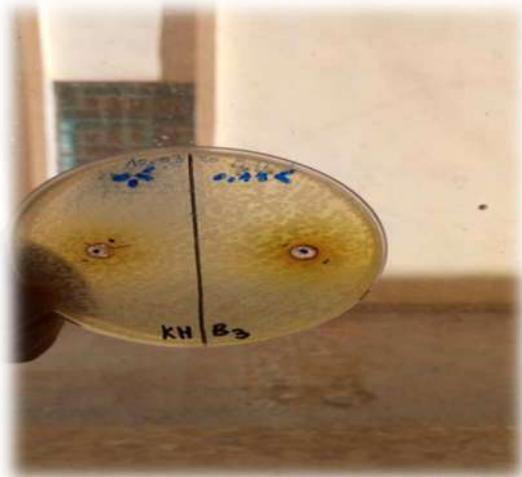
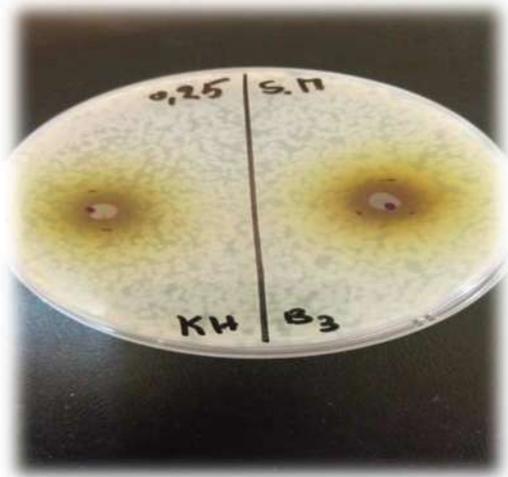
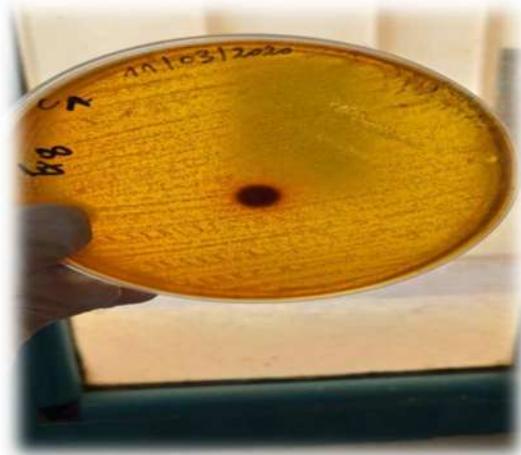


Figure 14 : Effet d'extrait de *Nerium oleander* vis-à-vis les souches bactériennes et les levures



**Figure 15:** Résultats de tests de diffusion des puits de différentes concentrations d'extraits de *Nerium oleander* sur *Bacillus cereus*



**Figure 16:** Résultats de tests de diffusion des puits d'extraits de *Nerium oleander* sur les levures

### 3.2. Etude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques :

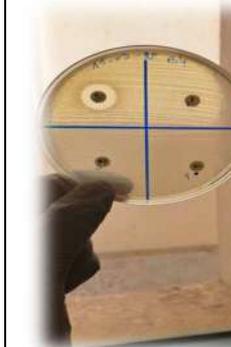
Les antibiotiques sont utilisés comme des référence. Les résultats ont montré une absence de l'activité inhibitrice de croissance de toutes les souches bactériennes testés à l'exception de l'antibiotique Gentamicine. Les résultats sont résumés dans le **tableau 11**.

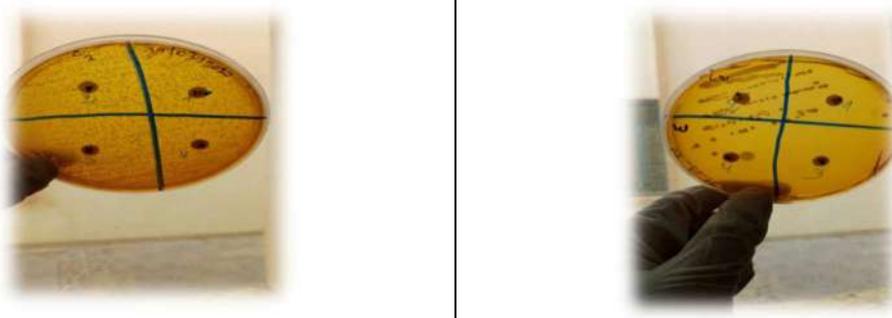
**Tableau 11** : Diamètres des zones d'inhibition obtenues par les antibiotiques standards témoins positifs vis-à-vis des souches microbiennes.

Les souches		Diamètres des zones d'inhibition (mm)			
		Gentamicine	Lincomycine	Amoxyciline	Ampicilin
<b>Gram+</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<b>16</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	<i>Bacillus cereus</i>	<b>17</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	<i>Enterococcus faecalis</i>	<b>13</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Gram-</b>	<i>Escherichia coli</i>	<b>14</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<b>14</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	<i>Klebsiella pneumonia</i>	<b>13</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	<i>Salmonella monteridea</i>	<b>14.5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

**0** : aucune zone

Nous avons enregistré une zone d'inhibition de l'ordre de 17 mm de Gentamicine vis-à-vis de *B. cereus* ATCC 11778. En revanche, aucune zone n'a été détectée pour les autres antibiotiques vis-à-vis toutes les souches testées.

