

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mentouri-Constantine
Faculté des Sciences Exactes
Département de Chimie

N° d'ordre :.....
Série :.....

Thèse
Présentée en vue de l'Obtention du Diplôme de
Doctorat en Sciences
Option : Pharmaco-Chimie

E valuation des E ffets B iologiques des E xtraits A queux
de P lantes M édicinales S eules et C ombinées

Présentée par: M^{elle} Benzeggouta Nairouz

Devant le Jury:

Présidente: Kabouche Zahia

Pr. Université Mentouri Constantine

Rapporteur: Ait Kaki Zahia née Semra

Pr. C. H. U. de Constantine

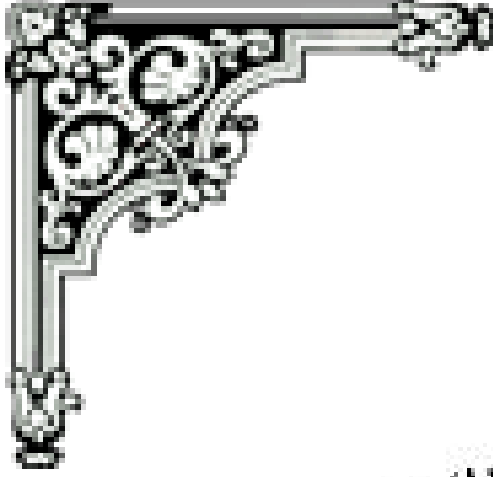
Examineurs: Arrar Lekhmici

Pr. Université Ferhat Abbas Sétif

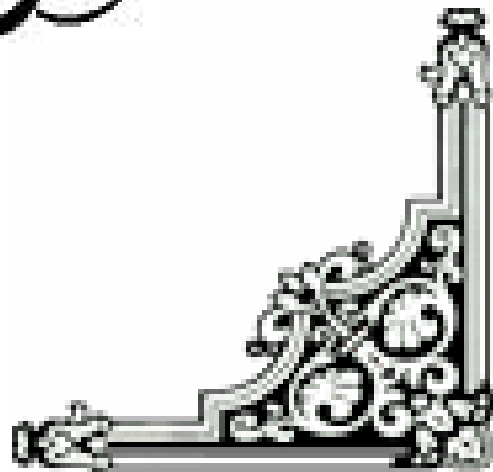
Belattar Abdel Hamid

Pr. Université Mentouri Constantine

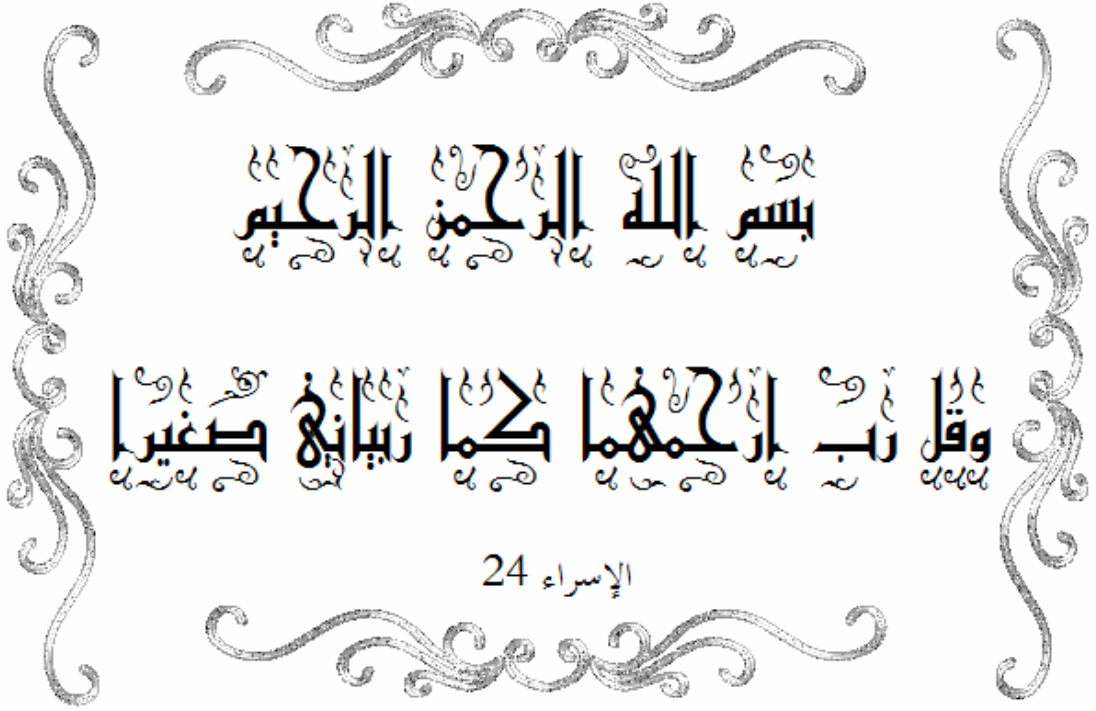
2014-2015



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



A Mes Parents



A toute ma famille

A toutes mes amies

Je remercie Dieu Le Tout Puissant qui m'a aidé à réaliser ce travail.



Je remercie mon encadreur Pr. Ait Kaki pour son aide précieuse et ses conseils.

Je remercie aussi Pr. Kabouche et Pr. Belattar (Université Mentouri-Constantine) d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier aussi Pr. Arrar (Université Ferhat Abbas-Sétif) qui a bien voulu participer à ce jury.

Et toute personne qui m'a aidé de près ou de loin dans la réalisation de ma thèse.

SOMMAIRE

<i>Introduction Générale</i>	1
------------------------------------	---

Partie Bibliographique

Chapitre1: Méthodes D'extraction

I- Introduction	5
II- Méthodes d'Extraction Traditionnelles	6
1- Infusion	6
2- Décoction	7
3- Macération	7
4- Distillation	7
III- Méthodes d'Extraction Modernes et Nécessité de la «Chimie Verte»	8
1- Extraction par Fluides Supercritiques	11
2- Extraction par Eau Surchauffée ou Subcritique	13
3- Extraction Assistée par Micro-Ondes	16
4- Extraction par Ultrasons ou Sonication	18

Chapitre2: Les Activités Biologiques

I- Introduction	21
II- Activité Antimicrobienne	22
III- Activité Allélopathique	27

Chapitre3: Phytochimie et Pharmacologie des Plantes Etudiées

I- <i>Alpinia officinarum</i> Hance	32
1- Classification	32
2- Description	32

3- Principaux Constituants	33
4- Pharmacologie de la Plante	35
II- <i>Zingiber officinale</i> Roscoe.	37
1- Classification	37
2- Description	37
3- Principaux Constituants	38
4- Pharmacologie de la Plante	40
III- <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Nees	42
1- Classification	42
2- Description	42
3- Principaux Constituants	43
4- Pharmacologie de la Plante	44
IV- <i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merrill & Perry	46
1- Classification	46
2- Description	46
3- Principaux Constituants	47
4- Pharmacologie de la Plante	49

Partie Expérimentale

<i>Matériel et Méthodes</i>	50
1- Matériel végétal	50
2- Préparation des Extraits	50
3- Activité antibactérienne	51
a- Souches Bactériennes et Milieux de Culture	51
b- Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)	51
4- Activité Bactériostatique et Bactéricide	52
5- Activité Allélopathique	53
a- Culture des Plantes.....	53
b- Les Essais de l'Activité Allélopathique	54
6- Screening Phytochimique	55
a- Saponosides	55
b- Coumarines	55

c- Tanins (hydrolysables)	55
d- Proanthocyanidols (tanins condensés)	55
e- Flavonoïdes	55
f- Triterpènes et Stéroïdes	56
g- Anthocyanes.....	56
h- Amidon	56
i- Acides Organiques.....	56
j- Alcaloïdes	56
7- Profil spectrophotométrique	57
Résultats et Discussions	58
I- Activité Antibactérienne.....	58
1- Les Bactéries à Gram Positif.....	58
2- Les Bactéries à Gram Négatif	62
3- Les Bactéries à Résistance Inconnue	64
II- Activité Allélopathique	66
1- Les décoctions	66
2- Les extraits surchauffés	68
III- Screening Phytochimique	71
1- Les décoctions	71
2- Les extraits surchauffés	72
IV- Profil Spectrophotométrique	75
1- Spectres des Décoctions	75
2- Spectres des Extraits Surchauffés	76
Conclusion	78
Références	80
Publications	
Résumés	

Introduction

Générale

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le concept d'ethnopharmacologie n'a jamais quitté la découverte de nouveaux médicaments, car c'est une source inépuisable. C'est une discipline qui s'intéresse aux médecines traditionnelles et aux remèdes constituant les pharmacopées traditionnelles. Elle a comme objectifs de recenser partout dans le monde les savoirs traditionnels, notamment là où la tradition est orale, car la transmission de la connaissance est entravée à la fois par la perte d'intérêt du métier de guérisseur et par la non reconnaissance du métier, voire son interdiction pour exercice illégal de la médecine (**Fleurentin, 2012**).

Guidées par les usages empiriques des plantes, les études ethnopharmacologiques ont apporté à l'humanité plus de 60% de ses médicaments. Située à la croisée des sciences de l'homme et de la nature, l'ethnopharmacologie a su développer des méthodologies originales, alliant tradition et modernité qui lui ouvrent des perspectives prometteuses (**Fleurentin, 2012**). Comme l'idée d'associer l'ethnopharmacologie à la chimie verte, une des sciences innovantes qui donne l'impression d'un retour au naturel et un point de départ de la thérapeutique par son cinquième principe visant à utiliser des solvants plus sûrs et moins toxiques pour l'homme et son environnement (**Benzeggouta, 2012**).

La chimie verte est une science qui implique la réduction dans l'usage des substances dangereuses ou leur élimination dans les procédés chimiques ou la genèse de produits intermédiaires toxiques risqués, incluant réactifs, solvants, produits et sous produits. C'est l'usage de la chimie pour réduire ou prévenir la pollution, et plus précisément c'est le modèle des produits chimiques et des procédés qui sont plus bénignes pour l'environnement. La chimie verte et durable est un nouveau concept apparu dans les années 90, qui s'intéresse au développement de procédés et technologies qui résultent de réactions chimiques plus efficaces, et qui génèrent peu de déchets et moins d'émissions environnementales que les réactions chimiques traditionnelles produisaient, ainsi que la réduction de leurs impacts négatifs sur la santé humaine et l'environnement (**Doble et Kruthiventi, 2007**).

La première rencontre avec la chimie verte et ses principes a commencé en 2009 avec le Premier Séminaire International Chimie Verte et Développement Durable 'CVDD 2009' qui s'est tenu à Mostaganem entre le 15 et le 17 Décembre 2009, avec un travail sur l'utilisation de l'huile végétale et l'eau comme solvants d'extraction des plantes médicinales

(Benzeggouta et al., 2009), et à partir de cette date mes recherches ont connus un nouveau départ dans l'intégration de l'ethnopharmacologie dans la chimie verte et vis-versa.

Les douze principes de la chimie verte se résument comme suit: 1-prévention de la pollution à la source ; 2-économie d'atomes et d'étapes ; 3-synthèses chimiques moins nocives ; 4-conception de produits chimiques plus sécuritaires ; 5-solvants et auxiliaires plus sécuritaires ; 6-minimiser les dépenses énergétiques des procédés chimiques ; 7-utilisation de matières premières renouvelables ; 8-réduction de la quantité de produits dérivés ; 9-catalyse sélective ; 10-conception de substances non persistantes ; 11-analyse en temps réel de la lutte contre la pollution ; 12-chimie sécuritaire pour prévenir les accidents (Schulz et al., 2008).

Dans le Coran et la Sounna il y a plusieurs signes concernant ces problèmes environnementaux et leurs solutions bien avant l'existence de la chimie verte et ses principes (Benzeggouta, 2010), comme le verset suivant:

ظَهَرَ الْفَسَادُ فِي الْبَرِّ وَالْبَحْرِ بِمَا كَسَبَتْ
أَيْدِي النَّاسِ لِيُذِيقَهُمْ بَعْضَ الَّذِي
عَمَلُوا إِنَّهُمْ لَعَالَمٌ أَلْفِينُ
الرُّومُ 41

« La corruption est apparue sur la terre et dans la mer à cause de ce que les gens ont accompli de leurs propres mains; afin qu'[Allah] leur fasse goûter une partie de ce qu'ils ont œuvré; peut-être reviendront-ils (vers Allah) »

Sourate 30, Verset 41

Et les deux Hadiths où le Prophète Mohamed (SAW) incite les gens à protéger leur environnement, en disant:

« *Evitez les trois malédictions, faire ses besoins (selles) dans les ressources
d'eau, les bords de la route et l'ombre* »

« *Le retrait de ce qui est nuisible de la route est une charité* »

انقوا المطعنة الثلاثة، البراز في الموارد

و قارعة الطريق و الظل

رواه أبو داود

و اماطة الأذى عن الطريق صدقة

Dans le cinquième principe, qui présente les différentes alternatives, ou solvants verts, à l'usage des solvants organiques, se cache une idée très ancienne, aussi ancienne que les premiers traitements utilisés par l'homme: «l'eau un solvant vert par excellence» du fait que c'est une source non toxique, abondante, peu couteuse et non inflammable (**Doble et Kruthiventi, 2007**).

En utilisant l'eau dans l'extraction ou les différentes réactions chimiques, les chercheurs tentent de revenir aux ressources naturelles, du fait que les solvants classiques sont des composés organiques volatils (COV), qui peuvent se disperser facilement dans l'environnement et provoquent plusieurs problèmes environnementaux: ils sont très souvent inflammables et généralement nocifs du point de vue de l'écologie et de la santé. L'inquiétude est d'autant plus justifiée que les solvants sont utilisés en grandes quantités, surtout à l'échelle industrielle (**Breslow, 2010**).

Les premiers traitements utilisés par l'homme étaient des préparations simples à base d'eau pour extraire les principes actifs des plantes médicinales. L'utilisation de la tisane, que ce soit infusion, décoction ou macération, est retrouvée parmi les méthodes les plus anciennes à côté des fumigations, des inhalations de vapeur, de l'application d'une solution sur le corps. La tisane n'est pas uniquement un apport d'eau. Il s'agit d'une préparation médicinale utile en

médecine et en phytothérapie. L'eau permet ainsi de récupérer certains constituants actifs hydrosolubles (Goetz, 2004).

C'est ainsi que se croisent les voies de l'ethnopharmacologie et de la chimie verte en utilisant l'eau, source de vie, pour fabriquer des remèdes plus efficaces et moins nocifs pour l'homme et son environnement.

L'objectif de ce travail est une étude comparative entre les extraits obtenus par les méthodes d'extractions traditionnelles et celles de la chimie verte, pour évaluer leurs effets antibactériens et allélopathiques, utilisant quatre épices: le galanga, le gingembre, la cannelle et les clous de girofle, seuls et en combinaison binaire et quaternaire (Dawilou à Constantine) pour vérifier une éventuelle synergie.

Le premier chapitre présente différentes méthodes d'extraction traditionnelles dans un cadre ethnopharmacologique comme l'infusion, la décoction, la macération, le sirop et la distillation, et des techniques modernes dans un cadre classique utilisant les solvants organiques et la nécessité de la chimie verte comme l'usage des fluides supercritiques, eau surchauffée, micro-ondes et ultrasons.

Le deuxième chapitre expose les activités biologiques utilisées pour évaluer les pouvoirs des différents extraits. En premier, l'activité antibactérienne qui nécessite plus d'attention du fait que l'OMS ne cesse de tirer la sonnette d'alarme sur les résistances microbiennes. En second, l'activité allélopathique ou plus exactement la recherche de bio-herbicides, qui est devenue un besoin croissant face à l'émergence de pesticides, parfois inefficaces, mais dangereux pour l'homme, l'animal et toutes les composantes de l'environnement.

Le troisième chapitre présente les différentes plantes utilisées dans ce travail, galanga, gingembre, cannelle et clous de girofle, leur description, composition chimique et les propriétés pharmacologiques correspondantes.

Dans la partie expérimentale seront présentées les techniques d'extraction des plantes médicinales (décoctions et extraits surchauffés), les techniques d'évaluation des effets biologiques (activité antibactérienne et allélopathique) et la composition chimique des différents extraits utilisant le screening phytochimique et le profil spectrophotométrique.

Enfin une conclusion générale présente les différents résultats obtenus ainsi que les perspectives envisagées.

Partie

Bibliographique

Chapitre 1

MÉTHODES D'EXTRACTION

DE L'ETHNOPHARMACOLOGIE À LA CHIMIE VERTE

DÉVELOPPEMENT DES MÉTHODES D'EXTRACTION

OU RETOUR AU POINT DE DÉPART ?

I- Introduction

L'ethnopharmacologie peut être définie comme une étude multidisciplinaire d'agents biologiquement actifs utilisés en médecine traditionnelle, ou bien, c'est l'étude scientifique qui relie les groupes ethniques, leur état de santé et comment ils se rapportent à leurs habitudes physiques et la méthodologie de création et d'utilisation des médicaments, (**Singh Saroya, 2011**) spécialement à base de plantes qui sont la principale source de médicaments et d'aliments où ils jouent un rôle essentiel dans le maintien de la santé humaine. La valeur médicinale de ces plantes se trouve dans certaines substances chimiques bioactives, essentiellement des métabolites secondaires, qui possèdent une action physiologique sur le corps humain: alcaloïdes, polyphénols et terpénoïdes (**Kardong et al., 2013**).

Ces métabolites peuvent être extraits par plusieurs techniques traditionnelles, modernes ou vertes. Les méthodes traditionnelles sont celles utilisant les procédés de base les plus simples pour extraire le «Totum» ou l'extrait brut de la plante par l'intermédiaire de l'eau (pour les molécules hydrosolubles) ou de l'huile (pour les molécules liposolubles). Les méthodes modernes ont été employées depuis le 18^e siècle pour la séparation et l'isolement des principes actifs majoritaires des plantes médicinales et qui utilisent principalement des solvants organiques. Ces méthodes sont les plus employées jusqu'à ce jour à l'échelle de laboratoire ou industrielle. Mais l'impact des solvants organiques sur l'homme et son environnement a incité les chercheurs à trouver des solutions pour diminuer ou éliminer leur usage. C'est alors que vers les années 90 du siècle dernier qu'une nouvelle science a vu le jour appelée «Chimie Verte», basée sur douze principes visant à protéger la planète et ses habitants, humains, animaux, végétaux et microbiens. Le cinquième principe de la chimie verte est l'usage de solvants verts qui veut dire inoffensifs et moins toxiques que possible, comme le chauffage par micro-ondes, les liquides ioniques, le CO₂ supercritique et l'eau (**Chevallier, 2001; Lancaster, 2002; Goetz, 2004**).

Ainsi, cette technologie avancée d'extraction fait appelle parfois au naturel; c'est le retour au point de départ !

II- Méthodes d'Extraction Traditionnelles

L'extraction veut dire la séparation des parties actives de tissus végétaux ou animaux des composants inactifs ou inertes à l'aide de solvants sélectifs, traditionnellement l'eau, les huiles végétales ou les graisses animales. Les produits ainsi obtenus sont relativement impures sous forme de liquides, semi-solides ou poudres exclusivement destinés à un usage oral ou externe. Il s'agit de préparations connues comme les tisanes et les huiles médicinales (**Handa, 2008**).

La tisane, que ce soit infusion, décoction ou macération, est un procédé d'extraction de constituants actifs des plantes médicinales. Le mot tisane vient du grec *ptisané* qui désignait orge mondé, puis tisane d'orge. L'utilisation de la plante en tisane est retrouvée parmi les méthodes les plus anciennes à côté des fumigations, des inhalations de vapeur, de l'application d'une solution sur le corps. L'eau chaude permet ainsi de récupérer certains constituants actifs hydrosolubles (**Goetz, 2004**). D'autres techniques traditionnelles étaient aussi utilisées pour la récupération des principes liposolubles et aromatiques comme les huiles infusées (**Benzeggouta, 2005**). La présence d'un composé ou d'un autre dépend de sa solubilité dans le solvant utilisé, la température et la durée d'extraction et la fragmentation de la plante (**Goetz, 2004**).

1- Infusion:

C'est la forme de préparation la plus simple, elle se prépare en versant de l'eau bouillante sur les parties de plantes fraîches ou séchées et les bien tremper afin d'extraire leurs principes médicinales. Elle convient pour l'extraction de parties délicates ou finement hachées des plantes: feuilles, fleurs, graines, écorces et racines, ayant des constituants volatiles ou thermolabiles comme les huiles essentielles (**Baba-Aïssa, 2000; Kraft et Hobbs, 2004**).

2- Décoction:

Elle convient pour l'extraction de matières végétales dur ou très dur : bois, écorce, racines, ou des plantes avec des constituants peu solubles (ex : l'acide silicique). Elle consiste à faire bouillir les plantes fraîches ou séchées dans de l'eau pendant 10 à 30 min, pour bien extraire les principes médicinales (**Baba-Aïssa, 2000; Kraft et Hobbs, 2004**).

3- Macération:

Elle consiste à mettre une plante ou partie de plante, dans de l'eau froide (macération aqueuse) ou une huile végétale (macération huileuse), pendant plusieurs heures, voir plusieurs jours, pour permettre aux constituants actifs de bien diffuser. Elle convient pour l'extraction de plantes contenant du mucilage, comme les graines de lin ou les graines du plantain des sables, leur forte concentration en amidon ou pectine peut causer une gélatinisation s'ils se préparent dans de l'eau bouillante. Egalement utilisée pour empêcher l'extraction de constituants indésirables qui se dissolvent dans l'eau chaude (**Kraft et Hobbs, 2004**). Elle concerne aussi les plantes dont les substances actives risquent de disparaître ou de se dégrader sous l'effet de la chaleur par ébullition (**Baba-Aïssa, 2000**).

4- Distillation:

C'est une pratique très ancienne utilisant la vapeur d'eau pour récupérer les principes volatiles. Développée par Jabir Ibn Hayyan (Geber 721-815) qui a rajouté l'alambic à l'ancien appareil de distillation pour la réfrigération, mais utilisée par Al Kindi (Alchindius 805-873) et Ibn Sina (Avicenne 980-1037) pour la préparation des parfums. Les eaux distillées ou hydrolats, sont obtenues par distillation de la plante (feuilles, tiges...), alors que les eaux florales sont obtenues de la même manière mais à partir des fleurs (**Shakeel, 1999; Goetz et Busser, 2007**). De nos jours cette technique traditionnelle est encore utilisée à Constantine pour l'extraction de certaines plantes aromatiques (Figure n°1).



*Figure n°1: Distillation traditionnelle des fleurs de roses (Rosa damascenna)
Pratiquée à ce jour à Constantine*

III- Méthodes d'Extraction Modernes et Nécessité de la «Chimie Verte»

Les débuts de l'usage des solvants organiques pour l'extraction des plantes médicinales sont mal connus, mais on pense que c'est l'apothicaire français Nicolas Lémery (1645-1715) qui a utilisé l'alcool comme solvant et a également prolongé la durée de l'extraction. Robert Boyle (1627-1691) n'a pas extrait un alcaloïde de l'opium mais il était dans la bonne voie en le traitant par le carbonate de potassium et l'alcool. En 1747 le saccharose a été isolé à partir de plusieurs plantes par l'allemand Andreas Sigismund Marggraf (1709-1780). Alors que le suédois Carl Wilhelm Scheele (1742-1786) avait beaucoup de succès dans le domaine de la phytochimie en isolant les acides citrique, gallique, malique, oxalique, tartrique et prussique (cyanure d'hydrogène) (Evans, 2002).

Au 19^e siècle le progrès de la phytochimie était plus rapide, plusieurs principes actifs ont été isolés des plantes médicinales tels que les alcaloïdes du pavot en 1803 (narcotine), l'inuline (polysaccharide) de l'aunée officinale (*Inula helenium*) en 1804 et une variété d'autres principes actifs. En 1838, l'acide salicylique, un précurseur chimique de l'aspirine, était extrait du saule blanc (*Salix alba*). Il sera synthétisé en laboratoire pour la première fois en 1860. A partir de cette date la médecine prend un nouvel essor loin de la phytothérapie traditionnelle: l'isolement et la synthèse des principes actifs des plantes médicinales (Chevallier, 2001).

Les méthodes d'extraction conventionnelles des plantes médicinales utilisaient les solvants organiques, soit par macération (extraction discontinue) ou en utilisant certains appareils comme le Soxhlet (Figure n°2) qui est une extraction continue inventé pour la première fois en 1879 par l'allemand Franz von Soxhlet (1848-1926), mais certains inconvénients se présentent avec cet appareil à cause de la taille limitée de la cartouche qui porte la plante, et la chaleur qui peut dégrader les composés chimiques (**Wikipédia, 2014**).

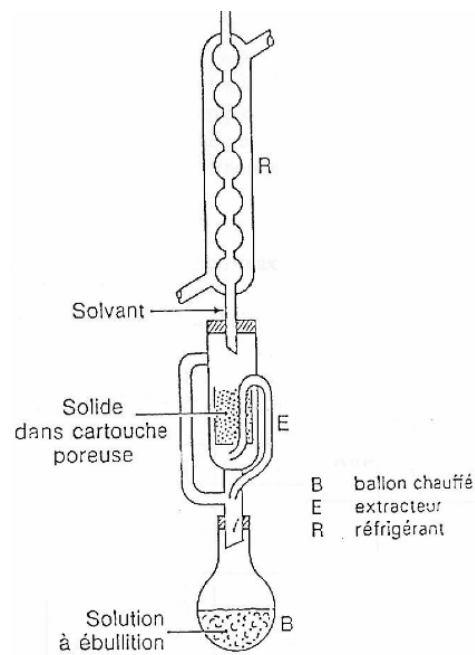


Figure n°2: L'extracteur de Soxhlet (Wikipédia, 2014).

Les solvants organiques sont des composés chimiques volatils et relativement inertes chimiquement et dans la plupart des applications ils jouent un rôle transitoire en facilitant le processus d'extraction, pour être ensuite évacués (**Bégin et Gérin, 2002**). Certains solvants organiques ont été remplacés ou suspendus de l'utilisation pour leurs dangers sur les organismes vivants ou sur l'environnement. Ils peuvent avoir des effets toxiques sur les systèmes nerveux, cardio-vasculaire et de reproduction, sur la peau, les yeux, les muqueuses, le foie, les reins, le sang et même des effets cancérigènes. Alors que sur l'environnement certains solvants organiques peuvent avoir des effets sur la déplétion de la couche d'ozone, la formation du smog photochimique, le réchauffement climatique, pollution de l'air, des eaux et des sols. Pour cela, la réduction des substances toxiques est devenue une nécessité pour la protection de l'homme et son environnement et pour un développement mondial durable

(Gérin, 2002), utilisant des conditions alternatives comme la suppression des solvants (telle que les micro-ondes), l'utilisation de solvants facilement séparables et sûrs comme les fluides supercritiques, l'utilisation de solvants non volatils comme les liquides ioniques ou, encore, l'utilisation de solvants n'ayant pas d'impact sur l'environnement comme l'eau (Scherrmann et al., 2008).

L'idée de « chimie verte » ou « chimie durable » est alors fondée vers les années 90, ce concept est introduit en 1998 par les chimistes américains Paul Anastas et John C. Warner pour être appliquée d'abord à l'industrie chimique, afin de mettre en œuvre des principes pour réduire et éliminer l'usage ou la génération de substances néfastes pour l'environnement, par de nouveaux procédés chimiques et des voies de synthèses propres, c'est-à-dire respectueuses de l'environnement, parmi ses douze principes (Figure n°3), le cinquième est celui d'utiliser des solvants plus sûrs (Gérin, 2002; Wikipédia, 2014).



Figure n°3: Les douze principes de la chimie verte

Parmi les techniques non conventionnelles ou écologiques empruntées par la chimie verte les plus utilisées sont: l'extraction par fluides supercritiques, par eau surchauffée ou subcritique, par micro-ondes et l'extraction par ultrasons.

1- Extraction par Fluides Supercritiques

En 1822, le physicien français Charles Cagniard de la Tour (1777-1859) remarque qu'au-dessus de certaines températures et pressions, les substances simples ne se condensent pas et ne s'évapore pas mais existent sous forme de fluides. Au-dessous de ces conditions les deux phases gaz et liquide possèdent la même densité et aucune distinction entre les deux phases, c'est l'état critique (**Evans, 2002**).

D'autres observations ont été faites sur l'état critique de la matière par plusieurs scientifiques: Michael Faraday (1791-1867) en 1823 et 1845, Adrien-Jean-Pierre Thilorier (1790-1844) en 1838, J. Natterer en 1844, Thomas Andrews (1813-1885) en 1869, Louis Paul Cailletet (1832-1913) et Raoul Pictet (1846-1929) en 1877, Hannay et Hogarth en 1879, William Ramsay (1852-1916) en 1883. Mais le mérite doit être donné à K. Zosel qui a présenté un travail sur la décaféinasson du café utilisant cette technique en 1964 (**Hannay et Hogarth, 1880; Penrose, 1884; Azmir et al., 2013**). Depuis ces travaux, la technique a attiré l'intérêt de plusieurs chercheurs et a été utilisée avec succès dans l'analyse environnementale, pharmaceutique, alimentaire et également dans l'industrie.

Toutes les substances sur terre possèdent trois états: solide, liquide et gaz, alors que l'état supercritique est distinct et qui ne peut être atteint que si la substance est soumise à une température et une pression au-delà de son point critique. Ce dernier se caractérise par une température critique (T_c) et une pression critique (P_c), qui au-dessus desquelles les phases liquide et gaz n'existent pas et leurs propriétés spécifiques disparaissent, ce qui veut dire que le fluide supercritique ne peut pas être liquéfié par la modification de la température ou la pression (Figure n°4). Le fluide supercritique ressemble au gaz dans sa propriété de diffusion, viscosité et la tension de surface, et il ressemble au liquide dans sa densité et son pouvoir de solvation. Ces propriétés le rendent convenable pour l'extraction des composés en un temps court avec un rendement élevé (**Evans, 2002**).

