

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

Université « Dr. Moulay Tahar » de Saida

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire de Biotoxicologie, Pharmacognosie Et Valorisation biologique des Plantes



Mémoire présenté en vue de l'obtention

Du diplôme de Master en : Biologie

Option: Biochimie

Présenté Par :

Mlle : SLIMANI Imene

Contribution à l'étude des propriétés conservatrices de
l'extrait aqueux de *Lippia citriodora*

Soutenu devant le jury composé de :

M. SLIMANI Miloud	Professeur	Université de Saida	Président
M. ADLI Djallal Eddine Houari	MCA	Université de Saida	Examineur
M. HALLA Noureddine	MAA	Université de Saida	Promoteur

Année universitaire 2018-2019

Introduction

Dans une société où les modes et les tendances sont maîtresses, les produits cosmétiques doivent séduire. Aussi, alors que le retour au naturel s'impose largement, l'industrie cosmétique doit s'adapter. A cela s'ajoute l'évolution des réglementations qui au fil des modifications, obligent à revoir des produits ou à développer de nouveaux tests. C'est ainsi que des réglementations ont vu le jour afin d'encadrer le développement des produits naturels et biologiques. Une intense concurrence oblige à innover constamment et très rapidement.

Des conservateurs de synthèses tels que les parabènes remplissent leur rôle avec succès depuis de nombreuses années, une polémique mettant en cause leur innocuité ainsi qu'une récente révision de la réglementation obligent les scientifiques et les industries concernés à chercher des alternatives. Ce projet a donc été instauré afin de trouver des alternatives naturelles aux conservateurs de synthèse. Le but est d'apporter des réponses aux évolutions de la réglementation et aux demandes des consommateurs. De plus, ce projet a pour objectif de valoriser le patrimoine végétal et de créer de nouvelles filières végétales. En effet, les végétaux ont la capacité de s'adapter à leur environnement en développant par exemple des systèmes de défense pour résister à l'attaque microbienne.

Dans le cadre de trouver des alternatives naturelles aux conservateurs, Nous nous sommes intéressés à étudier les propriétés souhaitées de la plante *Lippia citriodora* provenant de la région de Djelfa. La verveine (*Lippia citriodora*), herbe aromatique de la famille des Verbenaceae, appréciée pour ses propriétés aromatiques, antioxydantes, antimicrobiennes, antispasmodiques, antidépressive, sédative, largement utilisée dans les produits pharmaceutiques et en médecine traditionnelle (**Lenoir, 2001**).

Notre choix est porté sur cette plante aromatique, car elle est très répandue en Algérie et largement utilisée en médecine traditionnelle. Notre étude est présentée en deux parties. La première est réservée à la synthèse bibliographique. Cependant, la deuxième est conçue pour la partie expérimentale.

Dans le premier chapitre, des généralités sur les produits cosmétiques sont présentées. Ensuite, dans le deuxième chapitre un rappel sur les conservateurs généralement utilisés et autorisés est ajouté. Après, dans le troisième chapitre nous avons abordé l'utilisation de substances naturelles aux propriétés antimicrobiennes en cosmétique. Finalement, le dernier chapitre est consacré à la présentation de la plante étudiée, *Lippia citriodora*.

Introduction

Dans la deuxième partie, nous présentons le matériel et les méthodes utilisées pour la réalisation de ce travail. Quant au quatrième chapitre, nous présenterons les différents résultats obtenus et leurs discussions. Nous terminerons par une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus et des recommandations.

Synthèse Bibliographique

Chapitre I :
Généralités sur les produits
cosmétiques

1. Définition d'un cosmétique :

La définition d'un cosmétique est décrite par le Règlement Européen du 30 Novembre 2009. On entend par produit cosmétique « toute substance ou préparation destinée à être mise en contact avec les diverses parties superficielles du corps humain, notamment l'épiderme, les systèmes pileux et capillaires, 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. »(Article L. 5131-4).

Le produit cosmétique est distingué au médicament grâce à plusieurs notions, on parle de mise en contact et non d'administration. Le produit cosmétique est destiné à nettoyer, parfumer. .. et non à restaurer, corriger ou modifier une fonction organique. C'est d'ailleurs le critère essentiel qui distingue ces deux éléments ce qui justifie l'innocuité qu'on exige du cosmétique par opposition à l'effet thérapeutique du médicament. Le produit cosmétique ne doit « pas nuire à la santé », son action reste donc superficielle et n'a pas d'action sur les fonctions organiques (Article L. 5131-4).

2. Différentes catégories des produits cosmétiques:

Dans ce règlement européen, il est possible d'identifier, grâce aux Annexes, une liste des catégories des produits cosmétiques. Nous retrouvons dans cette liste les produits suivants :

- Crèmes, émulsions, lotions, gels et huiles pour la peau (mains, visage, pieds) ;
- Masques de beauté ;
- Fonds de teint (liquides, pâtes, poudres) ;
- Poudres pour maquillage, poudres à appliquer après le bain, poudres pour l'hygiène corporelle ;
- Savons de toilette, savons déodorants ;
- Parfums, eaux de toilette et eaux de Cologne;
- Préparations pour le bain et la douche (sels, mousses, huiles, gel);
- Dépilatoires;
- Déodorants et antiperspirants;

- Produits de soins capillaires:
- Les colorants capillaires;
- Produits pour l'ondulation, le défrisage et la fixation;
- Produits de mise en plis;
- Produits de nettoyage (lotions, poudres, shampooings);
- Produits d'entretien pour la chevelure (lotions, crèmes, huiles);
- Produits de coiffage (lotions, laques, brillantines);
- Produits pour le rasage (savons, mousses, lotions et autres produits);
- Produits de maquillage et démaquillage du visage et des yeux;
- Produits destinés à être appliqués sur les lèvres;
- Produits pour l'hygiène dentaire et buccale;
- Produits pour les soins et le maquillage des ongles;
- Produits pour les soins intimes externes;
- Produits solaires;
- Produits de bronzage sans soleil;
- Produits permettant de blanchir la peau;
- Produits antirides.

Cette annexe permet d'orienter le classement des produits dans la catégorie des cosmétiques ou non, et délimite un champ d'application de ces derniers. Elle peut servir pour aider à savoir si pour un produit il s'agit d'un médicament ou d'un cosmétique. (CE, 2009)

3. Composition des produits cosmétiques:

La forme finale d'un produit cosmétique résulte du mélange d'ingrédients judicieusement choisis et associés, appartenant à trois grandes familles de composés :

- Le principe actif qui définit l'efficacité du produit cosmétique.
- L'excipient, qui définit la forme finale du produit et vectorise les actifs.
- Les additifs, qui contribuent à l'amélioration des propriétés du produit (Martini, 2003)

3.1. Le principe actif:

L'activité et l'efficacité ciblées des produits cosmétiques dépendent tout particulièrement du ou des principes actifs introduits. Le pourcentage en actifs est généralement de 2 à 3 %. Les activités les plus revendiquées par le secteur sont l'hydratation des agents humectants, filmogènes, occlusifs), les effets anti-âge (anti- rides, antioxydants) et photoprotecteurs (anti-UVA et UVB) (Martini, 2003).

3.2. Les excipients :

Ils se trouvent sous forme d'émulsion fluide ou épaisse, émulsion huile/eau ou eau/huile... qu'ils donnent la texture du produit. Ils participent en particulier à la pénétration de l'actif dans l'épiderme, au dépôt des actifs sur les fibres capillaires, sur les dents, etc... Il peut être de nature hydrophobe (huiles, cires, acides et alcools gras, gélifiants), hydrophile (gélifiants) ou amphiphile (tensioactifs) (Laforgue, 2006)

3.3. Les additifs:

Les additifs regroupent les ingrédients ayant pour objectif de conserver, parfumer, colorer le produit cosmétique. Les conservateurs ont pour but d'empêcher la prolifération des microorganismes. Aujourd'hui, ils sont majoritairement d'origine synthétique, mais de plus en plus de « conservateurs » d'origine naturelle sont présents dans les cosmétiques. Les parfums sont des compositions liposolubles de substances odorantes, participant au plaisir de utilisation du produit. Ils apportent également une spécificité propre au produit dont l'utilisateur se souvient. De plus, certaines substances parfumantes (huiles essentielles) peuvent présenter une activité. Les colorants confèrent au produit une couleur adaptée et un aspect plus attractif (Martini, 2003).

4. Caractérisation des produits cosmétiques

4.1. Caractérisation physique :

a. Apparence :

L'évaluation et la description de l'apparence constituent l'un des tests les plus faciles, les plus pratiques et néanmoins les plus puissants. Elle peut être réalisée de manière macroscopique, en décrivant la couleur, la netteté, la transparence, la turbidité et l'état de la matière. En outre,

un examen microscopique est recommandé (**Audrey, 2014**).

b. Propriétés rhéologiques (viscosité, consistance):

Elles sont des caractéristiques importantes de la plupart des types de produits cosmétiques de soin, car elles ont un impact sur la préparation, le conditionnement, le stockage, l'application et la distribution des actifs. Ainsi, ces propriétés doivent être évaluées pour la caractérisation et le contrôle de la qualité du produit. La plupart des systèmes dispersés et donc des produits de soins cosmétiques présentent un comportement à l'écoulement non newtonien, à savoir un comportement pseudoplastique, plastique ou dilatant (**Audrey, 2014**).

c. Le pH :

La mesure du pH (concentration d'ions hydrogène) dans des véhicules aqueux (solutions, suspensions, émulsions H/E, gels) est un moyen de contrôle précieux. Tout d'abord, si possible, une valeur de pH dans la plage physiologique est généralement visée, idéalement similaire à celle de la peau ou du site d'application spécifique, afin de prévenir les irritations. De nombreuses réactions et processus dépendent du pH, efficacité des conservateurs antimicrobiens, stabilité et dégradation des substances et solubilité (**Audrey, 2014**).

d. Homogénéité :

Dans de nombreux cas, l'homogénéité peut être évaluée de manière visible dans un premier temps. La précipitation dans une solution ou une séparation de phase distincte dans une émulsion est facilement détectée. Les systèmes multiphasiques non transparents sont plus difficiles à vérifier. Dans ces cas, il est suggéré d'analyser au microscope des échantillons représentatifs, ainsi que des dosages quantitatifs concernant les principes actifs (uniformité du contenu) (**Audrey, 2014**).

e. Taille et distribution des particules ou de gouttelettes :

La stabilité physique des systèmes colloïdaux et des émulsions ou suspensions dépend partiellement de la taille des particules. En particulier, les compositions contenant de petites particules sont plus résistantes à la floculation et à la sédimentation que les systèmes contenant des entités plus grosses ou non chargées. De même, la stabilité cinétique des émulsions ou des suspensions. Pour cette raison, la détermination de la taille des particules est une méthode de caractérisation importante (**Audrey, 2014**).

4.2. Caractérisation chimique :

Outre la caractérisation physique, des investigations chimiques sont indispensables pour évaluer la qualité d'un produit. Il est bien connu que la qualité et la composition d'un produit cosmétique peuvent influencer sur la stabilité chimique des ingrédients. De nombreuses réactions, telles que l'hydrolyse ester ou d'autres dégradations, peuvent être améliorées ou prolongées par le changement de pH, la présence d'agents catalytiques ou stabilisants, respectivement. Ainsi, le développement et la sélection optimale du meilleur véhicule sont soutenus par des études de stabilité chimique (Audrey, 2014)

5. Exemple d'un produit cosmétique 'Le shampoing' :

Les shampoings actuels ont été élaborés au cours des années soixante. Ils contiennent de 10 à 30 ingrédients. Un premier groupe est constitué des détergents, un second des substances auxiliaires tandis qu'un troisième contient des ingrédients actifs qui remplissent des fonctions particulières. Les détergents doivent remplir différentes fonctions et répondre à de nombreux critères. Ils doivent laver de manière efficace, quelle que soit la dureté de l'eau, ne pas aggraver la peau et les muqueuses, mousser de manière agréable, supporter un pH neutre ou légèrement acide, être compatibles avec les autres ingrédients, être biodégradables, ne pas produire de charge statique... (Marie, 2011)

Parmi les détergents anioniques, ce sont les sulfates d'alkyles qui sont les plus couramment utilisés avec les sulfates d'éthers d'alkyles et les carboxylates d'éthers d'alkyles utilisés en présence des précédents ou de détergents amphotères. Les substances auxiliaires que l'on ajoute aux shampoings augmentent leurs performances ou remplissent un but précis. On ajoute des polydiméthylsiloxanes pour améliorer le coiffage, des hydrolysats de protéines pour réduire le potentiel irritant des détergents ioniques, des esters de l'acide sulfosuccinique pour leurs propriétés moussantes, des agents regraissants pour réduire l'effet dégraissant du lavage, des hydratants tels les polyols, des agents épaississants de manière à ajuster la viscosité de l'ensemble, tels les alcanolamides, des agents conservateurs comme un ester de l'acide p- hydroxybenzoïque, des agents complexants (EDTA), des absorbeurs UV, des antioxydants, des agents tamponnants... (Mathieu et Viviane, 2003).

Tableau 1: Composition d'un shampoing (Mathieu et Viviane, 2003).

Ingrédients	% Shampoing normal	% Shampoing journalier	
Sulfate d'éther d'alkyle (28%)	50	40	Détergent
Amidopropylbétaine (30%)	-	5	Détergent
Ester de l'aide sulfosuccinique(30%)	-	5	Agent moussant
Hydrolysat de protéine (30%)	5	5	
Alcanolamide	3	3	Épaississant et hydratant
Propylène glycol*	1	1	Hydratant
Ingrédients auxiliaires, eau	Ad 100		

Chapitre II:

Conservation des produits cosmétiques

1. Définition d'un conservateur :

L'annexe VI de la Directive Européenne fixe la liste des conservateurs autorisés dans les produits cosmétiques ainsi que leurs concentrations maximales d'utilisation. Les conservateurs se définissent comme des substances naturelles ou synthétiques qui protègent un produit de la contamination microbienne (bactéries, moisissures et levures) et de l'oxydation (rancissement des graisses). Il est nécessaire d'ajouter un conservateur à chaque produit cosmétique afin de lutter contre les proliférations bactériennes et fongiques. Leur action consistant à éliminer les microorganismes, n'est pas inoffensive au contact de notre peau. Ils entraînent des irritations cutanées, des allergies voire des toxicités. Bien que la législation prévoit des concentrations maximales d'emploi pour chaque conservateur, certains laboratoires additionnent les différents conservateurs à leur dose maximale autorisée de façon à augmenter la couverture antimicrobienne. Malheureusement les réactions indésirables augmentent elles aussi. Certains produits peuvent tout de même être commercialisés sans conservateur, comme les huiles essentielles où, en présence uniquement d'antioxydants naturels (voire d'alcool avec toutes les interrogations que cela soulève chez les nourrissons particulièrement)(Friedrich, 2008).

2. Différents types des conservateurs:

Il existe deux catégories des conservateurs utilisés en cosmétiques, la première est pour empêcher la prolifération microbienne, cependant, la deuxième pour stopper l'oxydation dans les produits cosmétiques.

2.1. Conservateurs antimicrobiens:

Nous pouvons citer : acide sorbique (fongicide), acide déhydroacétique(fongicide), acide benzoïque (fongicide), les esters de l'acide parahydroxybenzoïque(Parabens) (fongicides et bactéricides), acide salicylique (fongicide et bactéricide), le formol (fongicide etbactéricide), chlorure de benzalkonium(fongicide etbactéricide), le triclosan(fongicide etbactéricide), la chlorhexidine(fongicide etbactéricide), et le glutaraldéhyde : (fongicide et bactéricide). (Friedrich, 2008).

Les parabens sont les plus utilisés dans la conservation des cosmétiques. Ils sont fabriqués à partir de l'acide benzoïque, et souvent mélangés à un solvant également conservateur le phénoxyéthanol. Ce sont des allergènes à pouvoir allergisant modéré. Leur utilisation est controversée car ils sont cancérigènes à haute dose chez le rat, cependant il n'a jamais été

prouvé qu'ils soient cancérigènes pour l'homme. L'emploi d'ingrédients classés cancérigènes est d'ailleurs interdit dans la fabrication des cosmétiques (**Friedrich, 2008**).

2.2. Conservateurs antioxydants :

En raison de la composition cosmétique émulsifiée, il est essentiel de penser que l'apparence et l'odeur de la composition soient agréables. Pour conserver la composition et prévenir les développements malodorants, un agent antioxydant est inclus dans la composition cosmétique tels que : acide ascorbique (vitamine C), les huiles essentielles (thym, carvi, romarin...), le BHA (butylhydroxyanisole) et le BHT (butyl hydroxy toluène) (**Friedrich, 2008**).

3. Rôle des conservateurs dans les produits cosmétiques:

Les conservateurs jouent plusieurs rôles dans la protection des produits cosmétiques. Ils permettent tout d'abord la protection des produits cosmétiques des contaminations pouvant être apportées lors de leur production par : les matières premières (principes actifs, eau, colorants...) ; les articles de conditionnement ; l'atmosphère des locaux ; et ainsi le personnel (**Davidson, 2007**).

Or, les contaminations génèrent la dégradation anticipée du produit cosmétique, le rendant inapte à l'utilisation, voire dangereux pour le consommateur. Ils ont également un rôle de protection lors de l'utilisation du produit par le consommateur qui le pollue lors du prélèvement. La majorité des produits cosmétiques doivent donc contenir des conservateurs. Néanmoins, selon leur nature, composition, packaging, leur présence et concentration ou peuvent être très différentes. Certains produits font exception et ne nécessitent pas de conservateur. C'est le cas par exemple des lotions alcooliques dont la concentration en supérieure à 20% (**Kerdudo, 2014**).

4. Toxicité des conservateurs:

Les conservateurs utilisés dans les cosmétiques constituent une source importante de dermatite de contact allergique. Il existe un lien direct entre l'effet antimicrobien et la capacité à induire une sensibilité de contact. Ceci peut expliquer le fait que les conservateurs les plus efficaces sont souvent ceux qui possèdent le potentiel de sensibilité le plus important. Les conservateurs représentent, après les parfums, le deuxième grand groupe d'allergènes les plus fréquemment incriminés dans l'allergie aux cosmétiques parmi ces agents de conservation les plus problématiques sont le formaldéhyde et les agents libérant du formaldéhyde. L'utilisation

de formaldéhyde libre, dont les propriétés bactéricides et fongicides en font une substance de choix (Najma et al., 2005)

La conservation des produits cosmétiques a été réduite en raison de la mauvaise presse qu'elle a reçue en tant qu'agent irritant, sensibilisant et potentiellement cancérigène (Mustapha et al. 2010).

