



بسم الله الرحمن الرحيم
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة قاصدي مرباح ورقلة
UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA

FACULTE DES SCIENCES APPLIQUEES
DEPARTEMENT DE GENIE DES PROCÉDES

THÈSE EN VUE DE L'OBTENTION D'UN DIPLÔME DE DOCTORAT ÈS
SCIENCES

Spécialité : Génie des Procédés

Intitulé

**Procédés de désinfection des eaux : Étude comparative entre
l'huile de cade et l'hypochlorite de sodium**

Présentée et Soutenue publiquement par :

M^{ame} SIBOUKEUR - HADJI Warda

Le : 03/07/ 2023

Devant le jury composé de :

<i>Bissati-bouafia. S</i>	Professeur	Uni. Kasdi Merbah Ouargla	Président
<i>Messaitfa. A</i>	Professeur	Uni. Kasdi Merbah Ouargla	Directeur de thèse
<i>Gherraf. N</i>	Professeur	Uni. LBM Oum-bouaghi	Examineur
<i>Ouahrani. M R</i>	Professeur	Uni. EHL El-Oued	Examineur
<i>Belkhalifa. H</i>	MR A	Directeur CRAPC Ouargla	Examineur
<i>Hamada. D</i>	MC A	Uni. Kasdi Merbah Ouargla	Examineur

Année universitaire : 2022 – 2023

Remerciment

Je remercie ALLAH le Tout-Puissant de m'avoir donné le privilège et l'opportunité d'étudier, qui m'a guidé avec la bénédiction de mes parents sur le chemin de la lumière, de la science et de la connaissance pour réaliser cette thèse.

*Au terme de ces travaux, je désire exprimer ma profonde gratitude à mon directeur de thèse, M.^R **MESSAITFA Amar**, professeur à l'Université **KASDI MERBAH** de Ouargla, pour ses orientations, sa patience, sa générosité, sa confiance et ses conseils, tout au long de ce voyage scientifique.*

*J'adresse mes remerciements aux membres du jury qui m'ont honoré et d'accepter d'examiner ce travail. Mes sincères remerciements à M^{ame} **Bissati-bouafia. Samia**, professeur à Université Kasdi Merbah Ouargla pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. Je remercie chaleureusement :*

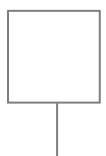
- *M.^R **Gherraf Noureddine**, professeur à Université de Larbi Ben Mhidi Oum-bouaghi.*
- *M.^R **Ouahrani Mohemmed Ridah**, professeur à Université de Echahid Hamma Lakhdar El-Oued.*
- *M.^R **Belkhalifa Hakim**, maitre chercheur « A » Directeur de CRAPC de Ouargla.*
- *M^{ame} **Hamada Djamila**, maitre conférence « A » Université Kasdi Merbah Ouargla.*

Un grand remerciement à M^{ame} Siboukeur Oumelkheir et M^r Didi Ould El Hadj Mohamed, M^{ame} Khalef Sakina, M^r Boual Zakaria, M^r Goudjil M^{ed} Bilal, et M^{elle} Zeghmi Zineb, pour leurs aides précieuses et leurs encouragements.

Je remercie tous les ingénieurs du centre de recherche à université de Ouargla, en particulier M^{elle} Ayachi Amor Asma l'ingénieur du Laboratoire de Génie De L'Eau Et De L'Environnement En Milieu Saharien (LG'EEMS).

En fin, Je remercie toutes personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail.

Merci encore une fois



الاهداء

الى كل من أحب هذا الدينوأحب علومه
.... الى كل من لامس القرآن شغاف قلبه..وخبايا
وجدانه فعكف على دراسته وتدبر آياته يبغى وجه الله
وحده

الى زوجي الذي ساندني وتمسك معي
بحبل المودة والرحمة والذي لم يبخل بشيء
من اجل دفعي ومؤازرتي في طريق النجاح

الى والديا حفظهما الله ورعاهما

الى روح جدي الذي زرع في قلبي حب طلب العلم

الى ابنائي قرة عيني وجواهر بيتي: بهاء الدين، ملاك، سلسبيل، ابراهيم، وهالة

الى أساتذتي الاجلاء من علموني حروفا من ذهب وكلمات من درر ومختلف العلوم، ممن لم يتوانوا في
مد يد العون لي

الى اخواتي الذين زرعوا في روحي الطموح وشاركوني الآمال

الى رفيقاتي الدرب اللاني لا تطيب المجالس الا بهن

الى كل من أسهم في هذه الاطروحة من قريب او بعيد

أهدي لكم أطروحة تخرُّجي.

الباحثة

Résumé

Procédés de désinfection des eaux : Étude comparative entre l'huile de cade et l'hypochlorite de sodium

Appelée localement « Gotrane », obtenue par combustion à haute température, de rameaux d'une essence forestière générant un liquide sombre épais et insoluble dans l'eau. Cette huile est connue par la majorité des algériens, en l'occurrence les habitants des zones rurales, pour son utilisation dans l'eau de boisson, afin de lui conférer une saveur agréable et de maintenir sa fraîcheur. Ce savoir-faire ancestral consiste à induire copieusement les parois internes d'un récipient en terre cuite (poterie), ou en peaux d'animaux domestiques (guerba) avec cette huile.

L'huile de cade, est obtenue par extraction à partir du Genévrier d'oxycèdre (*Juniperus oxycedrus*), ou du pin d'Alep (*Pinus halepensis*), en provenance de Djelfa (Sud-est algérien), par pyrogénéation, conformément à la méthode traditionnelle. L'analyse des espèces chimiques entrant dans la composition de cette huile, a été obtenue par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse (GC-MS). Les principaux composés identifiés sont des terpènes et des phénols (dehydroabietic acid (8,6%), α -cédrene (7,61%), calaménène (6,51%) et ferruginol (6,33%) avec l'huile de pin, et cedrane (13,78%), et α -vatirenene (6,77%) révélés de l'huile de cade. L'activité antibactérienne a été déterminée par trois tests d'antagonisme (méthodes des disques, méthodes des puits et de micro-atmosphère). À l'égard de 12 souches bactériennes pathogènes, l'huile de cade a montré une activité antimicrobienne contre toutes les souches testées avec une sensibilité accrue envers la souche de *Staphylococcus aureus*, et une activité fongicide contre 7 souches de champignons et 2 souches de levures.

Les résultats des tests de désinfection de l'eau dopée avec 1ml/l de l'huile de cade, montrent une diminution significative de tous les germes après deux heures de réaction. Une inhibition bactériostatique complète a été remarquée au bout d'une heure de réaction avec les coliformes fécaux, les streptocoques fécaux, et les *Salmonella typhi*, comparativement à l'effet de l'hypochlorite de sodium (eau de javel). Malgré cette efficacité, aucune inhibition n'a été relevée dans l'eau traitée avec l'huile fixée sur l'argile (la méthode traditionnelle), mais stimule la prolifération bactérienne, avec la neutralisation du pH de la solution et la perte du pouvoir efficace des huiles essentielles et leur matière active.

Mots-clés : Huile de cade, huile de pin, Hypochlorite de sodium, bactériostatique, fongicide, eau, désinfection.

الملخص

وسائل تطهير المياه: دراسة مقارنة بين زيت القطران وهيبوكلوريت الصوديوم

يُعرف محلياً باسم «القطران»، ويتم الحصول عليه عن طريق الاحتراق في درجة حرارة عالية، لاغصان وفروع بعض انواع الاشجار، حيث يولد سائل غامق سميك غير قابل للذوبان في الماء. وهذا النفط معروف لدى غالبية الجزائريين، وهذا حال سكان المناطق الريفية، لاستخدامه بشكل أساسي في مياه الشرب، لمنحه نكهة لطيفة وللحفاظ على برودته. تتمثل هذه المعرفة الموروثة في طلي الجدران الداخلية لحاوية الطين (الفخار)، أو في جلود الحيوانات الأليفة (القربة) بهذا الزيت.

يتم الحصول على زيت القطران عن طريق استخراج من شجرة العرعر الشريبي (*Juniperus oxycedrus*)، او الصنوبر الحلبي (*Pinus halepensis*)، القادم من ولاية الجلفة (جنوب شرق الجزائر)، عن طريق التولد الحراري (Pyrogénéation)، وفقاً للطريقة الجزائرية التقليدية. تم إجراء تحليل الأنواع الكيميائية المستخدمة في هذا الزيت بواسطة كروماتوغرافيا الغاز إلى جانب قياس الطيف الضوئي الكتلي (GC-MS). المركبات الرئيسية التي تم تحديدها هي التربينات والفينولات (dehydroabiatic acid) (8.6%)، α -cedrene (7.61%)، calamenene (6.51%) و ferruginol (6.33%) مع قطران الصنوبر، و cedrane (13.78%)، و α -vati renene (6.77%) تم الكشف عنها في قطران الطاقة. تم تحديد النشاط المضاد للبكتيريا من خلال ثلاثة اختبارات مضادة (طريقة القرص، وطريقة البئر، وطريقة الغلاف الجوي الجزئي) فيما يتعلق ب 12 سلالة بكتيرية مسببة للأمراض، وأظهر زيت القطران نشاطاً مضاداً للبكتيريا ضد جميع السلالات التي تم اختبارها مع زيادة الحساسية لسلالة المكورات العنقودية الذهبية (*Staphylococcus aureus*)، والنشاط الفطري ضد 7 سلالات فطرية وسلالتان من الخميرة.

تظهر نتائج اختبارات تطهير الماء بالقطران (1 مل/ لتر) انخفاضاً كبيراً في جميع الجراثيم بعد ساعتين من التفاعل. و لوحظ التثبيط الجرثومي الكامل بعد ساعة واحدة من التفاعل مع القولونيات البرازية والعقديات البرازية والسالمونيلا التيفي (*Salmonella typhi*) ، مقارنة بتأثير هيبوكلوريت الصوديوم (ماء الجافيل). على الرغم من هذه الفعالية، لم يلاحظ أي تثبيط في المياه المعالجة مع القطران المثبت على الطين (الطريقة التقليدية)، ولكنه يحفز تكاثر البكتيريا، وذلك بتعديل الأس الهيدروجيني للمحلول وفقدان القوة الفعالة للزيوت الأساسية ومكوناتها النشطة.

الكلمات الدالة: زيت القطران، زيت الصنوبر، هيبوكلوريت الصوديوم، ضد بكتيري، ضد فطري، الماء، التطهير.

Abstract

Water disinfection processes: a comparison study between cade oil and sodium hypochlorite

Locally called "Gotrane", obtained by burning at high temperatures, branches of a forest species generating a thick dark liquid insoluble in water. This oil is known by the majority of Algerians, in this case the inhabitants of rural areas, for its use in drinking water, to give it a pleasant flavor and to maintain its freshness. This ancestral know-how consists in generously inducing the inner walls of a container in terracotta (pottery), or in skins of domestic animals (guerba) with this oil.

The oil of cade, is obtained by extraction from the Cedar juniper (*Juniperus oxycedrus*), or the Aleppo pine (*Pinus halepensis*), from Djelfa (South-East Algeria), by pyrogenation, according to the traditional method. The analysis of the chemical species involved in this oil was obtained by gas chromatography coupled with mass spectrophotometry (GC-MS). The main compounds identified are terpenes and phenols (dehydroabiatic acid (8.6%), α -cedrene (7.61%), calamenene (6.51%) and ferruginol (6.33%) with pine oil, and cedrane (13.78%), and α -vati renene (6.77%) revealed from cade oil. Antibacterial activity was determined by three antagonism tests (disc methods, well and micro-atmosphere methods). For 12 pathogenic bacterial strains, cade oil showed antimicrobial activity against all strains tested with increased sensitivity to the *Staphylococcus aureus* strain, and fungicide activity against 7 fungal and 2 yeast strains.

The results of disinfection tests of water doped with 1ml/l of cade oil, show a significant decrease of all germs after two hours of reaction. Complete bacteriostatic inhibition was observed after one hour of reaction with faecal coliforms, faecal streptococci, and *Salmonella typhi*, compared to the effect of sodium hypochlorite (bleach). Despite this efficacy, no inhibition was found in water treated with oil fixed on clay (the traditional method), but stimulates bacterial proliferation, with the neutralization of the pH of the solution and the loss of the effective power of essential oils and their active ingredient.

Keywords: Cade oil, pine oil, sodium hypochlorite, bacteriostatic, fungicide, water, disinfection.

Liste des figures

Figure 1. Structure et vie dans un biofilm	10
Figure 2. Génération acoustique d'une bulle de cavitation par les ultrasons	19
Figure 3. Actions de différents biocides sur les bactéries, spores, champignons et virus	20
Figure 4. Les différentes formes des solutions et extraits de Javel.	33
Figure 5. Quelques exemples de problèmes mutagènes et cancérigènes associés aux THM.	38
Figure 6. Différentes formes de chlore résiduel total	39
Figure 7. Les différentes parties de Pin d'Alep (<i>Pinus halepensis</i>).....	54
Figure 8. Aire de répartition du <i>Pinus halepensis</i>	55
Figure 9. Aire de répartition du pin d'Alep en Algérie	56
Figure 10. <i>Juniperus oxycedrus</i>	59
Figure 11. Morphologie de <i>Juniperus oxycedrus</i>	60
Figure 12. Aire de répartition des genévriers en région méditerranéenne.....	61
Figure 13. Carte des groupes de végétations	62
Figure 14. Principe de distillation per descensum	65
Figure 15. Principe de distillation per ascensum	65
Figure 16. Anciens fours à cade	66
Figure 17. Coupe longitudinale d'un four à cade	67
Figure 18. Four à goudron végétal.....	67
Figure 19. Schéma de l'installation semi-industrielle	68
Figure 20. Régions ciblées par l'enquête ethnopharmacologique.....	80
Figure 21. Rameaux et fruits de <i>Juniperus oxycedrus</i> et de <i>Juniperus oxycedrus</i>	88
Figure 22. Carte de la situation géographique des sites d'échantillonnage.....	89
Figure 23. Station de Senalba Chergui	90
Figure 24. Station de Sehary Guebli.....	90
Figure 25. Stockage de la matière première (coupes sèches des troncs, des racines et des branches).....	90
Figure 26. Technique d'extraction d'huile de cade par pyrogénéation	91
Figure 27. Récupération du matériel d'étude « Gotrane ».....	92
Figure 28. Cinétique de l'optimisation de la température d'extraction par pyrogénéation des espèces étudiées	96
Figure 29. Rendement d'extraction des huiles obtenus à partir des espèces étudiées.....	97
Figure 30. Profil chromatographique d'huile de <i>P. halepensis</i>	102
Figure 31. Classes terpéniques des composés identifiés dans l'huile de <i>P. halepensis</i>	103

Figure 32. Classes chimiques des composés identifiés dans l'huile de <i>P. halepensis</i>	104
Figure 33. Profil chromatographique d'huile de <i>J. oxycedrus</i>	105
Figure 34. Mécanisme réactionnel du test DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH)	110
Figure 35. Principe de la méthode de diffusion par disque	113
Figure 36. Principe de la méthode de diffusion en puits	113
Figure 37. Principe de la méthode de micro-atmosphère	114
Figure 38. Activité antiradicalaire des huiles (goudrons) étudiés et de l'acide ascorbique .	118
Figure 39. Activité antibactérienne des huiles et de l'hypochlorite de sodium, par méthode des disques	121
Figure 40. Activité antibactérienne des huiles en comparaison avec l'hypochlorite de sodium, par méthode de des puits	121
Figure 41. Activité antibactérienne des huiles et d'hypochlorite de sodium, par méthode de micro-atmosphère	122
Figure 42. Concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles étudiées en comparaison avec l'hypochlorite de sodium	124
Figure 43. Effet du l'huile de pin sur le développement des souches fongiques	127
Figure 44. Effet d'huile de cade sur le développement des souches fongiques	128
Figure 45. Effet de l'hypochlorite de sodium sur le développement des souches fongiques	128
Figure 46. Cinétique de croissance mycélienne en fonction du temps et de la concentration de l'huile de pin	130
Figure 47. Cinétique de croissance mycélienne en fonction du temps et de la concentration de l'huile de cade	131
Figure 48. Cinétique de croissance mycélienne en fonction du temps et de la concentration de l'hypochlorite de sodium.....	132
Figure 49. Taux d'inhibition des souches en fonction de la concentration d'huile de pin....	132
Figure 50. Taux d'inhibition des souches en fonction de la concentration de l'huile de cade	133
Figure 51. Taux d'inhibition des souches en fonction de la concentration	133
Figure 52. Vitesse de croissance mycélienne en fonction de l'augmentation de la concentration de l'huile de pin	134
Figure 53. Vitesse de la croissance mycélienne sous l'effet de l'augmentation de la concentration de l'huile de cade	135
Figure 54. Vitesse de la croissance mycélienne sous l'effet de l'augmentation de la	

concentration de l'hypochlorite de sodium.....	135
Figure 55. Situation géographique de la STEP d'Ouargla.....	139
Figure 56. Lagune d'aération. STEP de Ouargla	140
Figure 57. Les trois types de récipients utilisé	152
Figure 58. L'effet désinfectant de l'huile de cade sur le taux de coliformes fécaux selon le milieu par la méthode traditionnel	153
Figure 59. L'effet désinfectant de l'huile de cade sur le taux de coliformes fécaux par contact direct	154
Figure 60. Evolution de la concentration des Staphylocoques en fonction de la concentration en huile de cade.....	156
Figure 61. Effet inhibiteur de l'huile de cade, à différentes concentrations sur les souches de staphylocoques	156
Figure 62. Effet des produits utilisés au cours du processus de désinfection.....	158
Figure 63. Variation de la température des eaux traitées avec des huiles (Gatrane) et l'hypochlorite de sodium en fonction du temps.....	159
Figure 64. Variation du pH des eaux traitées avec des huiles (Gatrane) et l'hypochlorite de sodium en fonction du temps.....	159
Figure 65. Variation de l'oxygène dissous des eaux traitées avec des huiles (Gatrane) et l'hypochlorite de sodium en fonction du temps.....	160
Figure 66. Variation de la conductivité électrique des eaux traitées avec des huiles (Gatrane) et de l'hypochlorite de sodium en fonction du temps	161
Figure 67. Variation de la salinité des eaux traitées avec des huiles (Gatrane) et l'hypochlorite de sodium en fonction du temps.....	161
Figure 68. Effets des huiles et de l'hypochlorite de sodium (à 37 °C) sur les germes totaux contenus dans l'eau polluée en fonction du temps.....	163
Figure 69. Effets des huiles (Gatrane) et l'hypochlorite de sodium (à 22°C) sur les germes totaux contenus dans l'eau polluée en fonction du temps.....	163
Figure 70. Evolution des coliformes fécaux en fonction du temps suite au traitement avec le « Gotrane » et l'hypochlorite de sodium.....	164
Figure 71. Evolution des entérocoques fécaux en fonction du temps suite au traitement avec des (Gatrane) et l'hypochlorite de sodium.....	165
Figure 72. Evolution des Salmonella typhi en fonction du temps suite au traitement avec des (Gatrane) et l'hypochlorite de sodium	165
Figure 73. Evolution des <i>Staphylococcus aureus</i> en fonction du temps suite au traitement avec des (Gatrane) et l'hypochlorite de sodium.....	166

Figure 74. Evolution d' <i>Escherichia Coli</i> en fonction du temps suite au traitement avec des huiles (Gatrane) et l'hypochlorite de sodium.....	166
Figure 75. Evolution des <i>Clostridium</i> sulfito-réducteurs en fonction du temps suite au traitement avec des (Gatrane) et l'hypochlorite de sodium	167
Figure 76. Évolution des levures et moisissures en fonction du temps suite au traitement avec des huiles (Gatrane) et l'hypochlorite de sodium	168
Figure 77. Expérience de l'effet désinfectant de l'eau avec les huiles adsorbantes sur support solide.....	170
Figure 78. Évolution des germes totaux (à 37 °C) en fonction du temps suite au traitement avec des huiles adsorbant sur support solide.....	171
Figure 79. Évolution des coliformes fécaux (CF) en fonction du temps suite au traitement avec des huiles adsorbant sur support solide.....	171
Figure 80. Évolution des Streptocoques fécaux (SF) en fonction du temps, suite au traitement avec des huiles adsorbées sur un support solide.....	172
Figure 81. Évolution de <i>Salmonella typhi</i> en fonction du temps, suite au traitement avec des huiles adsorbés sur un support solide.....	173
Figure 82. Évolution des <i>Staphylocoque aureus</i> en fonction du temps suite au traitement avec des goudrons adsorbés sur un support solide.....	173
Figure 83. Évolution de <i>Escherichia coli</i> en fonction du temps suite au traitement avec des huiles adsorbées sur un support solide.....	174
Figure 84. Évolution des levures et moisissures en fonction du temps suite au traitement avec des huiles adsorbées sur support solide	175
Figure 85. Poterie d'eau décorée extérieurement avec du Gotrane	177

Liste des tableaux

Tableau 1. Les caractéristiques principales des différents virus et les symptômes qu'ils engendrent chez l'individu infecté	7
Tableau 2. Principaux agents bactériens pathogènes d'origine fécale et les maladies transmises	8
Tableau 3. Le potentiel d'oxydation de certaines espèces	26
Tableau 4. Applications des POA dans le traitement des eaux	27
Tableau 5. Les grandes classes de composés organiques rencontrés dans les eaux naturelles	36
Tableau 6. Classification botanique de <i>Pinus halepensis</i>	55
Tableau 7. Taxonomie de plante <i>Juniperus oxycedrus</i>	61
Tableau 8. Composition de l'huile de cade	72
Tableau 9. Caractéristiques de la population visée par l'enquête	81
Tableau 10. Enquête ethnopharmacologique	82
Tableau 11. Situation géographique des sites d'étude.....	89
Tableau 12. Optimisation de la température d'extraction par pyrogénéation des espèces étudiées	95
Tableau 13. Rendement en goudron obtenus à partir des deux espèces étudiées.....	97
Tableau 14. Caractéristiques organoleptiques des huiles et de l'hypochlorite de sodium.....	98
Tableau 15. Profil comparatif des caractéristiques physico-chimiques des huiles et de l'hypochlorite de sodium	99
Tableau 16. Composition chimique d'une huile de <i>P. halepensis</i>	100
Tableau 17. Composés majoritaires du goudron de <i>J. oxycedrus</i>	105
Tableau 18. Caractéristiques des microorganismes tester.....	109
Tableau 19. Transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés (Ponce et al., 2003).....	113
Tableau 20. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et dilutions expérimentées	114
Tableau 21. Concentrations produit test/ PDA.....	116
Tableau 22. Résultats de concentration inhibitrice à 50%, des huiles étudiées, et l'acide ascorbique (Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n = 3))	118
Tableau 23. Activité antibactérienne des produits test en comparaison avec l'hypochlorite de sodium	120
Tableau 24. Concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles étudiées et de l'hypochlorite de sodium.....	125
Tableau 25. Méthodes d'analyses microbiologiques des eaux.....	143

Tableau 26. Méthode de nombre le plus probable (NPP) (table de Mac Grady) d'après la norme ISO 7218 : 1996.....	145
--	-----

Table des matières

<i>Remerciment</i>	i
Résumé.....	iii
المخلص.....	iv
Abstract.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des tableaux.....	x
Table des matières.....	xii
Liste des abréviations.....	xix
Introduction générale.....	1

Chapitre I

La désinfection des eaux et les différents désinfectants

I. Introduction.....	5
II. Désinfection.....	5
III. Micro-organismes et les biofilms.....	6
III.1. Micro-organismes et pathologies transmises par les eaux de boisson.....	6
III.1.1. Virus du milieu hydrique.....	6
III.1.1.1. Virus des hépatites.....	6
III.1.1.2. Entérovirus.....	6
III.1.1.3. Virus des gastro-entérites.....	7
III.1.2. Bactéries.....	8
III.1.3. Protozoaires.....	8
III.2. Biofilms.....	9
III.2.1. Résistances aux traitements.....	11
III.2.2. Limitations de la diffusion du biocide.....	11
III.2.3. Adaptations phénotypiques des cellules des biofilms.....	11
III.2.4. Cellules persistantes « persisters ».....	12
IV. Surveillance microbiologique des eaux de boisson.....	12
IV.1. Indicateurs bactériens de contamination fécale.....	12
IV.1.1. Germes aérobies.....	13
IV.1.2. Coliformes.....	13
IV.1.3. Streptocoques fécaux.....	14
IV.1.4. Spores de clostridium sulfita-réducteurs.....	15
IV.2. Normes microbiologiques.....	15
V. Solutions de traitement des eaux.....	15
V.1. Traitements physiques.....	16
V.1.1. Traitements thermiques.....	16
V.1.2. Ultraviolets.....	17
V.1.3. Filtration.....	18

V.1.4. Ultrasons.....	18
V.2. Traitements chimiques	19
V.2.1. Généralités sur les biocides (désinfectants).....	19
V.2.1.1. Définition et mode de fonctionnement.....	19
V.2.1.2. Choix d'un biocide	21
V.2.1.3. Résistance aux biocides et impacts environnementaux.....	21
V.2.2. Biocides oxydants	22
V.2.2.1. Chlore.....	22
V.2.2.2. Chloramines	22
V.2.3. Dioxyde de chlore	23
V.2.4. Ozone	24
V.2.5. Peroxyde d'hydrogène.....	25
V.2.3. Biocides non-oxydants	25
VI. Procédés d'oxydation avancée.....	26
VI.1. Radicaux hydroxyles.....	27
VI.1.1. Mécanismes de réaction des radicaux hydroxyles	27
VI.1.2. Radicaux hydroxyles et microorganismes	28
VII. Conclusion.....	29

Chapitre II

La désinfection par le chlore des eaux destinées à la consommation humaine

I. Introduction.....	31
II. Aspect chimique de la chloration et les produits utilisés.....	31
II.1. Chlore gazeux	31
II.2. Hypochlorite de sodium.....	32
II.3. Hypochlorite de calcium.....	34
III. Réaction avec les substances chimiques présentes dans l'eau	35
III.1. Action du chlore sur les composés minéraux de l'eau	35
III.2. Action du chlore sur les composés organiques de l'eau.....	35
III.3. Réactions d'oxydation annexes.....	37
III.3.1. Formation de trihalométhanes (THM)	37
III.3.2. Réactions à l'origine de goûts et d'odeurs.....	39
III.3.3. Incidence de la composante minérale sur la chloration de la matière organique	39
IV. Principales applications de la chloration.....	40
IV.1. Applications de l'hypochlorite de sodium.....	40
IV.2. Application du chlore au traitement de désinfection des eaux	40
V. Avantages et inconvénients du chlore	41
VI. Activité désinfectante du chlore.....	42
VI.1. Paramètres influençant l'efficacité du chlore	42
VI.2. Pratique de la chloration en Algérie.....	44

VI.3. Mécanisme d'inactivation des micro-organismes par le chlore.....	45
VI.3.1. Mécanisme d'inactivation des bactéries	45
VI.3.2. Mécanisme d'inactivation des virus	45
VI.3.3. Mécanisme d'inactivation des protozoaires.....	46
VI.4. Sensibilité des germes à la chloration	46
VII. Conclusion	50

Chapitre III

Aspect botanique des espèces végétales étudiées, et leurs huiles

I. Introduction.....	52
II. <i>Pinus halepensis</i> (Le pin d'Alep)	52
II.1. Description botanique.....	52
II.1.1. Genre pinus.....	52
II.1.2. Espèce <i>Pinus halepensis</i>	53
II.2. Classification botanique	54
II.3. Répartition géographique.....	55
II.3.1. Dans le monde	55
II.3.2. En Algérie.....	56
II.4. Usage traditionnel du pin.....	56
III. <i>Juniperus oxycedrus</i> (le Genévrier oxycèdre).....	58
III.1. Description botanique	58
III.1.1. Genre Juniperus.....	58
III.1.2. Espèce Juniperus oxycedrus.....	58
III.2. Classification botanique	60
III.3. Répartition géographique	61
III.3.1. Dans le monde.....	61
III.3.2. En Algérie	62
III.4. Usage traditionnel	62
IV. Goudron végétal de bois « Gotrane ».....	63
IV.1. Introduction.....	63
IV.2. Définition le goudron végétal « Gotrane ».....	64
IV.3. Mode d'extraction du goudron végétale « Gotrane ».....	64
IV.3.1. Distillation per descensum.....	64
IV.3.2 Distillation per ascensum	65
IV.4. Fours de distillation.....	66
IV.4.1. Fours anciens.....	66
IV.4.2. Fours modernes	68
IV.5. Types des essence végétales	68
IV.6. Huile de pin.....	69
IV.6.1. Propriétés physicochimiques du l'huile de pin.....	69

IV.6.2. Composition chimique du l'huile de pin.....	69
IV.6.3. Utilisations de l'huile de pin.....	70
IV.7. Huile de Cade (goudron de genièvre) :	70
IV.7.1. Propriétés physicochimiques du l'huile de cade.....	71
IV.7.2. Composition chimique de l'huile de cade.....	71
IV.7.3. Propriétés pharmacologiques de l'huile de cade.....	72
IV.7.4. Utilisation de l'huile de cade	73
IV.7.4.1. Utilisations en médecine vétérinaire	73
IV.7.4.2. Utilisations en médecine humaine.....	73
IV.7.4.3. Utilisations en fabrication des produits cosmétiques et pharmaceutiques	74
IV.8. Toxicité des goudrons végétal.....	74
V. Conclusion.....	76

Chapitre IV

Etude ethnopharmacologique des espèces végétales étudiées

I. Introduction.....	79
II. Matériel et méthodes	79
II.1. Description et choix des localités de l'enquête.....	79
II.2. Déroulement de l'enquête.....	81
III. Résultats et discussion	81
IV. Conclusion	85

Chapitre V

Caractérisation physico-chimique et la composition chimique des huiles étudiées

I. Introduction.....	88
II. Matériel et méthodes	88
II.1. Matériel végétal	88
II.2. Méthodes	91
II.2.1. Extraction des huiles.....	91
II.2.2. Caractérisation du matériel d'étude	92
II.2.2.1. Caractéristiques organoleptiques	93
II.2.2.2. Analyses physico-chimiques	93
II.2.2.2.1. Détermination des rendements en huile.....	93
II.2.2.2.2. Mesure de la densité relative à 20°C (AFNOR NFT60-214)	93
II.2.2.2.3. Mesure de pH (AFNOR NFT 04-408).....	94
II.2.2.2.4. Mesure de l'oxygène dissous	94
III. Résultats et discussion.....	95
III.1. Extraction du goudron végétal	95
III.2. Rendement d'extraction	97
III.3. Caractères organoleptiques d'essence végétale	98

III.4. Analyses physico-chimiques	99
III.4.1. Densité, pH, l'oxygène dissous.....	99
III.4.2. Analyses chromatographiques des goudrons végétaux.....	100
IV. Conclusion	106

Chapitre VI

Activités biologiques des huiles étudiées

I. Introduction.....	108
II. Matériel et méthodes	108
II.1. Matériel végétal	108
II.2. Matériel chimique.....	108
II.3. Matériel microbiologique	108
III. Méthodes d'évaluation des activités biologiques	109
III.1. Activité antioxydante	110
III.2. Activité antimicrobienne	111
III.2.1. Activité antibactérienne.....	111
III.2.1.1. Méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé (Aromatogramme).....	112
III.2.1.2. Méthode de diffusion en puits	113
III.2.1.3. Méthode de micro-atmosphère.....	114
III.2.2. Activité antifongique.....	115
III.2.2.1. Détermination de l'activité antifongique.....	115
III.2.2.2. Détermination de la concentration minimale fongicide	116
III.2.2.3. Détermination de l'indice antifongique.....	117
III.2.2.4. Détermination de la vitesse de croissance mycélienne (VC).....	117
IV. Résultats et discussion	117
IV.1. Activité antioxydante	117
IV.2. Activité antimicrobienne.....	119
IV.2.1. Activité antibactérienne	119
IV.2.2.1. Concentration minimale inhibitrice (CMI)	123
IV.2.2. Activité antifongique	126
IV.2.2.1. Cinétique de croissance mycélienne	129
IV.2.2.2. Indice antifongique (TI)	132
IV.2.2.3. La vitesse de la croissance mycélienne.....	134
V. Conclusion.....	137

Chapitre VII

Contribution à l'étude de la désinfection de l'eau par les huiles étudiées

I. Introduction.....	139
II. Matériel et méthodes	139
II.1. Matériel d'étude (eau)	139

II.2. Méthodes	140
II.2.1. Techniques de prélèvement des eaux	140
II.2.2. Méthodes d'analyses.....	141
II.2.2.1. Analyses physico-chimiques des eaux.....	141
II.2.2.1.1. Mesure de la température (T)	142
II.2.2.1.2. Mesure du potentiel d'hydrogène (pH).....	142
II.2.2.1.3. Mesure de la conductivité électrique (CE).....	142
II.2.2.1.4. Mesure de l'oxygène dissous (DO).....	142
II.2.2.1.5. Taux des sel dissous (TDS)	142
II.2.2.2. Analyses microbiologiques des eaux.....	142
II.2.2.2. 1. Dénombrement des germes totaux	144
II.2.2.2.2. Recherche et dénombrement des coliformes totaux, fécaux, et d' <i>E. coli</i>	144
II.2.2.2.3. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux.....	148
II.2.2.2.4. Dénombrement des <i>Clostridium</i> sulfito-réducteurs.....	149
II.2.2.2.5. Dénombrement des <i>Staphylococcus aureus</i>	150
II.2.2.2.6. Dénombrement des <i>Salmonella typhi</i>	150
II.2.2.2.7. Dénombrement des moisissures et levures	151
III. Stratégie de recherche	151
III.1. Rechercher le matériau le plus efficace pour un effet désinfectant optimal (effet type de récipient)	151
III.1.1. Préparation des échantillons.....	151
III.1.2. Résultats et discussions	152
III.2. Mettre en évidence de la concentration optimale pour une meilleure désinfection (effet concentration).....	154
III.2.1. Préparation des échantillons.....	154
III.2.2. Résultats et discussions	155
III.2.2.1. Effet de la concentration sur les Staphylocoques.....	155
III.2.2.2. Effet inhibiteur de l'huile de cade, à différentes concentrations.....	156
III.3. Effet des huiles utilisées sur le procédé de désinfection en comparaison avec l'hypochlorite de sodium.....	157
III.3.1. Mode opératoire	157
III.3.2. Résultats et discussions	158
III.3.2.1. Paramètres physico-chimiques.....	158
III.3.2.2. Paramètres bactériologiques.....	162
III.4. Désinfection de l'eau polluée par d'huile adsorbé par une surface poreuse : l'argile (effet adsorption).....	169
III.4.1. Méthode de fixation de l'adsorbant.....	169
III.4.2. Résultats et discussions	170
III.4.2.1. Paramètres physico-chimiques.....	170
III.4.2.2. Paramètres bactériologiques.....	171

IV. Discussion.....	175
V. Conclusion.....	177
Conclusion générale.....	180
Références bibliographiques.....	183
Annexe 01 : Fiche d'enquête ethnopharmacologique.....	198
Annexe 02 : Matériel utilisé lors de la recherche.....	202

Liste des abréviations

AFNOR : Association Française de Normalisation

AH : antioxydant

AHA : Acides haloacétiques

ADE : Algérie des Eaux

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ATCC : American Type Collection Culture

BEA : bile esculine azoture

BCPL : Lactosé au Bromo Crésol Pourpre

CE : Conductivité électrique

CF : Coliformes fécaux

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer

CMF : Concentration minimale fongicide

CMB : Concentration minimale bactéricide

CMI : La concentration minimale inhibitrice

CO : Monoxyde de carbone

CO₂ : Dioxyde de carbone

COD : Carbone organique dissous

COT : Carbone organique total

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

CSR : Clostridium sulfito-réducteurs

CT : Coliformes totaux

DL50 : La dose létale provoquant respectivement 50 % de mortalité

DC : croissance mycélienne

DO : Oxygène dissous

D/C : double concentration

EJ : Eau de Javel

EPS : Exopolysaccharides

FCI : Flash Chemicals Industry

FMAT : Flore mésophile aérobie totale

GC/MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Gp : Goudron de pin
GT : Germes totaux
HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HAV : Virus des hépatites A
Hc : Huile de cade
HEV : Virus des hépatites E
I (%) : Taux d'inhibition antiradicalaire
IC₅₀ : concentration inhibitrice à 50%
INRAP : Institut National de la Recherche et d'Analyse Physico-chimique
LGEEMS : Laboratoire de Génie de l'Eau et de l'Environnement en Milieu Saharien
MD : méthode de disque
MHA : Mueller Hinton
MM : méthode de micro-atmosphère
MON : Matière organique naturelle
MP : méthode de puit
MS : Spectrophotométrie de masse
NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standard
NPP : Nombre le plus probable
Obs : Obscurité
OMS : Organisation mondiale de la santé
ONA : Office Nationale d'Assainissement
OS : objectifs spécifiques
PDA : Potato Dextrose Agar
pH : Potentiel d'hydrogène
POA : Procédés d'oxydation avancée
psu: Practical Salinity Unit (g/Kg)
RI : Rétention linéaires
SAR : Système de résistances aux maladies acquises
SF : Streptocoques fécaux
SS : Salmonella Shigella
STEP : Station d'épuration

S/C : Simple concentration

T : Température

T (+) : Témoins positif

T (-) : Témoins négative

TBA : tryptonée contenant des sels biliaires

TDS : Taux des sel dissous

TGEA : glucosée tryptonée à l'extrait de levure

THM : Trihalométhanes

TI : Taux d'inhibition, ou Indice antifongique

TR : Temps de rétention

TSA : tryptonée au soja

UFC : Unités formant colonies

US : Ultra-sons

UV : Ultra-violet

VC : Vitesse de croissance mycélienne

VF : Viande-foie

Introduction générale

Introduction générale

Les essences végétales sont produites à partir de combustibles (le cade ou le genévrier, le pin, le hêtre, le bouleau, le cèdre...), portés à haute température. Ces différents combustibles donnent des huiles de composition dissemblable (**Dorvault,1994**).