			
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>
			<p><b>Figure 16 :</b> Résultats de tests de diffusion des différents disques d'antibiotique sur les bactéries</p>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumonia</i>	<i>Salmonella monteridea</i>	



**Figure 17 :** Résultats de tests de diffusion des différents disques d'antibiotique sur les levures

### 3.3. Comparaison de l'activité d'extraits à celle d'antibiotiques témoins

Nous avons testé la sensibilité des souches étudiées à certains antibiotiques couramment utilisés comme produits de référence. Gentamicine se caractérise par la forte activité inhibitrice de croissance sur les souches microbiennes sur toute la bactérie *Bacillus cereus*, laquelle est matérialisée par des diamètres d'inhibition plus importants de 17 mm comparativement à ceux obtenus avec l'extrait hydrométhanolique de 12.5 mm.

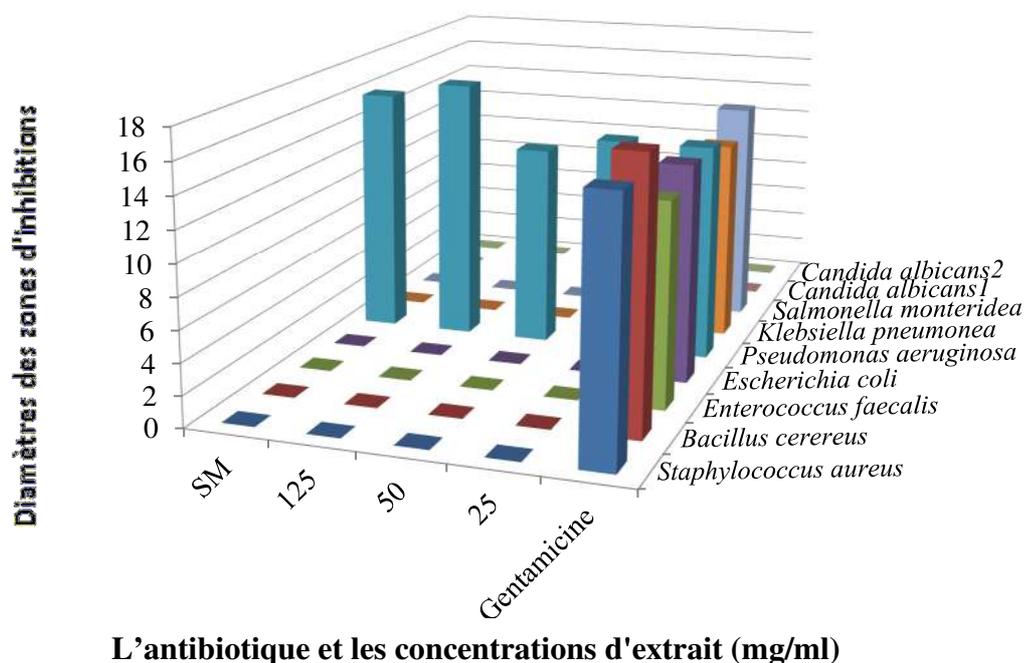


Figure 18 : Effet antimicrobien d'antibiotique Gentamicine et les différentes concentrations d'extrait

La Gentamicine était inactive sur *Staphylococcus aureus* ATCC 259231292, *Bacillus cerereus* ATCC11778, *Enterococcus faecalis* ATCC49452, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCCP27853, *Klebsiella pneumonea* ATCC70603, *Salmonella monteridea* ATCC3581. Il donne respectivement un diamètre d'inhibition de 16 mm au *Staphylococcus aureus* ; 17 mm au *Bacillus cerereus* et 13 mm au *Enterococcus faecalis* ; 14 mm au *Escherichia coli* ; 14 mm au *Pseudomonas aeruginosa* ; 13 mm au *Klebsiella pneumonea* ; 14.5 mm au *Salmonella monteridea*, tandis que l'ampicilline, l'amoxicilline et le lincomycine n'ont exercé aucune action antibiotique sur les bactéries et les levures .

L'extrait hydrométhanolique a montré une zone d'inhibition inférieure à celle obtenue de l'antibiotique standard, la Gentamicine vis-à-vis de la souche *Bacillus cerereus* ATCC11778.

#### **4. Evaluation des concentrations minimales inhibitrices (CMI) :**

Les CMI sont obtenues à partir de différentes dilutions obtenues à partir de la solution mère de l'extrait hydrométhanolique des fleurs de *Nerium oleander*. Les résultats ont révélé une présence d'activité vis-à-vis quelques souches microbiennes testées (tableaux 12 pour les bactéries et pour les levures).

**Tableau 12 : Effet des dilutions du macéré hydrométhanolique sur la croissance bactérienne dans les puits des plaques de microtitration**

Souches	Différentes dilutions utilisées du macéré (concentrations correspondantes en mg/ml)								
	1/1 (1000)	1/2 (500)	1/4 (250)	1/8 (125)	1/16 (62.5)	1/32 (31.25)	1/64 (15.5)	1/128 (7.8)	1/256 (3.9)
<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Salmonella monteridea</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+

Le signe - correspond à une absence de croissance visible à l'œil

Le signe + correspond à une présence de croissance visible à l'œil

Les valeurs de CMI déterminées pour chacun des germes testés sont résumées dans le tableau ci-dessous.