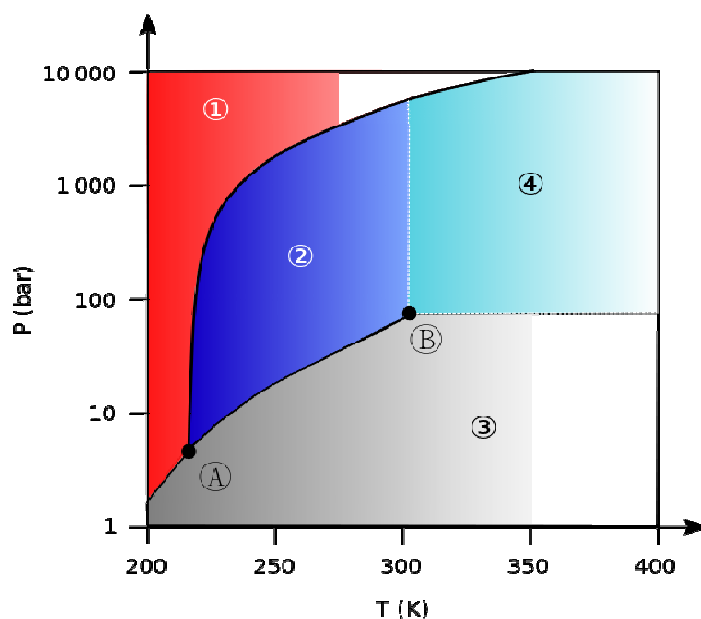


Figure n°4: Diagramme de phase du CO₂: (Wikipédia, 2014)

(1): solide, (2): liquide, (3): gaz, (4): fluide supercritique, (A): point triple, (B): point critique

Le dioxyde de carbone (CO₂) est considéré comme le solvant idéal pour l'extraction supercritique, sa température critique est 31°C qui est proche de la température ambiante, alors que sa pression critique est faible de l'ordre de 74 bars (pour l'eau T_c=374°C, P_c=220atm), ce qui offre la possibilité d'opérer à pressions modérées généralement entre 100 et 450 bars. L'inconvénient du CO₂ est qu'il a une faible polarité qui le rend idéal pour les lipides, les graisses et les substances non polaires, mais inapproprié pour la plupart des échantillons pharmaceutiques. Ce problème a pu être surpassé par l'usage de petites quantités de solvants chimiques pour augmenter la polarité du CO₂, par exemple 0.5ml de dichlorométhane (CH₂Cl₂) peut augmenter l'extraction qui est égale à quatre heures d'hydrodistillation (Azmir et al., 2013).

En industrie le CO₂ supercritique possède un avantage environnemental par rapport aux solvants organiques usuels car il ne laisse aucun résidu de solvant dans le produit. Cependant, les hautes pressions et pour certaines substances les hautes températures impliquées dans l'extraction supercritique sont les principaux inconvénients de la technique (Evans, 2002).

Certains avantages de cette technique se résument comme suit (**Azmir et al., 2013**):

- Coefficient de diffusion élevé et faible viscosité et tension de surface que les solvants liquides, ce qui permet une bonne pénétration dans la matrice de l'échantillon pour favoriser le transfert de masse.
- La sélectivité est supérieure que les solvants liquides du fait que le pouvoir de solvation peut être réglé par changement de température ou/et de pression.
- La séparation du solvant est facile et se fait par dépressurisation du liquide supercritique ce qui économisera le temps.
- Le travail à température ambiante est parfait pour l'extraction des molécules thermolabiles.
- Cette technique utilise de faibles quantités de solvants organiques et par conséquent elle est considérée comme «amie» de l'environnement.
- Elle est utile pour les molécules très volatiles du fait qu'elle peut être couplée aux techniques chromatographiques.
- Le recyclage et l'usage à nouveau du fluide supercritique est possible ce qui diminue la génération des déchets.
- L'échelle peut être arrangée selon l'échantillon étudié de l'ordre de quelques milligramme au laboratoire jusqu'à plusieurs tonnes à l'industrie.

Avec cette technique plusieurs métabolites secondaires ont pu être extraits: alcaloïdes (caféine, nicotine), polyphénols, huiles essentielles (arômes et parfums), huiles alimentaires (olive et soja), glycosides, jus de fruits, saponines, oléorésines ... (**Zancan et al., 2002; Benaissi, 2013; Scopel et al. 2014; Bitencourt et al., 2014**).

2- Extraction par Eau Surchauffée ou Subcritique

En essayant de chercher des méthodes alternatives pour remplacer les solvants organiques dans l'extraction des produits naturels à partir des plantes, une technique utilisant l'eau surchauffée a été utilisée depuis quelques décennies. L'objectif était de réduire la pollution dans les lieux de travail et l'environnement et éviter les résidus indésirables des solvants organiques qui sont souvent présents dans les produits alimentaires et les parfums (**Clifford, 2002**).

L'usage de l'eau à température plus élevée que son point d'ébullition date depuis longtemps avec les travaux de Denis Papin (1647-1712) et sa machine à vapeur en 1679, développée plus tard en 1820 par Pierre-Alexandre Lemare (1766-1835) et sa marmite autoclave, et en 1879 Charles Chamberland (1851-1908) améliore le procédé à des fins médicales. L'autoclave a été utilisé dans le domaine industriel, pour le nettoyage et la désinfection ou certaines réactions chimiques et l'extraction des minerais. Mais les procédés d'obtention de l'eau surchauffée ont largement progressé depuis (**Goodwin, 1925; Wikipédia, 2014**).

L'eau surchauffée ou subcritique est l'eau liquide au-dessus de sa température d'ébullition (100°C) sous pression. Sous ces conditions l'eau liquide est moins polaire qu'à la température ambiante et possède une capacité croissante à dissoudre les composés organiques, ainsi lui donnant un caractère étendu des solvants organiques polaires. Le terme eau surchauffée est attribué à l'eau liquide sous pression à température comprise entre 100°C et 374°C qui est sa température critique. Pour l'extraction des produits naturels la température ne peut pas être trop élevée à cause de leur thermosensibilité, alors l'intervalle entre 100 et 200°C est le plus utilisé. Les propriétés de l'eau changent lorsque sa température augmente, à cause de la rupture des liaisons hydrogène et sa constante diélectrique diminue. A température ambiante cette constante est de l'ordre de 80, mais lorsque la température augmente elle chute. A 205°C la constante diélectrique est égale à 33 comme celle du méthanol à température ambiante. Ainsi, entre 100 et 200°C l'eau surchauffée se comporte comme un mélange eau-méthanol (Figure n°5) (**Clifford, 2002**).

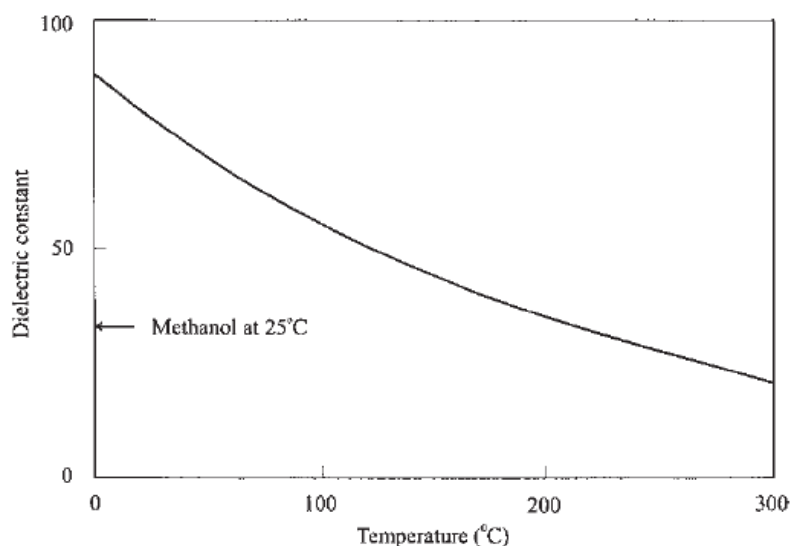


Figure n°5: La constante diélectrique de l'eau en fonction de la température.

La valeur pour le méthanol à température ambiante est mentionnée pour comparaison (Clifford, 2002).

La solubilité des composés organiques dans l'eau surchauffée est supérieure à leur solubilité dans l'eau à température ambiante pour deux raisons: la première est le changement dans la constante diélectrique et l'eau devient moins polaire; la seconde est lorsqu'un composé possède une faible solubilité à température ambiante aura une grande enthalpie positive de la solution et par conséquent une augmentation de sa solubilité. Les composés ayant une grande solubilité dans l'eau surchauffée sont généralement polarisables, comme les composés aromatiques, les huiles essentielles ou ceux possédant un caractère polaire (Clifford, 2002).

Parmi les avantages de cette technique: faible coût, non toxique, un rendement meilleur, une bonne qualité de produits propres, un bénéfice environnemental, et de l'économie d'énergie (pour l'élévation de la température de l'eau de 30 à 150°C il faut 505kJ/kg, alors que pour transformer l'eau à 30°C en vapeur à 100°C il faut 2550kJ/kg) (Clifford, 2002; Smith, 2002).

Certains problèmes se présentent comme: la séparation des composés désirés de l'eau à la fin du procédé et des autres composés hydrosolubles présents dans l'extrait aqueux; cet extrait est souvent coloré marron ressemblant au thé avec un précipité dans lequel les composés oxygénés sont absorbés; certains composés peuvent subir des réactions chimiques comme l'oxydation et l'hydrolyse alors il faut utiliser une eau désoxygénée (l'amidon et la

cellulose peuvent s'hydrolyser en sucres); à la température nécessaire à l'hydrolyse un extrait marron foncé a été obtenu qui sent l'odeur de combustion (brûlage), il faut utiliser des températures plus basses qui donnent l'odeur de cuisson due à la réaction de Maillard, alors la technique peut être utilisée pour la fabrication des arômes alimentaires, l'exemple de l'extraction des grains de café crus donne un extrait plus concentré avec une grande similitude de composition chimique et de proportions que le café grillé (**Clifford, 2002**).

L'application de l'eau surchauffée a été réalisée sur plusieurs échantillons: de sols pour l'extraction des pesticides par exemple; de matières végétales pour l'obtention des huiles essentielles et certains métabolites secondaires et pour l'analyse chromatographique (**Smith, 2002; Gogus et al., 2006; Luque-Rodriguez et al. 2006; Smith, 2008; Jayawardena et Smith, 2010**).

3- Extraction Assistée par Micro-Ondes

Les micro-ondes ou hyperfréquences sont des ondes électromagnétiques de longueur d'onde intermédiaire entre l'infrarouge et les ondes de radiodiffusion entre 300 GHz à 300 MHz. Cependant, quelques fréquences seulement sont utilisées pour des usages industriels, scientifiques et médicaux (ISM) comprises entre 0.915 à 2.45 GHz, à cette dernière fréquence la matière réagit avec le champ électromagnétique principalement via le phénomène de rotation des dipôles et de polarisation induite (**Ferhat et al., 2010; Leonelli et al., 2013**).

L'usage de l'énergie micro-onde dans les laboratoires de chimie a été décrit pour la première fois en 1986 par R. Gedye et coll. et R.J. Giguere et coll. en synthèse organique et par K. Ganzler et coll. pour l'extraction des matrices biologique en vue d'analyse d'échantillons (**Gedye et al., 1986; Giguere et al., 1986; Ganzler et al., 1986**). Depuis, l'usage de cette technique non conventionnelle pour l'extraction a augmenté en la considérant comme procédé «vert» qui permet l'économie d'énergie, de temps, de solvants et de déchets.

C'est un chauffage sélectif utilisant les radiations micro-ondes qui interagissent avec les dipôles des molécules polaires ou polarisables. Les molécules polaires tentent de s'orienter (rotation) dans la direction de champ et comme cela elles chauffent. L'énergie électrique est convertie en énergie cinétique qui est ensuite transformée partiellement en chaleur par cette

rotation dipolaire. L'alignement des dipôles par rapport au champ électrique est contrarié par les forces d'interactions entre molécules (liaisons hydrogène et Van der Waals) qui peuvent être assimilées à des forces de frottement internes, qui s'opposent à la libre rotation des molécules et de la friction produite naît le dégagement de chaleur. Sous chauffage micro-ondes, le volume traité devient lui-même source de chaleur, on parle de dégagement de chaleur de l'intérieur vers l'extérieur du récipient. La paroi externe du réacteur est plus froide que son milieu, et inversement pour le cas du chauffage conventionnel comme l'exemple de la plaque chauffante (Figure n°6) (**Pangarkar, 2008; Ferhat et al., 2010**).

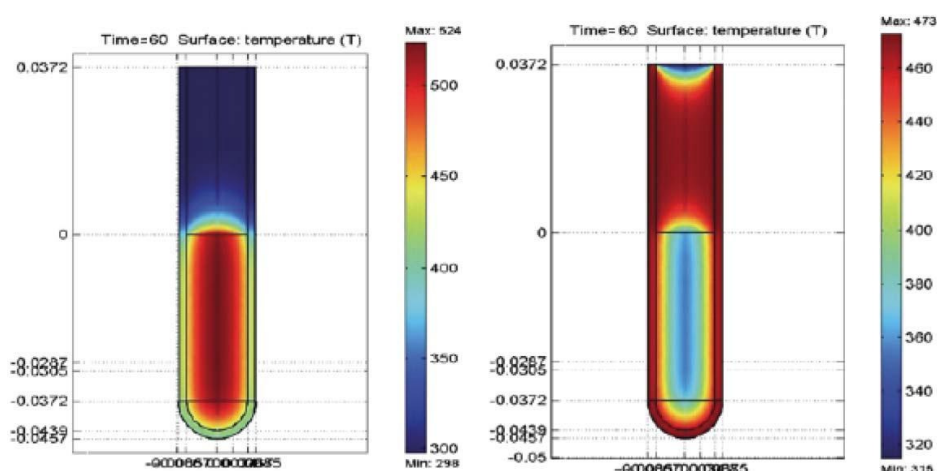


Figure n°6: Différents types de chauffage, à gauche, un tube contenant des réactifs, chauffés par micro-onde (tout le contenant est chaud en rouge). A droite, un chauffage traditionnel (le cœur du tube est froid en bleu).

(<http://pourquoilecielbleu.cafe-sciences.org/files/2013/01/microwave-heating.jpeg>)

Dans le cas des solvants non polaires et sans groupement polarisables le chauffage est faible, il y a une absorption diélectrique seulement qui est due à la polarisation atomique et électronique. Cet effet thermique est presque instantané à l'échelle moléculaire mais limité à une petite région en profondeur proche de la surface du matériau, le reste est chauffé par conduction. Ainsi, les particules larges ou agglomérats des petites particules ne peuvent pas être chauffées uniformément, et c'est l'inconvénient majeur du chauffage par micro-ondes. Il est possible d'utiliser des sources d'énergie élevées pour augmenter la profondeur de la pénétration, mais les radiations micro-ondes montrent un déclin exponentiel une fois à l'intérieur d'un solide absorbant (**Pangarkar, 2008**).

Certains avantages de cette technique:

- amélioration du produit existant
- augmente la pureté de l'extrait
- réduit la dégradation par la chaleur
- réduit les coûts du procédé
- c'est une extraction significativement rapide
- application de très faible énergie
- usage de très faibles quantités de solvant

L'extraction assistée par micro-ondes a été utilisée selon plusieurs procédés (par solvants, entraînement à l'air, hydrodistillation sous pression réduite, sans solvants...) pour extraire une variété de métabolites secondaires (Ferhat et al., 2010; Li et al., 2013; Leone et al., 2014; Dahmoune et al., 2015).

4- Extraction par Ultrasons ou Sonication

Inaudibles par l'oreille humaine, les ultrasons ont été découverts en 1883 par le physiologiste anglais Francis Galton (1822-1911), qui inventa le sifflet à ultrasons, en testant plusieurs fréquences pouvant être entendues par les animaux. Mais c'est la découverte, en 1880, de la piézoélectricité (polarisation électrique d'un échantillon de quartz soumis à une contrainte mécanique) par les frères Pierre (1859-1906) et Jacques (1856-1941) Curie, et par la suite en 1881 l'effet inverse par Gabriel Lippman (1845-1921) qui a permis de créer une vibration mécanique à partir d'une énergie électrique alternative. Cette découverte conduira Paul Langevin (1872-1946) à la mise au point du sonar en 1915, première application connue des ultrasons. Des études ont ensuite rapidement permis d'observer des modifications par les ultrasons du milieu dans lequel ils se propagent biologiques et chimiques en 1927. Il fallut cependant attendre les années 1980 et l'apparition des premiers générateurs ultrasonores fiables pour que des chercheurs démontrent que les ondes ultrasonores offrent d'indéniables perspectives en chimie, et pour la première fois le terme de « sonochimie » soit mentionné par Neppiras dans la revue *Physics Report* pour son travail sur la cavitation. Ainsi commencent les travaux sur les réactions de composés organiques s'opérant dans des solvants organiques eux aussi et sous l'influence des ultrasons (Pétrier et al., 2008; Draye et al., 2009).

L'ultrason fait référence aux ondes sonores mécaniques et élastiques avec des fréquences plus hautes que celles détectable par l'oreille humaine, c'est-à-dire autour de 18 kHz. Les fréquences ultrason d'intérêt pour réactions chimiques (20-100 kHz) sont plus faibles que dans applications médicales, mais le pouvoir utilisé est plus grand supérieur à une dizaine de Watt. En usage médical, les ondes à hautes fréquences (3-10 MHz) sont utilisées pour le diagnostic et à faible niveau d'énergie inférieur à 1Watt. L'application des faibles fréquences sur le corps peut endommager les tissus, alors que l'usage des hautes fréquences en chimie est sans valeur (**Lancaster, 2002**).

Les ondes sonores génèrent des vibrations mécaniques dans un solide, un liquide ou un gaz. À la différence des ondes électromagnétiques, les ondes sonores peuvent se propager dans une matière et elles impliquent des cycles d'expansion et de compression lors de la propagation dans le milieu. L'expansion peut créer des bulles qui se forment, se développent et s'effondrent dans un liquide. Près d'une surface solide, l'effondrement de cavité est asymétrique et produit un jet de liquide à grande vitesse (**Benamor, 2008**). Ce phénomène est appelé la cavitation acoustique (Figure n°7).

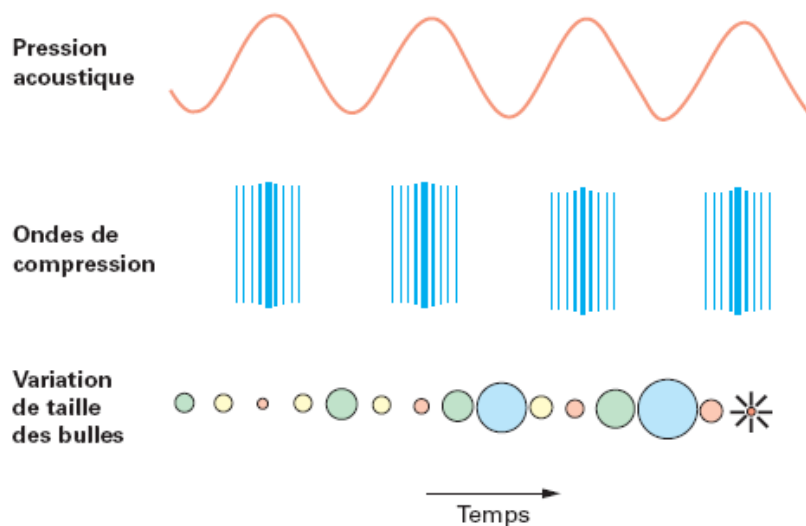


Figure n°7: Représentation schématique du phénomène de cavitation acoustique (Draye et al., 2009).

Plusieurs facteurs gouvernent l'action des ultrasons comme la fréquence, la pression, la température et le temps de sonication. Il faut prendre en considération les caractéristiques de la plante comme l'humidité, les dimensions des particules et les solvants utilisés pour avoir un bon rendement (**Wang et Weller, 2006**).

La technique d'extraction par ultrasons est la plus utilisée à l'échelle industrielle pour améliorer les phénomènes de transfert de masse. Elle a été reconnue pour son application potentielle dans l'extraction des plantes et leurs huiles (carvone, gingerols, huile d'amande...), les protéines (soja), polyphénols, anthocyanines, saponines de ginseng, polysaccharides, la pasteurisation et la production de produits laitiers... (**Bermúdez-Aguirre et Barbosa-Cánovas, 2011; Chemat et al., 2011; Adam et al., 2012; Goula, 2013; Both et al., 2014**).

Les avantages de la technique incluent (**Handa, 2008; Penchev, 2010; Goula, 2013**):

- Amélioration du rendement de l'extraction.
- Amélioration du procédé de l'extraction aqueuse lorsque les solvants ne peuvent pas être utilisés, exemple du concentré de jus.
- Fournir l'occasion d'utiliser des solvants alternatifs par l'amélioration de leur performance d'extraction.
- Augmentation de l'extraction de composés thermosensibles avec des conditions qui donnent ailleurs de faibles rendements.
- La technique permet l'utilisation d'une large gamme de solvant.
- Augmente la perméabilité des parois cellulaires et produit des cavitations.

Cependant, l'effet de l'extraction par ultrasons sur le rendement et la cinétique d'extraction est lié à la nature de la matrice végétale. La présence d'une phase dispersée mène à l'atténuation des ondes ultrasonores et les zones actives dans l'extracteur restent à proximité de l'émetteur d'ultrasons. Cette méthode ne permet pas de renouveler le solvant pendant le processus (**Penchev, 2010**). Un autre inconvénient de la méthode qui est occasionnel mais connu, est l'effet délétère de l'énergie ultrason sur les constituants actifs des plantes médicinales par la formation des radicaux libres et par conséquent des changements indésirables dans les molécules médicamenteuses (**Handa, 2008**).

Chapitre 2

ACTIVITÉS BIOLOGIQUES

ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DES PLANTES MÉDICINALES

I- Introduction

Les molécules de synthèse chimique utilisées dans la vie courante ne répondent plus aux exigences des habitants de la planète qui cherchent des produits plus sains, plus efficaces et moins dangereux pour eux et leur environnement.

Les antibiotiques, comme exemple, ont joué un rôle capital dans l'éradication de plusieurs maladies contagieuses graves au cours du 20^e siècle, mais la résistance bactérienne est devenue un sérieux problème, jusqu'au point où les antibiotiques de 3^e génération sont devenus dans plusieurs cas inefficaces. C'est dans un communiqué publié le 30 Avril 2014 que l'OMS tire la sonnette d'alarme contre la résistance aux antibiotiques. S'ils perdaient toute efficacité, des infections facilement prises en charge redeviendraient mortelles! Le monde s'achemine vers une ère post-antibiotiques, où des infections courantes et des blessures mineures pourraient à nouveau tuer! (**Fukuda, 2014**) De même que la résistance a touché la molécule de choix antipaludique, l'artémisinine (**Groupe d'Experts, 2011**) et d'autres antimicrobiens, il faut noter que la journée mondiale de la santé de l'année 2011 avait comme thème: «Résistance aux antimicrobiens – pas d'action aujourd'hui, pas de guérison demain» (**O.M.S., 2014**).

Un autre exemple de dangers d'herbicides et de pesticides devenus aussi inquiétants. Les pesticides sont utilisés largement depuis plusieurs décennies, ce qui a conduit à leur dissémination dans tous les milieux de l'environnement et une persistance à long terme pour certains. De nombreuses données attestent de leur présence dans les fluides biologiques humains, même après leur interdiction. Ils sont incriminés dans plusieurs pathologies cancéreuses, des maladies neurologiques et des troubles de la reproduction dès les années 80 du siècle dernier (**Expertise Collective, 2013**). D'autres études supposent aussi qu'il y a une relation entre l'autisme et les pesticides du fait qu'ils ont un effet sur le fœtus *in utero* (**Roberts et al., 2013**). Les pesticides peuvent aussi avoir un effet négatif sur la biodiversité: en affectant la faune et la flore sauvage et en diminuant la diversité des espèces (**Isenring, 2010**). De plus, l'usage intensif des pesticides cause un autre problème: la résistance et la sélection de nouveaux individus, insectes ou mauvaises herbes, plus puissants (**Groupe d'Experts, 2013**).

Deux exemples qui mènent au retour à la nature et ses ressources inexploitées est devenu une nécessité primordiale pour trouver de nouvelles solutions à ces problèmes.

II- Activité Antimicrobienne

Il ne fait aucun doute que les maladies infectieuses ont existé depuis la préhistoire, mais leur rôle y est le plus souvent méconnu, elles ont de tout temps accompagné l'homme, mais celui-ci ne le sait que depuis plus d'une centaine d'années, vers 1876 avec les découvertes de Pasteur et Koch. La preuve de leur existence en ces âges lointains existe pour certaines d'entre elles, dont les lésions spécifiques ou plus rarement les agents infectieux sont retrouvés sur les ossements ou sur les momies et même dans les anciens écrits (**Dedet, 2007; Panzer et al., 2014**).

Les premiers antimicrobiens utilisés étaient des vaccins (Edward Jenner en 1796, Louis Pasteur depuis 1880-1885), des colorants de synthèse chimique comme le bleu de méthylène, le salvarsan ou arsphénamine, le prontosil, etc. (Figures n°8 à 10), et enfin les antibiotiques: pénicilline 1928 (Figure n°11), gramicidine S 1942, streptomycine 1944, etc., qui sont des produits naturels issus de microorganismes. L'ère des antibiotiques a transformé totalement l'univers des maladies infectieuses, au point qu'on a pensé un temps pouvoir les faire disparaître (**Dedet, 2007**).

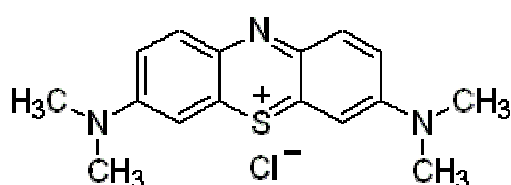
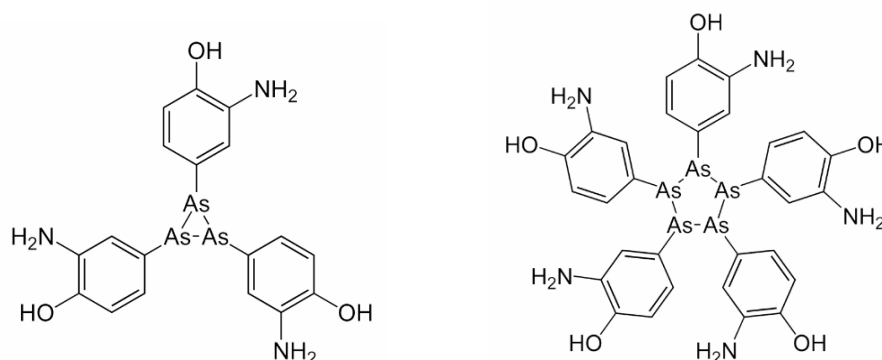


Figure n°8: Bleu de méthylène



*Figure n°9: Salvarsan ou arsphénamine est un mélange de trimère et pentamère contrairement à l'idée de Paul Ehrlich (**Lloyd et al., 2005**).*

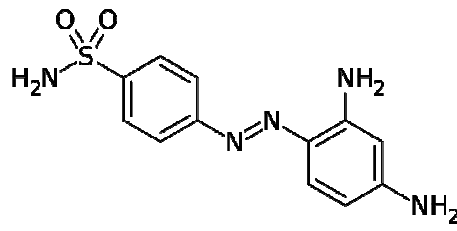
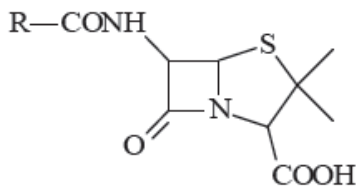


Figure n°10: Prontosil



Pénicilline G R = C₆H₅CH₂—

Pénicilline V R = C₆H₅OCH₂—

Ampicilline R = C₆H₅CH(NH₂)—

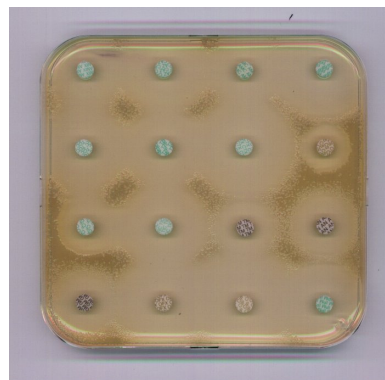
Amoxicilline R = *p*. HOC₆H₄CH(NH₂) —

Figure n°11: Dérivés de la pénicilline.

Cependant, ces dernières années, de profonds changements ont marqués les connaissances en microbiologie médicale, spécialement le nombre croissant de microorganismes impliqués dans les processus pathologiques et la résistance aux traitements appliqués (Figure n°12) (Eberlin, 1997). Il est donc nécessaire de trouver une alternative: de nouveaux remèdes plus efficaces ayant moins d'effets secondaires que les antibiotiques et moins onéreux, comme les plantes médicinales et aromatiques.



E. coli BLSE



E. coli sauvage

Figure n°12: Résistance et sensibilité aux antibiotiques pour deux souche d'*Escherichia coli*

L'usage des plantes médicinales et leurs extraits contre les maladies infectieuses a été pratiqué chez toutes les civilisations anciennes. La quinine possède des propriétés fébrifuge et antipaludique a été extraite en 1820 de l'écorce de quinquina, *Cinchona* sp. (Figure n°13),

utilisée par les indigènes de l'Amérique latine (Pérou) bien avant l'arrivée des Espagnols, sous forme de poudre ou de décoction (Achan et al., 2011).