Dans des prescriptions pharaoniques, l'huile de cade (goudron de cade), était préconisé en thérapie pour calmer les douleurs articulaires, soigner les brûlures locales, traiter les rhumatismes, les maladies cardiaques, l'épilepsie, l'inflammation des voies urinaires, ou encore contre les douleurs dentaires, thoraciques et contre la toux (**Kobeissi, 2002**). Il traitait également les maux d'estomac, cicatrisait les plaies, coagulait le sang et soignait les piqûres d'insectes (**Ashour, 1992**).

Très commun dans les régions semi-arides, et du moyen Atlas, l'huile de cade est appelée « Gotrane », produit connu pour son utilisation, notamment dans les eaux potables, dans le but de maintenir sa fraîcheur et lui conférer flaveur agréable. Ce savoir-faire ancestral consiste à induire copieusement les parois internes d'un récipient en terre cuite (poterie) ou en peaux d'animaux domestiques (guerba) avec cette huile.

Au vu des connaissances actuelles; peu d'informations scientifiques valorisables disponibles, sur l'utilité de cette huile, le présent travail s'est fixé comme objectif, l'étude de l'effet désinfectant de deux essences végétales (l'huile de cade vrai et l'huile vétérinaire), par des analyses physico-chimiques et bactériologiques, visant à déterminer leur effet désinfectant sur des germes indicateurs de contamination fécale et des germes pathogènes, comparativement avec l'effet de l'hypochlorite de sodium (eau de Javel), et de vérifier ainsi l'efficacité, voir la validité de la méthode traditionnelle.

Pour se faire, nous avons procédé à l'analyse qualitative et quantitative des espèces biochimiques entrant dans ces compositions. Nous nous sommes intéressés parallèlement aux activités, antimicrobiennes et antioxydantes, de ces huiles obtenues par pyrogénéation. Le second objectif, à pour but l'étude de l'effet désinfectant des essences végétales sur l'activité biologique notamment bactérienne et fongique.

Les expérimentations ont été réalisées au Laboratoire de Génie de l'Eau et de l'Environnement en Milieu Saharien (LGEEMS), de l'université de Ouargla. Ce travail est scindé en deux parties :

La première relative à l'étude bibliographique se focalisant sur :

- La désinfection des eaux et les différents désinfectants;
- La désinfection des eaux destinées à la consommation humaine par l'eau de Javel;
- Aspect botanique des espèces végétales étudiées, et leurs essences végétales.

Introduction générale

La deuxième présente les techniques utilisées, et les résultats obtenus. Dans cette partie quatre axes de recherche sont abordés:

- Etude ethnopharmacologique des espèces végétales étudiées ;
- Caractérisation physico-chimique et composition chimique des huiles étudiées;
- Activités biologiques des huiles étudiées ;
- Contribution à l'étude de la désinfection des eaux par les huiles étudiées.

Partie bibliographique

Chapitre I

La désinfection des eaux et les différents désinfectants

Chapitre I

La désinfection des eaux et les différents désinfectants

I. Introduction

L'eau, élément vital, porte de nombreux pathogènes (bactéries, virus, parasites, etc), était un lien essentiel dans la transmission de redoutables maladies infectieuses : choléra, typhoïde, dysenterie bacillaire, poliomyélite. Les maladies d'origine hydrique ont causé plus de décès que les guerres elles-mêmes (**White, 1995**). La relation entre ces maladies et l'eau potable n'a été établie qu'en 1854, pendant la violente épidémie de Londres, lorsque l'eau contaminée a joué un rôle dans la propagation du choléra (**Snow, 1855**). Cependant, ce n'est qu'en 1883, environ 30 ans plus tard, que des bactéries ont été découvertes comme agents contagieux. Lorsqu'on a compris le rôle de ces micro-organismes, on a mis au point des méthodes d'analyse microbiologique et de désinfection (**Snow et al., 1936**).

La chloration de l'eau et la création de réseaux d'approvisionnement public, ainsi que les avancées en hygiène et nutrition, vaccination et antibiothérapie, ont fait disparaître les pays industrialisés au cours du 20ème siècle, des grandes épidémies historiques. Cependant, à la fin du dernier siècle, la transmission des maladies infectieuses par l'eau potable demeure un problème actuel. L'apparition épisodique d'épidémies aiguës et localisées de gastroentérite, de salmonelle et d'hépatite virale est observée. L'épidémie du Havre en 1990 en est un exemple récent. On dit que ces épidémies augmentent légèrement, surtout au Royaume-Uni (**CDR, 1984**) et aux États-Unis (**Craun, 1978**), sans vraiment savoir si cette augmentation reflète une réalité ou une amélioration de la surveillance épidémiologique. Outre les infections épidémiques que nous essayons de recenser, il y a un autre problème : celui des infections endémiques chroniques (gastro-entérite et diarrhée) pour les populations régulièrement approvisionnées en eau non conforme aux normes microbiologiques de l'eau potable.

II. Désinfection

La désinfection est un procédé qui vise à éliminer ou inactiver des microorganismes pathogènes, dans le sens où elle empêche leur développement et leur prolifération (**Rodier et Merlet, 2009**), de telle sorte que ces microorganismes soient incapables de causer des maladies. Elle inclut également dans certains cas une quantité résiduelle, qui garantit la rémanence du produit désinfectant dans le système de distribution.

La désinfection des eaux comporte deux étapes importantes correspondant à deux effets différents d'un désinfectant (ou biocide) donné:

- L'effet bactéricide (capacité à détruire les germes) ;
- L'effet rémanent (propriété d'un désinfectant de persister dans l'eau un certain temps après son introduction) (Merlet, 2009).

III. Micro-organismes et les biofilms

III.1. Micro-organismes et pathologies transmises par les eaux de boisson

Les principaux micro-organismes contaminants présents dans l'eau potable sont les bactéries, les virus et les protozoaires pathogènes. La grande majorité de ces germes nocifs sont rejetés dans le milieu aquatique par les matières fécales humaines ou animales (Schwartzbrod, 1991).

III.1.1. Virus du milieu hydrique

Les virus abondent le milieu aquatique, aussi bien douces ou marines. Plus de 130 virus pathogènes ont été identifiés dans les fèces humains (Schwartzbrod, 1991).

III.1.1.1. Virus des hépatites

Deux types de virus responsables de l'apparition de l'hépatite sont excrétés dans les selles et sont susceptibles d'être transmis par ingestion d'eau. Il s'agit des virus de l'hépatite A (VHA) et de l'hépatite E (VHE). Ces virus se multiplient dans les cellules hépatiques et sont ensuite éliminés par les voies biliaires. Les symptômes observés sont la jaunisse accompagnée d'asthénie, d'anorexie, de douleurs, de troubles digestifs et habituellement de fièvre modérée. Le VEH est tenu responsable de l'épidémie d'hépatite de 1956 à New Delhi, dans les eaux de distribution contaminées par les eaux usées, où 30000 cas ont été enregistrés. Mais ces épidémies ne se limitent pas aux pays en développement (Schwartzbrod, 1991). En France, les populations paient le prix fort de cette maladie et son origine hydrique semble être courante, comme en témoignent certaines épidémies (Leclerc et al., 1982). Quelle que soit sa fréquence, l'hépatite est considérée comme la pathologie majeure qui reste liée à la distribution de l'eau.

III.1.1.2. Entérovirus

Le nom de ce groupe de virus vient du fait qu'ils effectuent une partie de leur phase de multiplication dans les intestins. Le genre des entérovirus inclut:

- *Les Poliovirus* : L'infection qu'ils causent est inapparente dans 90 % des cas (Schwartzbrod, 1991). Les manifestations cliniques entraînent le plus souvent de

la fièvre ou même des réactions méningées, la poliomyélite aiguë étant exceptionnelle.

- **Les Coxsackievirus et les Echovirus** : Ils sont responsables de paralysie, méningite aseptique, rhinite et diarrhée épidémique aiguë. 80 cas de méningite aseptique d'origine hydrique ont été signalés en Europe en 1984, causés par un virus *Echo 4* (Cliver, 1985).
- **Les Entérovirus 68 à 71** : Ils peuvent causer des troubles respiratoires, une méningite, une encéphalite et une conjonctivite hémorragique.

III.1.1.3. Virus des gastro-entérites

Il apparaît de plus en plus semblable que les gastro-entérites et les diarrhées qui surviennent dans les pays industrialisés, sans cause connue, soient d'origine virale (Leclerc, 1989). Plusieurs groupes de virus d'excrétion fécale sont impliqués. Le tableau 1 montre les caractéristiques principales de ces différents virus et les symptômes qu'ils engendrent chez la personne infectée.

Tableau 1. Caractéristiques principales des différents virus et les symptômes qu'ils engendrent chez l'individu infecté (Schwartzbrod, 1991).

Genre (Année d'implication dans la pathologie digestive) (Brochot, 2012)	Caractéristiques principales	Symptômes
Rotavirus (1973)	Considérés comme les agents majeurs des gastro-entérites aiguës sporadiques des jeunes enfants (50 % des enfants hospitalisés pour gastro-entérites en période hivernale)	- Asymptomatique chez l'adulte. Chez l'enfant : - Vomissements - Fièvre - Diarrhée
Réovirus	-	- Diarrhée - Symptômes respiratoires
Calicivirus (1972)	-	- Vomissements - Diarrhée - Maux de tête - Diarrhée
Virus de Norwalk	Incubation courte Symptômes de courte durée	- Nausées et vomissements - Asthénie - Fièvre peu élevée
Astrovirus (1975)	Responsables d'épidémies de gastro-entérite bénignes chez l'enfant et l'adulte	- Diarrhée
Parvovirus	-	- Vomissements - Fièvre
Coronavirus (1980)	Responsables de gastro-entérites chez l'adulte, d'entéocolites sclérosantes chez le nouveau-né	
Coronavirus like (agent de Breda ou de Berne)	Seraient responsables de gastro-entérites chez le nouveau-né et de gripes intestinales chez l'adulte	

Adénovirus entérique (1981)	Episodes gastro-entériques marqués chez l'enfant de moins de 2 ans. Responsables de 4 à 8 % des gastro-entérites infantiles	- Fièvre - Diarrhée - Vomissements
-----------------------------	---	--

III.1.2. Bactéries

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires rigides de la même taille que les petites particules de limon ou les grosses particules d'argile (0,5-10 µm). Parmi les bactéries pathogènes présentes dans l'eau potable comprennent :

- *Salmonella typhi et paratyphi*, responsables de la fièvre typhoïde et paratyphoïde
- *La dysenterie shigelale*, qui provoque une dysenterie bacillaire
- *Vibrio cholerae*, agent du choléra.

Leur disparition des eaux traitées et désinfectées a laissé la place à une plus grande diversité bactérienne avec les agents responsables de gastro-entérites et de diarrhées banales (Gerba et al., 1975). Les principales bactéries associées à ces manifestations intestinales sont rapportées dans le tableau 2.

Tableau 2. Principaux agents bactériens pathogènes d'origine fécale et les maladies transmises (Gerba et al., 1975).

Genres	Espèces	Maladies
<i>Salmonella</i>	<i>typhi</i> <i>paratyphi</i>	Fièvre typhoïde, Gastro-entérite Fièvre, paratyphoïde
<i>Shigella</i>	<i>dysenteriae</i> autres <i>shigella</i>	Dysenterie bacillaire Gastro-entérite, diarrhée
<i>Vibrio</i>	<i>cholerae</i> autres <i>vibrios</i>	Choléra Gastro-entérite, diarrhées
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	Gastro-entérite, diarrhées
<i>Yersinia</i>	<i>enterocolitica</i>	Diarrhées, septicémie, Entérocolite aigue
<i>Leptospira</i>	-	Leptospirose
<i>Legionnella</i>	-	Diarrhées, pneumopathies

III.1.3. Protozoaires

Parmi les protozoaires dangereux pour l'homme, on mentionne l'*Entamoeba Ristolytica* responsable de la dysenterie amibienne qui est répandue surtout dans les pays tropicaux, sans négliger ses effets dans les pays tempérés et froids. En France et dans les pays développés, ce n'est pas une maladie rare, surtout chez les sujets exposés (Leclerc, 1982). *Giarda Lamblia*, un pathogène intestinal responsable de diarrhée prolongée, est

prédominant dans les maladies d'origine hydrique. *Giardia* est la principale cause d'infections hydriques aux États-Unis (**Leclerc, 1982**).

Une autre famille de protozoaires est considérée comme un contaminant majeur de l'eau : *Cryptosporidium*, responsable de diarrhée aqueuse. Des infections de ce type ont souvent été décrites chez les malades du SIDA et ont ainsi attiré l'attention de la communauté médicale. Plusieurs centaines de personnes ont été infectées par *Cryptosporidium* en 1988 dans deux villes côtières de Grande-Bretagne (**Smith et al., 1989**).

III.2. Biofilms

Les biofilms combinent des communautés microbiennes, sont généralement très diverses (bactéries, protistes, algues, champignons), qui sont caractérisées par des cellules attachées à un substrat ou une interface et entre eux, ancrés dans une matrice d'exopolymères qu'ils ont produits. Ils présentent un phénotype plus ancien qui correspond aux taux de croissance et de transcription des gènes (**Donlan et Costerton 2002**). Leur stabilité est alors plus importante (**Costerton et al., 1987**). Les biofilms sont donc une accumulation de microorganismes (organismes unicellulaires), les substances polymériques exopolysadiques extracellulaires (SPE), les cations multivalents, les particules inorganiques, les matières biogéniques (débris) mais aussi les composés colloïdaux et dissous.

Ils se composent principalement de polysaccharides, mais aussi de protéines, d'acides nucléiques, de lipides et de substances humiques (**Wingender et al., 1999**). Ils représentent entre 50 et 90 % de la matière organique totale des biofilms (**Christensen et Characklis, 1990**).

EPS joue un rôle très important dans les biofilms car ils déterminent l'intégrité structurelle et fonctionnelle des agrégats microbiens. Ils donnent cette dimension 3-D aux biofilms, sous la forme d'un « gel » fortement hydraté – jusqu'à 97 % d'eau (**Geesey, 1982; Zhang et al., 1998**) et chargé localement (principalement anionique en raison de la présence d'acides uroniques (**Sutherland, 2001**) où les micro-organismes sont plus ou moins immobiles. L'EPS est responsable de la cohésion entre les cellules et d'autres composés particuliers, mais aussi de l'adhésion à un substrat (**Flemming et al., 2009**).

La formation des biofilms est variable. Cependant, un schéma général de développement a été reconnu : l'attachement initial à une surface, suivie par la formation de micro-colonies, et enfin la maturation de ces colonies en biofilms, qui sont maintenus sous une forme stable

par EPS (Fig. 1).

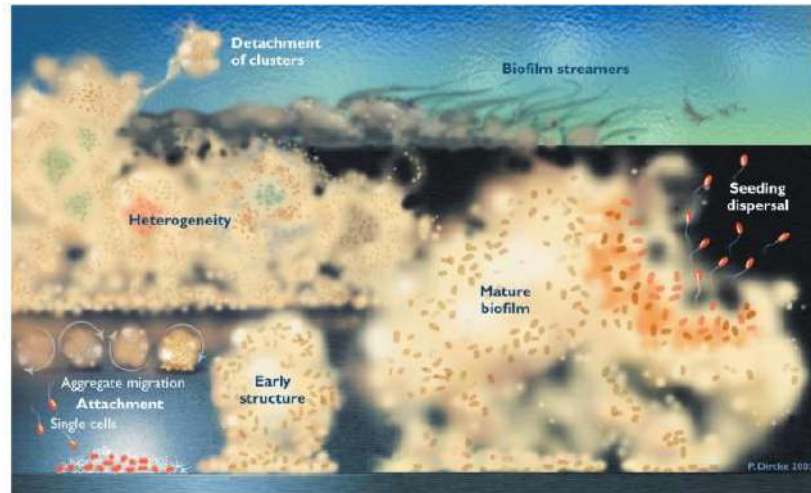


Figure 1. Structure et vie dans un biofilm (Flemming et al., 2009)

D'après Costerton (2007), les biofilms ont un mode de vie qui leur permet de :

- La biodiversité liée à différents gradients;
- Facilitation des échanges génétiques;
- Rétention enzymatique extracellulaire;
- L'accès aux particules biodégradables par la colonisation;
- Le recyclage des éléments nutritifs à mesure que les cellules lysées sont retenues dans le biofilm ;
- Protection contre les biocides et autres stress.

Les biofilms présentent une hétérogénéité de structure et de fonction avec un réseau de pores et de canaux. Chaque biofilm est unique parce que sa formation est liée à l'environnement dans lequel il se développe (O'Toole et al., 2000; Sutherland, 2001; Branda et al., 2005; Flemming et al., 2009). Ainsi, des paramètres tels que le pH, la température et l'oxygène détermineront les espèces qui constitueront ces consortiums bactériens. En outre, la présence de particules, offrira une surface de développement supplémentaire. D'autre part, des débits élevés et des forces de cisaillement élevées détacheront plus facilement ces biofilms (Bott, 1998; Viera et al., 1999), limitant leur développement et augmentant la quantité de microorganismes dans l'eau (Levi, 2001).

Dans de nombreux cas, les biofilms résultent non seulement d'une accumulation indésirable de matériel biologique à la surface, mais aussi de la précipitation de minéraux (carbonate de calcium en particulier), constituant ainsi un mélange de dépôts biologiques

et non biologiques qui sont particulièrement difficiles d'éliminer (**Flemming et al., 2009**).

III.2.1. Résistances aux traitements

Les biofilms ont une population hétérogène et structurée (**Luppens et al., 2002**). Regroupement d'un ensemble d'espèces ayant des interactions entre des micro-organismes d'une même espèce et différentes espèces, ce qui est synonyme d'une grande complexité (**Sutherland, 2001**). Ils peuvent, par leur structure, développer différents niveaux de résistance à un biocide (**Mah et O'Toole 2001**). Ainsi, les cellules proches de l'interface biofilm/eau de circulation seront partiellement protégées par la matrice exopolysaccharidique et par des enzymes qui inactivent certains agents microbiens. Les cellules en position intermédiaire se développeront plus lentement, ce qui leur permettra de se protéger et de le faire grâce à toutes les cellules présentes dans la couche externe (**Phull et al., 1997**). D'autres sous-populations cellulaires peuvent exprimer un phénotype de résistance spécifique, induit par des facteurs environnementaux spécifiques. Les mécanismes de résistance exacts des biofilms dépendent principalement des biofilms, du biocide utilisé et des conditions environnementales (**Schulte et al., 2005**). Plusieurs modes d'interaction entre biocide et biofilms ont été mis en évidence.

III.2.2. Limitations de la diffusion du biocide

Les biocides sont souvent des molécules hautement réactives qui peuvent réagir avec la matière organique : les protéines, les acides nucléiques. Ils peuvent donc réagir avec les composants du biofilm, modifiant ou modifiant la perméabilité de la membrane cytoplasmique ou de la paroi cellulaire (**Brözel et Cloete, 1991, et 1993**), produisant des gradients de concentration (zones à faibles concentrations biocides) (Stewart et al., 1998).et en limitant leur diffusion (**Costerton et al., 1987; De Beer et al., 1 994; Chen et Stewart, 1996; Xu et al., 1996; Stewart et al., 1998**). Cette diffusion limitée du désinfectant dans le biofilm semble davantage liée à l'interaction entre le biocide et la matrice extracellulaire des biofilms (EPS) (**Christensen et Characklis, 1990; Levi, 2001**), le plus souvent par réaction ou absorption, plutôt que des interférences stérique (**Bridier 2011; Habimara 2011; Guiot 2002**).

III.2.3. Adaptations phénotypiques des cellules des biofilms

La limitation de la pénétration des biocides dans les biofilms peut également être liée au développement de réponses adaptées des microorganismes aux concentrations sublétales (**Bridier et al., 2011**) par l'introduction d'enzymes pour inhiber un biocide (**Heinzel, 1988; Fiorenza et Ward, 1997; Schulte, 2003**). La présence d'un faible taux de

croissance des biofilms leur permettra également d'effectuer les changements physiologiques nécessaires à leur implantation lors de leur formation. Ils seront alors plus résistants aux stress environnementaux (traitements de choc thermique, changements de pH, présence de biocides) (Schulte et al., 2005). En effet, le schéma de croissance des biofilms a été noté dans de nombreuses études comme un mécanisme de résistance important (Morton et al., 1998; McDonnell et Russell, 1999; Lewis, 2001; Mah et O'Toole, 2001), qui résulte de l'expression de gènes spécifiques en réponse aux micro-gèneles conditions environnementales qui lui sont imposées (Bridier et al., 2011). Face au stress général, les biofilms peuvent également développer un phénotype spécifique par activation génétique (Schulte et al., 2005) et des mutations génétiques (Hall, 1990 ; Boles et Singh, 2008; Mai-Prochnow et al., 2008), aboutissant à l'émergence de sous-populations plus résistantes. Toute une population peut alors s'adapter à des conditions défavorables (Boles et al., 2004).

III.2.4. Cellules persistantes « persisters »

C'est une catégorie de cellules qui survivent et sont préservées malgré la présence d'un agent antimicrobien. Ce phénomène a été mis en évidence par l'absence d'efficacité supplémentaire d'un agent antimicrobien malgré l'augmentation de sa concentration (Lewis, 2001). Ces persistants ne sont pas des cellules mutantes et ne représentent pas un état particulier dans le cycle cellulaire. On pense qu'ils sont le résultat d'un mécanisme de sécurité qui permettrait de produire des cellules capables de survivre si toute la population est atteinte par un traitement (Lewis, 2001).

IV. Surveillance microbiologique des eaux de boisson

La surveillance microbiologique vise à s'assurer que, au moment de l'utilisation, l'eau de boisson ne contient pas de microorganismes pathogènes.

IV.1. Indicateurs bactériens de contamination fécale

Il est théoriquement, techniquement et financièrement impossible de rechercher dans l'eau potable tous les micro-organismes susceptibles de provoquer des infections. Par conséquent, les hygiénistes ont dû utiliser des méthodes indirectes pour évaluer la contamination de l'eau, en raison du fait que la grande majorité des pathogènes d'origine hydrique sont fécaux. La détection de la contamination des eaux fécales est donc un excellent signe d'avertissement (Prescott et al., 2003).

Cette contamination fécale peut être détectée par la présence de germes qui sont, exclusivement ou généralement, des hôtes permanents des intestins humains ou des

animaux à sang chaud. Ces germes sont appelés "germes témoins de contamination fécale" ou "indicateurs bactériens". Leur présence dans l'eau potable indique l'existence d'une chaîne de contamination entre les matières fécales et l'eau. L'existence de cette chaîne présente le risque d'un éventuel passage de germes pathogènes pouvant provoquer des infections (**Prescott et al., 2003**).

Les bactéries indicatrices doivent avoir de nombreuses qualités pour jouer pleinement leur rôle, en particulier, elles doivent être:

- Présents dans l'eau en même temps que les germes pathogènes;
- Facile et rapide à détecter et à identifier, à un coût modéré;
- Non pathogènes;
- Semblables aux pathogènes en termes de leur comportement dans l'eau et de leur résistance aux traitements physico-chimiques (sédimentation, filtration, désinfection, etc.). Cette caractéristique permettra notamment d'évaluer l'efficacité des traitements de l'eau pour ces micro-organismes (**Prescott et al., 2003**).

Les germes-test actuellement recherchés en routine en Algérie sont:

IV.1.1. Germes aérobies

Le nombre total de germes aérobies n'est pas spécifique d'une contamination fécale. En effet, l'eau contient toujours un certain nombre de micro-organismes qui constituent sa "flore spécifique", inoffensive pour la santé. Ce qui importe, ce sont les variations possibles de cette population, déterminées dans différentes conditions climatiques.

Ainsi, des fluctuations importantes du nombre de bactéries aérobies signifient que la ressource est mal isolée de l'environnement et est contaminée par l'infiltration des eaux de surface.

Ce nombre permet également d'évaluer la détérioration de la qualité de l'eau dans les réseaux. Il faut donc surveiller l'évolution de la flore bactérienne de l'eau et ne pas considérer le résultat d'une seule analyse (**A.G.1.f.f.M, 1991**).

IV.1.2. Coliformes

Les coliformes sont un groupe plutôt hétérogène d'espèces bactériennes appartenant à la famille des Entérobacteriaceae. L'étude de ces coliformes est intéressante à deux points de vue :

- Un très grand nombre de coliformes vivent en abondance dans les selles des animaux à sang chaud
- Leur résistance aux agents antiseptiques est proche de celle des bactéries pathogènes.

Pratiquement tous les coliformes peuvent exister dans les selles des humains et des animaux à sang chaud. Cependant, certains sont aussi des hôtes du sol et de l'eau, tandis que d'autres ne peuvent vivre que dans un habitat fécal. La présence de ce dernier est la preuve que l'eau a subi une contamination fécale, alors que la présence d'autres n'est pas nécessairement liée à une telle pollution.

Les coliformes qui vivent dans l'intestin acquièrent des propriétés particulières, caractéristiques de cet habitat ; parmi ceux-ci, une meilleure résistance aux températures croissantes, ce qui leur permet de croître à 44°C, et leur vaut le qualificatif de "thermotolérant". Parmi ces coliformes thermotolérants, *Escherichia coli* est l'espèce type de germes dont l'habitat fécal exclusif est le plus fréquent dans ce groupe et constitue le meilleur indicateur de contamination fécale des eaux non traitées (**Gulludec, 1995**).

L'intérêt d'utiliser ce groupe comme indicateur de contamination fécale est justifié par la similarité de leur comportement dans la nature avec celui des microorganismes pathogènes. En outre, leur concentration dans l'eau est proportionnelle au degré de pollution causée par les matières fécales (**G.S.E., 2003**).

IV.1.3. Streptocoques fécaux

Les streptocoques fécaux sont ceux qui possèdent l'antigène du groupe D. La plupart sont des germes exclusifs de l'intestin humain ou des animaux à sang chaud, certains sont ubiquistes. Ce manque de spécificité pour certaines espèces streptococciques implique de combiner leur recherche avec celle des coliformes thermotolérants qui permet, à son tour, d'affirmer l'existence de contamination fécale.

Les streptocoques du groupe D ont l'intérêt d'être très résistants et donc plus durables, ce qui permet de détecter les anciennes contaminations. Leur résistance aux agents désinfectants pourrait être comparable à celle des virus, ce qui leur permettrait de mieux représenter la contamination virale dans l'eau traitée.

Enfin, parmi les espèces fécales, il y a une spécificité relative de l'habitat qui peut être utilisée pour déterminer l'origine de la contamination. En effet, *Streptococcus faecalis* est prédominant dans l'intestin humain, tandis que *Streptococcus faecium* est plus abondant chez les bovins (ovins) (**G.S.E., 2003**).

IV.1.4. Spores de clostridium sulfita-réducteurs

Les *Clostridium* ne sont pas des hôtes exclusifs de l'intestin de l'homme. Ils se trouvent également dans l'environnement tellurique. D'autre part, les spores de clostridium ne peuvent pratiquement pas être éliminées par la chloration, et il faut pour le faire recourir à la filtration. C'est pourquoi leur présence ne doit pas être considérée comme un témoin de contamination fécale, mais comme une insuffisance de la filtration naturelle des sols ou de la filtration sur sable, dans le cadre d'une station de traitement.

Quand toutes ces spores ont été éliminées, cela signifie que tous les germes de taille analogue et plus grands ont été éliminés, notamment certains parasites (**A.G.1.f.f.M, 1991**).

IV.2. Normes microbiologiques

L'OMS (2000), stipule que:

1- L'eau ne doit pas contenir d'organismes pathogènes, en particulier des Salmonelles dans 5 litres d'eau prélevée, de Staphylocoques pathogènes dans 100 ml d'eau prélevée, de bactériophages fécaux dans 50 ml d'eau prélevée et d'entérovirus dans un volume ramené à 10 litres d'eau prélevée.

2- 95% au moins des échantillons prélevés ne doivent pas contenir de coliformes fécaux, dans 100 ml d'eau prélevée.

3- L'eau ne doit pas contenir de coliformes thermotolérants et de streptocoques fécaux, dans 100 ml d'eau prélevée (**G.S.E, 2002 ; US EPA, 2000**).

4- L'eau ne doit pas contenir plus d'une spore de bactérie anaérobie sulfito-réductrice par 20 ml d'eau prélevée.

V. Solutions de traitement des eaux

Alors que les principales maladies d'origine hydrique ont maintenant disparu des pays développés, elles ont cédé la place à des pathologies bénignes qui sévissent sous forme d'épidémies. L'eau comme réservoir et véhicule d'agents pathogènes reste une noble réalité d'inventeur. En outre, il ne faut pas oublier qu'il y a de nombreuses épidémies d'infection dans le monde qui peuvent être exportées grâce à la rapidité du transport, et que seul un individu infecté peut infecter des centaines à travers ses selles, en cas de contact accidentel entre les eaux usées et l'eau potable.

