

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

Université ABDERRAHMANE MIRA-Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique

Mémoire de Master

Filière: Biologie

Option: Pharmacologie moléculaire

Thème

*Prospection du pouvoir
antiseptique de l'huile de cade:*

Tests sur germes pathogènes

Présenté par:

Melle DELLYS Meriem

Membre de jury:

Présidente: Mme BEDJOU F.	M.C.A.	UAMB
Promoteur: Mr HARFI Ts.	M.A.B.	UAMB
Examineur I: Mr HAMOUM M.	M.A.A.	UAMB
Examineur II: Mr BRIBI N.	M.A.B.	UAMB

Année: 2012/2013

Remerciements

Le premier servi dans ces remerciements est, bien entendu, mon promoteur Tsoufik HARFI. Celui-ci m'a en effet, permis de travailler sur un sujet passionnant, selon son expression, C'EST GENIAL! Il m'a été d'un grand secours durant la phase de rédaction par ces relectures attentives et ces critiques et surtout son soutien dans mes moments de doute. Au-delà de l'apprentissage, je le remercie aussi pour l'ambiance dans laquelle j'ai travaillé, pour son élan communicatif et pour son humour.

Je remercie le chef de département monsieur HAMOUM de nous avoir accueilli dans son laboratoire et d'avoir mis à notre disposition son temps et son savoir.

Je remercie madame BEDJOU, monsieur HAMOUM et monsieur BRIBI pour m'avoir fait l'honneur d'être de mon jury de soutenance.

J'ai pu travailler dans un cadre agréable grâce à la sympathie du personnel de laboratoire de biophysique; monsieur BOUCHENOUA et madame MESSAOUDENE ainsi que mes collègues; SAMIHA, LILA, et BOUZID.

Je remercie également l'équipe du laboratoire microbiologie pour leur aide et leur serviabilité.

Dédicaces

Je dédie ce travail:

A toute ma famille, mes parents, ma sœur et mon frère qui m'ont apporté de l'aide grâce à leur soutien.

A mes meilleurs amis: Lydia, Radia, Ahlem, Souad, Chahinez, Yasmine et Nacer.

A MASSI SOFIANE BELLIL qui a toujours était à mes cotés, à me remonté le moral dans les moments les plus difficiles.

A toi, si t'était encore là tu serais fier de ta petite fille.

Sommaire

Listes des figures.....	i
Liste des tableaux.....	ii
Introduction.....	1

I- Partie théorique

I-1-Description et caractéristiques de l'huile de cade.....	2
I-2-Composition de l'huile de cade.....	2
I-3- Applications thérapeutiques de l'huile de cade.....	3
I-4- Procédés d'extraction de l'huile de cade.....	4
I-4-1-Distillation sèche.....	5
I-4-2-Hydrodistillation.....	5
I-5-Toxicité de l'huile de cade.....	6
I-5-1-Toxicité des hydrocarbures.....	6
I-5-2-Toxicité des phénols et de l'alcool sesquiterpène.....	7
I-6-Préparations pharmaceutiques à base d'huile de cade.....	8
I-7-Traitements à l'huile de cade.....	8
I-8-Falsification de l'huile de cade.....	9

II-Matériels et méthode

II-1-Matériels.....	11
II-1-1-Matériels biologique.....	11
II-1-1-1-L'huile de cade.....	11
II-1-1-2-Souches testées.....	11
II-1-2-Matériels de laboratoire.....	11
II-2- Méthodes.....	12
II-2-1-Caractérisation physico-chimique.....	12
II-2-1-1-Test de solubilité.....	12
II-2-1-1-1-Solubilité en milieu aqueux.....	12
II-2-1-1-2-Solubilité en milieu organique.....	12
II-2-2-prospection du pouvoir antiseptique.....	12
II-2-2-1-Fractionnement de l'huile de cade.....	12
II-2-2-2-Microbiologie de l'huile de cade.....	13
II-2-2-3-Mise en évidence de l'activité inhibitrice.....	13
II-2-2-3-1-Activité de l'huile brute.....	13
II-2-2-3-2-Activité des divers extraits.....	14
II-2-2-3-3-Test en gélose bicouche.....	14
II-2-2-4-Traitement alcalin.....	14
II-2-2-4-1-Protocole A.....	15
II-2-2-4-1-1-Protocole a.....	15
II-2-2-4-1-2-Protocole b.....	15
II-2-2-4-2-Protocole B.....	16

II-2-2-4-3-Protocole C.....	16
II-2-2-4-4-Protocole D.....	16
II-2-2-5-Hydrodistillation de l'huile de cade.....	17
II-2-2-5-1-Traitement alcalin de l'hydrodistillat.....	18
II-2-2-5-2- Mise en évidence de l'activité inhibitrice de l'hydrodistillat.....	18
II-2-3-Spectrophotométrie des extraits.....	18

III-Résultats et discussion

III-1-Résultats.....	20
III-1-1-Caractérisation physico-chimique.....	20
III-1-1-1-Test de solubilité.....	20
III-1-1-1-1-solubilité en milieu organique.....	20
III-1-1-1-2-solubilité en milieu aqueux.....	20
III-1-2-prospection du pouvoir antiseptique.....	21
III-1-2-1-Fractionnement de l'huile de cade.....	21
III-1-2-2-Microbiologie de l'huile de cade.....	21
III-1-2-3-Mise en évidence de l'activité inhibitrice.....	21
III-1-2-3-1-Activité de l'huile brute.....	21
III-1-2-3-2-Activité des extraits fractionnés.....	22
III-1-2-3-3-Test en gélose bicouche.....	23
III-1-2-4-Résultats d'activité antiseptique des extraits alcalins.....	23
III-1-2-4-1-Protocole A.....	24
III-1-2-4-1-1-Protocole a.....	24

III-1-2-4-2-Protocoles b, B et C.....	25
III-1-2-4-3-Protocole D.....	25
III-1-2-5-Résultats de l'hydrodistillation.....	26
III-1-2-5-1-Résultats de la caractérisation physico-chimique de l'hydrodistillat.....	26
III-1-2-5-2-Mise en évidence de l'activité inhibitrice de l'hydrodistillat.....	27
III-1-3-Résultats de la spectrophotométrie.....	29
III-2-Discussions générale.....	31
III-2-1-Caractérisation physico-chimique.....	31
III-2-2-Traitement de l'huile de cade.....	32
Conclusion.....	35
Références bibliographiques.....	36

Annexes

Annexe 1.....	I
Annexe 2.....	I
Annexe 3.....	II
Annexe 4.....	IV
Annexe 5.....	VIII
Annexe 6.....	IX
Annexe 7.....	XI

Liste des figures

Figure 1: Structure de β -cadinène (à gauche) et cadinol (à droite).....	2
Figure 2: Procédé de la distillation sèche.....	5
Figure 3: Procédé de l'hydrodistillation.....	6
Figure 4: Extraits obtenus par fractionnement.....	13
Figure 5: Photographie du dispositif d'hydrodistillation.....	17
Figure 6: Résultats de la microbiologie de l'huile sur boîte et bouillon.....	21
Figure 7: Résultats de l'activité inhibitrice de l'huile brute.....	21
Figure 8: Tests d'inhibition avec extraits préparés.....	22
Figure 9: Résultats du test de gélose en double couche.....	23
Figure 10: Résultats d'activité antiseptique de l'extrait "PEa".....	24
Figure 11: Résultats obtenus avec les extraits "PEb", "PEB" et "PEC".....	25
Figure 12: Résultats du test d'inhibition avec l'extrait "PRP1".....	25
Figure 13: Hydrodistillat obtenus.....	27
Figure 14: Résultats du test d'inhibition par l'hydrodistillat.....	28
Figure 15: Spectres des extraits et solvants.....	30
Figure 16: Schémas récapitulatif du protocole proposé.....	34

Liste des tableaux

Tableau I: structure des hydrocarbures et phénols de l'huile de cade.....	3
Tableau II: toxicité des hydrocarbures de l'huile de cade.....	6
Tableau III: toxicité des phénols et de l'alcool sesquiterpène de l'huile de cade.....	7
Tableau IV: solubilité de l'huile de cade dans divers solvants.....	20
Tableau V: solubilité de l'huile de cade en milieu aqueux.....	20
Tableau VI: résultats du test d'inhibition des extraits fractionnés.....	22
Tableau VII: résultats du test d'inhibition des extraits du protocole a.....	24
Tableau VII: diamètres des zones d'inhibition obtenus avec les extraits "PE2", "PRP2", "PRP1".....	26
Tableau IX: diamètre des zones d'inhibition obtenus avec les extraits "hydrodistillat" et "IE".....	28
Tableau X: résultats spectrophotomètre des solvants.....	29
Tableau XI: résultats spectrophotomètre des extraits.....	29

Introduction

L'huile de cade est le produit de la pyrogénéation du cadier ; *Juniperus oxycedrus*. D'usage ancien, elle est connue pour ses vertus thérapeutiques depuis le moyen âge. Elle a été utilisée avec succès sur diverses maladies tel que l'eczéma et le psoriasis, agit comme antiseptique antiprurigineux, antifongique, cicatrisant et kératolytique. Elle est utilisée à ce jour en médecine vétérinaire. **(Belliot, 2007)**

L'huile de cade est une résine complexe, présentant dans sa composition plusieurs substances, dû en partie à sa composition propre, en partie, à son protocole d'extraction. En effet toute combustion incomplète s'accompagne de dérivés polycycliques (dérivés aromatiques, pyrolygines, etc). Cette composition hétérogène explique le potentiel toxique qui accompagne l'huile de cade. Tous les cas de toxicité rapportés sont des cas de toxicité aigue dû à des doses importantes. **(Saviuc, 2012)**

Son efficacité dans le traitement de certains troubles cutanés peut s'expliquer par une activité antiseptique prolongée dans le temps. **(Dechambre, 1870)**

Malgré les propriétés thérapeutiques de cette huile, les gens l'utilisent de moins en moins, cela est dû à son aspect visqueux et à l'odeur répulsive qu'elle dégage. Peu d'études scientifiques lui en été consacrées malgré une large utilisation thérapeutique dans les milieux populaires des pays africains, et hygièno-cosmétique en Europe. **(Mansouri, 2010)**

A un moment où la recherche pharmacologique, notamment avec l'antibiothérapie, fait du sur-place, revisiter, à la lumière des récentes technologies, les sources qui ont fait leur preuves peut s'avérer utile, voire salutaire.

Dans cette optique nous nous proposons dans ce travail une exploration du potentiel antiseptique de l'huile de cade par :

- des tests sur des souches microbiennes pathogènes;
- par recherche d'huile essentielle hydrodistillable;
- par des traitements chimiques alcalins susceptibles de favoriser l'expression d'éventuels principes actifs.

I-Partie théorique:

I-1-Description et caractéristiques de l'huile de cade:

L'huile de cade est un liquide visqueux extrait du bois du genévrier oxycèdre "*Juniperus oxycedrus*", liquide riche en molécules aromatiques, de couleur brun foncé, ayant une odeur et une consistance proche de celle du goudron. (Burri, 2010; Le bas, 1823)

L'huile de cade serait partiellement soluble dans l'alcool à 90°, insoluble dans l'eau et entièrement soluble dans l'éther diéthylique, le benzène, l'acide acétique et le chloroforme. (Belliot, 2007)

I-2-Composition de l'huile de cade:

C'est un produit de composition hétérogène, riche en molécules apolaires et aromatiques. Sa formule est variable, fonction des matières premières, des régions, des climats et des procédés d'extraction. Les constituants caractéristiques sont le cadinène et le cadinol :

- le cadinène, hydrocarbure de formule $C_{15}H_{24}$, est présent sous forme de 4 isomères dont le principal est le β -cadinène, les autres (σ -cadinène, γ_1 -cadinène et γ_2 -cadinène) sont présents en quantité infime.

- cadinol, alcool sesquiterpène de formule $C_{15}H_{26}O$. (Belliot, 2007)

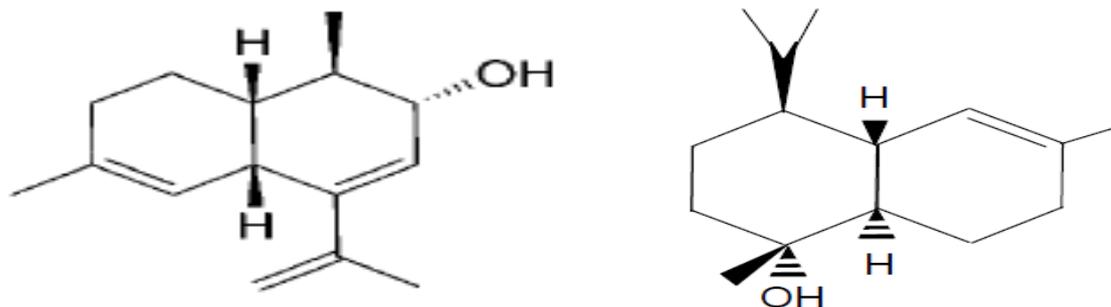


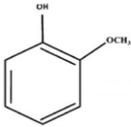
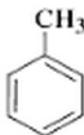
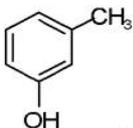
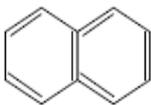
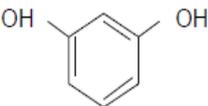
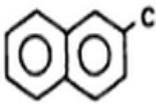
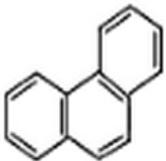
Figure 1: Structure de β -cadinène (à gauche) et cadinol(à droite). (Belliot, 2007)

L'huile de cade contient aussi;

- des hydrocarbures cycliques et polycycliques : benzène, toluène, naphthalène, méthyle-naphthalènes, et phénanthrène.