5. Alternatifs aux conservateurs :

5.1. Activité de l'eau (a_w):

L'activité de l'eau correspond à la mesure des molécules d'eau non complexées à d'autres molécules présentes dans la formule (Fourniat, 2006) .

Pour se développer de manière optimale, les microorganismes doivent être en présence d'eau libre en quantité suffisante. Généralement, une diminution de l' a_w entraîne donc un net ralentissement de la croissance microbienne (NF EN ISO 29621).

Ainsi, des produits tels que le talc ou des déodorants sticks, relativement anhydres, ne nécessitent pas que des conservateurs y soient ajoutés. Les industriels choisissent souvent d'en incorporer afin d'éviter toute contamination inhérente au consommateur. Ce dernier peut en effet ajouter de l'eau au produit par inadvertance (Kabara, 1996).

Chaque espèce de microorganisme étant spécifique, la valeur minimale de l' a_w pour laquelle la multiplication cellulaire peut avoir lieu varie. Typiquement, les levures et moisissures peuvent se développer à des valeurs d' a_w plus faibles que les bactéries (Ryan, 2003)

Le **Tableau 02** donne quelques valeurs minimales d' a_w pour la croissance de microorganismes spécifiques pour la cosmétique. Il faut cependant noter que ces valeurs peuvent varier en fonction de nombreux facteurs spécifiques à la formulation et au conditionnement.

Tableau 1: Valeurs d' a_w minimales permettant la croissance des microorganismes représentatives, à 25°C (Kabara, 1996)

	Microorganismes	A_w minimale
Bactéries	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,97
	<i>Esherichia coli</i>	0,95
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,86
Moisissures	<i>Aspergillusniger</i>	0,77
	<i>Candida albicans</i>	0,87

Ainsi, la diminution de l' a_w d'une formulation permet une protection contre la multiplication des microorganismes mais ne permet pas la destruction d'une population contaminante, comme peuvent le faire des conservateurs microbicides. Ainsi, si des microorganismes sont introduits dans le produit au moment de la fabrication (matières premières contaminées, mauvais nettoyage du matériel de fabrication...), ils resteront présents dans le produit fini. Un produit cosmétique qui serait uniquement conservé selon le facteur 'activité de l'eau' doit donc être fabriqué dans des conditions de fabrication strictes et être conditionné dans un packaging approprié (Kabara, 1996).

5.2. Bonnes pratiques de fabrication (BPF) :

L'hygiène des locaux est primordiale et facilitée par des surfaces lisses et non absorbantes. Il faut particulièrement veiller aux tuyauteries apparentes et difficiles à atteindre, aux courants d'air, au taux d'humidité ainsi qu'aux eaux stagnantes qui peuvent devenir des sources de contamination. Il est nécessaire de privilégier des matériaux de fabrication en acier inoxydable. Un choix judicieux des tuyauteries et robinetteries, à nombre limité de coudes par exemple, limitera les risques. Afin d'optimiser les décontaminations, les nettoyages à l'aide de détergent germicides (bactéricides et fongicides) sont à privilégier. Le personnel opérant doit également porter une tenue adaptée et répondre à des normes d'hygiène strictes afin de véhiculer un minimum d'agents contaminants (Fourniat, 2006).

Les matières premières utilisées dans la fabrication des produits peuvent contenir des

microorganismes et contaminer le produit in situ. L'eau est ainsi la source première de contamination et sa propreté microbiologique doit être scrupuleusement vérifiée. De plus, des produits d'origine végétale tels que les poudres végétales, les extraits, les gommes, les alginates, ... Ou encore d'origine tellurique telles que les argiles, mais également certains colorants, agents de surface, Peuvent être porteurs de germes et contaminer le produit fini. Il est donc nécessaire que les tests de contrôle de la qualité microbiologique de ces ingrédients soient rigoureusement appliqués(**Fourniat, 2006**).

5.3. Conditionnement:

Le choix du conditionnement est d'une importance cruciale lorsque le souhait du fabricant est d'optimiser la conservation du produit fini. En effet, une fois fabriqué et conditionné, les sources de contaminations majeures d'un produit sont les contacts répétés entre le produit et le doigt du consommateur, l'air et l'eau. De même, une température de conservation élevée (par exemple dans les salles de bains) pourra favoriser la multiplication des germes. La contamination peut avoir lieu alors que le consommateur prélève le produit dans le tube ou le pot, packaging nécessitant un contact direct du produit avec l'air et avec le doigt de l'utilisateur, chargé de microorganismes. Ainsi, des packagings spécifiques ont été élaborés afin de limiter au maximum la pénétration des microorganismes dans le contenant. De nombreux packaging permettent de protéger, avec plus ou moins d'efficacité, le produit fini de la contamination microbienne avant et après ouverture (**Kerdudo, 2014**)

Chapitre III :

Utilisation des extraits naturels dans la conservation des produits cosmétiques

Parmi les extraits naturels possédant un potentiel antimicrobien, on peut distinguer les huiles essentielles, les extraits aux solvants et certaines huiles végétales. Ils sont tous obtenus à partir de matières premières végétales mais selon des méthodes d'extraction plus ou moins sophistiquées et innovantes définissant le type de molécules extraites (volatiles ou non par exemple), ainsi que la forme finale (liquide, poudre, pâte...). La plupart des végétaux développent, au cours de leur croissance, des mécanismes de défense contre les attaques et stress environnementaux. Ils produisent alors des molécules les rendant résistants à ces phénomènes, notamment des molécules antibactériennes et antifongiques. Ces molécules et activités associées sont retrouvées dans les extraits végétaux (**Fernandez, 2012**)

1. Huiles essentiels:

Ce sont des extraits volatiles et odorants que l'on extrait de certains végétaux par distillation à la vapeur d'eau, pressage ou incision des végétaux qui les contiennent. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous-produits du métabolisme secondaire. Les huiles essentielles sont des composés liquides très complexes. Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie qui est l'aromathérapie (**Benayed, 2008**).

Au point de vue chimique, il s'agit de mélanges extrêmement complexes. Les Huiles essentielles (HE) sont constituées de différents composants comme les terpènes, esters, cétones, phénols, et d'autres éléments (**Benayed, 2008**).

Les HE doivent leur nom à ce qu'elles sont très réfringentes, hydrophobes et lipophiles. Elles ne sont que très peu solubles ou pas du tout dans l'eau et on les retrouve dans le protoplasme sous forme d'émulsion plus ou moins stable qui tend à se collecter en gouttelettes de grosse taille. Par contre, elles sont solubles dans les solvants (acétone, sulfure de carbone, chloroforme, etc.) des lipides et, à l'inverse des glycérides, dans l'alcool. Mais à ces caractères de solubilité se limite la ressemblance avec les huiles grasses.

Si les HE forment végétales sont très volatiles (contrairement aux résines qui, habituellement dissoutes dans les essences, laissent un résidu visqueux ou solide après évaporation des essences). Grâce à cette propriété, les essences végétales diffusent rapidement au travers des épidermes, même à travers des cuticules épaisses et se répandent dans l'atmosphère. Ce caractère, 20 associé à la propriété qu'ont la plupart des essences végétales de posséder une

odeur très prononcée, et souvent agréable, les rend responsables de l'odeur caractéristique de nombreux végétaux odoriférants (**Benayed, 2008**)

1.1. Mode d'obtention:

Le mode d'obtention de l'huile essentielle va différer selon la plante ou la partie de la plante utilisée. Selon la 7^{ème} édition de la Pharmacopée Européenne, l'obtention de l'huile essentielle s'effectue soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage (expression à froid). Il existe cependant d'autres méthodes : l'extraction par hydrodistillation, par solvant organique volatil, à l'eau surchauffée, au CO₂ supercritique, par ultrasons et par micro-ondes (**Lucchesi et al., 2007**).

1.1.2. Par entraînement à la vapeur d'eau :

A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter (**Figure 1**). De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse, la matière végétale située au-dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile essentielle (**Bruneton, 2009**).

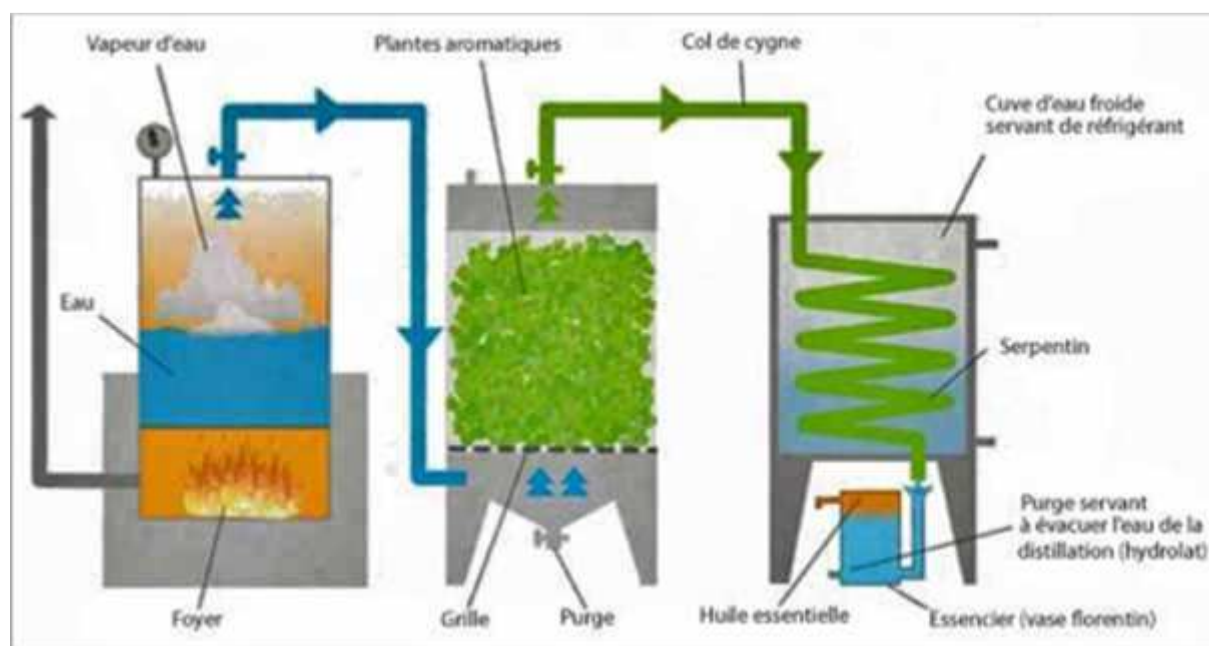


Figure 1: Distillation par entraînement à la vapeur (Aromatherapia,2013)

1.1.3. Par distillation sèche :

La distillation « sèche », aussi appelée distillation destructive, est utilisée pour la séparation des produits chimiques liquides contenus dans des matériaux solides. On peut ainsi obtenir, à partir du bois, par calcination, de la créosote (mélange de phénols), de l'alcool méthylique et de nombreux autres produits. En revanche, rares sont les documents se rapportant à la distillation sèche en tant que méthode d'extraction de composés aromatiques volatils. Pourtant, il s'agit d'une méthode d'extraction des huiles essentielles caractéristique des végétaux fragiles tels que les pétales de rose. Dans le domaine de l'extraction végétale, la distillation sèche consiste à chauffer de façon très modérée les plantes ou parties de plantes sans ajout d'eau ni de solvants organiques, puis à condenser les substances volatiles. L'avantage de cette méthode est la température à laquelle se déroule l'extraction : inférieure à 100°C, ce qui évite la dénaturation de certaines molécules thermosensibles. La figure 26 représente les montages de distillation sèche utilisés pour l'isolement de l'huile essentielle de rose par distillation sèche. Mais si cette technique présente un avantage certain au niveau de la qualité, elle aboutit cependant à des rendements extrêmement faibles en huile essentielle (Kapetanovic, 1984).

1.2. Propriétés et activités biologiques des huiles essentielles:

Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie l'aromathérapie. Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses, cependant, elles possèdent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants tant qu'agents antimicrobiens à large spectre (**Benayed, 2008**).

Les phénols (carvacrol, thymol) possèdent le coefficient antibactérien le plus élevé, suivi des monoterpénols (géraniol, menthol, terpinéol), aldéhydes (néral, géranial), etc. Les virus donnent lieu à des pathologies très variées dont certaines posent des problèmes non résolubles aujourd'hui, les HE constituent une aubaine pour traiter ces fléaux infectieux, les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques. Les mycoses sont d'une actualité criante, car les antibiotiques prescrits de manière abusive favorisent leur extension, avec les HE on utilisera les mêmes groupes que ceux cités plus haut, on ajoutera les sesquiterpéniques et les lactones sesquiterpéniques. Par ailleurs, les mycoses ne se développent pas sur un terrain acide. Ainsi il faut chercher à alcaliniser le terrain. Le groupe des phénols possède une action puissante contre les parasites (**Benayed, 2008**).

2.3. Propriétés physiques des huiles essentielles :

Malgré leurs différences de constitution, les huiles essentielles possèdent un certain nombre de propriétés physiques communes (**Tableau 03**). Elles sont généralement sous forme liquides à température ambiante et leur grande volatilité les oppose aux "huiles fixes" (lipides). Lorsqu'elles viennent d'être préparées, leurs teintes est généralement comprise dans une gamme allant de l'incolore, à jaune pâle. Il existe toutefois quelques exceptions, comme l'huile essentielle de camomille romaine (*Anthemis nobilis*) qui possède une coloration bleu clair due à la présence du chamazulène (**Ferhat, 1997**).

Leur densité est le plus souvent inférieure à l'unité. Seules 3 huiles essentielles officinales ont une densité supérieure à celle de l'eau: il s'agit des huiles essentielles de cannelle, de girofle et de saffras. Les huiles essentielles possèdent un indice de réfraction souvent élevé et sont douées de pouvoir rotatoire puisque constituées, pour l'essentiel, de molécules asymétriques. Peu solubles dans l'eau, elles lui communiquent cependant leurs odeurs (eaux distillées aromatiques). Elles sont très facilement altérables et sensibles à l'oxydation, mais ne

rancissent pas. Le caractère dorant des huiles essentielles est lié à la volatilité des molécules qui les composent ce qui permet de les obtenir par entraînement à la vapeur d'eau (**Faye et al.,1997**)

Tableau 3: Constantes physicochimiques de quelques constituants volatils (**Kerduo, 2014**).

composés	Masse Molaire (g/mol)	Densité	Volume molaire (cm ³ /mol)
α- pinène	136	0,8580	158,51
β- pinène	136	0,8650	157,23
limonène	136	0,8450	160,95
Acétate de géranyle	196	0,9174	213,65
β- selinène	204	0,9140	223,19
carotol	222	0,9624	230, 67

2. Extraits naturels:

Avec la diminution de l'utilisation des matières premières animales, la consommation en extraits végétaux par l'industrie cosmétique ne cesse de croître chaque année. Paradoxalement, il n'existe pas de définition réglementaire officielle pour qualifier les extraits cosmétiques. Il en résulte donc que la dénomination INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients) d'un extrait peut désigner des produits très différents en termes de technologies d'extraction, de concentration en actif, de test d'efficacité et finalement en termes de prix (**Kerduo, 2014**).

2.1. Mode d'obtention:

Les extraits naturels peuvent être obtenus au moyen de solvants (eau et solvants organiques). Le végétal, généralement haché ou broyé, est mélangé avec un solvant qui a la capacité de solubiliser les métabolites d'intérêt. Une fois les débris végétaux éliminés, le solvant est éliminé (généralement par évaporation sous pression réduite) pour conduire à l'extrait qui se présente sous la forme d'une pâte plus ou moins visqueuse ou d'un solide. Plusieurs solvants peuvent être utilisés. Ils sont le plus souvent organiques (hexane, éther de pétrole, acétate

d'éthyle, éthanol, acétone...). L'éthanol et l'acétone peuvent être utilisés en mélange avec l'eau. Depuis peu, on assiste au développement de l'extraction à l'aide de fluides supercritiques, et plus particulièrement au dioxyde de carbone. En effet, dans des conditions de température et de pression bien précises, ces fluides à l'état supercritique possèdent des propriétés particulièrement intéressantes pour l'extraction. L'extraction assistée par micro-ondes prend également beaucoup d'ampleur ces dernières années. Ces deux derniers exemples s'inscrivent dans le développement de la chimie verte, notamment l'utilisation de solvants verts (éco-solvants). Pour être ainsi définis, les solvants doivent présenter une faible toxicité, être facile à recycler, faciles à éliminer du produit final et présenter une faible réactivité **(Kerduo, 2014)**.

2.2. Propriétés des extraits :

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 (Tableau 4) **(Kerduo, 2014)**.

Tableau 4: exemples d'extraits aux propriétés conservatrices présents sur le marché de la cosmétique (Kerduo, 2014)

Extraits	Noms commerciaux	Actifs	Activité	Fournisseurs
Extrait de lichen (Barbe de Jupiter)	<i>Lichen Herbsasol® Extract PG</i>	Acides usnique et vulpinique	Antimicrobienne	Cosmetochem International
<i>Asparagopsis armata</i> (Algue rouge)	Ysaline® 100 INCI* : <i>asparagopsis armata</i> extract	Composés organiques halogénés	Antimicrobienne (<i>C. albicans</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>V. anguillarum</i> , <i>E. gergiviae</i> , <i>S. aureus</i>)	Algues & Mer
<i>Podocarpus totara</i> (bois de cœur recyclé)	Totarol™ INCI : <i>podocarpus totara</i> wood extract	Totarol (diterpène aromatique C ₂₀ H ₃₀ O)	Antimicrobienne (<i>S. aureus</i>) Antioxydante	Essentially NZ
<i>Citrus grandis</i> (pamplemousse, extrait de pépins)	P50 VTF-0373 INCI : <i>citrus grandis</i> seed extract	Flavonoïdes polyphénoliques	Antimicrobienne Antifongique	Chemie Research & Manufacturing Vege Tech Bio-Botanica
<i>Lonicera japonica</i> - Extrait de chèvrefeuille du Japon (bourgeons)	<i>Plantservative Wsr, WMr</i> INCI : <i>Lonicera Caprifolium</i> extract, <i>Lonicera Japonica</i> extract	Lonicérine (alcaloïde indolique) acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque (parabène) naturel	Antimicrobienne	Campo
<i>Viola Tricolor</i> - Extrait de pensées sauvage	INCI : <i>viola tricolor</i> extract	Flavonoïdes, saponines, acide salicylique, vitamine E	Antimicrobienne	Alban Müller International
<i>Pimpinella anisum</i> - Extrait d'anis	INCI : <i>pimpinella anisum</i> extract	Acide <i>p</i> -anisique	Antimicrobienne	Active Concepts LLC Alban Müller

Chapitre IV :

La plante étudiée : Lippia citriodora
(verveine odorante)

1. Noms communs

Selon **Pierre et Lis (2002)**, *Lippia* vient du nom de lippi, un botaniste du XVIIe siècle, qui laissa son nom gravé pour marquer la plante; le terme citriodora signifie «à odeur de citron». Cette plante possède aussi les noms suivants: Verveine citronnelle, verveine à trois feuilles, thé arabe, herbe Louise.