Par ailleurs, la recherche sur les germes d'essai de contamination fécale, sur lesquels repose le contrôle de la potabilité microbiologique de l'eau, n'est que

rétrospective et non préventive, car il est trop tard pour permettre une intervention et éviter les risques. Les consommateurs ont déjà ingéré de l'eau polluée et potentiellement dangereuse lorsqu'une contamination est détectée. Par conséquent, des traitements de désinfection sont mis en place dans le but premier d'assurer la salubrité microbiologique de l'eau en toutes circonstances (**Sunda, 2008**).

Il existe de nombreux traitements physiques et chimiques pour détruire les bactéries ou inhiber leur développement. L'objectif de cette partie est de faire une synthèse complète des techniques conventionnelles et de développement.

V.1. Traitements physiques

Les traitements physiques consistent en un approvisionnement en énergie thermique, mécanique ou électrique pour agir sur les contaminants de l'eau (polluants chimiques ou micro-organismes). Les principaux procédés utilisés pour la désinfection de l'eau sont les traitements thermiques, la filtration, l'irradiation UV ou les traitements par ultrasons. Leur action ne nécessite aucun réactif chimique, ayant ainsi l'avantage de n'avoir aucun impact sur l'environnement. Cependant, un apport énergétique important est nécessaire et nécessite un compromis entre l'efficacité souhaitée et le coût de l'énergie (**Sunda, 2009**).

V.1.1. Traitements thermiques

Le traitement thermique est le plus ancien traitement de désinfection de l'eau. Elle consiste à amener l'eau à une température suffisante pour détruire tous les micro-organismes. L'influence de la température sur le développement de certaines bactéries est rapportée par de nombreuses études. Par exemple, les légionelles prolifèrent (exemple : *Legionella*), prolifèrent lorsque la température de l'eau se situe entre 25 et 42 °C. En dessous de 25 °C, elles survivent, mais sont détruites en quelques heures autour de 5 °C. Au-delà de 42 °C, elles survivent et sont détruites en quelques minutes à environ 60 °C). (**Muraca et al., 1987; Rogers et al., 1994; Lin et al., 1998; Fields et al., 2002; Leteneur, 2003**).

- **Désinfection de l'eau par ébullition**

La désinfection de l'eau par ébullition consiste à porter l'eau à ébullition pendant quelques minutes. Durant cette opération, les pathogènes viraux, parasitaires et bactériens sont inhibés (**Dewolf., 1986**). Le principal inconvénient de cette méthode est son coût énergétique élevé, ce qui la rend non viable d'un point de vue économique et environnemental. Dans les zones rurales, les agriculteurs utilisent le bois forestier pour le

chauffage, une pratique peut conduire à la déforestation.

V.1.2. Ultraviolets

Les rayons UV sont des ondes électromagnétiques de longueurs d'onde comprises entre 200 et 400 nm. La dégradation photochimique des composés organiques par ces radiations est un important processus naturel de décontamination de l'environnement. L'irradiation d'une molécule dans la gamme de longueurs d'onde de son spectre d'absorption provoque le transfert d'un électron de la plus haute orbitale moléculaire occupée à la plus basse orbitale moléculaire vide. L'énergie fournie par les rayons UV est suffisamment élevée pour provoquer diverses transitions électroniques ou rompre les liens chimiques (**Stefan, 2004**).

Les UV-C sont les ondes les plus intéressantes pour leur application dans le traitement de l'eau. De nombreux polluants et composants de l'eau (composés organiques et inorganiques dissous) absorbent ce rayonnement. Ce type de rayonnement ultraviolet affecte les micro-organismes (**Haas, 1990**). Pendant la désinfection par UV, le rayonnement est absorbé par les acides nucléiques (ARN et ADN) des cellules bactériennes, ce qui entraîne la formation de dimères pyrimides ainsi que de nombreux photoproduits (**Cloete et al., 1998**). Les changements photochimiques dans les acides nucléiques et les dimères de thymine produits inhiberont la réplication et la transcription de l'ADN, empêchant la croissance cellulaire (**Liu et al., 1995; Opezzo et Pizarro, 2001; Franzin et al., 2002; Von Sonntag et al., 2004**). Ce procédé présente plusieurs avantages : facilité d'installation et faible coût (**Franzin et al., 2002**); sécurité opérationnelle élevée (**Cloete et al., 1998**); aucun effet néfaste sur l'eau, absence d'effets secondaires couramment observés dans les traitements chimiques classiques (**Franzin et al., 2002**). Cependant, l'irradiation aux rayons UV comporte de nombreux inconvénients : aucune protection durable (**Kusnetsov et al., 1994**). Les biofilms ne sont pas soumis aux UV; une reprise de la croissance bactérienne après le traitement, de sorte que la désinfection n'est pas maintenue (**van der Wende et Characklis, 1990**).

- **Désinfection solaire de l'eau**

La désinfection de l'eau par le soleil est une méthode de traitement simple qui utilise le rayonnement solaire (lumière UVA : 320 à 400 nm et température) pour détruire les micro-organismes dans l'eau. Son efficacité à éliminer les micro-organismes dépend également de la température atteinte lors de l'exposition au soleil et des conditions climatiques et météorologiques. L'eau contaminée microbiologiquement est placée dans des contenants transparents et exposée au plein soleil pendant 6 heures, si le ciel est

complètement dégagé (**Meierhofer et Wegelin., 2002**). Si le ciel est nuageux, le temps d'exposition passe de six heures à deux jours. Malheureusement, l'intensité de l'UVA est sujette à des variations dues aux conditions climatiques et quotidiennes. Ces variations remettent en question l'efficacité de cette méthode. En outre, cette méthode peut être améliorée par l'utilisation d'oxygène singulet, généré par l'action combinée d'un sensibilisant et de la lumière. C'est ce qu'on appelle la photosensibilisation (**Meierhofer et Wegelin., 2002**).

V.1.3. Filtration

Pour éliminer les micro-organismes, des filtres simples sont utilisés à la maison (filtres à bougies en céramique, filtres à galets et sable). Malheureusement, ces filtres n'éliminent pas tous les micro-organismes. De plus, ils nécessitent un entretien minutieux. Ils doivent être nettoyés régulièrement même s'ils ne sont pas bouchés. Pour éviter autant que possible que l'eau ne traverse le filtre sans être filtrée, ces filtres doivent être régulièrement inspectés et remplacés (cas des filtres en céramique) (**Howard., 2004**). En outre, les filtres disponibles dans le commerce sont relativement coûteux et les filtres fabriqués avec des matériaux disponibles localement sont généralement d'une efficacité limitée dans l'amélioration de la qualité microbiologique de l'eau. En raison de toutes les raisons mentionnées, certains utilisateurs préfèrent combiner cette méthode avec l'ébullition. La différence entre l'ultrafiltration et la microfiltration est la taille des pores. Contrairement à la microfiltration, les virus, en raison de leur petite taille, peuvent être éliminés par ultrafiltration (**LMS, 2017**).

V.1.4. Ultrasons

L'ultrason (US) est une onde vibratoire de fréquences entre 16 kHz et 100 MHz, entraînant une cavitation acoustique provoquant des effets mécaniques et chimiques agissant sur le milieu. Leur propagation dans un liquide provoque des compressions et des dépressions sur les molécules. Lorsque la dépression est suffisamment élevée pour surmonter les forces attractives entre les molécules présentes dans le liquide, des bulles de cavitation sont créées (**Lorimer et Mason, 1987**). Ceux-ci se développent au fur et à mesure que les cycles de compression/vide progressent par un transfert de gaz ou de vapeur du liquide jusqu'à atteindre l'équilibre pour une fréquence donnée (coalescence puis dégazage), ou jusqu'à ce qu'ils implosent : une énergie provoquant des effets mécaniques et chimiques est alors générée (Fig. 2). Typiquement, l'implosion des bulles de cavitation est observée lorsque la puissance ultrasonique est suffisamment élevée ($P > 10 \text{ W.cm}^{-2}$) (**Lorimer et Mason, 1987**). Il agit alors comme un point chaud localisé avec des

températures d'environ 4000 K et des pressions supérieures à 1000 atmosphères (**Suslick, 1990**).

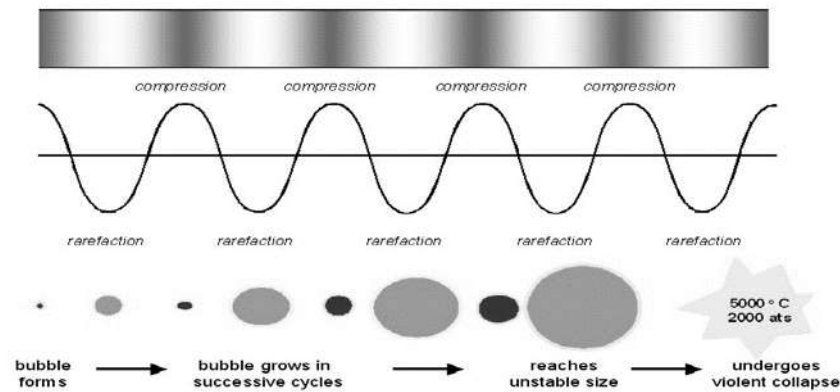


Figure 2. Génération acoustique d'une bulle de cavitation par les ultrasons
(**Mason et Pétrier, 2004**)

Les phénomènes impliqués dans la création et l'évolution des bulles de cavitation sont complexes, en raison de la diversité des facteurs impliqués : fréquence, puissance, solvant, température, pression externe, et la présence de gaz dans la bulle.

L'échographie est capable d'inactiver les bactéries et de désagréger les agrégats bactériens selon les processus physiques, mécaniques ou chimiques de la cavitation acoustique. L'énergie dissipée par la cavitation détruit ou affaiblit la croissance bactérienne par divers processus (**Hughes et Nyborg, 1962; Allinger, 1975**).

V.2. Traitements chimiques

Les principaux traitements chimiques utilisés dans le traitement de l'eau sont les biocides (désinfectants) pour éliminer les microorganismes de l'eau, et/ou les biodispersants qui limitent la fixation des biofilms sur les parois des canalisations des systèmes. Le but de cette section est de présenter toutes les caractéristiques communes aux biocides, puis d'exposer les biocides oxydants et non oxydants.

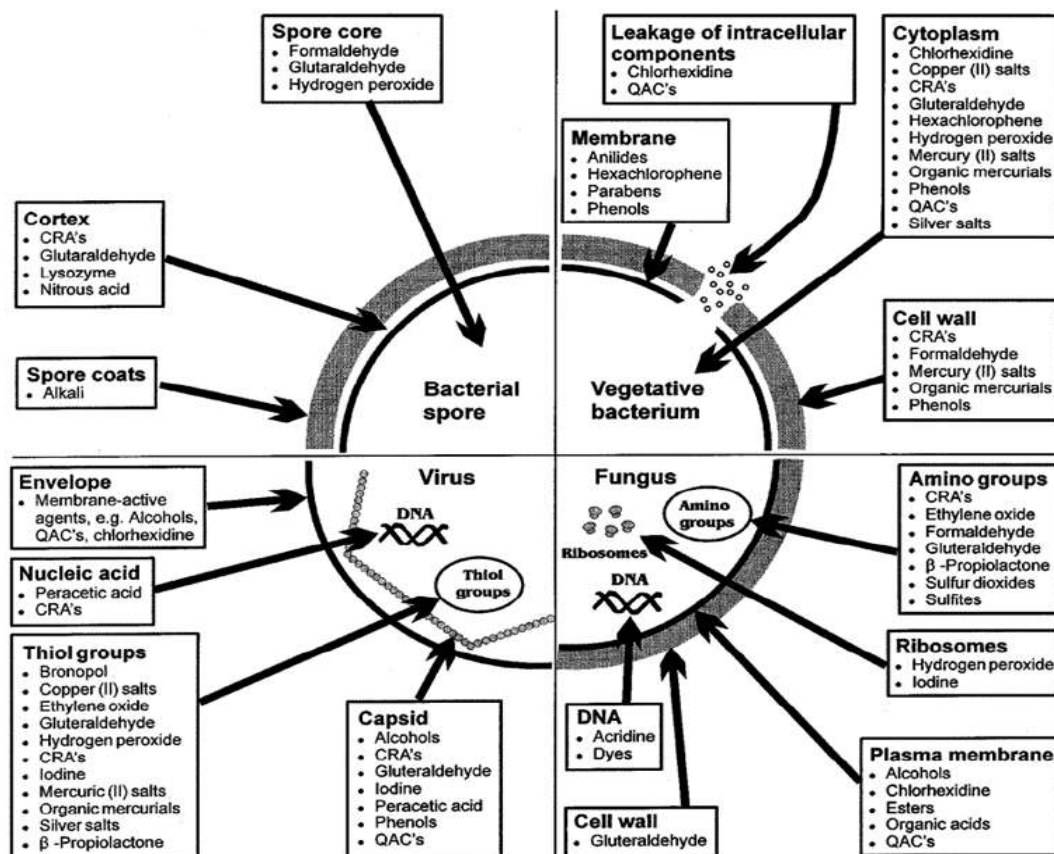
V.2.1. Généralités sur les biocides (désinfectants)

V.2.1.1. Définition et mode de fonctionnement

Les produits biocides sont des préparations contenant une ou plusieurs substances actives destinées à détruire, à repousser, à rendre inoffensifs, à prévenir ou à combattre les organismes nuisibles par une action chimique ou biologique. L'activité antibactérienne des biocides est déterminée par leur réactivité chimique avec certaines fonctions organiques. Selon les concentrations utilisées, elles ont un effet différent (**Woodcock, 1988**) :

- À faibles concentrations : un effet bactériostatique sera observé, empêchant temporairement la multiplication et la reproduction des bactéries. Cela dépend essentiellement du temps de contact.
- À fortes concentrations : un effet bactéricide sera observé, éliminant les microorganismes. La prolifération des bactéries est arrêtée mais reprendra dès que les conditions défavorables auront disparu. Certaines bactéries peuvent former des spores et ainsi résister à des conditions défavorables à leur développement.

D'une manière générale, les biocides s'attaquent aux composés fonctionnels de la cellule, provoquant un stress chez les micro-organismes (Wainwright, 1988) (fig. 3). En effet, leurs cibles sont les composés de la membrane cytoplasmique ou le cytoplasme lui-même. Mais avant d'être atteints, ils doivent d'abord traverser le mur et atteindre le site désiré, tout en maintenant une concentration minimale qui permet une efficacité visible (Brözel et Cloete, 1993). La quantité de biocide nécessaire à la désinfection peut alors être importante.



« CRA's = agents libérant du chlore ; QAC's = composés quaternaires d'ammonium »

Figure 3. Actions de différents biocides sur les bactéries, spores, champignons et virus

(Russell et al., 1997)

V.2.1.2. Choix d'un biocide

D'une manière générale, le biocide choisi doit posséder des fonctions désinfectantes tout en minimisant, voir en évitant un impact environnemental (limitation des fonctions d'oxydation non voulues) (**Miller, 1993**). Le choix d'un biocide est réalisé en prenant en considération les paramètres suivants :

- Connaître les organismes à éliminer ;
- Sélectionner le ou les biocides adéquats en déterminant les concentrations respectives et le temps de contact nécessaire ;
- Déterminer la fréquence de dosage ;
- Contrôler les microorganismes grâce à des analyses ;
- Contrôler leur présence sur les surfaces (biofilms).

Il est également nécessaire de se préoccuper de la chimie du milieu environnant, car les biocides ne réagissent pas seulement avec les cellules vivantes mais aussi avec d'autres composés organiques. Il est alors nécessaire de prendre en considération les paramètres suivants : le pH, la température de l'eau, la dureté de l'eau, les composés organiques tels que les protéines et les saccharides, les additifs ; agents antitartre et inhibiteurs de corrosion (**Cloete et al., 1998**).

V.2.1.3. Résistance aux biocides et impacts environnementaux

Une diminution de l'efficacité d'un traitement bactéricide, peut être due à des conditions défavorables de traitement. Cependant, les résistances développées par les microorganismes peuvent également en être responsables. Il peut s'agir aussi de l'adaptation phénotypique, de la modification du taux de croissance, du développement d'un phénotype spécifique, ou encore de la limitation de la diffusion/réaction du biocide (**Cloete et al., 1992**).

La présence de biofilms joue donc un rôle très important dans la résistance aux biocides, car même s'ils sont capables de réduire le nombre de bactéries sessiles de 80 à 99%, Cependant, 1 à 20% des bactéries sont encore attachées aux surfaces qui sont encore viables et capables de contaminer à nouveau le système. Il est donc nécessaire d'utiliser un biocide capable de pénétrer le biofilm afin d'atteindre les bactéries et d'appliquer souvent un temps de contact plus long que pour les bactéries planctoniques (**Wright et al., 1991**).

Les biocides utilisés pour traiter les eaux usées et industrielles sont rejetés dans l'environnement par des purges de déconcentration. Idéalement, un biocide ne devrait

affecter que les microorganismes cibles. Cependant, tous les produits chimiques ont certains effets sur les plantes et la vie animale à des concentrations variables. On suppose toujours que la dilution et la dégradation naturelle inactiveront les biocides individuels et les études en laboratoire indiquent que les biocides disponibles dans le commerce peuvent être biodégradables. Toutefois, ces résultats ne laissent pas croire que la biodégradation se produira aussi facilement dans l'environnement. Il faut donc garder à l'esprit que si les biocides continuent d'être utilisés si fréquemment dans le traitement, il faudra trouver des solutions aux problèmes d'efficacité in situ, de résistance, de biodégradabilité et d'impacts environnementaux (**Wright et al., 1991**).

V.2.2. Biocides oxydants

Ils détruisent les micro-organismes par oxydation chimique en pénétrant la paroi cellulaire et en perturbant leur métabolisme. Leur action n'est pas sélective. L'utilisation de ces biocides oxydants se fait dans différents contextes : traitement de l'eau potable, piscines, tours de refroidissement. Ils peuvent être appliqués de manière préventive, c'est-à-dire par injection continue à de faibles concentrations avec surveillance permanente pour contrôler le niveau de corrosion causé par leur utilisation (**Leteneur, 2003**); mais aussi en traitement de choc, avec une grande quantité de biocide sur de courtes périodes et à plusieurs reprises. Il existe différents biocides oxydants dont le plus connu et le plus utilisé est le chlore. D'autres biocides existent et se trouvent dans la désinfection. Ils seront également examinés (**Leteneur, 2003**).

V.2.2.1. Chlore

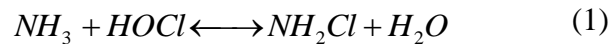
Lorsqu'il est introduit dans l'eau, le chlore se présente sous différentes formes :

- **Chlore libre** : correspond aux formes du chlore ; acide hypochloreux (HOCl) et ions hypochlorites (OCl⁻). Ces espèces proviennent de la réaction du chlore avec l'eau.
- **Chlore combiné** : résulte de sa combinaison avec l'azote ammoniacal avec formation de chloramines minérales, et organiques.

V.2.2.2. Chloramines

Bien que les chloramines soient des biocides moins efficaces que le chlore (la monochloramine (NH₂Cl) et la dichloramine (NHCl₂) sont considérées comme 3 – 5 et 20 – 30 fois moins actives respectivement que le chlore libre), les chloramines sont parfois utilisées pour assurer le traitement de désinfection de l'eau. En effet, ils sont plus stables que le chlore, préservant ainsi la qualité de l'eau sur une durée plus longue. La

monochloramine (NH_2Cl) est la chloramine minérale la plus utilisée dans la désinfection de l'eau. Elle est formée suite à l'addition, en conditions contrôlées, de chlore et d'ammoniac:



De nombreuses études montrent l'efficacité de la monochloramine à pénétrer les biofilms à des concentrations de 0,5 ; 1 et 1,5 mg/l (Kool *et al.*, 1999 ; Türetgen, 2004). Cependant, une étude sur un système d'eau domestique montre qu'une concentration en monochloramine de 0,5 mg/l de chlore total ne permet pas le retrait des biofilms (**Thomas *et al.*, 2004**).

Certes la désinfection par la monochloramine est plus lente que celle avec le chlore, mais le résiduel de désinfection peut être maintenu sur de plus longues périodes dans les systèmes d'eau (**Kool *et al.*, 1999**). Cette persistance dans les systèmes d'eau s'expliquerait par sa non-réactivité avec les exopolysaccharides (aucune réduction du biocide après 60 minutes de contact), contrairement au chlore libre (demande en chlore de 0,3 mg/l en 30 minutes) (**LeChevallier *et al.*, 1988 ; Momba *et al.*, 1999**).

V.2.3. Dioxyde de chlore

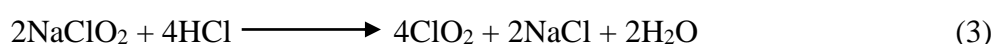
Le bioxyde de chlore (ClO_2) est un gaz jaun-verdâtre, c'est un oxydant hautement sélectif avec les composés organiques et minéraux contenus dans l'eau. Du fait de sa structure radicalaire, le dioxyde de chlore va se comporter comme un accepteur d'électrons, contrairement au chlore qui conduit à des réactions d'addition ou de substitution avec la formation de composés chlorés. Il réagit en particulier avec des composés pouvant facilement céder un électron. Un grand nombre de produits organiques sont relativement peu ou pas réactifs vis-à-vis du dioxyde de chlore (**Ben Amor *et al.*, 1984 ; Hoigné et Bader, 1994**). Fortement oxydant (2,63 fois plus que le chlore), instable à des concentrations supérieures à 10% dans l'air (**Calvert Churn, 1983**), il est de ce fait utilisé en solution aqueuse, préparée immédiatement avant usage sur le lieu d'utilisation. Le dioxyde de chlore peut s'obtenir de différentes façons :

- Par action du chlore sur le chlorite de sodium :



Ce procédé nécessite le stockage de 2 produits dangereux le chlore gazeux et le chlorite de sodium.

- Par action de HCl sur le chlorite de sodium :



Le bioxyde de chlore a des propriétés bactéricides, sporicides et virulicides qui sont dans la plupart des cas supérieures à celles du chlore (**Chevala, 1982**), et ce dans une gamme de pH plus large. Son utilisation est cependant plus complexe et son coût de revient élevé. De plus, sa décomposition spontanée et sa réduction entraînent la formation de chlorites toxiques.

Les mécanismes de désinfection du dioxyde de chlore ne sont pas bien connus, mais apparaissent comme variables selon le type de microorganismes. Le dioxyde de chlore réagit rapidement avec les acides aminés : cystéine, tryptophane et tyrosine, mais pas avec l'acide ribonucléique ARN des virus (**Noss et al., 1983; Olivieri et al., 1985**). L'inactivation des virus se fait alors par altération des protéines se trouvant sur les acides nucléiques présents avec l'interruption de la synthèse des protéines (**Benarde et al., 1967**). Le dioxyde de chlore pénètre facilement la membrane cellulaire des microorganismes en altérant les protéines et lipides se trouvant à sa surface et augmente ainsi sa perméabilité (**Ghanbari et al., 1983 ; Olivieri et al., 1985 ; Aieta et Berg, 1986**). Il peut également réagir avec les groupements des enzymes conduisant à leur inactivation (**Huang et al., 1997**).

Le dioxyde de chlore affecte généralement la structure de la matière organique en réagissant avec la partie aromatique insaturée. Les sous-produits d'oxydation sont donc à la fois aliphatiques mais aussi aromatiques avec des poids moléculaires plus faibles que ceux observés dans la matière organique non oxydée (**Swietlik et al., 2009**). Tous les produits d'oxydation ne sont pas identifiés mais il est possible de les citer : les aldéhydes (formaldéhyde, acétaldéhyde, le glyoxal, le méthylglyoxal) et les acides carboxyliques (acides formique, acétique, oxalique) (**Dabrowska et al., 2003 ; Swietlik et al., 2009**). Dans le cas d'un excès en dioxyde de chlore, il peut se former quelques produits chlorés comme l'acide monochloracétique et des traces d'acides monochlorosuccinique, dichloracétique et trichloracétique (**Masschelein, 1997**) et le THM (**Ben Amor et al., 1988**).

V.2.4. Ozone

L'ozone est produit à partir de l'oxygène de l'air ou de l'oxygène comprimé par l'application d'une décharge électrique. C'est un agent oxydant très puissant qui réagit sur de nombreuses structures chimiques (composés aliphatiques insaturés et composés aromatiques). La chimie de l'ozone dans l'eau est relativement complexe. L'ozone est un gaz peu soluble et instable dans l'eau. Sa décomposition implique des réactions complexes initiées par des ions hydroxydes ou par des composés organiques réagissant avec l'ozone.

La stabilité de l'ozone diminue avec le pH, car à un pH supérieur à 6, il sera décomposé en entités radicales hautement réactives comme les radicaux hydroxyles (**Rice, 1997**).

L'ozone est également un désinfectant à large spectre très puissant. Il est actif contre les bactéries, les champignons, les virus, les protozoaires et les spores bactériennes (**Khadre et al., 2001**). Son efficacité est indépendante du pH. Cependant, sa faible stabilité n'en fait pas un désinfectant rémanent. Il est souvent utilisé comme une alternative au chlore dans le traitement de l'eau, car il entraîne moins de sous-produits de réaction (**Farooq et al., 1977; Cloete et al., 1998; Cho et al., 2003**).

V.2.5. Peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène est généralement utilisé comme agent oxydant. En raison de son potentiel d'oxydation élevé, il peut oxyder un grand nombre de composés organiques et de minéraux. (**Duperron, 1999**). Il est fréquemment utilisé comme biocide pour la désinfection, la stérilisation ou comme antiseptique. Il inhibe la croissance et/ou inactive les microorganismes pathogènes comme les champignons, les virus, les bactéries et les levures lorsqu'il est utilisé à des concentrations appropriées (**Block, 1991; Labas et al., 2008**). Il est considéré comme « écologique » parce qu'il peut se dégrader rapidement en eau et en oxygène (**Baig et Mouchet, 2010**).

Le peroxyde d'hydrogène est une excellente source d'oxygène singulet, de radicaux superoxydes (O_2^-) et de radicaux hydroxyles (-OH). Ces espèces produisent un stress oxydatif et peuvent endommager les acides nucléiques, les enzymes, les constituants membranaires, les protéines, l'ADN, l'ARN et d'autres macromolécules cellulaires (**Juven et Pierson, 1996; Schurman, 2001**).

Le stress oxydatif n'est pas simplement lié à l'agression de produits chimiques externes, il peut aussi être une conséquence du métabolisme aérobie de la cellule (**Halliwell et Gutteridge, 1984**), ou de l'action de son système immunitaire sur d'éventuels compétiteurs, ou en réaction à l'attaque d'agents pathogènes (**Imlay, 2008; Labas et al., 2008**).

V.2.3. Biocides non-oxydants

Les biocides non-oxydants ont un mode d'action sélectif et souvent indépendant du pH. Ils détruisent les micro-organismes en réagissant avec des constituants cellulaires spécifiques ou en perturbant leur métabolisme. Ils agissent principalement sur les algues, les bactéries et les champignons (**Leteneur, 2003**).

Ces biocides sont plutôt utilisés pour la désinfection des circuits d'eau industriels ou de l'eau rejetée dans l'environnement. Leur application entraînera l'élimination de

certains types de bactéries (**Heinzel, 1988; Cloete et al., 1992**). En raison de cette sélectivité, il est recommandé qu'au moins deux biocides non oxydants, ou un biocide oxydant et un biocide non oxydant, soient introduits dans l'eau pour être traités en alternance à intervalles courts, habituellement chaque semaine ou aux deux semaines (**Keister, 2008**). Cette alternance évite la résistance des souches bactériennes au contact de ces composés (**Leteneur, 2003**). Les principaux biocides non-oxydants sont : les aldéhydes : le formaldéhyde (ou formol) et le glutaraldéhyde (**Wallhäußer, 1995**), les amines : N-alkyldiméthylbenzylammonium (CADBA), le N-akyl-1,3-propanediamine (ATMD), le chlorure didécyldiméthylammonium (CDDA) (Kim et al., 2002) ; et les amides halogénés : comme exemple, le 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamide (DBNPA) (**Wallhäußer, 1995**).

VI. Procédés d'oxydation avancée

Face aux inconvénients liés aux traitements physiques et chimiques exposés précédemment, les procédés d'oxydation avancée (POA) se sont développés. Il s'agit de traitements fonctionnant dans des conditions de température et pression habituellement rencontrées dans le milieu ambiant et conduisent à la production d'un oxydant secondaire plus puissant que le primaire (**Glaze et al., 1987**). L'oxydation est principalement liée à la formation de radicaux hydroxyles qui présentent un des potentiels d'oxydation les plus forts (Tab. 3) conduisant à la minéralisation complète des contaminants, de la matière organique ...etc.

Tableau 3. Le potentiel d'oxydation de certaines espèces (**Parsons et Williams, 2004**)

Espèces	Potentiel d'oxydation
Fluor	3,03
Radical hydroxyle	2,80
Oxygène atomique	2,42
Ozone	2,07
Peroxyde d'hydrogène	1,78
Radical perhydroxyle	1,70
Permanganate	1,68
Acide hypobromeux	1,59
Dioxyde de chlore	1,57
Acide hypochloreux	1,49
Chlore	1,36

Les POA existants sont nombreux. D'une manière générale, ils mettent en œuvre une activation chimique, photochimique ou catalytique afin d'activer l'ozone ou le peroxyde d'hydrogène, induisant la formation de radicaux hydroxyles. Ils peuvent être divisés en 4 groupes différents :

- Procédés d'oxydation chimique en phase homogène : $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$; $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3$;
- Procédés photochimiques et photocatalytiques en phase homogène et/ou hétérogène : $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$; O_3/UV , $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$;
- Procédés d'oxydation sonochimiques : $\text{US}/\text{H}_2\text{O}_2$; US/O_3 ;
- Procédés d'oxydation électrochimiques.

Ces procédés ont trouvé une grande variété d'applications dans le traitement de l'eau potable et des eaux usées (Tab. 4). Cependant, une optimisation des conditions d'application (prise en compte de la qualité de l'eau, paramètres physico-chimiques, objectifs à atteindre) est nécessaire parce que ces processus ont une consommation d'énergie importante (Song *et al.*, 2008).

Tableau 4. Applications des POA dans le traitement des eaux (Parsons et Williams, 2004)

Eaux souterraines	Eaux usées industrielles
Odeur et COV	Boues industrielles
Eau de surface	Eaux usées domestiques
Piscines	Lixiviats
Recyclage de l'eau	Boues domestiques
Désinfection	Eau ultrapure

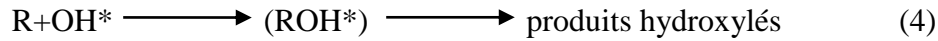
VI.1. Radicaux hydroxyles

Les radicaux hydroxyles sont des espèces hautement réactives malgré une durée de vie courte (de l'ordre de la microseconde), capables de réagir rapidement et de manière non sélective sur la plupart des composés organiques. Cependant, ils réagiront plus rapidement avec les liaisons insaturées comme les triples et doubles liaisons carbone-carbone avant les liaisons simples de type C-C ou C-H (Buxton *et al.*, 1988). Ils permettent notamment l'ouverture des cycles aromatiques. Présentant un caractère électrophile marqué, les composés substitués par des groupements donneurs d'électrons réagiront plus rapidement. En effet, les noyaux aromatiques porteurs d'un groupement donneurs d'électrons (-OH, -NH₂,...), comme le phénol ou l'aniline réagissent plus rapidement que les cycles porteurs de groupement attracteurs d'électrons (-NO₂, -COOH,...), comme le nitrobenzène ou l'acide benzoïque (Doré, 1989).

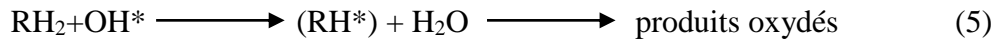
VI.1.1. Mécanismes de réaction des radicaux hydroxyles

Les radicaux hydroxyles réagissent sur les composés organiques selon trois mécanismes principaux :

- Par addition électrophile sur le composé organique R :



- Par substitution d'un atome d'hydrogène :



- Par transfert d'électron :



Les radicaux organiques formés peuvent ensuite réagir avec un autre oxydant moléculaire présent en solution (réaction de propagation ou même de terminaison). Par de telles réactions radicales, il est alors possible d'oxyder la plupart des polluants organiques jusqu'à ce qu'ils soient complètement minéralisés (H₂O et CO₂) (**Legrini et al., 1993**).

Dans le cas de la matière organique naturelle, les radicaux hydroxyles réagiront d'abord avec des composés de poids moléculaire élevé, car ils ont tendance à être plus aromatiques dans la nature et ont donc un plus grand nombre de sites de réaction (**Westerhoff et al., 1999; Thomson et al., 2004; Lamsal et al., 2011**). Il sera composé de composés de poids moléculaire plus petits et plus biodégradables (aldéhydes, acides carboxyliques) (**Sarathy et Mohseni, 2007**), qui pourront ensuite être minéralisés.

Le devenir des contaminants dépend de la durée d'application du traitement d'oxydation avancée (**Song et al., 2008**). Sous de fortes conditions d'oxydation avancée (temps d'irradiation longs, fortes concentrations), il y aura minéralisation totale (**Kleiser et Frimmel, 2000 ; Thomson et al., 2004**), et donc destruction des composés parents aussi bien que des sous-produits formés au cours du procédé (**Shemer et Linden, 2007**). Pour des applications moins poussées, les composés seront simplement oxydés, et selon l'eau traitée, il faudra alors prendre en considération le devenir et la possible toxicité de ces produits (**Wols et Hofman-Caris, 2012**). Il est donc nécessaire d'optimiser les procédés selon les objectifs visés.