- des phénols dont le gaiacol, le crésol et la résorcine. (Belliot, 2007)

Tableau I: Structure des hydrocarbures et phénols de l'huile de cade (Wang et al, 2006;Johnson, 1999;Pavia et al, 2012;Friedli, 2002;Belliot, 2007).

Hydrocarbures	Formule brute	Formule développée	Phénols	Formule brute	Formule développée
Benzène	C_6H_6		Gaïacol	$C_7H_8O_2$	
Toluène	$C_6H_5CH_3$		Crésol	C_7H_8O	
Naphtalène	$C_{10}H_8$		Résorcine	$C_6H_6O_2$	
Méthyle-naphtalènes	$C_{11}H_{10}$		-	-	-
Phénanthrène	$C_{14}H_{10}$		-	-	-

I-3- Applications thérapeutiques de l'huile de cade:

L'huile de cade est considérée comme un remède externe, elle présente plusieurs actions thérapeutiques:

- l'huile de cade a été utilisée, en association avec la poudre de diatomée (**annexe 2**), dans le traitement de la gale des ovins et caprins. (**Belliot, 2007;Le bas, 1823**)
- en cosmétologie, l'huile de cade est utilisée dans le shampoing pour des soins antipelliculaires, les états squameux, les démangeaisons du cuir chevelu, et les croutes de lait. (**Belliot, 2007**)

- en épidémiologie, elle est considérée comme un traitement add-on au Puvathérapies appliquées contre le psoriasis. **(Dechambre, 1870)**
- en médecine vétérinaire, jusqu'au dix-neuvième siècle, l'huile de cade servait de traitement contre les teignes et l'eczéma des animaux. On l'a aussi utilisé pour cicatriser les fissures des sabots des équidés. **(Le bas, 1823;Poudret, 1985)**
- actuellement, on y ai parfois recours dans le traitement des parasitoses, par application toutes les 48 heures sur les zones malades. L'huile de cade agit rapidement et efficacement dans le traitement des dermatoses rebelles et les différentes affections squameuses. Il semblerait avoir un effet sur les ulcères et les lésions torpides (lésions "statiques") par application d'une légère pellicule d'huile. **(Bardeau, 2009;Bouchardat, 1848)**
- l'association d'huile de cade avec l'huile d'olive (0.25 à 0.5 g d'huile de cade dans une cuillère d'huile d'olive) pourrait être efficace comme anthelminthique contre les vers intestinaux. L'huile de cade diluée soignerait les rhinites chroniques et les coryzas. **(Bardeau, 2009)**
- cette huile posséderait aussi un effet répulsif contre les divers insectes, qui serait bénéfique à l'homme, vu qu'il existe plusieurs maladies transmises via ces derniers. Cette action pourrait notamment être mise à profit dans le piquage des poules ainsi que dans le traitement des végétaux afin de les protéger contre les différentes agressions animales. **(Poudret, 1985)**
- sur le plan métabolique; l'huile de cade serait un agent réducteur, il permet de diminuer le turn-over accéléré des cellules et cela en inhibant la synthèse de l'ADN. **(Belliot, 2007)**

I-4-Procédés d'extraction de l'huile de cade:

L'utilisation de l'huile de cade remonte au moyen âge. On l'obtient à partir de la carbonisation du troncs et des grosses branches des vieux genévriers (les jeunes troncs ne donnent pas d'huile). **(Belliot, 2007)**

I-4-1-Distillation sèche:

Autre fois, appelée distillation per descensum ; l'extraction de l'huile de cade se fait par distillation du bois, qui donne un liquide visqueux de couleur rougeâtre, qui devient plus foncé au fur et à mesure, par traitement à la chaleur à une température d'environ 200°. **(Burri, 2010;Belliot, 2007)**

Le principe de la carbonisation, est de mettre le bois à distiller dans un pot troué, avec un couvercle, qu'on place par la suite sur un autre pot non percé.

L'ensemble sera placé dans une fosse, de sorte que le pot au dessus dépasse la surface du sol, au tour duquel on allume un feu très vif. Sous l'action de la chaleur le bois s'exsude et le distillat s'écoule ver le pot inferieur.

Une décantation est réalisée durant 8 jours au minimum, permettant ainsi de récupérer le liquide surnageant: l'huile de cade. **(Burri, 2010)**

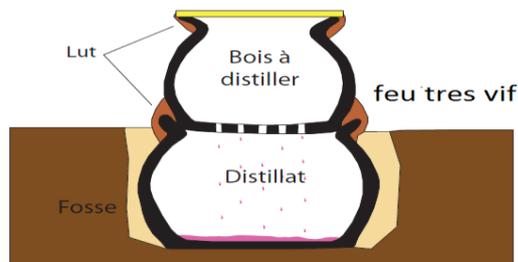


Figure 2: Procédé de la distillation sèche. (Burri, 2010)

I-4-2-Hydrodistillation:

Contrairement à l'ancien procédé, cité ci-dessus, la distillation per ascensum se fait avec une température très élevée (400°). L'huile s'évapore au fur et à mesure de son exsudation, se refroidit et se condense au niveau des parois. **(Belliot, 2007)**

Le principe de cette méthode est de mettre le bois dans une cuve de distillation, au tour de laquelle, on allume un feu:

- une partie des vapeurs issue de cette opération sera récupérée dans une chambre de condensation, dirigée par la suite vers une cuve de décantation ;
- l'autre partie s'échappe par la cheminée. Il s'agit des vapeurs qui ne se condensent pas. **(Burri, 2010)**

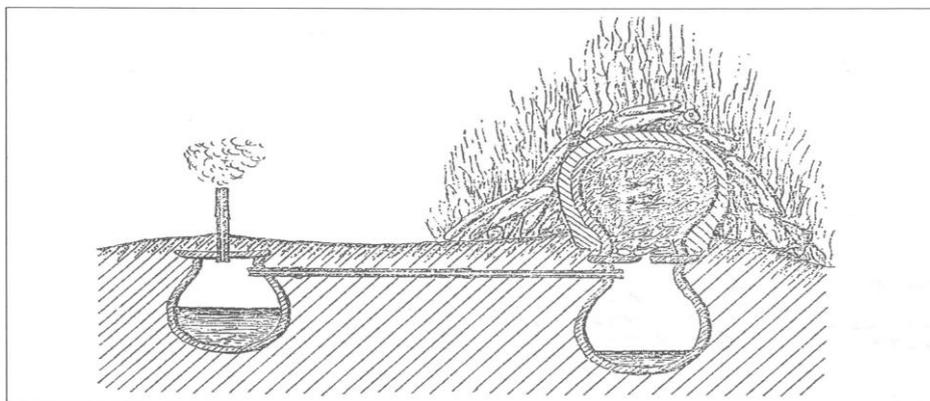


Figure 3: Procédé de l'hydrodistillation. (Gast, 1999)

I-5-Toxicité de l'huile de cade:

La toxicité de toute composition est d'abord déterminée par les toxicités relatives de ses différents constituants. Mais des interactions, souvent de synergie et parfois d'antagonisme ne sont pas à négliger :

- interactions chimiques intermoléculaires ;
- interactions avec des organes-cibles agonistes ou antagonistes ;
- interactions activant ou inhibant la diffusion ou la biodisponibilité des principes actifs.

(Saviuc, 2008)

L'huile présente dans sa composition diverses classes de substances à toxicité avérée :

I-5-1-Toxicité des hydrocarbures:

Tableau II: Toxicité des hydrocarbures de l'huile de cade. (Bhardwaj, 2001;Page et al, 1997;Roulet, 2004;Trachte, 2012;Jin et al, 2012;Tercé et Fraval, 2003)

Hydrocarbures	Effet toxique
Cadinène	- nécrose hépatocellulaire. - dilatation des voies biliaires. - perturbation des enzymes hépatiques.
Benzène	- hydrocarbure aromatique cancérigène et très toxique. -provoque des troubles respiratoires. -paralysie. -anémie.
Toluène	-toxique du système nerveux centrale. -l'exposition chronique provoque des troubles neurologiques, confusion mentale, perte de mémoire, céphalées. -responsable d'atteinte hématologique.
Naphtalène	-lésions du système respiratoire. -formation de tumeurs des voies respiratoires supérieures.
Méthyle-naphtalène	-cancérigène pulmonaire chez les souris.
Phénanthrène	-hydrocarbure cancérigène et mutagène.

I-5-2-Toxicité des phénols et de l'alcool sesquiterpène:

Tableau III: toxicité des phénols et de l'alcool sesquiterpène de l'huile de cade. (**Rachouti et al, 1997;Stellman & Dufresne, 2000;Cunningham, 1956;Claeson et al, 1991**)

Phénols	Effets toxiques
Gaiacol	irritants pour les muqueuses et les voies respiratoires. -présente une dose létale a partir de 0.043g/kg.
Crésol	-toxique pour toutes les cellules. -corrosif pour la peau et les muqueuses. -atteinte rénale et nécrose du foie. -irritations oculaires.
Résorcine	-hémorragie de la plèvre et du péricarde. - hypertrophie de la rate. - méthémoglobinémie.
Alcool sesquiterpène	Effets toxiques
cadinol	-antagoniste du calcium; interagit avec les canaux calciques.

Deux cas d'intoxication à l'huile de cade ont été rapportées :

- un nouveau-né de 40 jours qui a été traité par application cutané par l'huile de cade, pour une dermite séborrhéique, a manifesté une heure et demi après, une convulsion accompagnée d'un coma hypotonique et d'une dyspnée. (**Saviuc, 2012**)

- une femme de 30 ans, qui après avoir bus un demi-verre d'huile de cade, pour traiter des céphalées, s'est plainte d'une épigastralgie avec complication de céphalées, une hypotension artérielles et une détresse respiratoire. (**Saviuc, 2012**)

I-6-Préparations pharmaceutiques à base d'huile de cade:

L'huile de cade existe en pharmacie sous forme de pommade mélangée avec des corps gras ou de la glycérine. (**Dechambre, 1870**)

L'huile de cade est retrouvée sous forme de pommade (**Annexe 1**). (**Dechambre, 1870**)

- on la trouve aussi sous forme de shampoing composé;

- 3% d'huile de cade
- 0.5% d'acide salicylique
- excipients (eau, lauryl sulfate de sodium, polysorbate 80, lauryl poly glucose, chlorure de sodium, caramel et parabène).

L'huile de cade peut être aussi sous forme de gel contenant 4g d'huile de cade et 3g d'acide salicylique.

L'huile de cade existe aussi sous forme d'une solution;

- 35g d'huile de cade
- excipients (laurylsulfate de trolamine, laurate de sorbital, polysorbate et eau purifiée).
(Belliot, 2007)

I-7-Traitements à l'huile de cade:

- l'huile de cade est surtout indiquée dans le traitement de psoriasis et des dermatites séborrhéiques. Dans ce cas, on la prescrit comme suite;
- application d'une pommade à base d'huile de cade chaque soir pour lutter contre l'épaississement de la couche dermique.
- le lendemain un shampoing doit être appliqué pour éliminer les résidus de la pommade sur le cuir chevelu.
- pour le reste du corps un bain, de 15 minutes, est conseillé, avec une solution à base d'huile de cade, qui doit être diluée en raison de 2 à 4 cuillères à soupe, pour une baignoire d'eau chaude. On peut également l'appliquer localement avec des compresses sur les parties malades du corps. (Belliot, 2007)
- l'application d'huile de cade sur la peau ne provoque aucun effet immédiat, même à une grande concentration, seule une chaleur est ressentie au moment de l'application.
- il paraît que l'huile de cade possède une manière particulière d'agir, ces propriétés n'apparaissent pas au moment de l'application, mais après un bout de temps qui permet la pénétration du principe actif dans le tégument. (Dechambre, 1870)
- l'expression du principe actif se voit lors de la formation de papulo-pustules dures parfois d'un volume considérables de couleur rouge. La pustule cadique pourrait être résolue par des frictions prolongées qui diminuerait l'affection squameuse. (Dechambre, 1870)

I-8-Falsification de l'huile de cade:

Malgré son faible prix de revient et son faible coût, l'huile de cade est l'objet de falsifications avec d'autres goudrons végétaux (houille, hêtre, pin,...etc).