Selon les recherches de **Bonjean (2001)** la verveine odorante possède plusieurs nominations suivant les langues courantes de chaque pays:

Arabe : لوزة الليمونية

Allemagne: Citronenkraut, Zitronenkraut, Zitronenverbene;

France : Herbe-Louise, Verveine citronnelle, Verveine citronnée, Verveine du Pérou;

Grande Bretagne : Lemonverbena, Herb Louisa, LemonBeebrush, LemonVerbena, Lemon-scentedVerbena;

Italie: Cedrina, Cedronella, Erba-Luigia, Verbenaodorosa;

Espagne: Cedrôn de! Peri, Cidrén, Hierba Luisa, Hierbacidrera;

Nederland: Citroenkruid, Citroenverbena, Lemonverbena.

2. Description botanique et morphologique

La verveine odorante, *Lippiacitriodora*(L'Hérit.) Britton ou *Aloysiacitrodora*(Kunth.), est un sous-arbrisseau de la famille des Verbenaceae, originaire d'Amérique du Sud, introduit et cultivé sur le pourtour méditerranéen (midi de la France et Afrique du Nord). « Il s'agit d'un arbrisseau ramifié dont les tiges anguleuses et cannelées portent des feuilles rudes, courtement pétiolées, verticillées par 3. Les fleurs disposées en épis possèdent 4 pétales soudés à la base en un tube et étalés en 4 lobes bicolores : blancs sur la face externe et bleu violacé sur la face interne » (**Bruneton, 2009**). La verveine odorante est utilisée en herboristerie et en industrie de la parfumerie à cause de l'odeur de citron que dégagent les feuilles broyées. Les rameaux sont récoltés peu avant la floraison, rassemblés en bouquets puis séchés. Les feuilles sont mondées une fois séchées puis consommées en infusion(**Perrot et al., 1974**).

3. Composition en polyphénols de l'infusé de *Lippia citriodora*

Bien que l'infusé de feuilles de verveine odorante soit largement consommé, sa composition qualitative et quantitative en polyphénols est encore mal connue. Une première analyse de sa composition avait été réalisée au laboratoire (Carnat et al.,1999). Cette étude rapporte la présence dans l'infusé de flavonoïdes, principalement la lutéoline 7- diglucuronide, et de dérivés hydroxycinnamiques dont le principal est le verbascoside. Plus récemment, des études ont identifié dans l'infusion de verveine odorante, outre la lutéoline 7-diglucuronide et le verbascoside, des dérivés diglucuronidés d'apigénine et de chrysoériol ainsi qu'un isomère du verbascoside, l'isoverbascoside(Quirantes-Pine et al., 2009)(Figure 02). Par ailleurs, l'instabilité du verbascoside et de son isomère à la chaleur a été soulignée (Biliaet al. 2008). D'un point de vue quantitatif, la concentration en polyphénols de l'infusion de verveine odorante a été évaluée à 675 mg/l dont 24% de flavonoïdes et 76% d'acides phénoliques, la teneur des 2 principaux constituants, lutéoline 7-diglucuronide et verbascoside, étant respectivement de 100 mg/l et 500 mg/l (Carnat et al., 1999).

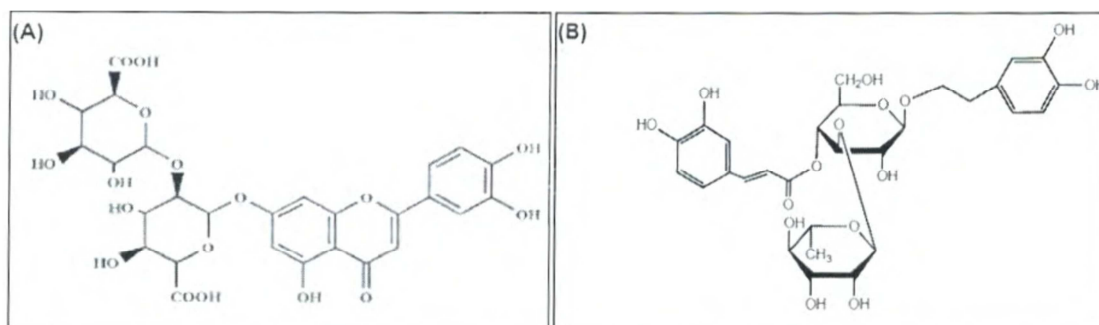


Figure2: Structure des principaux polyphénols présents dans l'infusé de verveine odorante.

(A) lutéoline 7-diglucuronide ; (B) verbascoside(Carnat et al., 1999).

4. Propriétés biologiques de *Lippia citriodora*:

4.1. Propriétés médicinales:

Les parties utilisées de la plante sont les feuilles, fraîches ou séchées. Cette drogue contient une huile essentielle (>0.4% V/m), jaune clair, riche en citral et en flavonoïdes, principalement des flavones 6-hydroxylés et leurs esters méthyliques (slavigénine, eupafoline, hispiduline, etc.). Fraîches et ébouillantées, les feuilles de verveine peuvent être appliquées en compresses sur la joue pour apaiser les maux de dents ou les ulcères variqueux.

Toutefois, elles sont le plus fréquemment infusées à raison de 4 ou 5 feuilles par tasse et offrent alors une tisane au parfum très agréable, rafraîchissante, légèrement excitante, stimulante, anti-spasmodique et digestive. Cette tisane, souvent désignée sous le seul nom de

« Verveine », qui est avant tout une boisson « hygiénique et de confort », est le plus souvent une tisane du soir. Elle est le plus souvent sucrée. Le goût prononcé de la verveine amène également à l'employer en phytothérapie dans des mélanges avec des plantes aux goûts moins agréables. En applications réellement pharmaceutiques (en France, bien que consommée depuis des temps plus anciens, la verveine est en vente libre "officielle" depuis le 4 juillet 1960, - Pharmacopée française, 10^{ème} édition), cette tisane est recommandée pour traiter les indigestions, les flatulences, les gastralgies, la dyspepsie, les névroses, les céphalées, les troubles mineurs du sommeil, les bourdonnements d'oreille, l'asthénie, les vomissements de sang, les attaques cardiaques et épileptiques et les acouphènes, en infusion (5 à 10 grammes de feuilles dans un demi-litre d'eau bouillante, pendant dix minutes) à raison de 3 à 4 tasses par jour durant trois semaines au maximum. La verveine odorante est également considérée comme vasculotrope : elle aurait un effet vasodilatateur artériel intéressant dans les cas d'artériosclérose ; de plus, elle présenterait un effet tonique et décongestif pour la circulation veineuse (varices, jambes lourdes, hémorroïdes, etc.). Elle est parfois aussi donnée comme fébrifuge, anti-inflammatoire, antinévralgique, antispasmodique, cicatrisant, décongestif veineux, désinfectant et tonique. Il est également signalé qu'une utilisation exagérée de cette infusion peut provoquer des troubles gastriques chez certains sujets. En aromathérapie, l'huile essentielle est utilisée dans le traitement de problèmes nerveux et digestifs, ainsi que pour l'acné et les ulcères (**Bonjean, 2001**).

4.2. Propriétés antioxydants de l'infusé de *Lippia citriodora* :

Etant donnée la composition en polyphénols de l'infusé de verveine odorante, certaines études se sont intéressées aux effets antioxydants de cet infusé. Des analyses menées *in vitro* à l'aide de différents tests ont permis de montrer les propriétés antioxydantes de l'infusé. L'infusé de verveine odorante et le verbascoside se sont révélés plus actifs que le Trolox lors d'un test au DPPH (Biliaet al., 2008). L'infusé a une forte activité de piégeage du radical superoxyde et une activité plus modérée vis-à-vis du radical hydroxyle et de l'acide hypochloreux (Valento et al., 2002).

A forte concentration, un effet prooxydant a par ailleurs été rapporté (Valentaet al., 2002). Un extrait de verveine odorante standardisé à 25% de verbascoside a montré une forte activité antioxydante dans un milieu lipophile, ce qui pourrait indiquer une capacité à piéger les radicaux libres au niveau des membranes biologiques (Funeset al, 2009). De même, cet extrait ainsi que le verbascoside lui-même inhibent la peroxydation lipidique *in vitro*. Ces effets antioxydants de la verveine odorante ont également été observés *ex vivo* sur du plasma de rats ayant préalablement consommé un extrait de verveine odorante. Le pic plasmatique de concentration en verbascoside est corrélé à l'activité antioxydante plasmatique maximale (Funes, 2009).

Partie expérimentale

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 Saida.

1. Matériel

1.1. Matériel végétal :

La plante étudiée, *Lippia citriodora*, a été achetée chez un herboriste locale (Saida). L'origine de cette plante est la wilaya de Djelfa (**figure 4**) dont les paramètres géographiques de cette région sont représentés dans le **tableau 05**.

Tableau 5: Situation géographique (Encarta, 2009).

Station	Djelfa
Latitude	33°et 35' Nord
Altitude	901 m
Superficie	542,17 km ²
Zone climatique	Semi aride



Figure 4: Situation géographique de la zone d'étude (A.N.A.T., 2009).

La récolte de la plante a lieu durant le mois de septembre 2018. Les différents organes du matériel végétal (feuilles, tiges et fleurs) ont été séchés à l'ombre, à l'abri de l'humidité et à une température ambiante pendant quelque jour. La plante est en suite ramenée au laboratoire où elle a subi divers traitements (nettoyage, cassage des tiges).



Figure 5 : feuilles séchées de *Lippiacitriodora*

1.2. Microorganismes

Six bactéries et trois levures ont été l'objet de l'étude de l'activité antibactérienne et antifongique (**Tableau 06**). La conservation des souches bactériennes se fait dans des tubes de gélose nutritive inclinée et Les levures dans des tubes de sabouroud gélosé inclinée à une température de 4°C.

Bactéries: Dans les tubes à essai stériles contenant 5ml de milieu BN ajouter les gouttes de bactéries dans chaque tube, après garder les tubes en incubation à 37 C° pendant 24h. Les six souches bactériennes conservées sontensemencées dans des boîtes de Pétri contenant 15ml de gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 24h, afin de stimuler leur croissance (**CLSI-M7-A7, 2006**).

Levures : Dans les tubes à essai stériles contenant 5ml de milieu sabouraud ajouter les

gouttes de levures dans chaque tube, après garder les tubes en incubation à 25n C° pendant 24h. Les levures sontensemencées par la méthode des stries sur milieu Sabouraud en boîtes de Pétri. Ces dernières sont incubées à 25°C pendant 48h (CLSI-M27-A2, 2002).

Tableau 06 : Les différents microorganismes utilisés.

	Microorganisme	Référence	
Bactéries	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Gram +
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115	Gram+
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	Gram+
	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311	Gram -
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25933	Gram-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Gram-
Levures	<i>Candida albicans</i>	ATCC 26790	
	<i>Candida albicans</i>	IP444	
	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	

2.Méthodes :

2.1.Etude ethnopharmacologique :

La plante *Lippia citriodora* provenant de la région de Djelfa. La verveine (*Lippia citriodora*), herbe aromatique de la famille des Verbenaceae, appréciée pour ses propriétés aromatiques, antioxydantes, antimicrobiennes, antispasmodiques, antidépressive, sédative, largement utilisée dans les produits pharmaceutiques et en médecine traditionnelle. Dans le but de définir la proportion et la nature de l’usage de *Lippiacitriodora* et d’évaluer l’impact de son utilisation, une étude transversale descriptive, menée sur 40 personnes choisies au hasard (30 femmes et 20 hommes), a été réalisée au niveau de la wilaya de SAIDA (Ouest d’Algérie) ; à la place, entre Novembre 2018 et Décembre 2019. Les informations recueillies à l’aide d’un questionnaire, établi en français et en arabe ; ont été traitées par le logiciel IBM-SPSS

(logiciel d'analyses statistiques pour les sciences sociales)(**Voir l'annexe**).

2.2. Préparation de l'extrait aqueux :

La préparation de l'extrait aqueux est réalisée par la décoction. Cette méthode d'extraction a été choisie selon l'étude ethnopharmacologique. Une quantité de 15 g de la plante séchée et broyée a fait l'objet d'une ébullition à 100°C pendant 02 heures avec 250 ml d'eau distillée dans un ballon de 500 ml surmonté d'un réfrigèrent pour permettre la condensation des vapeurs (**figure 6**).Une fois la décoction est terminée, le mélange a été filtré à l'aide d'un papier filtre et le filtrat a été récupéré et gardé dans un four à 50 C° pendant 5jours pour l'évaporation.



Figure 6: Montage utilisé pour la décoction du matériel végétal

Calcul des rendements en extrait secs :

Le pourcentage de rendement de la plante en extrait sec a été calculé par la formule suivante:

$$\text{Rdt \%} = [(P_1 - P_2) / P_3] \times 100$$

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

2.3. Tests photochimiques :

L'un des buts essentiels d'un test phytochimique consiste à la détection des différentes familles de métabolites secondaires existant dans la partie étudiée de la plante par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés ainsi que des examens en lumière ultraviolette (**Hagerman et al., 2000**).

2.3.1. Les alcaloïdes

Les tests ont été réalisés par des réactions de précipitation avec les réactifs de Mayer, de Wagner et Dragendorff. 6 mL de chaque extrait sont évaporés à sec, le résidu est repris par 5 mL d'HCl 2N. Dans trois tubes à essai contenant 1 mL du filtrat, nous avons ajouté 5 gouttes de réactif de Mayer dans le premier tube, 5 gouttes du réactif de Wagner dans le second tube et 5 gouttes du réactif de Dragendorff dans le troisième tube, l'apparition d'un précipité blanc, brun et orange, respectivement, révèle la présence d'alcaloïdes (**Dohou et al., 2003**).

Réactif de Dragendorff : (Tétraiodobismuthate de potassium) ou appelle aussi réactif à l'iodobismuthate de potassium : Solution A : 0.5g de bismuth nitrate ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) dissous dans 20 ml d'acide acétique 20% ; Solution B : 5ml de KI préparée à 40% dans l'eau distillé ; A et B sont mélangé et Ajuster à 100ml par l'eau distillé.

Réactif de Mayer : Solution A : 1.358g de chlorure de mercure HgCl_2 sont dissous dans 60 ml d'eau distillée ; Solution B : 5g d'iodure de potassium KI sont dissous dans 10ml d'eau distillée ; Les solutions A et B sont mélangées extemporanément et le volume final est ajusté à 100ml avec d'eau distillée.

Réactif de Wagner : 2g de KI et 1,27g de I sont dissous dans 75ml d'eau distillée, puis ajustés à 100ml avec d'eau distillée.

2.3.2. Les substances polyphénoliques :

a. Tanins :

Dans un tube à essai, nous avons introduit 5 ml d'extrait à analyser, ajouter 1mL d'eau et 2 gouttes de solution aqueuse de FeCl_3 diluée à 1%. En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre (**Trease et Evans, 1987**).

- L'apparition d'une coloration vert foncé ou bleue-verte indique la présence des tanins.

- L'apparition d'une coloration vert foncé indique la présence des tanins catéchiques.

- L'apparition de la coloration bleue-verte indique la présence des tanins galliques.

b. Flavonoïdes :

5 ml d'extrait à tester, nous avons 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 (**Cavé, 1993**).

c. Anthocyanes :

Dans 1mL d'extrait, nous avons ajouté 5 mL d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 10% puis de l'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH) à 25%. Si la coloration s'accroît par acidification, puis vire au bleu-violet en milieu basique, cela permet de conclure la présence des anthocyanes(**Debray et al., 1971**).

2.3.3. Quinones :

Les substances quinoniques ont été recherchées par le réactif de Bornstraëgen. 2 mL de chaque extrait est évaporé à sec. Le résidu est trituré dans 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. Une coloration rouge ou violette confirme la présence de quinones (**Cavé, 1993**).

2.3.4. Saponines : Indice de mousse

Dans une série de 10 tubes à essai numérotés de 1 à 10, introduire respectivement 1, 2, 3, ..., 10 ml de la solution à analyser. Ajuster le volume de chaque tube à 10 ml avec de l'eau distillée. Agiter chaque tube dans le sens de la longueur du tube pendant 15 secondes à raison de 2 agitations par seconde. Laisser reposer 15 min et mesurer la hauteur de la mousse produite dans chaque tube. L'indice de mousse (**I**) est calculée par la formule suivante : $I = 1000 / N$ où **N** est le numéro du tube où la hauteur de mousse est égale à 1 cm (**Dohou et al., 2003**).

2.3.5. Stérols et triterpènes : La réaction de Liebermann Buchard.

Evaporer à sec 10 ml de la solution à analyser, le résidu a été dissous dans 5 ml d'anhydride acétique puis 5 ml de chloroforme. A l'aide d'une pipette nous avons ajouté 1 ml de H₂SO₄ concentré au fond du tube sans agiter. On a laissé reposer pendant 30 minutes. La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et une coloration violette de la couche surnageant révèlent la présence de stérols et triterpènes (**Trease et Evans, 1987**).

2.3.6. Composés réducteurs :

Nous avons introduit 2 ml d'extrait dans un tube, ajouter 2 ml de liqueur de Fehling (1 ml réactif A et 1 ml réactif B) et incuber 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. Evaluation de l'activité antioxydante :

Les antioxydants peuvent être définis en tant que composés qui empêchent ou retardent l'oxydation des substances biologiques en empêchant le déclenchement ou la propagation des réactions en chaîne d'oxydation. Ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs (**Gulcin et al., 2010**). Les radicaux libres se définissent comme tout atome ou molécule, neutre ou ionisée, comportant au moins un électron célibataire dans une orbitale externe. Ils sont caractérisés par une grande réactivité chimique et une courte durée de vie. Leurs agressions sur l'organisme sont multipliées sous l'effet de la fumée du tabac, de la pollution, du soleil et d'un effort physique intense (**Zenini, 2012**).