VI.1.2. Radicaux hydroxyles et microorganismes

Les radicaux hydroxyles ne sont pas les seuls présents. En effet, il est également possible de rencontrer les radicaux peroxydes. L'ensemble de ces radicaux formés constitue un stress oxydatif pour les cellules. Bien que de telles espèces soient présentes dans les cellules, mais contrôlées au travers d'enzymes (catalase, peroxydase, superoxyde dismutase rencontrée dans le cas du peroxyde d'hydrogène comme rapporté par **Fiorenza et Ward (1997) et Storz et al. (1987)**). La création et donc la présence de radicaux

supplémentaires en dehors des cellules peut conduire à une plus grande efficacité de désinfection (**Rincòn et Pulgarin, 2006**). A ce phénomène s'ajoute la présence d'espèces pouvant diffuser au sein des cellules (peroxyde d'hydrogène, ions Fe^{2+}) qui conduiront à la formation de radicaux supplémentaires directement au sein des cellules (**Spuhler et al., 2010**).

Les radicaux formés à dans le milieu environnant attaquent - en premier lieu - l'extérieur de la membrane par oxydation, formant de fins pores à l'origine de sillons. Les radicaux peuvent alors pénétrer au travers de la fine couche de peptidoglycane des bactéries Gram-négatives atteignant alors la membrane cytoplasmique. Après peroxydation des lipides de cette dernière, les radicaux se trouvent alors à l'intérieur de la bactérie et peuvent commencer à oxyder les composés intracellulaires (**Coyle et Puttfarcken, 1993**). Leurs présences modifient le potentiel oxydant intracellulaire, empêchant ainsi le fonctionnement normal de certaines enzymes et les réactions d'oxydoréduction biochimiques comme la respiration (**Maness et al., 1999 ; Storz et al., 1987**). De tels effets conduiront ainsi à la lyse du microorganisme. Cependant, ces réactions ne pourront se produire qu'à proximité de leur lieu de formation, si les radicaux ayant un temps de vie très court.

VII. Conclusion

L'accès à l'eau potable demeure une préoccupation dans de nombreuses régions du monde. Le manque d'eau potable est la cause de plusieurs maladies d'origine hydrique, dont le choléra, la typhoïde, l'hépatite... Les micro-organismes (germes pathogènes) responsables de ces maladies et utilisés dans cette recherche sont : *Escherichia coli*, *salmonella typhi*... Les indicateurs de contamination fécale (coliformes fécaux, entérocoques fécaux, *Clostridium* sulfito-réducteur, ...), qui révèlent la présence ou l'absence de pathogènes, sont ensuite utilisés pour évaluer la qualité microbiologique de l'eau. Par ailleurs, les habitants des pays en développement sont approvisionnés en eau potable grâce au raccordement au réseau d'approvisionnement en eau, aux fontaines, aux puits et aux sources protégées. Mais l'eau de ces systèmes est souvent contaminée par une manipulation peu fiable et un entretien inadéquat, ce qui peut entraîner de graves problèmes de santé publique. Pour résoudre ces problèmes, il est important de promouvoir des méthodes de désinfection de l'eau au niveau domestique. Les méthodes courantes de désinfection de l'eau sont les suivantes : physique (thermique, ultraviolet, filtration et ultrasonique), chimique (chlore, chloramines, dioxyde de chlore, ozone et peroxyde d'hydrogène) ou traitement sactuels (POA)..

Chapitre II

*La désinfection par le chlore des eaux
destinées à la consommation humaine*

Chapitre II

La désinfection par le chlore des eaux destinées à la consommation humaine

I. Introduction

En vue d'assurer la potabilité d'une eau de consommation, la première mesure à prendre est de protéger la ressource de toute contamination. Quand cela n'est pas possible (ressources superficielles), une désinfection s'avère nécessaire.

La désinfection n'est pas une "stérilisation", c'est pourquoi il peut subsister dans l'eau quelques germes dits "banaux", inoffensifs pour la santé du consommateur. Les moyens de désinfection les plus couramment utilisés sont l'ozone, les rayonnements ultra-violet, le chlore, l'hypochlorite de sodium (eau de Javel) et le bioxyde de chlore. Tous ne possèdent pas des performances équivalentes dans les deux domaines précités : absence ou présence d'effet rémanent, pouvoir bactéricide plus ou moins élevé. En l'occurrence, seuls le chlore, l'hypochlorite de sodium et le bioxyde de chlore sont dotés d'un pouvoir rémanent. L'hypochlorite de sodium (NaOCl) reste encore le désinfectant le plus utilisé dans la plupart des pays (80 % de la désinfection dans le monde), malgré un engouement croissant pour les rayons ultra-violet qui ont l'avantage de ne pas conférer de goût et d'odeur à l'eau traitée.

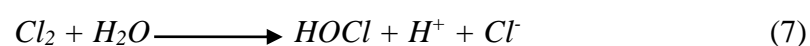
Cette prédominance de l'hypochlorite de sodium dans la désinfection provient essentiellement du fait qu'il est facilement disponible, rémanent, peu coûteux, aisé à manipuler et à mesurer (**Guergazi, 1998 ; Achour, 2001**).

II. Aspect chimique de la chloration et les produits utilisés

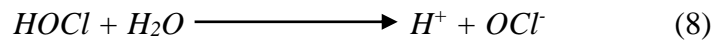
Le chlore destiné à la désinfection se retrouve normalement sous l'une des trois formes suivantes : Chlore gazeux, sels d'hypochlorite (hypochlorite de sodium, hypochlorite de calcium). Lorsque du chlore est introduit dans l'eau, différentes réactions chimiques vont successivement se produire :

II.1. Chlore gazeux

Le chlore est un gaz jaune, plus lourd que l'air et soluble dans l'eau. Il est commercialisé sous forme liquéfiée, dans des récipients en acier. C'est un gaz corrosif et très toxique ; il présente des risques mortels d'intoxication par inhalation, ingestion ou par contact avec la peau. Le chlore gazeux est rapidement hydrolysé dans l'eau pour donner de l'acide hypochloreux (HOCl) selon la réaction suivante (**Gonzalez et al., 1996**) :



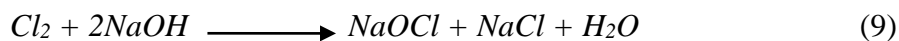
Il est à noter que l'addition du chlore gazeux dans l'eau diminue le pH, car cela entraîne la formation d'un ion hydrogène (**Doré, 1989 ; Gonzalez et al., 1996**). L'acide hypochloreux (HOCl), est un acide faible qui réagit de la façon suivante :



Cette réaction est fonction du pH, quand ce dernier se situe entre 6.50 et 8.50, la dissociation demeure incomplète et les deux espèces (HOCl et OCl⁻) sont présentes jusqu'à un certain point (**White, 1992**). Ainsi un pH élevé favorise la libération d'ions hypochlorites (OCl⁻). Lorsque la concentration de chlore libre est de quelques (mg/l), comme c'est le cas dans le traitement des eaux à potabiliser et que le pH est situé entre 6 et 10, la réaction (8) est incomplète, dans ces conditions, il y'a coexistence de HOCl et de OCl⁻. Notons que, plus l'eau est alcalinisée et plus l'équilibre se déplace dans le sens d'apparitions des ions ClO⁻ (**Gonzalez et al., 1996**).

II.2. Hypochlorite de sodium

De manière générale, l'hypochlorite de sodium (*NaClO*), est une autre forme de chlore dont l'utilisation présente moins de dangers que celle du chlore gazeux. Il se présente habituellement sous forme d'une solution aqueuse dont la teneur en chlore est de 5 à 15% (**White, 1992**). En d'autres termes; 50 à 150 g de chlore actif par litre, et plus couramment dénommée "*eau de Javel*", est une solution de couleur jaune, Les solutions et extraits de Javel sont nettement basiques et ont un caractère oxydant. Il est produit par addition du dichlore gazeux à de la soude caustique. Lorsque cela est fait, de l'hypochlorite de sodium, de l'eau et du sel sont formés selon la réaction 8 suivante :



La concentration en chlore d'une solution d'eau de Javel est exprimée en degrés chlorométriques. Un degré étant égal à une concentration de chlore de 3,17 g/l. Les titres des solutions et extraits de Javel couramment rencontrés sont repris par la figure (4), il s'agit de :

- Berlingots du commerce : 48° chlorométriques, soit 150g de chlore par litre de solution;
- Bouteilles plastiques du commerce : 12° à 18° chlorométriques;
- Eau de Javel industrielle : 48° chlorométriques.



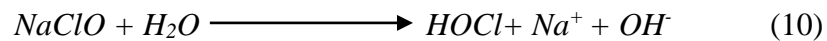
a. Berlingots du commerce

b. Bouteilles plastiques du commerce

c. Eau de Javel industrielle

Figure 4. Les différentes formes des solutions et extraits de Javel.

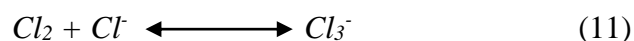
En solution dans l'eau, l'hypochlorite de sodium (eau de Javel) produit la réaction suivante:



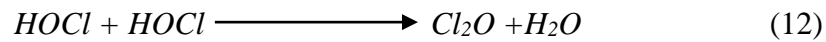
Cette équation montre que l'ajout d'hypochlorite de sodium dans l'eau entraîne la formation de l'acide hypochloreux comme dans le cas de l'hydrolyse du chlore gazeux (équation 7), mais induit une légère remontée du pH. Contrairement à l'hydrolyse du chlore gazeux l'ajout de l'hypochlorite de sodium dans l'eau produit un ion hydroxyle qui fait augmenter le pH (**Doré, 1989 ; Gillis, 2001**). Le chlore libre est dit actif sous la forme HOCl, ClO⁻, Cl₂ et c'est surtout sous cette forme qu'il sera consommé par les composés réducteurs de l'eau.

L'acide hypochloreux a une action désinfectante environ 100 fois plus forte que celle des ions hypochlorites, son efficacité sera d'autant plus élevée que le pH sera bas (**Ellis, 1991**), en pratique, il est souhaitable que celui-ci soit compris entre 6,50 et 8. En réalité, en dehors des espèces très largement majoritaires que nous venons de voir (HOCl et ClO⁻), d'autres espèces intermédiaires seraient susceptibles de se former dans certaines conditions dans les solutions aqueuses de chlore (**Morris et al, 1992 ; Reinhard et Stumm, 1980**), il s'agit de : Cl₃⁻, Cl⁻, Cl₂O, H₂OCl⁺, ClO₂⁻, et ClO₃⁻.

Selon Zimmermann cité par **Merlet (1986)**, la formation de l'ion trichlorure est thermodynamiquement possible:



L'intervention de Cl₂O, fréquemment cité, est également possible suivant la réaction 12 (**Reinhard et Stumm, 1980**):

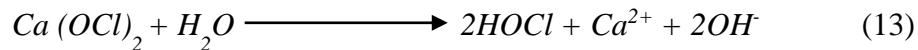


L'eau de Javel est utilisée soit pure (extraits à 48°), soit diluée (12°). Dans ce cas, l'eau de dilution ne doit pas être trop dure afin d'éviter le phénomène de cristallisation de l'hypochlorite au contact du calcium de l'eau ; ce phénomène qui est à l'origine des problèmes d'entartrage.

II.3. Hypochlorite de calcium

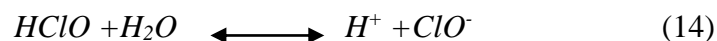
L'hypochlorite de calcium ($Ca(ClO)_2$) est une poudre blanche, sous forme de granules ou galets, très soluble dans l'eau. Elle doit être mise en solution avant son injection. La forme poudre se conserve bien et est fortement concentrée en éléments actifs. C'est le réactif de choix lorsque l'on doit exporter le désinfectant. L'hypochlorite de calcium est préparé à partir du précipité issu de la dissolution de chlore gazeux dans une solution d'oxyde de calcium (chaux vive) et d'hypochlorite de sodium. L'hypochlorite de calcium granulaire du commerce, contient habituellement 65% de chlore disponible. Cela signifie que 1,50 g de ce produit renferme l'équivalent d'un gramme de chlore (**Doré, 1989; White, 1992**).

L'équation 13 suivante illustre la réaction qui a lieu entre l'hypochlorite de calcium et l'eau :



D'après cette équation, on constate que l'addition d'hypochlorite de calcium dans l'eau produit elle aussi de l'acide hypochloreux, de manière similaire à l'hydrolyse du chlore gazeux et d'hypochlorite de sodium (équations 7 et 10). Comme dans le cas de la solution d'hypochlorite de sodium, cet ajout entraîne la formation d'ions hydroxydes, qui haussent le pH de l'eau (**White, 1992**).

L'acide hypochloreux est donc responsable de l'effet désinfectant. C'est un acide faible qui se dissocie selon la réaction :



L'ion ClO^- a une action désinfectante d'environ 80 à 100 fois moins forte que celle de $HOCl$. Cela s'explique par le fait que la membrane cytoplasmique des bactéries, constituée de lipoprotéines, est électriquement neutre. Or, la facilité pour une substance chimique de franchir cette membrane est d'autant plus grande que la substance en question est petite et non porteuse de charges électriques. C'est le cas de l'acide hypochloreux ($HOCl$), mais pas de l'ion hypochloreux (ClO^-) qui est chargé négativement. Le chlore se

trouvera donc sous forme d'un mélange d'acide hypochloreux et d'ions hypochlorites ; ce mélange est appelé « chlore libre » (**Gulludec, 1995**).

III. Réaction avec les substances chimiques présentes dans l'eau

III.1. Action du chlore sur les composés minéraux de l'eau

Parallèlement à ses propriétés désinfectantes et algicides, le chlore conduit également à un grand nombre de réactions chimiques avec les matières minérales présentes dans les eaux à traiter. Compte tenu de leur grande réactivité vis-à-vis du chlore, les ions ammonium et bromure, l'ion ferreux et le manganèse doivent être plus particulièrement considérés. D'autres éléments minéraux réagissent rapidement avec le chlore, l'acide hypochloreux en particulier ou l'ion hypochlorite. Parmi ces réducteurs, on cite les sulfures et les nitrites (**Merlet, 1986 ; Doré, 1989**):

- Les composés réducteurs tels que le fer ferreux, l'ion nitrite, les sulfures réagissent très rapidement avec les premières fractions de chlore ajoutées pour former des produits oxydés et des chlorures, dont les pouvoirs germicides sont nuls. Cette dose de chlore injectée, indispensable, pour agir sur les micro-organismes, constitue une partie de la demande immédiate en chlore.

- Les composés azotés minéraux (azote ammoniacal), portent le nom de « chloramines », dont seule une d'entre-elles, la monochloramine est utilisée industriellement pour la désinfection des eaux (**Gonzalez et al., 1996**).

III.2. Action du chlore sur les composés organiques de l'eau

La matière organique dissoute, des eaux naturelles, constitue un milieu très hétérogène, comprenant des molécules à structures très complexes, de masse moléculaire élevées mais aussi des composés organiques simples (acides aminés, sucres ...), difficiles à analyser car généralement présents à l'état de traces (**Lefebvre, 1995**).

La matière organique est généralement définie dans la globalité par les mesures de carbone organique total (COT), de carbone organique dissous (COD), ou encore par l'oxydabilité au permanganate de potassium en milieu acide et chaud. Le tableau 5 donne les concentrations et les pourcentages relatifs en (COD), des grandes classes de composés rencontrés dans les eaux naturelles. Il est intéressant de constater que les substances humiques (macromolécules naturelles, complexes, résultant essentiellement de la polymérisation des composés organiques), constituent la fraction la plus importante (**Thurman et Malcom, 1981**).

Tableau 5. Les grandes classes de composés organiques rencontrés dans les eaux naturelles (**Thurman et Malcom, 1981**).

Composés	Concentrations	% COD
Substances humiques	2 - 10 mg/l	40 - 60
Acides Carboxyliques	100 - 600 µg/l	5 - 8
Acides aminés	300 µg/l	2 - 3
Hydrate de carbone	500 µg/l	5 - 10
Hydrocarbures	1 - 10 µg/l	< 1
Composés à l'état de traces	ng/l - µg/l	< 1

Ce sont en particulier les acides humiques et fulviques qui réagissent avec le chlore et forment des composés organohalogénés. En effet, selon **Minear et Gray (1996)** et **Christman et al., (1981)**, ces substances possèdent des sites métadihydroxybenzeniques très réactifs avec le chlore. Les réactions peuvent être de différentes natures:

- Des substitutions halogénées sur les cycles et les chaînes aliphatiques des molécules organiques;
- Des oxydations qui peuvent être couplées aux substitutions;
- Des décarboxylations et des hydroxylations.

La chloration des eaux de surface conduit à la production du chloroforme, bromoforme et d'autres trihalométhanes (THM) (**Christman et al., 1981; Minear et Gray, 1996; Achour, 2001**).

Pour décrire l'action du chlore sur cette matière organique, il est nécessaire de noter qu'en solution aqueuse et pour des pH voisins de 7, le chlore se trouve essentiellement sous forme d'acide hypochloreux $HOCl$. Dans cette molécule, la liaison oxygène – chlore est polarisée selon $HO \delta^- - Cl \delta^+$, et l'action du chlore sur les substances organiques conduit à des réactions d'oxydation et d'addition sur les doubles liaisons carbone = carbone, d'hydrogène, de décarboxylation et de polycondensation (**Doré, 1989**).

Dans les conditions de traitement des eaux potables, l'action prépondérante du chlore sera une attaque électrophile sur les sites de plus forte densité électronique, conduisant directement à des réactions de substitution (**Vaudras et Reinhard, 1988**).

Le chlore a une réactivité appréciable vis-à-vis de la matière organique des eaux de surface, aussi bien vis-à-vis des composés organiques complexes, tels que les substances humiques que des composés simples caractérisés par un noyau aromatique contenant un groupement fonctionnel (OH, NR₂...). De même, il est très réactif vis-à-vis des bases puriques et pyrimidiques constituant les acides nucléiques (ADN et ARN), et molécules

vitales dans le métabolisme de micro-organismes de l'eau (**Hames et al., 2000; Peter et Anthony 2002**).

III.3. Réactions d'oxydation annexes

III.3.1. Formation de trihalométhanes (THM)

Nous pouvons noter que les trihalométhanes (THM) sont des composés constitués d'un seul atome de carbone lié à des halogènes, de formule générale CHX_3 , où X est habituellement du chlore, du brome ou une combinaison de ces deux éléments. Les THM mesurés dans l'eau chlorée sont le chloroforme ($CHCl_3$), le bromodichlorométhane ($CHBrCl_2$), le chlorodibromométhane ($CHClBr_2$) et le bromoforme ($CHBr_3$). Ces substances existent à l'état liquide à une température ambiante (**Santé canada, 2003**). Elles sont extrêmement volatiles et se dégradent dans l'air par réaction photo oxydative (**O.M.S, 2000; Santé canada, 2003**).

Il est important de souligner que les études qui ont été effectuées en Algérie, par **Achour et Moussaoui (1993)**, et **Achour et Guergazi (2002)**, ont montrés qu'au cours de la chloration des eaux brutes, il y'a formation de quantités importantes de chloroforme allant de 39 à 152 $\mu\text{g/l}$. Lors de la chloration à forte dose; d'une eau brute contenant des précurseurs organiques (composés organiques d'origine naturelle comme les acides humiques ou d'origine industrielle comme les pesticides), il se forme des composés organo-chlorés, parmi lesquels figurent les halométhanes. Ce sont des composés volatiles du chlore et du méthane, dont le plus connu est le chloroforme. Découverts en 1974, leur présence fut jugée inquiétante pour deux raisons principales à savoir :

- Des expériences ont montré l'effet cancérigène du chloroforme chez le rat ;
- Une fraction importante des composés organochlorés non encore identifiés (80%) et parmi eux, il est à craindre l'existence de composés aussi toxiques que le chloroforme. (Fig.5).



Figure 5. Quelques exemples de problèmes mutagènes et cancérigènes associés aux THM
(Guergazi, 1998)

Il convient de souligner que les doses de chloroforme administrées aux rats lors des essais de carcinogénèse sont très élevées par rapport aux quantités détectées dans les eaux de boisson. Les résultats de différentes études engagées à ce jour, ne permettent pas de déterminer si la chloration de l'eau présente ou non un danger réel pour le consommateur. Ainsi, certaines études ont décelé de très faibles associations statistiques avec les cancers de l'estomac, du gros intestin, du rectum ou du pancréas. De même, une évaluation de ces études par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) de Lyon, a conduit à la conclusion qu'il n'était pas possible d'affirmer que la consommation d'eau de boisson chlorée pouvait induire des cancers (Ahour, 2001). Par ailleurs, il est bien montré que les (THM), sont des sous-produits halogénés susceptibles d'accroître l'incidence de cancer de la vessie et éventuellement du côlon et des reins suite à l'ingestion d'eau chlorée durant plus de 25 ans, et provoquer des problèmes mutagènes (Vandentorren, cité par Véronique, 2003).

Plusieurs études épidémiologiques ont tenté de montrer des possibilités de corrélation entre eau chlorée et cancer de la vessie. Des associations dont le poids reste faible ont été signalées, cependant, aucune relation causale n'a pu être mise en évidence (Cantor K.P et al., 1990). D'après Daniel et al., (1991), des essais d'ingestion d'eau fortement chlorée ou chloraminée, par des souris, n'ont pas décelé une quelconque tendance du chlore à induire des cellules cancéreuses.

III.3.2. Réactions à l'origine de goûts et d'odeurs

L'un des inconvénients majeurs de la chloration réside dans la survenue de "goûts et d'odeurs de chlore", mal acceptés par les consommateurs. Ces désagréments résultent de la formation excessive de chloramines, lors du traitement par le chlore d'une eau riche en matières organiques. Ils peuvent également provenir d'un taux de chlore libre résiduel excessif, supérieur à 0,4 mg/l (**Guergazi, 1998**).

Le goût de chlore est en France par exemple; le deuxième motif de plaintes, après le calcaire et avant la turbidité, et conduit à un comportement paradoxal : les consommateurs se détournent parfois de l'eau distribuée chlorée au profit de sources particulières non traitées (puits privés, sources sauvages), qui ne respectent pas toujours les normes sanitaires (**Aupic, 1985 ; Collin et al., 1986**). Ce désagrément est à l'origine d'une réticence de certaines collectivités à installer une structure de traitement, et contribue enfin au succès d'autres procédés de désinfection ne procurant ni odeurs ni saveurs. Signalons qu'aux Etats-Unis, le goût de chlore est très bien accepté par les consommateurs, car il est perçu comme la garantie de l'innocuité de l'eau.

III.3.3. Incidence de la composante minérale sur la chloration de la matière organique

Comme nous l'avons décrit précédemment, le chlore agit sur différents composés présents dans l'eau. Il réagit tout d'abord très rapidement avec certaines substances oxydables (sels de fer, manganèse et nitrites...), pour former des composés oxydés et des chlorures dont le pouvoir désinfectant est nul. La quantité de chlore consommé, dans ce cas constitue la demande immédiate (**Doré, 1989**).

En présence d'ammoniaque et de certains composés organiques azotés, il forme des chloramines ou chlore combiné. Ces chloramines sont peu désinfectantes et donnent des goûts désagréables à l'eau (Fig. 6).

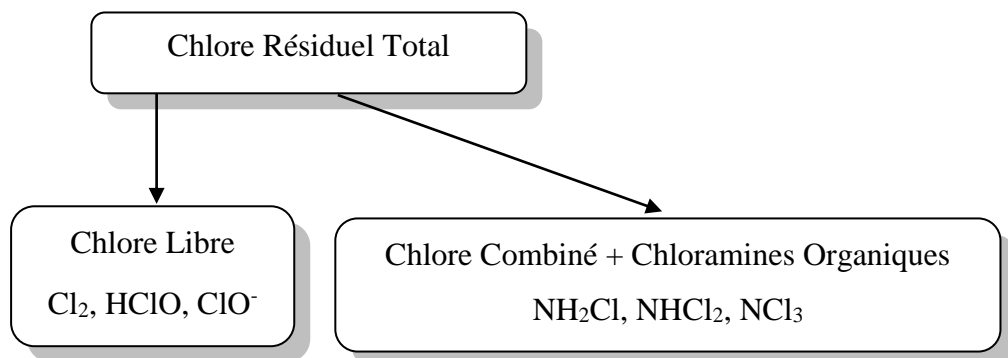


Figure 6. Différentes formes de chlore résiduel total (**Doré, 1989**)

La chloration de la matière organique en présence de quelques éléments minéraux spécifiques tels que l'ion ammoniacal ou bromure, est abordée surtout sous l'angle de la détermination et de l'évolution des composés organohalogénés en particulier les trihalométhanes.

La présence de la composante minérale entre en réaction compétitive avec le chlore et la matière organique et provoque soit un effet promoteur, tels que les ions ammoniums ou bromures, soit un effet inhibiteur (de la réaction de chloration de la matière organique) tels que les chlorures et les sulfates (**Guergazi, 1998 ; Achour, 2001**).

IV. Principales applications de la chloration

IV.1. Applications de l'hypochlorite de sodium

L'hypochlorite est utilisé dans une large gamme d'applications ; telles que en agriculture, dans l'industrie chimique, dans les industries de la peinture et de la chaux, dans l'industrie alimentaire, dans celles du verre, du papier, dans l'industrie pharmaceutique et dans les industries de synthèse et de dépôt des déchets. Dans l'industrie du textile, l'hypochlorite de sodium est utilisé pour blanchir le textile. Il est parfois ajouté dans l'industrie du traitement des eaux usées et cela pour en réduire les odeurs. L'hypochlorite neutralise l'hydrogène de sulfure (HS) et l'ammoniac (NH_3). Il est aussi utilisé pour désintoxiquer des bains de cyanure dans l'industrie des métaux. L'hypochlorite peut être également utilisé pour prévenir la croissance des algues et des organismes dans les tours de refroidissement. Dans le traitement de l'eau, l'hypochlorite est utilisé pour désinfecter l'eau. Dans les tâches domestiques, l'hypochlorite est utilisé pour la purification et la désinfection de la maison (**Lenntech, 2010**).

IV.2. Application du chlore au traitement de désinfection des eaux

Les installations de production d'eau potable utilisent surtout le chlore comme désinfectant. Il a toutefois été constaté qu'en vertu de ses capacités oxydantes (**Leclerc, 2003**), il peut servir à d'autres fins, dont quelques exemples :

- Eliminer les goûts et odeurs désagréables des eaux;
- Prévenir la croissance d'algues dans les ouvrages de la station et notamment les filtres;
- Enlever le fer et le manganèse de l'eau;
- Détruire le sulfure d'hydrogène;
- Maintenir la qualité de l'eau dans le réseau de distribution;
- Eliminer l'azote ammoniacal;

- Favoriser la floculation par déstabilisation des particules colloïdales et désinfecter partiellement l'eau avant la décantation (**Merlet, 1986**).

V. Avantages et inconvénients du chlore

La désinfection par le chlore et ses dérivés présente de nombreux avantages, en raison de sa grande efficacité et son utilisation extensive (**Labas et al., 2006**); il est :

- Simple à doser (**Silva Martínez et al., 2004**);
- Le biocide oxydant le plus économique pour des concentrations d'utilisation de 0,5 à 1,5 mg/l (**Keister, 2008**);
- Il inactive de manière efficace une vaste gamme d'agents pathogènes courants ;
- Il laisse dans l'eau un résidu facilement mesurable et dont le suivi est aisé.

Cependant, le chlore pose des problèmes de sécurité relatifs à son stockage et sa manipulation. Il est fortement dépendant des paramètres de température et de pH qui influent sur son efficacité ; de plus son action résiduelle est de courte durée. Des doses élevées de chlore peuvent faire en sorte que l'eau ait un goût et une odeur désagréable. Ce type de traitement présente également d'autres inconvénients liés à :

- **Corrosion**

Les concentrations de chlore utilisées peuvent provoquer une corrosion notable des tuyaux de distribution (**Oguma et al., 2004**), conduisant à deux conséquences distinctes. D'une part, au sein des dépôts de corrosion, des organismes autotrophes peuvent exister, générant ainsi de la matière organique, qui après décomposition, redonne des éléments nutritifs aux autres cellules hétérotrophes. Il existe ainsi des zones micro-aérobies et anaérobies dans les dépôts et dans les biofilms, et ce, jusqu'à la surface au contact avec un éventuel biocide présent dans l'eau. Ces zones permettent alors aux espèces présentes de trouver de la nourriture et une protection leur permettant de se multiplier ou au moins de survivre. D'autre part, cette présence de corrosion augmente la consommation du chlore résiduel (**Levi, 2001**). Il est donc nécessaire d'avoir des matériaux de construction et des tuyaux résistants à cette corrosivité du chlore, avec, par exemple, une couche protectrice de silicate de sodium (**Kim et al., 2002**).

- **Formation de sous-produits chlorés**

Le chlore réagit avec les composés présents dans l'eau comme l'azote ammoniacal et particulièrement les composés organiques azotés. Ces réactions diminuent l'effet du chlore car ces composés réagissent avec le chlore libre pour former

des chloramines organiques et inorganiques (Cloete et al., 1998). Le chlore peut aussi réagir avec la matière organique naturelle (MON), présente dans les eaux brutes formant ainsi des sous- produits de chloration tels que les trihalométhanes (THM) et les acides haloacétiques (AHA) (Chin et Bérubé, 2005). Certains de ces composés ont des propriétés mutagènes et cancérigènes (Nakamura et al., 1993). Ils ont un fort impact environnemental en affectant la vie aquatique si l'eau chlorée est rejetée dans le milieu naturel. Ils entraînent également une sur consommation du chlore, le rendant moins disponible pour la désinfection (Silva Martínez et al., 2004).

- **Résistance des microorganismes et la formation d'agglomérats**

Certains microorganismes développent une forme de résistance face à ce biocide (Duckhouse et al., 2004). En effet, certains microorganismes sont capables de muter sous des conditions « normales » de chloration. Ainsi, des souches plus tolérantes se développent. Pour combattre ce phénomène, il est possible d'utiliser une plus grande quantité de chlore, qui peut résulter en des goûts et odeurs déplaisants, dus à la formation de chlorophénols et d'autres halocarbones (Joyce et al., 2003a). De plus, le chlore est inefficace pour atteindre les microorganismes se trouvant à l'intérieur des agglomérats de bactéries (Duckhouse et al., 2004).

VI. Activité désinfectante du chlore

VI.1. Paramètres influençant l'efficacité du chlore

L'efficacité biocide du chlore dépend de la prise en compte d'un certain nombre de facteurs qui influencent la quantité de chlore nécessaire à une bonne désinfection :

a) Effet du pH : L'action bactéricide du Cl augmente ou tend à augmenter pour les valeurs faibles du pH de l'eau, en particulier une augmentation de la teneur en CO₂, produisant une baisse du pH, pour les eaux ayant une alcalinité, l'action du Cl sera plus grande pour les eaux contenant plus du CO₂; que celles en contenant moins. Il a été vérifié qu'en prenant deux échantillons d'une même eau dont les valeurs du pH sont respectivement 10 à 5, il faut 150 fois plus de Cl dans le premier cas (pH = 10), pour obtenir les mêmes effets bactéricides (Lenntech, 2010). Ainsi, l'efficacité du chlore est plus grande lorsque le pH de l'eau est peu élevé.

b) Effet de la température : L'effet bactéricide du chlore augmente lorsque la température augmente. En effet, lorsque la température augmente l'efficacité du désinfectant augmente. Il a été démontré que deux échantillons d'une même eau ayant pour pH 7 et dont les températures sont 4° et 25 °C, il faut 2,5 fois plus de Cl dans le premier

cas que dans le second cas (**Lenntech, 2010**). Mais le chlore perd son efficacité lorsque l'eau est trop chaude.

c) Effet du temps de contact entre les germes et le désinfectant : L'effet bactéricide est proportionnel à la durée de contact du désinfectant avec l'eau. Il existe peu de règles à ce sujet et l'expérience confirme que l'effet varie avec la nature et le nombre d'organismes présents (**Lenntech, 2010**). C'est le temps qui s'écoule entre l'injection du chlore et la consommation de l'eau. Les quantités de chlore nécessaires à la désinfection sont d'autant plus faibles que le temps de contact est important.

d) Effet de la turbidité : Les paramètres générateurs de turbidité (matières en suspension, colloïdes), nuisent à l'efficacité de la chloration : ils sont consommateurs de chlore et protègent les germes contre son action désinfectante (**Kaneko et Igarashi, 1983**); c'est pourquoi il est important de réduire le plus possible la turbidité de l'eau à désinfecter, au moyen de traitements préalables (coagulation, sédimentation, filtration ...).

Si de tels traitements ne sont pas ou ne peuvent pas être mis en place, ou sont défectueux à un instant donné, un surdosage de chlore permettra d'obtenir une désinfection correcte, mais avec comme conséquence l'apparition de sous- produits.

Sur un plan général, la désinfection sera optimale lorsque les paramètres énoncés ci-dessous seront respectés : Turbidité < 0,5 NTU, pH < 8, temps de contact > 30 min.

Les composés azotés et la matière organique que contient l'eau en plus ou moins en grande quantité sont également d'importants consommateurs de chlore. Il est donc préférable de réduire leur concentration avant de désinfecter l'eau.

Enfin, le nombre de micro-organismes présents dans l'eau influence l'efficacité de la chloration. En effet, la réglementation Française prévoit un nombre maximum de germes tolérables au niveau de l'eau brute, considérant que l'on ne peut garantir une désinfection satisfaisante à partir d'une eau de n'importe quelle qualité microbiologique (**Guergazi, 1998**).

e) Quantité totale de chlore à utiliser : L'action bactéricide du chlore dépend entièrement de son dosage. En principe on doit ajouter du Cl en quantité suffisante pour que la réaction soit complète, mais cette condition est nécessaire et non suffisante, car une eau bien chlorée doit conserver un résiduel de chlore libre qui continuera l'action bactéricide et prévenir les éventuelles contaminations survenant après les opérations de désinfection.