## Résultats et discussion

Nous avons utilisé la méthode de la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour l'évaluation du potentiel antibactérien des concentrations d'extrait des fleurs de *Nerium oleander*. Les valeurs de CMI obtenues sont d'ordre de 125 à 1000 mg/ml (tableau 13). Cette activité inhibitrice de croissance est une illustration de la sensibilité des souches étudiées vis-à-vis de l'extrait végétal, laquelle sensibilité par ailleurs, varie d'une souche bactérienne à l'autre et les levures au regard des CMI déterminées.

Les souches les plus sensibles ont été celles qui présentaient les CMI les plus basses, toute chose qui permet de faire une classification des micro-organismes par ordre de sensibilité croissante selon la CMI : *Klebsiella pneumoniae* (CMI = 125 mg/ml) s'est avéré être la souche clinique la plus sensible, suivie par, *Staphylococcus aureus* (CMI = 500 mg/ml) et *Escherichia coli* (CMI = 500 mg/ml), *Candida albicans* ATCC IP444 (CMI = 500 mg/ml) et *Enterococcus faecalis* (CMI = 1000 mg/ml), *Bacillus cereus* (CMI = 1000 mg/ml), *Salmonella monteridea* (CMI = 1000 mg/ml), *Pseudomonas aeruginosa* (CMI = 1000 mg/ml).

**Tableau 13 :** Concentrations Minimales Inhibitrices du macéré hydrométhanolique

Germes	CMI (mg/ml)	Dilution
<i>Escherichia coli</i>	500	1/2
<i>Enterococcus faecalis</i>	1000	1/1
<i>Bacillus cereus</i>	1000	1/1
<i>Klebsiella pneumonea</i>	125	1/8
<i>Salmonella monteridea</i>	1000	1/1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1000	1/1
<i>Staphylococcus aureus</i>	500	1/2
<i>Candida albicans 2</i>	500	1/2

# *Conclusion*

D'après la recherche bibliographique, la plante *Nerium oleander* est un arbuste de la famille des Apocynacées employé en médecine traditionnelle pour le traitement de nombreuses maladies et fait d'ailleurs partie de plusieurs pharmacopées locales.

L'extraction de la partie florale de la plante a permis d'obtenir un rendement important (15.47%), qui a été obtenu par l'utilisation d'un solvant hydrométhanolique en utilisant la macération. Le screening chimique nous a permis de conclure que l'extrait actif (macéré) semble contenir les tanins, stérols et tri-terpènes et les composés réducteurs.

D'autre part, cette étude avait pour but d'évaluer in-vitro l'activité antibactérienne de l'extrait hydrométhanolique des fleurs de *Nerium oleander*. L'activité des extraits est évaluée par la méthode des puits contre sept souches de référence, quatre bactéries Gram- et trois Gram + et deux levures. Il ressort que :

- Les levures étudiées ont eu un pouvoir résistant à l'extrait hydrométhanolique des fleurs de *Nerium oleander* ;
- La sensibilité a été enregistré uniquement pour *Bacillus cereus* ATCC 11778 en dépendance aux différentes concentrations d'extraits, avec des diamètres d'inhibition de 12.5 mm 12 mm, 11.5 mm, 11 mm obtenu par l'action du macéré.
- La concentration minimale inhibitrice déterminée vis-à-vis des souches étudiées a été respectivement 125; 500; 500 ;500 ;1000 ;1000 ;1000 et 1000 mg/ml.

# *Références bibliographiques*

**Al-Obaidi, O. H. S. (2014).** Studies on antibacterial and anticancer activity of *Nerium Oleander* extracts. *Eur. Chem. Bull*, 3(3), 259–262.

**Alvarez, L.F., Muall, E., and Terradas, R. (2008):** Moisturizing body milk as a reservoir of Burkholderiacepacia: outbreak of nosocomial infection in a multidisciplinary intensive care unit. *Critical Care Médecine*, 12, 10.

**Amaral, L.F.B., Camilo, N.S., Pereda, M.D.C.V., Levy, C.E., Moriel, P. and Mazzola, P.G. (2011):** Evaluation of antimicrobial effectiveness of C-8 xylitol monoester as an alternative preservative for cosmetic products. *Int. J. Cosm. Sci.* 33, 391–397.

**Anne, M., and Pensé, J. (2016).** Concevoir et développer un produit cosmétique coordonnatrice, Lavoisier. Code de la Santé Publique, <http://www.legifrance.gouv.fr/>

**Bagari, M., Bouhaimi, A., Ghaout, S., and Chihrane, J. (2013):** The toxic effects of *Nerium oleander* on larvae of the desert locust *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (Orthoptera, Acrididae). *Zool. Baetica*, 24, 193–203.

**Bakkali H., Ababou K., Nassim Sabah T., Moussaoui A., Ennouhi A., Fouadi F.Z, Siah S.,Ihrai H.(2010):** *Annals of Burns and Fire Disasters - vol. XXIII - n. 3* .