L'activité antioxydante des extraits végétaux traduit leur aptitude à piéger les radicaux libres de l'organisme. En effet, la méthode de réduction du DPPH• a été utilisée pour évaluer l'activité antioxydante de l'extrait aqueux d'*Aloysia citriodora*. Le 2,2-diphényl-1-picryl-

hydrazine (DPPH•) est un radical organique stable de couleur rouge pourpre. En présence des composés antiradicalaires, le radical DPPH• est réduit et change de couleur en virant au jaune, ce qui entraîne une diminution de son absorbance.

Pour la mesure de l'activité, une prise d'essai de 1 ml d'extrait à différentes concentrations est mise en présence de 250 µl d'une solution de DPPH[•] (0.2 mM, préparée dans le méthanol). Le mélange est placé pendant 30 mn à l'obscurité pour réagir et l'absorbance est mesurée à 517 nm contre un témoin négatif (sans extrait). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition, calculés suite à la diminution de l'intensité de la coloration du mélange, selon la formule :

$$PI = (D.O \text{ témoin} - D.O \text{ extrait}) * 100.$$

D.O témoin : absorbance du témoin négatif .

D.O extrait : absorbance de l'extrait.

L'étude de la variation de l'activité antiradicalaire en fonction de la concentration des extraits permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (CI50). Une faible valeur de CI50 correspondant à une grande efficacité de l'extrait (**Brand-Williams, 1995**).

2.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne :

L'activité antibactérienne de l'extrait *Lippiacitriodora* a été évaluée par trois méthodes de référence :

- Technique de diffusion sur gélose Mueller Hinton (bactéries) sabouraud (levures) (méthode des disques)
- Méthode des micro-dilutions sur milieu liquide pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).
- Méthode pour la détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB).

2.5.1. Conservation des souches :

La conservation des souches bactériennes se fait dans des tubes de gélose nutritive inclinée à une température de 4°C.

2.5.2. Préparation des dilutions :

Nous avons préparé une solution mère qui contient 1g d'extrait avec 2 ml DMSO qui a été ensuite filtré aseptiquement à l'aide d'un filtre stérile. 8 dilutions d'extrait de concentrations différentes dans diméthylesulfoxyde DMSO a été préparé(Figure 07) (Tableau 07).



Figure 7: Les dilutions préparées

Tableau 7: Différentes dilutions préparées pour l'activité antimicrobienne

Concentration	L'extrait pur (μ l)	DMSO (μ l)
$\frac{1}{2}$	500	1000
$\frac{1}{4}$	250	1000
$\frac{1}{8}$	125	1000
$\frac{1}{16}$	62,5	1000
$\frac{1}{32}$	31,25	1000
$\frac{1}{64}$	15,6	1000
$\frac{1}{128}$	7,8	1000
$\frac{1}{256}$	3,9	1000

2.5.3. Préparation de l'inoculum :

a. Préparation de pré-culture :

Les tests de l'activité antimicrobienne ont été réalisés à partir des cultures jeunes de (18 à 24 heures) 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 heures à 37°C (bactéries) ou 48 heures à 30°C, un deuxième repiquage a été réalisé sur des boites de pétri contenant de la gélose nutritive, GN (bactéries) ou sabouraud gélose (levures) puis, incubées à 37°C ou 30°C pendant 18 heures ou 24 heures, respectivement (**Hellal, 2011**).

b. 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 UFC/ml, a été réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 625 nm. Selon la standardisation de Mc Farland, nous admettons une DO comprise entre 0.08 et 0.1 correspond à une concentration de 10^8 UFC/ml; la suspension d'inoculum est diluée à 1/100^{ème} dans le milieu de culture pour avoir une concentration de 10^6 UFC/ml. L'ajustement de la charge fongique a été effectué par une cellule Thomas sous un microscope optique (**Hellal, 2011**).

2.5.4. Technique de diffusion sur gélose MuellerHinton (méthode des disques):

a. Activité antibactérienne :

Les boites de Pétri contenant de la gélose sont ensemencées aseptiquement par écouvillonnage. Ensuite elles sont séchées à proximité de la flamme (15 min).Des disques de 6 mm de diamètre préparés à base de papier filtre (Whatman No.1), puis stérilisés par autoclavage sont imbibés par les solution de nos dilutions à tester puis placés sur la gélose préalablement ensemencée avec la bactérie à tester. Les disques sont préparés en extemporané [(**Abiramiet Venugopal, 2005**),(**Nejjahet al., 2006**)].

Les boites sont laissées pendant 15 minutes à la température ambiante avant d'être mises à incuber dans une étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures. Après l'incubation, une zone ou un

halo clair apparait. La lecture des résultats est faite par mesure des diamètres des zones d'inhibitions en (mm). Les zones doivent être uniformément circulaires (**Espinel-Ingroff et Cantón, 2007**).

Selon **Barros et al., 2007**, l'activité antimicrobienne est exprimée en zones d'inhibition comme suit :

- Diamètres inférieurs à 7 mm : *aucune activité antimicrobienne* (-)
- Diamètres de 7 à 9,9 mm : *activité antimicrobienne faible* (+)
- Diamètres de 10 à 11,9 mm : *activité antimicrobienne modeste* (+ +)
- Diamètres de 12 à 15 mm : *activité antimicrobienne élevée* (+ + +)
- Diamètres supérieurs à 15 mm : *activité antimicrobienne forte* (+ + + +)

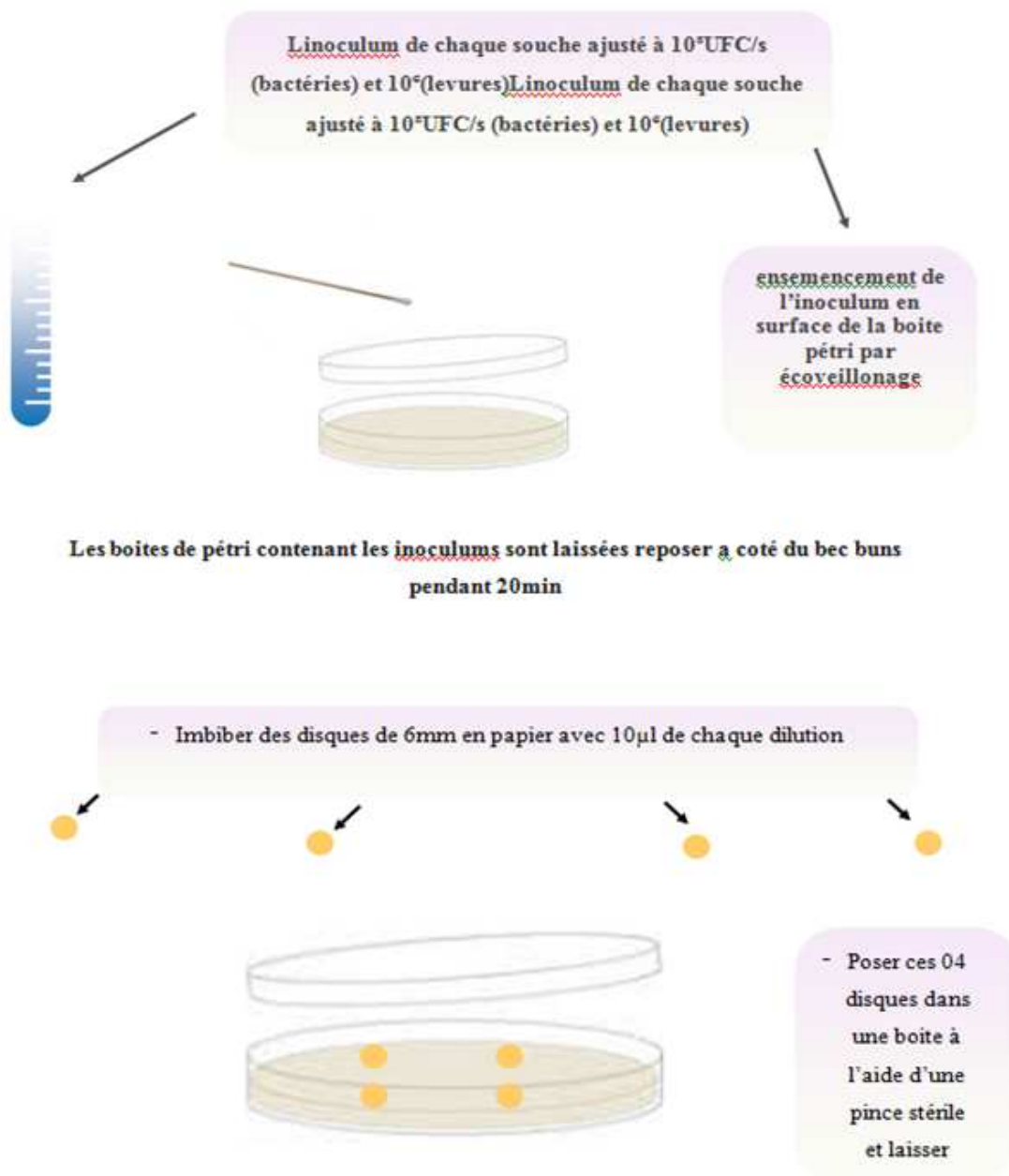


Figure 8: Schéma descriptif de la préparation des disques et l'ensemencement des souches

b. Activité antifongique :

Les boîtes de Pétri contenant du sabouraudgélose sont ensemencées aseptiquement par écouvillonnage. Ensuite elles sont séchées à proximité de la flamme (15 min). Des disques de 6 mm de diamètre préparés à base de papier filtre (Whatman No.1), puis stérilisés par autoclavage sont imbibés par les solution de nos dilutions à tester puis placés sur le sabouraud gélose préalablement ensemencée avec la bactérie à tester. Les disques sont préparés en extemporané. Les boîtes sont laissées pendant 15 minutes à la température ambiante avant d'être mises à incuber dans une étuve à 35°C pendant 24 heures. Après l'incubation, une zone ou un halo clair apparaît [(Abirami et al., 2005),(Nejjah et al. 2006)].

2.5.5.Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide :

a. Activité antibactérienne :

L'activité antibactérienne de notre extrait aqueux a été évaluée par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI). 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).

Le Bouillon MuellerHinton (MH) (pH de 7,2 à 7,4) est largement utilisé comme milieu standard pour la micro-dilution en plaque. Il permet une meilleure croissance de la plupart des bactéries pathogènes non exigeantes, en plus de son faible effet antagoniste vis-à-vis des antibiotiques. Ce bouillon est considéré comme milieu de référence. Pour chaque ligne de la microplaque, nous avons déposés 50µl de l'inoculum dans les 12 puits à l'exception du puits N°12 qui servira de puits de contrôle de contamination, qui contient seulement le Bouillon Mueller Hinton, comme témoin positif (100 µl). Nous avons ensuite ajouté 50 µl de la solution de l'extrait dans les 12 puits à l'exception du puits N°11 et puits N°12. le puits N°11 servira de témoin négatif (croissance sans HE). Les plaques sont scellées et placées dans une étuve à 35°C pendant 24 heures. La lecture du résultat s'effectue a l'œil nu à l'aide de d'une source de lumière sous la microplaque pour visualisé si il y'a une inhibition ou non (la croissance sous forme une trouble). [(Espinel-Ingroff et Canton, 2007) ; (Majoroset al., 2005)].

La plus faible concentration de chaque fraction ne montrant aucune croissance sera considérée comme la concentration minimale inhibitrice (CMI), elle est confirmée par un ensemencement sur milieu solide (**CLSI-M7-A7 2006**).

b. Activité antifongique :

L'étude de l'activité antifongique est réalisée par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI). Nous avons utilisé la méthode décrite en 2002 par *Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 (CLSI)*. C'est la méthode de référence qui permet de tester l'efficacité des antifongiques et de déterminer les CMI et les CMF correspondantes (**CLSI-M27-A2 2002**). La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la concentration la plus faible de la substance antimicrobienne qui inhibe la croissance des microorganismes.

Le principe de cette méthode est d'évaluer la capacité des levures à produire une croissance visible dans les puits d'une microplaque à fond rond (à 96 puits) contenant le milieu de culture liquide, en présence de concentrations décroissantes de notre extrait. Le milieu de culture préconisé pour cette technique est le sabouraud liquide (*Roswell Park Memorial Institut*). Nous avons utilisé ce milieu à pH 7,0.

Les souches fongiques conservées dans sabouraud gélose à 4°C, sont ensemencées dans sabouraud liquide à 35°C pendant 24 h, puis réensemencées en strie sur boîte de pétri contenant de sabouraud gélose à 35°C pendant 20 h, nous avons prélevé 5 colonies d'un millimètre de diamètre, que nous avons placé dans un tube à essai contenant 5 ml d'eau physiologique stérile.

La concentration cellulaire de cette solution est ensuite ajustée à 10^8 cellules/ml par cellule de Thomas. Une dilution au $1/100^{\text{ème}}$ est effectuée pour avoir un inoculum final de 10^6 cellules/ml.

Pour chaque ligne de la microplaque, nous avons déposés 50µl de l'inoculum dans les 12 puits à l'exception du puits N°12 qui servira de puits de contrôle de contamination qui contient seulement le sabouraud liquide comme témoin positif (100 µl). Nous avons ensuite ajouté 50 µl de la solution de l'extrait aqueux dans les 12 puits à l'exception du puits N°11 et puits N°12. le puits N°11 servira de témoin négatif (croissance sans extrait). Les plaques sont scellées et placées dans une étuve à 35°C pendant 24 heures (**CLSI-M27-A2 2002**).

Matériel et méthodes

La lecture du résultat s'effectue à l'œil nu sous la microplaque pour visualisé si il y'a une inhibition ou non (la croissance sous forme d'un trouble). [(Espinel-Ingroff et al., 2007) ; (Majorosetet al., 2005)].

La plus faible concentration de chaque fraction ne montrant aucune croissance sera considérée comme la concentration minimale inhibitrice (CMI), elle est confirmée par la un ensemencement sur milieu solide (CLSI-M27-A2 2002).

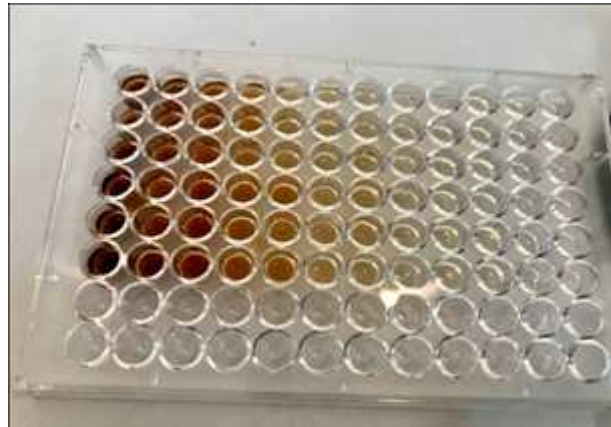


Figure9: utilisation de la microplaque (la méthode des microdilutions sur milieu liquide)

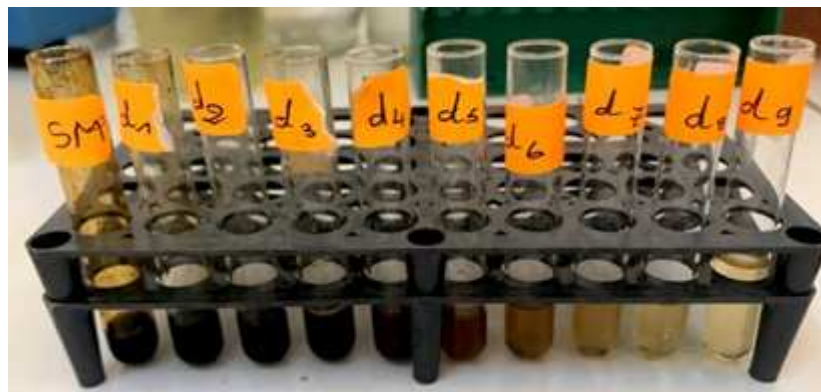


Figure 10 : Différentes dilutions préparées

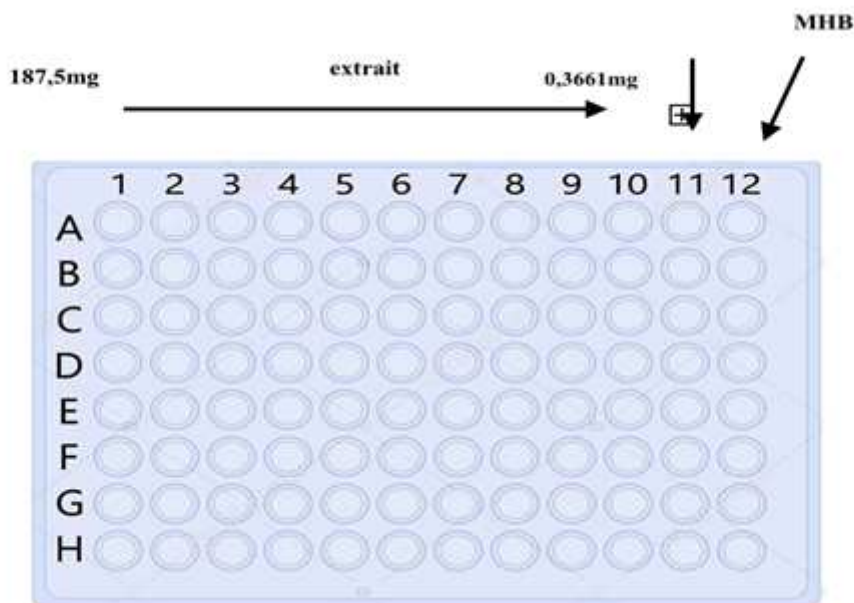


Figure 11: Schéma descriptif de l'utilisation de la microplaque

2.5.6. Détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB) ou fongicides (CMF) :

a. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) :

La CMB est définie comme la plus faible concentration de l'antibactérien qui détruit 99,9% de la concentration cellulaire finale. Après la détermination de la CMI (durant 24h d'incubation à 37°C), les deux puits contenant les concentrations en extraits strictement supérieures à la CMI vont servir pour la détermination de la CMB. Pour ce faire, un échantillon de 10 µl de chaque puits (ne présentant pas de croissance) va être transféré dans des boîtes de Pétri contenant du milieu Gélose nutritive. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 h.

Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boîte de celle de la CMB renferme un nombre de colonies inférieur à 3 (Prescott *et al.*, 1995).

b. Détermination de la concentration minimale fongicide (CMF) :

La CMF est définie comme la plus faible concentration de l'antifongique qui tue 99,9% de la

concentration cellulaire. Cette méthode est en accord avec les exigences de la CLSI « Clinical and Laboratory Standards Institute » (Espinelingroff et Canton, 2007).

Après la détermination de la CMI (durant 24h d'incubation à 35°C), les deux puits contenant les concentrations de substances antifongiques strictement supérieures à la CMI vont servir pour la détermination de la CMF. Pour ce faire, 10 µl de chaque puits vont être transférés dans des boîtes de Pétri contenant du milieu Sabouraud gélose. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 35 °C pendant 48 h. Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boîte correspondant à la CMF renferme un nombre de colonies inférieures à 3 (Majoros et al., 2005).

2.6. Test d'efficacité d'un conservateur :

Pour l'étude de l'efficacité conservatrice de l'extrait aqueux de *Lippiacitriodora*, nous avons utilisé la méthode de valeur D proposée par Orth. En 1979 Orth a proposé une méthode rapide pour estimer l'efficacité des agents de conservation. Cette méthode utilise des temps d'échantillonnage courts et estime la réponse finale 28 jours par régression linéaire comme valeur D. Cette méthode peut être utilisée pour déterminer l'efficacité de conservation des produits cosmétiques dans les 48 h pour les bactéries et les levures et 7 jours pour les moisissures. Le temps de réduction décimale (valeur D) pour chaque organisme dans chaque échantillon d'essai a été calculé en prenant l'inverse négatif de la pente de la droite obtenue par régression linéaire de la courbe du nombre de logarithme d'organismes survivants en fonction du temps après l'inoculation dans l'échantillon d'essai (Orth, 1979).

Pour déterminer la valeur D les conditions suivantes doivent être remplies:

- 1- Une seule souche pour chaque test ;
 - 2- Une détermination quantitative du nombre de germes viables ;
 - 3- La conservation doit réduire le nombre de germes par plusieurs ordres de grandeur dans les premières 24 heures ;
 - 4- La courbe de mort doit ajuster une régression linéaire ;
 - 5- Des données suffisantes sont acquises au premier point de lecture pour générer une régression (Orth and Enigl, 1993)
2. Préparation du shampooing d'essai :

2.6.1. Ingrédients utilisés:

La composition en ingrédients de notre shampooing est régie par la directive européenne. Les détails des ingrédients utilisés sont résumés dans le **tableau 10**.

Tableau 10 : Les composants du shampooing			
Ingrédients	Description	Formule chimique	
3,5% Cocamide DEA	Le Cocamide DEA, ou cocamide diéthanolamine, est un diéthanolamide obtenu par réaction du mélange d'acides gras d'huiles de noix de coco avec de la diéthanolamine. C'est un liquide visqueux qui est utilisé comme agent moussant dans les produits de bain comme les shampooings et savons à mains, et comme agent émulsionnant dans les cosmétiques.	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2, n \sim 8-18$	
15% D'aurylsulfate de sodium	Le laurylsulfate de sodium (LSS) ou dodécylsulfate de sodium (SDS), plus connu sous sa dénomination INCI <i>sodium lauryl sulfate</i> ou SLS, est un détergent et tensioactif ionique fort, couramment utilisé en biochimie et biologie moléculaire.	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$	
1%Nacl	Le chlorure de sodium est un composé chimique ionique de formule NaCl. Il est utilisé comme épaississant de la base lavante	NaCl	
1%Coco betaine	La bétaine de cocamidopropyle (Cocamidopropyl bétaine, en nomenclature INCI) est un tensioactif dérivé de l'huile de noix de coco et de la diméthylaminopropylamine. Elle nettoie, améliore la qualité de la mousse, réduit l'électricité statique (antistatique) Elle est utilisée dans de nombreux produits nettoyants, dont les gels douche et shampooings pour ses propriétés peu irritantes en comparaison à d'autres agents de surface.	$\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_3$	

2.6.2. Préparation du shampoing :

-**Solution A:** Dans un erlenmeyer remplie de 200ml d'eau distillée , 7,5g de l'aurylsulfate de sodium , 1,75g de cocamideDEA et 0,5g de cocobétaine sont mélangés .

-**Solution B :** Consiste à dissoudre 0,5g de NaCl dans 50ml d'eau distillée .

Après avoir mélangé les deux solutions préparés on a réajusté le volume a 500ml .

Aspect final : Une solution transparente homogène

2.6.3.Préparation de l'inoculum :

a.Les bactéries utilisées :

Deux souches à Gram négative ont été utilisée pour le test de l'efficacité antimicrobienne dans le shampoing.

Tableau 1: les bactéries utilisées pour le test de l'efficacité antimicrobienne dans le shampoing		
Bactéries	Références	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25933	Gram +
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Gram +

b. Préparation de pré-culture :

Le test d'efficacité de notre conservateur a été réalisé à partir des cultures jeunes de (18 à 24 heures) en phase exponentielle de la croissance. La réactivation des souches a été effectuée par ensemencement de l'espèce bactérienne dans une eau physiologique 0,9%.Après incubation de 24 heures à 37°C , un deuxième repiquage a été réalisé sur des boites de pétri contenant de la gélose nutritiveetincubées à 37°C pendant 18 heures ou 24 heures.

c. Préparation de la suspension bactérienne :

A partir des cultures jeunes sur la gélose nutritive, nous avons prélevé cinq (05) colonies bien isolées et identiques dans 5 ml d'eau physiologique stérile, agitées manuellement pendant

quelques secondes. L'ajustement de la charge bactérienne à 10^6 UFC/ml, est réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 625 nm. Selon la standardisation de Mc Farland, nous admettons une DO comprise entre 0.08 et 0.1 correspond à une concentration de 10^8 UFC/ml; la suspension d'inoculum est diluée à $1/100^{\text{ème}}$ dans le milieu de culture pour avoir une concentration de 10^6 UFC/ml.

2.6.4. Préparation des échantillons :

4 échantillons ont été préparés pour chaque souche. La composition de chaque échantillon est résumée dans le tableau 12.

Tableau 12: les échantillons préparés.

Echantillon	Composition
Échantillon 1	50ml de shampoing
Échantillon 2	-50ml de shampoing. -100µl de suspension bactérienne.
Échantillon 3	-50ml de shampoing ; -100µl de suspension bactérienne ; -0,17g de formaldéhyde (conservateur synthétique).
Échantillon 4	-50ml de shampoing ; -100µl de suspension bactérienne ; -4,6g d'extrait de <i>Lippiacitriodora</i> (notre conservateur) pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et 0,3g pour <i>E.coli</i>

Les échantillons ont été mis dans des bouteilles de 100 ml à bouchon vissé et à l'abri de la lumière. Les 4 bouteilles des 4 échantillons ont été agitées vigoureusement 100 fois et 11 ml ont été pipetés dans 99 ml de bouillon avec 0,01% de triton X-100. Ensuite les bouteilles ont été agitées vigoureusement 50 fois, et des dilutions de 1/100 ont été faites en transférant 1 ml à 99 ml de BN-T et en agitant 25 fois. Après, des quantités de 5 ml de dilutions appropriées ont étéensemencées par inondation dans des boîtes de Pétri en double contenant 15ml de gélose nutritive. Cette procédure a été répétée pour la deuxième souche d'essai. Le matériel d'essai a été ré-échantillonné à différents moments à 2h, 16h et 24h après l'inoculation. Les boîtes de Pétri contenant les bactéries d'essai ont été incubées pendant 48 heures à 35°C.

Résultats et discussion

1. Etude ethnobotanique :

Il existe actuellement à travers le monde un grand intérêt pour l'étude des remèdes populaires et la recherche de nouveaux médicaments issus de la pharmacopée traditionnelle. De nombreux travaux ont été consacrés ces dernières années à l'inventaire des plantes médicinales. Il nous est apparu important de réunir des informations sur la plante étudiée (*Lippia citriodora*) afin de laisser un témoignage sur ce savoir ancestral qui risque de se perdre et qui actuellement n'est détenu que par peu de personnes âgées.

L'étude présente s'est déroulée à Saida par des interviews d'herboristes. Les enquêtes ont permis de vérifier l'utilisation de la plante étudiée en médecine traditionnelle. Les nombreuses propriétés biologiques et les nombreux principes actifs contenus dans les différentes drogues des espèces médicinales utilisées mettent en évidence leur importance et le besoin urgent de préserver la diversité biologique et l'utilisation durable des ressources biologiques qu'elles présentent. Cette étude ainsi que la collecte des données ont eu pour objectif de montrer la richesse en plantes médicinales dans le but de faire mieux comprendre ultérieurement l'importance des mesures à prendre qu'appellent la préservation de la diversité biologique et l'utilisation durable des ressources biologiques.

11. Classes d'âge

Le tableau 13 et la figure 12 représentent la répartition de la fréquence d'utilisation de *Lippia citriodora* selon l'âge.

Tableau 13: Répartition de la fréquence d'utilisation des plantes selon l'âge.

		L'age de l'utilisateur			
		Fréquence	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
Valide	18-30	5	12,5	12,5	12,5
	30-45	19	47,5	47,5	60,0
	<45	16	40,0	40,0	100,0
	Total	40	100,0	100,0	

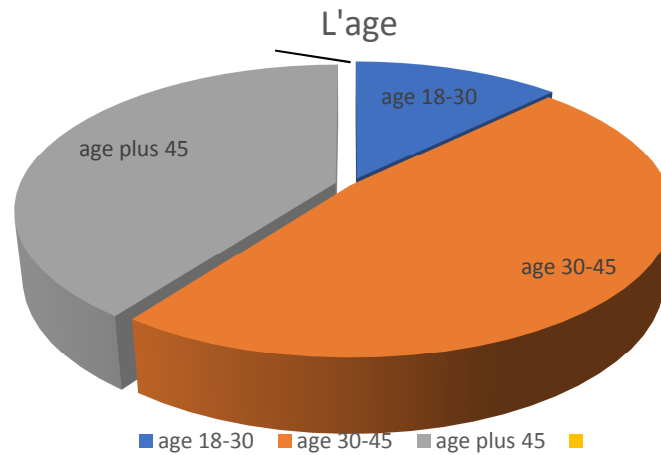


Figure 12: les pourcentages d'utilisation de *Lippia citriodora* selon l'âge.

Le traitement des données nous a permis d'obtenir le graphique de la **figure 12**, qui montre qu'à l'échelle de la wilaya de SAIDA, les personnes entre 30 ans et 45 ans ont une fréquence d'utilisation de *Lippia citriodora* par un pourcentage de 47,5 %. Viennent ensuite les personnes qui ont plus de 45 ans, et enfin ceux qui ont moins de 30 ans avec respectivement 40 %, 12,5%.

La connaissance des usages de *Lippia citriodora* et ses propriétés est généralement acquise suite à une longue expérience accumulée et transmise d'une génération à l'autre. La transmission de cette connaissance est en danger actuellement parce qu'elle n'est pas toujours assurée (**Anyinam 1995**). Les résultats obtenus montrent effectivement que les personnes les plus âgées ont plus de connaissances en plantes médicinales par rapport aux autres classes d'âges. L'expérience accumulée avec l'âge constitue la principale source d'information à l'échelle locale au sujet de l'usage de *Lippia citriodora*.

En règle générale, les personnes âgées sont responsables de la santé de la famille. De plus, les connaissances sur les plantes médicinales sont plus importantes surtout en milieu rural. Les informateurs âgés de plus de 50 ans occupent la 3ème place. Ainsi, les aînés jouent un rôle particulier dans une enquête ethnobotanique, car ils ont acquis une vaste expérience au fil du temps. Selon **Justin et Nancy (2011)**, les aînés de la communauté sont souvent porteurs des plus grandes quantités de connaissances sur les plantes indigènes. Néanmoins, cette découverte n'exclut pas les autres groupes d'âge comme possédant une connaissance précieuse des plantes médicinales.

1.2. Sexe d'appartenance:

Les résultats de l'utilisation de *Lippia citriodora* en fonction du sexe à la wilaya de Saida sont présentés dans le tableau 14 et la figure 13.

Tableau 14: les pourcentages d'utilisation de *Lippia citriodora* selon le sexe

		Le sexe de l'utilisateur			
		Fréquence	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
Valide	homme	10	25,0	25,0	25,0
	femme	30	75,0	75,0	100,0
	Total	40	100,0	100,0	

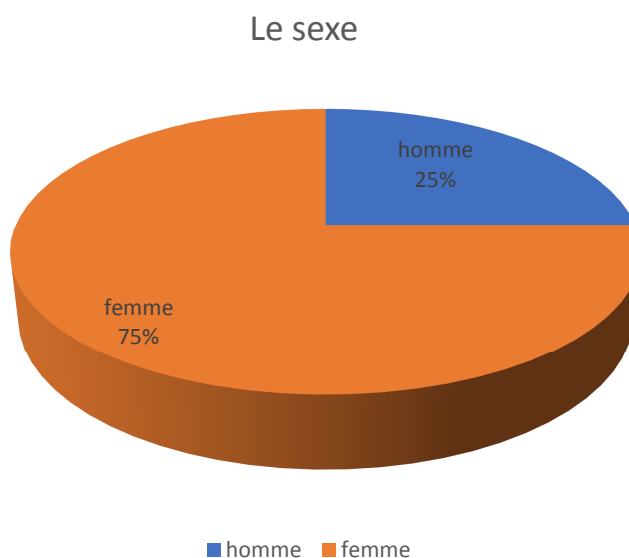


Figure 13: Répartition de la fréquence d'utilisation de *Lippia citriodora* selon le sexe

Dans cette région, les femmes et les hommes sont concernés par la médecine traditionnelle. Cependant, les femmes ont un peu plus de connaissances sur les espèces des plantes par rapport aux hommes (75 % contre 25 %) (**Fig. 13**). Ces résultats confirment les résultats

d'autres travaux ethnobotaniques réalisés à l'échelle nationale, qui ont montré que les femmes sont plus détentrices du savoir phytothérapeutique traditionnel.

1.3. Niveau de scolarisation :

Le tableau 15 et la figure 14 montrent les pourcentages d'utilisation de *Lippia citriodora* selon le niveau scolaire.

Tableau 15: Les pourcentages d'utilisation de lippia citriodora selon le niveau académique

		Niveau académique de l'utilisateur			
		Fréquence	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
→ Valide	Analphabète	5	12,5	12,5	12,5
	Primaire	4	10,0	10,0	22,5
	Secondaire	12	30,0	30,0	52,5
	Universitaire	19	47,5	47,5	100,0
	Total	40	100,0	100,0	

Niveau académique

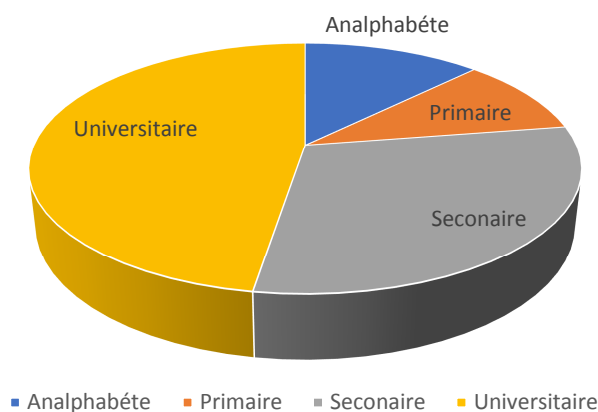


Tableau 14: Répartition de la fréquence d'utilisation des plantes selon le niveau académique.

Dans la zone d'étude, la grande majorité des usagers des plantes médicinales sont universitaires, avec un pourcentage de 47,5 % (Fig. 14). Ce pourcentage relativement élevé est en corrélation directe avec le niveau d'études de la population locale utilisatrice de la plante. Néanmoins, les personnes ayant le niveau de l'école secondaire ont un pourcentage d'utilisation non négligeable des *Lippia citriodora* qui est de 30%, alors que celles qui sont

analphabète et ayant un niveau de l'école primaire, utilisent très peu *Lippia citriodora* (primaire 10 %, analphabète 12,5 %).

Le niveau d'éducation est reflété par le niveau culturel et les personnes ayant un niveau d'études élevé possèdent plus d'informations sur les soins de santé primaires et la médecine moderne. Néanmoins, cette constatation ne signifiait pas que cette catégorie de société possédait plus de connaissances liées à la médecine traditionnelle ou à la botanique. Au contraire, plusieurs études antérieures ont montré que les personnes ayant un faible niveau d'instruction possédaient une plus grande expertise dans ce domaine de la médecine traditionnelle et de la botanique populaire médicale (Fajardo et al., 2008).

1.4 .Situation familiale:

Les pourcentages d'utilisation de *Lippia citriodora* selon la situation familiale sont présentés dans le tableau 15 et la figure 14.

Tableau 15: Les pourcentages d'utilisation de *Lippia citriodora* selon la situation familiale

		Situation Familiale			
		Fréquence	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
Valide	Marié	33	82,5	82,5	82,5
	Célibataire	7	17,5	17,5	100,0
	Total	40	100,0	100,0	

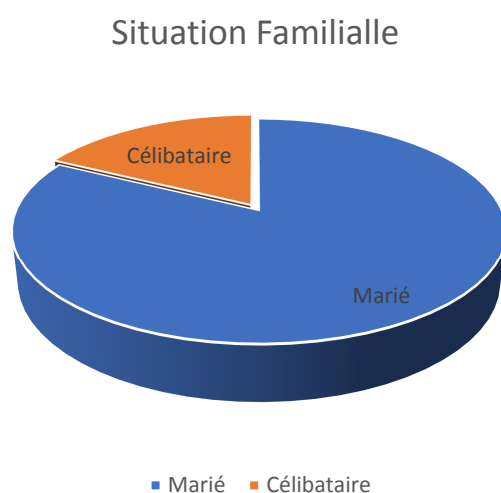


Figure 14: Répartition de la fréquence d'utilisation des plantes selon la situation familiale

Dans la zone d'étude, la majorité des utilisateurs de *Lippia citriodora* sont des personnes mariées avec un pourcentage de (82,5%) et (17,5) pour les célibataires (**Figure 14**).