La quantité totale de Cl₂ à utiliser est déterminée à partir de deux méthodes appelées test chloré (Genre test), et la méthode du point critique. La méthode du test chloré appelé demande en chlore, en pratique la dose moyenne utilisée est comprise entre 0,1 et 1 mg/l et peut atteindre 5 mg/l dans certains cas (**Lenntech, 2010**).

VI.2. Pratique de la chloration en Algérie

Le chlore gazeux est utilisé dans les usines importantes, l'hypochlorite de sodium est utilisé dans le cas de petites installations. Chaque type de chlore nécessite des appareillages particuliers et demande des conditions de mise en oeuvre et précautions d'entretien bien précises.

Au niveau des stations de traitement, la chloration est effectuée selon le type d'eau à distribuer aux consommateurs. Les taux de chlore utilisés sont directement liés à la qualité de l'eau brute à traiter et en particulier à la concentration en matière organique et /ou matières minérales réactives vis-à-vis du chlore en particulier les substances azotées.

En Algérie, la chloration est l'unique méthode pratiquée à partir de l'hypochlorite de sodium (eau de Javel), ou plus rarement de chlore gazeux, telle que la station de traitement des eaux de barrage de Ain Zada (Sétif), des eaux de barrage de Hammam Ghrouz (Constantine), des eaux de barrage de Keddara (Alger)...etc. Les taux de chlore utilisés sont directement liés à la qualité de l'eau brute à traiter et en particulier à la concentration en substances azotées. L'appréciation de l'efficacité du traitement est subordonnée à un personnel encore insuffisamment expérimenté, de sorte que les dosages sont généralement ceux définis par les constructeurs de station (1 à 5 mg/l en pré-chloration et 1 à 2 mg/l en post-chloration) d'une façon générale (**Achour, 2001**).

Dans le cas d'une eau souterraine, la chloration des eaux de consommation est effectuée en une seule étape, l'appareillage de mise en oeuvre pour la désinfection de l'eau est très simple.

Au niveau du réservoir, il y'a généralement un bac de mise en solution. Dans le cas où il y'a une injection directe dans le réseau, la chloration est effectuée par des pompes doseuses.

Des études sur des eaux provenant de stations de traitement (**Achour, 1992 ; Merakeb et Hafid, 1991**), indiquent que les eaux arrivant aux consommateurs présentent souvent un goût désagréable dû à un excès de chlore résiduel et/ou à la formation de produits de substitution organohalogénés. De même, la teneur en chloroforme dépasse souvent la norme recommandée par l'OMS (**Achour et Moussaoui, 1993**).

Par ailleurs, une étude faite par **Guergazi et Achour (2004)**, sur la qualité des eaux de consommation de la ville de Biskra, a montré que les teneurs en chlore résiduel des eaux distribuées sont très variables, allant de valeurs nulles jusqu'à des valeurs dépassant 2 mg/l. Cette valeur dépasse largement les normes de 0,10 à 0,20 mg/l de chlore résiduel au robinet. En effet, l'absence totale du chlore résiduel pour les différents points est expliquée d'une part par, la présence dans le réseau des micro-organismes qui sont fixés aux parois des canalisations et dans ce cas le chlore a pu jouer partiellement son rôle de désinfectant. D'autre part, il peut y avoir la présence de quelques éléments minéraux réducteurs présents dans les eaux et qui ont une forte réactivité avec le chlore. C'est le cas du fer et du manganèse qui ont une réactivité non négligeable vis-à-vis du chlore (**Guergazi et Achour, 2004 ; Doré 1989**). L'absence de chlore résiduel peut être attribuée à la dose de chlore introduit insuffisante pour que la chloration aboutisse à ses objectifs qui sont, la destruction des micro-organismes et l'oxydation de quelques éléments minéraux et organiques contenus dans le réseau. Par contre, la présence de teneurs résiduelles en chlore atteignant 2 mg/l semble indiquer que les gestionnaires peuvent parfois majorer fortement les doses introduites sans essais préalables en laboratoires.

VI.3. Mécanisme d'inactivation des micro-organismes par le chlore

VI.3.1. Mécanisme d'inactivation des bactéries

Les recherches visant à expliquer le mécanisme d'action du chlore sur les bactéries aboutissent à des résultats divergents. Ainsi, en **1975; Venkobachar et al.**, conclurent que le chlore agit en oxydant les enzymes de la respiration (aldolases et diverses déshydrogénases). Cependant, **Mc Fetters et Camper (1983)**, expliquent que cette oxydation n'est réalisable qu'in vitro, sur des extraits enzymatiques, et non pas sur des bactéries entières et vivantes. Pour **Haas et Engelbrecht (1989)**, le chlore provoquerait l'inhibition de la synthèse protéique, suite à l'oxydation des enzymes impliquées. Ces mêmes chercheurs ont étudié la diminution de la synthèse de l'ADN par la chloration.

VI.3.2. Mécanisme d'inactivation des virus

Comme pour les bactéries, le mécanisme d'inactivation des virus par le chlore demeure mal connu. La modification de l'acide nucléique du virus semble être la transformation, dont les conséquences sont les plus importantes pour l'inactivation du virus (**Fauris, 1986**). **Calvert et al., (1983)**, ont signalés que le chlore provoquait l'augmentation de la perméabilité de la capsid virale par modification des protéines qui la composent.

Le chlore diminuerait également, mais de façon secondaire, le pouvoir de fixation des virions sur les cellules. Cela serait valable pour le chlore mais aussi pour l'ozone (**Roy et al, 1981**) et le bioxyde de chlore (**Hauchman et al, 1986**).

VI.3.3. Mécanisme d'inactivation des protozoaires

Les phénomènes sont peu connus car ils n'ont été que très rarement étudiés. Des études ont montré que les kystes inactivés d'*Entamoeba Hystolitica* présentaient des altérations au niveau de leur noyau, ces détériorations pourraient provenir de la pénétration de l'acide hypochloreux (**Chang et al, 1986**). Par ailleurs, **Derreumaux et al. (1974)**, ont observé que les formes végétatives des amibes libres appartenant au genre *Naegleria*, étaient complètement lysées lorsque l'on appliquait des doses de chlore suffisamment importantes.

VI.4. Sensibilité des germes à la chloration

Tous les germes ne possèdent pas une sensibilité identique vis-à-vis du chlore. Tandis que certains sont instantanément inactivés par de faibles concentrations en chlore, d'autres sont très résistants, et les doses nécessaires à leur destruction sont parfois considérables.

Très schématiquement, les bactéries sont plus sensibles à la chloration que les virus, lesquels sont moins résistants que les kystes de protozoaire pathogènes tels que *Giardia* ou *Cryptosporidium*.

On constate qu'une concentration de 0,1 mg/l de chlore libre permet d'inactiver *E. coli* en une fraction de minute ; il faut par contre 5 fois plus de chlore et un temps de contact de 2 minutes pour inactiver le *Poliovirus 1*, et des valeurs 10 à 20 fois supérieures pour les kystes de parasites.

La teneur maximale en chlore libre résiduelle préconisée par la réglementation Française (0,1 mg/l), permettrait d'inactiver les *E.coli*, mais pas les virus *polio1* et encore moins les kystes de parasites, s'ils venaient à s'infiltrer à l'intérieur du réseau de distribution.

En outre, il a été montré que l'acide hypochloreux était 80 fois plus actif que ClO^- pour inactiver l'espèce bactérienne *E.coli* et 150 fois plus pour détruire les kystes d'*Entamaeba histolytica* (**White, 1992**). Ceci a été rapporté par les travaux de **Ellis (1991)**, qui ont montré que 99% des micro-organismes (*E. coli*, *Poliovirus* et *Giardia – Lamblia*), sont inactivés par le chlore et cela pour une température comprise entre 5 et 23 °C et un pH acide. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'acide hypochloreux (*HOCl*), grâce à sa faible

taille moléculaire et à sa neutralité, peut traverser plus aisément les parois cellulaires, comparé à la forme dissociée de ClO^- (Ellis, 1991 ; White, 1992).

Dans le même contexte, les travaux effectués par Morris et al. (1992) ont montré qu'une solution d'hypochlorite de sodium (NaClO) contenant 3,50 g de chlore actif est active contre 7 virus dont le *Poliovirus* très résistant. Cette constatation permet de penser que cette solution serait active contre le *rétrovirus* et en particulier contre le virus du sida.

En 1981, dans une étude sur la résistance au chlore des *Salmonelles* isolées des eaux d'alimentation, Baylet et al., (1981) montrent qu'une concentration initiale de 0,30 mg/l de chlore libre permet la survie à la 30^{ème} minutes de 33,33% des souches testées, tandis que la teneur en chlore résiduel n'est jamais descendue en dessous de 0,1 mg/l durant ce laps de temps. Au bout de 1 heure de contact, la survie est encore de 4,16 %. L'inactivation des *Salmonelles* est finalement obtenue à la 60^{ème} minute avec une dose initiale de 0,40 mg/l de chlore libre et le maintien d'une teneur résiduelle supérieure ou égale à 0,1 mg/l. Ou encore en moins de 15 minutes avec une dose initiale de 0,50 mg/l de chlore libre.

Les *Salmonelles* apparaissent donc beaucoup plus résistantes au chlore que les *E.coli*, qui servent d'indicateurs.

A ce propos, en 1975; Sinègre et al., ont retrouvé des *Salmonelles* dans des échantillons d'eaux traitées par javellisation, alors que ces mêmes échantillons ne renfermaient pas d'indicateurs de contamination fécale.

Inversement, *Campylobacter jejuni*, présente une sensibilité au chlore comparable à *E.coli*, voire même supérieure (Martin et al, 1986).

La résistance individuelle au chlore des entérovirus a été révélée par les travaux de Liu et al., en 1971; qui portaient sur 20 entérovirus humains testés avec une eau de la rivière aux USA.

Ce travail a montré que des différences de résistance au chlore existaient entre les Entérovirus, les *Réovirus*, étant les plus sensibles et les *Poliovirus* et *Coxsackievirus*, les plus résistants. Ces derniers étaient inactivés à 99,99% au bout de 40 minutes par 0,5 mg/l de chlore libre à pH 7,8, tandis que les *réovirus* le sont en 4 minutes.

La plupart des virus testés par Liu et al., (1971) manifestaient une résistance au chlore environ 10 fois supérieure à celle des entérobactéries. Mais les résultats sont basés sur l'extrapolation de données expérimentales au moyen de cinétiques de premier ordre.

C'est une des raisons qui poussa Engelbrecht et ses collaborateurs à entreprendre en 1980, une expérience similaire, afin de vérifier les observations de **Liu et al., (1971)** et obtenir davantage d'informations sur l'incidence du pH lors de l'inactivation des virus (**Evins et Greaves, 1979**). Ils conclurent que des concentrations en chlore libre de 0,5 mg/l le temps nécessaire à l'inactivation de différents entérovirus à pH 6 et à pH 10.

Il apparait que :

- Tous les virus testés ont une résistance au chlore exacerbée lorsque le pH du milieu augmente;
- *Polio 2, Echo 1* et *Coxsackie 85*, sont globalement les plus résistants;
- Les virus les plus résistants à un pH donné; ne sont pas forcément les plus résistants à un autre pH.

Ainsi, *Echo 1*, qui est un des plus sensibles à pH 6, devient le plus résistant à pH 10. **Engelbrecht et al. (1980)** en déduisent que le pH exerce non seulement un effet sur les espèces de chlore en présence (HOCl ou ClO⁻), mais aussi directement sur les virus.

Engelbrecht et al., (1980) conduisirent également une expérience dans des conditions identiques à celles de **Liu et al., (1971)** (température, pH, concentrations en chlore), et observerent des sensibilités accrues par rapport à celles constatées par **Liu et al., (1971)** Cette différence fut attribuée à l'utilisation par Liu et al., d'une eau de rivière partiellement traitée, tandis que **Engelbrecht et al., (1980)** ont utilisé pour ses expériences de l'eau distillée. L'eau de la rivière a sans doute favorisé l'agrégation des particules virales, ce qui contribue à accroître la résistance au chlore des virus.

Des études ultérieures ont confirmé l'importante résistance des entérovirus et en particulier des *Coxsackievirus*, notamment par rapport aux indicateurs bactériens (**James, 1986**). Des chercheurs ont détecté en effet, la présence d'entérovirus dans 7% des échantillons d'eau issus d'usines de fabrication d'eau potable. Des entérovirus infectieux étaient encore détectés après un temps de contact de 16 heures avec un résiduel de chlore de 0,1 mg/l (**Payment et al., 1985**). Le virus de l'hépatite A, est également très résistant. Ainsi, en 1983; **Peterson et al.**, ont démontré, en injectant à des singes un inoculum contenant le virus, que celui-ci était encore infectant après avoir été traité par chloration. Les inoculums ont été traités pendant des durées variables et à différentes concentrations en chlore. Les résultats consistaient à déterminer l'apparition d'une hépatite et/ou d'une séro-conversion chez les singes inoculés.

Un traitement par 0,5 à 1,5 mg/l de chlore libre inactive une partie des HAV. En revanche, à partir de 2,0 mg/l, tous les virus sont détruits. Le virus de l'hépatite A est donc plus résistant que les entérovirus qui sont inactivés par 0,5 mg/l de chlore libre. On souligne que ces résultats, obtenus dans des conditions de laboratoire, ne permettent pas de définir les quantités de chlore requises pour inactiver le virus au sein même environnement. En effet, dans des conditions naturelles, les virus échappent en partie à l'action du chlore grâce aux particules en suspension qui favorisent leur aggrégation (**Kaneko, 1982**). On connaît peu de choses en ce qui concerne la résistance des *Cryptosporidium*, cependant une certaine résistance de ces parasites à l'action du chlore a été rapportée. En effet, lors d'une épidémie survenue en 1987, dans la ville de Géorgie (USA), des *Cryptosporidium* ont été isolés et identifiés dans l'eau de distribution. Or cette eau avait été traitée par coagulation, sédimentation, filtration puis désinfection, le taux de chlore résiduel libre étant de 1,5 mg/l à la station (**Gulludec, 1995**).

Enfin, il convient d'évoquer le rôle des nématodes (vers), qui sont systématiquement retrouvés dans les canalisations. Ces vers colonisent les filtres et s'y reproduisent activement. Ils sont très résistants à la chloration et supportent sans dommage les résiduels de chlore maintenus dans les canalisations (**Chang et al., 1986**). Certains d'entre eux pourraient héberger et protéger des bactéries (*Salmonelles, Shigelles*), et des virus pathogènes (*Coxsackievirus*), et jouer ainsi le rôle de vecteur d'agents infectieux. Les entérobactéries et virus éventuellement pathogènes pour l'homme, véhiculés dans le tube digestif de ces nématodes, peuvent y survivre 24 à 48 heures.

Ainsi, ces études confirment que tous les germes n'ont pas la même sensibilité au chlore que les *Echerishia coli*. Un certain nombre d'entre eux, de par leurs caractéristiques propres, peuvent échapper à un traitement classique par chloration seule. C'est le cas notamment des kystes de protozoaires, du HAV, des entérovirus ou de certaines bactéries comme les Salmonelles. D'autre part, les germes font partie intégrante d'un environnement capable d'augmenter encore la résistance de certains d'entre eux, et de modifier sensiblement l'efficacité biocide du chlore.

En conclusion :

- Les *Echerishia coli* ne sont pas de bons indicateurs de la qualité microbiologique d'une eau traitée par chloration;
- Un traitement de chloration bien conduit et la persistance d'un résiduel de 0,1 mg/l ne garantissent pas l'absence totale de germes pathogènes ;

- L'élimination des spores et kystes de protozoaires nécessite d'autres procédés que la chloration (ex : filtration);
- La chloration résiduelle telle qu'elle est pratiquée ne constitue pas une protection contre une contamination accidentelle du réseau. Par ailleurs, la réglementation Française par exemple n'impose aucunement le maintien d'un résiduel en réseau. Elle précise seulement que si résiduel il y a, celui-ci ne doit pas excéder 0,1 mg/l.

L'instauration d'un résiduel plus élevé se heurterait au problème du goût de chlore, mal accepté par les consommateurs Français, et accroîtrait le risque d'apparition de sous-produits indésirables ;

La résistance des virus vis-à-vis des quantités de chlore couramment appliquées, pourrait confirmer l'hypothèse selon laquelle les virus seraient à l'heure actuelle la première cause de gastro-entérites (**Guergazi, 1998**).

Ces différentes constatations confirment la nécessité de choisir des ressources hydriques de la meilleure qualité possible et de les protéger efficacement contre une contamination externe.

VII. Conclusion

Le chlore gazeux ou sous forme d'hypochlorite de sodium, est un oxydant puissant. Il permet l'oxydation de la matière organique et minérale ainsi que la désinfection pour l'inactivation de microorganismes pathogènes. Il a fait preuve d'efficacité depuis de nombreuses années tant dans le monde qu'en Algérie.

Le chlore a une réactivité appréciable vis-à-vis de la matière organique des eaux, aussi bien vis-à-vis des composés organiques complexes tels que les substances humiques que des composés simples, caractérisés par un noyau aromatique contenant un groupement fonctionnel (OH, NR₂...). De même, il est très réactif vis-à-vis des bases puriques et pyrimidiques constituants des acides nucléiques (ADN et ARN) et molécules vitales dans le métabolisme de micro-organismes de l'eau.

Enfin, nous pouvons dire que les données scientifiques montrent que les avantages de la chloration de l'eau potable surpassent les risques sanitaires que peuvent poser les THM et autres sous-produits. Bien qu'il existe d'autres oxydants, les traiteurs d'eau continuent de privilégier le chlore.

Chapitre III

*Aspect botanique des espèces végétales
étudiées, et leurs essences végétales*

Chapitre III

Aspect botanique des espèces végétales étudiées, et leurs essences végétales

I. Introduction

Les goudrons sont produits à partir de combustibles (le pin, le hêtre, le bouleau, le cèdre et le cade ou genévrier), ou la houille ou le schiste (origine pétrolifère), portés à haute température. Ces différents combustibles produisent de composition différente **(Dorvault ,1994)**.

Il existe plusieurs types des essences végétales. En Algérie, les espèces les plus couramment utilisées sont : l'huile de cade et le huiles de pin dont l'extraction sont réalisée à partir du cadier (*Juniperus oxycedrus*), ou du pin (*Pinus halepensis*), par pyrogénéation, conformément à la méthode traditionnelle.

II. *Pinus halepensis* (Le pin d'Alep)

II.1. Description botanique

II.1.1. Genre *pinus*

Le pin est la désignation générique des arbres appartenant au genre *Pinus*. L'origine de nom pinus provient du mot Indo –Européen « pit », désignant une résine **(Judd et al., 2002)**. Le genre *Pinus* appartenant à la famille des Pinacées (Pinaceae), ou Abiétacées (Abiétaceae). Cette famille est la plus importante des conifères tant par le nombre de ses espèces (de plus de 90), toutes caractérisées par une phyllotaxie unique et prétendue des forêts qu'il constitue, que par son utilisation intensive dans le reboisement et l'importance économique de ses produits. Ils vivent en plaine dans les régions nordiques, mais surtout en montagne dans les régions chaudes. Ce sont, à quelques exceptions près, des arbres de haute taille, à cime habituellement conique, dont les rameaux longs couverts de petites écailles portent des rameaux très courts à feuilles aciculaires persistantes, à la différence de celles des sapins ou des épicéas **(Brosse, 2000)**.

On reconnaît un Pin par le développement sur le rameaux longs ou moyens de petits bouquets de 2, 3, 5 aiguilles. Ces aiguilles ne sont pas libres, mais réunies en faisceaux dans une gaine écailleuse qui enserre leur base *brachyblaste* et c'est d'après le nombre des feuilles ainsi groupées qu'on distingue dans le genre trois sections : pins à 2, à 3 et à 5 **(Gaussen et al., 1982; Quezel et Santa, 1963)**. Les cônes (ou pommes à pin), dont la maturation demande 2 ou 3 ans, sont constitués d'écailles ligneuses à la partie terminale épaissie et de forme pyramidale, portant le nom d'écusson **(Brosse, 2000)**.

Pinus halepensis et *Pinus brutia* sont deux taxons très proches génétiquement, précédemment inclus dans une section distincte ou dans la sous-section *halepensis* (**Price et al., 1998, Lopez et al., 2002**). La classification récente du genre *Pinus*, sous-genre *Dyploxylon*, ou pins « durs » à tendance à regrouper les deux espèces *P. halepensis* et *P. brutia* avec *P. heldreichii*, *P. pinaster*, *P. pinea*, *P. canariensis* et *P. roxburghii* dans la sous-section *pinaster*, également appelée le groupe des pins méditerranéens (**Gernandt et al., 2005 ; 2008**).

II.1.2. Espèce *Pinus halepensis*

Le pin d'Alep (*P. halepensis*) appartient à un groupe de pins dans lequel plusieurs espèces ont été décrites. L'espèce *Pinus halepensis*, fait partie de la section Halepensoïdes qui est divisée en trois groupes parmi lesquels le groupe *halepensis* qui se caractérise par des feuilles à deux aiguilles et à cônes caducs (**Nahal, 1962; Kadik, 2006**). C'est le botaniste écossais Philip Miller qui lui donna abusivement ce nom scientifique, en 1768.

Le Pin d'Alep est un arbre qui peut atteindre 20 m avec un tronc de 80 cm et peut atteindre 150 cm de diamètre (**Maire, 1952**). Il est branchu et feuillé dès la base, puis développe un fût grêle, flexueux, souvent penché par le vent, à cime étalée, irrégulière et peu dense, on distingue :

L'écorce est lisse, de couleur grise - argentée chez les jeunes arbres et devient écailleuse et plus sombre de couleur brune rougeâtre chez les adultes. Elle est très inflammable et très riche en tanins (**Boutchiche et Boutrighe, 2016**). **Les bourgeons** non résineux de forme cylindro-coniques ont une taille comprise entre 7 et 8mm. **Les aiguilles** groupées par 2, parfois plus, sont souples, de couleur vert – gris clair, longues de 5 à 12 cm, et de moins de 1 mm de diamètre, rassemblées en pinceaux à l'extrémité des rameaux (**Brosse, 2000**). **Les cônes mâles** longs de 6 à 7 cm, ressemblant à des chatons dressés, produisent une grande quantité de pollen jaune orangé dispersée par le vent. **Les cônes femelles**, plus gros, mûrs à l'automne de la seconde année, ovoïdes coniques aigus, longs de 6 à 12 cm, roux vif luisant à maturité et réfléchis vers le bas du rameau (**Nahal, 1986**). **Les graines** comestibles (Fig.7), appelées «Zgougou», sont utilisées dans plusieurs préparations culinaires. Ces graines sont ovoïdes bombées à trois angles, de petite taille (de 5 à 7 mm) à aile de 3 - 4 fois plus longues (**Bonnier, 1990**), brun gris sur une face et gris moucheté de noir sur l'autre (**Boutchiche et Boutrighe, 2016**).

Le pin d'Alep demande beaucoup de lumière et de chaleur. Il supporte bien la sécheresse mais il est très sensible au froid, ce qui limite son implantation en zone méditerranéenne et

à faible altitude (étage semi –aride). Très peu exigeant quant au sol, il s’accommode bien des terrains calcaires où il a peu de concurrents.



Figure 7. Les différentes parties de Pin d’Alep (*Pinus halepensis*) (Boutchiche et Boutrighe, 2016)

a- les aiguilles, b-l’écorce, c-arbre, d-les graines, e- le cône

Noms vernaculaires :

- *Arabe* : الراوراي الحلبى. الصنوبر الحلبي. (Sanaouber halabi , raourai).
- *Berbère* : Azoumbei, Taïda.
- *Français* : pin d’Alep, pin de Jérusalem, pin blanc. Pin blanc de Provence
- *Angleterre*: Aleppo pine, Jerusalem pine.
- *Espagne* : Pino carrasso.
- *Italie* : Pino di Gerusalemme. Pino di Aleppo
- *Allemagne* : Aleppo Kiefer.

Noms scientifiques :

Pinus halepensis ; *Pinus halepensis* Mill ; *Pinus halepensis* sageMill ; *Pinus halepensis* var. *marrocanus* Sennen ; *Pinus halepensis* f. *kerkeranus* Sennen ; et *P. halepensis* (CJB, 2020).

II.2. Classification botanique

La systématique du pin d’Alep établie par FARJON (1996) est rapportée dans le tableau ci-dessous (Tab. 6).

Tableau 6. Classification botanique de *Pinus halepensis*

Taxonomie	Selon FARJON (1996)
Règne	Plantae
Sous - règne	Tracheobionta (Ozenda, 2006)
Embranchement	Spermatophytes
Sous - embranchement	Gymnospermes
Classe	Pinopsida
Ordre	Pinales (Abietales)
Famille	Pinaceae (Abietaceae)
Sous - famille	Pinoïdeae
Genre	Pinus
Sous - genre	<i>Eupinus</i>
Espèce	<i>Pinus halepensis</i>

II.3. Répartition géographique

II.3.1. Dans le monde

L'aire de répartition géographique du pin d'Alep se limite au bassin méditerranéen et occupe plus de 3,5 millions d'hectares (Quézel, 1986) (Fig. 8). L'espèce domine les écosystèmes forestiers dans les zones semi-arides du bassin méditerranéen. En plus de son aire de répartition naturelle, *P. halepensis* occupe la zone la plus méridionale des pins méditerranéens et il est très répandu dans la partie occidentale du bassin méditerranéen (allant de 45° à 31° N), y compris en Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie, Libye), au sud de la France, en Italie, en Espagne, en Grèce et à Malte. Il est également présent dans les zones côtières de la Croatie et de l'Albanie. Des populations naturelles et artificielles se trouvent en Turquie, en Jordanie, Palestine, Liban et Syrie (Baker et al., 2017 ; Newman et al., 2003).



Figure 8. Aire de répartition du *Pinus halepensis* (Quézel, 1986)

II.3.2. En Algérie

Le pin d'Alep occupe la première place de la surface forestière de l'Algérie, il couvre 850.000 ha (35% de la surface du Nord boisée) (**Bentouati et al., 2005**). Il existe dans toutes les variantes bioclimatiques avec une prédominance dans l'étage semi-aride. Il est présent partout, de l'Est à l'Ouest, allant du niveau de la mer aux grands massifs montagneux du Tell littoral et de l'Atlas saharien (**Quezel, 1986**) (Fig. 9). Très répandu dans les montagnes sèches de l'intérieur : Souk – Ahras ; Ouenza ; Aurès ; Bellezma, Monts du Hodna et dans les terrains calcaires du littoral à Bougie et jusqu' à dans la basse vallée de l'Oued Agrioun (**Maire, 1952**). Le pin d'Alep se caractérise par une plasticité exceptionnelle (**Quézel, 1986**). Il est considéré comme l'un des pins les plus tolérants à la température et la sécheresse prononcées (**Scarascia-Mugnozza, 1986**). L'âge du pin d'Alep est en moyenne de 100 ans ; les individus les plus sénescents atteignent 150 ans alors que les plus jeunes ont 60 ans (**Guit et Nedjimi, 2020**).

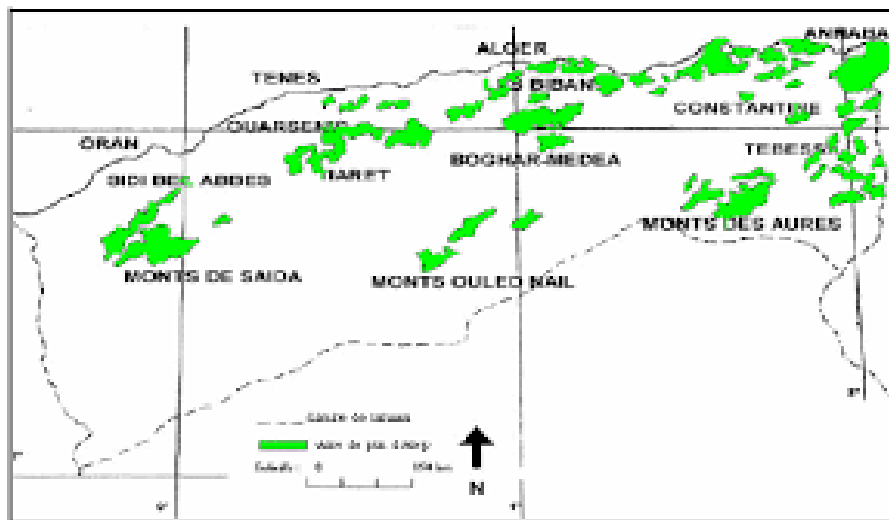


Figure 9. Aire de répartition du pin d'Alep en Algérie (Ben Touati, 2006)

II.4. Usage traditionnel du pin

Différentes espèces du genre pinus sont utilisées à travers le bassin méditerranéen dans divers applications thérapeutiques. L'huile essentielle est utilisée pour traiter une variété de problèmes de peau et pour le traitement des plaies et des brûlures (**Demirci et al., 2015**).

Diverses parties du pin (feuilles, bourgeons, graines, résine, bois) sont utilisées pour divers traitements dont les plus importants sont récapitulés dans ce qui suit :

La résine de pin a été considérée de tout temps, comme un remède très efficace contre les affections pulmonaires. Hippocrate l'employait contre la péripneumonie et les médecins

arabes contre les ulcères du poumon. Elle exercerait une action antirhumatismale et décongestionnante (**Leclerc, 1994**).

En médecine traditionnelle algérienne, elle est utilisée pour ses propriétés suivantes : expectorantes, balsamiques, diurétiques légères, antiseptiques puissants et astringentes (**Mahmoudi, 1984**). Selon la tradition kabyle trois cuillérées à soupe de résine pilée et tamisée, incorporées à un pot de miel pur de 500 g, constitueraient un traitement complet de la bronchite (**Hammiche, 2015**).

Les bourgeons riches en huiles essentielles, sont béchiques, balsamiques et efficaces dans le traitement de la toux (**Boullard, 2001 ; Cecchini, 2003**). Les huiles essentielles riches en pinène sont utiles dans de nombreuses indications telles que : les affections des voies respiratoires, la grippe, la fatigue, les infections des voies urinaires, le rhumatisme et la goutte (**Fleurentin, 2008; Lacoste, 2014**).

Quant aux **huiles (essences végétales)** résultant de la distillation de bois, sous sa forme galénique en sirop ou en pastilles, (**Fleurentin, 2008 ; Cecchini, 2003**), il est également utilisé en usage externe contre les dermatoses.

De l'écorce de ce résineux, on extrait le cyanidol qui est un antihémorragique efficace en cas de trouble de la perméabilité cellulaire et d'insuffisance veineuse (Boullard, 2001).

Les pinènes constituent des matières premières courantes en parfumerie. L'essence de térébenthine ou l'infusion d'aiguilles de pin, entrent dans la composition de produits pour bains désinfectants, stimulants, rafraichissants et désodorisants (**Hlava et al., 1984**).

Le pin et ses dérivés naturels, se sont révélés être des agents thérapeutiques et préventifs pour les infections parodontales dans diverses études in vitro, et s'avèrent être des produits prometteurs pour les infections dentaires chez les humains aussi. L'huile de pin, d'origine naturelle, a gagné en intérêt pour sa propriété comestible, antiseptique et abondante. Facile à préparer en pratique médicinale traditionnelle, ce qui a augmenté l'orientation de la recherche en tant que candidat potentiel à des fins pharmaceutiques et également comme agents de traitement parodontal. Toute molécule ou tout produit à base de plantes, utilisé comme médicament, doit subir une procédure d'essai clinique rigoureuse pour être déclaré comme médicament. L'huile de pin à concentration phénolique atténuée peut être utilisé comme agent antimicrobien potentiel contre les agents pathogènes parodontaux, compte tenu de ses propriétés antibactériennes et cytotoxiques (**Hlava et al., 1984**).

III. *Juniperus oxycedrus* (le Genévrier oxycèdre)

III.1. Description botanique

III.1.1. Genre *Juniperus*

Les genévriers (*Juniperus*), occupent une place importante dans le paysage nord-africain, essentiellement en raison de leur rusticité et de leur dynamisme ; ce sont en effet des espèces pionnières peu exigeantes du point de vue écologique et présentes depuis le bord de mer jusque sur les sommets des Atlas. Leur rusticité leur permet de résister tant bien que mal aux agressions humaines intenses dont ils sont l'objet car dans de nombreuses régions, ils représentent le seul élément arboré ou arbustif susceptible d'être exploité pour le bois ou le feuillage, voire à des fins industrielles ou médicinales (**Quézel et Santa, 1962**).

Les genévriers sont les seules essences résineuses pouvant constituer en montagne, dans les plus mauvaises conditions de sol et de climat, de véritables peuplements forestiers (**Boudy, 1950**). Les genévriers en région méditerranéenne, peuvent se répartir du point de vue écologique en plusieurs ensembles, les genévriers thermophiles ou thermo méditerranéens : *Juniperus phoenicea*, *Juniperus turbinata*, *Juniperus microcarpa*, *Juniperus navicularis* (**Quezel, 1986**).