Les pharmaciens et les connaisseurs de l'huile de cade reconnaissent l'huile de cade vraie grâce au reflet rouge qu'elle donne, car les autres goudrons donnent un reflet brun. (**Bardeau, 2009**)

II-Matériels et méthodes:

II-1-Matériels:

II-1-1-Matériel biologique:

II-1-1-1-L'huile de cade:

L'huile de cade est produite dans la régions de Ouled Taleb (wilaya de Sétif). Il s'agit d'un produit commercial, vendu par les herboristes.

II-1-1-2-Souches microbiennes:

Toutes les souches testées ont été remises par le service de microbiologie de CHU de SETIF.

- *Pseudomonas aeruginosa* (souche 97): isolée à partir du pus.
- *Enterobacter aerogenes* (souche 903): isolée à partir du sang.
- *Serratia marcescens* (souche 91): isolée à partir du pus.
- *Klebsiella pneumoniae* (souche 912): isolée à partir du sang.
- *Candida albicans* (souche 96).

II-1-2-Matériels de laboratoire:

- milieux de culture;
 - Mueller-Hinton (IPA, Algérie);
 - Sabouraud (IPA, Algérie);
 - bouillons nutritifs: Mueller-Hinton (IPA, Algérie);
- spectrophotomètre SPECORD 50;
- étuve MMM-Group (venticell);
- solvants (Biochem): diethyl ether, ethanol, méthanol, acide acétique, benzène, chloroforme, acide hydrochlorique;
- produits chimiques (Biochem): hydroxyde de sodium et bicarbonates de sodium.

II-2-Méthodes:

II-2-1-Caractérisation physico-chimique:

La caractérisation physico-chimique porte :

- d'une part, sur la solubilité de l'huile de cade dans divers solvants, organiques et aqueux, polaires et apolaires ;
- et la caractérisation spectrophotométrique UV-visible des différents extraits actifs obtenus **(Bensegueni L, 2001)**.

II-2-1-1-Test de solubilité:

- *Solubilité en milieu aqueux:*

La solubilité en milieu aqueux est déterminée comme suit:

- dans de l'eau distillée;
- dans l'eau distillée acidifiée (HCl);
- dans l'eau alcalinisée (bicarbonates de sodium, pH 7);
- dans l'eau alcalinisée (NaOH, pH 13).

- *Solubilité en milieu organique:*

On régénère l'huile de cade par chauffage et on en rajoute 1 ml dans 9 ml de chacun des solvants suivants: diéthyl éther, chloroforme, benzène, acide acétique et éthanol.

Après 60 minutes, on filtre toutes les solutions pour déterminer la présence éventuelle de précipité (solubilité partielle) ou l'absence de résidu (solubilité totale).

Le test est effectué en quatre exemplaires.

II-2-2-prospection du pouvoir antiseptique:

II-2-2-1-Fractionnement de l'huile de cade :

Le test consiste à séparer l'huile de cade en différentes fractions, basé sur les critères de solubilité de polarité variable, déterminés par la caractérisation physico-chimique. L'objectif est de séparer l'huile de cade en "pools" de molécules présentant une solubilité commune :

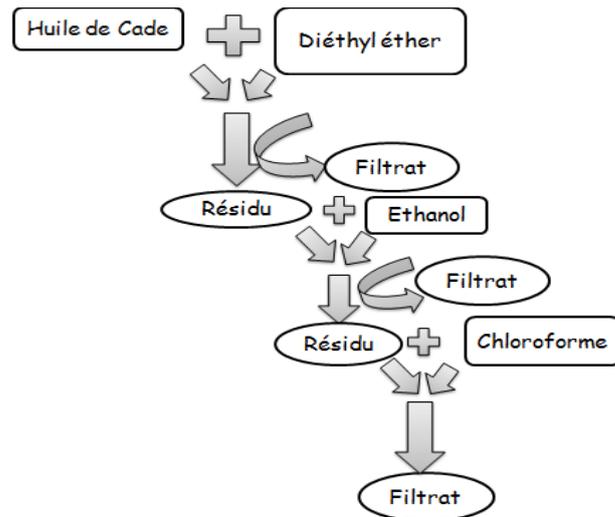


Figure 4: Extraits obtenus par fractionnement.

Tous les *filtrats* obtenus sont évaporés, récupérés dans le DMSO et testés pour une éventuelle activité antiseptique.

II-2-2-2-Microbiologie de l'huile de cade:

Avant d'étudier le pouvoir antiseptique de l'huile de cade, on se doit de détecter une éventuelle microflore

- *Protocole expérimental:*

un échantillon d'huile de cade brute est ensemencé par strie sur gélose Mueller-Hinton (MH) et dans un bouillon du même milieu.

II-2-2-3-Mise en évidence de l'activité inhibitrice:

II-2-2-3-1-Activité de l'huile brute:

- *protocole expérimental:*

L'huile de cade est solubilisée dans le DMSO (20%).

-on réalise un ensemencement sur boîtes de pétri avec gélose MH, pour les bactéries et Sabouraud, pour la levure.

- on sature un disque stérile avec 15 µl de la solution huile de cade + DMSO qu'on dépose au milieu de la gélose.

- incubation à l'étuve 24 à 48 heures/ 33°C **(Bensegueni L, 2001).**

II-2-2-3-2-Activité des divers extraits:

- test en milieu solide:

- *protocole expérimental:*

- les cinq souches sont ensemencées dans 5 boîtes de pétri au contact avec les disques de chacun des extraits obtenus après fractionnement. (5 disques dans chaque boîte).

-Incubation 24 heures dans l'étuve.

- test en milieu liquide:

- *protocole expérimental:*

- chaque souche est ensemencée dans 5 ml de bouillon nutritif MH, additionné de 15 µl de chaque extrait.

Incubation 24 à 48 heures dans l'étuve.

II-2-2-3-3-Test en gélose bicouche:

- *protocole expérimental:*

Pour l'extrait chloroformique, le seul ayant montré une certaine activité inhibitrice, on a procédé par ensemencement sur gélose en double couche:

- une gélose MH, est additionnée de l'extrait chloroformique (1 ml/10 ml de gélose MH), puis solidifiée en position inclinée en boîte de pétri. sur laquelle on coule une gélose MH vierge. Le but est de créer ainsi un gradient de concentration en principes actifs, pour favoriser la croissance microbienne même en cas de grande sensibilité. (Nicolle, 1965)

II-2-2-4-Traitement alcalin :

L'huile de cade se présente sous forme d'une oléorésine légèrement visqueuse, véritable piège à molécules. En effet elle diffuse mal dans les milieux de cultures, empêchant ainsi d'éventuels principes actifs de s'exprimer. Le but de ce test est de solubiliser cette oléorésine en milieu alcalin et à différents pH, le seul traitement aqueux ayant réagi avec l'huile de cade, pour libérer ses principes actifs :

- *protocole expérimental:*

- après chauffage de l'huile de cade, on le traite avec une solution alcaline (bicarbonates de sodium ou NaOH).

- pH 10 + chauffage (protocole A)
- pH 13 + chauffage (protocole B)
- pH 8 + chauffage (protocole C)
- pH 7 + chauffage (protocole D)

Dans les différents cas on obtient une fraction hydrosoluble et un résidu.

II-2-2-4-1-Protocole A:

II-2-2-4-1-1-Protocole a: (appliqué à "l'extrait éther")

Le "filtrat éther" est évaporé et le résidu est traité avec une solution NaOH à pH 10 avec chauffage jusqu'à dissolution totale;

- après refroidissement et filtration on obtient une fraction hydrosoluble alcaline et une autre insoluble;

- la fraction insoluble est solubilisé dans le DMSO "FIa";

- la fraction hydrosoluble est acidifié avec HCl (à pH 2), filtrée puis épuisée avec l'éther diéthylique;

- le résidu de filtration, insoluble dans le DMSO, est solubilisé dans l'éther "Ra";

- la phase "éther" est évaporée et le résidu obtenu est repris avec du DMSO "PEa";

- la phase aqueuse résiduelle est évaporée et le résidu est repris avec l'éther "PRa".

II-2-2-4-1-2-Protocole b:

- l'huile de cade brute est traitée directement avec une solution NaOH à pH 10 avec chauffage jusqu'à dissolution.

- on suit le protocole a et on obtient les extraits suivants:

- fraction insoluble dans NaOH "FIb";
- résidu de filtration après acidification "Rb";
- phase éther "PEb";
- phase aqueuse résiduelle "PRb".

II-2-2-4-2-Protocole B:

- l'huile de cade est solubilisée dans une solution NaOH à pH 13 avec chauffage.

- on suit le protocole a et on obtient les extraits suivants:

- fraction insoluble dans NaOH "FIB";
- résidu de filtration après acidification "RB";
- phase éther "PEB";
- phase aqueuse résiduelle "PRB".

II-2-2-4-3-Protocole C:

- l'huile de cade est traitée avec une solution NaOH à pH=8 avec chauffage.

- on suit le protocole a et on obtient les extraits suivants:

- fraction insoluble dans NaOH "FIC";
- résidu de filtration après acidification "RC";
- phase éther "PEC";
- phase aqueuse résiduelle "PRC".

II-2-2-4-4-Protocole D:

O n dissous l'huile de cade dans une solution de bicarbonates de sodium (pH 7 final).

- après refroidissement et filtration on obtient une fraction hydrosoluble alcaline et un insoluble.

- la fraction hydrosoluble est acidifié avec HCl (à pH 2), filtrée puis épuisée avec l'éther diéthylique;

- la "phase éther" est évaporée et le résidu obtenu est repris avec l'éther "PE1";

- la phase aqueuse résiduelle est séchée et le résidu est repris successivement avec l'éther "PRA1" et le méthanol "PRP1". Ces derniers sont évaporés puis repris avec le DMSO.

- l'insoluble dans le bicarbonates de sodium "FI1" est solubilisé avec NaOH à pH 13, chauffé pendant une heure puis refroidit;

- la fraction insoluble est solubilisée dans le DMSO "FI2";

- le filtrat est acidifié, filtré (à pH 2) puis épuisé avec l'éther, le précipité est séché puis solubilisé dans l'éther "RD";

- la "phase éther" est évaporée et récupérée avec le DMSO "PE2";
- la phase aqueuse résiduelle est séchée et le résidu est repris successivement avec l'éther "PRA2" puis le méthanol "PRP2". Ces derniers sont évaporés puis repris avec le DMSO;

Tous les extraits obtenus sont testés pour leurs activités antiseptiques.

II-2-2-5-Hydrodistillation de l'huile de cade

L'huile de cade a été soumise à une hydrodistillation directe, menée au laboratoire de microbiologie de la faculté SNV (**Mansouri *et al*, 2010**).



Figure 5: Photographie du dispositif d'hydrodistillation.

- l'extrait obtenu est transféré dans une ampoule à décanter. L'ensemble est laissé à reposer 24 heures.

- l'hydrodistillat à été récupéré avec l'éther est testé tel quel (cet extrait est insoluble dans le DMSO).

On a récupéré aussi dans l'ampoule à décanter un précipité blanchâtre (insoluble dans l'éther "IE"). Ce dernier est solubilisé dans du méthanol et testé pour son pouvoir antiseptique.

II-2-2-5-1-Traitement alcalin de l'hydrodistillat:

- on a traité l'hydrodistillat avec deux solutions:

- bicarbonates de sodium à pH 7;
- NaOH à pH 13.

- l'hydrodistillat traitée avec NaOH est transférée dans une ampoule à décanter , la phase soluble dans NaOH est récupérée et acidifiée.

- on suit le protocole D.

II-2-2-5-2-Mise en évidence de l'activité inhibitrice de l'hydrodistillat:

- l'huile essentielle et les extraits obtenus suite à son traitement alcalin ont été testés sur toutes les souches, avec un ensemencement par étalement et des disques imbibés de 20µl chacun.

II-2-3-Spectrophotométrie des extraits

Les extraits testés sont passés au spectrophotomètre UV-Visible.

les extraits sont:

- " l'hydrodistillat" de l'huile de cade;
- "PE2";
- "PRP1" ;
- "PRP2" ;
- "IE".

III-Résultats et discussion:

III-1-Résultats:

III-1-1-Characterisation physico-chimique:

III-1-1-1-Test de solubilité:

III-1-1-1-1-Solubilité en milieu organique:

L'huile de cade s'est avérée insoluble dans les solvants suivants; diéthyl éther, benzène, éthanol et acide acétique. Après une heure de décantation, un dépôt se forme au fond des tubes.

le chloroforme est le seul solvant qui solubilise totalement l'huile de cade.