1.5. Parties utilisées et Mode de conservation

Dans la zone d'étude, les feuilles sont la partie utilisée avec un pourcentage de 100%. (**Figure15**). En plus, dans la zone d'étude, la plante *Lippia citriodora* est à 100% conservée à l'abri de la lumière (**Figure16**).



Figure 15: Répartition des pourcentages de différentes parties utilisées de *Lippia citriodora*

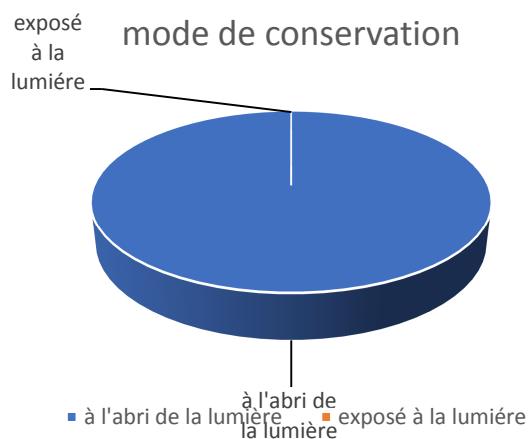


Figure 16: Répartition des pourcentages des modes de conservation de *Lippia citriodora*

Les feuilles représentent la partie la plus utilisée pour la préparation de médicaments à partir de plantes médicinales et les tiges occupent la deuxième place, suivies par la plante entière. Cela pourrait s'expliquer par la rapidité et la facilité de récolte des plantes médicinales et par le fait que les parties aériennes des plantes sont au centre du phénomène photosynthétique. En outre, il a été signalé que les matières végétales à base de racines et d'écorce ne sont pas durables pour le développement de médicaments traditionnels ou pour la découverte de médicaments (**Geoffrey, 2015**).

1.7. Etat de la plante et la toxicité:

100% des personnes interrogées confirment qu'ils utilisent l'espèce *Lippia citriodora* séchée est non pas fraîche (**Figure17**). Du même, 100% des personnes interrogées confirment que l'espèce *Lippia citriodora* ne montre pas la toxicité (**Figure 18**).

Parties utilisées de la plante

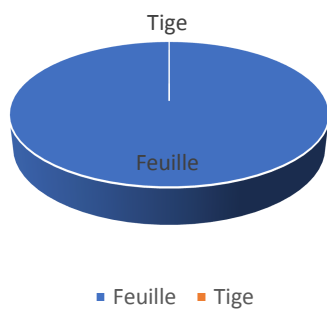


Figure 17:Répartition des différents parties utilisées de la plante

Toxicité

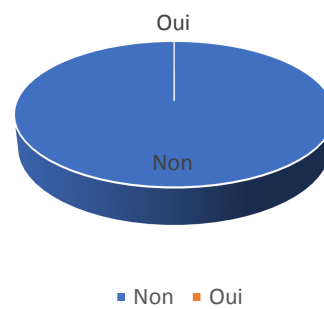


Figure 18:Répartition de la fréquence d'utilisation des plantes selon la toxicité

1.9. Mode de préparation

La décoction constitue le mode de préparation le plus fréquent (77,5 %). Elle est suivie par la préparation en poudre (22,5%)

Les modes de préparation de la plante

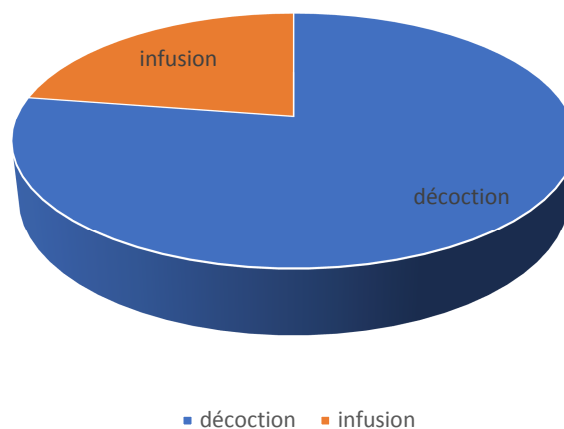


Figure 19: proportions des modes de préparation

Le mode de préparation d'un médicament dans la pratique de la médecine traditionnelle est une étape cruciale dans l'opération de traitement d'une maladie. Ainsi, il peut interférer à différents niveaux comme suit:

- C'est un facteur limitant dans l'extraction des molécules bioactives de la matrice du matériel végétal et certaines substances nécessitent l'extraction d'une technique spécifique.
- Les taux de rendement des substances bioactives sont fortement liés au mode de préparation.
- Cela pourrait agir sur l'activité pharmacologique et biologique du médicament extrait de la matière végétale.

Dans la présente étude, la méthode de préparation des plantes médicinales la plus fréquemment citée était la décoction suivie du mode d'infusion. Le mode de préparation est également lié au type d'utilisation (externe ou interne), normalement pour un masque externe, les modes massage ou suppositoire sont appliqués alors que la décoction, l'infusion, la macération et les autres modes sont impliqués pour un usage interne.

1.10. Domaines d'indication thérapeutique

L'enquête ethnopharmacologiques a révélé que l'espèce *Lippia citriodora* est utilisée principalement contre les maladies infectieuses avec un pourcentage de 42,5% (**Fig. 20**), suivent les maladies de l'appareil digestif (30%) et contre les maladies neurobiologique avec un pourcentage de (27,5)

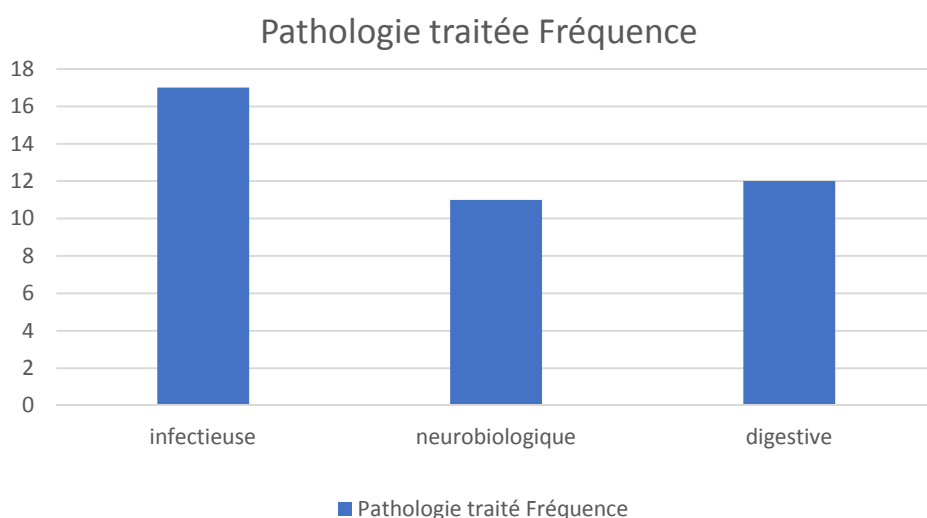


Figure 20 Répartition des pourcentages selon les maladies traitées avec *Lippia citriodora*

Les résultats concernant ces maladies traitées sont conformes à ceux établis lors d'une enquête récente menée en Algérie (Banarba et al., 2015), au Maroc oriental (Fakchich et al., 2014), à Fès (Maroc central) (Mikou et al., 2015) et au Liban (Baydoun et al., 2015).

2. Calcul du rendement :

Le rendement R en extrait obtenu à partir de la partie aérienne de *Lippia citriodora* est calculé à l'aide de la formule suivante :

- **Rdt %**= [poids du ballon après évaporation- poids du ballon avant évaporation / poids de la matière végétale de départ] x 100

- L'extrait aqueux *Lippia citriodora* préparé par la décoction a fourni un rendement moyen de 35,47 % obtenus à partir d'une seule extraction.

Tableau 16: Rendement massique d'extrait

Espèce	Partie utilisée	RDT (%)
<i>Lippia citriodora</i>	Les feuilles	35.47

3. Tests phytochimiques :

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans les feuilles de *Lippia citriodora* par des réactions qualitatives. La détection de ces composés chimiques est basée sur des réactions de précipitation et de turbidité, un changement de couleur spécifique. Les tests de caractérisation phytochimique, réalisés sur notre extrait aqueux, ont donné les résultats que nous présentons dans le tableau 17.

Tableau 17 : Résultats des tests phytochimiques

Métabolites secondaires		Présence/Absence	Coloration
1. Alcaloïdes	Mayer		Blanche
	Wagner	+	orange
	Drangendroff	+	Brune
2. Polyphénoliques	Flavonoïdes	+	Rose
	Tanins	+	Verte foncée
	Anthocyanes	-	Bleu-violacée
Stérols et triterp- nes	/	+	Anneau rouge brunâtre
Saponosides	/	+	I=277
Composés réducteurs	/	+	Précipité rouge brique

(+) = présence; (-) = absence.

D'après les résultats du screening phytochimique nous constatons que :

Notre extrait ne contient pas d'anthocyanes , tandis que ce même extrait aqueux de *Lippia citriodora* contient des flavonoïdes , des tannins et des composés réducteurs en quantités très importantes par rapports aux autres métabolites secondaires. Nous avons aussi noté la présence des alcaloïdes en quantités importantes et les saponosides avec un indice de mousse de 227 qui est supérieur à 100.

4. Evaluation de l'activité antioxydants :

L'activité antioxydante peut être due à différents mécanismes, dont parmi la prévention de l'initiation de l'altération des chaînes, la décomposition des peroxydes, l'abstraction continue de l'hydrogène, capacité réductrice. Elle exprime la capacité de réduction des radicaux libres (Bounatirou et al., 2007).

Piégeage radical DPPH :

Pour notre extrait, nous avons employé la méthode au DPPH. Ce radical libre présente une coloration violet sombre, lorsqu'il est piégé par des substances antioxydantes, la forme réduite confère à la solution une coloration jaune pâle, le virage vers cette coloration et l'intensité de la coloration de la couleur de la forme libre en solution dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance anti-radicalaire (Mohammedi, 2006).

Le pourcentage d'inhibition d'extrait aqueux des feuilles de *Lippia Citriodora* et l'acide ascorbique avec le DPPH est montré dans la figure 22.

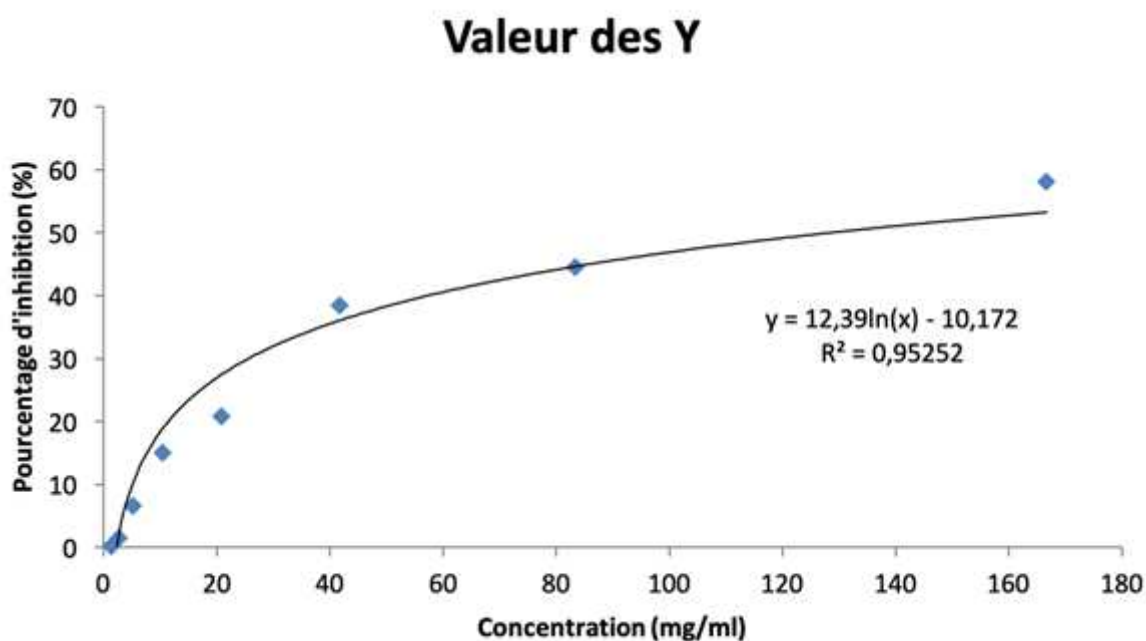


Figure 21: Pourcentage d'inhibition d'extrait aqueux de *Lippia Citriodora* par la méthode de DPPH

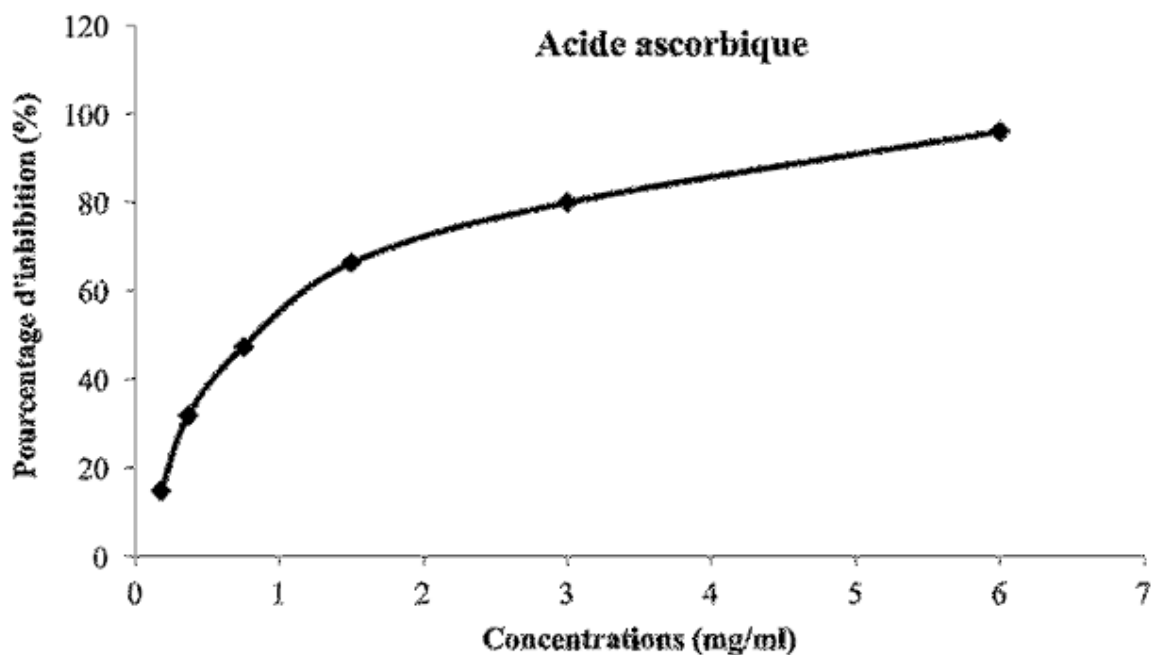


Figure 22: Pourcentage d'inhibition d'acide ascorbique par la méthode de DPPH

Le pourcentage d'inhibition du radical varie selon le produit examiné. Un fort pourcentage d'inhibition est obtenu avec l'acide ascorbique (95,9%) et un pourcentage de (58,14%) est obtenu pour l'extrait aqueux d'*Lippia citriodora* pour une concentration de 333,8 mg/ml d'extrait aqueux de cette plante. Il semble que l'extrait de *Lippia Citriodora* a une activité antioxydante mais elle est légèrement moins efficace que celle de l'acide ascorbique. Il semble aussi que cette activité est liée à la présence des composés phénoliques dans l'extrait aqueux. Le rôle principal des composés comme réducteurs des radicaux libres est souligné dans plusieurs rapports.

L'étude de **Dopico-Garcia et al (2008)**, sur l'extrait aqueux de *Lippia citriodora* a enregistré une forte activité antioxydante qui dépasse les 90 % à une concentration de 0,075mg/ml. **Mothana et al. (2008)**, dans une étude sur *Lippia citriodora* du Yemen ont obtenus une concentration d'inhibition de 50 % des radicaux libres $IC_{50} = 30$ tg/ml.

Les IC_{50} a été déterminée graphiquement à partir des graphes représentant les pourcentages d'inhibition en fonction de la concentration. Les résultats sont rassemblés dans le **tableau 18**.

Tableau 18: IC₅₀ obtenue par la méthode de piégeage du DPPH de l'extrait aqueux de *Lippia citriodora* et de l'acide ascorbique

IC ₅₀ d'acide ascorbique (mg/ml)	IC ₅₀ de l'extrait aqueux de <i>Lippia citriodora</i> (mg/ml)
1.2	134

D'après ces résultats, nous remarquons que l'acide ascorbique présente le meilleur pouvoir antioxydant qui correspond à IC₅₀ la plus faible (1.2 mg/ml). Par contre, l'extrait aqueux de *Lippia citriodora* présente le faible pouvoir antioxydant avec IC₅₀ la plus élevée (134 mg/ml). Selon des études similaires de **Dopico-Garcia et al (2008)**, le résultat d'inhibition à 50 % (IC₅₀) est de 0.0314 mg/ml qui n'était pas en accord avec les résultats obtenus par notre étude.

5. Evaluation de l'activité antimicrobienne

5.1. Méthode de diffusion sur disques :

L'évaluation qualitative de l'activité antimicrobienne d'extrait *Aloysia Odorata* obtenu par décoction en milieu aqueux a été faite sur 6 bactéries et 3 levures de références, basée sur la mesure des diamètres des zones d'inhibitions en mm.

Les résultats de l'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait aqueux de *Lippia citriodora* sont représentés dans le **tableau 17** et les figures ... qui porte les diamètres d'inhibitions en mm et pour chaque souche de bactérie et levure.