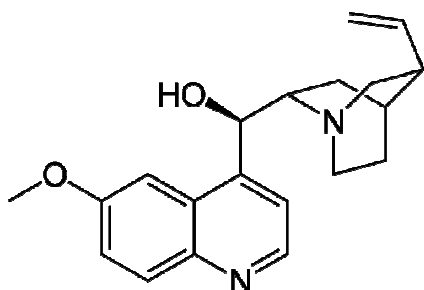


Figure n°13: La quinine et l'écorce de quinquina rouge

En Chine, le *Qing-hao* ou *Artemisia annua* a été utilisé depuis 168 av. J.-C. pour ses vertus antipyrétique et antipaludique, son principe actif est l'artémisinine isolé en 1972 (Figure n°14) (Dedet, 2007).

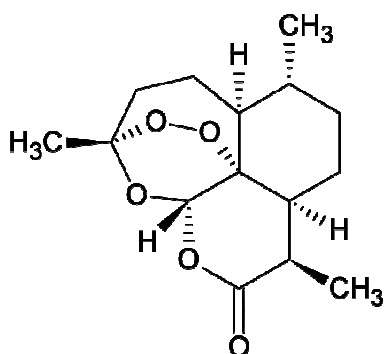


Figure n°14: Artémisinine et *Artemisia annua* L.

L'huile de chaulmoogra, *Hydnocarpus kurzii* (Figure n°15), était utilisée en Inde contre la lèpre, puis introduite dans la médecine occidentale au XIXe siècle par le médecin anglais Frederic John Mouat (1816-1897) (Dedet, 2007).



Figure n°15: Le chaulmoogra et son Oléoessence

Les racines de l'ipéca, *Psychotria ipecacuanha*, étaient empiriquement utilisées desséchées pour traiter la dysenterie amibienne dès le XVIIe siècle, son principe actif, l'émétine (Figure n°16) était isolé en 1817 (Dedet, 2007).

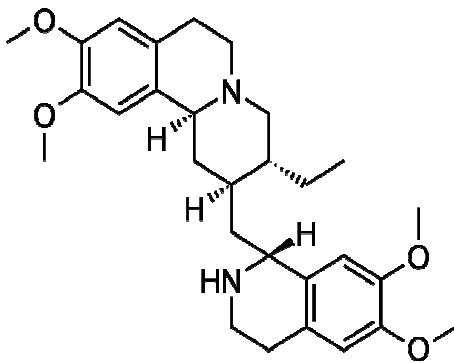


Figure n°16: L'émétine et les racines de l'ipéca

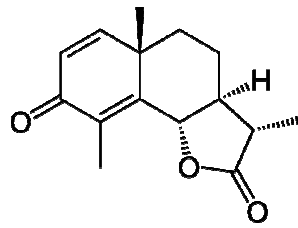
Divers produits végétaux étaient utilisés comme antihelminthiques (vermifuge), l'écorce de grenade est décrit dans les textes médicaux de l'ancienne Égypte, la térébenthine, l'huile de *Chenopodium*, les plantes aromatiques contenant thymol et santonine (en particulier les capitules de l'armoise) étaient largement utilisées (Figure n°17). Au Japon, on avait recours à un extrait sec d'une algue rouge la *Digenea simplex* (Dedet, 2007).



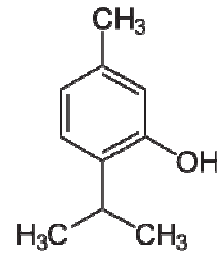
Écorce de grenade



Récolte de la résine de pin par gemmage



Santonine le principe actif d'Artemisia cina



Thymol

Figure n°17: Quelques plantes et substances antimicrobiennes

En médecine Prophétique avant 1435 ans la notion de traitement des maladies infectieuses existait avec la notion d'hygiène et de prévention dans plusieurs Hadiths. Le Prophète Mohamed (SAW) à recommandé par exemple l'usage de la truffe pour le traitement oculaire, les feuilles de jujubier pour le nettoyage corporel. Il a aussi déconseillé la baignade dans une eau souillée stagnante, il a mis au point la notion de contagion pour la peste et la lèpre, et les exemples sont multiples (**Ibn Qay'em El-Jozeyah, 2003**). Et c'est ainsi que les médecins Arabes, Musulmans et même Chrétiens, ont suivi le chemin du Prophète Mohamed (SAW) dans le traitement en utilisant de nouvelles substances comme les épices orientales (clous de girofle, cannelle...), dans l'hygiène et la prévention avec l'expansion des Bimaristans, ou hôpitaux de cette époque médiévale, et des bains publics (**AL-Hassani et al., 2007**).

De nos jours, les plantes offrent un nouvel espoir de lutte contre les maladies infectieuses causées par des bactéries, des champignons, des levures ou des virus, puisque le rapport effet thérapeutique/toxicité est maximal. Un nombre important de publications scientifiques traite les effets antimicrobiens des plantes médicinales et aromatiques utilisant une variété de solvants organiques ou verts avec différentes techniques d'extraction, soit,

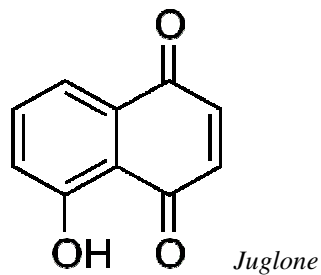
traditionnelles, modernes ou vertes (Ahmad et Beg, 2001; Zhang et al., 2013; Teixeira et al., 2014; Stanisavljevic et al., 2009).

III- Activité Allélopathique

L'allélopathie est tout effet direct ou indirect, positif (stimulation) ou négatif (inhibition), d'une plante (micro-organismes inclus) sur une autre par le biais de composés biochimiques (métabolites secondaires) libérés dans l'environnement (atmosphère et sol) (Gallet et Pellissier, 2002) et par conséquent elle désigne l'ensemble des interactions biochimiques existant entre une plante et un autre organisme (végétal, champignon ou micro-organisme). Bien que ce terme soit le plus couramment utilisé pour décrire les interactions chimiques entre deux plantes, il a également été utilisé pour décrire les communications chimiques entre microbe-microbe, plante-microbe et plante-insecte ou plante-herbivore (Weir et al., 2004).

Le mot allélopathie, du grec *allélon*, l'un l'autre et *pathos*, maladie, est apparu en 1937 dans le dernier livre (en allemand) écrit juste avant la mort du botaniste Autrichien Hans Molisch (1856-1937), spécialiste de la photosynthèse. Le terme resta ignoré pendant plusieurs décennies, jusqu'à ce que, au début des années 1960, l'écologue américain Elroy Leon Rice (1917-2000) l'utilise à nouveau pour expliquer la rapide disparition des herbes pionnières dans les champs abandonnés en Oklahoma (Willis, 2007; Bray, 2010).

Le botaniste grec Théophraste (371-288 av. J.-C.) était la première personne à reconnaître les propriétés allélopathiques des plantes vers 300 av. J.-C., quand il a constaté et enregistré que plantes de pois chiches épuisent le sol et détruisent les mauvaises herbes (Weir et al., 2004). Plus tard, Pline l'Ancien (23-79) a remarqué l'effet allélopathique du noyer, il nota l'absence de couverture végétale sous cet arbre sans évidemment comprendre la cause du phénomène. Les feuilles du noyer (*Juglans regia*) sécrètent une phytotoxine phénolique, la juglone, lessivée par la pluie, elle tombe sur le sol, empêchant le développement de beaucoup de plantes herbacées (Figure n°18). En réduisant la compétition pour les ressources, cela augmente les chances de développement de l'arbre, mais certaines plantes peuvent résister à l'action de cette molécule comme *Pachysandra terminalis*, barbe-de-bouc (*Aruncus sylvester*), alchémille, hosta, heuchère, bugle rampante (*Ajuga reptans*) et la majorité des bulbes (Bray, 2010).



Le noyer

Figure n°18: Le noyer et son principe allélopathique

La notion de l'allélopathie, l'antipathie et la culture associée des différentes variétés des plantes était aussi mentionnée dans plusieurs livres de l'agriculture des Arabo-Andalous, comme le célèbre livre « Kitab al Filaha » écrit par Ibn Al Awam au 12^e Siècle, traduit en 1864 en français (Figure n°19), où il mentionnait par exemple que le figuier est nocif pour la vigne dans certaines conditions comme les régions chaudes, alors que le chou et le chou-fleur sont très nocif et ne doivent pas être cultivés à coté, c'est un poison pour elle (Willis, 2007).

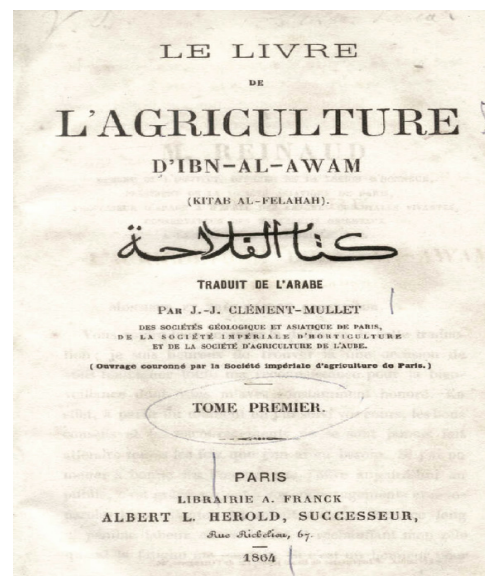


Figure n°19: Couverture du livre Kitab Al Filaha

Les molécules chimiques allélopathiques sont souvent des métabolites secondaires. Leur rôle ne semble pas nécessaire au niveau de la cellule car elles n'exercent pas de fonction directe dans les activités fondamentales du végétal: acides phénoliques, acide cinnamique et ses dérivés, flavonoïdes, terpénoïdes et alcaloïdes. Cependant, ces substances jouent un rôle important à l'échelle de la plante, car elles sont souvent capables d'inhiber la germination ou

le développement des organismes alentour. Mais les conséquences des propriétés allélopathiques d'une plante peuvent être sélectives sur des plantes et pas d'autres et selon les doses, généralement les monocotylédones sont plus résistants que les dicotylédones (**Bray, 2010; Bhadoria, 2011**).

Dans les plantes, les molécules allélochimiques peuvent être présentes dans les feuilles, l'écorce, les racines, les exsudats des racines, les fleurs et les fruits. La livraison de ces molécules dans la rhizosphère est souvent produite par lessivage des feuilles et autres parties aériennes de la plante, par les émissions volatiles, par exsudation racinaire, et par la répartition de l'écorce et les feuilles mortes (Figure n°20) (**Weir et al., 2004**).

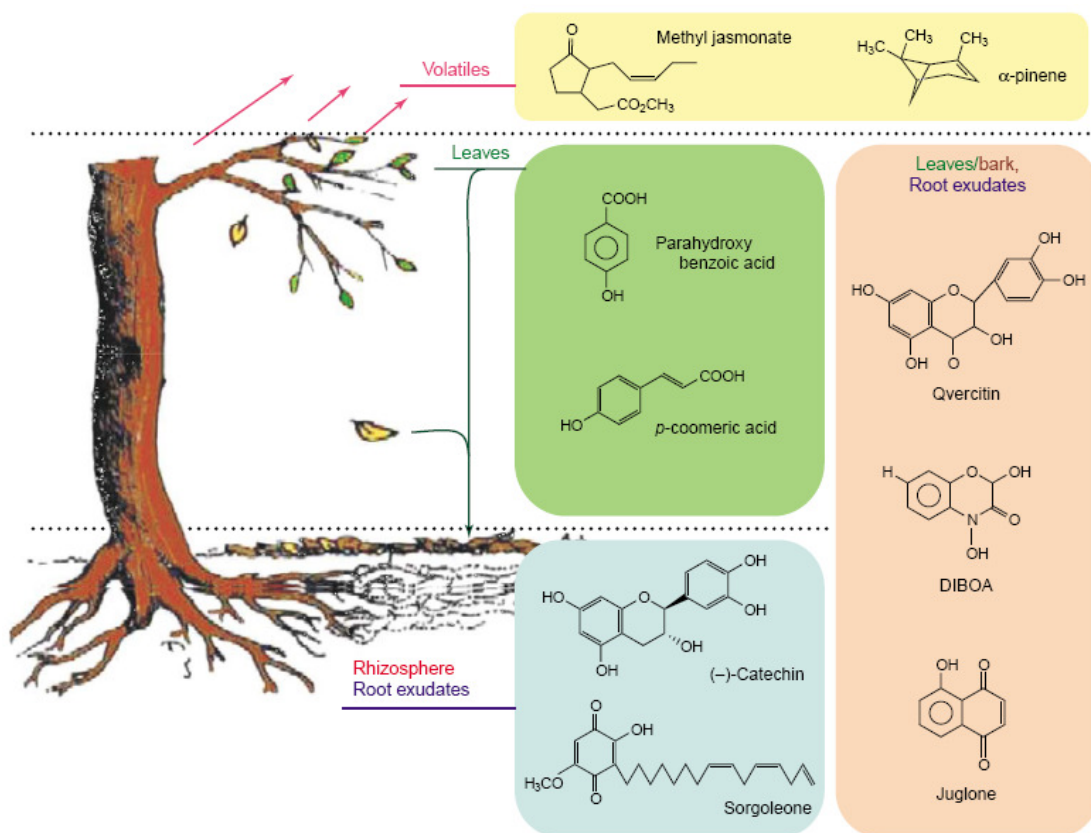


Figure n°20: Certaines molécules allélochimiques et les régions de leur émission (Weir et al., 2004).

L'effet de ces molécules peut être direct sur la plante cible, ou indirect par sa transformation dans le sol par les microorganismes (Figure n°21) (**Soltys et al., 2013**).

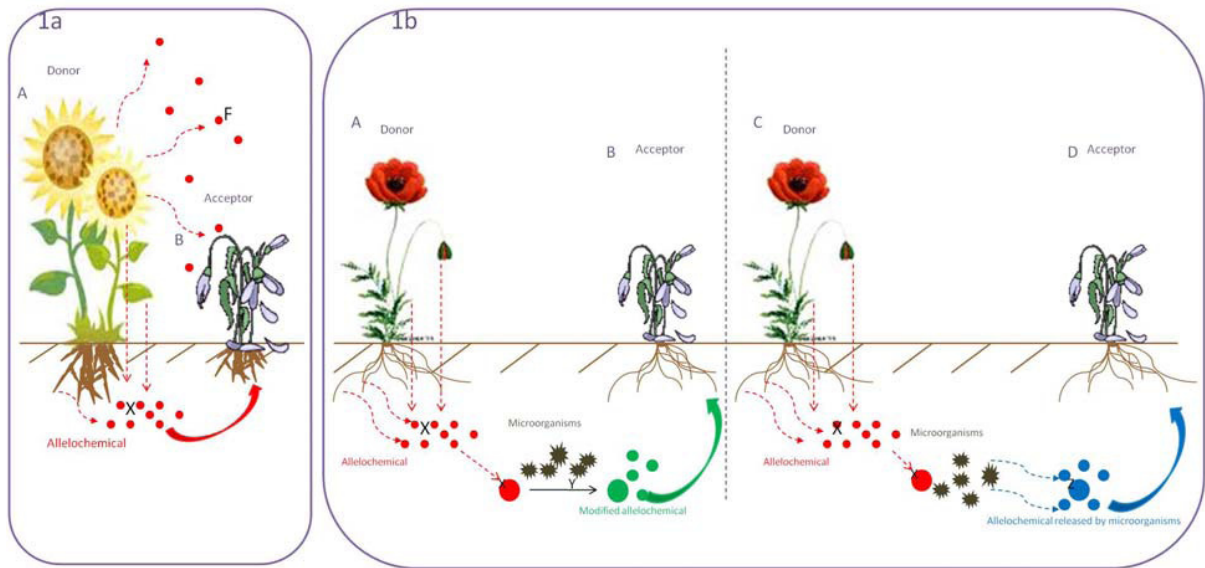


Figure n°21: Effet direct ou indirect des molécules allélochimiques (Soltys et al., 2013).

Pour expliquer ce phénomène écologique, il faut se baser sur l'étude des mécanismes physiologiques, chimiques et biochimiques des interactions entre les êtres vivants. Les molécules allélochimiques de la plante «donatrice» interfèrent à différents niveaux physiologiques et biochimiques dans la plante «cible»; effet sur la division et la croissance cellulaire du fait qu'elles interfèrent avec les protéines à différents sites; réduction ou inhibition de la photosynthèse qui peut être dû à la diminution de la quantité de chlorophylle ou à l'inhibition du transport des électrons; effet sur la respiration par inhibition de la consommation de l'O₂, l'oxydation du NADH ou production d'ATP; interférence avec la consommation des minéraux; inhibition du métabolisme de l'ARN, de l'ADN, des enzymes et des acides aminés (**Inderjit et Keating, 1999**).

La diversité des relations allélopathiques découverte chez les plantes, ouvre des perspectives d'utilisation importantes pour l'homme. Ces substances naturelles pourraient, à terme, solutionner les problèmes des mauvaises herbes qui doivent toujours être gérés par l'utilisation d'herbicides de synthèse. Si la majorité des problèmes d'adventices est maîtrisée à court terme par les produits chimiques, les effets néfastes à long terme ne doivent pas être occultés. On constate un appauvrissement de la flore dans les parcelles régulièrement désherbées, des résistances à certains herbicides sont apparues et les risques de pollution des eaux sont réels. Maîtriser l'usage des plantes et des substances allélopathiques en agriculture permettrait de disposer d'herbicides, de fongicides et d'insecticides naturels censés pouvoir préserver l'environnement (**Bray, 2010**). Ces dernières décennies il y a eu une hausse à la demande de composés allélopathiques naturels ayant une toxicité sélective sur les mauvaises

herbes et qui peuvent être dégradés par les plantes ou les microorganismes du sol (**Sodaeizadeh et Hosseini, 2012**).

En plus de l'effet inhibiteur, les molécules allélochimiques peuvent avoir un effet stimulant en favorisant la croissance d'autres plantes. Ces molécules peuvent aussi dans d'autres cas être sans effet négatif ou positif, mais ces études sont minimales et reçoivent moins d'attention de la part des chercheurs (**Inderjit et Keating, 1999; Riotte, 2010**).

Chapitre 3

PHYTOCHIMIE ET PHARMACOLOGIE
DES PLANTES ÉTUDIÉES

PROPRIÉTÉS DES PLANTES ÉTUDIÉES

I- *Alpinia officinarum* Hance

1- Classification

Famille :	<i>Zingiberaceae</i>
Genre :	<i>Alpinia</i>
Espèce :	<i>A. officinarum</i>
Nom Commun :	Galanga, Petit Galanga
Nom Anglais :	Lesser Galangal
Nom Arabe :	Khoulanjane (خولنجان)



2- Description

Rhizome rougeâtre, dur et noueux importé d'Asie (Inde, Chine...) à caractère piquant et aromatique, le galanga des officines a été introduit dans la pharmacopée par les arabes (**Baba-Aïssa, 2000**). Ce genre comprend environ 250 espèces (**Evans, 2002**), le plus connu est le grand galanga, *Alpinia galanga*, appelé gingembre siamois qui ressemble largement au petit galanga mais ses rhizomes sont plus gros et son goût est bien inférieur et il contient moins d'huile essentielle (**Chevallier, 2001**). C'est une plante vivace herbacée et robuste à feuilles de plus de 1 mètre de hauteur, se développant à partir des rhizomes épais et charnus, les fleurs en grappes blanches violacées sont souvent nées sur les extrémités des tiges (Figure n°22). La plante ressemble au gingembre et parfois elle est appelée: gingembre de Chine. Le galanga est natif de l'Est et du Sud-est d'Asie et est largement cultivé en Chine, Malaisie, Thaïlande et en Inde (**Van Wyk et Wink, 2004**). Le rhizome possède un goût unique entre le poivre et le gingembre. Les Arabes l'utilisaient autrefois comme nourriture de leurs chevaux pour les rendre puissants, pour les doper (**Ravindran et Balachandran, 2006**). La mystique allemande Hildegard von Bingen qualifiait cette plante d'«épice de vie» pour ses multiples vertus (**Chevallier, 2001**).



Figure n°22: Fleurs, feuilles et rhizome frais du galanga

3- Principaux Constituants

Le galanga est très aromatique, il possède un gout camphré citronné très agréable qui rappelle l'arome des bonbons ! Il contient une variété de composés chimiques, leur existence et abondance dépend de l'origine de la plante, son état, fraîche ou sèche, de la technique d'extraction, incluant les fluides supercritiques, et des solvants utilisés (Luo et al., 2010; Xie et al., 2013).

Le rendement en huile essentielle est faible, il varie entre 0.1% à 4%, cette huile contient essentiellement du 1,8-cinéole (Figure n°23), son pourcentage varie entre 1.8% à 28.11% si la plante est sèche et il peut arriver jusqu'à 50% pour la plante fraîche (Ly et al., 2001; Pripdeevech et al., 2009; Zhang et al., 2010).

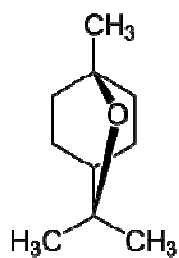


Figure n°23: 1,8-cinéole

En plus du 1,8-cinéole (eucalyptol), l'huile essentielle contient aussi : β -bisabolène, chavicol, chavicol acétate, eugényl acétate, α -farnésène, méthyle eugénol, β -caryophyllène, α -terpinéol, γ -muurolène, α -bergamotène, γ -gurjunène, comme composés majoritaires (Figure n°24) et une variété d'autres molécules (Ly et al., 2001; Pripdeevech et al., 2009; Zhang et al., 2010; Xie et al., 2013).

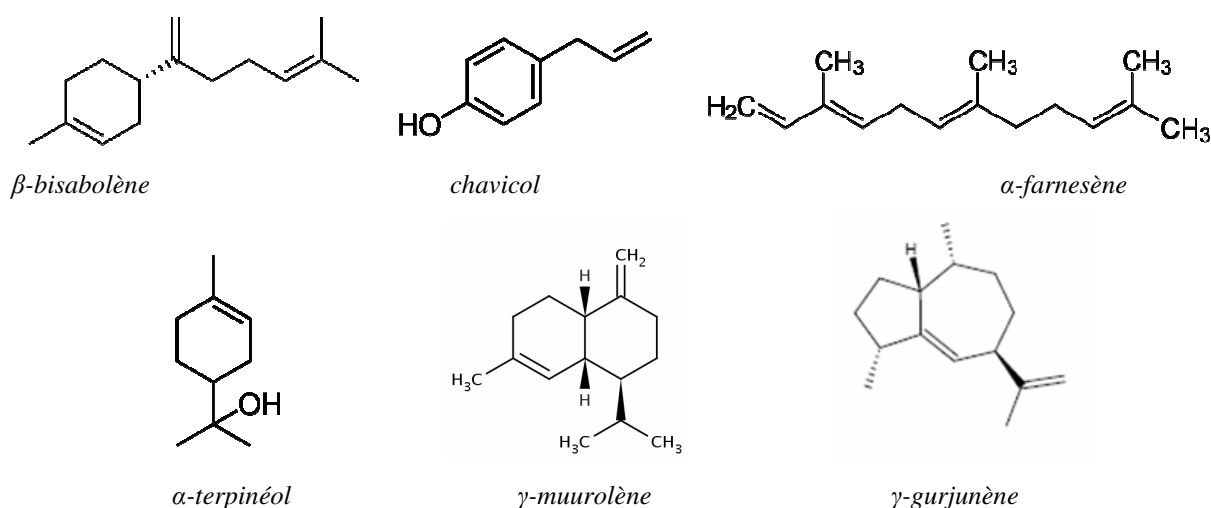


Figure n°24: Quelques structures de l'huile essentielle de galanga.

Le galanga contient également (Figures n°25 et 26): des flavonoïdes comme la galangine (le plus abondant), 3-*O*-méthylgalangine, kaempférol et une variété de molécules phénoliques caractéristiques de la famille des *Zingiberaceae* appelées les diarylheptanoïdes (Shin et al., 2003; Cushnie et Lamb, 2006; Ravindran et Balachandran, 2006), et des phénylpropanoïdes (Zhu et al., 2009).

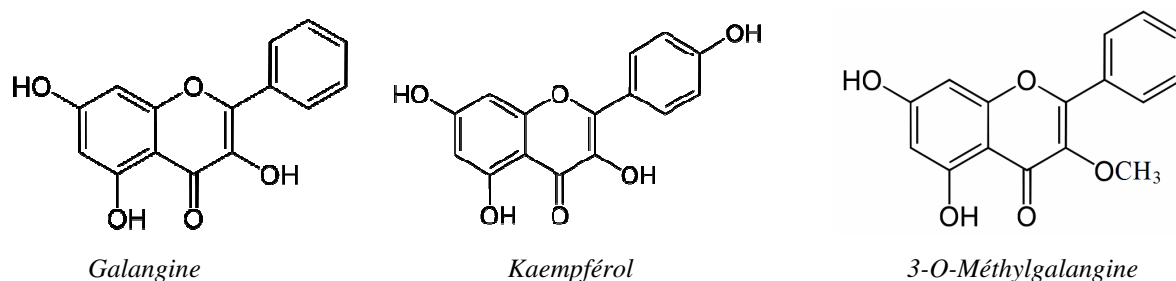
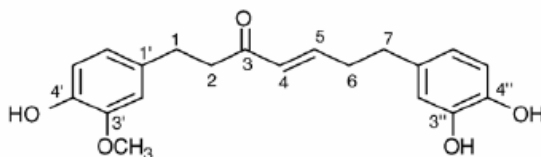
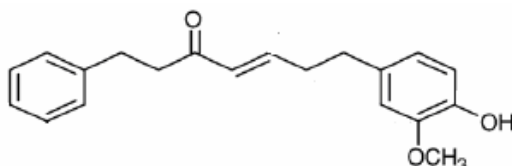


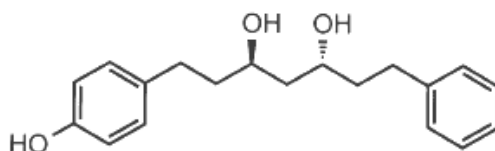
Figure n°25: Les principaux flavonoïdes du galanga.



7-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-en-3-heptanone
activité anticancéreuse (An et al., 2008).



7-(4''-Hydroxy-3''-methoxyphenyl)-1-phenyl-4E-hepten-3-one
activité antivirale (Sawamura et al., 2010).



(3R,5R)-1-(4-hydroxyphenyl)-7-phenyl-3,5-heptanediol
activité antiémétique (Shin et al., 2002).

Figure n°26: Quelques diarylheptanoïdes du galanga et leurs effets pharmacologiques.

4- Pharmacologie de la Plante

Traditionnellement, le rhizome en décoction est utile contre les affections de l'appareil urinaire (reins, vessie), notamment pour traiter l'incontinence d'urine. En Inde, il est utilisé comme anti-inflammatoire, expectorant, stomachique et tonique. En médecine traditionnelle chinoise, il est employé contre les douleurs abdominales, les diarrhées, les nausées et le hoquet. En Algérie, il est utilisé comme épice et il entre aussi dans la composition du «h'ror» ou curry Algérien. Dans le Sud Algérien le galanga est très utilisé, il est inclus dans certains aliments, par exemple mélangé au «gharss» ou dattes en pâte, ou préparé sous forme de thé, associé à d'autres substances de nature voisine: cannelle, clous de girofle, gingembre, considéré comme antiasthénique (Baba-Aïssa, 2000). En médecine chinoise, il est aussi

utilisé pour expulser le froid intérieur et comme réchauffant de la rate et de l'estomac (**Hempen et Fisher, 2009**).

Les études scientifiques réalisées sur le petit galanga, ses extraits bruts ou ses constituants actifs isolés montrent qu'il possède plusieurs vertus médicinales: antibactérienne et antifongique des extraits bruts (**Ray et Majumdar, 1976 ; Zhang et al., 2013**) et de la galangine (**Cushnie et Lamb, 2006; Eumkeb et al., 2010**); bactéricide et anti-inflammatoire sur le colon (**Subramanian et al., 2008**); antiviral sur la grippe H1N1 *in vivo* et *in vitro* (**Sawamura et al., 2010a ; 2010b**); antiviral sur le virus de l'hépatite C (**Hussein et al., 2000**); antioxydant (**Ly et al., 2003 ; Ly et al., 2004; Juntachote et Berghofer, 2005**); anticancéreux (**An et al., 2008**); cytotoxique sur des cellules cancéreuses (**Lee et Houghton, 2005; Houghton et al., 2007**); hypo-lipidique c'est-à-dire diminue les taux des triglycérides et du cholestérol sanguins par inhibition de la lipase pancréatique (**Shin et al., 2003; Shin et al., 2004**); antiagrégant plaquettaire par l'inhibition de la biosynthèse des prostaglandines et leucotriènes (**Kiuchi et al., 1992**); antagoniste du facteur d'activation plaquettaire (PAF) et par conséquent inhibant la réaction pro-inflammatoire (**Fan et al., 2007**); inhibition du monoxyde d'azote (NO) qui, à forte concentration, peut être impliqué dans plusieurs types d'inflammations ou de cancérogénèse (**Matsuda et al., 2006**); anti-inflammatoire par l'inhibition des médiateurs de l'inflammation (**Yadav et al., 2003**); antiémétique (**Shin et al., 2002**); anti-polyarthrite rhumatoïde (**Park et Ernst, 2005**); anti-fibrose hépatique (**Wang et al., 2013**); antiulcéreux (**Zhu et al., 2009**).

II- *Zingiber officinale* Roscoe.