III.1.2. Espèce *Juniperus oxycedrus*

Le Genévrier oxycèdre (*J. oxycedrus*) (Fig. 10) appelé aussi « le cade » qui est un nom provençal de *Juniperus oxycedrus* var. *oxycedrus*, Il a été décrit par Linne en 1753. Son nom vient du grec « Oxus » qui signifie pointu, piquant et « Cedrus » qui désigne le cèdre, faisant allusion certainement à la ressemblance entre les feuillages c'est-à-dire «cèdre à feuilles épineuses», (**Garnier et al.,1961**). C'est une espèce très commune dans le sous-bois et les zones dégradées des régions semi-arides de l'Algérie. Selon **Boudy (1950)**, **Maire (1952)** et **Quézel et Santa (1962)**, il s'étend sur une superficie de 112 000 ha, depuis les dunes littorales jusqu'aux limites du grand Sahara, soit plus souvent sous la forme d'un arbuste buissonnant plus petit. En outre, ce taxon a un rôle écologique considérable du fait qu'il résiste à la sécheresse (**Riou-Nivert, 2001**) donc à la dégradation des sols et à la pression anthropique, surtout dans les régions les plus arides.

Le *Juniperus oxycedrus* est un arbrisseau ou arbuste dressé de 1-10 m de hauteur pouvant atteindre les 14 mètres, avec un tronc de 1m de diamètre, à bourgeons écailleux, à ramules obtusément triangulaires.



Figure 10. *Juniperus oxycedrus* (Boullard, 2001)

L'écorce grise ou rougeâtre, à rameaux marqués de 3 angles portant des feuilles groupées, étalées et étoilées

Les feuilles très étalées de 12 à 25 mm de longueur, à pointe fréquente, se présentant sous forme d'aiguilles. Ces aiguilles, à pointe fine et piquante, sont disposées en verticilles de 3 sur 6 rangs. Leur face supérieure porte deux bandes blanches, ce qui permet de faire la distinction avec le genévrier commun (aiguilles à une seule bande blanche) (Bezanger – Beauquesne, 1989).

Les cônes mâles (fleurs mâles): jaunâtres, petites et ovoïdes.

Les cônes femelles : (les fruits ou les graines) prennent peu à peu l'apparence de baies, les écailles se soudant les unes aux autres. Ces cônes arrivent à maturité au bout de deux ans environ, formant des **fruits** appelés baies ou galbules de couleur brun-rouge (Fig. 11), et luisants à la maturité, subglobuleux allant de 6 - 11 mm de diamètre (Boullard, 2001). C'est un arbuste dioïque dont la floraison intervient en avril-mai.



Figure 11. Morphologie de *Juniperus oxycedrus* (Léger, 2007)

Noms vernaculaires :

Arabe : العرعار الشربيني (Araar).

Berbère : Taga, Takka, Tikka. (Quezel et Santa, 1962).

Français : Cadier, Cade, Genévrier oxycèdre, Petit Cèdre, Petit Cèdre d'Espagne Genévrier cade, oxycèdre, Cèdre piquant.

Angleterre: Berried-cedar, Prickly Cedar, Prickly Juniper, Red Juniper, Sharp Cedar, Brown berried Juniper, (Garnier et al., 1961; Bonnier, 1990).

Espagne : Cada, Oxicedro, Enebro de la miera.

Italie : Ginepro ossicedro. (Léger, 2007 ; Flore, 2020).

Noms scientifiques :

Juniperus oxycedrus ; *Juniperus oxycedrus* L; *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus*; *Juniperus glauca* Salisb; *Juniperus rufescens* L; et *J. oxycedrus* (CJB, 2020).

III.2. Classification botanique

La position systématique de *Juniperus oxycedrus* est définie comme suit (Tabl. 7):

Tableau 7. Taxonomie de plante *Juniperus oxycedrus* (Evans, 1989).

Taxonomie	Selon (Evans, 1989).
Règne	Plante
Sous-règne	Tracheobionta
Embranchement	Spermaphytes
Sous- Embranchement	Gymnospermae (Linne, 1753)
Classe	Vectrices ou conifères
Ordre	Coniférales
Sous-ordre	Taxales
Famille	Cupressacées
Sous-famille	Cupressoideae
Genre	<i>Juniperus</i>
Section	<i>Sabina</i> (Mao et al, 2010)
Espèce	<i>Juniperus oxycedrus</i>

III.3. Répartition géographique

III.3.1. Dans le monde

J. oxycedrus est une espèce typique de la région méditerranéenne, sa répartition s'étend dans l'Afrique du nord (Maroc, Algérie et la Tunisie) (Fig. 12). Il se trouve aussi dans les régions du sud de l'Europe; en Espagne, France, Italie, et Portugal, mais également en Turquie, dans la péninsule Balkanique, et Aussi dans l'Est du caucase et au Nord de l'Iran. Cette espèce se développe sur des pentes sèches, mais elle est rare sur les dunes de sable. Elle apprécie les lieux arides, rocaillieux, sur calcaire ou sur sols acides, où elle est fréquemment associée au chêne vert et au Chêne kermès (Farjon, 2005) et (Brus et al., 2011), et atteint dans les montagnes méridionales l'altitude de 1000 mètres (Boubkeri et al.,2014).

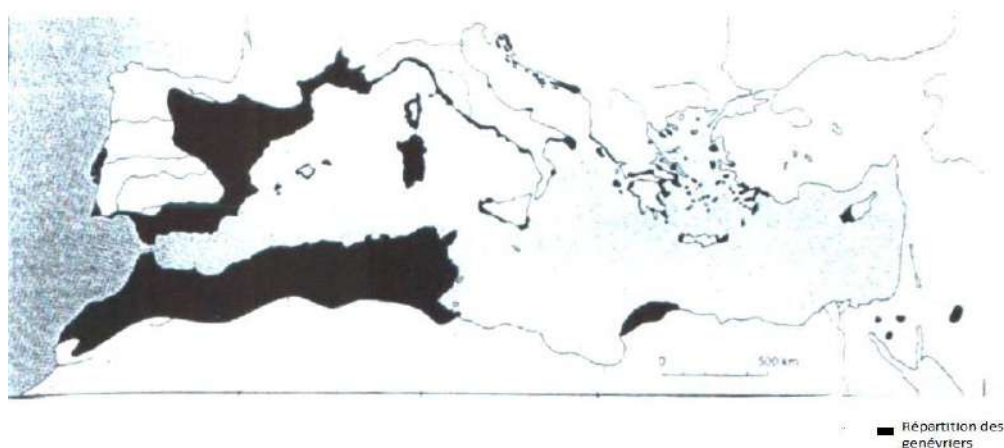


Figure 12. Aire de répartition des genévriers en région méditerranéenne (Quezel et Medail; 2003)

III.3.2. En Algérie

En Algérie, **Quezel et al. (1962)**, ont mentionné que le *Juniperus oxycedrus*, est commun dans le secteur des hauts-plateaux (Oranais, Algerois et Constantinois) et aussi dans le secteur de l'Atlas Saharien, et quelconque espèce sur tout le littoral.

Le Genévriers Oxycèdre, est abondant dans le secteur saharo atlasique (monts des Ksour, Djebel Amour, monts des Ouleds Nail, monts des M'Zab) ; figure 13 ci-dessous.

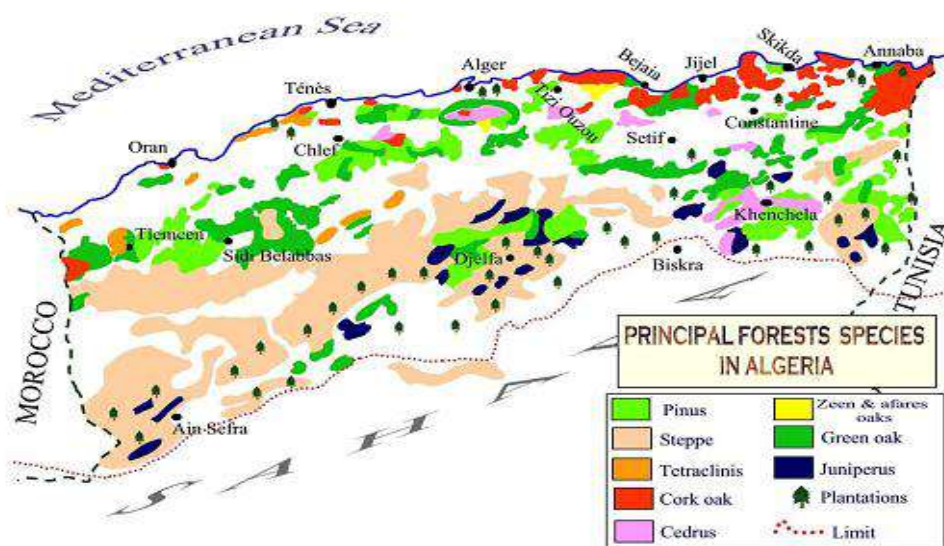


Figure 13. Carte des groupes de végétations (INRF, 2012)

III.4. Usage traditionnel

Le genévrier est utilisé depuis l'Antiquité par les grecs et les arabes, comme plante médicinale. C'est au XIX^{ème} siècle que ses vertus antirhumatismales, digestives et diurétiques sont rapportées par François-Joseph Cazin. Dans l'Antiquité et au Moyen Âge, le genévrier était utilisé comme panacée. Ses fumigations étaient réputées désinfectantes, utilisées notamment dans les rues pour combattre les épidémies de peste et de choléra (Bellakhdar,1997).

L'huile essentielle de *Juniperus oxycedrus* a multiples usages contre les affections de la peau, elle aide à la pousse et fortifie les cheveux. En médecine traditionnelle, cette plante est utilisée dans le traitement de diverses maladies telles que l'hyperglycémie, l'obésité, la tuberculose, la bronchite, et la pneumonie. Elle est également utilisée sous forme de décoction pour le traitement des troubles gastriques et comme un analgésique buccal (Bellakhdar,1997).

Les feuilles ont un effet anti-diarrhéique. Leurs huiles essentielles sont généralement appliquées en dermatologie humaine et vétérinaire pour traiter l'eczéma chronique et des

cancers de la peau (**Bouhlal et Meymadier, 1988**). Les feuilles séchées et réduites en poudre peuvent guérir les affections broncho-pulmonaires et diurétiques (**Bellakhdar, 1997**). **El youbi et al., (2016)** rapportent que la poudre des feuilles de *J. oxycedrus* L. est recommandée en tant que cataplasme pour soigner l'eczéma. **Kahouadji (1995)**, rapporte que les feuilles de *J. oxycedrus* en décoction, associées avec celles de *Phillyrea latifolia* L. et *Calycotome villosa*, représentent un bon remède contre l'ictère. Les feuilles quant à elles ; sont utilisées sous forme de décoction pour soigner le diabète, la diarrhée et le rhumatisme. Le mélange des feuilles et des cônes est utilisé comme hypoglycémiant (**Bellakhdar,1997**).

Les baies du genévrier oxycèdre sont diurétiques, stimulantes et vermifuges. Par ailleurs, la gomme du « Aarar » est utilisée en médecine interne pour arrêter la diarrhée chronique et calmer les douleurs menstruelles (**Bellakhdar,1997**).

Le bois peut être utilisé en menuiserie pour la fabrication des portes et des fenêtres, ainsi que des artefacts et l'industrie des statues (**Bhar et Balouk, 2011**).

En outre, par la distillation sèche du bois de *Juniperus oxycedrus*, on obtient un produit acre et caustique nommée huile de cade, ou essence végétal, utilisée pour ses vertus cicatrisantes, antiseptiques et désinfectantes. Cette huile est fréquemment associée à divers produits cosmétiques tels que les shampooings. Elle constitue un traitement local d'appoint du psoriasis et des dermatites séborrhéiques. Elle sert aussi à soigner les sabots des chevaux. Elle est considérée comme un produit antiseptique et parasiticide (**Boullard,2001**).

En effet ; l'huile de cade, fut d'une aide précieuse pour lutter contre les dermatoses et divers parasites (gale, teigne, herpès, eczéma, acné ou psoriasis) (**Bertaudière-Montes et Montès, 2004 ; Bhar et Balouk, 2011**).

IV. Goudron végétal de bois « Gotrane »

IV.1. Introduction

Lorsque les combustibles sont portés à une température importante, différents gaz sont produits et un liquide sombre et insoluble dans l'eau s'écoule par une densité importante, une forte odeur aromatique et une viscosité plus ou moins importante. C'est ce produit que l'on nomme goudron, ou huile, ou essence végétale. Ces produits de combustion diffèrent par leurs compositions, leurs procédés d'obtention et leurs degrés de pureté.

Les goudrons ou essence végétale se définissent par leur mode d'obtention. En effet, ils sont produits à partir de combustibles portés à haute température. Il existe plusieurs types

de combustibles tels que les végétaux, la houille ou le schiste (origine pétrolière). Ces différents combustibles donnent des huiles de nature différente (**Dorvault, 1994**) :

- Les goudrons de bois (huile de pin, de hêtre, de bouleau, de cèdre et l'huile de cade);
- Les goudrons fossilifères (goudrons de houille);
- Les goudrons sédimentaires (origine schisteuse, origine pétrolière) (**Dorvault, 1994; Lorette et al., 1995**).

IV.2. Définition le goudron végétal « Gotrane »

On appelle goudron végétal ou essence végétale ou « Gotrane » le liquide de couleur brune-noire et insoluble dans l'eau, obtenu par distillation destructive de certains végétaux : le pin d'Alep, l'acacia et le genévrier, etc. (**Dorvault, 1994**). Par ailleurs, essence végétale est un liquide visqueux, ayant la consistance d'une huile épaisse et très dense, de composition complexe. Il est inflammable, sa saveur est acre, amère et caustique et de densité allant de 0,95 et 1,03 à 20°C (**Bardeau, 2009**). Selon l'Association Française de Normalisation (**AFNOR, 1988**), les essences végétales réunissent la plupart des espèces moléculaires fondamentales telles que : des acides, des phénols, des hydrocarbures paraffiniques ou aromatiques.

IV.3. Mode d'extraction du goudron végétale « Gotrane »

L'extraction d'essence végétale se fait par pyrogénéation (pérolyse). La distillation sèche, à l'abri de l'air, est une carbonisation qui dissocie, par la chaleur seule, les substances végétales en produits résiduels et produits distillés (**Porte, 1994**). Elle est utilisée pour séparer les produits chimiques liquides contenus dans des matériaux solides. Il existe deux types de distillation : per descensum et per ascensum.

IV.3.1. Distillation per descensum

Le bois est placé dans une fosse qui sera chauffée à une température d'environ 200°C à 250°C. permettant de récupérer l'huile s'écoulant du bois sans qu'il y ait de phénomène d'évaporation. Le goudron s'exsude du bois est ainsi recueilli à l'extrémité de la fosse dans une cuve (Fig. 14). Il s'écoule tout d'abord un liquide aqueux de couleur brun rougeâtre puis celui-ci devient plus épais et plus foncé (**Chuyen, 1985**). Cette méthode est utilisée dans les anciens fours. En dernier lieu une décantation d'une durée de huit jours au minimum permettait de récupérer le liquide décanté ou le goudron (**Lucas, 2000 ; Demarle, 2001**).

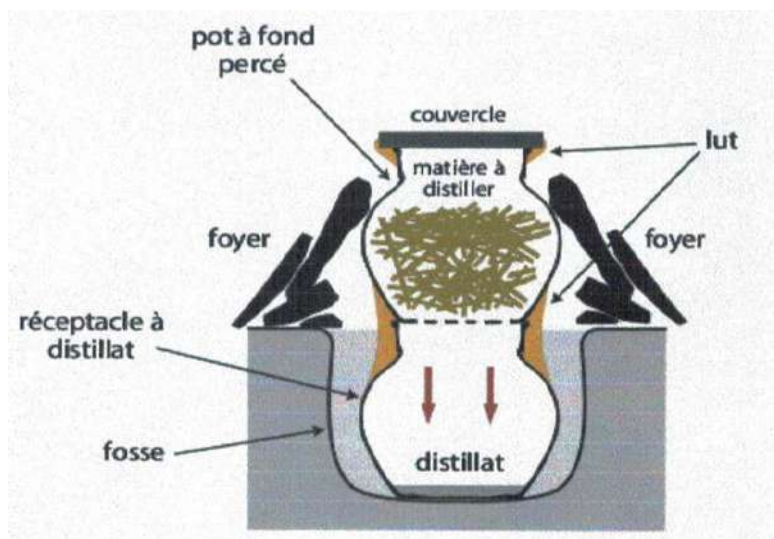


Figure 14. Principe de distillation per descensum (Thomas, 2011)

IV.3.2 Distillation per ascensum

Dans ce mode de distillation sèche, la cuve de distillation est chauffée à une température de 400 °C. L'évaporation commence et grâce à une plaque métallique, la vapeur est refroidie, se condense sur les parois, puis sera récupérée dans un récipient de condensation (Fig. 15). Le liquide condensé reste dans la cuve de décantation une dizaine de jours jusqu'à la formation de trois couches : La couche inférieure est le goudron (gotrane el-glaide), la deuxième couche ou couche médiane est un mélange d'huile et d'eau. Enfin, la couche supérieure correspond à l'huile (gotrane el-rgaigue). La distillation *per ascensum* fournit un meilleur rendement ; pour 1300 kg de tronçons de cade, on obtient 70 à 80 litres d'huile (Chuyen, 1985 ; Porte, 1994).

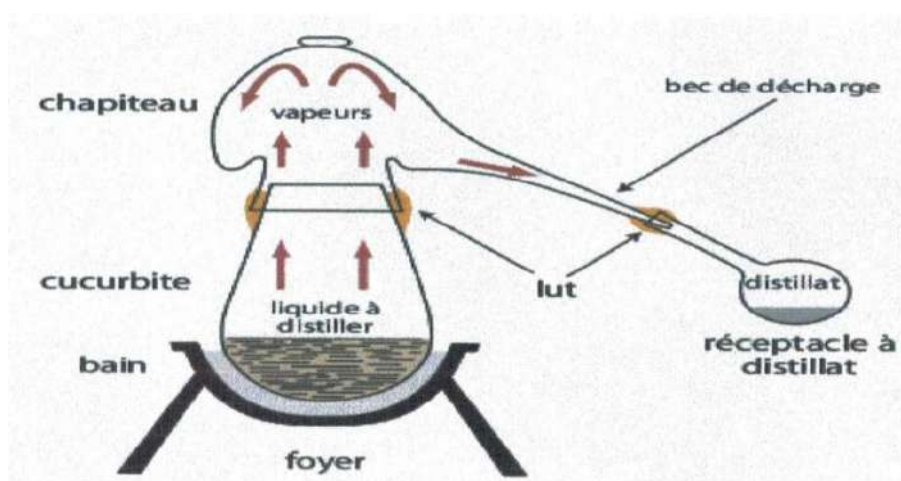


Figure 15. Principe de distillation per ascensum (Thomas, 2011)

IV.4. Fours de distillation

IV.4.1. Fours anciens

Autrefois, les fours étaient des constructions massives faites de pierres sèches et recouvertes de terre (Fig. 16). Ils ont été utilisés jusqu'au milieu du XX^{ème} siècle. L'intérieur du four était constitué d'une grande fosse centrale d'environ deux mètres de profondeur sur un mètre de diamètre. Cette fosse était faite de briques et d'argile. Son fond avait une forme particulière d'entonnoir permettant de récupérer l'huile (Fig. 18). En arrière de cette fosse, se trouvait la chambre de chauffe. C'est dans celle-ci que l'on allumait un feu afin d'avoir un chauffage maximal d'environ 250 °C (per descensum), cette température permettant une exsudation du goudron sans que celui-ci ne s'évapore ni ne s'enflamme (**Port, 1994**). Ce four donne deux liquides : eau goudronneuse, et le goudron.

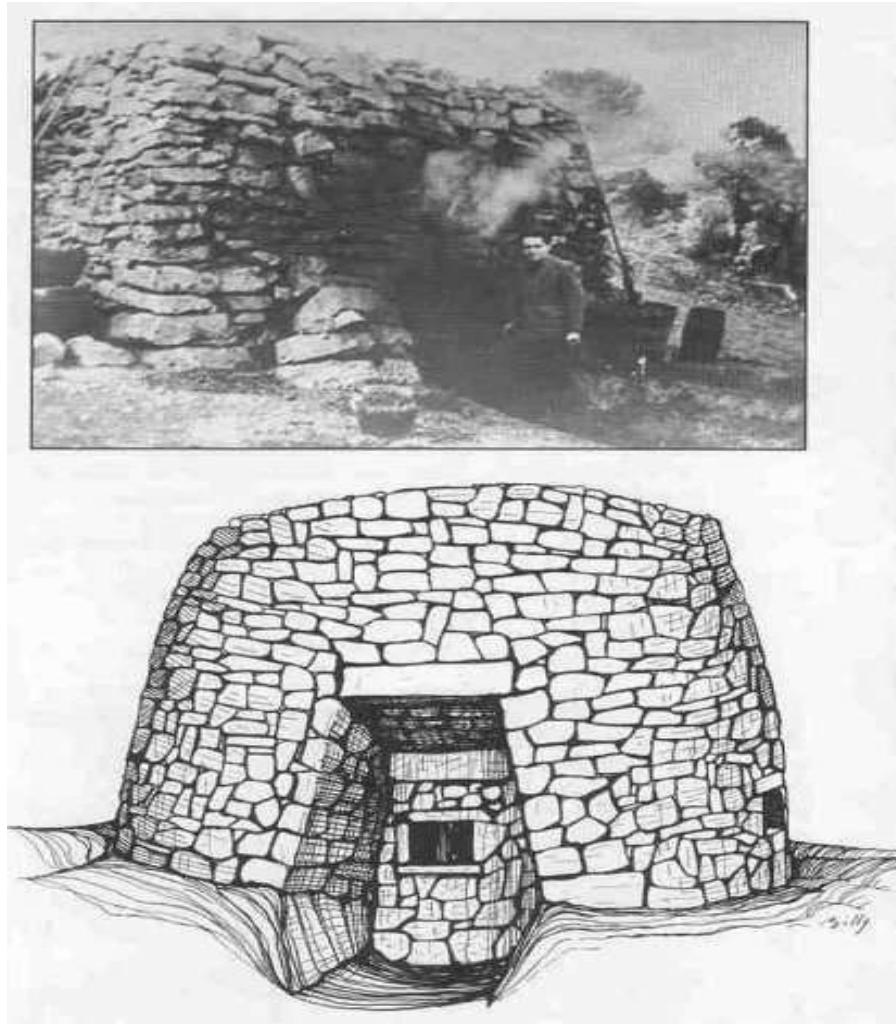


Figure 16. Anciens fours à cade (**Porte, 1994**)

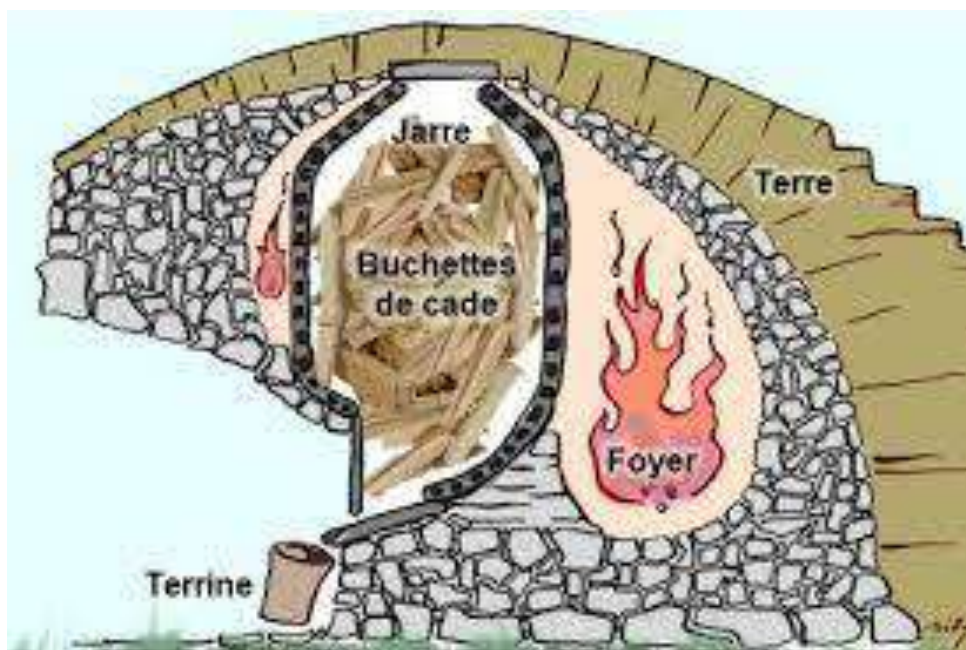


Figure 17. Coupe longitudinale d'un four à cade (Porte, 1994)

Il existe d'autres fours anciens au principe mixte (distillation mixte), qui associe entre le liquide et le vapeur, permettant de récupérer l'huile s'écoulant du bois avec le phénomène d'évaporation, c'est la méthode per descensum à température supérieure à 250 °C pouvant atteindre 400 °C (Fig. 17). Cependant, Il existe plusieurs types d'architecture de fours de distillation, mais le principe reste le même. Applique la méthode per descensum avec condensation des vapeurs des huiles dans deux fosses différentes (Fig. 18); donnant deux liquides dans chaque fosse ; la première fosse : eau goudronneuse, et le goudron, et la deuxième fosse : eau huileuse et l'huile. Certains fours donnent trois liquides : l'huile légère, eau goudronneuse et le goudron.

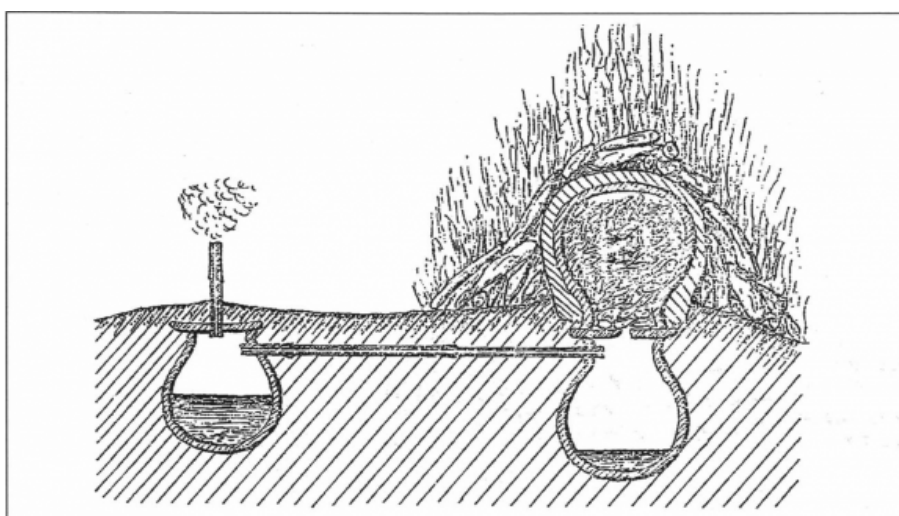


Figure 18. Four à goudron végétal (Belliot, 2007)

IV.4.2. Fours modernes

Ce sont les fours semi-industriels, leur installation diffère de celle des anciens fours, car ils utilisent un procédé de distillation per ascensum. L'appareil présente une cuve de distillation où le bois est entreposé. Autour de cette cuve, un couloir de chauffe circulaire fait de briques réfractaires permet de transmettre la chaleur du four de chauffe à la cuve de distillation (fig. 19). Le four de chauffe est alimenté de manière indépendante. Les vapeurs dégagées lors de la distillation sont récupérées pour une partie dans la chambre de condensation, les autres, ne se condensant pas, s'échappent par une cheminée. Les vapeurs condensées sont ensuite conduites vers une cuve de décantation (cornue) (Porte, 1994). L'ensemble four-cornue liée par poste de surveillance des températures, à la sortie des vapeurs. Cette version, dite « contemporaine » par comparaison aux fours ancestraux, permet d'avoir toujours un regard continu sur le compteur afin d'être informé des perturbations thermiques comme un dérèglement de la régulation, une prise d'air, des vents ambiants s'engouffrant dans la chambre de chauffe, etc... Ce four donne deux liquides : eau, et l'huile (Stéphane, et al., 2013).

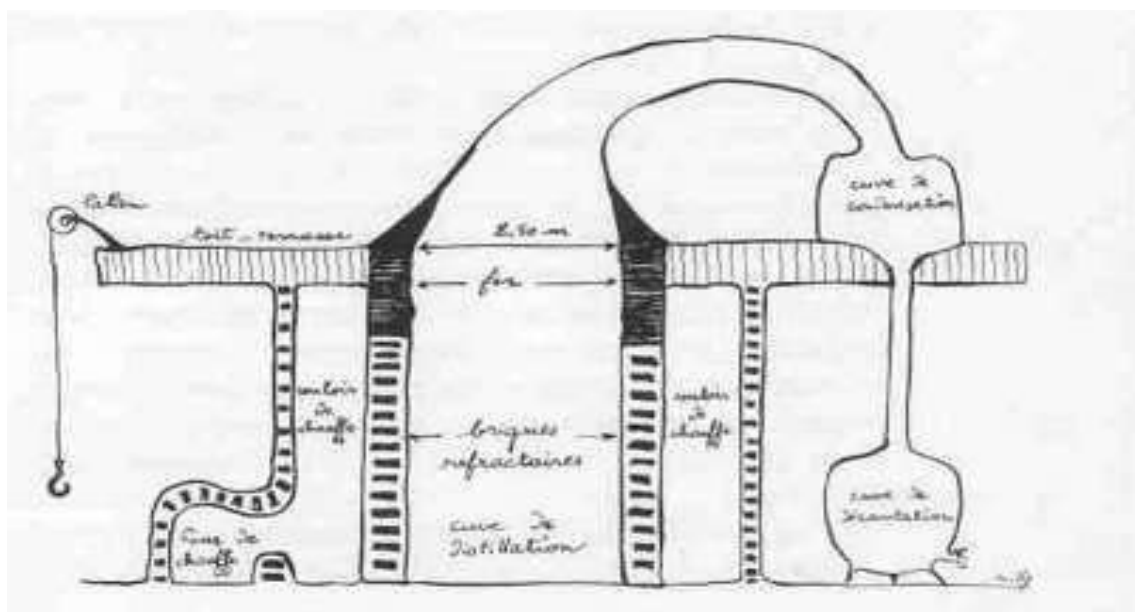


Figure 19. Schéma de l'installation semi-industrielle (Porte, 1994).

IV.5. Types des essence végétales

L'essence végétale est obtenue par distillation sèche de bois des plantes ou des racines, troncs et copeaux de branches sont utilisés (Dorvault, 1994). Il existe plusieurs types de goudrons selon le pays tels que : l'huile de cade ou goudron genévrier oxycèdre, et d'autre espèces de Genévrier comme : G. Phénicie, G. commun et G. thurifère (Mansouri et al., 2010, 2011), huile de pin (Ghamni et al., 2009), huile de hêtre (*Fagus sylvatica*) (Schoket, 1990 ; Bosman et al., 1992), huile de bouleau (*Betula verrucosa* et *Betula*

pubescens) (Schoket, 1990 ; Dorvault, 1994), huile de cèdre de (Satrani et al., 2006 ; Rhafouri et al., 2014), et du Liban (Kurt et Isik 2012) (*Cedrus atlantica*, *Cedrus libani*, *Cedrus brevifolia*), huile d'olivier (*Olea europaea*), goudron d'*Acacia raddiana* (Benlarbi., 2019), huile de *Tetraclinis articulata*, huile d'*Anisotes trisulcus*, et huile de thuya (Satrani et al., 2004). En Algérie, les espèces les plus couramment utilisées sont l'huile de pin et huile de cade.

IV.6. Huile de pin

L'huile de pin « Gotrane de pin » est obtenue par distillation sèche de bois résineux. C'est une distillation *per descensum*. Pour la réalisation de celle-ci, racines, troncs et copeaux de pins sont utilisés (Dorvault, 1994). Ce l'huile est obtenue à partir plusieurs espèces de pins :

- *Pinus halepensis.*, Le Pin d'Alep ;
- *Pinus sylvestris.*, Le Pin sylvestre ou pin rouge ;
- *Pinus maritima.*, Le Pin maritime ou pin des Landes (Dorvault, 1994).

Lors de la récupération de ce l'huile, on peut observer un liquide brun, d'odeur empyreumatique surnageant l'huile de pin. Ce liquide est dénommé huile de cade vétérinaire. Il ne faut cependant pas la confondre avec l'huile de cade vraie car sa composition est différente (Dorvault, 1994).

IV.6.1. Propriétés physicochimiques du l'huile de pin

L'huile de pin est de couleur brune-noire, sous forme semi-fluide, son odeur forte et tenace et sa saveur âcre." Il se liquéfie à la chaleur et brûle avec une flamme fuligineuse. Son pH est acide. Insoluble dans l'eau, il se solubilise complètement dans l'alcool, l'éther, les huiles fixes et volatiles. Sa densité à 20 °C est de 1,065 (Dorvault, 1994).

IV.6.2. Composition chimique du l'huile de pin

L'huile de pin contient de la résine non altérée, de l'acide acétique, des acides pyrologieux provenant de la distillation du bois et surtout des produits pyrogénés renfermant des phénols (gaïacol ou crésol), du toluol, du xylol et des hydrocarbures tels que le naphtalène et l'anthracène (Dorvault, 1994).