Tableau IV: Solubilité de l'huile de cade dans divers solvants.

Solvants	Chloroforme	Ethanol	Diéthyl éther	Benzène	Acide acétique
Solubilité	Solubilité totale	Partiellement soluble	Partiellement soluble	Partiellement soluble	Partiellement soluble

III-1-1-1-2-Solubilité en milieu aqueux:

- l'huile de cade est insoluble dans l'eau distillée et à pH acide.
- le traitement alcalin solubilise partiellement l'huile de cade ;
- l'alcalinisation douce (bicarbonate) provoque une précipitation plus importante que l'alcalinisation forte (soude) ;
- le résidu –bicarbonate est partiellement soluble dans NaOH.

Tableau V: Solubilité de l'huile de cade en milieu aqueux.

Milieu aqueux	Eau acidifiée	Eau distillée	Milieu alcalin (NaOH)	Milieu alcalin (bicarbonates de sodium)
Solubilité	Insoluble	Insoluble	Solubilité partielle	Solubilité partielle

III-1-2-prospection du pouvoir antiseptique

III-1-2-1-Fractionnement de l'huile de cade

La combinaison éther-éthanol-chloroforme a permis une solubilisation totale de l'huile de cade en trois fractions solubles distinctes : filtrat éther, filtrat éthanol et filtrat chloroforme. Il est à noter que ce dernier solubilise toutes les autres fractions.

III-1-2-2-Microbiologie de l'huile de cade

Aucune croissance n'a été obtenue pour la gélose et le bouillon nutritif, même après plusieurs jours d'incubation. L'huile de cade ne contient aucune microflore, indigène ou contaminante.

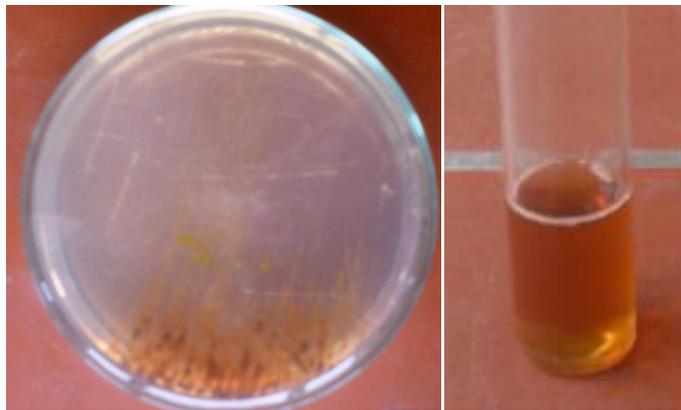


Figure 6: Résultats de la microbiologie de l'huile sur boîte et bouillon.

III-1-2-3-Mise en évidence de l'activité inhibitrice :

III-1-2-3-1-Activité de l'huile brute:

Sur les boîtesensemencées la croissance bactérienne est homogène aucune zone d'inhibition n'a été observé. A l'état brute huile de cade n'a présenté aucune activité inhibitrice, du moins pour les souches testées.



Figure 7: Résultats de l'activité inhibitrice de l'huile brute.

III-1-2-3-2-Activité des extraits fractionnés:

- test en milieu solide et liquide:

- les trois fractions, le filtrat benzène et acide acétique n'ont exercés aucun effet inhibiteur sur les souches bactériennes;

- par contre, pour la levure on note une légère inhibition avec la fraction chloroformique.

En milieu liquide cet effet inhibiteur n'est pas évident à observer.

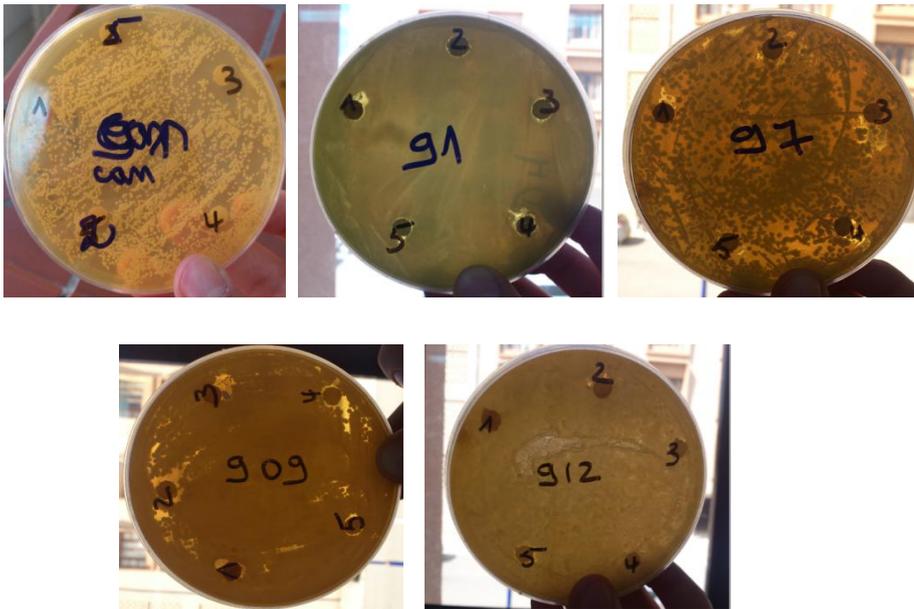


Figure 8: Tests d'inhibition avec extraits préparés.

Tableau VI: Résultats du test d'inhibition des extraits fractionnés.

Extraits Souches	Filtrat éther (1)	Filtrat éthanol (2)	Filtrat chloroforme (3)	Filtrat benzène (4)	Filtrat acide acétique (5)
<i>pseudomonas aeruginosa</i>	Sans effet	Sans effet	Sans effet	Sans effet	Sans effet
<i>enterobacter aerogenes</i>	Sans effet	Sans effet	Sans effet	Sans effet	Sans effet
<i>serratia marcescens</i>	Sans effet	Sans effet	Sans effet	Sans effet	Sans effet
<i>klebsiella pneumoniae</i>	Sans effet	Sans effet	Sans effet	Sans effet	Sans effet
<i>candida albicans</i>	Effet négligeable	Effet négligeable	Sensible 12,6 mm	Effet négligeable	Sans effet

III-1-2-3-3-Test en gélose bicouche:

L'extrait chloroformique a alors été testé en gélose bicouche pour mettre en évidence un éventuel effet dose: cette technique permet d'exposer la culture à un gradient de concentration du principe actif.

Pour les bactéries (Figure 8), la croissance homogène confirme l'absence d'effet antiseptique. Pour *Candida albicans* par contre l'effet antiseptique se confirme par une croissance réduite (colonies isolées) aux zones de fortes concentrations.

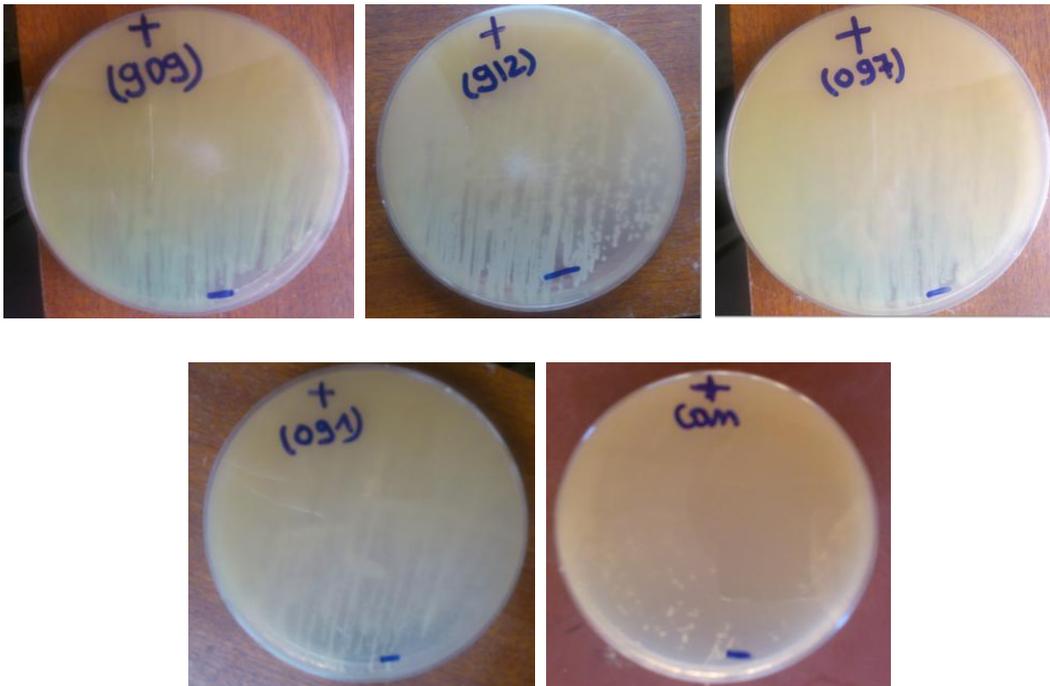


Figure 9: Résultats du test de gélose en double couche.

III-1-2-4-Résultats d'activité antiseptique des extraits alcalins:

L'appréciation de l'effet inhibiteur s'est faite sur plusieurs jours pour distinguer l'effet inhibiteur de l'effet "statique". En effet on a remarqué, pour certains extraits, une reprise de la croissance dans les zones d'inhibition; signe de la disparition de l'effet inhibiteur. Ceci explique les appréciations "bactériostatique" et "bactéricide".

III-1-2-4-1-Protocole A:

III-1-2-4-1-1-Protocole a: (appliqué à "l'extrait éther")

Tableau VII: Résultats du test d'inhibition des extraits du protocole a.

Extraits	Fla	Ra	PEa		PRa
			t=0	t=7jours	
Résultats	-	+	-	+++	-

avec effet: + ; sans effet: -

- l'extrait "PEa" exerce une activité bactéricide qui ne s'est manifesté qu'après plusieurs jours de "maturation" (stockage).

La figure ci-dessous souligne cet effet pour les cinq souches:

- les faibles zones sont obtenues après application de l'extrait extemporané;
- les zones plus importantes correspondent au même extrait appliqué après 7 jours de stockage, à température ambiante (figure 10).

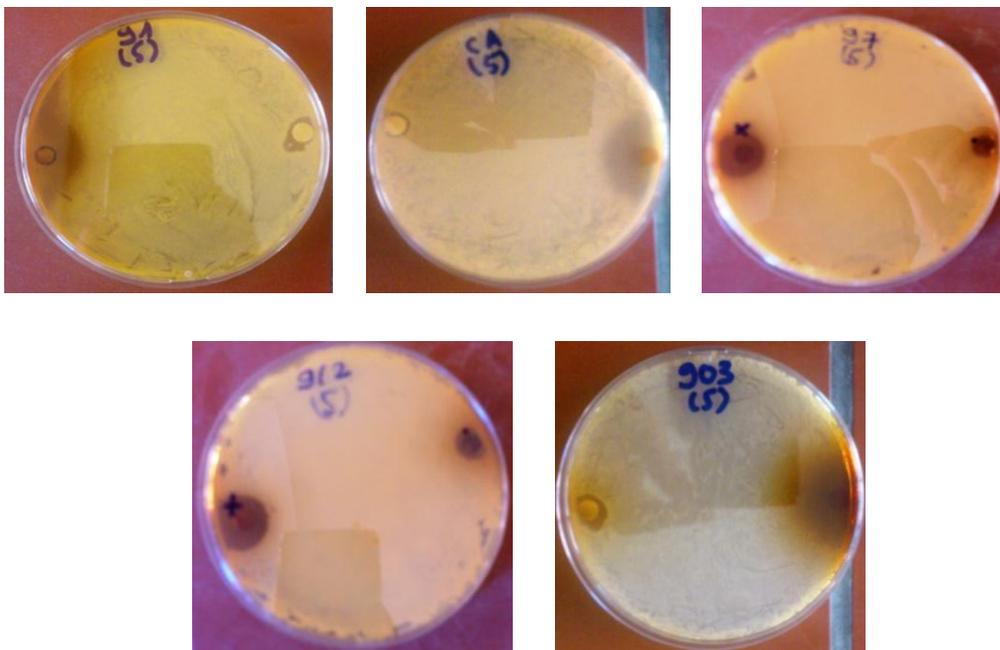


Figure 10: Résultats d'activité antiseptique de l'extrait "PEa". (Annexe 3)

Les résultats des autres extraits, négligeables devant ceux de cet extrait, sont regroupés dans l'annexe 3.

III-1-2-4-2-Protocoles b, B et C

Tous les extraits obtenus avec ces protocoles se sont montrés inactifs sur la croissance des microorganismes testés, même après plusieurs jours de "maturation" (figure 11).