1- Classification

Famille :	<i>Zingiberaceae</i>
Genre :	<i>Zingiber</i>
Espèce :	<i>Z. officinale</i>
Nom Commun :	Gingembre
Nom Anglais :	Ginger
Nom Arabe :	Zanjabile (زنجبيل)



2- Description

Plante vivace tropicale herbacée mesurant jusqu'à 3m de haut. Son rhizome est noueux et parfumé, peau beige pâle, chair jaune pâle juteuse et parfumée, il devient de plus en plus fibreux avec l'âge, couvert de feuilles écailleuses et pourvu à sa partie inférieure de racines cylindriques. Ses feuilles sont persistantes bisériées, longues, étroites, lancéolées, pointues et longues de 20cm. Il y a deux sortes de tiges: tiges hautes stériles servant à l'assimilation chlorophyllienne et des tiges plus courtes (20cm environ) portant des fleurs irrégulières en épi. L'inflorescence est en courts épis axillaires très serrés, à tige couverte d'écailles. Elle a des fleurs parfumées blanches jaunes, avec des traînées rouges sur les lèvres (Figure n°27). La floraison a lieu entre les mois d'août et novembre. Ses fruits sont des capsules trivalves contenant des graines noires (**Faivre et al., 2006**).

Sur le marché, le gingembre se présente sous deux formes: le blanc (pelé) et le noir (non pelé). Son nom populaire au Maghreb est «Skendjbir» une déformation de «Zandjabil» qui est la forme arabisée de «Singabera» son nom «Pâli» (langue ancienne de l'Inde). Le médecin grec Dioscoride croyait que le gingembre était importé d'Arabie (**Baba-Aïssa, 2000**). Le gingembre est l'une des épices les plus connues et des plus populaires. C'est une plante qui épuise beaucoup le sol. Il est cultivé surtout en Inde, principal pays producteur (plus de 50%), mais aussi au Sri Lanka, en Chine, au Japon, en Jamaïque, au Nigéria, en Amérique du Sud, en Australie, ... Le produit commercial est préparé à partir de ces rhizomes déterrés quand les parties supérieures de la plante se fanent. Dans les pays producteurs, les rhizomes sont consommés à l'état frais (**Richard et Loo, 1992**).



Figure n°27: Feuilles, fleurs et rhizome frais du gingembre

3- Principaux Constituants

Les constituants du gingembre sont nombreux et varient selon l'origine de la plante et état fraîche ou séchée et les méthodes d'extraction. Seulement il est réputé de renfermer une grande quantité d'amidon qui est au environ de 45%, et parfois plus (**Braga et al., 2006**)

L'odeur du gingembre est due à l'existence d'une huile volatile (Figure n°28), sa teneur varie entre 1% et 3%. Plus de 50 composés ont été caractérisés: des monoterpènes (β -phellandrène, (+)-camphène, cinéole, géraniol, curcumène, citral, terpinéol, bornéol) et des sesquiterpènes (α -zingibérène (30-70%), β -sesquiphellandrène (15-20%), β -bisabolène (10-15%), (*E-E*)- α -farnesène, *ar*-curcumène, zingibérol). Certains constituants de l'huile sont convertis en composés à faible odeur avec le séchage (**Martins et al., 2001; Ali et al., 2008**). L'extraction par micro-ondes et CO₂ supercritique donne approximativement les mêmes résultats avec quelques différences (**Yu et al., 2007; Mesomo et al., 2013**).

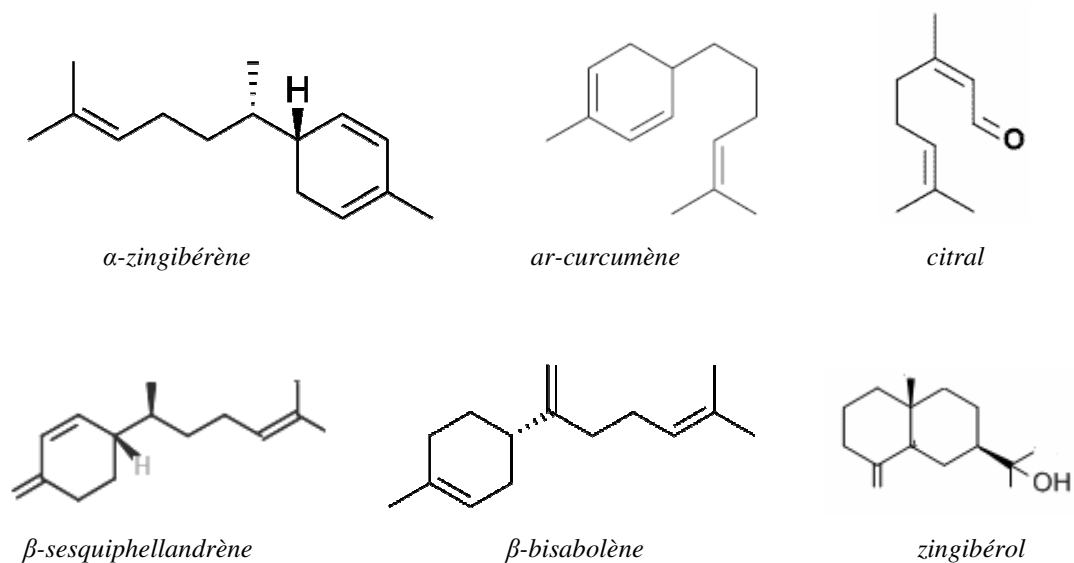


Figure n°28: Quelques structures de l'huile essentielle du gingembre. .

Le goût piquant du gingembre frais est dû principalement aux gingérols (Figure n°29) qui sont des séries d'homologues des phénols. Le plus abondant est le [6]-gingérol, mais il y a aussi de petites quantités d'autres gingérols avec différentes longueurs de chaîne. Alors que le goût piquant du gingembre sec est dû aux shogaols (Figure n°29), qui sont les composés déshydratés des gingérols. Les shogaols sont formés durant le traitement thermique de la plante. La formation de ces composés dépend du pH (avec une grande stabilité à pH=4), cependant à 100°C et à pH=1 la dégradation réversible est relativement rapide (Ali et al., 2008; Dugasani et al., 2010; Ha et al., 2012).

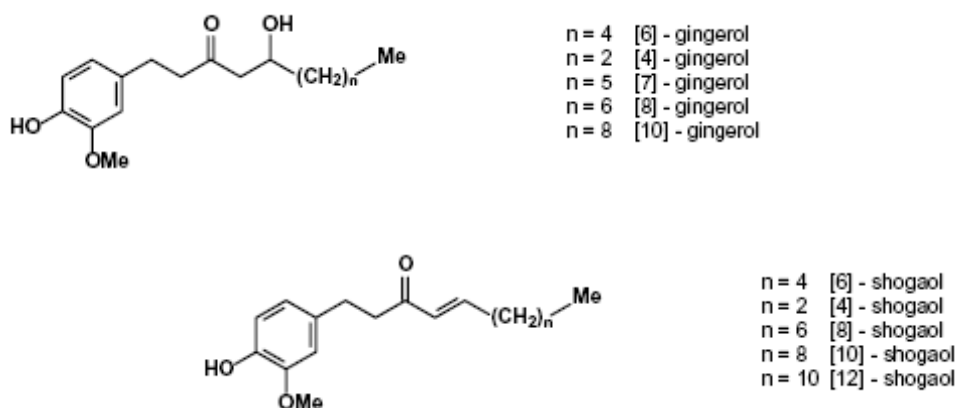
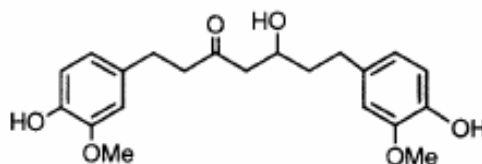
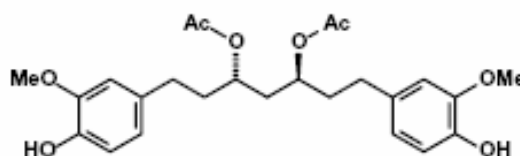


Figure n°29: Les composés responsables du goût du gingembre

D'autres molécules caractéristiques de la famille des *Zingiberaceae*, les diarylheptanoïdes (Figure n°30) ont été isolés des extraits du gingembre (**Pancharoen et al., 2000; Ma et al., 2004**), certains d'entre eux ont fait l'objet d'études pharmacologiques (**Kiuchi et al., 1992; Zhou et al., 2007; Ali et al., 2008**).



Hexahydrocurcumine, antiagrégant plaquettaire (Kiuchi et al., 1992)



*(3S,5S)-3,5-diacetoxy-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)heptane
activité cytotoxique (Ali et al., 2008)*

Figure n°30: Quelques diarylheptanoïdes du gingembre et leurs effets pharmacologiques.

Le gingembre contient également quelques flavonoïdes et acides phénoliques mais à faibles proportions comme la quercétine, la rutine, fisetine, morine, acide gallique, acide ferulique, acide vanillique (**Ghasemzadeh et al., 2010**).

4- Pharmacologie de la Plante

Au 18^e siècle, on l'ajoutait aux remèdes pour réduire leurs effets irritants sur l'estomac. Il joue encore ce rôle en Chine, où il a la réputation de réduire la toxicité de certaines autres plantes. En occident, la racine sèche combat le mal des transports et les nausées de la grossesse. La racine fraîche s'emploie comme sudorifique et comme expectorant lors des rhumes et les refroidissements (**Ody, 1995**). Il est recommandé en friction, sous forme de préparation huileuse, à parts égales d'huile d'olive et de gingembre pilé, contre les douleurs musculaires et en distillation auriculaires contre certaines otites

douloureuses (**Baba-Aïssa, 2000**). En chine le gingembre frais est utilisé pour le traitement de la fièvre, la toux, et les nausées. Séché, il est utilisé contre les douleurs de l'estomac et la diarrhée. Son goût piquant est parfois utilisé pour masquer le goût désagréable d'autres médicaments (**Van Wyk et Wink, 2004**).

Les études récentes réalisées sur l'huile, l'oléorésine, les extraits et molécules actives du gingembre dévoilent diverses propriétés, soit *in vitro* ou bien *in vivo*: activité antivirale respiratoire, anti-VIH1 et anti-herpès virus (**Lee et al., 2008; Chang et al., 2013; Schnitzler et al., 2007**); activité antibactérienne sur différentes souches (**Bonjar, 2004**), sur des germes anaérobies de la cavité orale (**Park et al., 2008**), anti-mycobactérie (**Hiserodt et al., 1998**) et des extraits obtenus par CO₂ supercritique (**Mesomo et al., 2013**); un bon anti-inflammatoire non stéroïdien pour les patients ayant une arthrite rhumatoïde (**Fouda et Berika, 2009**); effet immuno-modulateur de l'huile essentielle *in vitro* et *in vivo* et par conséquent utile dans le cas de l'inflammation chronique et les maladies auto-immunes (**Zhou et al., 2006**); l'association d'un repas protéiné à du gingembre diminue de façon importante les nausées retardées observées après une chimiothérapie et permet de réduire l'utilisation d'un traitement antiémétique (**Gigon, 2012**); effet antioxydant des extraits obtenus par CO₂ supercritique (**Zancan et al., 2002**) et antioxydant et antifongique de l'huile et de l'oléorésine (**Amir et al., 2011; Bellik, 2014**); effet antiulcéreux très proche de celui de l'Omeprazole (**Uz Zaman et al., 2014**); traitement des troubles gastro-intestinaux comme la dyspepsie, les nausées et la diarrhée par inhibition de la motilité intestinale (**Borrelli et al., 2004**); hépato-protecteur (**Haniadka et al., 2013**); anticancéreux (**Brown et al., 2009**) et améliore l'efficacité d'un traitement du cancer cervical (**Sharma et al., 2009**); cytotoxique et cytoprotecteur (**Peng et al., 2012**); neuro-protecteur de maladies dégénératives (**Ha et al., 2012**). Le gingembre a été utilisé aussi en médecine vétérinaire *in vivo* comme vermifuge de nématodes gastro-intestinaux des moutons (**Iqbal et al., 2006**).

III- *Cinnamomum zeylanicum* Nees

1- Classification

Famille :	<i>Lauraceae</i>
Genre :	<i>Cinnamomum</i>
Espèce :	<i>C. zeylanicum</i> Nees
Nom Commun :	Cannelle de Ceylan
Nom Anglais :	Ceylon cinnamon ou cinnamon
Nom Arabe :	Karfa (قرفة)
Synonyme :	<i>C. verum</i> J. Presl



2- Description

Le cannelier de Ceylan est un arbre d'une dizaine de mètres de haut, originaire de l'Inde, introduit dans les îles de l'océan Indien et dans le sud-est asiatique, il est principalement cultivé au Sri Lanka (ancien Ceylan), mais se rencontre également aux îles Seychelles, à Madagascar et au Ghana (**Vernon et Richard, 1976; Bruneton, 1999**).

Ses feuilles opposées et persistantes, de forme ovale, sont lisses et luisantes, d'un vert brillant sur le dessus, glauques (vert tirant sur le bleu) en dessous et ont un parfum caractéristique lorsqu'elles sont écrasées. Ses fleurs petites, blanches ou jaunes sont réunies en grappes terminales et dégagent une odeur désagréable. Ses fruits, de couleur violette foncée, sont des drupes (à pulpe) charnues et ressemblent par leur forme, au gland du chêne (Figure n°31) (**Vernon et Richard, 1976; Richard et Loo, 1992**).

La première récolte est possible au bout de cinq ans, ensuite elle se fait tous les deux ans à la saison des pluies lorsque l'écorce est gorgée de sève. L'écorce est détachée des jeunes pousses ou des branches, par incision, découpée en lanières de 30 cm de long, qui sont mis à sécher puis grattée pour en séparer le liège. Elle se présente sous forme de tuyaux emboîtés les uns dans les autres (**Vernon et Richard, 1976; Richard et Loo, 1992**).



Figure n°31: Feuilles, fleurs et fruits du cannellier

3- Principaux Constituants

L'écorce contient des tanins, résines, mucilage, gomme, sucres, oxalate de calcium, peu de coumarine, de l'amidon, des diterpènes polycycliques, des oligomères proanthocyanidoliques, acides phénoliques et des huiles volatiles. La teneur de ces dernières, est au minimum 12 ml/kg (un intervalle de 5 à 20 ml/kg). L'huile essentielle est très majoritairement composée de dérivés phenylpropaniques: E-cinnamaldehyde (Figure n°32) entre 60 à 80%, eugénol jusqu'à 10%, acétate de cinnamyle 5%, linalol 2%, β -caryophyllène 3%, et peu de α -terpinéol, 1,8-cinéole et terpinen-4-ol (Figure n°33). L'huile des feuilles, qui renferme 70 à 95% de phénols (eugénol), est utilisée pour isoler l'eugénol puis la fabrication de la vanilline utilisée en parfumerie et en aromatisation. L'espèce *C. zeylanicum* possède la plus grande quantité d'eugénol parmi les variétés de l'huile d'écorce du genre *Cinnamomum* (Leung, 1980; Bruneton, 1999; Shan et al., 2005; Unlu et al., 2010).

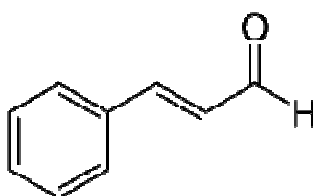


Figure n°32: Cinnamaldéhyde

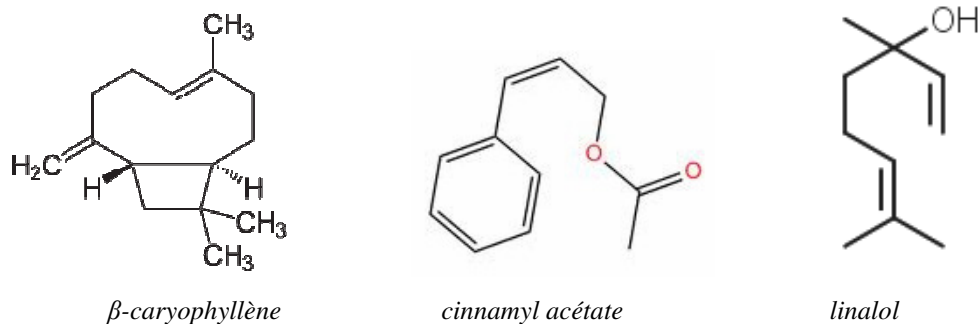


Figure n°33: Quelques constituants de l'huile essentielle de cannelle

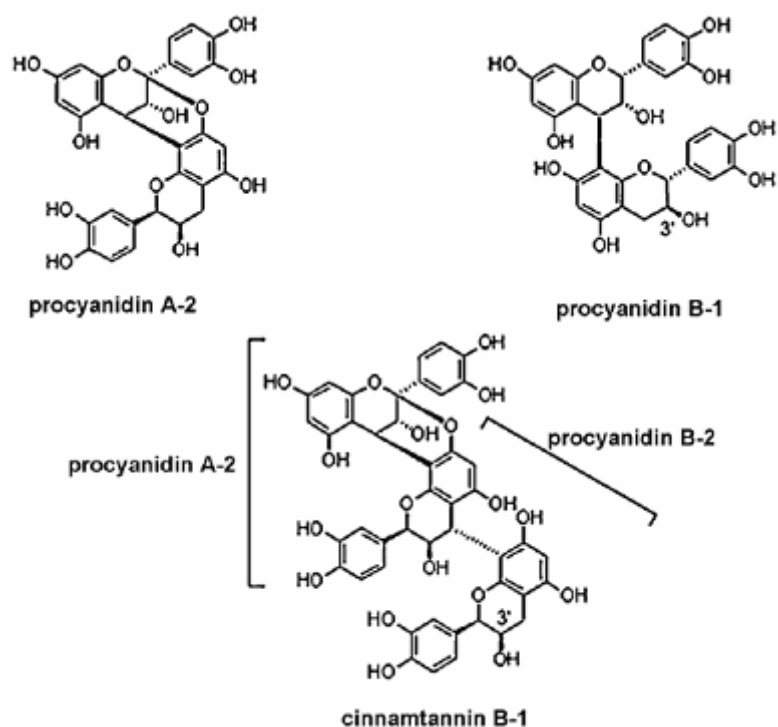


Figure n°34: Les composés phénoliques de l'extrait aqueux ayant une activité antivirale (Zhuang et al., 2009)

4- Pharmacologie de la Plante

La cannelle est connue comme remède traditionnel de la dyspepsie y compris flatulence, spasmes gastro-intestinaux, perte d'appétit et diarrhée, pour le traitement d'inflammation, de rhumatisme, de froids, des nausées et vomissements et des troubles menstruels. Elle est connue pour son usage antidiabétique en médecine traditionnelle algérienne, en Palestine (Ali-Shtayeh et al., 2012) et ailleurs. Cependant, la cannelle est

déconseillée pour les femmes enceintes (car les fortes doses peuvent induire l'avortement), les gens ayant une allergie à la cannelle ou des ulcères d'estomac et du duodénum (**Van Wyk et Wink, 2004**).

Les études scientifiques modernes confirment les usages traditionnels de la cannelle et ses principes actifs et ajoutent d'autres propriétés pharmacologiques: les extraits aqueux et hydro-alcooliques présentent un effet antidépressif (**Emamghoreishi et Ghasemi, 2011**); antiasthmatique par diminution de l'inflammation pulmonaire et/ou la réaction allergique (**Kandhare et al., 2013**); antifongique, antibactérien et antioxydant (**Senhaji et al., 2005**; **Shan et al., 2005**; **Singh et al., 2007**); effet antiparasitaire sur les poux humains et leurs œufs (lentes) (**Yang et al., 2005**); antiviral (**Zhuang et al., 2009**); cytotoxique sur des cellules cancéreuses humaines et provoque l'arrêt de la croissance de cellules leucémiques (**Unlu et al., 2010**; **Sudan et al., 2013**; **Schoene et al., 2009**); protection des dommages oxydatifs et inflammatoires induits par les radiations gamma (**Azab et al., 2011**); protecteur gastrique antiulcéreux (**Rafatullah et al., 2011**); analgésique (**Arzi et al., 2011**); anti-arthrite et anti-inflammatoire sans effet ulcérogène (**Vetal et al., 2013**); le cinnamaldéhyde est un antidiabétique potentiel par voie orale en agissant comme hypoglycémiant et hypolipidémiant (**Subash Babu et al., 2007**); l'extrait aqueux agit aussi comme antidiabétique (**Abd El. Rahman et al., 2010**). En usage vétérinaire l'huile est antibactérienne contre certains germes responsables de la mastite (mammite) qui est l'inflammation des glandes mammaires (**Fratini et al., 2014**). L'huile extraite par CO₂ supercritique prévient le brunissement enzymatique et par conséquent c'est un bon conservateur des aliments (**Marongiu et al., 2007**). De plus l'huile possède un effet herbicide et protecteur des cultures contre les insectes et les champignons (**Tworkoski, 2002**; **Dayan et al., 2009**) et un effet insecticide sur les charançons nuisibles des graines en stocks (**Viteri Jumbo et al., 2014**).

IV- *Syzygium aromaticum* (L.) Merrill & Perry

1- Classification

Famille :	<i>Myrtaceae</i>
Genre :	<i>Syzygium</i>
Espèce :	<i>S. aromaticum</i> (L.) Merrill & Perry
Nom Commun :	Giroflier
Nom Anglais :	Clove buds
Nom Arabe :	Kourounfoul (قرنفل)



Synonymes : *Eugenia caryophyllus* Bull. & Harr. , *E. caryophyllata* Thunb.

2- Description

C'est un grand arbre originaire des îles des Moluques, élancé, d'une hauteur moyenne de 10 à 12 m, qui peut atteindre jusqu'à 20 m de haut, à port pyramidal et au tronc gris clair ridé. Ses feuilles, de 8 à 10 cm de long, sont coriaces, persistantes, opposées, pétiolées, ovales, aux limbes lancéolés, à la face supérieure vert rougeâtre et à la face inférieure vert sombre, légèrement ponctuée. Elles sont aromatiques et dégagent une forte odeur de clou de girofle au froissement. L'inflorescence comprend de petites cymes (4–5 cm) compactes et ramifiées, regroupées en panicules de trois à cinq petites fleurs parfumées, au calice tubulaire blanc cassé, puis rouge (quatre sépales rouges charnus et persistants) et à la corolle blanc rosé (quatre dialypétales blancs) (**Ghedira et al., 2010**).

L'arbre donne en Janvier/Février des boutons floraux, ou clous de girofle, pourpres cramoisis, groupés en cimes terminales. Ils sont cueillis en Juillet avant l'épanouissement de la corolle, quand ils commencent à prendre une teinte rosée, puis de nouvelles inflorescences apparaissent dès le mois d'Août et seront récoltées vers le début de l'année suivante. Les clous de girofle sont mis ensuite à sécher sur des claies au soleil ou à feu doux, pendant trois jours, avant de procéder à l'égriffage pour éliminer les pédicelles ou griffes. Au cours du séchage, clous et griffes perdent entre 67 et 72 % d'eau (**Richard, 1974; Richard et Loo, 1992**).

Comme le nom de clou l'indique, le bouton floral comporte une partie quadrangulaire, l'hypanthe, longue de 10 à 12 mm pour un diamètre de 2 à 3 mm et une tête globuleuse d'un diamètre de 4 à 6 mm, entourée par les quatre lobes divergents des sépales et constituée des

quatre pétales imbriqués qui enferment de très nombreuses étamines recourbées (Figure n°35). La poudre des clous de girofle peut être caractérisée par des fragments de parenchyme renfermant de grandes poches sécrétrices, de nombreux grains de pollen triangulaires à 3 pores dans les angles (**Bruneton, 1999**).



Figure n°35: Feuilles et fleurs du giroflier et quelques boutons floraux

3- Principaux Constituants

Les clous de girofle renferment des hétérosides de chromones, glucosides des stérols (sitostérol, stigmastérol et campestérol), acide oléanolique, camphérol, 6 % protéines, 20 % lipides, 61 % carbohydrates, vitamines et entre 15 à 18% d'huile volatile, les tiges entre 4 à 6% et les feuilles ont un rendement de 2 à 3 % (**Leung, 1980; Bruneton, 1999**). L'huile essentielle contient, selon une étude récente, 28 composés avec l'eugénol (Figure n°36) comme composé majoritaire à 80.95%, eugényl acétate 5.01%, β -caryophyllène 3.14%, Myrcène 1.84%, α -terpinène 1.65%, comme principaux constituants (Figure n°37) (**Fayemiwo et al., 2014**).

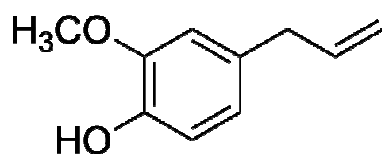


Figure n°36: L'Eugénol

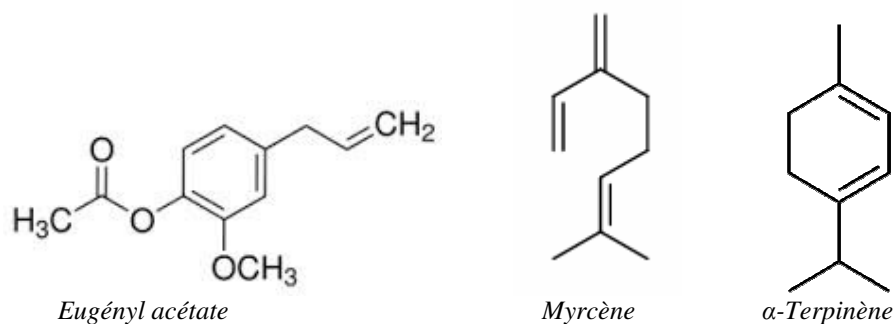
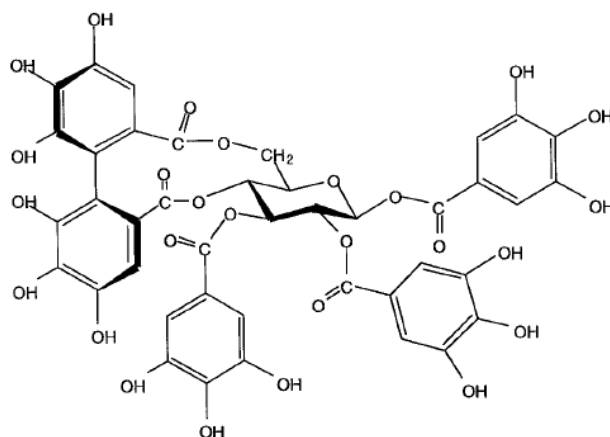
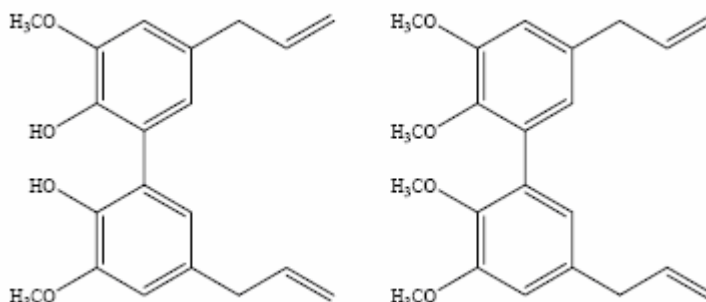


Figure n°37: Quelques constituants de l'huile essentielle des clous de girofle

Les clous de girofle contiennent aussi des molécules phénoliques comme: l'acide gallique, flavonols glucosidiques, tannins, eugéniin, dehydrodieugénol, *O,O'*-dimethyl-dehydrodieugenol (Figure n°38) (Kurokawa et al., 1998; Shan et al., 2005; Pisano et al., 2007).



L'Eugéniin avec activité antivirale (Kurokawa et al., 1998)



*Le Dehydrodieugénol et le *O,O'*-dimethyl-dehydrodieugénol avec activité anticancéreuse (Pisano et al., 2007)*

Figure n°38: Quelques structures phénoliques et leurs activités biologiques

4- Pharmacologie de la Plante

Traditionnellement, les clous de girofle étaient utilisés pour le traitement des maux de dents, de la bouche, de la gorge, de l'inflammation de la muqueuse buccale et de la mauvaise haleine. En usage externe contre le rhumatisme, les myalgies (douleurs musculaires), la sciatique et anesthésiant local dans les soins des plaies. Par voie orale, les clous de girofle sont utilisés dans le traitement des troubles digestifs: ballonnement épigastrique, lenteur à la digestion, éructations et flatulences (**Van Wyk et Wink, 2004; Ghedira et al., 2010**).

Dans les études scientifiques modernes les clous de girofle extraits avec différentes méthodes sont étudiés pour leurs vertus médicinales: l'extrait supercritique possède un effet antioxydant puissant en le comparant aux antioxydants de synthèse mais un effet antibactérien modéré (**Ivanovic et al., 2013**); l'extrait obtenu par ultrasons possède un effet antioxydant important et une grande quantité de composés phénoliques par rapport à l'extraction hydro-éthanolique classique (**Alexandru et al., 2013**); l'huile essentielle obtenue par hydro-distillation classique et les polyphénols présentent un bon effet antioxydant par rapport aux témoins (**Gülçin et al., 2012; Liu et al., 2008**); l'extrait aqueux possède un effet antibactérien important en le comparant avec celui de cannelle (**Al-dhaher, 2008**); effet antibactérien puissant mais inférieur à celui de la cannelle en phase vapeur (**Kloucek et al., 2012**); antifongique (**Guynot et al., 2005**); anti-aspergillose et anti-dermatophytose par l'inhibition de la kératinase et de l'élastase des champignons (**Khan et Ahmad, 2011**); effet larvicide de l'huile sur les moustiques *Aedes aegypti* et *Culex quinquefasciatus*, vecteurs principales de la dengue, de la fièvre jaune, fièvre du Nil (virus du Nil occidental) et le paludisme aviaire (**Fayemiwo et al., 2014**); effet hypoglycémiant de l'huile avec réduction des dommages du cristallin, du muscle cardiaque et du foie (**Shukri et al., 2010**); l'infusion administrée par voie orale inhibe significativement la progression du cancer de poumon chez l'animal (**Banerjee et al., 2006**). L'eugénol est antiviral anti-herpès (**Khan et al., 2005**); anti-inflammatoire, analgésique, antioxydant et anticancéreux (**Kamatou et al., 2012**). En agriculture, l'huile essentielle possède un effet herbicide et protecteur des cultures contre les insectes et les champignons (**Tworkoski, 2002; Dayan et al., 2009**), effet insecticide sur les charançons nuisibles des graines en stocks (**Viteri Jumbo et al., 2014**).