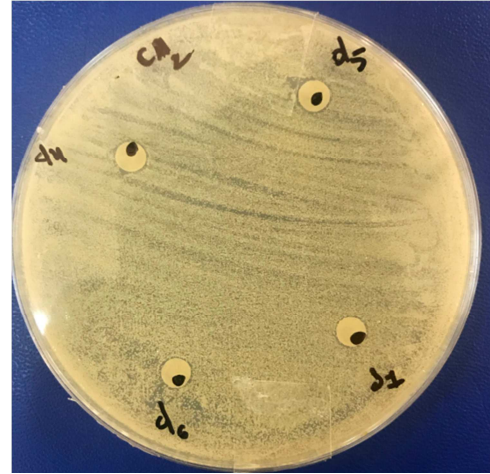
Tableau 17 : Diamètres de zone d'inhibition obtenues par différentes concentrations de l'extrait aqueux *Lippia citriodora* vis-à-vis des bactéries testées

Microorganismes	Différentes concentrations (mg/ml)							
	1000	500	250	125	62,5	31,2	15,6	7,8
<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>L. monocitogenes</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>B. subtilis</i>	9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. typhimurium</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>E. coli</i>	12	11	10	ND	ND	ND	ND	ND
<i>P. aeruginosa</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Candida albicans 26790</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Candida albicans 10231</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Candida albicans IP444</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Le **tableau 17** montre clairement que la diminution du diamètre des zones d'inhibition correspondant à une diminution de la concentration de l'extrait appliqué. La comparaison des diamètres d'inhibition montre que l'extrait aqueux de *Lippia citriodora* présente une activité antimicrobienne importante sur *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. En outre aucune activité n'a été enregistrée sur les autres souches bactériennes et fongiques.

L'étude d'**Alanis et al. (2004)**, sur l'extrait aqueux de *Lippia citriodora* a montré une activité antimicrobienne de 21,2% qui est supérieur à notre résultat sur *E. coli* et aucune activité sur *S. typhimurium* à une concentration de 8 mg/ml.

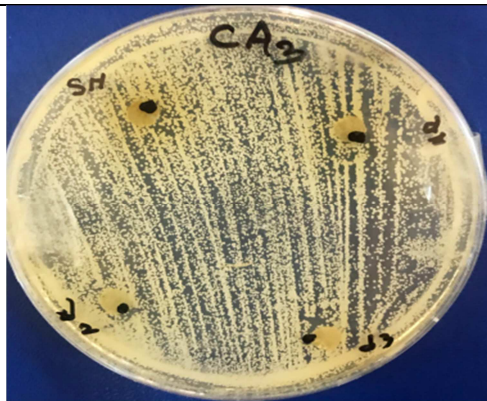
Les résultats obtenus sont présentés sur la **figure 23**.



Candida albicans IP 444



Candida albicans ATCC 26790



Candida albicans ATCC 10231

Figure 24: Résultats obtenus par la méthode de diffusion des disques de l'extrait aqueux de *Lippia citriodora* à différentes concentrations vis-à-vis des souches bactériennes testées

6. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB):

La détermination des concentrations minimales inhibitrices de l'extrait de *Lippia citriodora*, nous a permis de mettre en évidence les concentrations minimales de notre extraits qui à partir desquelles les bactéries que nous avons testé sont inhibées. La méthode des microdilutions sur milieu liquide est une technique quantitative permettant de déterminer la sensibilité des microorganismes vis-à-vis une substance antimicrobienne. Cette méthode se base sur le pouvoir inhibiteur de l'extrait à l'intérieur d'un puits, dans un milieu nutritif (Mueller Hinton bouillon)ensemencée par l'inoculum des souches à testées. Ces résultats sont présentés dans le **tableau 18**.

Tableau 18: Les différentes concentrations minimales inhibitrices des différents extraits.

Microorganismes	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)
<i>S .aureus</i>	187.5	/
<i>L. monocitogenes</i>	46.87	/
<i>B. subtilis</i>	5.859	/
<i>S. typhimurium</i>	11.718	11.718
<i>E. coli</i>	5.859	/
<i>P. auruginosa</i>	93.75	/

D'après les résultats consignés dans le **Tableau 18**, Les concentrations minimales inhibitrices obtenus de l'extrait aqueux de *Lippia citriodora* varient de 5,859 à 187,5 mg/ml pour les bactéries à gram positif et de 5,859 à 93,75 mg/ml pour les bactéries à gram négatif. L'extrait aqueux de *Lippia citriodora* exerce une importante activité inhibitrice vis-à-vis des bactéries testées, sauf *Staphylococcus aureus* qui s'est montré la plus résistante par une CMI de l'ordre de 187,5 mg/ml qui a été suffisante pour arrêter sa croissance.

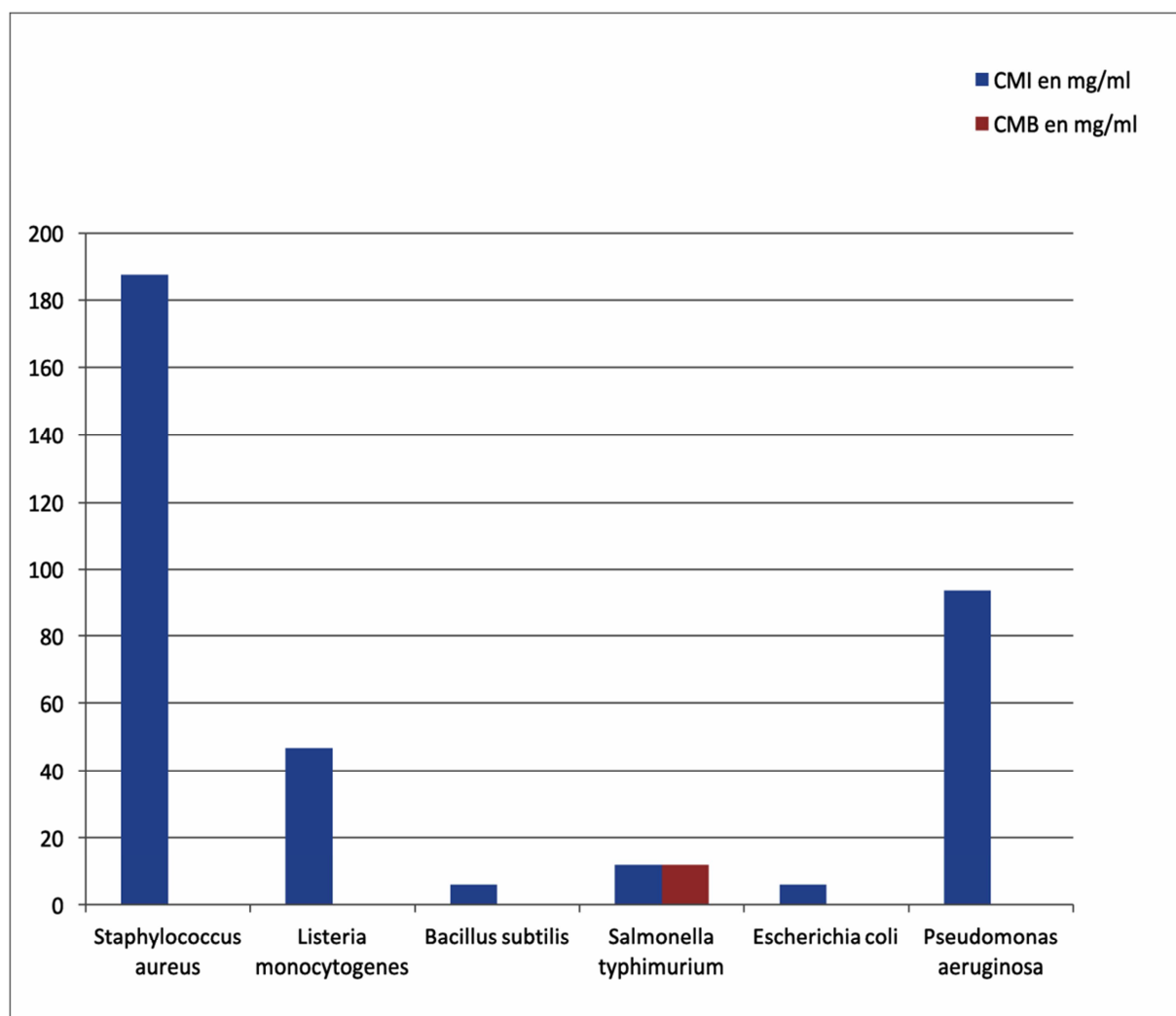


Figure 25: Résultat des CMI et des CMB de l'extrait *Lippia citrodora* vis-à-vis des souches bactérienne.

Activité antifongique : détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales fongicides (CMF) :

La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) d'extrait de *Lippia Citriodora* vis-à-vis trois souches de levures est réalisée par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide. Nous avons utilisé comme milieu de culture : le Bouillon Sabouraud (Tableau 19).

Tableau 19: Résultat des CMI et des CMB de l'extrait de *Lippia citriodora* vis-à-vis des souches fongiques

Microorganismes	CMI en mg /ml	CMF en mg/ml
<i>Candida albicans</i> ATCC 26790	62.5	0
<i>Candida alcicans</i> ATCC 10231	125	0
<i>Candida albicans</i> IP444	62.5	0

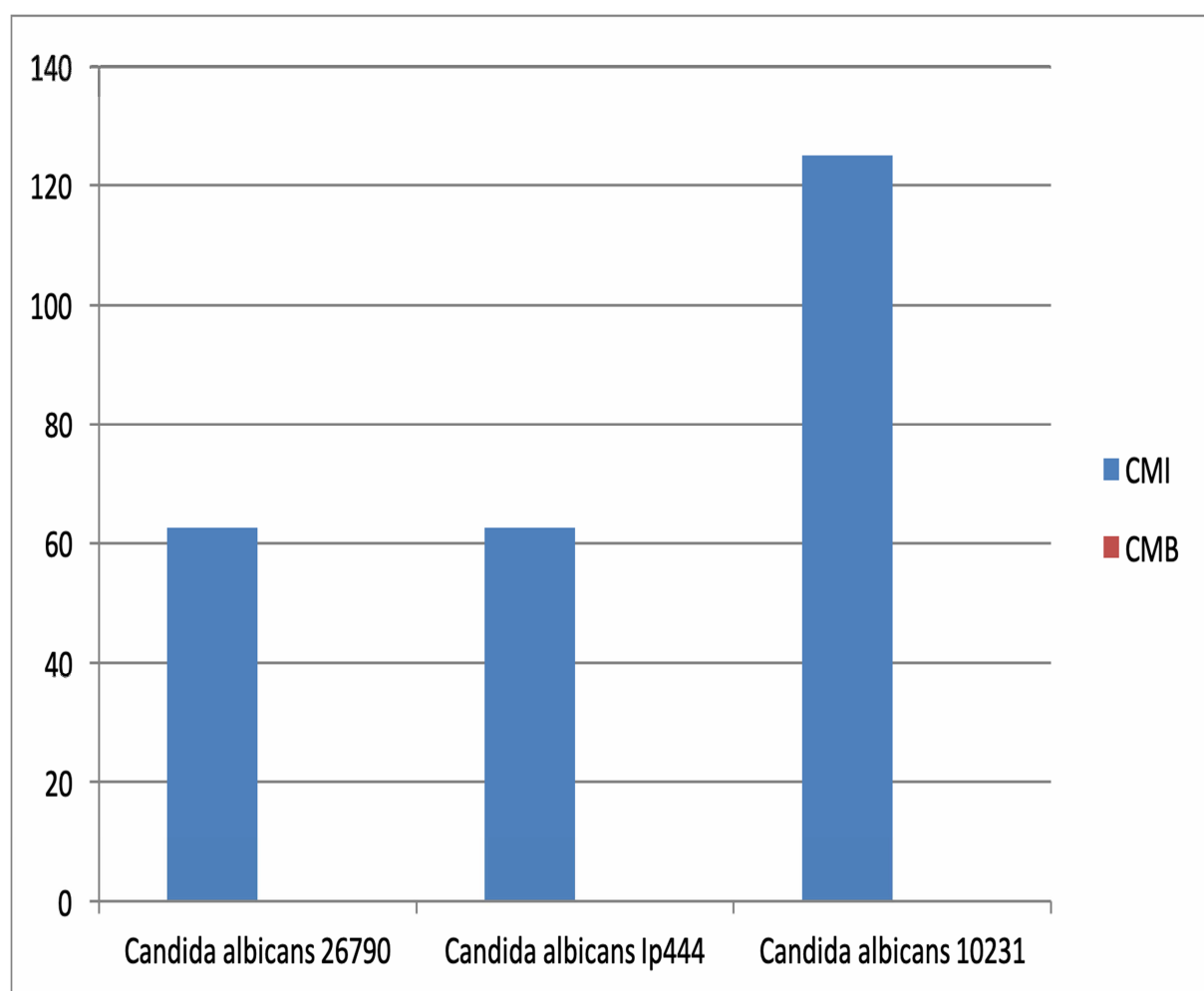


Figure 26: Résultat des CMI et des CMF de l'extrait de *Lippia citriodora* vis-à-vis des souches fongiques

Les résultats illustrés ont indiqué l'existence de composés antimicrobiens dans notre extrait aqueux. D'après des études similaires de **Toyang et al. (2012)**, les extraits ayant une CMI inférieur à 111 µg/ml ont une bonne activité antibactérienne, entre 111 et 511 µg/ml, on parlera d'une activité antibactérienne modérée, entre 511 et 1111 µg/ml, l'activité

antibactérienne est dite faible et enfin l'extrait est considéré comme inactif pour une CMI de plus de 1000 µg/ml En outre notre extrait a été considéré comme inactif.

4. Test d'efficacité d'un conservateur :

La méthode de régression linéaire est une méthode alternative aux méthodes actuelles de test d'efficacité des agents de conservation, cette méthode offre l'avantage d'obtenir des résultats en quelques jours, la quantification des taux de mortalité d'organismes spécifiques dans les produits et l'estimation du temps requis pour la destruction complète d'une population microbienne de toute taille.

La méthode de régression linéaire a été utilisée pour déterminer l'efficacité de notre extrait aqueux de *Lippia citriodora* autant qu'un agent conservateur dans le shampooing.

La caractéristique saillante de cette méthode est que la valeur D fournit une expression quantitative du taux de mortalité d'un organisme d'essai spécifique dans un produit particulier lorsque des conditions des tests définies sont utilisées. Le concept de la valeur D est largement utilisé en thermobactériologie où il a été utile dans le calcul des taux de mortalité des micro-organismes et dans l'établissement des conditions de transformation (**Bean, 1972**).

La valeur D dans les tests d'efficacité des conservateurs permet de comparer les taux d'inactivation de plusieurs organismes différents, d'un ou plusieurs produits cosmétiques.

Le temps requis pour la destruction complète d'une population de toute taille d'un organisme particulier peut être prédit lorsque le taux de mortalité est connu pour un produit ; par exemple, la valeur D moyenne pour *S. aureus* est de 2,5 heures pour un type de lotion. En utilisant cette valeur D, le temps d'inactivation totale de 10^6 *S. aureus*/ml est donné par le log du nombre d'organismes/ml (la valeur D) (**Orth, 1979**).

Tableau 20: Les échantillons utilisées dans le test

Echantillon 1	Shampooing
Echantillon 2	Shampooing + suspension bactérienne
Echantillon 3	Shampooing + suspension bactérienne + formaldehyde
Echantillon 4	Shampooing +suspension bactérienne + extrait aqueux de <i>Lippia citriodora</i>

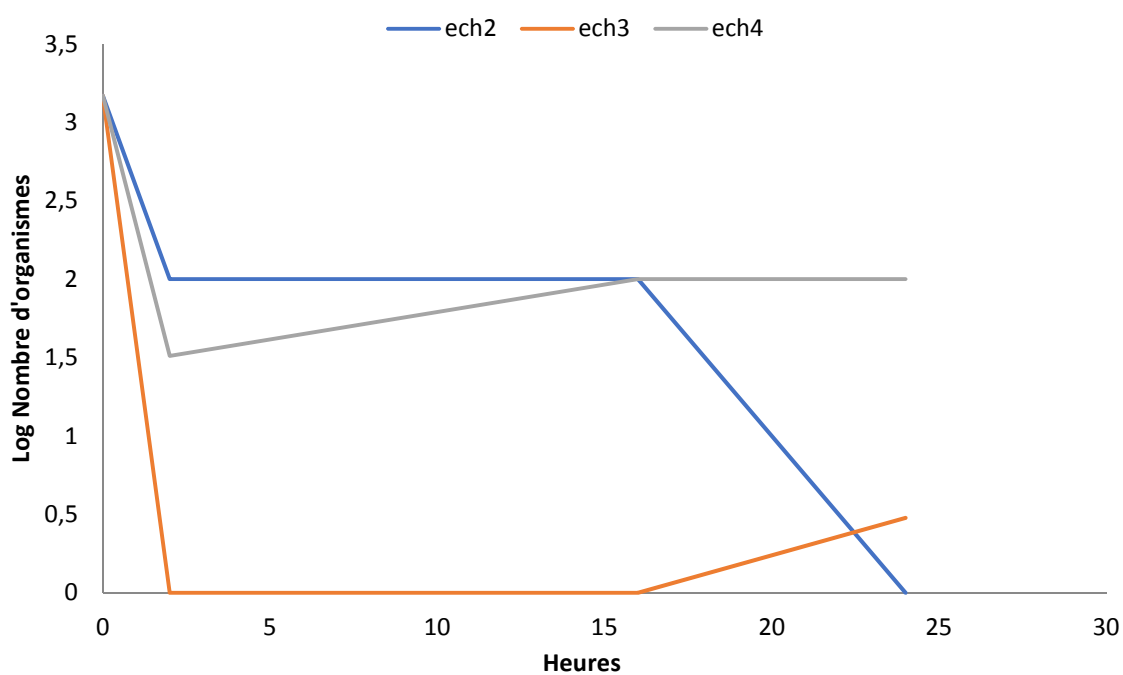


Figure 27: Résultat du test d'efficacité de la conservation des 3 échantillons vis-à-vis de la souche bactérienne *Pseudomonas aeruginosa*

Tableau 21 : Résultat du test d'efficacité de la conservation des 3 échantillons vis-à-vis de la souche bactérienne *Pseudomonas aeruginosa*

	Valeur D	Temps de destruction (heures)	Coefficient de corrélation
Echantillon 2	1,70	5.39	-0,610042
Echantillon 3	0.63	2	-0,5122
Echantillon 4	1.20	3.81	-0,7451

Le coefficient de corrélation a été utilisé comme indicateur de précision et pour déterminer la qualité de l'ajustement des données de la régression linéaire.

La valeur D de l'échantillon 4 de *Pseudomonas aeruginosa* avec 4,69 de notre extrait aqueux était de 3,81 heures, alors que la valeur D pour cet organisme dans l'échantillon 3 témoin était de 2 heures.