IV.6.3. Utilisations de l'huile de pin

L'huile de pin a eu, au cours des siècles, de multiples applications. La première utilisation du l'huile de pin fut l'enduit et le calfeutrage des coques de bateaux (**Dorvault, 1994 ; Porte, 1994**). Il est ensuite remarqué pour ces propriétés cicatrisantes ce qui amène à l'employer contre les démangeaisons et la gale (**Gall et Litoux, 1989**). Sous forme d'eau d'huile, il est ensuite indiqué dans le traitement des bronchites chroniques car il permet de fluidifier les sécrétions bronchiques. Il est également préconisé par extension contre la tuberculose pulmonaire (**Dorvault, 1994**). A partir de 1840, l'huile est utilisée pour traiter certaines maladies dermatologiques. C'est notamment le traitement de référence du psoriasis, de l'eczéma sec et de la séborrhée du cuir chevelu (**Dorvault, 1994 ; Alliance, 2007**). Aujourd'hui, étant donné la découverte, en médecine humaine, de traitements plus efficaces et moins contraignants en terme esthétique, l'huile de pin est davantage utilisée en médecine vétérinaire (**Dorvault, 1994**).

IV.7. Huile de Cade (goudron de genièvre) :

On peut obtenir l'huile de genévrier à partir de plusieurs espèces :

- *Juniperus oxycedrus* L., genévrier oxycèdre, cadier ;
- *Juniperus communis* L., genévrier commun, genièvre ;
- *Juniperus phoenicea* L., genévrier rouge, mourven ;
- *Juniperus sabina* L., sabine ;
- *Juniperus thurifera* L., genévrier à encens (**Lachat ,1990 ; Bertaudiere-Montes et Montes, 2004**).

Comme tout genévrier, le cadier peut se présenter sous trois formes différentes. Il peut prendre l'aspect d'un arbre, mais, le plus souvent, c'est celui d'un arbuste ou même d'un buisson à feuilles épineuses qui reste vert toute l'année. L'huile de cade est le plus produite en Algérie.

L'huile de cade « Gotrane de cade » est obtenue par carbonisation du tronc et des grosses branches des vieux cadiers, les jeunes ne donnant pas d'huile (**Porte, 1994**), acquis par les deux types de distillation : la distillation *per descensum* et la distillation *per ascensum*.

Comme cité précédemment, il faut distinguer l'huile de cade vraie, de l'huile de cade dite vétérinaire qui se forme au cours de la préparation du l'huile de pin (**Dorvault, 1994**).

La pyrogénéation du bois, à l'abri de l'air, a longtemps été une méthode d'obtention de la poix à partir des résineux (pins) et de l'huile de cade à partir de *Juniperus oxycedrus*. Les

mêmes types de fours ont pu servir à l'une ou l'autre production ou parfois même aux deux alternativement (**Porte, 1994**).

IV.7.1. Propriétés physicochimiques du l'huile de cade

De couleur noire ou brunâtre, l'huile de cade vrai est un liquide très épais et homogène, son odeur est piquante, particulière, très forte, empyreumatique et désagréable. Avec une densité importante (entre 0,97 à 1.03 à 20°C). Cette dernière n'est pas un critère d'identification car elle varie en fonction du mode de préparation. En effet, elle sera plus importante si le taux de phénol est plus élevé ; celui-ci ne doit cependant pas dépasser 40% (**Ousseron et al., 1939 ; Chalchat et al., 1988 ; Dorvault, 1994**). L'huile de cade communique à l'eau une réaction acide, et doit, en contact avec une solution de chlorure ferrique, la colorer en rouge (**Bardeau,2009**).



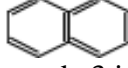
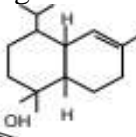

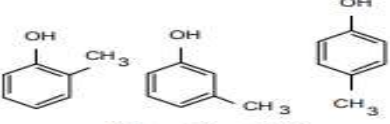
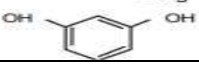
Lorsque l'on mélange de l'eau et du l'huile de cade, il se forme des globules remontant lentement à la surface L'huile de cade est insoluble dans l'eau, mais partiellement soluble dans l'alcool 90° ; par contre il est soluble dans l'éther, le benzène, le chloroforme et l'acide acétique cristallisé ; il est miscible aux graisses, aux huiles et à la vaseline (**Dorvault, 1994**).

IV.7.2. Composition chimique de l'huile de cade

Selon la durée et la température de la pyrogénéation, on obtient des mélanges de compositions différentes. L'huile de cade se caractérise par :

- Une proportion élevée d'hydrocarbures dont le benzène, le toluène, le naphthalène, le méthyl-naphthalène, le phénanthrène et surtout le cadinène ;
- Un alcool sesquiterpénique : le cadinol ;
- Des phénols dont le gaïacol de formule $C_7H_8O_2$ (2-méthoxyphénol), le crésol et la résorcine (benzène-1,3-diol) ;
- Des acides pyroligneux dont l'acide acétique, majoritaire. Ces acides, en faible quantité, proviennent de la distillation du bois (**Ousseron et al., 1939; Lucas, 2000**). Les formules brutes et développées de ces principaux composants sont rapportées par le tableau8.

Tableau 8. Composition du l'huile de cade (Ousseron et al., 1939 ; Chalchat et al., 1988 ; Porte, 1994)

Nom	Forule brute	Formule développée
Benzène	C ₆ H ₆	
Toluène	C ₆ H ₅ CH ₃	
Naphtalène	C ₁₀ H ₈	
Cadinène	C ₁₅ H ₂₄	Mélange de 3 isomères
Cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O	
Gaïacol	C ₇ H ₈ O ₂	
Crésol	C ₇ H ₈ O	
Résorcine	C ₆ H ₆ O ₂	

IV.7.3. Propriétés pharmacologiques de l'huile de cade

L'huile de cade possède différentes actions pharmacologiques. Il est antiprurigineux, kératolytique, cicatrisant, antiseptique, antifongique et arthropodicide.

L'action antiprurigineuse est essentiellement due à la présence de phénols tels que les crésols. L'action kératolytique est liée aux crésols et à la résorcine. (Gall et Litoux, 1989 ; Lorette et al., 1995). Elle est antiseptique et cicatrisante pour différentes plaies et blessures. L'antisepsie est vraisemblablement due à la teneur en crésols (Chuyen, 1985). Il possède également un pouvoir parasiticide. En effet, cette huile est à la fois arthropodicide et antifongique.

De plus, de par ses composés phénoliques, l'huile de cade a une action fongistatique, elle est active sur les trichophytons, *Candida albicans*, *Cryptococcus sp.* et *Aspergillus sp.* Bien que l'huile de cade soit souvent incorporée dans les shampooings antipelliculaires, peu d'études démontrent l'activité réelle sur *Malessezia furfur*, impliquée dans le *Pityriasis capitis* et les dermites séborrhéiques. (Chuyen, 1985 ; Lucas. 2000). Il a été montré que l'huile de cade pouvait être un antiparasitaire important en phytopharmacie, en raison de ses propriétés fongistatiques, insecticides et ovicides (Chuyen, 1985).

IV.7.4. Utilisation de l'huile de cade

L'huile de cade, au cours des siècles, des multiples applications. La première utilisation de l'huile fut l'enduit et le calfeutrage des coques de bateaux (**Dorvault, 1994**).

L'essence végétale est connue dans tout le « Nord d'Afrique » pour son utilisation ancestrale dans la conservation de l'eau et contre les maladies de la peau. Il est utilisé comme une sorte de tannage sur la peau des caprins maintient l'eau saine et propre (**Pipet, 1986**).

IV.7.4.1. Utilisations en médecine vétérinaire

L'huile de cade, par ses propriétés antiseptiques, antiparasitaires et acaricides, fut employée en médecine vétérinaire jusqu'au dix-neuvième siècle, l'huile végétale était employée contre la gale, les teignes, et l'eczéma des animaux (**Porte, 1994**).

L'essence végétale fut utilisée contre l'eczéma des chiens ou des chats ou encore des chevaux et des bovins. Lorsque des animaux présentaient des symptômes de gale, une pommade à base de l'huile végétale était appliquée sur les zones touchées par les acariens en alternance avec une pommade l'oxyde de zinc (**Chuyen, 1985**).

L'essence végétale était parfois employée dans les fissures des sabots des équidés mais aussi lors d'une affection que l'on appelle « piétin » chez le mouton, sorte de pyodermite végétale détruisant le plancher du sabot, les vétérinaires y ont encore parfois recours lorsque les thérapies modernes échouent (**Porte, 1994**).

IV.7.4.2. Utilisations en médecine humaine

A côté de la médecine vétérinaire, l'huile de cade fut largement employée en médecine humaine. A partir du dix-neuvième siècle, l'huile de cade fut, du fait de ses actions kératolytique et antiprurigineuse majoritairement employée dans le cadre du traitement du psoriasis sous forme d'onguents et de pommades. Les médecins avaient remarqué que ses applications avaient l'avantage de ne pas produire d'irritation de la peau saine (**Chuyen, 1985**).

Son champ d'application était large car il pouvait être prescrit aussi bien dans le traitement de maladies pulmonaires que pour des douleurs dentaires ou certaines maladies oculaires, la gale, les teignes, mais aussi la pelade, les alopecies pityriasís et séborrhéiques l'eczéma et le psoriasis (**Porte, 1994; Ettahir et al., 2020**).

Il fut également utilisé en usage interne, dans le cadre de traitement des lithiases biliaires, de néphrites chroniques mais surtout en tant qu'anti-helminthique, chez les enfants qui

présentaient une affection vermineuse (**Lucas, 2000**). Il constituait également un bon traitement pour les eczémas notamment les eczémas se compliquant d'impétigos.

L'huile de cade permet d'assainir l'épiderme et de soulager le prurit dans le cadre de traitement des états desquamatifs séborrhéiques du cuir chevelu, elle constituait également un bon traitement pour les eczémas notamment les eczémas se compliquant d'impétigos (**Porte, 1994**).

IV.7.4.3. Utilisations en fabrication des produits cosmétiques et pharmaceutiques

Autrefois, l'huile de cade était utilisée, en cosmétologie, par les femmes de la campagne provençale afin d'obtenir une chevelure luisante (**Porte, 1994**). Aujourd'hui, il est employé dans certains shampooings. L'huile de cade est utilisée dans shampooing dermatologique. Il est conseillé dans le traitement du psoriasis du cuir chevelu sec, et antipelliculaire, des croûtes de lait. Il permet de diminuer les démangeaisons et les irritations (**Alliance, 2007**).

IV.8. Toxicité des goudrons végétal

Une substance, quelle qu'elle soit, appliquée sur la peau peut provoquer des réactions cutanées d'intolérance, soit par causticité directe (irritation), soit par réaction du système immunitaire (allergie de contact) (**Lucas, 2000**).

Les médecins médiévaux, comme certains tradi-praticiens actuels, préconisent l'application cutanée et l'administration par voie orale de l'huile. Or, ces pratiques ont causé plusieurs cas d'empoisonnement, parfois mortels (**Koruk et al., 2005 ; Achour et al., 2011 ; Skalli et al., 2014**). L'intoxication est le plus souvent d'origine iatrogène, résultant de l'ingestion orale d'une quantité importante ou d'une application cutanée prolongée et étendue, voire interne. L'intoxication provoque des troubles cardiovasculaires, neurologiques et respiratoires. Les effets secondaires observés correspondent à ceux d'une intoxication aux phénols, dont la toxicité rénale et hépatique est bien connue (**Skalli et al., 2014**). Les quelques études toxicologiques se limitent aux huiles de pins et de genévriers, dont certaines molécules, principalement des hydrocarbures aromatiques polycycliques, sont mutagéniques et génotoxiques (**Shocket et al., 1990 ; Sccnfp, 2003 ; Tisserand et Young, 2013**).

Des tests d'irritation ont été effectués avec divers extraits de bois de cade purs à 3% et à 20%, dispersés dans de la vaseline blanche puis appliqués sur le dos de 25 sujets. Il apparaît que l'huile empyreumatique est irritante. En effet, des érythèmes ont été signalés.

De plus, on note que plus la concentration en huile de cade est élevée, plus l'irritation est importante (**Lucas, 2000**).

Le pH semble intervenir dans le pouvoir irritant de l'huile de cade. En effet, l'huile de cade est très irritante, à un pH très acide ($\text{pH} < 5$), comparé à celui d'autres extraits de cade, qui eux, sont beaucoup moins irritants (**Lucas, 2000**).

Des tests déterminant le pouvoir allergisant de l'huile de cade ont été réalisés. Divers extraits de cade dont l'huile empyreumatique, ont été testés à des doses infra-irritatives, c'est-à-dire à une concentration de 3% (dispersés dans de la vaseline blanche). Tous les tests se sont révélés négatifs (**Lucas, 2000**).

En ce qui concerne la photosensibilisation, des extraits analogues ont été appliqués sur la peau pendant 24h. Ce délai écoulé, une irradiation UV (émis par un simulateur solaire) a été réalisée. Les tests se sont, également, révélés négatifs (**Lucas, 2000**).

L'huile empyreumatique de cade à 3% n'a donc entraîné ni réaction allergique, ni réaction photo-allergique (**Lucas, 2000**).

Cependant d'autres études rapportent l'apparition d'une dermatite allergique de contact due aux essences végétales. Ce phénomène allergique pourrait être la conséquence d'une sensibilisation croisée avec le goudron de houille (**Kuljanac et al., 2006 ; Roesyanto, 1990**).

L'huile de cade contient des hydrocarbures aromatiques polycycliques tel que le benzopyrène réputé cancérigène. Le benzopyrène ($\text{C}_{20}\text{H}_{12}$), a donc été dosé dans l'huile de cade, le résultat est de 8000 pg/kg, ce qui fait de l'huile de cade la fraction la plus riche en benzopyrène parmi les produits extraits de *Juniperus oxycedrus*. En effet, l'huile de cade rectifiée contient une dose de 20 pg/kg. De plus, une étude menée sur différents échantillons de peaux humaines et murines ainsi que sur des poumons de souris, montrent qu'il y a des transformations au niveau de l'ADN des cellules traitées. En effet, il y a formation d'adduits persistants au niveau de l'ADN. Cette étude a montré également que l'huile de cade occasionne un taux d'adduits plus important que le goudron de houille (**Schoket, 1990 ; Lucas, 2000**).

Peu d'études ont été menées pour connaître le réel impact, au niveau de l'organisme humain, de ces hydrocarbures contenus dans l'huile de cade. L'huile essentielle de cade, ayant une composition assez proche de l'huile de cade vraie, est suspectée d'avoir des propriétés cancérigènes. Il serait intéressant d'avoir plus de données sur le possible effet

cancérogène de l'huile de cade, afin de garantir une sécurité d'emploi des cosmétiques contenant ce (**Gall et Litoux, 1989**).

En **2011**, **Achour et al.**, rapportaient déjà un cas d'intoxication chez un nouveau-né en bonne santé, traité par application topique de l'huile de cade, pour dermatose atopique. L'intoxication a causé des convulsions, un collapsus, un œdème pulmonaire aigu, une insuffisance rénale et une hépatotoxicité. L'huile de cade contient du phénol, qui a des effets potentiellement mortels : corrosif, cardiaque, hémolytique, pulmonaire et rénale.

V. Conclusion

Dans des prescriptions pharaoniques, l'huile de cade était mentionnée comme une recette thérapeutique pour calmer les douleurs articulaires, traiter les rhumatismes, soigner les brûlures locales, traiter les maladies cardiaques, l'épilepsie, l'inflammation des voies urinaires, contre les douleurs dentaires, thoraciques et contre la toux (Kobeissi, 2002). Il traitait également les maux d'estomac, cicatrisait les plaies, coagulait le sang, et soignait les piqûres d'insectes (**Ashour, 1992**). L'huile de pin était appliquée sur la peau, dans le traitement de la gale. Il était également administré, chez des patients présentant une bronchite chronique. L'huile de cade contient du phénol, qui a des effets potentiellement mortels : corrosif, cardiaque, hémolytique, pulmonaire et rénale (**Achour et al., 2011**).

Partie expérimentale

Chapitre IV

Etude ethnopharmacologique des espèces végétales étudiées

Chapitre IV

Etude ethnopharmacologique des espèces végétales étudiées

I. Introduction

En dépit des progrès en pharmacologie, l'usage des plantes à des fins thérapeutiques est omniprésent chez la majorité des peuples du monde entier. En Afrique, 80% de la population ont recourt aux plantes pour se soigner. En Algérie, et plus particulièrement au Sahara septentrional, on compte environ 500 espèces de plantes spontanées, dont une partie reste utilisée par la population comme plantes médicinales (**Boualala et al., 2014**). Le « Gotrane » ou huile de cade, en l'occurrence, est un produit obtenu après distillation par pyrogénéation de certaines d'entre elles. Le gatrane sert à induire copieusement les surfaces internes (fond et parois), des jarres à eau, des cruches et des *guerba* (gourde en peau de chèvre). Cette technique empirique connue en Algérie notamment dans le sud algérien, est utilisée traditionnellement pour aromatiser et purifier l'eau de consommation.

Cette partie de l'étude, vise d'une part à établir un état des lieux de l'utilisation de l'huile de cade par la population de la région d'étude et d'autre part à essayer de déceler de nouveaux médicaments à partir de ressources naturelles (**Jaradat, 2005**).

C'est dans cette optique que nous nous sommes proposé d'entreprendre une enquête ethnopharmacologique des espèces étudiées auprès de la population de la région d'étude.

II. Matériel et méthodes

II.1. Description et choix des localités de l'enquête

Il s'agit d'une enquête ethnopharmacologique sur le pin d'Alep et le genévrier oxycedre, et El-Gatrane (l'huile de cade), réalisée durant l'année 2018 dans trois régions Ouargla, Dar Chioukh et Djelfa (Fig. 20).

- **Ouargla** : est une commune de la wilaya de Ouargla dont elle est le chef-lieu, située au Sud-Est du pays. La ville de Ouargla, à 135 mètres d'altitude, se situe à 710 km à sud d'Alger, et couvre une superficie de 2 887 km². Selon les statistiques de l'année 2008, sa population est estimée à 169 927 habitants.
- **Djelfa** : est une ville du centre de l'Algérie, située au pied de l'Atlas saharien, à 300 km au sud d'Alger. Elle est le chef-lieu de la wilaya du même nom. Elle à 490 km au Ouest-Nord d'Ouargla et couvre une superficie de 542,17 km², Sa population est estimée à 289 226 habitants en 2008.

- **Dar Chioukh:** est une commune de la wilaya de Djelfa en Algérie. C'est une commune de la wilaya de Djelfa . Elle se situe à 530 km de Ouargla et couvre une superficie de 338,70 km² et compte en fin 2008 une population de 30 372 habitants.

Par ailleurs, le choix de ces trois localités peut être justifié par le fait que ces dernières se trouvent dans la région de la présente étude d'une part, et d'autre part, en raison de la disponibilité des plantes étudiées chez les herboristes, qui continuent à les vendre pour différents usages, ingrédients pour préparer et conserver certaines denrées alimentaires traditionnelles (beurre (*smen*), dattes, eau) ou pour des fins thérapeutiques et leur utilisation traditionnelle pour aromatiser les eaux de consommation dans le Sud algérien.

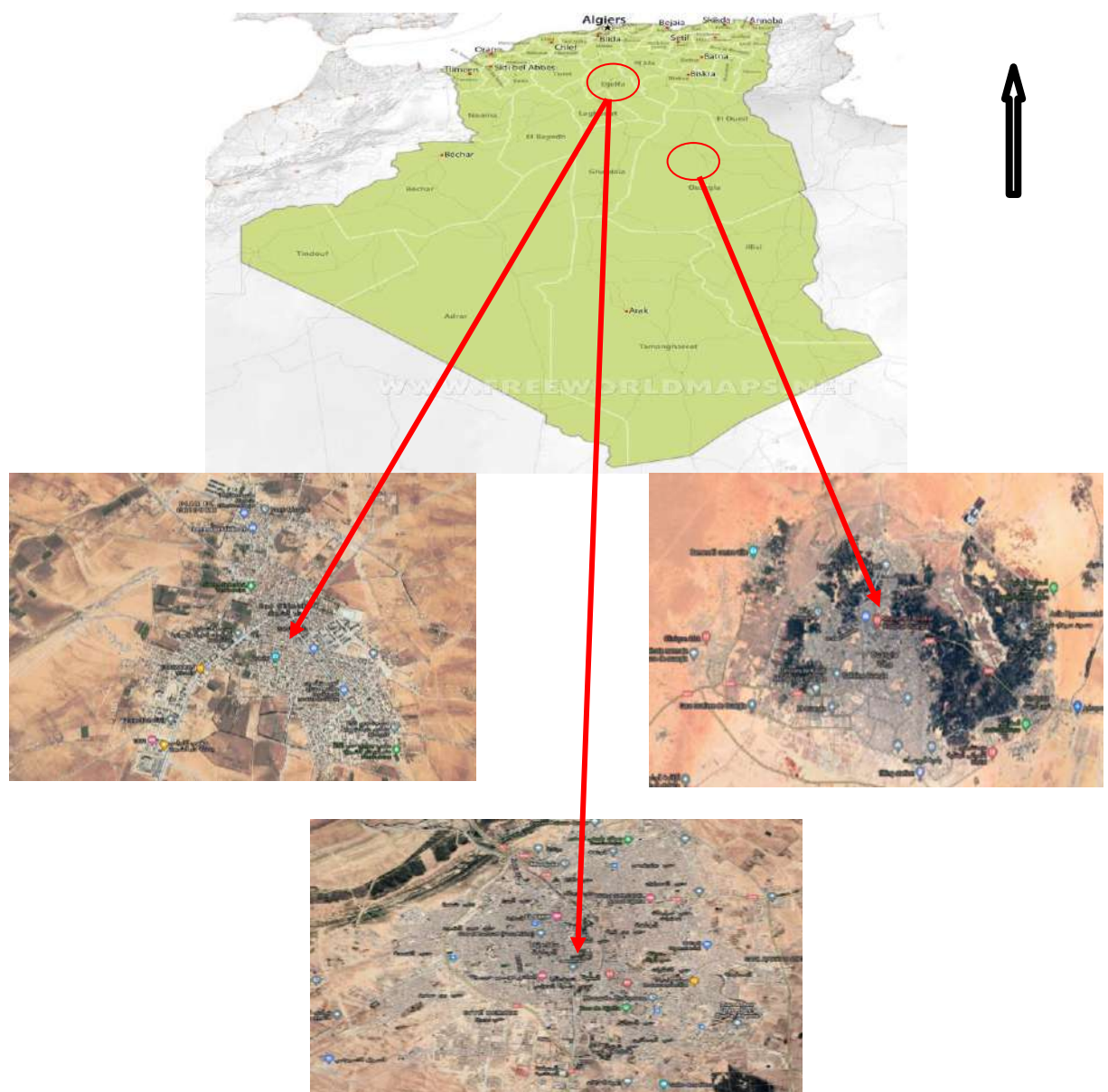


Figure 20. Régions ciblées par l'enquête ethnopharmacologique (carte google map 2021)

II.2. Déroulement de l'enquête

L'enquête ethnopharmacologique a été réalisée durant l'année 2018, auprès d'une population hétérogène, composée de 103 individus issus des trois localités choisies qui ont accepté de participer à cette enquête. Une conversation est tenue au préalable avec les participants (herboristes, pasteurs et autres).

Des échantillons des deux espèces végétales (le pin d'Alep et le genévrier oxycèdre) ainsi que de l'huile de cade contenue dans des jarres (ou dans un vase en grès), ont été présentés aux enquêtés, pour savoir d'une part s'ils arrivent à les identifier, et pour collecter d'autre part, un maximum d'informations sur leur savoir et savoir-faire surtout dans le domaine thérapeutique. Les informations collectées sont soit obtenues directement après chaque entretien ou recueillies dans une fiche d'enquête (Annexe 01). La dernière étape consiste à trier les données collectées, puis en déduire le pourcentage de l'utilisation de chaque produit.

III. Résultats et discussion

Les caractéristiques de la population ciblée par l'enquête telles que : l'âge, le sexe, l'effectif, la profession et le niveau d'instruction sont consignés dans le tableau 9.

Tableau 9. Caractéristiques de la population visée par l'enquête

Catégorie (profession)	Age (ans)	Effectif	Niveau académique	Région
Herboristes	30 - 75	16 dont une femme	- non scolarisés - jusqu'au niveau secondaire	Ouargla - Dar Chioukh
Pasteurs	35 - 73	07	- non scolarisés - jusqu'au niveau secondaire	Djelfa - Dar Chioukh
Autres	31 - 75	80 dont 23 femmes	- non scolarisés - jusqu'au niveau universitaire	Ouargla - Djelfa - Dar Chioukh

La tranche d'âge des individus, autres les herboristes et les pasteurs, a été choisie à partir de 30 ans et plus afin d'écartier la méconnaissance des modes et usages thérapeutiques des plantes par les sujets plus jeunes et pour un recueil de données plus fiable, à partir de sujets expérimentés.

Les résultats de l'enquête ont montré que 80% de la population connaissent le pin d'Alep, alors que seulement 42% connaissent le genévrier oxycèdre. Ce dernier est surtout connu par les pasteurs et quelques herboristes de la région de Djelfa - Dar Chioukh et le nomment « tagga ». On a remarqué aussi que le pin d'Alep est disponible chez la plupart

des herboristes, par contre le genévrier oxycèdre est quasiment introuvable.

Par ailleurs, les utilisations de ces deux plantes par la population en médecine traditionnelle sont rapportées dans le tableau 10. On a constaté qu'à l'inverse du genévrier oxycèdre, le pin d'Alep est utilisé beaucoup plus en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire. Toutefois, les parties les plus utilisées du pin d'Alep sont les feuilles et les fruits, soit pour la préparation de décoction ou pour préparation d'une poudre utilisée seule ou en mixture avec d'autres ingrédients (plantes médicinales, miel, ...).

Le bois de ce végétal sert comme celui du genévrier oxycèdre pour la préparation de l'huile végétal, appelé l'huile de cade ou « Gotrane », utilisés pour soigner les affections dermiques ou lutter contre certains parasites chez l'homme et l'animal. Cependant, certains pasteurs utilisent les cendres des feuilles et des rameaux du genévrier oxycèdre pour soigner quelques affections ophtalmiques chez le bétail. En outre, nous avons constaté que les posologies et les quantités du matériel végétal utilisé dans les préparations à base de genévrier varient d'un utilisateur à un autre ; à titre d'exemples : la décoction de 25 baies par tasse d'eau prise trois fois par jour est efficace contre les affections pulmonaires, gaz intestinaux et la toux.

De surcroît, la consultation de certains ouvrages et sites internet nous laissent perplexes devant la multitude des modes de préparation et les posologies de cette plante, qui varient en fonction des espèces de genévrier d'une part, et des maux à traiter d'autre part. Les baies de pin sont riches en huiles essentielles et sont efficaces dans le traitement de la toux. Riches en pinène elles sont utiles dans de nombreuses indications telles que : les affections des voies respiratoires, la grippe, la fatigue, les infections des voies urinaires, le rhumatisme.

Tableau 10. Enquête ethnopharmacologique

Espèce végétale	Partie utilisée	Mode de préparation	Utilisations (analyses des données)
Pin d'Alep : <i>Pinus halepensis.</i>	Feuilles et fruits	Infusion, décoction, poudre, cataplasme	Traitement de la toux (26%) , les voies respiratoires (63,33%), la grippe (33,33%), la fatigue (6,66%), les infections des voies urinaires (16%), le rhumatisme (8%), les plaies et affections cutanées (12%)
			Décoction
	Rameaux	Pyrogénéation	Soigne les affections de la peau (eczéma, psoriasis, vitiligo) (40%), et combat les maladies parasitaires (poux, lentes, gales). (52%), insecticide (33,33%), tannage des cuirs et badigeonnage des jarres à eau

Genévrier oxycedre : <i>Juniperus oxycedrus</i>	Feuilles	Infusion, décoction, poudre,	Anti-diarrhéique (40,66%), dermatologie humaine et vétérinaire pour traiter l'eczéma (60%), traitement broncho-pulmonaires (8%),
	Rameaux	Pyrogénéation	Soigne les affections de la peau (eczéma, psoriasis, vitiligo) (40%), et combat les maladies parasitaires (poux, lentes, gales). (40%), Insecticide (42%), dans les jarres à eau, les cruches et l'intérieur des guerba (60%)

Les espèces de *Juniperus* (Cupressaceae) sont généralement utilisées dans la médecine alternative pour le traitement de différentes maladies : les rhumatismes, les maladies inflammatoires, la bronchite, l'urticaire, la dysenterie, des saignements, la gale, les champignons, les hémorroïdes, etc... En effet, l'usage du genévrier à des fins médicinales a été rapporté dans plusieurs enquêtes ethnobotaniques. **Kahouadji (1995)**, rapporte que les feuilles de *J. oxycedrus* en décoction, associées avec celles de *Phillyrea latifolia*. et *Calycotome villosa*, représentaient un bon remède contre l'ictère. De même, le genévrier commun est conseillé dans la prévention et le traitement de nombreuses affections, entre autres : diabète de type 2, anti-diarrhéique, maladies de la peau (eczéma), anti-colique, anti-psoriasis, carminatifs, antiseptiques, diurétique, tonique et anti-inflammatoire (**Jouad et al., 2001 ; Jaradat, 2005**).

Récemment, **El youbi et al. (2016)** ont rapporté que la poudre des feuilles de *J. oxycedrus* était recommandée en tant que cataplasme pour soigner l'eczéma. A l'inverse du l'huile végétal extrait par pyrolyse, l'huile de pin est peu connue chez la population d'étude, Seuls les individus ayant un certain niveau académique supérieur ou quelques herboristes qui savent qu'on peut extraire du pin des huiles. Toutefois, nous avons constaté que l'huile essentielle vendue par certains herboristes est moins demandée car la plupart des individus la trouve peu efficace voire inefficace et qu'il s'agit d'un mélange empirique d'une huile fixe et d'huile essentielle, sans indication des proportions, pour usage externe ; tel que le massage, pour la plupart de ces huiles. Il est à noter que le manque de connaissances sur le potentiel toxique de ces plantes limite leur application en toute sécurité.

Bien que les résultats de notre enquête ethnopharmacologique soient globalement en accord avec les données de la littérature, il est vraisemblable qu'elle ne nous permet pas à elle seule d'affirmer ou de confirmer la toxicité des espèces étudiées. Dès lors, nous avons procédé à une lecture comparative des résultats d'autres enquêtes et travaux scientifiques afin de mettre en évidence la toxicité éventuelle de ces huiles végétales.

Dans ce contexte, **DerMarderosian et Beutler (2004)**, ont constaté que les genévriers ont des effets allergiques indésirables chez l'espèce humaine. Ceux-ci comprennent l'allergie professionnelle affectant la peau et des voies respiratoires par une sensibilité au pollen de genévrier. Dans d'autres rapports, ces mêmes auteurs notent que les chinois, les japonais et les philippins ont tendance à être plus sensibles aux pollens de genièvre que les caucasiens, et que le contact externe (la peau) ; avec des préparations à base de genévrier cède pour traiter le psoriasis peut causer des dommages de l'ADN des tissus humains d'une part. D'autre part, le 1-terpinène-4-ol de l'huile essentielle de genévrier a un effet irritant du rein. De plus, l'huile peut provoquer une irritation gastrique et une diarrhée. Par conséquent, son utilisation est limitée à de faibles concentrations (< 0,01%). Ils rapportent aussi que l'administration orale de genévrier oxycèdre à une dose de 8014 mg / kg est létale pour le rat.

D'autres études ont montré que différents extraits de *J. oxycedrus* L. ont une faible toxicité aiguë. La dose létale 50 (DL50) cutanée de l'huile essentielle des baies chez le lapin a été supérieure à 5 g/kg. Ces études ont montré aussi que l'emploi de plusieurs extraits des espèces de genévrier utilisés dans les parfums et les additifs biologiques ou dans des formulations cosmétiques variées, avait peu de toxicité sur les animaux. Cependant, il y avait des effets de sensibilisation aux huiles (**Morrie et al., 2004**).

D'après **Eman et al., (2020)**, le pin et ses dérivés naturels se sont révélés être des agents thérapeutiques et préventifs pour les infections parodontales dans diverses études in vitro et s'avèrent des produits prometteurs pour les infections dentaires chez les humains aussi. L'huile de pin, un produit d'origine naturelle, a gagné en intérêt pour sa propriété comestible, antiseptique et abondante. Il est facile à préparer et la pratique médicale traditionnelle a augmenté l'orientation de la recherche en tant que candidat potentiel à des fins pharmaceutiques et à des agents de traitement parodontal. Toute petite molécule ou tout produit à base de plantes utilisé comme médicament doit subir une procédure d'essai clinique rigoureuse pour être déclaré comme médicament.

Les résultats de l'enquête ont montré que 68% de la population connaissent l'huile de cade (connue sous le nom de "Gatrane"), mais seulement 37% connaissent leur source. D'après les herboristes et les pasteurs, l'extraction de l'huile à partir du bois de genévrier (*Juniperus sp.*), présent à hauteur de plus de 86% quand le pin (*Pinus halepensis*) atteint moins de 10% sur l'ensemble des huiles extraites. Alors qu'une minorité (32% de la population) connaît leurs utilisations, parmi celles-ci :

- Tannage des cuirs et badigeonnage des jarres à eau ;
- Aromatisation de l'eau de boisson lui conférant une saveur (goût et odeur) caractéristiques, une et stimulation de l'appétit ;
- Chasse les reptiles, les scorpions et les insectes ;
- Traitement de la gale, des dents, contre l'eczéma et psoriasis et empêche l'apparition des cheveux blancs ;
- Prescription aux malades souffrant de maux de tête et d'estomac, en particulier comme vermifuge chez les enfants en bas âge.
- Il est plus usité contre la gale animale et diverses affections cutanées du cheptel, comme vermifuge et parasiticide
- Pour les jeunes, l'huile de cade a une bonne odeur et vivifiante, qu'on utilise pour rafraîchir l'eau durant l'été qu'en hiver.