Partie

Expérimentale

*M*atériel et

*M*éthodes

1- MATÉRIEL VÉGÉTAL

Les plantes utilisées dans ce travail se trouvent sur le marché tout au long de l'année, pour leur importance majeure et leur usage quotidien dans la cuisine Algérienne ou en médecine traditionnelle. Elles se trouvent sous forme séchée, tuyaux de la cannelle, bouton floraux des clous de girofle et rhizome de gingembre et de galanga.

2- PRÉPARATION DES EXTRAITS

Les décoctions ont été préparées selon un dosage thérapeutique; 10g de plante pour les extraits seuls, et 2.5g de chaque plante pour le mélange des quatre épices (afin d'obtenir 10g), sont mis dans 250 ml d'eau distillée jusqu'à l'ébullition (100°C) dans un bécher pendant 15 à 20 min, pour avoir une concentration de 40mg/ml (**Chevallier, 2001**).

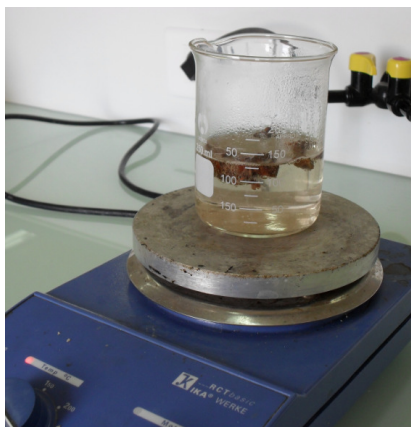


Figure n°39: Préparation des décoctions

Les extraits surchauffés ont été préparés avec le même dosage que les décoctions mais ils sont mis dans des flacons en verre, ensuite placés dans l'autoclave pour assurer une température de 120°C.



Figure n°40: Préparation des extraits surchauffés

3- ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE

Ce procédé a été réalisé suivant un protocole standardisé selon l'OMS (**Rahal et al., 2003**).

a- Souches Bactériennes et Milieux de Culture

Les tests de l'activité antibactérienne ont été réalisés au niveau du Laboratoire de Bactériologie – CHU de Constantine.

Les bactéries utilisées sont des isolats cliniques, bactéries isolées à partir de divers prélèvements de malades: coproculture, urine, abcès, pus, hémoculture, trachéal, plaie, liquide céphalo-rachidien (LCR), sonde vésicale et urinaire, cathéter: *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Citrobacter sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Serratia sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Xanthomonas sp.*

Ces bactéries sont conservées et maintenues en vie par des repiquages continus, sur divers milieux de culture solides et liquides, selon les espèces.

Les milieux de culture utilisés sont: des milieux d'isolement, sélectifs ou d'enrichissement pour chaque groupe bactérien.

- Gélose Hektoen pour les *Entérobactéries* et *Pseudomonas aeruginosa*.
- Gélose Chapman pour les *Staphylococcus*.
- Bouillon cœur cerveau, qui est un milieu d'enrichissement pour toutes les souches bactériennes utilisées.
- Gélose Muller – Hinton, utilisée pour les tests de l'activité antibactérienne.

b- Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice est la plus faible concentration des extraits qui inhibe les bactéries testées. Elle a été réalisée sur milieu solide pour permettre de tester plusieurs souches bactériennes dans la même boîte.

Elle consiste à réaliser des dilutions des décoctions et les incorporer dans le milieu gélosé fondu, ensuite ensemercer les souches bactériennes à étudier après refroidissement du milieu de culture.

- Mettre 2 ml de chaque décoction ou ses dilutions dans une boîte de Pétri en lui rajoutant 18 ml du milieu de culture Muller – Hinton fondu.
- Homogénéiser le mélange par mouvements rotatoires. Laisser prendre la gélose et si c'est possible la faire sécher plus longtemps pour éliminer les gouttelettes d'eau qui se forment.
- Ensemencer les boîtes de Pétri par un inoculum préparé à partir d'une culture bactérienne pure à l'aide d'une anse de platine par stries.
- Utiliser une boîte témoin ensemencée sans aucun extrait.
- Enfin, incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures.

La lecture et l'interprétation des résultats est le calcul de la CMI, qui est la concentration de l'extrait où il n'y a pas de culture visible (inhibition totale).

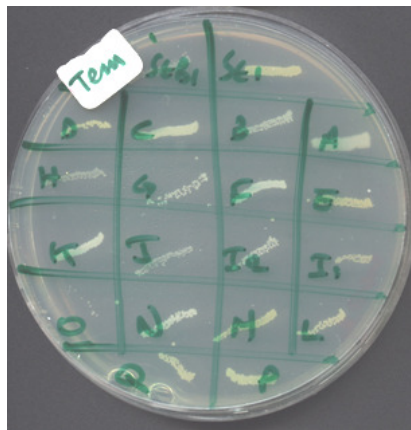


Figure n°41: Méthode d'ensemencement par stries.

4- ACTIVITÉ BACTÉRIOSTATIQUE ET BACTÉRICIDE

Ce test a été réalisé selon Benjilali et al. (1986), qui consiste à suivre les cultures bactériennes inhibées après un deuxième cycle d'incubation à température ambiante pendant une semaine. L'extrait est dit bactériostatique s'il y a croissance après 24h de la première incubation. Il est bactéricide s'il n'y a pas de croissance pendant toute la durée.

5- ACTIVITÉ ALLÉLOPATHIQUE

Les tests de mise en évidence de l'existence d'effets inhibiteurs ou stimulants des extraits aqueux sur la croissance des plantes ont été réalisés sur des carottes et des graines d'haricots blancs secs achetées du marché local.

a- Culture des Plantes

La partie supérieure de la carotte (feuillage) a été séparée à l'aide d'un couteau à environ 1cm de longueur et introduite dans une boîte de Pétri contenant de l'eau potable ordinaire pour la faire repousser à nouveau (après avoir coupé l'ancien feuillage), et la laisser pendant 10 à 15 jours à température ambiante, pour avoir de nouvelles tiges vertes. L'aspect des feuilles peut renseigner sur l'état de la plante déperie (affaiblie) ou épanouie (normale). Cette technique est une multiplication végétative qui repose sur l'aptitude d'un végétal à pouvoir reconstituer un individu identique à lui-même à partir d'un organe (tige, racine, feuille...) d'un tissu ou d'une cellule. Elle est, depuis des siècles, largement utilisée pour reproduire de nombreuses espèces en horticulture et arboriculture (**Cornu et Boulay, 1986**).

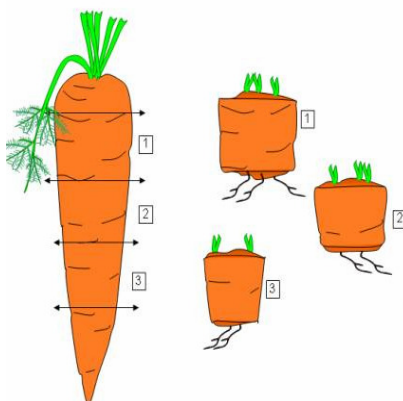


Figure n°42: Culture in vitro des fragments de carotte. (www.stardz.com)



Figure n°43: Expérience de culture des fanes de carotte (jour1, jour7, jour10 à 15)

Les graines d'haricots blancs ont été mis dans du coton hydrophile imbibé d'eau ordinaire pour permettre leur germination préalable dans des boîtes de Pétri; la germination

est une méthode permettant l'assemblage des conditions adéquates aux graines pour l'élongation de l'embryon afin de donner de nouveaux individus (Bewley, 1997). Ces graines sont ensuite transférées dans des barquettes contenant du terreau le septième jour et laissés jusqu'à l'obtention des premières feuilles et que les plantules soient bien épanouies pour une durée de dix à quinze jours. La technique a été adaptée selon les moyens disponibles.



Figure n°44: Culture in vitro des graines d'haricots blancs.

b- Les Essais de l'Activité Allélopathique

Après avoir obtenu des feuilles bien dressées, les plantes ont été inondées (cas des carottes) ou arrosées (cas des haricots blancs) par les extraits aqueux (décoctions et extraits surchauffés) à une concentration de 40mg/ml. Leur aspect a été suivi pendant une semaine maximum pour voir les modifications apparentes sur les feuilles et les tiges comme le changement de couleur ou le flétrissement (affaiblissement). L'incubation est faite à température ambiante. Les expériences ont été réalisées durant les mois d'Avril à Mai 2010 et ensuite durant la période Novembre 2013 à Mai 2014, pour compléter et bien confirmer les résultats obtenus. La technique a été faite selon plusieurs travaux antérieurs et modifiée selon les moyens (Dudai et al., 1999; Han et al., 2008; Rsaissi et al., 2013).



Figure n°45: Mise en évidence de l'effet allélopathique, par inondation (carottes) et arrosage (haricots blancs).

6- SCREENING PHYTOCHIMIQUE

Le screening phytochimique met en évidence la présence des familles de molécules actives, c'est une étude qualitative utilisée pour connaître la composition chimique globale des extraits (El-Olemy et al., 1994; Dohou et al., 2003; Senhaji et al., 2005; Kumar et al., 2010).

a- Saponosides

Leur présence est déterminée par la présence ou non de mousse persistante. Deux millilitres de l'extrait sont mis dans un tube à essai fermé, ensuite bien agiter verticalement pendant 30sec et laisser reposer 15min.

b- Coumarines

Les tubes des extraits sont recouverts avec du papier imbibé de NaOH dilué et sont portés à ébullition. Toute fluorescence jaune témoigne de la présence de coumarines après examen sous UV à 365 nm.

c- Tanins (hydrolysables)

L'ajout de quelques gouttes de FeCl₃ 1 % permet de détecter la présence ou non de tanins. La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques.

d- Proanthocyanidols (tanins condensés)

A 2 ml d'infusé sont additionnés 2 ml d'acide chlorhydrique concentré; le tout est laissé pendant cinq minutes dans un bain-marie bouillant; l'apparition d'une coloration rouge indique une réaction positive.

e- Flavonoïdes

Quelques gouttes d'HCl concentré en présence de trois ou quatre tournures de magnésium. Le changement de coloration est observé: virage au rouge (flavones), virage au rouge pourpre (flavonols), rouge violacée (flavanones et flavanols).

f- Triterpènes et Stéroïdes

Test de Salkowski: incliner le tube à 45° et ajouter 1 à 2ml de H₂SO₄, le changement de coloration est noté immédiatement. Agiter le mélange légèrement et noter le changement graduel de coloration : une coloration rouge indique la présence de stéroïls insaturés.

Test de Libermann-Burschard: additionner trois gouttes d'anhydride acétique puis agiter légèrement. Ajouter une goutte de H₂SO₄ concentré. Le changement de coloration est observé pendant une heure: une coloration bleu-vert indique la présence de stéroïdes tandis que rouge-violet à rose dénote la présence de triterpènes.

g- Anthocyanes

Deux millilitres d'infusé sont ajoutés à 2 ml d'acide chlorhydrique 2 N. L'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu-violacé par addition d'ammoniac indique la présence d'anthocyanes.

h- Amidon

Quelques gouttes de l'iode (I₂) sont rajoutées à la décoction contenue dans un tube à essai, et on observe le changement de la couleur vers le bleu, ce qui indique la présence d'amidon.

i- Acides Organiques

Mettre quelques gouttes du Bleu de Bromothymol dans un tube à essai contenant 2ml de la décoction; si la couleur change au jaune canarie, l'extrait contient des acides organiques.

j- Alcaloïdes

Mettre quelques gouttes du réactif de Dragendorff dans un tube à essai contenant l'extrait; si la couleur change au marron foncé ça prouve l'existence des alcaloïdes.

7- PROFIL SPECTROPHOTOMÉTRIQUE

L'absorption lumineuse a pour origine l'interaction des photons de la source lumineuse d'un spectrophotomètre avec les ions ou molécules de l'échantillon (**Rouessac et al., 2004**). Cette méthode est habituellement non spécifique pour l'identification, à moins que la courbe d'absorption ne présente plusieurs maximums et minimums, des régions d'absorption inhabituellement fortes ou faibles, etc. Le spectre UV d'une substance peut donc rarement servir à lui seul de critère d'identification (**Groupe d'Experts, 2005**).

Les différents extraits aqueux ont été soumis à une analyse par spectrophotométrie, afin d'obtenir les spectres d'absorption correspondants, pour avoir des informations supplémentaires sur les longueurs d'ondes maximales et les domaines d'absorption de chaque extrait aqueux, et pour connaître aussi le comportement de ces extraits bruts sous l'influence d'une lumière UV-visible (**Shenoy et al., 2010; Velho-Pereira et al., 2012; Ansari et al., 2013**).

La technique consiste à faire un balayage par spectrophotomètre UV-vis Shimadzu (UV-2401PC) qui est équipé de cuves de quartz de 1cm et relié à un ordinateur; les spectres ont été enregistrés contre un blanc (l'eau distillée); les extraits aqueux ont été dilués dans de l'eau distillée au $1/10^{\text{ème}}$, sauf pour les extraits peu concentrés du galanga et du gingembre leur dilution est faiblement plus concentré; le travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Chimie de Université de M'sila.

Résultats et

Discussions

I- Activité Antibactérienne

Les tests de l'activité antibactérienne ont été réalisés sur 147 souches bactériennes à Gram positif et à Gram négatif. Parmi ces souches, 78 sont trouvées sensibles au moins à un extrait (53%) et 69 souches résistantes à tous les extraits utilisés (47%) la majorité était à Gram négatif. Parmi les souches sensibles il y a 42 à Gram positif et 36 à Gram négatif.

Les extraits préparés étaient à partir de plantes seules ou combinées en deux et quatre plantes. Mais les extraits qui ont pu inhiber les bactéries étaient cinq seulement: les décoctions de clous de girofle, de cannelle et du mélange de cannelle et clous de girofle, et les extraits surchauffés de clous de girofle et de cannelle. Les autres extraits n'avaient aucun effet, mais certains ont affaibli des souches et d'autres ont, par contre, stimulé la croissance bactérienne qui est le cas du galanga et du gingembre.

Les valeurs des CMI (concentrations minimales inhibitrices) représentées ici sont des moyennes, les concentrations des extraits utilisées varient entre 1mg/ml et 4mg/ml. Le fait qu'il n'y a pas inhibition cela veut dire que la CMI est estimée supérieure à 4mg/ml.

I- Les Bactéries à Gram Positif

Le tableau n°1 présente l'effet antibactérien des cinq extraits qui ont eu une réponse positive sur les souches bactériennes, c'est-à-dire une inhibition, sur des Staphylocoques blancs.

Tableau n°1: Concentrations minimales inhibitrices des Staphylocoques blancs (mg/ml).

Souches	ATB R%	Girofle Surch.	Girofle Décoc.	Cannelle Surch.	Cannelle Décoc.	Can+Gir Décoc.
<i>Staphylococcus albus</i> 10	80	4 ?	4 ?	4 ?	-	4 s
<i>S. albus</i> O	73.3	≤1 c	2 c	≤1 c	4 s	-
<i>S. albus</i> I2	61.1	3 c	4 ?	-	-	-
<i>S. albus</i> O3	46.6	4 ?	-	-	-	-
<i>S. albus</i> J	35.2	4 c	-	4 ?	-	-
<i>S. albus</i> R	25	2 ?	4 ?	4 ?	-	4 c
<i>S. albus</i> 00	16.6	4 c	3 s	-	4 s	4 s
<i>S. albus</i> 1	0.00	2 c	4 c	4 s	4 s	4 c
% d'inhibition	/	100	75	62.50	37.50	50

(c): effet bactéricide, (s): effet bactériostatique, (?): effet inconnu, (-): aucun effet, (ATB, R%): pourcentage de résistance aux antibiotiques.

L'activité antibactérienne était remarquable malgré la résistance des souches aux antibiotiques, jusqu'à 80%. L'extrait le plus puissant était les clous de girofle surchauffés avec une inhibition de 100% et un effet bactéricide dominant, suivi par la décoction de clous de girofle avec une inhibition de 75%, suivi par la cannelle surchauffée avec une inhibition de 62.5%, suivi par le mélange de cannelle et clous de girofle en décoction avec une inhibition de 50%, et enfin la décoction de cannelle avec une inhibition de 37.5% et un effet bactériostatique.

Le tableau n°2 présente les CMI des Staphylocoques dorés ayant une résistance aux antibiotiques, avec la présence de souches résistantes à la Méricilline (SARM).

Tableau n°2: Concentrations minimales inhibitrices des Staphylocoques dorés résistants (mg/ml).

Souches	ATB R%	Girofle Surch.	Girofle Décoc.	Cannelle Surch.	Cannelle Décoc.	Can+Gir Décoc.
<i>Staphylococcus aureus</i> 7	70.5	4 c	4 s	-	-	4 s
<i>S. aureus</i> 9	66.6	4 c	4 s	-	-	4 s
<i>S. aureus</i> II (SARM)	61.5	3 c	4 s	4 ?	-	4 s
<i>S. aureus</i> G (SARM)	57.1	2.5 c	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> H (SARM)	50	3 c	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> 1	47.05	4 c	4 s	-	-	4 s
<i>S. aureus</i> 3	28.5	4 ?	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> 01	23.5	4 ?	-	4 ?	-	-
<i>S. aureus</i> U	23.5	4 ?	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> N	21.4	4 ?	-	4 c	4 c	-
% d'inhibition	/	100	40	30	10	40

(c): effet bactéricide, (s): effet bactériostatique, (?): effet inconnu, (-): aucun effet, (ATB, R%): pourcentage de résistance aux antibiotiques.

Toutes les souches résistantes ont été inhibées par l'extrait surchauffé des clous de girofle avec un effet bactéricide dominant, ce qui prouve que c'est l'extrait le plus puissant comme ça s'est présenté dans le tableau n°1. Suivi par les décoctions de clous de girofle et le mélange de cannelle et clous de girofle avec une inhibition de 40% et un effet bactériostatique, suivi par la cannelle surchauffée avec une inhibition de 30%, et enfin la décoction de cannelle avec une très faible inhibition.

Le tableau n°3 est une suite du tableau n°2 mais avec des souches de Staphylocoques dorés moins résistantes et sensibles aux antibiotiques.

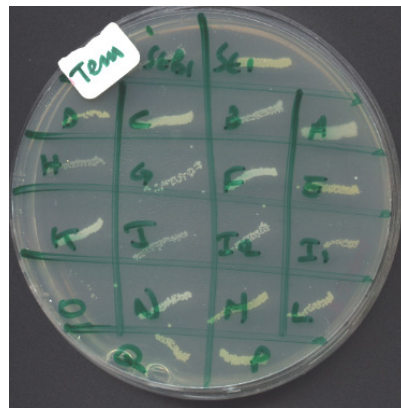
Tableau n°3: Concentrations minimales inhibitrices des Staphylocoques dorés peu résistants (mg/ml).

Souches	ATB R%	Girofle Surch.	Girofle Décoc.	Cannelle Surch.	Cannelle Décoc.	Can+Gir Décoc.
<i>Staphylococcus aureus</i> L	16.6	4 ?	-	4 ?	-	-
<i>S. aureus</i> T	13.3	4 ?	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> E	13.3	3 c	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> 8	11.7	4 c	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> F	8.3	3 c	-	4 s	-	-
<i>S. aureus</i> 1	7.1	3 c	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> 10	7.1	4 c	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> P	6.6	4 ?	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> K	6.6	4 c	-	4 s	-	-
<i>S. aureus</i> D	6.6	3 c	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> C	6.6	3 c	-	4	-	-
<i>S. aureus</i> B	6.6	3 c	4 s	4 s	4 s	-
<i>S. aureus</i> A	6.6	3 c	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> M	5.8	4 ?	4 s	4 ?	-	-
<i>S. aureus</i> 6	5.5	4 c	4 s	-	-	-
<i>S. aureus</i> 2	5.5	4 c	3 c	-	-	-
<i>S. aureus</i> Q	00	4 ?	-	4 ?	-	-
% d'inhibition	/	100	23.52	41.17	5.88	0

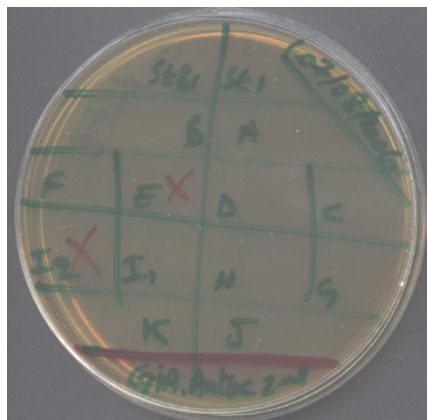
(c): effet bactéricide, (s): effet bactériostatique, (?): effet inconnu, (-): aucun effet, (ATB, R%): pourcentage de résistance aux antibiotiques.

De la même manière l'extrait surchauffé des clous de girofle était le plus puissant avec une inhibition totale de toutes les souches et un effet bactéricide dominant. Suivi par la cannelle surchauffée avec une inhibition de 41.17% et un effet bactériostatique, suivi par la décoction de clous de girofle et une inhibition de 23.52% et un effet bactériostatique, suivi par la décoction de cannelle avec une seule souche inhibée, et enfin le mélange de cannelle et clous de girofle en décoction qui n'a donné aucun effet.

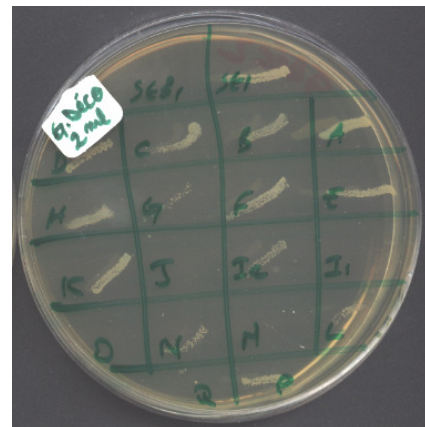
En analysant les résultats obtenus avec les souches à Gram positif, la première remarque concerne l'extrait surchauffé des clous de girofle qui avait la meilleure activité antibactérienne sur les souches multi-résistantes et sensibles aux antibiotiques classiques avec un effet bactéricide. La décoction des clous de girofle et la cannelle surchauffée avaient un effet modéré sur certaines souches seulement avec un effet bactériostatique dominant. Les autres extraits n'avaient pas un effet significatif.



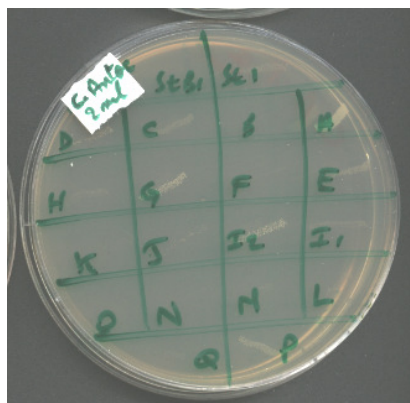
Boite témoin



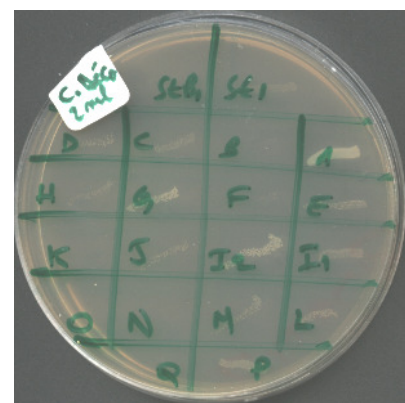
Girofle surchauffé (aucune croissance)



Décoction de girofle



Cannelle surchauffée



Décoction de cannelle

Figure n°46: Tests de l'activité antibactérienne sur les Staphylocoques

2- Les Bactéries à Gram Négatif

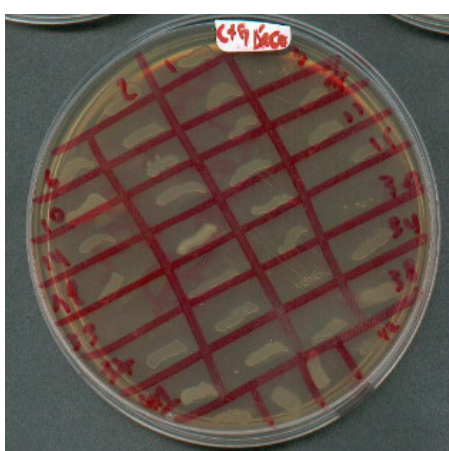
Le tableau n°4 présente les CMI des bactéries à Gram négatif, toutes ces souches sont résistantes aux antibiotiques sauf une souche sauvage (*Escherichia coli* 04), avec présence de souches BLSE (bêta-lactamase à spectre élargi).

Tableau n°4: Concentrations minimales inhibitrices des souches à Gram (-) (mg/ml).

Souches	ATB R%	Girofle Surch.	Girofle Décoc.	Cannelle Surch.	Cannelle Décoc.	Can+Gir Décoc.
<i>Acinetobacter</i> sp. 4	95	4 c	-	-	-	-
<i>Acinetobacter</i> sp. 1	84.2	4 c	-	-	-	-
<i>Acinetobacter</i> sp. 2	80	4 c	4 c	-	-	-
<i>Acinetobacter</i> sp. 3	77.7	4 c	4 c	-	-	-
<i>E. coli</i> (04)	0.00	4 ?	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> 7 (BLSE)	55.5	-	4 s	-	-	-
<i>Serratia</i> sp. 2	68.7	4 s	-	-	-	-
<i>Serratia</i> sp. 3 (BLSE)	68.7	4 s	-	-	-	-
<i>Serratia</i> sp. 1 (BLSE)	64.7	4 s	-	-	-	-
<i>Serratia</i> sp. 4	42.8	4 s	-	-	-	-
<i>P. mirabilis</i> (5) (BLSE)	83.3	4 ?	-	-	-	-
<i>P. mirabilis</i> 5	53.8	4 c	-	-	-	-
<i>P. mirabilis</i> 2	45.4	4 c	4 c	-	-	4 s
<i>P. mirabilis</i> 4	23.07	2 c	4 s	-	-	-
<i>P. mirabilis</i> 1	16.6	4 c	4 c	-	-	-
<i>M. morgani</i> 2	53.3	4 c	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> 1 (BLSE)	66.6	4 c	4 c	-	-	4 s
<i>Xanthomonas</i> malto	23.5	4 c	-	-	-	4 s
<i>P. aeruginosa</i> 5	55.5	4 s	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> 4	45.4	4 s	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> 2	44.4	4 s	-	-	-	-
% d'inhibition	/	95.23	33.33	0	0	14.28

(c): effet bactéricide, (s): effet bactériostatique, (?): effet inconnu, (-): aucun effet, (ATB, R%): pourcentage de résistance aux antibiotiques.

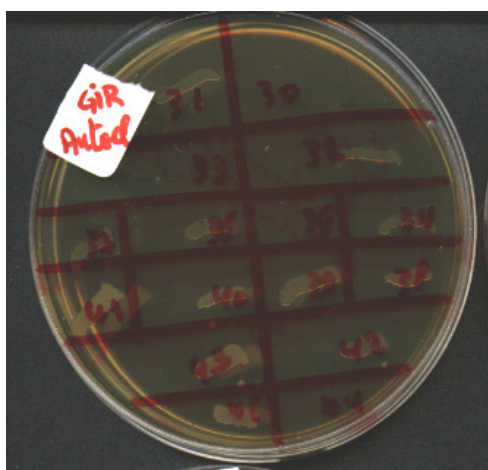
L'extrait des clous de girofle surchauffés avec un effet bactéricide a inhibé toutes les souches y compris des *Acinetobacter* multi-résistantes aux antibiotiques (95%) opportunistes, sauf une souche de *Klebsiella pneumoniae* 7 (BLSE) qui a causé le décès d'un malade, mais cette souche a été inhibée par la décoction de la même plante. La décoction de clous de girofle paraît moins efficace avec les bactéries à Gram négatif que les bactéries à Gram positif avec une inhibition de 33.33% mais son effet est bactéricide dominant. Les deux extraits de cannelle n'avaient aucun effet. Alors que le mélange de cannelle et des clous de girofle avait un faible effet bactériostatique et 14.28% d'inhibition.



Mélange cannelle et clous de girofle en décoction (très faible inhibition)



Décoction de cannelle (aucun effet)



Extrait surchauffé des clous de girofle (faible inhibition)

Figure n°47: Tests de l'activité antibactérienne sur les bactéries à Gram négatif

3- Les Bactéries à Résistance Inconnue

Tableau n°5: Concentrations minimales inhibitrices de souches sans antibiogramme (mg/ml).

Souches	Girofle Surch.	Girofle Décoc.	Cannelle Surch.	Cannelle Décoc.	Can+Gir Décoc.
<i>S. albus</i> 2	4 c	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> 4 (+)	4 c	4 s	-	-	-
<i>S. aureus</i> 5 (-)	-	4 s	-	-	-
<i>M. morgani</i> 1	4 c	-	-	-	-
<i>Shigella</i> sp. 1	4 c	-	-	-	-
<i>Shigella</i> sp. 2	4 c	-	-	-	-
<i>P. mirabilis</i> 3	4 c	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> 4	4 c	4 c	-	-	4 s
<i>Salmonella</i> 6	4 s	-	-	-	-
% d'inhibition	88.88	33.33	0	0	11.11

(c): effet bactéricide, (s): effet bactériostatique, (-): aucun effet.

Le tableau n°5 est une suite des travaux précédents mais avec des souches sans antibiogramme, pour prouver encore l'effet des extraits où les clous de girofle surchauffés présentent l'effet puissant et bactéricide.

Les CMI des bactéries à Gram négatif (tableaux n°4 et n°5) variaient entre 2mg/ml à 4mg/ml, contrairement aux CMI des bactéries à Gram positif qui étaient plus faible jusqu'à 1mg/ml (tableaux n°1, n°2 et n°3). Cela montre que les extraits aqueux ont eu un effet meilleur sur les bactéries à Gram positif plus que les bactéries à Gram négatif, et cela est dû à la composition chimique de la paroi bactérienne à Gram positif qui est constituée essentiellement de peptidoglycane laissant pénétrer les molécules hydrophiles. Cela a été remarqué dans un travail antérieur où les extraits huileux avaient un effet sur les bactéries à Gram négatif plus que sur les bactéries à Gram positif parce que la paroi présente un aspect hydrophobe (**Benzeggouta, 2005**).