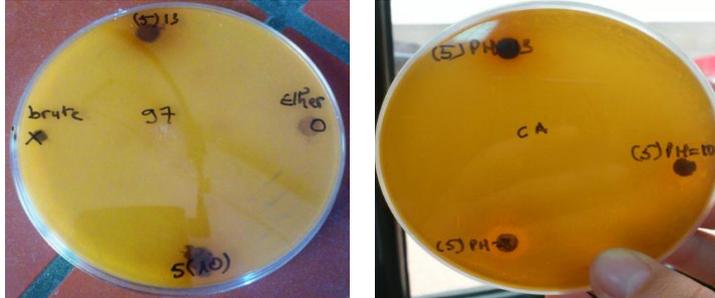


Figure 11: Résultats obtenus avec les extraits "PEb", "PEB" et "PEC".

III-1-2-4-3-Protocole D:

Les extraits obtenus avec ce protocole se sont montrés inhibiteurs, avec des diamètres d'inhibition intéressants (**annexe 4**).

Parmi ceux-là, certains ont donné de très bons résultats, à savoir :

- extrait "PE2" bactéricide;
- extrait "PRP1" bactéricide (figure 12);
- extrait "PRP2" bactériostatique.

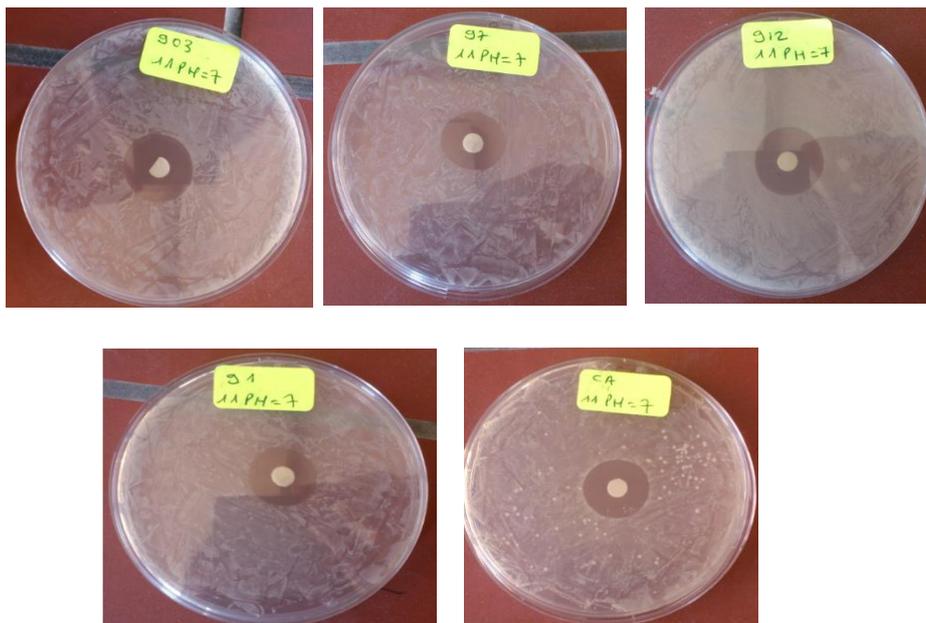


Figure 12: Résultats du test d'inhibition avec l'extrait "PRP1". (**Annexe 4**)

Tableau VIII: Diamètres des zones d'inhibition obtenus avec les extraits "PE2", "PRP2", "PRP1".

Extraits souches	Diamètre d'inhibition (mm)		
	"PE2"	"PRP2"	"PRP1"
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15.6	18.2	18.4
	13.8	16.6	17.6
	17.4	20.0	19.8
<i>Enterobacter aerogenes</i>	15.0	19.0	17.8
	15.9	17.0	18.8
	15.1	21.6	22.0
<i>Serratia marcescens</i>	18.0	19.0	17.6
	12.4	15.3	17.7
	15.2	21.0	19.8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	26.7	17.7	16.9
	13.8	16.6	17.5
	11.6	22.2	21.6
<i>Candida albicans</i>	15.0	19.8	17.8
	14.4	17.7	17.2
	17.4	19.8	21.0

III-1-2-5-Résultats de l'hydrodistillation:

III-1-2-5-1-Résultats de la caractérisation physico-chimique de l'hydrodistillat:

L'hydrodistillation de l'huile de cade a donné un extrait huileux, jaune-clair, d'odeur caractéristique de l'huile de cade mais beaucoup moins prononcée, voire agréable.



Figure 13: *Hydrodistillat obtenus.*

La caractérisation de l'hydrodistillat a donné les résultats suivants :

- une densité inférieure à celle de l'eau ;
- une insolubilité dans le DMSO ;
- une solubilité totale dans l'alcool;
- une insolubilité dans l'eau à pH neutre ;
- une solubilité partielle dans l'eau alcalinisée.

III-1-2-5-2-Mise en évidence de l'activité inhibitrice de l'hydrodistillat:

L'huile essentielle extraite de l'huile de cade s'est montrée très inhibitrice, que ce soit à l'état brut ou après dilution dans l'éther (1/5). De plus elle présente un temps d'action très court. En effet on observe les zones d'inhibition après 6h d'exposition. (figure 13) (**Annexe 5**)

L'extrait "IE" présente une activité antiseptique pour une dilution de 1/10 (g/ml). (**Annexe 6**)

Les extraits obtenus après traitement alcalin de cet hydrodistillat n'ont pas donné de bonne activité. (**Annexe 7**)

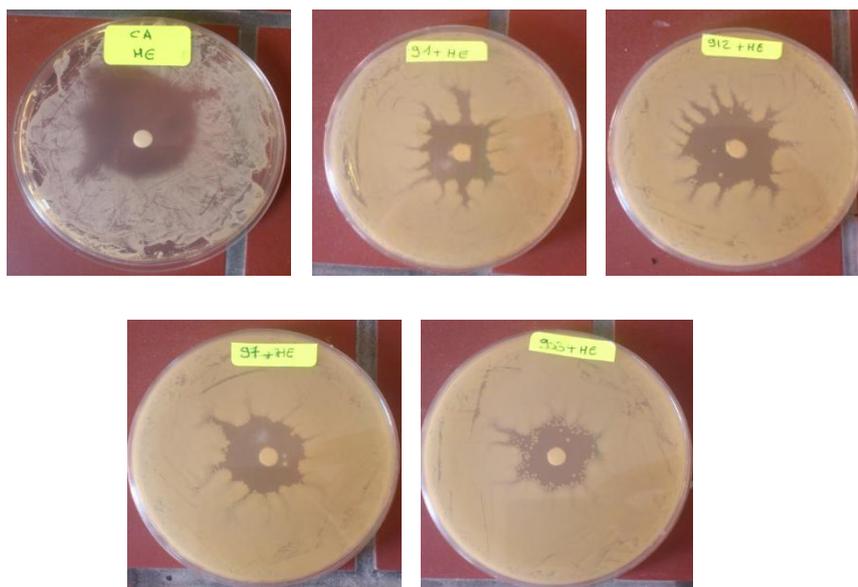


Figure 14: Résultats du test d'inhibition par l'hydrodistillat.

Tableau IX: diamètre des zones d'inhibition obtenus avec les extraits "hydrodistillat" et "IE".

Extraits Souches	Diamètre d'inhibition (mm)	
	Hydrodistillat	IE
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19.9	12.6
	26.2	20.0
	23.4	18.6
<i>Enterobacter aerogenes</i>	08.4	21.4
	24.6	18.0
	22.8	15.4
<i>Serratia marcescens</i>	24.5	19.4
	21.0	17.8
	28.6	17.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	19.4	18.5
	30.0	15.0
	29.8	19.2
<i>Candida albicans</i>	24.3	17.2
	40.1	19.0
	35.0	17.6

III-1-3-Résultats de la spectrophotométrie

Tableau X: Résultats spectrophotomètre des solvants.

	Absorbance nm	Longueurs d'ondes
DMSO	0.6695	260
Ether éthylique	1.2535	290
méthanol	0.3487	249

Tableau XI: Résultats spectrophotomètre des extraits.

	Absorbance (nm)	Longueur d'ondes	
Hydrodistillat	1.8806	320	
PE2	1.2527	290	
PRP1	Pic 1	1.4000134	292
	Pic 2	1.4222	303
	Pic 3	1.3609	320
	Pic 4	0.5757	370
PRP2	1.0739	289	
IE	Pic 1	0.4948	254
	Pic 2	0.5021	261
	Pic 3	0.4963	266
	Pic 4	0.4917	271
	Pic 5	0.4800	279

Les extraits ont donnés les graphes suivants:

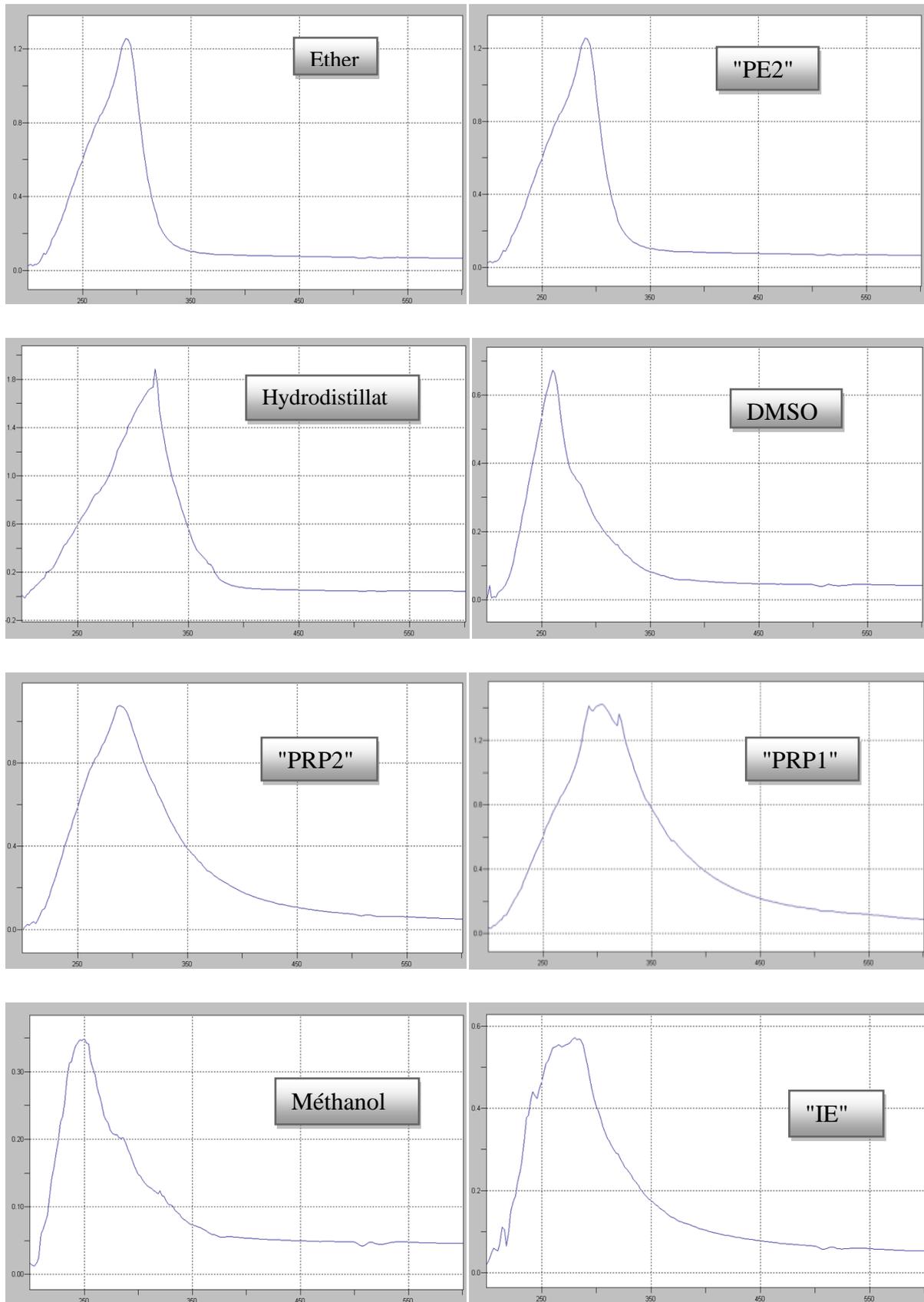


Figure 15: Spectres des extraits et solvants.

III-2-Discussions générale:

III-2-1-Caractérisation physico-chimique:

L'analyse spectrale UV-Visibles des différents extraits laisse voir que:

- l'hydrodistillat (confondu avec l'huile essentielle) montre une absorbance dans l'UV avec un maximum caractéristique à 320 nm. Le pic obtenu, très pointu, est synonyme d'un extrait mono moléculaire, donc pure.

- l'extrait éther n'absorbe pas dans l'UV-Visible. On remarque que le spectre obtenu se confond avec celui du solvant.