En comparant les résultats de notre échantillon témoin 3 avec l'échantillon contenant notre extrait aqueux de *Lippia citriodora* illustrées dans la **figure 27** on a trouvé que le temps prévu pour l'inactivation complète de l'organisme d'essai dans l'échantillon 4 ne convenait pas avec le temps nécessaire pour l'inactivation complète des organismes *Pseudomonas aeruginosa*.

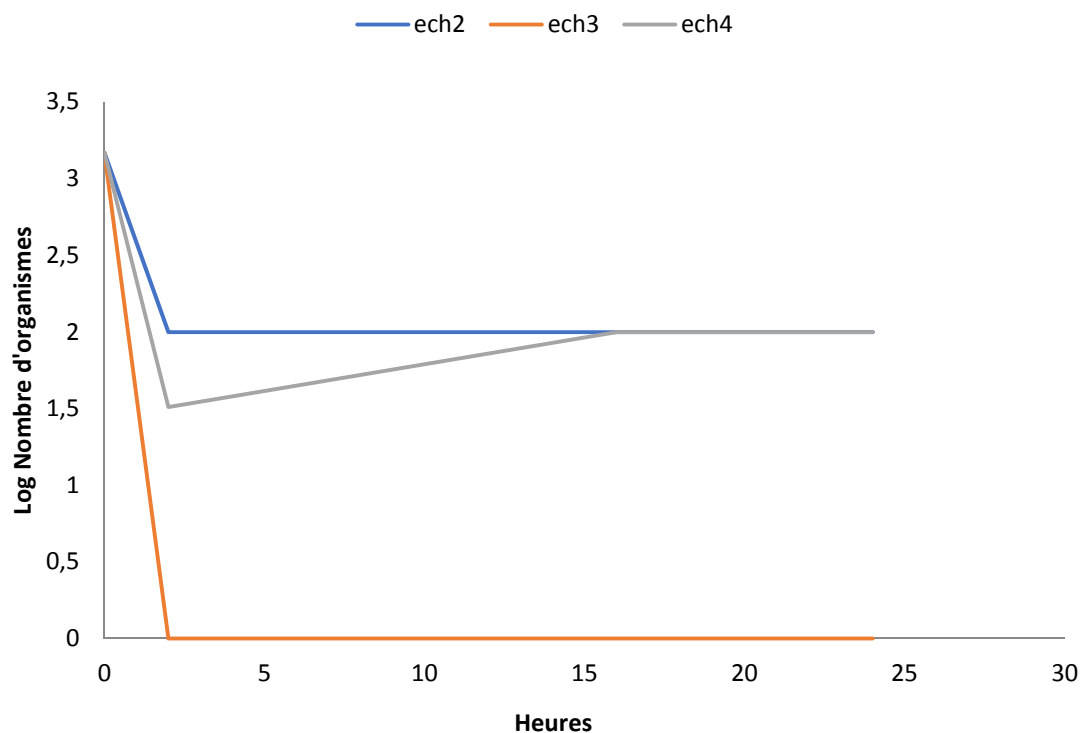


Figure 28 : Résultat du test d’efficacité de la conservation des 3 échantillons vis-à-vis de la souche bactérienne *E. coli*

Tableau 22 : Résultat du test d’efficacité de la conservation des 3 échantillons vis-à-vis la souche bactérienne *E. coli*

	Valeur D	Temps de destruction (heures)	Coefficient de corrélation
Echatillon 2	1.709	5.42	-0 ,6604
Echatillon 3	0.639	2,01	-0,1165
Echatillon 4	1.709	5,42	-0,61004

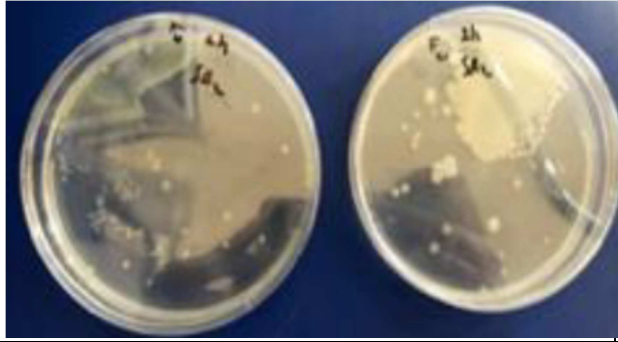


Figure 30 : Résultat du test des échantillons 2 et 4 vis-à-vis *E. coli* après 2h d'incubation

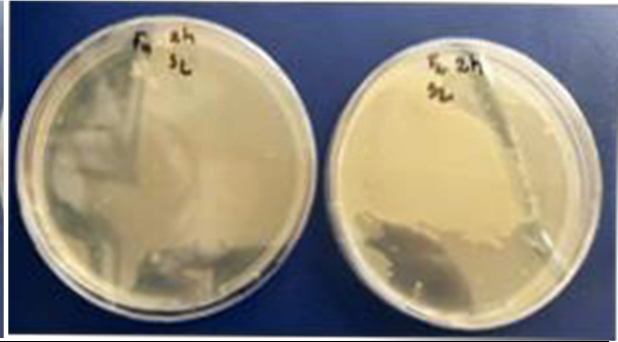


Figure 30 : Résultat du test des échantillons 2 et 4 vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa* après 2h d'incubation

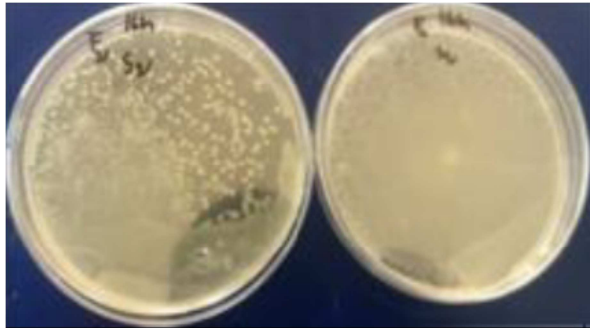


Figure 31 : Résultat du test des échantillons 2 et 4 vis-à-vis *E. coli* après 16h d'incubation.

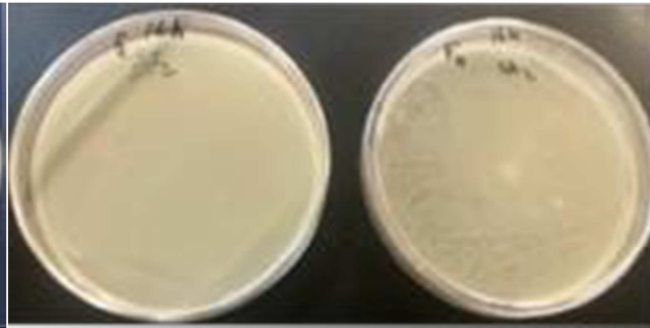


Figure 32 : Résultat du test des échantillons 2 et 4 vis-à-vis *E. coli* après 16h d'incubation.



Figure 33: Résultat du test des échantillons 2 et 4 vis-à-vis *E. coli* après 24h d'incubation

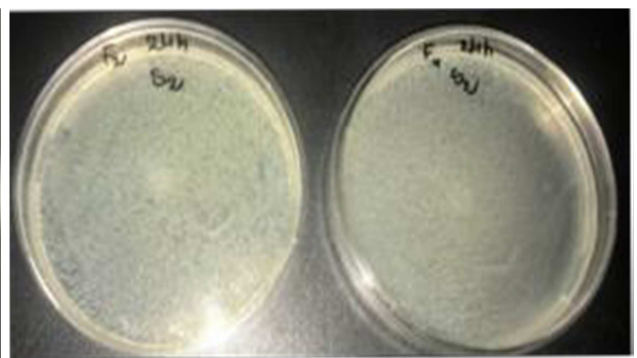


Figure 34: Résultat du test des échantillons 2 et 4 vis-à-vis *E. coli* après 24h d'incubation

Les résultats illustrés dans la **figure 28** ont montré que le temps prévu pour l'inactivation complète de l'organisme d'essai (*E. coli*) dans l'échantillon 4 contenant 0,3 g d'extrait aqueux de *Lippia citriodora* est supérieur au temps prévu pour l'inactivation complète d'*E. coli* dans l'échantillon 3 témoin contenant le conservateur synthétique formaldéhyde.

Un produit cosmétique devrait avoir une valeur D de ≤ 4 heures pour que 10^6 agents pathogènes seront inactivés complètement en 24 heures. Des valeurs D inférieures à 28 heures sont réalistes et atteignables pour presque toutes les bactéries, levures et moisissures non pathogènes, ce qui permettrait au système de conservation d'inactiver 10^6 organismes/matières premières une semaine (Orth, 1979).

Conclusion

Conclusion

Notre étude réalisée au Laboratoires de biotoxicologie, pharmacognosie et valorisation biologique des plantes à l'université de Saïda, nous a permis de mettre en évidence la présence des différentes familles de composés chimiques dans la plante *Lippia citriodora*, évaluer l'activité antioxydant et antimicrobienne d'extrait aqueux *Lippia citrodora* et finalement de tester l'efficacité de l'extrait aqueux en conservation des produits cosmétiques.

L'extraction sélective des composés présente un rendement de 35,47%. Les tests phytochimiques ont montré la présence des alcaloïdes, des polyphénols, des saponosides, des flavonoïdes, des stériles et tritèrènes et finalement des composés réducteurs.

Selon le test du DPPH, l'extrait aqueux de *Lippia citriodora* présente une activité antioxydante par une IC₅₀ de l'ordre de 134 mg/ml. Le témoin, acide ascorbique, a montré une bonne activité antioxydante par rapport l'extrait aqueux de *Lippia citriodora*.

L'étude du pouvoir antimicrobien de l'extrait aqueux de *Lippia citrodora* par la méthode de diffusion des disques n'a montré aucune activité vis-à-vis les souches bactériennes et fongiques utilisées à l'exception d'*E. coli*.

La mise en évidence de l'étude des concentrations minimales inhibitrices d'extrait sélectif de *Lippia citriodora* a révélé des CMI allant de 5,89 à 187,5 mg/ml ouu les souches les plus sensibles sont *E. coli* et *B. subtilis*.

L'efficacité d'extrait aqueux *Lippia citriodora* dans la conservation des produits cosmétiques a été évalué par la méthode de la valeur D. Ce test a démontré que l'extrait aqueux *Lippia citrodora* a réduit le nombre des microorganismes dans le shampoing après 2 heures d'incubation mais il n'a pas respecté les critères de la Pharmacopée Européenne.

Références bibliographiques

Article L. 5131-4, C. (n.d.). *Code de la Santé Publique*. Retrieved from site Légifrance: <https://www.legifrance.gouv.fr/>

Audrey, K. ((2014)). *OPTIMISATION DE LA CONSERVATION DES COSMETIQUES – IMPACT DE LA FORMULATION, RECHERCHE DE NOUVEAUX CONSERVATEURS NATURELS, ENCAPSULATION* .

Abirami, C. P., & Venugopal, P. V. (2005). In vitro evaluation of the antifungal activity of toothpastes. *Journal de Mycologie Medicale*, 15(4), 247-249.

Benarba, B., Belabid, L., Righi, K., amine Bekkar, A., Elouissi, M., Khaldi, A., & Hamimed, A. (2015). Ethnobotanical study of medicinal plants used by traditional healers in Mascara (North West of Algeria). *Journal of ethnopharmacology*, 175, 626-637.

Baydoun, S., Chalak, L., Dalleh, H., & Arnold, N. (2015). Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in traditional medicine by the communities of Mount Hermon, Lebanon. *Journal of ethnopharmacology*, 173, 139-156.

Benayed., N. (2008). *Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : Moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées*. Université Mohamed V_Agdal: Laboratoire Des Substances Naturelles et Thermolyse Eclair. Rabat.

Bruneton J. (2009). *Pharmacognosie. Phytochimie , Plantes médicinales . Paris : Tec & Doc., Paris.*

Cavé, A. (1993). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2006) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. Ninth Edition (M2-A9).26 (1).

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. (2002) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard M27-A2, 2nd ed. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Villanova, PA*, 22 (15).

Debray, M., Jacquemin, H., & Razafindraba, R. S. (1971). Contribution à l'inventaire des plantes médicinales de Madagascar.

Dohou, R., Yamni, K., Tahrouch, S., Hassani, L. I., Badoc, A., & Gmira, N. (2003). Screening phytochimique d'une endémique iberomarocaine, Thymelaealythroïdes. *Bulletin-Société de Pharmacie de Bordeaux*, 142(1/4), 61-78.

Espinel-Ingroff, A., Canton, E., Gibbs, D., & Wang, A. (2007). Correlation of Neo-Sensitabs tablet diffusion assay results on three different agar media with CLSI broth microdilution M27-A2 and disk diffusion M44-A results for testing susceptibilities of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B, caspofungin, fluconazole, itraconazole, and voriconazole. *Journal of clinical microbiology*, 45(3), 858-864.

Ferhat M., L. M. (1997). *Connaissances et circuit thérapeutiques relatifs au plaudisme en zone rurale Sénégalaise . Médecine tropical.*

Fernandez., x. .. (2012). *Conservateurs pour cosmétiques - Généralités et conservateurs antimicrobiens . Formulation techniques de l'ingénieur .*

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

Majoros, L., Kardos, G., Szabó, B., & Sipiczki, M. (2005). Caspofungin susceptibility testing of *Candida inconspicua*: correlation of different methods with the minimal fungicidal concentration. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(8), 3486-3488.

FRIEDRICH, b. ((2008)). *HYGIENE DU NOURRISSON LES PRODUITS COSMETIQUES D'HYGIENE ET LEUR EVOLUTION DEPUIS LES CINQUANTE DERNIERES ANNEES .*

Funes M ., F.-a. S. (2009). "Correlation between plasma antioxydant capacity and verbascoside levels in rats after oral administration of lemon verbena extract" *Food Chem.*

Hagerman, A. E. (2000). Quantification of tannins in tree foliage: a laboratory manual for the FAO/IAEA co-ordinated research project on " The use of nuclear and related techniques to develop simple tannin assays for predicting and improving the safety and efficiency of feeding ruminants on tanniferous tree foliage. <http://www.iaea.org/programmes/nafa/d3/crp/pubd31022manual-tannin.pdf>.

Hellal, Z. (2011). Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*) (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).

Kabara, J. (1996). *Principles for Product Preservation. Preservative-Free and Self Preserving Cosmetics and Drugs: Principles and Practice*, Kabara J.J. & Orth D.S. Marcel Dekker.

Kapetanovic S ., D. D. (1984). *Isolement de l'huile essentielle de rose par distillation sèche. Parfum , Cosmétiques et Aromes.*

KERDUDO, A. (2014). *.OPTIMISATION DE LA CONSERVATION DES COSMETIQUES – IMPACT DE LA FORMULATION, RECHERCHE DE NOUVEAUX CONSERVATEURS NATURELS, ENCAPSULATION .*

Kerduo, A. (2014). *Optimisation de la conservation des cosmétiques .* Nice: Ecole doctorale sciences Fondamentale et Appliquées Institut de chimie.

Mahieu, V. (2003). *La chimie des produits cosmétiques .*

Mustapha K, E. G.-P. (2010). Preservatives in cosmetics: reactivity of allergenic formaldehyde-releasers towards amino acids through breakdown products other than formaldehyde, *Journal of the American Academy of.*

RÈGLEMENT(CE). (1223/2009). *Parlement européen et du Conseil du 30 novembre.* Retrieved from eur-lex.europa.eu: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:0209:FR:PDF>

Ryan, T. (p. 38-41.). *L'activité de leau, une autre façon de voir l'humidité. Mesures Physiques.*

Annexe

Milieux de culture

Bouillon Nutritif (BN, Fluka) :

Formule (en g/l)

Peptone 15,0
Extrait de levure 3,0
Chlorure de sodium.....6,0
Glucose1,0
Eau Distillée qsp1L

pH = 7,5 ($\pm 0,2$) à 37°C

Suspendre 25g de la poudre dans un litre d'eau distillée, en suite stériliser par autoclavage à 121 °C pendant 15 min.

Gélose Nutritive (GN, Fluka):

Formule (en g/l)

Peptone..... 15,0
Extrait de levure..... 3,0
Chlorure de sodium..... 6,0
Glucose..... 1,0
Agar..... 15,0

Eau Distillée qsp 1L

pH = 7,5 ($\pm 0,2$) à 37°C

Suspendre 40g de la poudre dans un litre d'eau distillée, en suite chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

Bouillon Sabouraud :

Formule (en g/l)

Peptone (Fluka)..... 10,0
Extrait de levure (Fluka)..... 3,0
Glucose (Sigma-Aldrich)..... 20,0

Eau Distillée qsp 1L

pH = 5,8 ($\pm 0,2$) à 37°C

Suspendre la poudre dans un litre d'eau distillée, chauffer si c'est nécessaire pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121 °C pendant 15 min.

Gélose Sabouraud :

Formule (en g/l)

Peptone (Fluka)..... 10,0

Extrait de levure (Fluka)..... 3,0

Glucose (Sigma-Aldrich).....20,0

Agar..... 15,0

Eau Distillée qsp 1L

pH = 5,8 ($\pm 0,2$) à 37°C

Suspendre la poudre dans un litre d'eau distillée, en suite chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121 °C pendant 15 min.

Bouillon Mueller Hinton:

Formule (en g/l)

Infusion de viande de bœuf..... 2,0

Hydrolysate de caséine..... 17,5

Amidon..... 1,5

Eau Distillée qsp 1L

pH = 7,4 ($\pm 0,2$) à 37°C

Suspendre 23 g de la poudre dans un litre d'eau distillée, en suite stériliser par autoclavage à 12°C pendant 15 min.

Gélose Mueller Hinton (GMH,Fluka) :

Formule (en g/l)

Infusion de viande de bœuf..... 4,0

Hydrolysate de caséine..... 17,5

Amidon..... 1,5

Agar..... 17

Eau Distillée qsp 1L

pH = 6,8 ($\pm 0,2$) à 37°C

Suspendre 38 g de la poudre dans un litre d'eau distillée, en suite chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121 °C pendant 15 min.

Neutraliseur :

Formule (en g/l)

Gélose nutritive.....	23
NaCl.....	5
Tween 80.....	5
Jauned'œuf.....	75

GN-NaCl :

Formule (en g/l)

GN.....	23
NaCl.....	50
Tween 80.....	5
Jaune d'œuf.....	75

L'eau physiologie :

NaCl.....	9
-----------	---

L'eau distillé qsp 1L