L'effet puissant de l'extrait surchauffé des clous de girofle sur les souches à Gram positif et celles à Gram négatif est dû à sa composition chimique, où la technique d'extraction par eau surchauffée permet d'extraire les molécules organiques polaires et peu polaires qui peuvent agir sur la paroi des bactéries à Gram positif et négatif en même temps (**Clifford, 2002**).

Les extraits de cannelle avaient une faible activité en les comparants à ceux des clous de girofle et cela est dû à la composition chimique de la cannelle qui se montre moins stable et moins efficace que les clous de girofle en solution aqueuse, ce résultat est en conformité avec une autre étude (**Al-dhaher, 2008**), alors que les travaux sur l'huile essentielle de cannelle montre qu'elle est plus antibactérienne que celle des clous de girofle (**Mayaud et al., 2008**).

Un autre effet a été remarqué avec les extraits de galanga et du gingembre, décoction et surchauffé, où il y a eu une surcroissance de certaines souches bactérienne au lieu d'une inhibition, et cela est dû aussi à leur composition chimique qui est riche en amidon qui peut atteindre 60% (selon la région) du poids sec dans le cas du gingembre (**Van Beek et al., 1987**), sachant que l'amidon est un élément de choix dans la nutrition bactérienne. Cet effet a été remarqué avec d'autres chercheurs qui ont utilisé l'extrait aqueux de rose comme milieu de culture pour les bactéries (**Al-Azzaui et al., 2011**).

Concernant les mélanges binaires et le mélange des quatre épices on remarque qu'il n'y a pas de synergie apparente dans les tests *in vitro*, puisque l'effet antibactérien est trop faible et ne concerne que le mélange de cannelle et de clous de girofle en décoction et le mélange des quatre épices qui ont présenté un affaiblissement du tapis bactérien ou quelques souches inhibées. Il est fort probable que ces mélanges, utilisés en médecine traditionnelle contre certaines maladies infectieuses respiratoires, possèdent un effet indirect sur ces maladies comme réchauffants interne et stimulants du système immunitaire (**Hempfen et Fisher, 2009**), ou bien l'effet est dû à leurs métabolites dans l'organisme, et non pas à un effet direct.

II- Activité Allélopathique

Les tests de l'activité allélopathique ont été réalisés avec les décoctions des quatre plantes séparément et leur mélange, et avec les extraits surchauffés respectifs. Les résultats récapitulatifs obtenus sont présentés dans le tableau n°6. Les extraits sont mis en contact avec les plantes une seule fois sans répétition, et si l'extrait est absorbé par les plantes il est remplacé par de l'eau ordinaire pour voir s'il y a possibilité de revivifier les plantes affaiblies.

Tableau n°6: Résultats de l'effet allélopathique des différents extraits.

	Les Décoctions					Les Extraits Surchauffés				
	C	G	Z	A	Q	C	G	Z	A	Q
Carottes	-	+ r	+	-	-	-	+ r	-	-	±
Haricots	-	-	-	-	-	NT	NT	NT	NT	NT

C: cannelle, G: clous de girofle, Z: gingembre, A: galanga, Q: mélange des quatre épices, (+): présence d'activité allélopathique, (-): absence d'activité allélopathique, (±): régénération des plantes affaiblies, (r): effet retardé, NT: non testé.

1- Les décoctions

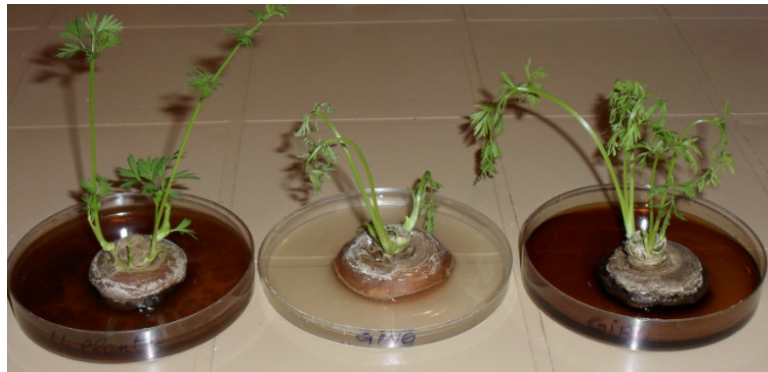
La figure n°48 présente l'activité de l'extrait de gingembre, de clous de girofle et du mélange des quatre épices. Les autres extraits de galanga et de cannelle n'ont eu aucun effet. De manière générale l'effet allélopathique est soit immédiat, c'est-à-dire affaiblissement après un jour, ou retardé lorsque l'affaiblissement se montre durant une semaine ou plus. L'extrait de gingembre possède un effet immédiat, après un jour seulement les tiges de la carotte commencent à s'affaiblir, au cours de la semaine la plante meure même après régénération avec de l'eau ordinaire qui a servi à faire repousser le feuillage. L'extrait des clous de girofle a un effet retardé puisque l'affaiblissement n'est apparent qu'après 3 jours du début de l'expérience, la plante meure après une semaine même après régénération avec l'eau ordinaire. L'extrait du mélange des quatre épices a servi comme témoin puisqu'il n'a eu aucun effet négatif sur la plante.



Jour zéro, début du test, extrait des 4 épices, de gingembre et de girofle (de gauche à droite).



Jour 1^e, début de l'affaiblissement pour le gingembre.



Jour 3^e, régénération sans effet (gingembre), début de l'affaiblissement pour le girofle.



Jour 5^e, aucun effet de l'extrait des 4 épices, et mort des autres.

Figure n°48: Tests de mise en évidence de l'activité allélopathique des décoctions

Les décoctions de cannelle, de galanga et le mélange des quatre épices n'ont aucun effet toxique sur les plantes et par conséquent elles peuvent être étudiées pour un éventuel effet insecticide, puisqu'elles n'altèrent pas les tissus végétaux.

Les tests sur les plantules d'haricots blancs n'ont montré aucun effet toxique et les plantes continuent de se développer même après utilisation répétée des extraits. Dans ce cas aussi ces décoctions peuvent être étudiées pour un éventuel effet insecticide puisque les haricots sont résistants.

2- Les extraits surchauffés

Les figures n°49 et n°50 présentent l'effet allélopathique immédiat de l'extrait surchauffé du mélange des quatre épices, et l'effet retardé des clous de girofle surchauffés. Alors que les extraits de cannelle, de galanga et de gingembre n'ont donné aucun effet.



Jour zéro



Jour 1^{er}, début de l'affaiblissement



Jour 2^e, le 1/3 de la plante a été régénéré



Après une semaine, altération totale

Figure n°49: Tests de mise en évidence de l'activité allélopathique du mélange des quatre épices surchauffées



Jour zéro

Jour 2^e, affaiblissement retardé



Après une semaine, altération totale

Figure n°50: Tests de mise en évidence de l'activité allélopathique du girofle surchauffé.

L'extrait du gingembre surchauffé n'a pas donné un effet cette fois-ci et la plante est restée intacte pendant une semaine, contrairement au résultat de la décoction où l'effet paraissait le lendemain. Cette instabilité dans l'effet est probablement due à des variétés différentes du gingembre sur le marché, puisque la composition de la plante change avec le changement de la région (Ali et al., 2008) ou bien c'est la plante cible qui est résistante. Si l'extrait de gingembre est faiblement allélopathique, il peut être utilisé pour la protection de la carotte contre certains champignons (Ojaghian et al., 2014). D'autres études montrent que les extraits aqueux gingembre possèdent un effet allélopathique grâce à la présence de molécules solubles dans l'eau, mais le rhizome est moins toxique que les tiges et les feuilles (Han et al., 2008). Ces extraits de gingembre doivent être étudiés en utilisant d'autres plantes cibles pour vérifier avec précision l'activité allélopathique.

La décoction du mélange des quatre épices n'avait aucun effet mais l'extrait surchauffé a présenté un effet modéré avec faible régénération de la plante cible, cela est dû

probablement à la différence dans la composition chimique où de nouvelles molécules polaires peuvent apparaître avec cette technique (**Clifford, 2002**).

Les extraits aqueux des clous de girofle soit surchauffé ou décoction présentait un effet allélopathique retardé, et cela prouve que les molécules hydrophiles jouent un rôle comme bio-herbicides. L'huile essentielle des clous de girofle aussi possède un effet herbicide (**Tworkoski, 2002**) et peut être utilisée comme insecticide afin de protéger certaines cultures (**Dayan et al., 2009**).

Les différents extraits de cannelle et de galanga n'ont eu aucun effet allélopathique sur les fanes de carottes, mais ils peuvent avoir un effet sur d'autres types de plantes, puisque les molécules allélochimiques n'agissent pas sur toutes les plantes de la même façon (**Bray, 2010; Bhadoria, 2011**). Ou bien les molécules extraites avec ces techniques n'ont pas d'effet. Cependant, des études montrent que l'huile essentielle de cannelle seule ou en association avec d'autres huiles est utilisée pour lutter contre les mauvaises herbes et le cinnamaldéhyde est commercialisé pour la protection des cultures contre les champignons (**Tworkoski, 2002; Dayan et al., 2009**).

III- Screening Phytochimique

Les tests qualitatifs phytochimiques effectués sur les décoctions et les extraits surchauffés des quatre plantes seules puis mélangés, ont permis de déceler l'existence d'une variété de métabolites secondaires représentés dans les tableaux n°7 et n°8.

1- Les décoctions

Le screening phytochimique des décoctions a montré une richesse en métabolites secondaires pour les extraits de cannelle, de galanga et le mélange des quatre épices.

Tableau n°7: Mise en évidence des métabolites secondaires dans les décoctions

Métabolites	Décoctions				
	Cannelle	Girofle	Gingembre	Galanga	4 épices
Flavonoïdes	+	+	-	+	+
Acides phénoliques	+	+	+	+	+
NaOH (ml)	0.8	3	1.4	0.3	0.9
Tanins	+	+	-	+	+
Proanthocyanidoles	+	-	-	+	+
Coumarines	+	+	-	+	+
Anthocyanes	+	-	-	-	-
Saponines	++	±	+	+	+
Triterpènes/Stéroïdes	+/+	-/-	-/-	-/+	+/+
Alcaloïdes	+	-	++	+	++
Amidon	+	-	++	+	+

(+): présence, (++): abondance, (-): absence, (±): faible.

L'extrait des clous de girofle contient moins de métabolites comme les tanins hydrolysables, les terpénoïdes, les alcaloïdes et l'amidon, mais la quantité d'acides organiques et beaucoup plus élevée que les autres extraits. L'extrait du gingembre est le plus pauvre en métabolites, selon les tests, il y a par contre les acides phénoliques (la plus forte quantité après l'extrait des clous de girofle), les saponines, une grande quantité d'alcaloïdes et d'amidon, prouvée par une forte coloration brune et bleue observée dans les tubes à essai respectivement. A la surface de toutes les décoctions il y a présence d'une plaque brillante métallique qui est due à la présence de faibles quantités d'huiles essentielles ou de lipides.

L'effet antibactérien des décoctions peut être expliqué sur la base de leur composition chimique. L'extrait des clous de girofle est le plus puissant parce qu'il contient une grande quantité de polyphénols par rapport à la cannelle, le gingembre et le galanga (Shan et al., 2005; Liu et al., 2008), et son principe majoritaire l'eugénol possède le meilleur effet antibactérien (Al-dhaher, 2008).

L'extrait de cannelle est trop faible car il contient moins d'acides organiques et son principe majoritaire l'aldéhyde cinnamique est très peu soluble dans l'eau, la présence de l'amidon, peut diminuer l'activité antibactérienne des autres constituants du fait que les bactéries se développent mieux en présence de l'amidon traité à la chaleur (Zhou et al., 2013). La présence de concentrations différentes d'amidon dans le mélange des quatre épices, du gingembre et du galanga a probablement inhibé l'effet des autres constituants.

Les activités allélopathiques du gingembre, des clous de girofle sont dues à la présence de molécules allélochimiques hydrosolubles comme les acides organiques et l'eugénol (Inderjit et Keating, 1999; Kamatou et al., 2012).

2- Les extraits surchauffés

Les résultats de la composition chimique des extraits surchauffés sont très proches à ceux des décoctions, mais avec quelques différences.

Tableau n°8: Mise en évidence des métabolites secondaires dans les extraits surchauffés

Métabolites	Extraits surchauffés				
	Cannelle	Girofle	Gingembre	Galanga	4 épices
Flavonoïdes	+	+	-	+	+
Acides phénoliques	+	+	+	+	+
NaOH (ml)	0.8	2.9	1.5	0.7	1.4
Tanins	+	+	-	+	+
Proanthocyanidoles	+	-	+	+	+
Coumarines	+	+	-	+	+
Anthocyanes	+	-	ND	ND	ND
Saponines	+	±	+	+	+
Triterpènes/Stéroïdes	+/+	-/+	-/-	+/-	+/+
Alcaloïdes	+	-	+	+	+
Amidon	+	-	+	+	+

(+): présence, (-): absence, (±): faible, ND: Non Déterminé.

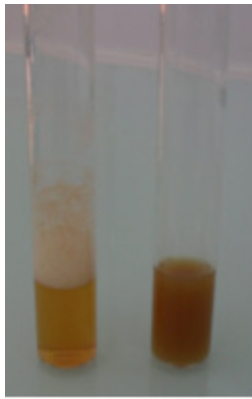
Ces différences sont dues à l'erreur dans la réaction chimique avec les réactifs lorsque la quantité des composés est trop faible ou à l'effet de la chaleur où certains composés peuvent se dégrader ou bien apparaître.

Mais globalement, les décoctions et les extraits surchauffés renferment les mêmes familles de composés chimiques. Cependant, pourquoi les extraits surchauffés ont une activité antibactérienne meilleure, dans le cas des clous de girofle et de la cannelle ?

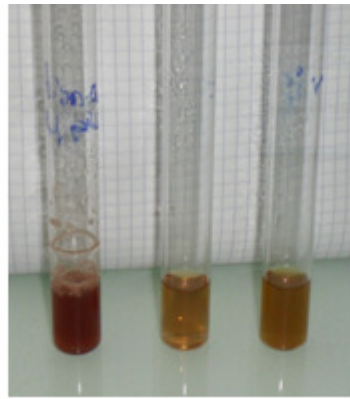
Avec la technique de l'eau surchauffée il est fort possible d'obtenir l'eugénol et le cinnamaldéhyde à partir des clous de girofle et de cannelle, comme cela a été démontré dans plusieurs travaux (**Rovio et al., 1999; Clifford et al., 1999; Jayawardena et Smith, 2009**), mais l'instabilité de l'aldéhyde en solution aqueuse rend l'extrait des clous de girofle plus puissant avec l'activité antibactérienne ou l'activité allélopathique.

L'eau sous pression et à température de 120°C devient moins polaire (**Clifford, 2002**) et par conséquent elle peut extraire facilement les molécules organiques, c'est-à-dire il y a influence sur la quantité de molécules libérées par les cellules végétales, mais aussi d'autres molécules peuvent être libérées qui ne sont pas détectables par le screening phytochimique classique. Cela a été remarqué aussi visuellement par une couleur plus accentuée des extraits. C'est ce qui donne un effet antibactérien plus puissant des extraits surchauffés que les décoctions.

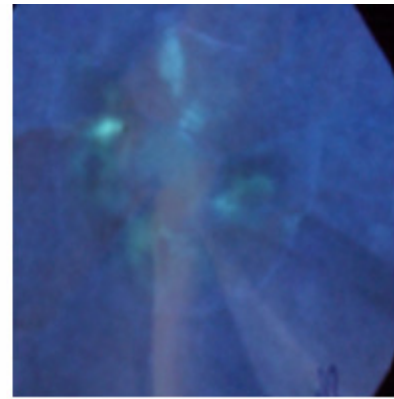
L'activité allélopathique des extraits surchauffés des clous de girofle et du mélange des quatre épices est due à la présence d'une diversité de molécules allélochimiques comme les acides phénoliques, l'eugénol, les molécules terpéniques ainsi que d'autres molécules, mais leur mode d'action sélectif sur les carottes et pas sur les haricots n'est pas bien assimilé et nécessite un approfondissement des recherches (**Inderjit et Keating, 1999; Tworkoski, 2002; Weir et al., 2004; Han et al., 2008; Kamatou et al., 2012**).



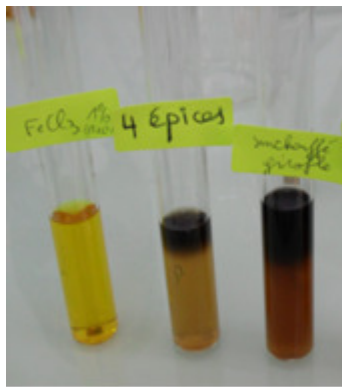
Saponines (Cannelle)



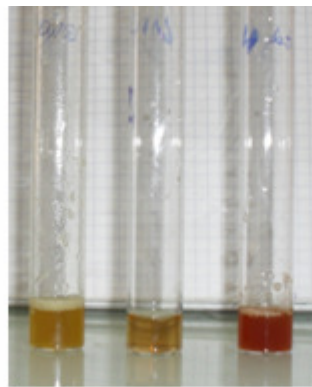
Proanthocyanidoles



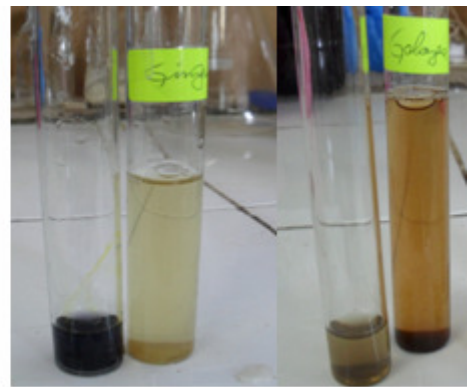
Coumarines (sous UV)



Tanins



Stéroïdes



Alcaloïdes

Figure n°51: Quelques tests du screening phytochimique

IV- Profil Spectrophotométrique

Le spectre d'absorption est une caractéristique du composé dans son environnement car il dépend des différents niveaux énergétiques du système soluté/solvant. Pour déterminer ce spectre il suffit de mesurer l'absorbance pour chaque longueur d'onde (**Mesplède et Randon, 2004**).

Dans cette expérience les spectres des extraits aqueux ont été tracés pour connaître le domaine d'absorbance maximal, c'est-à-dire λ_{\max} , et l'allure du spectre de chaque extrait brut (figures n°52 jusqu'à n°60).

1- Spectres des Décoctions

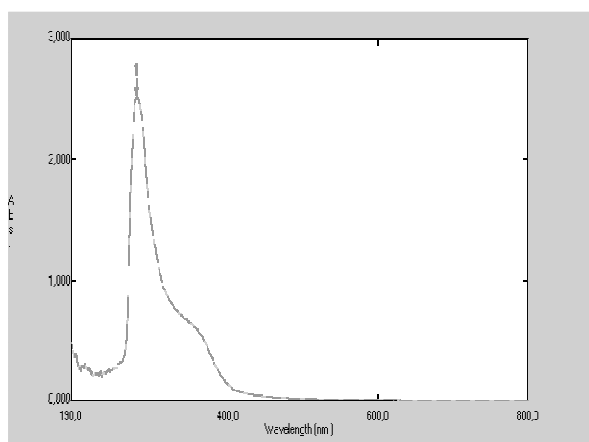


Figure n°52: Spectre d'absorption des clous de girofle
($\lambda_1 = 278$, $A_1 = 2.5244$, $\lambda_2 \sim 370$, $A_2 \sim 0.6$)

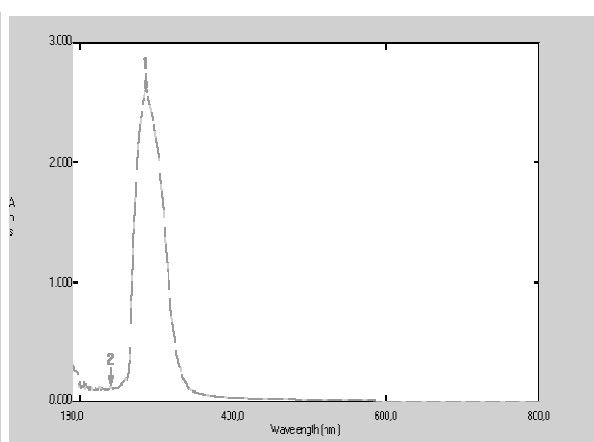


Figure n°53: Spectre d'absorption de cannelle
($\lambda = 286$, $A = 2.6039$)

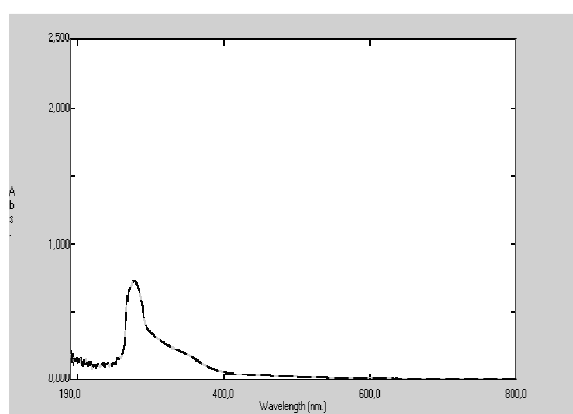


Figure n°54: Spectre d'absorption du galanga
($\lambda = 277.5$, $A = 0.7250$)

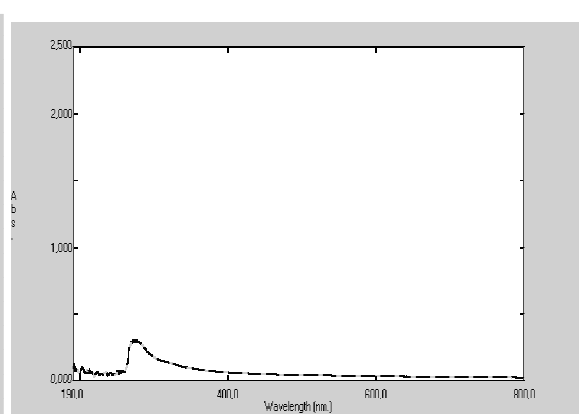


Figure n°55: Spectre d'absorption du gingembre
($\lambda = 274.5$, $A = 0.3057$)

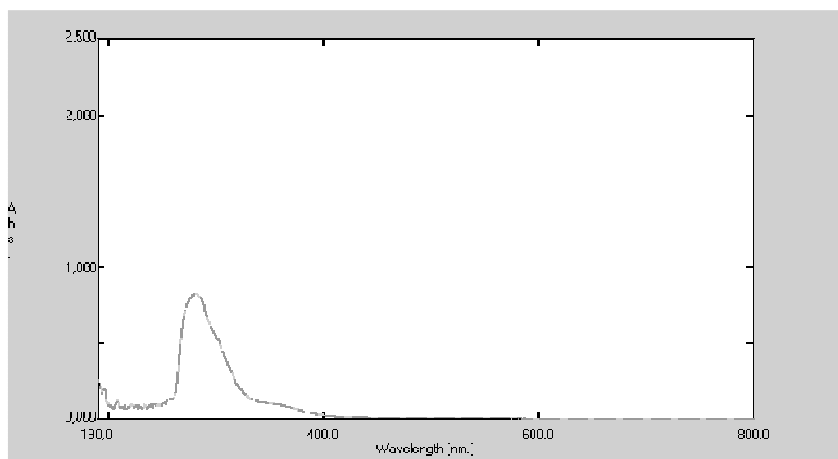
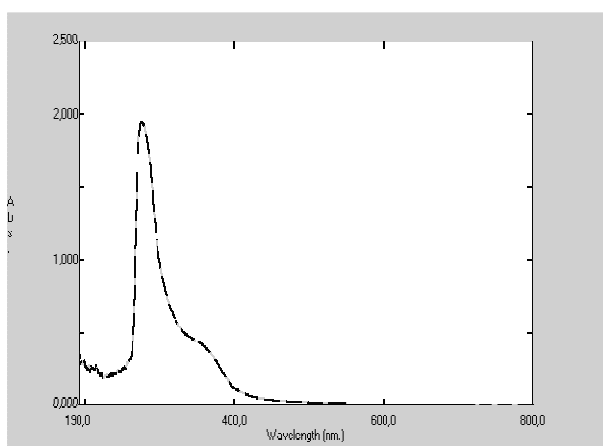
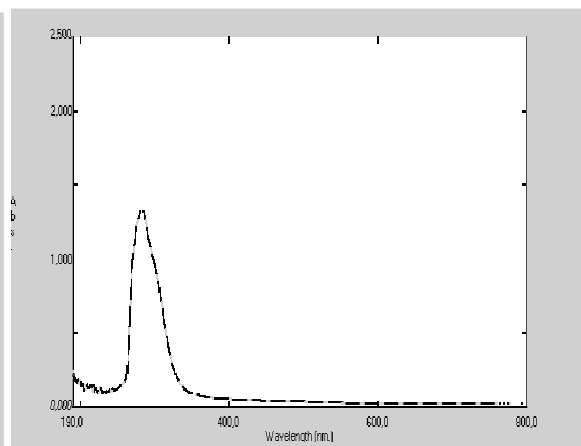


Figure n°56: Spectre d'absorption du mélange des quatre épices ($\lambda_1 = 280$, $A_1 = 0.8250$, $\lambda_2 \sim 370$, $A_2 \sim 0.2$)

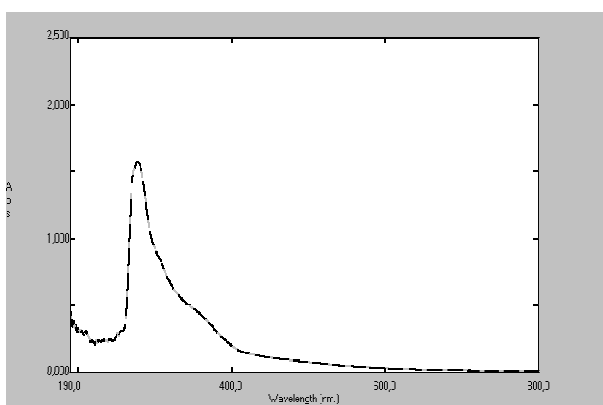
2- Spectres des Extraits Surchauffés



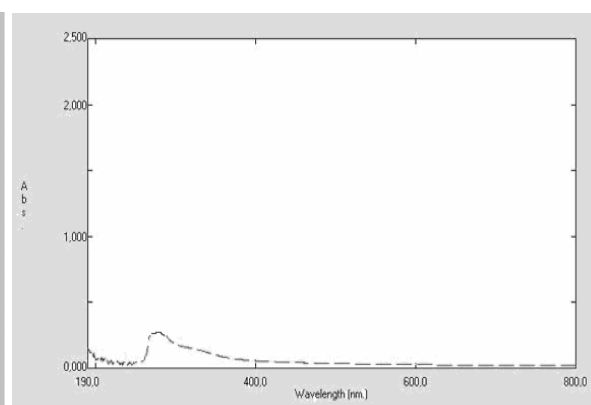
*Figure n°57: Spectre d'absorption des clous de girofle
($\lambda_1 = 275$, $A_1 = 1.9443$, $\lambda_2 \sim 370$, $A_2 \sim 0.4$)*



*Figure n°58: Spectre d'absorption de cannelle
($\lambda = 282.5$, $A = 1.3287$)*



*Figure n°59: Spectre d'absorption du galanga
($\lambda_1 = 276.5$, $A_1 = 1.5730$, $\lambda_2 \sim 370$, $A_2 \sim 0.4$)*



*Figure n°60: Spectre d'absorption du gingembre
($\lambda = 276$, $A = 0.2916$)*

Les longueurs d'onde maximales de tous les extraits donnent des valeurs entre 270 et 290 nm avec deux épaulements vers 370 nm pour les extraits de clous de girofle de galanga et du mélange des quatre épices, ces valeurs prouvent encore que ces mélanges contiennent des molécules phénoliques qui absorbent dans ce domaine. La spectroscopie UV-Visible est souvent utilisée pour identifier les composés phénoliques isolés, mais le spectre d'absorption des extraits des polyphénols totaux peut être utilisé pour identifier la présence des groupes prédominants des polyphénols (**Shahidi et Naczk ,2004**).

Alors que l'absorbance, représentée par l'amplitude des spectres, qui est très forte pour les extraits de clous de girofle et de cannelle et faibles pour les autres extraits, est fonction seulement des concentrations et non pas des activités (**Burgot, 2006**).

Conclusion

CONCLUSION

Dans le cadre de la comparaison entre les techniques d'extraction traditionnelles (décoctions) et les techniques de la chimie verte (extraction par eau surchauffée), l'étude de l'activité antibactérienne et allélopathique, des extraits aqueux de cannelle, clous de girofle, gingembre, galanga et de leur mélange, a été réalisée et a permis d'avoir des résultats très intéressants pour des extraits bruts, qui ont été soumis par la suite à un screening phytochimique et à une analyse du profil spectrophotométrique afin de découvrir les molécules existantes responsables de ces activités biologiques.

La décoction et l'extrait surchauffé des clous de girofle avaient la plus grande efficacité antibactérienne, du fait qu'il y a eu un effet bactéricide sur des souches multi-résistantes aux antibiotiques classiques. Ces extraits possédaient aussi une bonne activité allélopathique, mais agissant sur une seule variété de plantes testées. Ces résultats semblent très proches d'autres études réalisées sur les extraits aqueux (**Al-dhaher, 2008**) et l'huile essentielle (**Dayan et al., 2009**). En analysant la composition chimique et le profil spectrophotométrique, il s'est avéré que les molécules phénoliques étaient majoritaires. Cependant, l'extrait surchauffé avait un effet antibactérien plus puissant que la décoction. En se basant sur les études antérieures qui prouvent que l'eau surchauffée peut extraire les molécules polaires et apolaires y compris la présence de l'eugénol (**Clifford, 2002; Clifford et al., 1999**), l'efficacité de l'extrait surchauffé s'éclaircit. L'activité allélopathique est semblable pour les deux extraits et cela reste à expliquer dans de futurs travaux.