- le séchage du résidu aqueux d'extraction (pH 7) a donné deux principes actifs. un principe actif soluble dans l'éther, ne présentant aucune activité antiseptique, et un deuxième extrait soluble dans le méthanol, présentant une nette activité antiseptique. Ce dernier présente une absorbance multi-pics synonyme d'une composition hétérogène, avec trois composés majeurs:

- l'une absorbant à 320 nm identifiée à l'huile essentielle (hydrodistillat);
- deux autres absorbant à 292 nm et 303 nm;

- le même résidu obtenu après alcalinisation par NaOH de l'insoluble pH 7 "FI1" a donné un seul principe actif absorbant à 289 nm.

- l'extrait "IE" présente aussi un spectre complexe avec cinq principes actifs absorbants à des maximum distincts.

Cette analyse fait ressortir des détails très intéressants:

- si l'hydrodistillation nous donne une huile essentielle très active comme antiseptique, ce même principe actif est retrouvé après extraction alcaline, dans le résidu aqueux;

- d'autres molécules à fort pouvoir antiseptique, sont retrouvées aussi dans les résidus aqueux (pH 7 et pH 13) mais l'analyse spectrale montre qu'elles sont différentes du principe actif extrait par distillation:

- l'extrait "PE2", soluble à pH alcalin et insoluble dans l'eau à pH acide, et ne présentant aucune absorbance dans l'UV-Visible;
- des molécules (pH 7 et pH 13), solubles dans l'eau à pH acide, absorbant dans l'UV à des maximums très voisins ce qui laisse penser qu'elles sont probablement de la même famille ou très proche sur le plan structure.

L'activité antiseptique indiscutable de l'hydrodistillat se retrouve aussi dans l'extrait alcalin. On est tentés alors d'attribuer l'activité antiseptique de l'huile de cade à cette fraction, mais l'existence d'une activité antiseptique comparable, dans l'extrait "PE2", où la fraction volatile est totalement absente, prouve qu'il ya au moins deux principes actifs distincts antiseptiques dans l'huile de cade.

III-2-2-Traitement de l'huile de cade:

L'huile de cade s'est montrée insoluble dans l'eau. Elle présente, par contre, une bonne solubilité en milieu alcalin croissante avec élévation du pH.

En présence de bicarbonates de sodium, elle présente une légère solubilisation avec formation d'un abondant précipité. Ce dernier est, en partie, soluble dans la soude .Le résidu insoluble est soluble dans l'éther.

Le traitement alcalin nous a permis d'obtenir différentes fractions:

- la fraction hydrosoluble à pH 7: après acidification et extraction à l'éther, on obtient la phase éther "PE1" et la phase résiduelle aqueuse "PR". Le séchage de cette dernière donne un résidu sec extrait successivement par l'éther diéthylique "PRA1" et le méthanol "PRP1".
- l'insoluble à pH 7: traité avec la soude, il présente une fraction hydrosoluble (pH 13) et une fraction insoluble. Cette dernière est soluble dans le DMSO "FI1". La fraction hydrosoluble donne, après acidification, un extractible éther "PE2" et une phase résiduelle aqueuse qui, séchée et extraite successivement, par l'éther et le méthanol donne "PRA2" et PRP2".

L'exploration du pouvoir antiseptique des différentes fractions obtenues nous a donné:

- trois extraits actifs sur les souches testées: "PE2", "PRP1" et "PRP2";
- les caractéristiques d'extraction, les spectres d'absorption UV-Visibles et même les diamètres d'inhibition obtenus montrent que "PRP2" est inclut dans "PRP1".

Ainsi le traitement alcalin de l'huile de cade à permis de libérer deux principes actifs que l'oléorésine brute ne permet pas d'exprimer.

On peut expliquer, de cette manière, la latence nécessaire à certains extraits pour agir. Leur emprisonnement dans la résine empêche leur actions immédiate.

A la lumière de toutes ces considérations, un protocole de traitement globale d'extraction et d'expression des principes actif de l'huile de cade se dégage. Il est proposé ci-dessous dans sa forme finale.

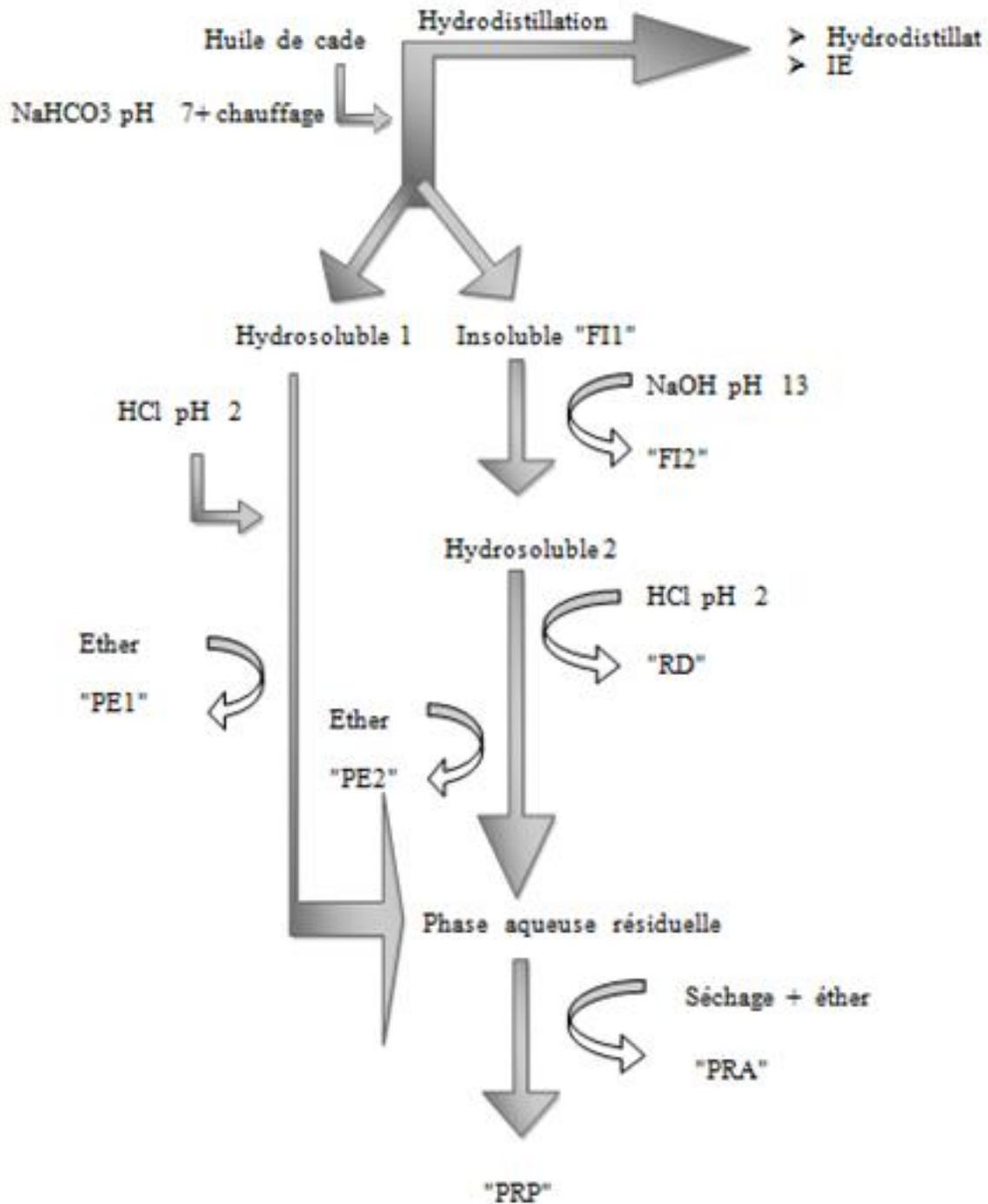


Figure 16: Schémas récapitulatif du protocole proposé.

Conclusion

L'huile de cade a toujours été réputée efficace dans le traitement des affections cutanées, pour son action sur les processus de multiplication cellulaires, mais aussi pour son activité antiseptique.

L'exploration de cette activité sur l'huile brute s'est montrée totalement négative. Mais la recherche et l'extraction de son huile essentielle s'est avérée très intéressante. Cette huile essentielle s'est montrée très antiseptique et, de plus, présente à des teneurs notables.

L'aspect oléo-résineux d'huile de cade montre une consistance brute, hétérogène, non adaptée à une utilisation directe et paraît nécessiter un traitement susceptible de mieux la solubiliser.

Si l'hydro-solubilisation n'a rien donné, le traitement alcalin s'est montré très fructueux. Deux principes actifs ont été isolés, l'un dans la phase éther et l'autre dans la fraction aqueuse résiduelle.

Ainsi le potentiel antiseptique de l'huile de cade se confirme. Mais son mécanisme d'action reste à élucider. Parce qu'une question se pose: ce pouvoir inhibiteur est-il spécifiquement dirigé contre les microorganismes ou peut-il s'exercer contre les cellules animales et humaine ?

Parce que dans ce dernier cas, toutes les hypothèses sont permises. Un screening moléculaire s'impose et une réévaluation des différentes propriétés, réelles ou, supposées de l'huile de cade pourrait, peut être, répondre au problèmes d'antibio-résistance.

Références bibliographiques

- **Bardeau, F. (2009).** *les huiles essentielles*. Paris: Fernand Lanore. 95p.
- **Belliot, A. (2007).** *huile de cade, goudron de houille, ichtycol: utilisations dermatologiques et cosmetologiques*. These de doctorat. Université de Nantes. pp 16-32.
- **Bensegueni, L. (2001).** *Etude in vitro de l'effet antibactérien et antifongique de : Inula viscosa, Lawsonia inermis, Asphodelus microcarpus, Aloe vera, Juniperus oxycedrus*. Thèse de magister. Université de Constantine. 55p.
- **Bhardwaj, R., Singh, A., Sharma, O.P., Dawra, R.K., Kurade, N.P., Mahato, S.B. (2001).** Hepatotoxicity and cholestasis in rats induced by the sesquiterpene, 9-oxo-10,11-dehydroageraphorone, isolated from Eupatorium adenophorum. *Biochem Mol Toxicol*, 15(5), 279-286.
- **Bouchardat, A. (1848).** *Repertoire de pharmacie*. Paris : Germer balliere. 16p.
- **Burri, S. (2010).** Production et commerce de la poix et de l'huile de cade en basse Provence au Moyen Âge. *anthropobotanica*. pp 12-14.
- **Claeson, P., Andersson, R., Samuelsson, G. (1991).** T-cadinol: a pharmacologically active constituent of scented myrrh: introductory pharmacological characterization and high field 1H- and 13C-NMR data. *Planta Med*, 57(4), pp 352-356.
- **Cunningham, A.A. (1956).** resorcin poisoning. *Arch Dis Child*, (31)157, pp 173-176.
- **Dechambre, A. (1870).** *Dictionnaire encyclopédique des sciences médicales*. Harvard: Asselin. pp 431-447.
- **Friedli, C.K.W. (2002).** *Chimie générale pour ingénieur*. Lausanne: Presses polytechniques. pp405-406.
- **Gast, M. (1999).** *Encyclopédie berbère*. Aix-en-provence: Edisud. pp 3170-3174.
- **Jin, M., Kijima, A., Suzuki, Y., Hibi, D., Ishii, Y., Nohmi, T., Nishikawa, A., Ogawa, K., Umemura, T. (2012).** In vivo genotoxicity of 1-methylnaphthalene from comprehensive toxicity studies with B6C3F1 gpt delta mice. *J Toxicol Sci*, 37(4), pp 11-21.
- **Johnson, A.W. (1999).** *Invitation to organic chemistry*. Massachusetts: Jones &

- **Lebas, J.P.H. (1823).** *pharmacie veterinaire, chimique, theorique et pratique à l'usage des eleves, des artistes et des proprietaires.* paris : Errata. 259p.
- **Le du, M., Ferrand, C. (1990).** *Filtration des vins à l'aide de terre à diatomées.* Rapport. 7p.
- **Mansouri, N., Satrani, N., Ghanmi, M., ghadraoui, L., Aafi, A., Farah, A. (2010).**
 - Valorisation des huiles essentielles de *Juniperus thurifera* et de *Juniperus oxycedrus* du Maroc. *Phytothérapie*,8(1), pp 66-70.
- **Nicole, C. (1956).** *Archives de l'institut Pasteur de Tunis.* Californie: Institut Pasteur de Tunis. 95p.
- **Page, C.P., Curtis, M.J., Sutter, M.C., Walker, M.J., Hoffman, B.B. (1997).** *pharmacologie intégrée.* belgique: De Boeck Supérieur. pp 532-534.
- **Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kris, G.S., Engel, R.G. (2012).** *a microscale approach to organic laboratory techniques.* belmont : Cengage Learning. 20p.
- **Poudret, C. (1985).** *Sur la composition des essences de Genévrier commun, de l'Oxycedre et du goudron de Cade.* these de doctorat. Faculté de Pharmacie de Marseille. 30p.
- **Rachouti, M., Seigle-Murandi, F., Steiman, R., Benoit-Guyod, J.L. (1997).** Étude de la toxicité des composés phénoliques modèles de la lignine vis-à-vis de 1040 souches de champignons. *Actes Inst Agron Veto*, 17(3). pp 165-172.
- **Roulet, C.A. (2004).** *Santé et qualité de l'environnement intérieur dans les bâtiments.* Lausanne : presse polytechnique. 52p.
- **Saviuc, P. (2012).** *Bulletin de la Société de Toxicologie Clinique.* Grenoble:Infotox international. 5p.
- **Saviuc, P. (2008).** *Bulletin de la Société de Toxicologie Clinique.* Grenoble: Infotox international. 2p.
- **Stellman, J.M., Dufresne, C. (2000).** *Encyclopédie de sécurité et de santé au travail.* Geneve : International Labour Organization. 61p.
- **Tercé, M., Fraval, A. (2003).** *Agrede: agriculture et épandage de déchets urbains et agro-industriels.* Paris: Éditions Quae.78p.
- **Trachte, S. (2012).** *Choix responsable des matériaux de construction, pour une conception globale de l'architecture soutenable.* Louvain: Presses univ. 233p.