**Barros, L., Caiheha Ricardo, C., Vaz. Josiana., A., Ferreira Isabel, C. F. R., Baptista, P., Estevinho Leticia, M. (2007):** Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. *Eur Food Res Technol*; 225:151-156.

**Bayer, E., Buttler, K.P., Finkenzeller, X. and Grau, J. (2005):** Guide de la flore méditerranéenne. Caractéristiques, habitat, distribution et particularités de 536 espèces. (Ed.) *Delachaux ET Niestlé*. 287p.

**Belaoufi F. (2016).** Parabenes dans les produits cosmétiques : Quelles Alternatives, Quelle Place Des Cosmétiques Bio. Université MOHAMMED V-Rabat Faculté De Médecine Et De Pharmacie P204

**Blumenfeld, O., Nathansohn, N., and Yeshurun, I. (2005):** Ashkenazi, I. Eye cosmetics-the beauty and the beast. *Harefuah*, 144, 357–362. [PubMed].

**Bruneton J. (2009).** Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 4eme éd., revue et Augmentée, Paris, Tec & Doc - Editions médicales internationales, 1288 p. (ISBN 978-2- 7430-1188-8).

**Bruneton, J. (2005).** *Plantes toxiques - Végétaux dangereux pour l'Homme et les animaux*, 3e éd. Tec & Doc Lavoisier.

**Bssaibis, F., Gmira, N., and Meziane, M. (2009) :** Activité antibactérienne de *Dittrichia viscoa* (L.)W. Greuter .Rev ; Microbiol . Ind .San et Environn, 3(1), 44-4.

**Buckingham J. (2004).** Dictionary of Natural Products. Version 9.2 on CD-ROM. Chapman & Hall/CRC Press, London, New York.

**Cavé, A. (1993).** **Pharmacognosie, phytochimie, plantesmédicinales.**

**Charnot, A. (1945).** La toxicologie au Maroc. Mémoires de la société des sciences naturelles du Maroc: 475-9.

**Charrié, J-C., Hedayat, K., Chastel, B., Cieur-Tranquard, C., Combe, P., Damak, M., et al. (2017) :** Notions de galénique. In: Lapraz J-C, éditeur. *Plantes médicinales: phytothérapie clinique Intégrative et médecine endobiogénique*. Paris, France: Lavoisier Tec & Doc.

**Chaudhary, K. and Prasad, D.N. (2014):** A Review on: *Nerium oleander* Linn. (Kaner). International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research 2014; 6(3): 593-597.

**Chauhan, S., Singh, M., Thakur, A., and Dogra M. s (.2013):**“Antibacterial activity of *Nerium indicum* against some gram positive bacterial species” *Int. J. Drug Res. Tech*, 3 (1), 8-11.

**Cheick traore M. (2006).** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de quelques plantes utilisées dans le traitement traditionnel de la dysménorrhée au mali. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako : 72p

**Cheriti, A., BelboukharI, M., BELBOUKHARI, N., and DJERADI, H. (2012):** Phytochemical and biological studies on *Launaea* Cass. Genus (Asteraceae) from Algerian Sahara. *Current Topics in Phytochemistry*, 11 : 67- 80 .

**CLSI-M7-A7 2006 . Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. 2006.** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 7th ed. CLSI document M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA

**Cohen, Y., and Gleitz, C. (2009):** Les conservateurs dans les produits cosmétiques : cas des parabens et du phénoxyéthanol. Et que penser des produits cosmétiques "biologiques" ? Thèse de doctorat en pharmacie. Université Joseph Fourier.

**Crashaw B. (1977)** .Preservatives for cosmetics and toiletries. *J Soc Cosm Chem*; 28: 3-16.

**Croteau, R., Kutchan, T.M., and Lewis, N.G. (2000):** Natural Products (Secondary metabolites). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Buchanan B., Grissem W, Jones R. (eds). *Americ. Soc. Of Plant Physiologists*. 1250-1318.

**Croteau, R., Kutchan, T.M., and Lewis, NG. (2000):** American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, p.1250.

**Croteau, R., Mange, B., Curr. (1999) :** *Opin. Plant Biol.* 2-139.

**Darbre, P.D., Aljarrah, A., Miller, W.R., Coldham, N.G., Sauer, M.G. and Pore, G.S. (2004):** Concentration of parabens in human breast tumors. *J. Appl. Toxicol.* 24, 5–13.

**Derbray, M., jacquemin, H., and Razafindrambo, R. (1971):** Travaux et documents de l'Orstom (Paris, N°8).

**Dewick PM. (2002).** Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 2nd edn, JohnWiley and Sons, Chichester.

**Dibong, SD., Mpondo Mpondo, E., Ngoye, A., Kwin, MF., and Betti, JL., (2011):** Ethnobotanique et phytomédecine des plantes médicinales de Douala, Cameroun. *Journal of Applied Biosciences* 37: 2496 – 2507.

**Doijad C., Rajendra, Pathan B Asma, Suryavanshi S., Jayprakash, Jagtap K., Meena and Sankpal S, Pournima. (2013):** "Phytochemical Screening and Antibacterial Activity of Nerium Indicum" *International Journal of Pharmacy Teaching & Practices*, 4(3), 743-746.