Les deux extraits de cannelle avaient une efficacité plus faible que celle des clous de girofle sur les bactéries testées, comparable à celle obtenue dans un autre travail (**Al-dhaher, 2008**), mais l'activité antibactérienne de l'extrait surchauffé était plus grande que celle de la décoction avec un effet bactériostatique. Cela est dû au pouvoir d'extraction de l'eau surchauffée (**Clifford, 2002**). Alors que l'activité allélopathique était absente pour les deux extraits. Le screening phytochimique et le profil spectrophotométrique étaient en faveur de la présence de molécules polyphénoliques (**Shahidi et Naczki, 2004**).

Le mélange des quatre épices en décoction ou surchauffé n'a pas donné de bons résultats pour l'activité antibactérienne, et cela peut être expliqué par l'absence de synergie *in vitro* pour un extrait largement utilisé traditionnellement pour combattre le froid. Mais l'activité allélopathique était présente pour l'extrait surchauffé et absente pour la décoction.

La décoction n'était pas toxique pour la plante mais son extrait surchauffé était toxique. Ce résultat montre que l'extraction par l'eau surchauffée peut devenir toxique aussi bien pour les plantes que pour l'homme, et cela implique des études toxicologiques plus avancées.

Les extraits du gingembre et de galanga n'avaient pas une activité antibactérienne, mais au lieu d'inhiber les bactéries, ces extraits ont stimulé la croissance bactérienne, à cause de la présence de l'amidon. Ces résultats paraissaient non logiques, mais ils étaient en accord avec une étude réalisée sur les extraits aqueux (**Al-Azzaui et al., 2011**), où ils ont été utilisés pour cultiver les bactéries. L'activité allélopathique du galanga était absente pour les deux extraits, mais le gingembre en décoction présentait un bon effet allélopathique immédiat pour une première expérience et retardé lors de la répétition. Cela est dû probablement à la différence de variétés du gingembre qui se trouvent sur le marché. Par conséquent il faut bien vérifier la qualité, le mode de stockage et la date des plantes médicinales achetées.

Les extraits aqueux des clous de girofle, de cannelle, de gingembre et de leur mélange peuvent être utilisés pour contrôler les maladies infectieuses dont les germes sont multi-résistants et comme herbicides et insecticides, à condition de vérifier profondément leur efficacité et leur toxicité sur d'autres types de plantes et sur les cellules humaines.

Certaines techniques et principes de la chimie verte, amies de l'homme et son environnement, présentent actuellement le meilleur choix pour notre futur, en essayant de trouver des molécules plus sûres utilisant des solvants moins toxiques. C'est ainsi que l'on reprend la voie du naturel avec l'eau et les plantes médicinales: l'ethnopharmacologie revêtue de vert, ou retour au point de départ.

Et c'est ainsi que les domaines des bio-bactéricides, bio-herbicides et bio-pesticides nécessitent un approfondissement dans la recherche de nouvelles alternatives présentant un nouveau contexte: « De l'Ethnopharmacologie à La Chimie Verte ».

Références

A

- Abd El. Rahman S.N., Abdel-Haleem A.M.H., AL Mudhaffar H.M. (2010) Anti-diabetic Effect of Cinnamon Powder and Cinnamon Aqueous Extract on Serum Glucose of Rats, *International Journal of Food, Nutrition and Public Health*, 3, 183-197.
- Achan J., Talisuna A.O., Erhart A., Yeka A., Tibenderana J.K., Baliraine F.N., Rosenthal P.J., D'Alessandro U. (2011) Quinine, an Old Anti-Malarial Drug in a Modern World: Role in the Treatment of Malaria, *Malaria Journal*, 10, 144.
- Adam F., Abert-Vian M., Peltier G., Chemat F. (2012) "Solvent-free" Ultrasound-Assisted Extraction of Lipids from Fresh Microalgae Cells: A Green, Clean and Scalable process, *Bioresource Technology*, 114, 457-465.
- Ahmad I., Beg A.Z. (2001) Antimicrobial and Phytochemical Studies on 45 Indian Medicinal Plants Against Multi-drug Resistant Human Pathogens, *Journal of Ethnopharmacology*, 74, 113-123.
- Al-Azzaay A.A.M., Hana D.B., Abdalah M.E. (2011) The Use of the Water Extract of *Rosa spp* Petals as a Bacterial Growth Medium, *Al-Mustansiriyah Journal for Pharmaceutical Sciences*, 10, 84-93.
- Al-dhaher Z.A. (2008) The Antibacterial Activity of Aqueous Extract of Cinnamon and Clove Against *Staphylococcus aureus*, *Journal of Al-Nahrain University*, 11, 131-135.
- Alexandru L., Cravotto G., Giordana L., Binello A., Chemat F. (2013) Ultrasound-Assisted Extraction of Clove Buds Using Batch- and Flow-Reactors: A Comparative Study on a Pilot Scale, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 20, 167-172.
- AL-Hassani S.T.S., Woodcock E., Saoud R. (2007) 1001 Inventions: Muslim Heritage In Our World, Foundation for Science, Technology and Civilisation, UK.
- Ali B.H., Blunden G., Tanira M.O., Nemmar A. (2008) Some Phytochemical, Pharmacological and Toxicological Properties of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A Review of Recent Research, *Food and Chemical Toxicology*, 46, 409-420.
- Ali-Shtayeh M.S., Jamous R.M., Jamous R.M. (2012) Complementary and Alternative Medicine Use Amongst Palestinian Diabetic Patients, *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 18, 16-21.
- Amir M., Khan A., Mujeeb M., Ahmad A., Usmani S., Akhtar M. (2011) Phytochemical Analysis and *In vitro* Antioxidant Activity of *Zingiber officinale*, *Free Radicals and Antioxidants*, 1, 75-81.
- An N., Zou Z.-m., Tian Z., Luo X.-z., Yang S.-l., Xu L.-z. (2008) Diarylheptanoids from the Rhizomes of *Alpinia officinarum* and Their Anticancer Activity, *Fitoterapia*, 79, 27-31.

- Ansari M., Sharififar F., Kazemipour M., Sarhadinejad Z., Mahdavi H. (2013) *Teucrium polium* L. Extract Adsorbed on Zinc Oxide Nanoparticles as a Fortified Sunscreen, *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 3, 188-193.
- Arzi A., Sarkaki A., Saeed Najad S., Nazari Z., Aghel N. (2011) Analgesic Effect of Hydroalcoholic Extract of *Cinnamomum Zeylanicum* In Rat by Formalin Test, *Toxicology Letters*, 205S, S83.
- Azab K.S., Mostafa A.-M. A., Ali E.M.M., Abdel-Aziz M.A.S. (2011) Cinnamon Extract Ameliorates Ionizing Radiation-Induced Cellular Injury In Rats, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 2324-2329.
- Azmir J., Zaidul I.S.M., Rahman M.M., Sharif K.M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M.H.A., Ghafoor K., Norulaini N.A.N., Omar A.K.M. (2013) Techniques for Extraction of Bioactive Compounds from Plant Materials: A Review, *Journal of Food Engineering*, 117, 426-436.

B

- Baba-Aïssa F. (2000), *Encyclopédie des Plantes Utiles, Flore d'Algérie et du Maghreb, Substances Végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident*. EDAS Algérie.
- Banerjee S., Kr.Panda C., Das S. (2006) Clove (*Syzygium aromaticum* L.), A Potential Chemopreventive Agent for Lung Cancer, *Carcinogenesis*, 27, 1645-1654.
- Bégin D., Gérin M. (2002) Les Grandes Familles de Solvants Organiques, Utilisation et Aspects Physico-Chimiques. *In: Gérin M. (Ed) Solvants industriels: Santé, Sécurité, Substitution*. Masson, Paris. p13-38.
- Bellik Y. (2014) Total Antioxidant Activity and Antimicrobial Potency of the Essential Oil and Oleoresin of *Zingiber officinale* Roscoe, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4, 40-44.
- Benaïssi K. (2013) *Le CO₂ Supercritique Appliqué à l'Extraction Végétale (CHV4015)*. Editions Techniques de l'Ingénieur, Paris, France.
- Benamor B. (2008) *Maitrise de l'Aptitude Technologique de la Matière Végétale dans les Opérations d'Extraction de Principes Actifs; Texturation par Détente Instantanée Contrôlée DIC*. Thèse de Doctorat, Université de La Rochelle, France.
- Benjilali B., Tantaoui-Elaraki A., Ismaïl-Alaoui M., Ayadi A. (1986) Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes médicinales et phytothérapie*. 20,155-167.
- Benzeggouta N. (2005) *Etude de l'Activité Antibactérienne des Huiles Infusées de Quatre Plantes Médicinales Connues Comme Aliments*. Mémoire de Magister, Université Mentouri-Constantine.

- Benzeggouta N. (2010) Chimie Verte dans le Coran et la Sounna, Revue de la Radio du Coran, 18, 75-78. (Article en Arabe)
- Benzeggouta N. (2012) From Ethnopharmacology to Green Chemistry: Olive Oil as Solvent, International Journal of Drug Research and Technology, 2, 388-392.
- Benzeggouta N., Semra Z., Kabouche Z. (2009) Utilisation de l'Huile Végétale et de l'Eau Comme Solvants d'Extraction des Principes Actifs de Plantes Médicinales Ayant une Activité Antibactérienne, 1^e Séminaire International Chimie Verte et Développement Durable 'CVDD 2009', Mostaganem 15-17 Décembre.
- Bermúdez-Aguirre D., Barbosa-Cánovas G.V. (2011) Power Ultrasound to Process Dairy Products. In: Feng H., Barbosa-Cánovas G.V., Weiss J. (Eds.) Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing. Springer. p445-465.
- Bewley J.D. (1997) Seed Germination and Dormancy, The Plant Cell, 9, 1055-1066.
- Bhadoria P.B.S. (2011) Allelopathy: A Natural Way towards Weed Management, American Journal of Experimental Agriculture, 1, 7-20.
- Bitencourt R.G., Queiroga C.L., Montanari Junior I. (2014) Fractionated Extraction of Saponins from Brazilian Ginseng by Sequential Process Using Supercritical CO₂, Ethanol and Water, The Journal of Supercritical Fluids, 92, 272-281.
- Bonjar G.H.S. (2004) Antibacterial Screening of Plants Used in Iranian Folkloric Medicine, Fitoterapia, 75, 231-235.
- Borrelli F., Capasso R., Pinto A., Izzo A.A. (2004) Inhibitory Effect of Ginger (*Zingiber officinale*) on Rat Ileal Motility *In vitro*, Life Sciences, 74, 2889-2896.
- Both S., Chemat F., Strube J. (2014) Extraction of Polyphenols from Black Tea - Conventional and Ultrasound Assisted Extraction, Ultrasonics Sonochemistry, 21, 1030-1034.
- Braga M.E.M., Moreschi S.R.M., Meireles M.A.A. (2006) Effects of Supercritical Fluid Extraction on *Curcuma longa* L. and *Zingiber officinale* R. Starches, Carbohydrate Polymers, 63, 340-346.
- Bray L. (2010) Interactions Végétales: la Guerre Biologique est Déclarée. (www.botanique.org le 5-Août-2014)
- Breslow R. (2010) The Principles of and Reasons for Using Water as a Solvent for Green Chemistry. In: Li C.-J. (Ed) Handbook of Green Chemistry, Volume 5: Reactions in Water. WILEY-VCH.
- Brown A.C., Shah C., Liu J., Pham J.T.H., Zhang J.G., Jadus M.R. (2009) Ginger's (*Zingiber officinale* Roscoe) Inhibition of Rat Colonic Adenocarcinoma Cells Proliferation and Angiogenesis *In Vitro*, Phytotherapy Research, 23, 640-645.
- Bruneton J. (1999) Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentations Lavoisier.

- Burgot G., Burgot J.-L. (2006) Méthodes Instrumentales D'analyse Chimique et Applications. Méthodes Chromatographiques, Electrophorèses et Méthodes Spectrales. Editions Tec & Doc, E.M. Inter. p 223.

C

- Chang J.S., Wang K.C., Yeh C.F., Shieh D.E., Chiang L.C. (2013) Fresh Ginger (*Zingiber officinale*) has Anti-viral Activity Against Human Respiratory Syncytial Virus in Human Respiratory Tact Cell Lines, Journal of Ethnopharmacology, 145, 146-151.

- Chemat F., Huma Z.E., Khan M.K. (2011) Applications of Ultrasound in Food Technology: Processing, Preservation and Extraction, Ultrasonics Sonochemistry, 18, 813-835.

- Chevallier A. (2001) Encyclopédie des plantes médicinales. Larousse. pp: 61, 293.

- Clifford A.A. (2002) Extraction of Natural Products with Superheated Water. In: Clark J., Macquarrie D. (Eds) Handbook of Green Chemistry and Technology. Blackwell Science Ltd. p524-531.

- Clifford A.A., Basile A., Al-Saidi S.H.R. (1999) A Comparison of the Extraction of Clove Buds with Supercritical Carbon Dioxide and Superheated Water, Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 364, 635-637.

- Cornu D., Boulay M. (1986) La Multiplication Végétative, Techniques Horticoles et Culture *In Vitro*, Revue Forestière Française, Spécial Amélioration Génétique, 60-68.

- Cushnie T.P.T., Lamb A.J. (2006) Assessment of the Antibacterial Activity of Galangin against 4-Quinolone Resistant Strains of *Staphylococcus aureus*, Phytomedicine, 13, 187-191.

D

- Dahmoune F., Nayak B., Moussi K., Remini H., Madani K. (2015) Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves, Food Chemistry, 166, 585-595.

- Dayan F.E., Cantrell C.L., Duke S.O. (2009) Natural Products in Crop Protection, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 17, 4022-4034.

- Dedet J.-P. (2007) La Microbiologie, de ses Origines aux Maladies Emergentes. Dunod, Paris.

- Doble M., Kruthiventi A.K. (2007) Green Chemistry and Processes. Academic Press, Elsevier. p3-5.

- Dohou N., Yamni K., Tahrouch S., Idrissi Hassani L.M., Badoc A., Gmira N. (2003) Screening phytochimique d'une endémique Ibéro-Marocaine, *Thymelaea lythroides*. Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux, 142, 61-78.

- Draye M., Estager J., Malacria M., Goddard J.-P., Ollivier C. (2009) *Sonochimie Organique* (K1250). Editions Techniques de l'Ingénieur, France.
- Dudai N., Poljacoff-Mayber A., Mayer A.M., Putievsky E., Lerner H.R. (1999) Essential Oils as Allelochemicals and their Potential Use as Bioherbicides, *Journal of Chemical Ecology*, 25, 1079-1089.
- Dugasani S., Pichika M.R., Nadarajah V.D., Balijepalli M.K., Tandraa S., Korlakunta J.N. (2010) Comparative Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of [6]-Gingerol, [8]-Gingerol, [10]-Gingerol and [6]-Shogaol, *Journal of Ethnopharmacology*, 127-515-520.

E

- Eberlin T. (1997) *Les Infections Microbiennes, Tome1: Agents Infectieux*. Nathan Université, Paris.
- El-Olemy M.M., Al-Muhtadi F.J., Afifi A.A. (1994) *Experimental Phytochemistry. A Laboratory Manual*. King Saud University Press, Riyadh, Saudi Arabia.
- Emamghoreishi M., Ghasemi F. (2011) Antidepressant Effect of Aqueous and Hydroalcoholic Extracts of *Cinnamon zeylanicum* in the Forced Swimming Test, *Asian Journal of Psychiatry*, 4S1, S44.
- Evans W.C. (2002) *Trease and Evans Pharmacognosy*. Saunders, Edinburgh, UK. p137, 138.
- Eumkeb G., Sakdarat S., Siriwong S. (2010) Reversing β -lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with Galangin from *Alpinia officinarum* Hance and Synergism with Ceftazidime, *Phytomedicine*, 18, 40-45.
- Expertise Collective (2013) *Pesticides, Effets sur la Santé*. Inserm, Paris.

F

- Faivre Cl., Lejeune L., Staub H., Goetz P. (2006) *Zingiber officinale* Roscoe, *Phytothérapie*, 2, 99-102.
- Fan G.-J., Kang Y.-H., Han Y.N., Han B.H. (2007) Platelet-Activating Factor (PAF) Receptor Binding Antagonists From *Alpinia officinarum*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17, 6720-6722.
- Fayemiwo K.A., Adeleke M.A., Okoro O.P., Awojide S.H., Awoniyi I.O. (2014) Larvicidal Efficacies and Chemical Composition of Essential Oils of *Pinus sylvestris* and *Syzygium aromaticum* Against Mosquitoes, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4, 30-34.
- Ferhat M.A., Meklati B. Y., Chemat F. (2010) *Citrus d'Algérie, Les Huiles Essentielles et leurs Procédés d'Extractions*. O.P.U. Algérie.

- Fleurentin J. (2012) L'Ethnopharmacologie au Service de la Thérapeutique: Sources et Méthodes, Hegel, 2, 12-18.
- Fouda A.-M.M., Berika M.Y. (2009) Evaluation of the Effect of Hydroalcoholic Extract of *Zingiber officinale* Rhizomes in Rat Collagen-induced Arthritis, Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 104, 262-271.
- Fratini F., Casella S., Leonardi M., Pisseri F, Ebani V.V., Pistelli L., Pistelli L. (2014) Antibacterial Activity of Essential Oils, Their Blends and Mixtures of Their Main Constituents Against Some Strains Supporting Livestock Mastitis, Fitoterapia, 96, 1-7.
- Fukuda K. (2014) Premier Rapport de l'OMS sur la Résistance aux Antibiotiques: Une Menace Grave d'Ampleur Mondiale. Organisation Mondiale de la Santé (www.who.int).

G

- Gallet C., Pellissier F. (2002) Interactions Allélopathiques en Milieu Forestier, Revue Forestière Française, 6, 567-576.
- Ganzler K., Salgo A., Valko K. (1986) Microwave extraction. A novel sample preparation method for chromatography, Journal of Chromatography, 371, 299-306
- Gedye R.N., Smith F.E., Westaway K.C., Ali H., Baldisera L., Laberge L., Roussel J. (1986) The use of microwave ovens for rapid organic synthesis, Tetrahedron Letters, 27, 279-282.
- Gérin M. (2002) Solvants et Prévention : Nouvelles Perspectives. In: Gérin M. (Ed) Solvants industriels: Santé, Sécurité, Substitution. Masson, Paris. p1-12.
- Ghasemzadeh A., Jaafar H.Z.E., Rahmat A. (2010) Elevated Carbon Dioxide Increases Contents of Flavonoids and Phenolic Compounds, and Antioxidant Activities in Malaysian Young Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe.) Varieties, Molecules, 15, 7907-7922.
- Ghedira K., Goetz P., Le Jeune R. (2010) *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (*Myrtaceae*) Giroflier, Phytothérapie, 8, 37-43.
- Gigon F. (2012) Le Gingembre, Une Epice Contre la Nausée, Phytothérapie, 10, 87-91.
- Giguere R.J., Bray T.L., Duncan S.M., Majetich G. (1986) Application of commercial microwave ovens to organic synthesis, Tetrahedron Letters, 27, 4945-4948.
- Goetz P. (2004) Plaidoyer pour la tisane médicinale, Phytothérapie, 1, 8-15.
- Goetz P., Busser C. (2007) La Phytocosmétologie Thérapeutique. Springer-Verlag France, Paris. p53-54.
- Gogus F., Ozel M.Z., Lewis A.C. (2006) Extraction of essential oils of leaves and flowers of *Achillea monocephala* by superheated water, Flavour and Fragrance Journal, 21, 122-128.
- Goodwin H. (1925) Autoclaves and High Pressure Work. London: Ernest Benn Ltd.

- Goula A.M. (2013) Ultrasound-Assisted Extraction of Pomegranate Seed Oil – Kinetic Modeling, *Journal of Food Engineering*, 117, 492-498.
- Groupe d'Experts (2005) Guide Technique pour l'Elaboration des Monographies, Pharmacopée Européenne, Direction Européenne de la Qualité du Médicament, 4^e Edition. p17.
- Groupe d'Experts (2011) Plan Mondial de Maîtrise de la Résistance à l'Artémisinine (GPARC), Résumé d'Orientation. Organisation Mondiale de la Santé, Genève.
- Groupe d'Experts (2013) Directives Pour la Prévention et la Gestion de la Résistance aux Pesticides. L'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture, FAO.
- Gülçin I., Elmastas M., Aboul-Enin H.Y. (2012) Antioxidant Activity of Clove Oil – A Powerful Antioxidant Source, *Arabian Journal of Chemistry*, 5, 489-499.
- Guynot M.E., Marin S., Seto L., Sanchis V., Ramos A.J. (2005) Screening for Antifungal Activity of Some Essential Oils Against Common Spoilage Fungi of Bakery Products, *Food Science and Technology International*, 11, 25-32.

H

- Ha S.K., Moon E., Ju M.S., Kim D.H., Ryu J.H., Oh M.S., Kim S.Y. (2012) 6-Shogaol, A Ginger Product, Modulates Neuroinflammation: A New Approach to Neuroprotection, *Neuropharmacology*, 63, 211-223.
- Han C.-M., Pan K.-W., Wu N., Wang J.-C., Li W. (2008) Allelopathic Effect of Ginger on Seed Germination and Seedling Growth of Soybean and Chive, *Scientia Horticulturae*, 116, 330-336.
- Handa S.S. (2008) An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants. *In*: Handa S.S., Khanuja S.P.S., Longo G., Rakesh D.D. (Eds) *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. International Centre For Science and High Technology, Trieste, Italy. p 21-54.
- Haniadka R., Saxena A., Shivashankara A.R., Fayad R., Palatty P.L., Nazreth N., Francis A., Arora R., Baliga M.S. (2013) Ginger Protects the Liver against the Toxic Effects of Xenobiotic Compounds: Preclinical Observations, *Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3, 226.
- Hannay J.B., Hogarth J. (1880) On the Solubility of Solids in Gases. *Proceedings of the Royal Society of London*, 30, 178-188.
- Hempen C.H., Fisher T. (2009) *A Materia Medica for Chinese Medicine: Plants, Minerals and Animal Products*. Churchill and Livingstone Elsevier. pp 390.
- Hiserodt R.D., Franzblau S.G., Rosen R.T. (1998) Isolation of 6-, 8-, and 10-Gingerol from Ginger Rhizome by HPLC and Preliminary Evaluation of Inhibition of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2504-2508.

- Houghton P., Fang R., Techatanawat I., Steventon G., Hylands P.J., Lee C.C. (2007) The Sulphorhodamine (SRB) Assay and Other Approaches to Testing Plant Extracts and Derived Compounds for Activities Related to Reputed Anticancer Activity, *Methods*, 42, 377-387.

- Hussein G., Miyashiro H., Nakamura N., Hattori M., Kakiuchi N., Shimotohno K. (2000) Inhibitory Effects of Sudanese Medicinal Plant Extracts on Hepatitis C Virus (HCV) Protease, *Phytotherapy Research*, 14, 510-516.

I

- Ibn Qay'em El-Jozeyah (2003) *The Prophetic Medicine*, Dar Al-Ghadd Al-Gadeed, Egypt, Al-Mansoura.

- Inderjit, Keating K.I. (1999) Allelopathy: Principles, Procedures, Processes and Promises for Biological Control, *Advances in Agronomy*, 67, 141-231.

- Iqbal Z., Lateef M., Akhtar M.S., Ghayur M.N., Gilani A.H. (2006) *In vivo* Anthelmintic Activity of Ginger Against Gastrointestinal Nematodes of Sheep, *Journal of Ethnopharmacology*, 106, 285-287.

- Isenring R. (2010) *Les Pesticides et la Perte de Biodiversité*. Pesticide Action Network Europe, Belgique.

- Ivanovic J., Dimitrijevic-Brankovic S., Misic D., Ristic M., Zizovic I. (2013) Evaluation and Improvement of Antioxidant and Antibacterial Activities of Supercritical Extracts From Clove Buds, *Journal of Functional Foods*, 5, 416-423.

J

- Jayawardena B., Smith R.M. (2010) Superheated Water Extraction of Essential Oils from *Cinnamomum zeylanicum* (L.), *Phytochemical Analysis*, 21, 470-472.

- Juntachote T., Berghofer E. (2005) Antioxidative Properties and Stability of Ethanolic Extracts of Holy basil and Galangal, *Food Chemistry*, 92, 193-202.

K

- Kamatou G.P., Vermaak I., Viljoen A.M. (2012) Eugenol—From the Remote Maluku Islands to the International Market Place: A Review of a Remarkable and Versatile Molecule, *Molecules*, 17, 6935-6981.

- Kandhare A.D., Bodhankar S.L., Singh V., Mohan V., Thakurdesai P.A. (2013) Anti-Asthmatic Effects of Type-A Procyanidine Polyphenols From Cinnamon Bark in Ovalbumin-Induced Airway Hyperresponsiveness In Laboratory Animals, *Biomedicine & Aging Pathology*, 3, 23-30.

- Kardong D., Upadhyaya S., Saikia L.R. (2013) Screening of phytochemicals, antioxidant and antibacterial activity of crude extract of *Pteridium aquilinum* Kuhn, Journal of Pharmacy Research, 6, 179-182.
- Khan M.S.A., Ahmad I. (2011) *In Vitro* Antifungal, Anti-Elastase and Anti-Keratinase Activity of Essential Oils of *Cinnamomum*-, *Syzygium*- and *Cymbopogon*-Species Against *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*, Phytomedicine, 19, 48-55.
- Khan M.T.H., Ather A., Thompson K.D., Gambari R. (2005) Extracts and Molecules From Medicinal Plants Against Herpes Simplex Viruses, Antiviral Research, 67, 107-119.
- Kiuchi F., Iwakami S., Shibuya M., Hanaoka F., Sankawa U. (1992) Inhibition of Prostaglandin and Leukotriene Biosynthesis by Gingerols and Diarylheptanoids, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 40, 387-391.
- Kloucek P., Smid J., Frankova A, Kokoska L., Valterova I., Pavela R. (2012) Fast Screening Method for Assessment of Antimicrobial Activity of Essential Oils in Vapor Phase, Food Research International, 47, 161-165.
- Kraft K., Hobbs C. (2004) Pocket Guide to Herbal Medicine. Thieme, Stuttgart, New York. p16.
- Kumar U., Kumar B., Bhandari A., Kumar Y. (2010) Phytochemical investigation and comparison of antimicrobial screening of clove and cardamom. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 1, 138-147.
- Kurokawa M., Hozumi T., Basnet P., Nakano M., Kadota S., Namba T., Kawana T., Shiraki K. (1998) Purification and Characterization of Eugeniiin as an Antiherpesvirus Compound from *Geum japonicum* and *Syzygium aromaticum*, The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 284, 728-735.

L

- Lancaster M. (2002) Green Chemistry: An Introductory Text. The Royal Society of Chemistry. p225, 226.
- Lee C.C., Houghton P. (2005) Cytotoxicity of Plants From Malaysia and Thailand Used Traditionally to Treat Cancer, Journal of Ethnopharmacology, 100, 237-243.
- Lee H.S., Kim S.-S., Kim G.J., Lee J.-s., Kim E.-J., Hong K.J. (2008) Antiviral Effect of Ingenol and Gingerol During HIV-1 Replication in MT4 Human T Lymphocytes, Antiviral Research, 78, A44.
- Leone A., Tamborrino A., Romaniello R., Zagaria R., Sabella E. (2014) Specification and Implementation of a Continuous Microwave-Assisted System for Paste Malaxation in an Olive Oil Extraction Plant, Biosystems Engineering, 125, 24-35.

- Leonelli C., Veronesi P., Cravotto G. (2013) Microwave-Assisted Extraction: An Introduction to Dielectric Heating. *In*: Chemat F., Cravotto G. (Eds.), *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice*. Springer. p1-14.
- Leung A. Y. (1980) *Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetics*. Wiley-Interscience Publication New York.
- Li Y., Fabiano-Tixier A.S., Abert Vian M., Chemat F. (2013) Solvent-Free Microwave Extraction of Bioactive Compounds Provides a Tool for Green Analytical Chemistry, *Trends in Analytical Chemistry*, 47, 1-11.
- Liu H., Qiu N., Ding H., Yao R. (2008) Polyphenols Contents and Antioxidant Capacity of 68 Chinese Herbals Suitable for Medical or Food Uses, *Food Research International*, 41, 363-370.
- Lloyd N.C., Morgan H.W, Nicholson B.K., Ronimus R.S. (2005) The Composition of Ehrlich's Salvarsan: Resolution of a Century-Old Debate, *Angewandte Chemie International Edition*, 44, 941-944.
- Luo J., Rui W., Jiang M., Tian Q., Ji X., Feng Y. (2010) Separation and Identification of Diarylheptanoids in Supercritical Fluid Extract of *Alpinia Officinarum* by UPLC–MS–MS, *Journal of Chromatographic Science*, 48, 795-801.
- Luque-Rodriguez J.M., Pérez-Juan P, Luque de Castro M.D. (2006) Extraction of Polyphenols from Vine Shoots of *Vitis vinifera* by Superheated Ethanol-Water Mixtures, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8775-8781.
- Ly T.N., Shimoyamada M., Kato K., Yamauchi R. (2003) Isolation and Characterisation of some Antioxidative Compounds From the Rhizome of Smaller Galanga (*Alpinia officinarum* Hance), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4924-4929.
- Ly T.N., Shimoyamada M., Kato K., Yamauchi R. (2004) Antioxidative Compounds Isolated From the Rhizomes of Smaller Galanga (*Alpinia officinarum* Hance), *BioFactors*, 21, 305-308.
- Ly T.N., Yamauchi R., Kato K. (2001) Volatile Components of the Essential Oils in Galanga (*Alpinia officinarum* Hance) from Vietnam, *Food Science and Technology Research*, 7, 303-306.