- **Wang, M.Z., Zhang, Y.Y., Li, S.L., Cai, X.H., Luo, X.D. (2006).** Cadinene Derivatives from *Eupatorium adenophorum*. *Helvetica Chimica Acta*, 89(12), pp3104-3106.

Annexes

Annexe 1:

- *différentes pommades à l'huile de cade. (Dechambre, 1870)*

Substances	Huile de cade	Glycérine	Huile d'amande douce	Mucilage de semences de coings	Axone
pommades					
Glycérés d'huile de cade	1 gramme	30 grammes	-	-	-
Liniments de l'huile de cade	30 grammes	-	60 grammes	-	-
Liniments de l'huile de cade	4 grammes	-	-	30 grammes	-
Pommades contre les gerçures du sein	2 grammes	30 grammes	4 grammes	-	-
Pommade de l'huile de cade	5 grammes	-	-	-	30 grammes

Annexe 2:

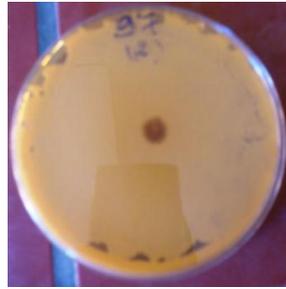
- *Poudre de diatomées:*

La poudre de diatomées est issue de roche légère de couleur blanche, verdâtre ou jaunâtre qui est le résultat de l'accumulation au fil du temps de carapace de diatomées (classe d'algue unicellulaire marine o d'eau douce). **(Le Du et Ferrand, 1990)**

Annexe 3:

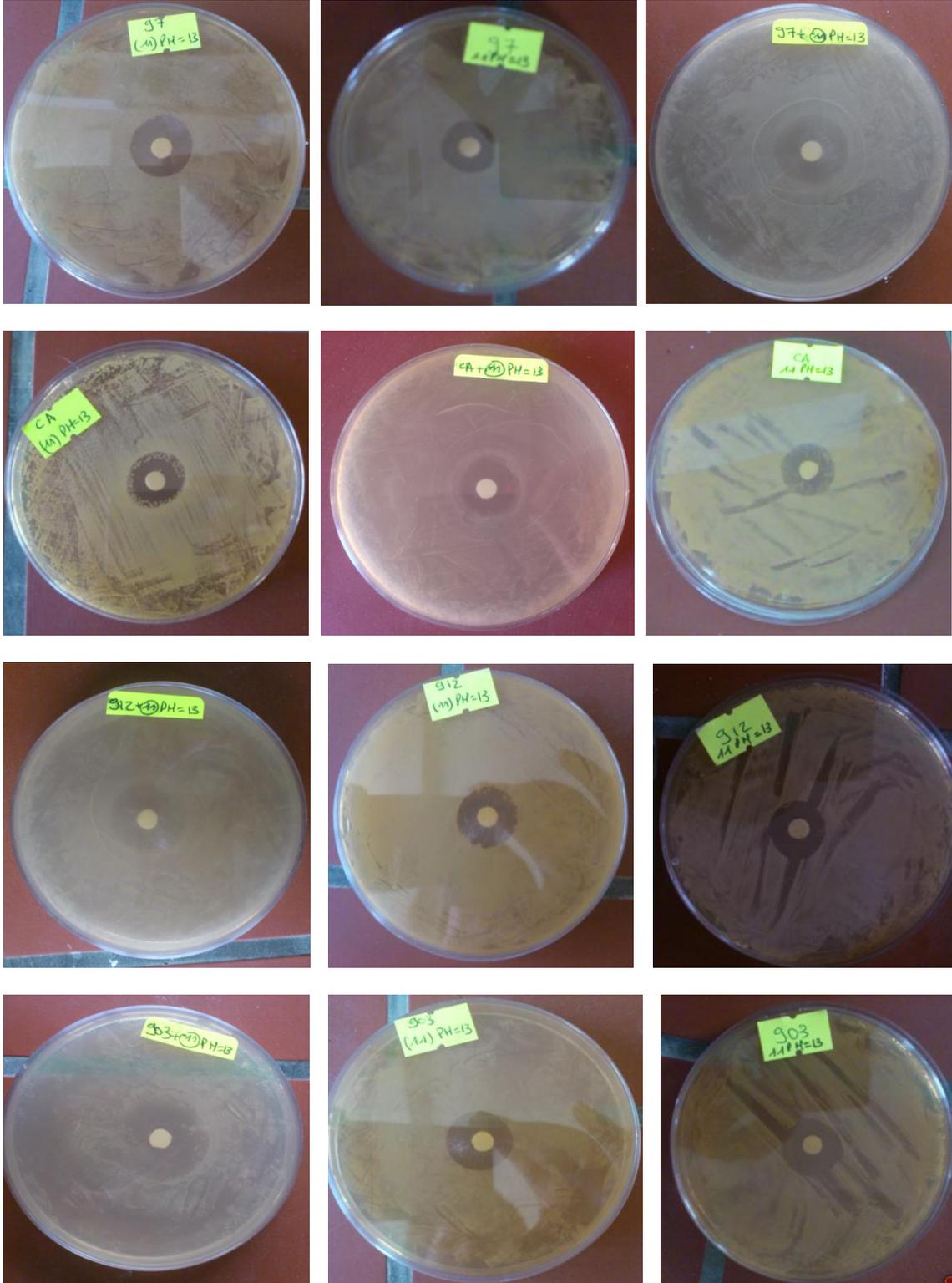
- *Résultats du test antiseptique avec le protocole a:*





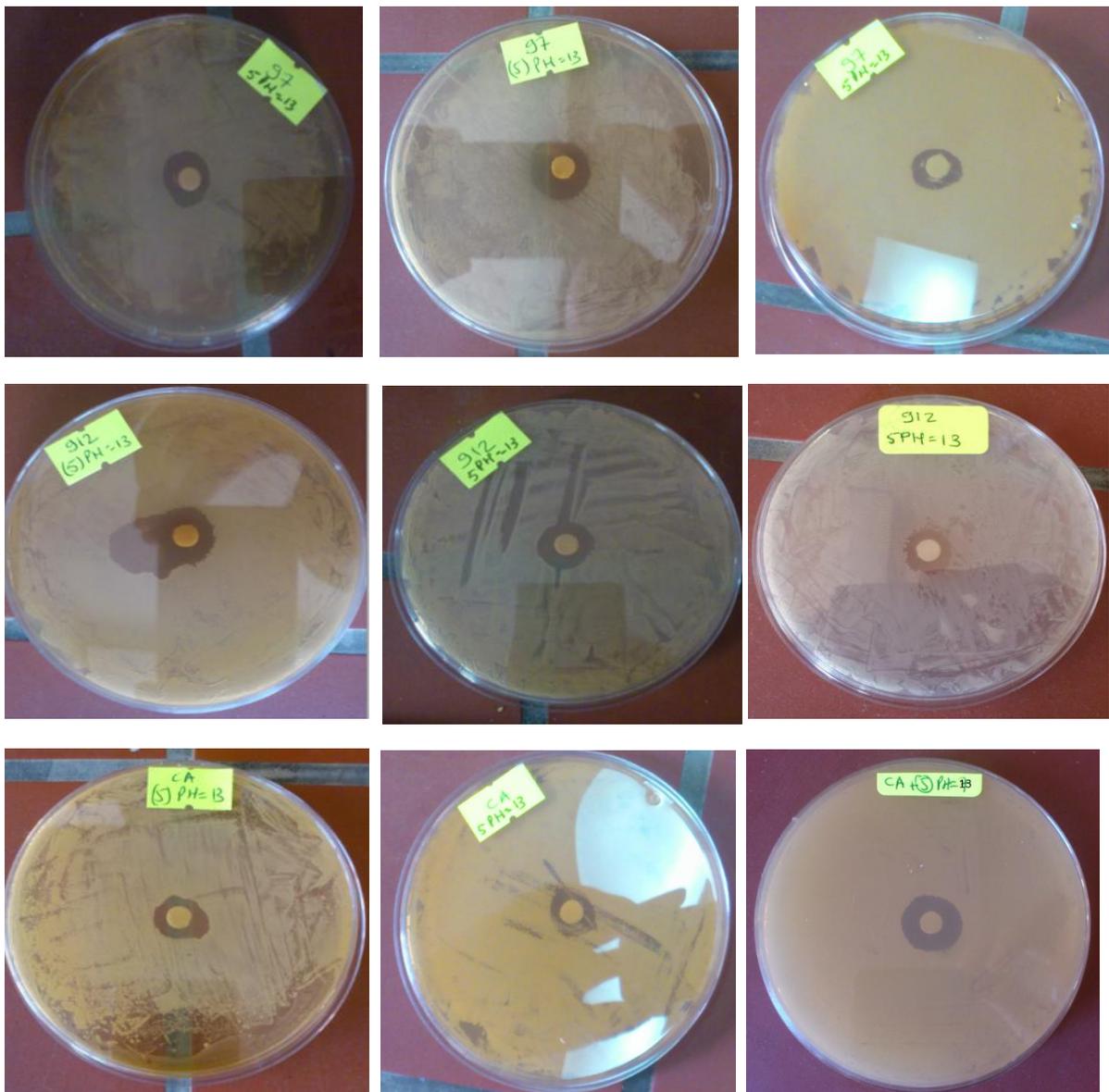
Annexe 4:

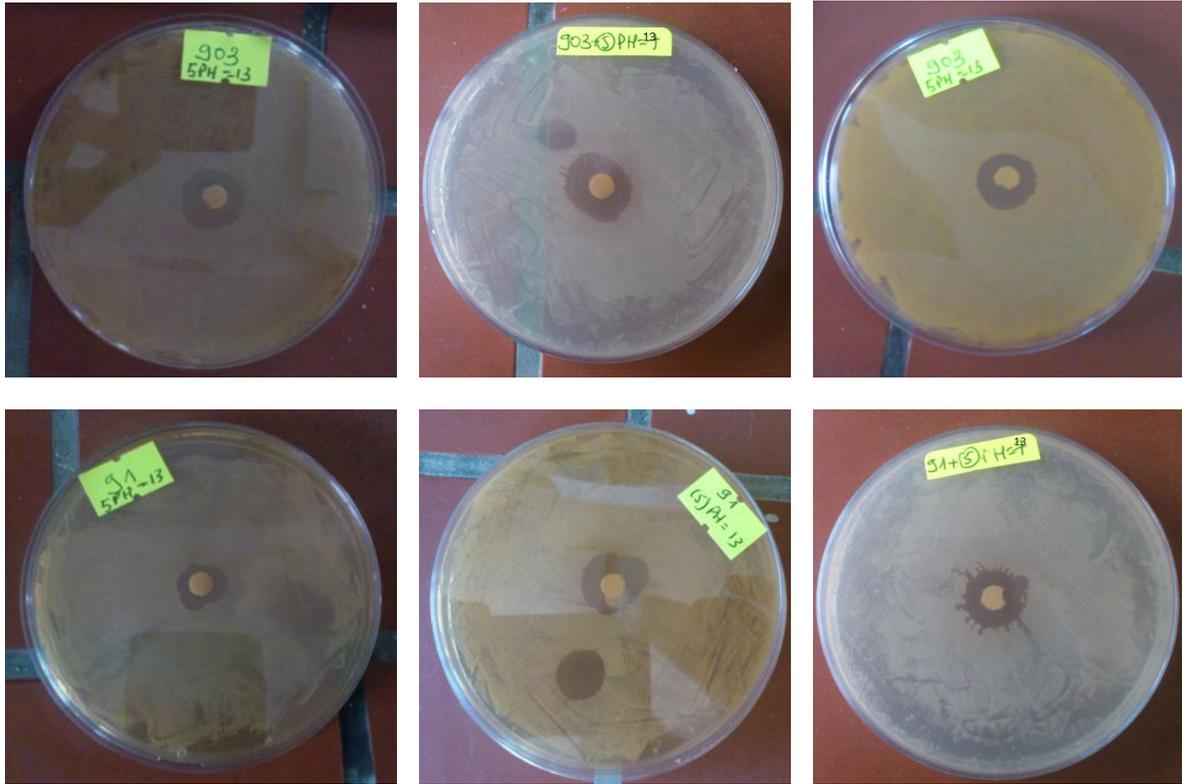
- Résultats du test d'inhibition en présence de l'extrait "PRP2":