**El Sawi, N. M., Geweely, N. S., Qusti, S., Mohamed, M., and Kamel, A. (2010):** Cytotoxicity and Antimicrobial Activity of *Nerium oleander* Extracts. *Journal of Applied Animal Research*, 37(1), 25–31.

**Elkolli M. (2016).** Structure et activités des substances naturelles : principes et applications.

**Eloff J.N. (1998).** A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med.* 64(8):711-713.

**Eloff J.N. (1998).**A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria .*Planta Med* .64(8): 711-713.

**Epstein H. (2006)** .Cosmetics preservation. *Clin. Derm.* 24, 551–552.

**Erdemoglu, N., Esra, K., and Erdem, Y. (2003):** Antiinflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine. *J. Ethnopharmacol.* **89**: 123-9.

EU regulation, Cosmetic products regulation (1223/2009).

**Fourniat J. (2006)** . Conservateurs antimicrobiens. Actifs et Additifs en Cosmétologie, Martini M-C. & Seiller M., Ed., 3e édition, Lavoisier. p. 763-807.

**Gazengel J.M. and Orecchioni A.M. (2013)** : Le préparateur en pharmacie. Guide théorique et pratique. 2éme éd. Ed. Tec et Doc, Paris. France. P1443.

**Giménez-Arnau A. (2010)** .In: Les biocides : anges ou démons ? De l'activité antimicrobienne aux effets indésirables. Tome XVI. Strasbourg: John Libbey Eurotext; p. 101–22.

#### **Guide illustré de la flore algérienne**

**Hadri .N (2015).** Etude phytochimique et activité antioxydant d'extraits de plantes sedurn *Villosum L* (orpin) et *Anabasis articularata Moq.* (Forsk). Thèse de doctorat, université Abou bekr belkaid Tlemcen.

**Hakimi. (2004).** Traduction du traité complet des deux arts en médecine vétérinaire: hippologie et hippiatric. (Le naceri) p 239.

**Halla .N et al, 2018** Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies 28 June 2018. Légifrance.Article L5111-1 du Code de la santé publique. Disponible sur <http://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?cidTexte=LEGITEXT00006072665&idArticle=LEGIARTI000006689867>

**Handa, S et al, (2008)** extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology. *Journal of Materials Science and Chemical Engineering*, 3, 8, 260.

**Hellal Z, (2011).** Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydants de certaines huiles essentielles extradites des Citrus. Application sur la sardine (Sardine

pilchardus).Mémoire magister option ; Biochimie Appliquée et Biotechnologies. Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou.

**Hopkins W.G. (2003).** Assimilation du carbone et productivité. Dans: *Physiologie végétale. Traduction de la 2ème édition américaine par Serge Rambour. Editions De Boeck université*, 515p.

**Hordé P. (2014).** Plantes médicinales. p1.

Inserm. Reproduction et environnement. Inserm; 2011.

**Janetos TM, Akintilo L, Xu S.** Overview of high-risk Food and Drug Administration recalls for cosmetics and personal care products from 2002 to 2016. *J Cosmet Dermatol* 2018. <https://doi.org/10.1111/jocd.12824>.

**Jiofack ,T ., Fokunang ,C., Guedje ,N., Kemeuze ,V., Fongnzossie, E., Nkongmeneck, BA., Mapongmetsem ,PM., and Tsabang, N.( 2010):** Ethnobotanical uses of medicinals plants of two ethnoecological regions of Cameroon. *International Journal of Medicine and Medical Sciences*, **2**(3): 60-79.

**Kabara, J.J. and Orth, D.S. (1996) :**( eds) Preservative-Free and Self-Preserving Cosmetics and Drugs: Principles and Practice. Marcel Dekker Inc., New York.

**Kabara, J.J. and Orth, D.S. (1998):** Preservative-free and selfpreserving cosmetics and drugs. *Cosmet. Toiletries* 113, 51–58.

**Karumi, Y ., Onyeyili, PA ., and Ogugb uaja VO. (2004) :** Identification of active principales of *M. balsamina* (Balsam apple) leaf extract. *J Med Scien* 2004; 4: 179- 182.

**Khare, C.P. (2004).** Encyclopedia of Indian Medicinal Plants, Springer-Verlag-Heidelberg, pp. 328-330.

**Khenaka K. (2011).** Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogénèse ruminale chez l'ovin. Université Mentouri. Constantine. p81.

**Lamarti, A., Badoc, A., Deffieux, G., Carde, JP., and Bull Soc. (1994):** Pharm. ZBordeaux.13379.

**Langford, S.D.and Boor, P. (1996):** Oleander toxicity: An examination of human and animal toxic exposures. *Toxicology*, 109: 1-13.