M

- Ma J., Jin X., Yang L., Liu Z.-L. (2004) Diarylheptanoids From the Rhizomes of *Zingiber officinale*, *Phytochemistry*, 65, 1137-1143.
- Marongiu B., Piras A., Porcedda S., Tuveri E., Sanjust E., Meli M., Sollai F., Zucca P., Rescigno A. (2007) Supercritical CO₂ Extract of *Cinnamomum zeylanicum*: Chemical Characterization and Antityrosinase Activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10022-10027.

- Martins A.P., Salgueiro L., Gonçalves M.J., Proença da Cunha A., Vila R., Cañigüeral S., Mazzoni V., Tomi F., Casanova J. (2001) Essential Oil Composition and Antimicrobial Activity of Three *Zingiberaceae* from S.Tomé e Príncipe, *Planta Medica*, 67, 580-584.
- Matsuda H., Ando S., Kato T., Morikawa T., Yoshikawa M. (2006) Inhibitors From the Rhizome of *Alpinia officinarum* on Production of Nitric Oxide in Lipopolysaccharide-Activated Macrophages and the Structural Requirements of Diarylheptanoids for the Activity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 138-142.
- Mayaud L., Carricajo A., Zhiri A., Aubert G. (2008) Comparison of Bacteriostatic and Bactericidal Activity of 13 Essential Oils Against Strains With Varying Sensitivity to Antibiotics, *Letters in Applied Microbiology*, 47, 167-173.
- Mesomo M.C., Corazza M.L., Ndiaye P.M., Dalla Santa O.R., Cardozoc L., Scheer A.P. (2013) Supercritical CO₂ Extracts and Essential Oil of Ginger (*Zingiber officinale* R.): Chemical Composition and Antibacterial Activity, *The Journal of Supercritical Fluids*, 80, 44-49.
- Mesplède J., Randon J. (2004) 100 Manipulations de Chimie Générale et Analytique. Bréal Editions.

O

- Ody P. (1995) Les Planes Médicinales, *Encyclopédie Pratique. Sélection Reader's Digest*. p115.
- Ojaghian M.R., Wang L., Cui Z.q., Yang C., Zhongyun T., Xie G.-L. (2014) Antifungal and SAR Potential of Crude Extracts Derived From Neem and Ginger Against Storage Carrot Rot Caused by *Sclerotinia sclerotiorum*, *Industrial Crops and Products*, 55, 130-139.
- O.M.S. (2014) Résistance aux antimicrobiens, Centre des Médias, Aide-mémoire N°194. Organisation Mondiale de la Santé (www.who.int).

P

- Pancharoen O., Prawat U., Tuntiwachwuttikul P. (2000) Phytochemistry of The *Zingiberaceae*. In: Atta-ur-Rahman (Ed) *Studies in Natural Products Chemistry, Volume 23, Bioactive Natural Products (Part D)*, Elsevier. pp 797-865.
- Pangarkar V.G. (2008) Microdistillation, Thermomicrodistillation and Molecular Distillation Techniques. In: Handa S.S., Khanuja S.P.S., Longo G., Rakesh D.D. (Eds) *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. International Centre For Science and High Technology, Trieste, Italy. p 129-143.
- Panzer S., Peschel O., Haas-Gebhard B., Bachmeier B.E., Pusch C.M., Nerlich A.G. (2014) Reconstructing the Life of an Unknown (ca. 500 Years-Old South American Inca) Mummy- Multidisciplinary Study of a Peruvian Inca Mummy Suggests Severe Chagas Disease and Ritual Homicide, *PLoS ONE* 9(2): e89528. doi:10.1371/journal.pone.0089528 (in press).

- Park J., Ernst E. (2005) Ayurvedic Medicine for Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review, *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 34, 705-713.
- Park M., Bae J., Lee D.-S. (2008) Antibacterial Activity of [10]-Gingerol and [12]-Gingerol isolated from Ginger Rhizome Against Periodontal Bacteria, *Phytotherapy Research*, 22, 1446-1449.
- Penchev P.I. (2010) Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse, France.
- Peng F., Tao Q., Wu X., Dou H., Spencer S., Mang C., Xu L., Sun L., Zhao Y., Li H., Zeng S., Liu G., Hao X. (2012) Cytotoxic, Cytoprotective and Antioxidant Effects of Isolated Phenolic Compounds From Fresh Ginger, *Fitoterapia*, 83, 568-585.
- Penrose C. B. (1884) The Critical State of Gases. *Science*, 3, 98-99.
- Pétrier C., Gondrexon N., Boldo P. (2008) *Ultrasons et Sonochimie (AF6310)*. Editions Techniques de l'Ingénieur, France.
- Pisano M., Pagnan G., Loi M., Mura M.E., Tilocca M.G., Palmieri G., Fabbri D., Dettori M.A., Delogu G., Ponzoni M., Rozzo C. (2007) Antiproliferative and Pro-Apoptotic Activity of Eugenol-Related Biphenyls on Malignant Melanoma Cells, *Molecular Cancer*, 6, 8.
- Pripdeevech P., Nuntawong N., Wongpornchai S. (2009) Composition of Essential Oils From the Rhizomes of Three *Alpina* Species Grown in Thailand, *Chemistry of Natural Compounds*, 45, 562-564.

R

- Rafatullah S., Alqasoumi S., Al-Dosary M., Al-Yahya M., Al-Mofleh I. (2011) Gastroprotective Effect of a Popular Spice Cinnamon "*Cinnamomum zeylanicum*" In Rats, *European Journal of Pharmacology*, 668, S.1, e42.
- Rahal K., et un groupe de collaborateurs (2003) Standardisation de l'Antibiogramme en Médecine Humaine à l'Echelle Nationale Selon les recommandations de l'OMS, 3^e Edition.
- Ravindran P. N., Balachandran I. (2006) Galangal. *In*: Peter K.V. (Ed) *Handbook of Herbs and Spices*, Volume 3. Woodhead Publishing Limited and CRC Press, Cambridge, England. p362.
- Ray P.G., Majumdar S.K. (1976) Antimicrobial Activity of Some Indian Plants, *Economic Botany*, 30, 317-320.
- Richard H. (1974) Quelques épices et aromates et leurs huiles essentielles. *In* *Actualités scientifiques et techniques en industries agro-alimentaires*. Ialine Agorial – Normandie St-LÖ.
- Richard H., Loo A. (1992) Nature, origine et propriétés des épices et aromates bruts. *In* Richard H (Coordonnateur) *Epice et Aromates*. Tec et Doc - Lavoisier, Apria.

- Riotte L. (2010) Les Tomates Aiment les Carottes, Les Secrets du Bon Voisinage des Plantes dans Votre Jardin. Edisud.
- Roberts A.L., Lyall K., Hart J.E., Laden F., Just A.C., Bobb J.F., Koenen K.C., Ascherio A., Weisskopf M.G. (2013) Perinatal Air Pollutant Exposures and Autism Spectrum Disorder in the Children of Nurses' Health Study II Participants, *Environmental Health Perspectives*, 121, 978-984.
- Rouessac F., Rouessac A., Cruché D. (2004) *Analyse Chimique, Méthodes et Techniques Instrumentales Modernes*. Dunod, Paris. p141.
- Rovio S., Hartonen K., Holm Y., Hiltunen R., Riekkola M.-L. (1999) Extraction of Clove Using Pressurized Hot Water, *Flavour and Fragrance Journal*, 14, 399-404.
- Rsaissi N., Bouhache M., Bencharki B. (2013) Potentiel Allélopathique du Figuier de Barbarie «*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill» sur la Germination et la Croissance du Jujubier «*Ziziphus lotus* (L.) Desf.», *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 3, 205-214.

S

- Sawamura R., Shimizu T., Sun Y., Yasukawa K., Miura M., Toriyama M., Motohashi S., Watanabe W., Konno K., Kurokawa M. (2010a) *In vitro* and *in vivo* anti-influenza virus activity of diarylheptanoids isolated from *Alpinia officinarum*, *Antiviral Chemistry Et Chemotherapy*, 21, 33-41.
- Sawamura R., Sun Y., Yasukawa K., Shimizu T., Watanabe W., Kurokawa M. (2010b) Antiviral Activities of Diarylheptanoids Against Influenza Virus *In Vitro*, *Journal of Natural Medicine*, 64, 117-120.
- Scherrmann M.-C., Malacria M., Goddard J.-P., Ollivier C. (2008) *Chimie dans l'Eau* (K1210). Editions Techniques de l'Ingénieur, Paris, France.
- Schnitzler P., Koch C., Reichling J. (2007) Susceptibility of Drug-Resistant Clinical Herpes Simplex Virus Type 1 Strains to Essential Oils of Ginger, Thyme, Hyssop, and Sandalwood, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007, 51, 1859-1862.
- Schoene N.W., Kelly M.A., Polansky M.M., Anderson R.A. (2009) A Polyphenol Mixture From Cinnamon Targets p38 MAP Kinase-Regulated Signaling Pathways to Produce G2/M Arrest, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20, 614-620.
- Schulz E., Bezzanine S., Mellah M., Thanh G.V. (2008) Qu'elle est Verte ma Chimie ! Plein Sud, *Spécial Recherche*, 72, 80-89.
- Scopel R., Falcão M.A., Lucas A.M., Almeida R.N., Gandolfi P.H.K., Cassel E., Vargas R.M.F. (2014) Supercritical Fluid Extraction from *Syzygium aromaticum* Buds: Phase Equilibrium, Mathematical Modeling and Antimicrobial Activity, *The Journal of Supercritical Fluids*, 92, 223-230.

- Senhaji O., Faid M., Elyachioui M., Dehhaoui M. (2005) Etude de l'activité antifongique de divers extraits de cannelle. *Journal de Mycologie Médicale*, 15, 220-229.
- Shahidi F., Naczki M. (2004) *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. CRC Press. p 500.
- Shakeel A.J. (1999) L'Industrie du Parfum dans la Civilisation Islamique, *Afaq Magazine*, 25/26, 153-167. (Article en Arabe)
- Shan B., Cai Y.Z., Sun M., Corke H. (2005) Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7749-7759.
- Sharma C., Ahmed T., Sasidharan S., Ahmed M., Hussain A. (2009) Use of Gemcitabine and Ginger Extract Infusion May Improve the Efficiency of Cervical Cancer Treatment, *African Journal of Biotechnology*, 8, 7087-7093.
- Shenoy P.A., Khot S.S., Chavan M.C., Takawale J.V., Singh S. (2010) Study of Sunscreen Activity of Aqueous, Methanol and Acetone Extracts of Leaves of *Pongamia pinnata* (L.) Pierre, *Fabaceae*, *International Journal of Green Pharmacy*, 4, 270-274.
- Shin D., Kinoshita K., Koyama K., Takahashi K. (2002) Antiemetic Principles of *Alpinia officinarum*, *Journal of Natural Products*, 65, 1315-1318.
- Shin J.-E., Han M.J., Kim D.-H. (2003) 3-Methylethergalangin Isolated from *Alpinia officinarum* Inhibits Pancreatic Lipase, *Biological and Pharmacological Bulletin*, 26, 854-857.
- Shin J.-E., Han M.J., Song M.-C., Beak N.-I., Kim D.-H. (2004) 5-Hydroxy-7-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-1-phenyl-3-heptanone: A Pancreatic Lipase Inhibitor Isolated From *Alpinia officinarum*, *Biological and Pharmacological Bulletin*, 27, 138-140.
- Shukri R., Mohamed S., Mustapha N.M. (2010) Cloves Protect the Heart, Liver and Lens of Diabetic Rats, *Food Chemistry*, 122, 1116-1121.
- Singh G., Maurya S., deLampasona M.P., Catalan C.A.N. (2007) A Comparison of Chemical, Antioxidant and Antimicrobial Studies of Cinnamon Leaf and Bark Volatile Oils, Oleoresins and Their Constituents, *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1650-1661.
- Singh Saroya A. (2011) *Herbalism, Phytochemistry and Ethnopharmacology*. Science Publisher, USA.
- Smith R.M. (2002) Extraction with Superheated Water, *Journal of Chromatography A*, 975, 31-46.
- Smith R.M. (2008) Superheated Water Chromatography – A Green Technology for the Future, *Journal of Chromatography A*, 1184, 441-455
- Sodaeizadeh H., Hosseini Z. (2012) Allelopathy an Environmentally Friendly Method for Weed Control. *In: International Conference on Applied Life Sciences (ICALS2012)*, Turkey, September 10-12, 2012, 387-392.

- Soltys D., Krasuska U., Bogatek R., Gniazdowska A. (2013) Allelochemicals as Bioherbicides – Present and Perspectives. *In: Price A.J., Kelton J.A. (Eds) Herbicides - Current Research and Case Studies in Use. InTech Publisher. p517-542.*
- Stanisavljevic I., Stojicevic S., Velickovic D., Veljovic V., Lazic M. (2009) Antioxidant and Antimicrobial Activities of Echinacea (*Echinacea purpurea* L.) Extracts Obtained by Classical and Ultrasound Extraction, *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 17, 478-483.
- Subash Babu P., Prabuseenivasan S., Ignacimuthu S. (2007) Cinnamaldehyde – A Potential Antidiabetic Agent, *Phytomedicine*, 14, 15–22
- Subramanian K., Selvakkumar C., Meenakshisundaram S., Balakrishnan A., Lakshmi B.S. (2008) Extract of *Alpinia officinarum* Suppresses Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Lipopolysaccharide (LPS) Induced Inflammation in J774 A.1 Macrophages, *Journal of Health Science*, 54, 112-117.
- Sudan R., Bhagat M., Gupta S., Chittrarakha, Devi T. (2013) Comparative Analysis of Cytotoxic and Antioxidant Potential of Edible *Cinnamomum verum* (bark) and *Cinnamomum tamala* (Indian bay leaf), *Free Radicals and Antioxidants*, 3, S70-S73.

T

- Teixeira R.R., Pereira W.L., Costa da Silveira Oliveira A.F., da Silva A.M., de Oliveira A.S., da Silva M.L., da Silva C.C., de Paula S.O. (2014) Natural Products as Source of Potential Dengue Antivirals, *Molecules*, 19, 8151-8176.
- Tworkoski T. (2002) Herbicide Effects of Essential Oils, *Weed Science*, 50, 425-431.

U

- Unlu M., Ergene E, Unlu G.V., Zeytinoglu H.S., Vural N. (2010) Composition, Antimicrobial Activity and *In Vitro* Cytotoxicity of Essential Oil From *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae), *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3274-3280.
- Uz Zaman S., Mirje M.M., Ramabhimaiah S. (2014) Evaluation of the Anti-Ulcerogenic Effect of *Zingiber officinale* (Ginger) Root in Rats, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3, 347-354.

V

- Van Beek T.A., Posthumus M.A., Lelyveld G.P., Phiet H.V., Yen B.T. (1987) Investigation of The Essential oil of Vietnamese Ginger, *Phytochemistry*, 26, 3005-3010.
- Van Wyk B.-E., Wink M. (2004) *Medicinal Plants of The World*. Briza Publication, South Africa. pp 43, 349

- Velho-Pereira R., A Kumar, BN Pandey, KP Mishra, Aarti G Jagtap (2012) Radioprotection by Macerated Extract of *Nigella sativa* in Normal Tissues of Fibrosarcoma Bearing Mice, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74, 403-414.
- Vernon F., Richard H. (1976) Quelques épices et aromates et leurs huiles essentielles Vol. 2. *In Série synthèses bibliographiques N° 10 – Centre de documentation internationale des industries utilisatrices de produits agricoles. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.*
- Vetal S., Bodhankar S.L., Mohan V., Thakurdesai P.A. (2013) Anti-Inflammatory and Anti-Arthritic Activity of Type-A Procyanidine Polyphenols From Bark of *Cinnamomum zeylanicum* In Rats, *Food Science and Human Wellness*, 2, 59-67.
- Viteri Jumbo L.O., Faroni L.R.A., Oliveira E.E., Pimentel M.A., Silva G.N. (2014) Potential Use of Clove and Cinnamon Essential Oils to Control the Bean Weevil, *Acanthoscelides obtectus* Say, *In Small Storage Units, Industrial Crops and Products*, 56, 27-34.

W

- Wang L., Weller C.L. (2006) Recent Advances in Extraction of Nutraceuticals from Plants, *Trends in Food Science and Technology*, 17, 300-312.
- Wang X., Gong G., Yang W., Li Y., Jiang M., Li L. (2013) Antifibrotic activity of galangin, a novel function evaluated in animal liver fibrosis model, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36, 288-295.
- Weir T.L., Park S.-W., Vivanco J.M. (2004) Biochemical and Physiological Mechanisms Mediated by Allelochemicals, *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 472-479.
- www.wikipédia.fr (Accès en Juillet 2014)
- Willis R.J. (2007) *The History of Allelopathy*. Springer. p1, 48.

X

- Xie Z.-S., Xu X.-J., Xie C.-Y., Huang J.-Y., Yang M., Yang D.-P. (2013) Volatile Components of Rhizoma *Alpiniae Officinarum* Using Three Different Extraction Methods Combined With Gas Chromatography–Mass Spectrometry, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 3, 215-220.

Y

- Yadav P.N., Liu Z., Rafi M. (2003) A Diarylheptanoid from Lesser Galangal (*Alpinia officinarum*) Inhibits Proinflammatory Mediators Via Inhibition of Mitogen-Activated Protein Kinase, p44/42, and Transcription Factor Nuclear Factor- κ B, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 305, 925-931.

- Yang Y.-C., Lee H.-S., Lee H.S., Clark L.M., Ahn Y.-J. (2005) Ovicidal and Adulticidal Activities of *Cinnamomum zeylanicum* Bark Essential Oil Compounds and Related Compounds Against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae), International Journal for Parasitology, 35, 1595-1600.

- Yu Y., Wang Z.-M., Wang Y.-T., Li T.-C., Cheng J.-H., Liu Z.-Y., Zhang H.-Q. (2007) Non-polar Solvent Microwave-Assisted Extraction of Volatile Constituents from Dried *Zingiber Officinale* Rosc., Chinese Journal of Chemistry, 25, 346-350.

Z

- Zancan K.C., Marques M.O.M., Petenate A.J., Meireles M.A.A. (2002) Extraction of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) Oleoresin with CO₂ and Co-solvents: A Study of the Antioxidant Action of the Extracts, The Journal of Supercritical Fluids, 24, 57-76.

- Zhang J., Dou J., Zhang S., Liang Q., Meng Q. (2010) Chemical Composition and Antioxidant Properties of the Essential Oil and Methanol Extracts of Rhizoma *Alpinia officinarum* from China *In vitro*, African Journal of Biotechnology, 9, 4414-4421.

- Zhang L., Ravipati A.S., Koyyalamudi S.R., Jeong S.C., Reddy N., Bartlett J., Smith P.T., de la Cruz M., Monteiro M.C., Melguizo A., Jiménez E., Vicente F. (2013) Anti-Fungal and Anti-Bacterial Activities of Ethanol Extracts of Selected Traditional Chinese Medicinal Herbs, Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 6, 673-681.

- Zhou H.-l., Deng Y.-m., Xie Q.-m. (2006) The Modulatory Effects of the Volatile Oil of Ginger on the Cellular Immune Response *In Vitro* and *In Vivo* in Mice, Journal of Ethnopharmacology, 105, 301-305.

- Zhou C.X., Zhang X.Y., Dong X.W., Tao Q.F., Dou H., Zhang R.P., Huang K.X., Li X.K., Chen C.X., Zeng S., Zhao Y. (2007) Three New Diarylheptanoids and Their Antioxidant Property, Chinese Chemical Letters, 18, 1243-1246.

- Zhou Z., Zhang Y., Zheng P., Chen X., Yang Y. (2013) Starch Structure Modulates Metabolic Activity and Gut Microbiota Profile, Anaerobe, 24, 71-78.

- Zhu J.-X., He W., Ma J.-c. (2009) Progress on *Alpinia officinarum* Hance, Food and Drug Magazine, 11, 68-70. (Article en chinois)

- Zhuang M., Jiang H., Suzuki Y., Li X., Xiao P., Tanaka T., Ling H., Yang B., Saitoh H., Zhang L., Qin C., Sugamura K., Hattori T. (2009) Procyanidins and Butanol Extract of Cinnamomi Cortex Inhibit SARS-CoV Infection, Antiviral Research, 82, 73-81.

Publications

Pharmacophore

(An International Research Journal)

Available online at <http://www.pharmacophorejournal.com>

Original Research Paper

FROM ETHNOPHARMACOLOGY TO GREEN CHEMISTRY: “DAWILOU” A TRADITIONAL HERBAL MIXTURE

Naïrouz Benzeggouta^{1*}, Pr. Zahia Semra² and Pr. Zahia Kabouche³

^{1*} Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université de M'sila, Algeria

² Laboratoire de Bactériologie, C.H.U. de Constantine, Algeria

³ Laboratoire d'Obtention des Substances Thérapeutiques,
Université Mentouri, Constantine, Algeria

ABSTRACT

Since long times, human employs medicinal plants to treat illnesses, using frequently oily or aqueous preparations. Such uses are one of the most important principles of green chemistry which called 'green solvents'. Within the context of clean and green pharmaceutical industry, ethnopharmacological preparations must to be investigated to reduce toxicity of chemicals and solvents. 'Dawilou' is an ancient preparation used in Constantine as an Algerian Traditional Medicine (ATM); it is an aqueous herbal mixture of four spices: lesser galangal rhizome, ginger rhizome, cinnamon bark and clove buds. It is used to prevent or treat cold disease and to give some energy to workers in ancient times. The decoction was studied for its qualitative chemical composition using phytochemical screening; it was found that the extract is rich in chemical constituents: phenolics, terpenoids and alkaloids. Biological activity of 'Dawilou' against clinical isolated bacteria was investigated also and found to have moderate activity *in vitro* because of bacterial nature. So, the *in vivo* study is necessary to complete the study and evaluate immunostimulating activity of the extract which is empirically proved.

Keywords: 'Dawilou', Decoction, Spices, Phytochemical screening, Antibacterial effect, Immunostimulating.

From ethnopharmacology to green chemistry *Clove decoction and superheated water extracts*

Nairouz Benzeggouta, Zahia Semra



Correspondence to:
Nairouz Benzeggouta
nairouz@gmail.com

Keywords:
Syzygium aromaticum
superheated water extract
decoction
bactericidal effect

Received: 29 August / Accepted: 21 December 2012
© Springer Healthcare – CEC Editore 2013

Abstract

Antibiotic-resistant strains remain an important public health problem in developing countries, but industrialised countries are not fully protected from this problem either. Recent research has used combinations of traditional ethnopharmacology and modern technologies to find more effective treatments. Green chemical processes are one of these important combinations with herbal medicine. A superheated water extract and a decoction were prepared from clove buds (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry) and evaluated for their antibacterial activity. The obtained extracts were tested against multi-resistant clinical isolates. The superheated extract showed strong antibacterial activity with bactericidal effect against most tested strains, whereas the decoction showed low activity with bacteriostatic effect. Both extracts have a similar

global chemical composition; however, the powerful bactericidal activity of the superheated extract is due to greater concentration of polyphenolics. This study reveals the promising potential of clove extracts obtained by a green process using water, heat and pressure.

Introduction

Nosocomial bacterial infections, and resistance of these bacteria to antibiotics, is a serious public health problem, especially when drugs are the last line of effective treatment available for multi-resistant strains [1]. This problem encourages the use of combination therapy, which is concurrent administration of two or more anti-infective agents in order to (a) broaden the spectrum of action, (b) delay development of resistance and (c) potentiate efficacy [2]. Plant phytochemicals present the best and most natural combination of molecules that act in harmony; it has been hypothesized that some

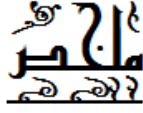
ABSTRACT

The aqueous extracts of lesser galangal (*Alpinia officinarum* Hance), ginger (*Zingiber officinale* Roscoe.), Ceylon cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Nees) and clove buds were obtained by two extraction methods, traditional (ethnopharmacology) as a decoction at the temperature of 100°C, and modern (green chemistry) by using superheated water extraction at the temperature of 120°C. These extracts were subjected to evaluate their biological activities, antibacterial and allelopathic, and their chemical composition to compare the efficiency of each extraction method.

It has proved that superheated extract of cloves was the most antibacterial with bactericidal effect on multi-resistant strains, followed by the decoction of the same plant with bacteriostatic effect. Superheated extract and decoction of cinnamon and the decoction of mixture of cloves and cinnamon were less effective. The other extracts did not give good results. Concerning the allelopathic activity results indicate that decoctions of ginger and cloves were most effective, and the other decoctions did not have any effect. However, superheated extracts of cloves and the mixture of four spices were the most effective.

The phytochemical screening made on aqueous extracts showed a similarity in chemical composition between decoctions and superheated extracts. However the powerful effect of superheated extracts is due to the amount of obtained metabolites, where the water subjected under some conditions of temperature and pressure has a power of extracting less polar molecules. The spectrophotometric profile is an additional proof for the chemical composition of these extracts where polyphenolic molecules predominated.

Keywords: Aqueous extracts, decoctions, superheated water, galangal, ginger, cinnamon, clove, bactericidal activity, bacteriostatic activity, allelopathic activity, phytochemical screening, spectrophotometric profile.



تم الحصول على المستخلصات المائية لنباتات الخولنجان، الزنجبيل، القرفة والقرنفل باستعمال طريقتين للاستخلاص، الطريقة التقليدية -أو ما يسمى بعلم الصيدلة الإثنية- على شكل مُغلي بدرجة حرارة 100°م، والطريقة المعاصرة -أو ما يعرف بالكيمياء الخضراء- بواسطة الماء فوق-مُغلي إلى درجة الحرارة 120°م. ثم خضعت هذه المستخلصات لتقييم فاعليتها البيولوجية، المضادة للبكتيريا والمضادة للأعشاب، وتركيبها الكيميائية من أجل مقارنة فعالية كل طريقة إستخلاص.

تبين أن مستخلص القرنفل فوق-مُغلي كان الأكثر مضادا للبكتيريا مع تأثير قاتل للجراثيم المتعددة المقاومة، متنوعا بمُغلي نفس النبتة مع تأثير مثبط للبكتيريا. أما المستخلص فوق-مُغلي و مُغلي القرفة ومزيج القرفة والقرنفل كان لهم تأثير ضعيف. أما المستخلصات الأخرى فلم تعط نتائج جيدة. وبخصوص الفعالية المضادة للأعشاب فقد أثبتت النتائج أن مُغلي الزنجبيل والقرنفل كانا أكثر تأثيرا، ولم يكن للمغليات الأخرى أي مفعول. وفي المقابل كان لمستخلصات فوق-مُغلي القرنفل ومزيج التوابل الأربعة تأثيرا جيدا. أظهر الفحص الكيميائي النباتي الذي أُجري على المستخلصات المائية تشابها في التركيبة الكيميائية بين المغليات والمستخلصات فوق-مُغلات، غير أن التأثير القوي للمستخلصات لهذه الأخيرة يرجع إلى كمية المركبات الأيضية الحصل عليها. بحيث أن الماء الخاضع لظروف معينة من حرارة وضغط لديه قدرة استخلاص المركبات ضعيفة القطبية. ويعتبر المخطط الطيفي دليل إضافي للتكوين الكيميائي لهذه المستخلصات أين تسود المركبات متعددة الحلقات العطرية.

الكلمات المفتاحية: المستخلصات المائية، المُغلي، الماء فوق-مُغلي، الخولنجان، الزنجبيل، القرفة، القرنفل، تأثير قاتل للجراثيم، تأثير مثبط للبكتيريا، الفعالية المضادة للأعشاب، الفحص الكيميائي النباتي، المخطط الطيفي.

RÉSUMÉ

Les extraits aqueux du galanga (*Alpinia officinarum* Hance), de gingembre (*Zingiber officinale* Roscoe.), de cannelle (*Cinnamomum zeylanicum* Nees) et des clous de girofle (*Syzygium aromaticum* (L.) Merril & Perry) ont été obtenus par deux procédés d'extraction, traditionnel (ethnopharmacologie) sous forme de décoction à la température de 100°C, et moderne (chimie verte) utilisant l'eau surchauffée à la température de 120°C. Ces extraits ont été soumis à l'évaluation de leurs activités biologiques, antibactérienne et allélopathique, et leur composition chimique afin de comparer l'efficacité de chaque méthode d'extraction.

Il s'est avéré que l'extrait surchauffé des clous de girofle était le plus antibactérien avec un effet bactéricide sur des souches multi-résistantes, suivi par la décoction de cette même plante avec un effet bactériostatique. L'extrait surchauffé de cannelle et sa décoction et le mélange de cannelle et clous de girofle en décoction avaient un faible effet. Les autres extraits n'ont pas donné de bons résultats. Concernant l'activité allélopathique les résultats montrent que la décoction de gingembre et des clous de girofle étaient efficaces et les autres décoctions n'avaient aucun effet. Cependant, les extraits surchauffés des clous de girofle et le mélange des quatre épices étaient les plus efficaces.

Le screening phytochimique effectué sur les extraits aqueux montre une similitude dans la composition chimique entre les décoctions et les extraits surchauffés. Toutefois le pouvoir puissant des extraits surchauffés est dû à la quantité de métabolites obtenus, où l'eau soumise dans certaines conditions de température et de pression possède un pouvoir d'extraction pour les molécules peu polaires. Le profil spectrophotométrique est une preuve supplémentaire de la composition chimique de ces extraits où les molécules polyphénoliques prédominaient.

Mots clés: Extraits aqueux, décoctions, eau surchauffée, galanga, gingembre, cannelle, clous de girofle, activité bactéricide, activité bactériostatique, activité allélopathique, screening phytochimique, profil spectrophotométrique.