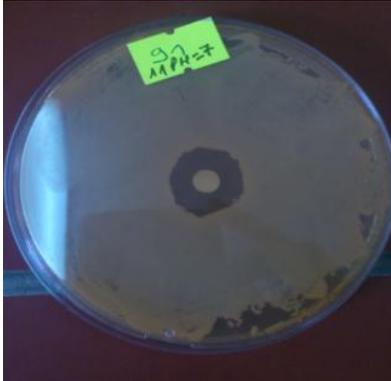
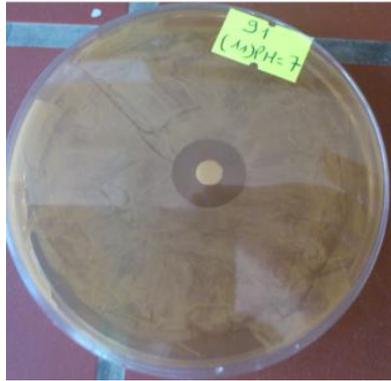
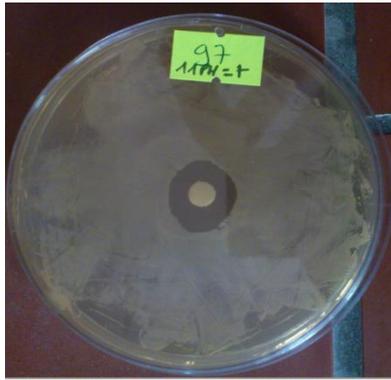
- *Résultats du test d'inhibition en présence de l'extrait "PE2":*





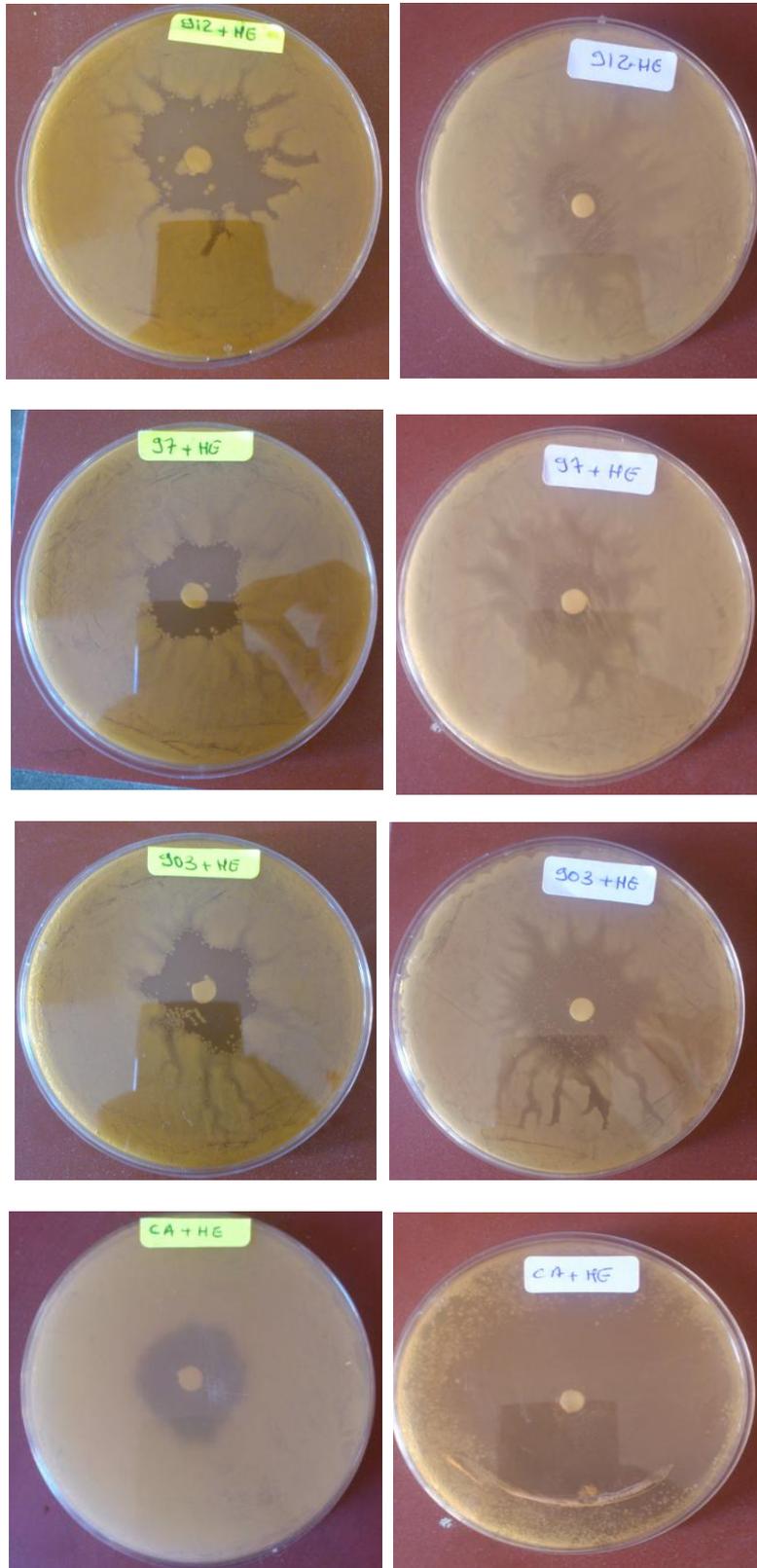
- Résultats du test d'inhibition en présence de l'extrait "PRP1":

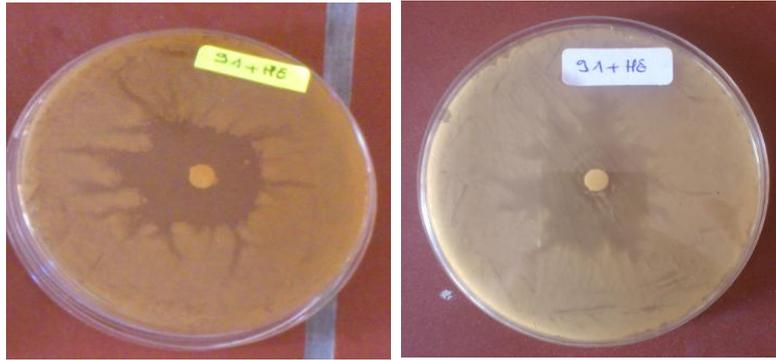




Annexe 5:

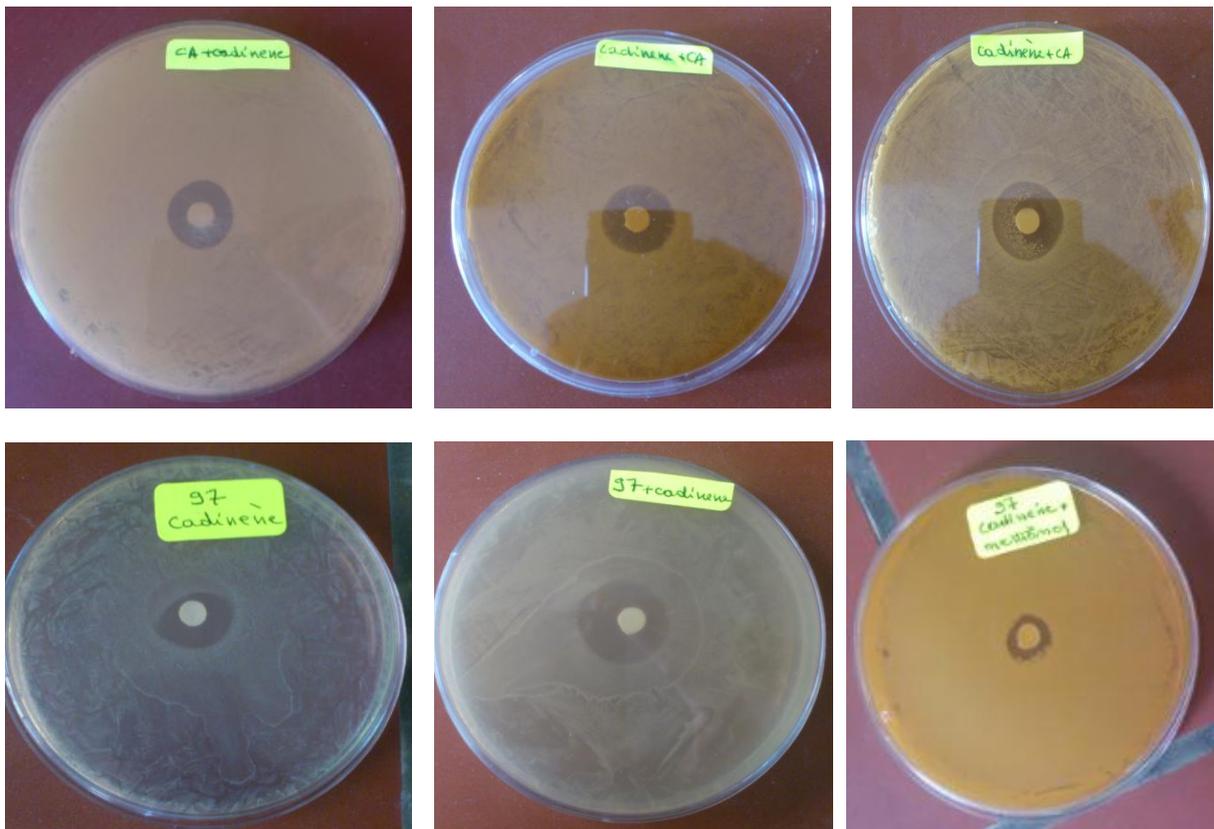
- *Résultats du test d'inhibition en présence de l'extrait "hydrodistillat":*

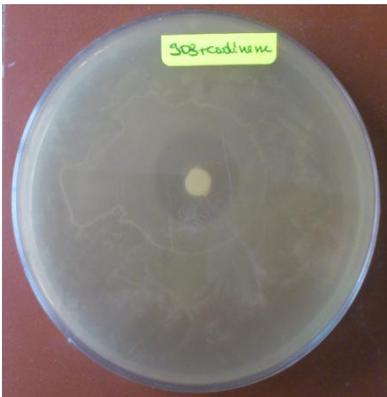
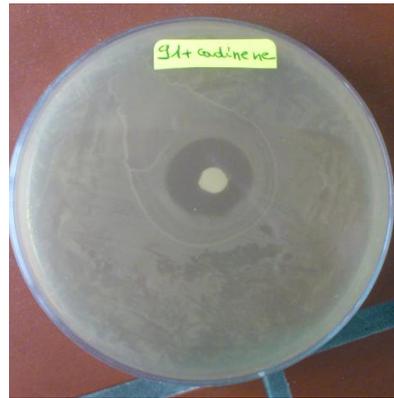




Annexe 6:

- *Résultats du test d'inhibition en présence de l'extrait "IE":*





Annexe 7:

- Résultats du test d'inhibition en présence des extraits du traitement alcalin de l'hydrodistillat:



Résumé:

L'huile de cade a été étudiée pour son pouvoir antiseptique. La caractérisation physico-chimique, essentiellement la solubilité, a été déterminée. Son fractionnement en milieu organique à trois pools moléculaires distincts, sans réelle activité antiseptique.

L'hydrodistillation de l'huile brute a extrait une huile essentielle inhibitrice pour toutes les souches microbiennes testées.

Le traitement alcalin de l'huile brute a libéré deux extraits, l'un polaire et l'autre apolaire présentant une activité inhibitrice avérée.

Mots clés:

Huile de cade, antiseptique, traitement alcalin, hydrodistillation.

Abstract:

Cade oil has been studied for its antiseptic properties. The physical and chemical characterization, mainly solubility was determined. Its division into organic medium in three distinct molecular pools exhibit no real antiseptic activity.

The steam distillation of crude oil extracted an inhibitory essential oil for all microbial strains tested.

The alkali treatment of the crude oil released two extracts, one polar and one apolar having inhibitory activity proved.

Keywords:

Cade oil, antiseptic, alkali treatment, hydrodistillation.