- Lee, J.Y., Lee, G.T., Lee K.K., and Soc ,J. (2012):** Cosmet. Sci. Korea 38 (2) 171.
- Lemini, C., Jaimez, R., Avila, M.E., Franco, Y., Larrea, F. and Lemus, A.E. (2003):** In vivo and in vitro estrogen bioactivities of alkyl parabens. Toxicol. Ind. Health 2– 6, 69–79.
- Lemini, C., Jaimez, R., Avila, M.E., Franco, Y., Larrea, F. and Lemus, A.E. (2003):** In vivo and in vitro estrogen bioactivities of alkyl parabens. Toxicol. Ind. Health 2– 6, 69–79.
- Leslie T. (2004).** The Healing Power of Rainforest Herbs: A Guide to Understanding and Using Herbal Medicinals. New York: 519.
- Luay, J.R., Katrin, F., Myint, M.K., Gerhard, K., Heinz, H.F., Jachina, N., Ludgar, A., and Wess, J. (2011):** “Characterization of the anticancer properties of monoglycosidic cardenolides isolated from *Nerium oleander* and *Streptocaulon tomentosum*” Journal of Ethnopharmacology, 134, 781-788.
- Lundov MD, Zachariae C.** Recalls of microbiologically contaminated cosmetics in EU from 2005 to May 2008. Int J Cosmet Sci 2008; 30: 471–474.
- Martini M.C, and Seiller M. (2006) :** Actifs et additifs en cosmétologie, 3ème édition, Tec&Doc Lavoisier, Mercuée.
- Martini, M.C., Peyrefitte, G., and Camponovo, J. (2008):** Esthétique Cosmétique CAP, BP/Bac Pro.
- Mary A L. (1990).** Final report of the safety assessment of phénoxyéthanol. J Am Coll Toxicol: 9: 259–277.
- Masahi F, Yuri O, Hitoshi M.** Skin sensory stimulation. J Soc Cosmet Chem Japan 1989: 22: 229–236.
- Meftah, T. (2003).** Programme UICN – Cosmétologie au naturel. Alger. A.N.N
- Michael W. (2010).** Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites. Second Edition Blackwell Publishing Ltd by Michael Wink A John Wiley & Sons, Ltd, Publication United Kingdom.
- Mitsui T.** in New Cosmetic Science, 499 p., Ch. 9 Preservation of Cosmetics p. 199-208 (Elsevier, 1997).

**Mohadjerani, M. (2012).** Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of *Nerium Oleander* L. Grown in North of Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 11(4), 1121–6.

**Monica, G., Sandra, VV., Patricia, IO., and Cesar, G. (2010):** Archives of Biochemistry and Biophysics. 501(1) 23.

**NakiSiviri, N., Ozar, A.Y., and Ozalp. (2006):** Decontamination of cosmetic products and raw materials by gamma irradiation. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 198-209.

**Neacsu, M., McMonagle, J., Fletcher, R.J., Scobbie, L., Duncan, G.J., Cantlay, L., de Roos, B., Duthie, G.G., and Russel, W.R. (2013),** Bound phytochemicals from ready-to-eat cereals: comparison with other plant-based foods. *Food Chemistry*, 141, 2880-2886.

**Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R.** L'essentiel en microbiologie, Ed Berti. 2000. 365p., Paris. Baker S., Nicklin J., Khan N. 2007. Microbiology, Ed. revue de: Microbiology / J. Nicklin, K. Graeme-Cook and R. Killington. 2nd éd. 2002, Taylor & Francis Group, New York. Beveridge, 2001.

**Norman FE. (1984).** The cosmetic industry scientific regulatory foundation. *Cosmetic science and Tech. Series*. Vol.2:21, 301- 320.

**Nurgun, E., Esru, K., Erdem, Y. (2003):** “Anti-inflammatory and Antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine” *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 123-129.

**OMS (Organisation mondiale de la Santé).** Principe méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle. *WOH/TRM/2000*.

**OMS (Organisation mondiale de la Santé).** Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle. *WOH/TRM/2000* ; annexe II : 31-35.

**Orecchio, S. and Amorello, D. (2010):** Platinum and rhodium associated with the leaves of *Nerium oleander* L.; analytical method using voltammetry; assessment of air quality in the Palermo (Italy) area. *Journal of Hazardous Materials*. 174: 720-7.

**Orth D S. (1989).** Handbook of Cosmetic Norms F E. The Microbiology. Marcel Dekker .New York.

**Ouahas C. (1996).** Chimie Organique, Science biomédicales et Sciences de la nature. Office des publications Universitaires, Alger, 431.

**Pierpoint WS.** Biochemist. 22(2000) 37.

**Pochet, A., and Reynier , J-P. (2006) :** Réglementation européenne des produits cosmétiques, In : MARTINI M-C, SEILLER M. Actifs et additifs en cosmétologie, 3ème édition, Lavoisier, Paris, 1-33. Directive 2003/15/CE JOCE L66 du 11/03/2003

**Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A.** in Microbiologie. 2ème edition, 1137 p., Ch. 3 La cellule procaryote: structures et fonctions p. 1-73 (De Boeck, 2003).

**Raven H., Evert, R. F., Eichhorn, S. E. (2000):** Biologie végétale. 6e édition. Traduit par Jules Bouharmont avec la collaboration scientifique de Charles-Marie Evrard. *De Boeck Université - Paris*, 944p.

**Reid, F.R., and Wood, T.O., (1979):** Pseudomonas corneal ulcer. The causative role of contaminated eye cosmetics. Arch. Ophthalmol. 97, 1640–1641. [CrossRef] [PubMed].

**Sangwan, NS., Farooqi, AHA., Shabih, F., and Sangwan, RS. (2001):** Plant Growth Regul. 34-3.

**Santhi, R., Lakshami, G., Priyadarshini, A.M., and Anandraj, L. (2011):**“Phytochemical screening of *Nerium oleander* leaves and *Momordica charantia* leaves,” Inter. Res. J. Pharm 2011, 2(1), 131-135.

**Sato F., Hashimoto T., Hachiya A., Tamura K. I., Choi K. B., Morishige T., Fujimoto H.,**

**Sato, F., Hashimoto T., Hachiya, A., Tamura K. I., Choi K. B., Morishige, T., Fujimoto H., and Yamada, Y. (2001):** Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 (1): 367-372.

Scientific Committee on Consumer Products. The SCCP’s Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and Their Safety Evaluation. Available online: [http://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/consumer\\_safety/docs/sccs\\_s\\_006.pdf](http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_s_006.pdf) (accessed on 11 November 2015).

Secrets et vertus des plantes médicinales (publié par sélection du Sélection du Reader 's Digest 1986 ).

**Shan, B., Cai, Y., BOOKS, J.D., and Corke, H. (2007):** The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *Int j food Microbiol* 117:112-9.

**Sharma, P., Gupta, Y.K., Sharma, M.C., and Dhobal, M.P. (2012):** “Two new compounds from the stem of *Nerium oleander*” *Indian Journal of Chemistry*, 49B, 374-378.

**Siddiqui, B.S., Khatoon, N., Begum, S., Farooq, A. D., Qamar, K., Bhatti, H.A., Ali, S.K. (2012):** “Flavonoid and cardenolide glycosides and a pentacyclic triterpene from the leaves of *Nerium oleander* and evaluation of cytotoxicity.” *Phytochemistry*, 77, 238-244.

**Siddiqui, I., Bokhari, N. A., & Perveen, K. (2016).** Antifungal ability of *Nerium oleander* against *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii* and *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 26(1), 269–274.

**Singhal, K.G.and Gupta, G.D. (2012):** “Hepatoprotective and antioxidant activity of methanolic extract of flowers of *Nerium oleander* against CCl<sub>4</sub> induced liver injury in rats.” *Asian Pac. J. Trop. Med.*2012, 5(9), 677-685.

**Soulaymani-Bencheikh R. (2011).** Intoxication par les produits cosmétiques données du centre anti poison du Maroc (1980-2010), *Toxicologie Maroc* N°11-4ème trimestre 2011

**Strack D. (1997).** Phenolic metabolism. In P.M. Dey and J.B. Harborne (eds), *Plant Biochemistry*. Academic Press, London, P. 387.

**Tenenbaum S. (1967).** Pseudomonas in cosmetics. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 18, 797–807.

**Tenenbaum S. (1967).**Pseudomonas in cosmetics. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 18, 797–807.

The European Parliament and the Council of the European Union. Regulation (EC) No. 1223/2009 of the European parliament and of the council of 30 November 2009 on cosmetic products. *Off. J. Eur. Union L* 2009, 342, 59.

**Toler J.C. (1985).** Preservative stability and preservative systems. *Int. J. Cosmet. Sci.* 7, 157–164. [CrossRef] [PubMed].

**Trease, E., Evans, W.C. (1987):** *Pharmacognosie*, Billiaire Tindall. London 13 th Edition .P 61- 62.

**Vandepitte J. K. (1994)** Piot P. *Bactériologie Clinique : techniques de base pour le laboratoire*. Genève : Organisation Mondiale de la santé, 177.

**Wallhausser K H. (1984)** .Antimicrobial preservatives used by the cosmetic industry. In: *Cosmetics and Drug Preservation*, Kabara J J (ed.): Marcel Dekke: 605–745.

**Wallhausser K.H. (1978)**. Microbiological quality control of skin care preparations, *Cosmetics and toiletries*, 93, 42-48.

**Yamada Y. (2001)**: Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*, 98 (1): 367-372.

**Zobel A. M. and Brown S. A. (1990)**: Dermatitis-inducing furanocoumarins on leaf surfaces Of eight species of Rutaceous and Umelliferous plants. *Journal of Chemical Ecology* **16**, 3: 693-700.

- **R. Soulaymani-Bencheikh. Intoxication par les produits cosmétiques données du centre anti poison du Maroc (1980-2010), Toxicologie Maroc N°11-4ème trimestre 2011.**
- **(Directive 2003/15/CE JOCE L66 du 11/03/2003)**
- **Bernier, A. Mises au point interactives – Peau et environnement Conservateurs des cosmétiques: vérités et idées reçues. N° 277, p41-p45.**
- **Varvaresou,A., Papageorgiou,S., Tsirivas.E., Protopapa E., Kintziou,H., Kefala ,V., and C. Demetzos (2009) : Self-preserving cosmetics. International Journal of Cosmetic Science, 31, 163–175.**
- **Flavie L.(2011). Les Produits Cosmetiques Biologiques : Labels, Composition Et Analyse Critique De Quelques Formules .Universite Joseph Fourier Faculte De Pharmacie De Grenoble . These De Docteur En Pharmacie .p144**
- **Edlira, N.,and Marisanna ,C.(2016). Microbiologically Contaminated and Over-Preserved Cosmetic Products According Rapex 2008–2014. Cosmetics , 3, 3 .p11.**
- **Florence,M.(2018). La Biodiversité Végétale Au Service Des Ingrédients Naturels : Étude Des Propriétés Antimicrobiennes Et Antioxydantes D’extraits Végétaux Et Développement D’un Conservateur Naturel Pour L’industrie Cosmétique , L’UNIVERSITÉ CÔTE D’AZUR,THÈSE DE DOCTORAT En Chimie,P.320.**
- **Abaas I,Haithem R, Majeed A.The microbial contamination study of some herbal cosmetics products used in traditional medicine in Iraq. Kerbala Journal of Pharmaceutical Sciences Number 6 , 132-140 pp(2013)**
- **Edlira N, Marisanna C.Microbiologically Contaminated and Over-Preserved Cosmetic Products According Rapex 2008–2014.11,pp(2016)**
- **BERNIER C. Conservateurs des cosmétiques: vérités et idées reçues. réalités Thérapeutiques en Dermato-Vénéréologie n° 277,pp (41-45)(2018)**
- **Flavie ,L. Les Produits Cosmetiques Biologiques : Labels, Composition Et Analyse Critique De Quelques Formules, Thèse pour l’obtention du titre de Docteur en Pharmacie, Universite Joseph Fourier faculte de pharmacie de Grenoble,144pp (2011)**
- **Boukhira, S .Vers d’innovants conservateurs naturels pour la cosmétique : Applications du challenge test et évaluation de leurs activités biologiques, Thèse pour Formation Doctorale : Ressources Naturelles, Environnement et Développement Durable, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah,210pp(2017)**
- **Saba A , Sajjad U, Zara S, Bakhtawar M.EVALUATION OF COSMETICS FOR THEIR POTENTIAL CONTAMINANTS AND DRUG RESISTANT MICROORGANISMS. Acta Scientifica Malaysia (ASM) 1(2), 16-19pp(2017)**
- **Dweck, A. Natural preservative – an update. In Formulating Natural Cosmetics (Kozłowski, A.C., ed.), pp. 107–130. Alluredbooks, USA (2011).**
- **EU regulation, Cosmetic products regulation (1223/2009)**
- **Eunyoung,L., Susun ,A., Dongwon,C., Seongjoon ,M.,And Ihseop,C. Comparison Of Objective And Sensory Skin Irritations Of Several Cosmetic Preservatives, Contact Dermatitis 56,pp.131–136(2017)**

- Audrey K , Pauline B , Florence M, Alexandre D, Yohan R, Thomas M, Xavier F. Development of a natural ingredient e Natural preservative: A case study, C. R. Chimie 19,pp1077-1089(2016)
- Fourniat, J., Conservateurs antimicrobiens. Actifs et Additifs en Cosmétologie, Martini M-C. & Seiller M., Ed., 3e édition, Lavoisier. (2006), p. 763-807.
- Pastor-Nieto MA, Alcántara-Nicolás F, Melgar-Molero V, Pérez-Mesonero R, Vergara-Sánchez A, Martín-Fuentes A, et al. Preservatives in personal hygiene and cosmetic products, topical medications, and household cleaners in Spain. Actas Dermosifiliogr. 2017;108(8):758-70.
- Fourniat, J., Conservateurs antimicrobiens. Actifs et Additifs en Cosmétologie, Martini M-C. & Seiller M., Ed., 3e édition, Lavoisier. (2006), p. 763-807.
- Fernandez X., Chemat F., and Do T.K.T. Les huiles essentielles – Vertus et Applications, Ed. Vuibert. 2012..
- Holley R.A., Patel, D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. Food Microbiol. 22(4) pp. 273–292
- Patrone V,Campana R, Emanuela Vittoria E,Baffone W. In Vitro Synergistic Activities of Essential Oils and Surfactants in Combination with Cosmetic Preservatives Against Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus,Curr Microbiol 60:237–241(2010)
- KEHAL,F.Utilisation De L’huile Essentielle De Citrus Limon Comme Agent Conservateur Et Aromatique Dans La Crème Fraîche. Universite Constantine 1 Département De Technologies Alimentaires. Mémoire Présenté De L’obtention De Diplôme De Magister En Sciences Alimentaires, N°:047/Mag ,P.93(2013)
- Liang LV., F.H., Yuan Q., and Li C., In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. Food Research International. 2011. 44: 3057-3064.
- Oyedemi S.O., Okoh A.I., Mabinya L.V., Pirochenva G., and Afolayan A.J. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol,  $\alpha$ -terpineol and  $\gamma$ -terpinene against Listeria monocytogenes, Streptococcus pyogenes, Proteus vulgaris and Escherichia coli. African Journal of Biotechnology. 2009. 8: 1280-1286.
- Karagöz A., Doruöz N., Zeybek Z., Aslan A. 2009. Antibacterial activity of some lichen extracts. Journal of Medicinal Plants Research. 3(12): 1034-1039.
- Mussard J. Les parabens, des conservateurs omniprésents : un risque pour la santé , Université de Nantes, Faculté de Pharmacie (2006).
- Amaral, L.F.B., Camilo, N.S., Pereda, M.D.C.V., Levy, C.E., Moriel, P. and Mazzola, P.G. Evaluation of antimicrobial effectiveness of C-8 xylitol monoester as an alternative preservative for cosmetic products. Int. J. Cosm. Sci. 33, 391–397 (2011)