D'après les Pasteurs qui fabriquent l'huile de cade (ouvriers dans les fours traditionnels) ; l'extrait des rameaux des plantes est différent selon le type de four, mais généralement, on obtient trois phases de liquide, soit : huile, eau goudronneuse, ou le goudron

Le goudron : la partie dense (Gotrane El-glide, El-kar) : utilisé dans les jarres à eau, les cruches et l'intérieur des *guerba*, et utilisé dans les sabots de chameaux. Constituant le matériel d'étude « goudron de cade, et goudron de pin ».

Eau goudronneuse : la partie médium (El-mehel) : utilisé contre la gale du cheptel, notamment les moutons.

L'huile légère : la partie surnageant (Gotrane El-reguig, El-soumel) : utilisé contre l'eczéma et psoriasis, contre la gale animale et diverses affections cutanées du cheptel.

IV. Conclusion

L'enquête ethnopharmacologique n'est qu'une partie de l'étude ethnobotanique, qui permet d'avoir une idée sur les différentes utilisations des plantes à des fins thérapeutiques. Néanmoins, cette enquête nous a beaucoup aidé dans le choix d'une plante relictuelle des piémonts sud-est Algérien, qui est le *P. halepensis* et *J. oxycedrus*. Cependant, c'est le *P. halepensis* qui est le plus abondant et le plus utilisé dans la médecine traditionnelle dans la région d'étude, quant au *J. oxycedrus*, il est le plus utilisé pour préparer l'huile de pyrogénéation (El-Gotrane). En effet, nous avons constaté que ce sont bien les herboristes, les pasteurs ainsi que les personnes les plus âgées qui ont une assez bonne connaissance de cette plante et de

cette huile. Auparavant, ces produits connaissaient des utilisations très diversifiées dans plusieurs domaines, mais dont l'usage actuel en médecine traditionnelle reste limité (traitement des gastrites, insecticide) et devient l'apanage des personnes démunies ; ou celles qui croient encore aux vertus médicinales ou magiques de cette plant. Enfin, il est certain que les données pharmacologiques et toxicologiques expérimentales seront importantes dans une approche thérapeutique, mais l'extrapolation des résultats obtenus *in vitro* à des conditions *in vivo* reste difficile, en raison du manque de données sur la toxicité de cette plante et huile chez l'espèce humaine.

Chapitre V

Caractérisation physico-chimique et la composition chimique des huiles étudiées

Chapitre V

Caractérisation physico-chimique et la composition chimique des huiles étudiées

I. Introduction

La composition en métabolites secondaires varie d'une espèce végétale à une autre même au sein d'une même espèce, sous l'influence de divers facteurs génétiques et abiotiques (édaphiques, climatiques, etc...). Cependant, la sélection du genévrier oxycèdre et le pin d'Alep, dans la région Sud-Est de l'Algérie, se justifie par le manque ou la quasi absence d'études de la composition chimique des huiles végétales de ces plantes. Au vu des données disponibles, la grande majorité des études concernent non pas des goudrons, mais des huiles essentielles extraites à partir de différentes parties des arbres (sciure de bois, feuilles, aiguilles, fruits...) (Quezel, 1998). C'est dans ce contexte que nous aborderons dans ce chapitre, l'extraction, la caractérisation physico-chimique et la composition chimique par chromatographique GC/MS, des huiles à partir des espèces étudiées.

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel végétal

Les espèces végétales ayant fait l'objet de cette étude ont été choisies essentiellement à cause de leurs usages en médecine traditionnelle. Il s'agit des espèces, *Juniperus oxycedrus*, et *Pinus halepensis*, en provenance de deux stations situées dans la wilaya de Djelfa où elles y sont très largement répandues (Fig. 21). Les paramètres géographiques (altitudes et localités) des deux stations sont représentés dans le tableau 11.



Juniperus oxycedrus



Pinus halepensis

Figure 21. Rameaux et fruits de *Juniperus oxycedrus* et de *Juniperus oxycedrus*

Tableau 11. Situation géographique des sites d'étude

Nom scientifique	Région (Daïra)	Forêt	Altitudes (m)	Latitude	Longitude
<i>P. halepensis</i>	Djelfa (Dar Chioukh)	Sehary Guebli	1100	34.845256°	3.336792°
<i>J. oxycedrus</i>	Djelfa (Djelfa)	Sénalba Chergui	1320	34.649026°	3.180542°

L'étude a été conduite dans les massifs forestiers de Senalba Chergui et Sehary Guebli, situés dans les monts des Ouled Nail. Ces massifs sont localisés en grande partie sur les collines des hauts plateaux de l'Atlas saharien, à environ 300 kilomètres au sud d'Alger. Les forêts se situent au Nord-Est de la commune de Djelfa (Fig. 22), et regroupes les forêts domaniales de Senalba Chergui (Fig. 23), et de Sehary Guebli (Fig. 24), avec une altitude allant de 1 100 à 1 530 m.

La zone d'étude est située en bioclimat semi-aride à hiver froid. La pluviométrie annuelle moyenne est de 319 ± 77 mm pour la période 1984-2020. La température moyenne annuelle est de $14,11 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Le mois de janvier est le mois le plus froid avec une température minimale moyenne de $4,4^{\circ}\text{C}$. La température du mois le plus chaud (juillet) est d'environ 34°C .

Les sols sont caractérisés par une hétérogénéité, liée à la roche-mère et à la topographie. **Kadik (1987, 2005)** distingue deux classes de sols : les rendzines et les sols bruns calcaires. La profondeur du sol est de 40 cm en moyenne (**Guit, 2020**).

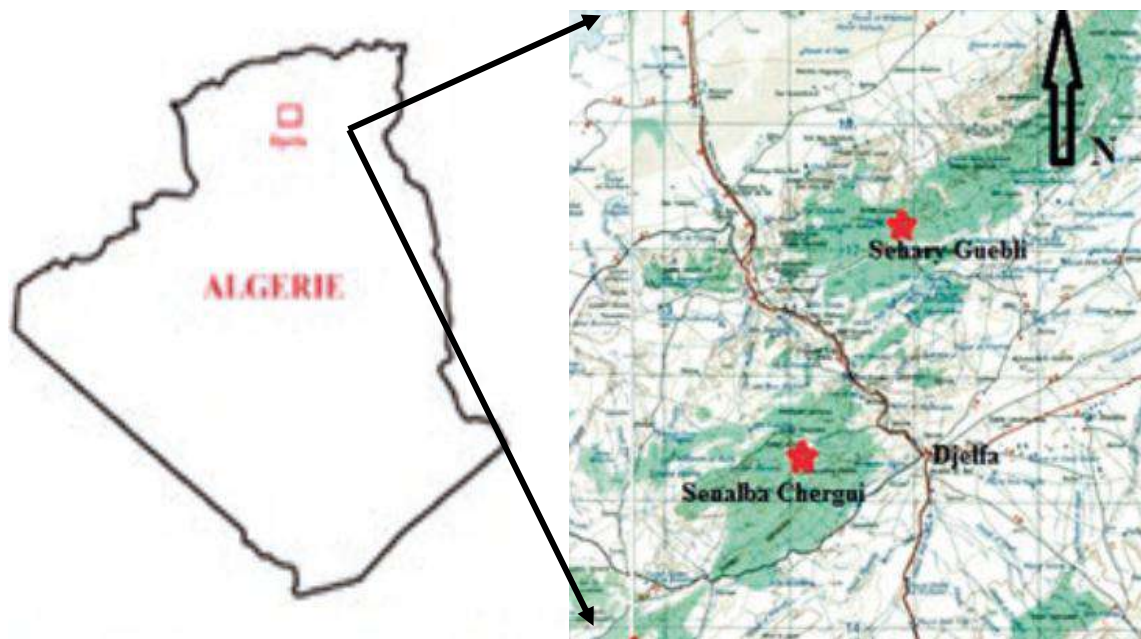


Figure 22. Carte de la situation géographique des sites d'échantillonnage



Figure 23. Station de Senalba Chergui (Guit, 2020).



Figure 24. Station de Sehary Guebli (Guit, 2020).

Le bois utilisé provient essentiellement des coupes sèches des troncs, des racines, et des branches de vieux arbres (Fig. 25); les jeunes arbres ne donnant pas d'huile. Les tronçons de bois sont triés selon leurs calibres et chargés sur des grands paniers métalliques. Nous avons utilisé des branches de 50 cm de longueur environ.



Figure 25. Stockage de la matière première (coupes sèches des troncs, des racines et des branches)

II.2. Méthodes

II.2.1. Extraction des huiles

Afin d'étudier les paramètres physico-chimiques, la composition chimique et les activités biologiques des huiles issus des deux espèces végétales, nous avons adopté la méthode d'extraction par distillation sèche ou pyrogénéation. C'est une technique traditionnelle (Dob et al., 2006), qui consiste à entasser le bois du conifère dans une grande fosse en guise de four (four intérieur, ou aires cylindriques, ou fosse à combustion), de 90 cm de longueur et 60 cm de largeur. Actuellement des tonneaux ou des barils métalliques sont utilisés. L'ensemble est alors soumis à une ignition, dans le four de chauffe (four extérieur), de construction massive fait de pierres sèches et recouverte de terre (un couloir de chauffe circulaire permet de transmettre la chaleur du four de chauffe à la four intérieur), il est alimenté de manière indépendante. Les vapeurs qui s'en échappent sont recueillies et liquéfiées après refroidissement, permettant ainsi de récupérer les huiles. C'est une méthode dite « *per descensum* ». La température dans le four extérieur ou chambre de chauffage atteint 400 °C environ, permettant de ce fait de récupérer l'huile. Cette huile s'évapore (four intérieur), puis refroidie, se condense sur la paroi d'un canal incliné appelé tunnel ou conduit de refroidissement, permettant de récupérer l'huiles dans un autre fosse appelée cornue ou cuve de récupération, située à une distance de trois à quatre mètres de la fosse à combustion (Fig. 26).



Figure 26. Technique d'extraction d'huile de cade par pyrogénéation (photo originale)

A l'aide d'un thermocouple portatif (cobra4 mobile-link) (Fig.01 de l'annexe2), nous avons branché une sonde thermique au-dessus du four intérieur afin de suivre l'élévation de la température. Parallèlement. La température d'extraction est optimisée. L'ensemble four-cornue, se refroidissent. Au terme de laquelle la séparation s'effectue, et le goudron est récupéré.

Le produit brut obtenu est laissé 2 à 3 heures au repos pour *J. oxycedrus*, et dix jours pour *P. halepensis* (selon la méthode traditionnelle). Après décantation, 3 phases non miscibles apparaissent : un surnageant de couleur brun- rougeâtre, très fluide, d'odeur empyreumatique, une couche intermédiaire de couleur noire constituée d'un mélange d'huile et d'eau (eau goudronneuse), et une substance dense de couleur brun-noire très prononcée, constituant notre matériel d'étude « Gotrane ». Cette phase est récupérée grâce à une ampoule de décantation dans laboratoire d'étude (Fig. 27). Cette partie dense représentant le goudron (Gatrane) a été choisie pour les deux critères suivants :

- C'est la substance utilisée traditionnellement pour induire l'intérieur des jarres d'eau (d'après l'enquête ethnopharmacologique) ;
- D'après **Siboukeur-Hadji (2013)**, elle possède une activité antibactérienne plus importante comparé à l'huile surnageant de même espèce.



Figure 27. Récupération du matériel d'étude « Gotrane »

II.2.2. Caractérisation du matériel d'étude

La caractérisation d'huile consiste à déterminer :

- Le profil organoleptique de ce produit (aspect, couleur, odeur, saveur.etc.) ;
- Les indices physiques (rendement, densité.etc.) ;

- Le profil chromatographique des substances actives et une quantification relative de ses différents constituants.

II.2.2.1. Caractéristiques organoleptiques

Le contrôle organoleptique d'un produit, consiste à mesurer les perceptions sensorielles en écartant toute subjectivité dans l'évaluation de ce dernier. Il s'agit de porter une appréciation sur la qualité d'un produit par le biais des sens, essentiellement, la vue (couleur, aspect), le goût (saveur) et l'odorat (arome). La détermination de ces paramètres est subjective, car elle fait appel aux sens qui diffèrent d'un individu à un autre.

II.2.2.2. Analyses physico-chimiques

Les méthodes utilisées pour déterminer les indices physico - chimiques sont celles indiquées par les normes de l'Association Française de Normalisation (**AFNOR, 2000**). Les analyses physico-chimiques sont effectuées sur les deux huiles étudiées et sur l'hypochlorite de sodium, désinfectant pris comme référence. Les thématiques de ce travail ont été réalisées au Laboratoire de recherche de Génie de l'Eau et de l'Environnement en milieu Saharien de l'Université de Ouargla.

II.2.2.2.1. Détermination des rendements en huile

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile obtenue après l'extraction et la masse du matériel végétal utilisé. Il est exprimé en pourcentage, et correspond au rendement moyen d'une substance (**AFNOR, 2000**). Après récupération des huiles, le rendement (R%) en huile est calculé par la formule suivante :

$$(R\%) = \frac{m}{m_0} 100 \quad (15)$$

m : masse d'huiles récupérées (g)

m₀ : prise d'essai du matériel végétal (g)

II.2.2.2.2. Mesure de la densité relative à 20°C (AFNOR NFT60-214)

La densité relative de l'huile est définie comme étant le rapport de la masse d'un certain volume d'huile à 20 °C et la masse égale de volume d'eau distillée à 20 °C. Cette grandeur est sans dimension et son symbole est d^{20} (**AFNOR, 2000**). La densité est mesurée à l'aide d'un densimètre portable de type Dma 35 V3, marque Anton Paar (Fig. 02 de l'annexe2).

II.2.2.2.3. Mesure de pH (AFNOR NFT 04-408)

Le pH (potentiel d'hydrogène) est l'une des mesures que l'on doit effectuer le plus fréquemment, pour la mesure de l'activité chimique des ions hydrogènes (H^+) (appelés aussi couramment protons) en solution. Il est relié à l'acidité et l'alcalinité de l'échantillon. Cette mesure est effectuée à l'aide d'un multiparamètre portatif de type HI 9829 (Fig. 03 de l'annexe2).

II.2.2.2.4. Mesure de l'oxygène dissous

La méthode utilisée pour le dosage de l'oxygène dissous est électrochimique. La réduction de l'oxygène, au niveau d'une cathode convenable, engendre un courant proportionnel à la pression partielle d'oxygène dans la solution on utilise le multiparamètre portatif (Fig. 03 de l'annexe2).

II.2.2.3. Identification des composants chimiques des huiles par GC/MS

La détermination de la composition chimique des huiles essentielles a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) (Fig. 04 de l'annexe2).

- **Chromatographie en phase gazeuse**

La chromatographie en phase gazeuse (CPG ou GC) est une technique couramment utilisée pour la séparation, l'identification et le dosage des constituants chimiques. Elle consiste à séparer les composés d'un mélange en fonction des vitesses d'entraînement à travers une phase stationnaire contenue dans une colonne et une phase mobile gazeuse (gaz vecteur) (Arpino et al., 1995).

La possibilité de coupler les chromatographes à divers spectromètres augmente considérablement à la quantité et la qualité des informations obtenues. En GC/MS, la comparaison informatique des spectres d'un pic inconnu avec une ou plusieurs références permet son identification (Brunneton, 1993).

- **Spectrophotométrie de masse**

La spectrophotométrie de masse (MS) repose sur l'ionisation et la fragmentation des molécules. Leur ionisation entraîne en effet une accumulation d'énergie qui en se dissipant, peut provoquer la rupture des liaisons interatomiques et donner naissance à des fragments caractérisés par le rapport de leur masse et leur charge. Les différents fragments ainsi produits, sont accélérés avant de parvenir à un analyseur appelé filtre de masse qui les sépare. Le recueil sélectif des différents ions permet l'établissement d'un spectre

caractéristique appelé : spectre de masse (**Brunneton, 1993**).

- **Mode opératoire**

L'analyse des huiles a été effectuée à l'INRAP (Institut National de la Recherche et d'Analyse Physico-chimique) de Tunisie. La CPG utilisé (type : Agilent 6890), est couplée à un spectromètre de masse (type Agilent 5975B) à quadripôle de tension d'ionisation de 70 eV. La colonne utilisée est une HP-5MS; 5% Phenyl Methyl Siloxane d'une longueur de 30 m et d'un diamètre interne égale à 0,25 mm ; l'épaisseur du film étant de 0,25 µm. Les conditions opératoires sont les suivantes :

- Une température de l'injecteur (mode split 1 :50), de 250 °C ;
- Une programmation de température : de 50 °C à 300 °C à raison de 2 °C/min ;
- Un gaz vecteur l'Hélium, utilisé avec un débit de 0,8 ml/min.

Les températures de la source du quadripôle sont fixées, respectivement, à 230 °C et à 150 °C.

Les indices de rétention linéaires (RI), pour tous les composés ont été déterminés en utilisant n-alkanes comme standards. L'identification des composés individuels est réalisée en faisant correspondre leur spectre de masse avec les données correspondantes (bibliothèques NIST 05a.L et Wiley 7), et la base de données du laboratoire (INRAP).

III. Résultats et discussion

III.1. Extraction du goudron végétal

Les huiles végétales sont des produits résineux extraits par pyrolyse du bois ou de l'écorce. Le principe d'extraction consiste à faire exsuder la matière première en la soumettant à un traitement thermique direct ; l'exsudat se transforme alors en goudron, huile et fraction aqueuse. Cette étude a pour but de suivre et d'évaluer la température d'extraction par pyrogénéation, sur la teneur en huile des espèces étudiées. Les résultats sont présentés dans le Tableau 12 ci-dessous.

Tableau 12. Optimisation de la température d'extraction par pyrogénéation des espèces étudiées

Température (°C) de l'espèce végétale	Temps d'extraction (min)									
	T ₀ =0	30	60	90	120	150	180	210	240	270
<i>Pinus halepensis</i>	16,5	56,1	123,5	204,9	385,2	342,5	220,0	163,4	-	-
<i>Juniperus oxycedrus</i>	13	95,5	162,7	222,9	283,7	397,6	385,7	263,2	172	80,4

La figure 28 représente l'évolution de la température d'extraction des plantes étudiées au cours du temps. La température est maintenue plusieurs heures (2 à 3 heures) aux environs

de 400 °C (condition traditionnelle de la méthode), puis diminuée la température du four. On note que la température augmente progressivement, la réaction devient exothermique, la température atteint 385 °C dans le cas de *P. halepensis* et 397 °C dans celui de *J.oxycedrus* . A ce stade, la carbonisation se termine (**Caron et Cheylan, 2008**).

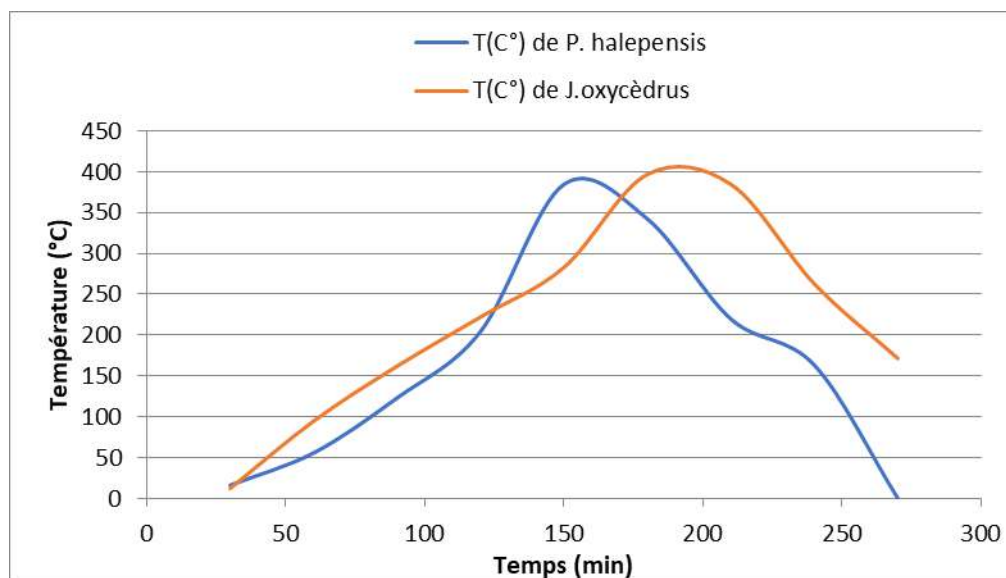


Figure 28. Cinétique de l'optimisation de la température d'extraction par pyrogénéation des espèces étudiées

D'après **Louppe (2014)**, le procédé se déroule selon les étapes suivantes :

- À température 160 °C, le bois ne perd pratiquement que de l'eau ;
- Jusqu'à 200 °C, le bois brunit, perd encore son humidité, de l'acide acétique et quelque composés volatils entraînés par la vapeur d'eau ;
- De 200 °C à 270 - 280 °C, se dégage des gaz oxygénés : CO, CO₂, vapeur d'eau, acide acétique, méthanol. Le résidu n'est pas encore du charbon, mais de bois roux.
- A partir de 270 - 280 °C, le bois commence à se décomposer spontanément en une réaction exothermique incontrôlable qui élève la température, sans apport extérieur de calories, jusque vers 350 - 380°C, pour donner du charbon de bois (carbonisation), plus encore des gaz oxygénés, mais en plus faibles quantités, et des hydrocarbures de poids moléculaire peu élevé (méthane, éthane, éthylène) ;
- Entre 270 et 380 °C, la formation de méthanol, d'acide acétique, ...etc. est accompagnée d'autres composés chimiques plus complexes, principalement sous forme de goudrons légers ;
- Si l'on chauffe pour que la température dépasse 400 °C, la teneur en carbone pur augmente avec la décomposition d'une plus grande proportion des goudrons.

III.2. Rendement d'extraction

Le rendement d'une extraction est la quantité de l'huile récupéré dans la phase aqueuse rapportée à la quantité de matière première (bois de *P. halepensis* et *J. oxycedrus*) exprimé en pourcentage, ce qui correspond au rendement moyen d'une substance. L'extraction par distillation sèche, nous a permis d'avoir un rendement de l'ordre de 5,72% pour l'huile obtenue de *P. halepensis*, et 4,194% pour l'huile obtenue de *J. oxycedrus* (Tab. 13 et Fig. 29).

Tableau 13. Rendement en goudron obtenus à partir des deux espèces étudiées

Espèce végétale	Température maximale (°C)	Quantité de la matière première (Kg)	Volume final d'huile (l)	Quantité finale d'huile (Kg)	Rendement (%)
<i>P. halepensis</i>	385,2	35	1,85	2,002	5,720
<i>J. oxycedrus</i>	397,2	50	2,03	2,097	4,194

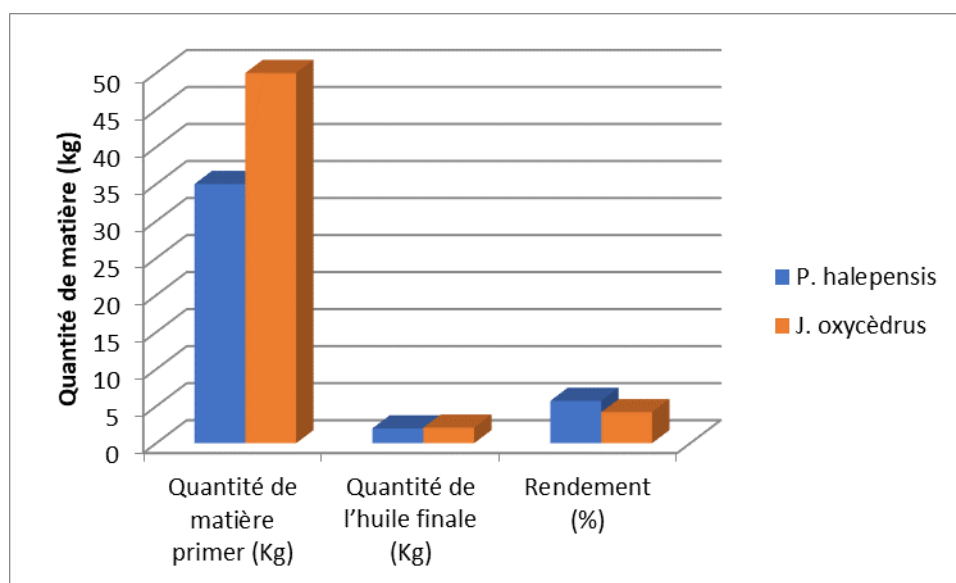


Figure 29. Rendement d'extraction des huiles obtenus à partir des espèces étudiées

Il ressort des résultats que, les rendements en huile enregistrés lors de la présente étude, soient 5,720 et 4,194 respectivement pour *P. halepensis* et *J. oxycedrus*, sont comparables à ceux obtenus par **Porte, (1994)** à partir de *P. halepensis*, par distillation sèche dans des fours anciens (5,38% et 6,15 %); mais plus élevés que ceux rapportés en littérature. En effet, des rendements de l'ordre de 0,21% pour les genévriers rouges de la Grèce, de 0,30% et 0,36% pour la sous-espèce *turbinata* d'Espagne, d'Égypte respectivement et de 0,41% concernant la sous-espèce *eu-mediterranea* du Portugal (**El-Sawi et al., 2007; Adams et Boratynski, 2014**), 0,542% concernant l'espèce *J.phoenicea* (**Terfaya, 2015**),

0,549% et 0,54% concernant les espèces *J. oxycedrus* et *J. phoeniceae* respectivement. Un rendement de 0,703% a été rapporté pour le genre *Accacia*. **Cavaleiro et al., (2006)** attribuent ces variations non seulement à la partie de la plante étudiée, mais également à l'emplacement géographique spécifique de l'espèce végétale. Il semble aussi que la variation du rendement est attribuée à un effet génétique (morphologie du végétal) (**Achak, 2006 ; Massei et al., 2006**), environnemental (origine du végétal, altitude, ensoleillement, température ambiante ...etc.), agronomique (l'âge du résineux, zone et période de récolte, composition du sol ...etc.) et technologique (type de four, température et durée d'extraction, technique d'extraction ...etc.) (**Russo et al., 1998 ; Van Damme, 2001 ; Karousou et al., 2005 ; Loziene et al., 2005 ; Pibiri, 2005 ; Curado et al., 2006**).

III.3. Caractères organoleptiques d'essence végétale

Les huiles obtenues par distillation sèche, des rameaux et bois de *P. halepensis* et *J.oxycèdru*, se caractérisent par une odeur empyreumatique, spécifique. Ils sont fluides plus ou moins visqueux et d'une couleur brune très accentuée avec une tendance vers le noir.

Le tableau 14 regroupe l'essentiel de cette caractérisation en comparaison avec celle de l'hypochlorite de sodium.

Tableau 14. Caractéristiques organoleptiques des huiles et de l'hypochlorite de sodium

Attributs Espèce végétale	Aspect général	Couleur	Odeur	Saveur
<i>Pinus halepensis</i>	Liquide, très visqueux, épais, et homogène	Noir-brun	Forte, boisée, fumée, empyreumatique, et désagréable	Goût amer de brûlé-carbonisé, acide, âcre
<i>Juniperus oxycedrus</i>	Liquide, visqueux, homogène	Noir-rougeâtre, brun foncé	Forte, boisée, empyreumatique particulière, et désagréable	Goût amer de brûlé-carbonisé, et piquante
Hypochlorite de sodium	Liquide, fluide, limpide, homogène	Jaune pâle Ou jaunâtre	Caractéristique de l'eau de javel, odeur chlorée	Caractéristique de l'eau de javel

Ainsi, les résultats des caractéristiques organoleptiques portant essentiellement sur la couleur et l'odeur de goudron obtenu par la distillation sèche des espèces étudiées (*P.halepensis* et *J.oxycèdru*), soulignent qu'ils sont liquides visqueux à température ambiante, de couleur noirâtre, dotés d'odeurs très prononcées (empyreumatique) spécifique de l'huile de cade «Gotrane».

Les caractérisations organoleptiques de l'hypochlorite de sodium (sauf le goût) effectuée réponds aux normes de l'Association Française de Normalisation (**AFNOR, 2013**).

III.4. Analyses physico-chimiques

III.4.1. Densité, pH, l'oxygène dissous

La densité, le pH et l'oxygène dissous, constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité du goudron (Belliot, 2007). Ces propriétés physico-chimiques sont déterminées selon un protocole précis et obéissent aux normes dictées par l'association française de normalisation (AFNOR). Les résultats obtenus sont portés dans le tableau 15 suivant :

Tableau 15. Profil comparatif des caractéristiques physico-chimiques des huiles et l'hypochlorite de sodium

Produits	Densité	pH	Oxygène dissous (ppm DO)
<i>Goudron de P. halepensis</i>	1,082 ± 0,07	3,81 ± 0,12	1,04 ± 0,27
<i>Goudron de J. oxycedrus</i>	1,033 ± 0,05	2,95 ± 0,15	3,10 ± 0,05
Solution d'hypochlorite de sodium	1,012 ± 0,12	11,64 ± 0,18	1,23 ± 0,21

La densité d'une substance est le rapport entre sa masse volumique et celle de l'eau. Elle constitue un critère physique très important pour contrôler la qualité. Elle peut facilement donner un aperçu sur la conformité d'un produit (Hellal, 2011).

La densité d'huile de *P. halepensis* se situe autour de 1,082± 0,07. Celle du l'huile de *J. oxycedrus* est de l'ordre de 1,033 ± 0,05. Cette dernière se situe dans la fourchette 0,980 - 1,065, rapportée pour l'essence végétal, par certains auteurs (Dorvault, 1994 ; Wilbur, 2001 ; Boubkeri et al., 2014 ; Terfaya et al., 2017 et Benlarbi, 2019). La densité enregistrée pour l'essence issu du pin se rapproche plus de celle rapportée par Mezouari et al., (2019) qui est de l'ordre de 1,15 pour l'huile d'*Acacia tortilis*.

Les huiles essentielles sont des liquides à la température ambiante et sont très volatiles. Elles sont plus ou moins colorées et leur densité est inférieure à celle de l'eau (AFNOR, 2000). On ne peut donc pas assimiler El-Gotrane, produits faisant l'objet de la présente étude, à un ensemble d'huiles essentielles. Ils sont plutôt regroupés sous la dénomination « goudrons végétaux de bois » ou « essences végétales » et caractérisés par une densité généralement supérieure à celle de l'eau. Les goudrons végétaux renferment toutefois un fort pourcentage d'huiles essentielles (Cenzon-Salvayre, 2018 ; Burri S et al., 2018 ; Ettahir, 2020).

La densité n'est pas un moyen de caractérisation de l'essence végétal car elle varie en fonction du mode de préparation. En plus, elle sera plus importante si le taux de phénol est plus élevé. Celui-ci ne doit cependant pas dépasser 40% (Mousseron, 1939 ; Dorvault, 1994). D'après Dorvault, (1994) l'huile de cade contiendrait un taux de phénol de l'ordre

de 0,3%, elle serait pour cette raison moins dense par rapport au goudron de pin. L'huile de pin obtenu dans la présente étude, en contient 19,4%, ce qui semble conforter les résultats obtenus à savoir une densité plus élevée (1.082 ± 0.07) comparativement à celle de l'huile de cade.

Les valeurs de pH enregistrées, des produits issus de la pyrogénéation, montrent un caractère très acide ($3,81 \pm 0,12$), pour l'huile de *P. halepensis* et de $2,95 \pm 0,15$, pour l'huile de *J. oxycedrus*.

Ces valeurs sont inférieures à celles rapportées en littérature, pour trois huiles commercialisées à savoir : "E-Rawda" d'un pH de 5,75, "l'huile de cade" d'un pH de 5,78 et "Zazia" avec un pH de 6,59 (Benlarbi *et al.*, 2015). Un pH de 5,2 est évoqué pour un goudron issu de l'espèce *Acacia tortilis subsp. raddiana* (Mezouari *et al.*, 2019) et un pH de 4.02 pour celui issu de *Juniperus oxycedrus* (Terfaya, 2015) et *Juniperus phoenicea* (Terfaya, 2019). Par ailleurs, les travaux de Makhloufi et Safi, (2013) rapportent un pH de 5.66 pour un produit provenant de l'espèce *Juniperus oxycedrus*.

Les résultats de l'oxygène dissous obtenues sont de $1,04 \pm 0,27$ mg/l pour l'huile de *P. halepensis* et de $3,10 \pm 0,05$ ppm pour l'huile de *J. oxycedrus*. L'huile de *P. halepensis* extraite lors de la présente étude, en contient 26,6% des terpènes oxygénés, ce qui semble conforter les résultats obtenus à savoir une concentration d'oxygène dissous est élevée comparativement à celle de l'hypochlorite de sodium.

La détermination des propriétés physico-chimiques est une étape nécessaire mais non déterminante pour caractériser les essences végétales. Il était donc nécessaire de la compléter par des analyses chromatographiques.

III.4.2. Analyses chromatographiques des goudrons végétaux

Les résultats de l'analyse par GC/MS de la composition chimique des huiles des espèces étudiées, sont présentés dans les tableaux 16.

Tableau 16. Composition chimique d'une huile de *P. halepensis*.

Les composants	Formule chimique	Temps de rétention (TR)	Pourcentage %
α -Pinene	C ₁₀ H ₁₆	06,17	0,31
Limonene	C ₁₀ H ₁₆	08,80	0,40
Guaiacol	C ₇ H ₈ O ₂	10,63	1,49
Creosol	C ₈ H ₁₀ O ₂	13,61	2,61
p-Ethylguaiacol	C ₉ H ₁₂ O ₂	16,01	2,63
α -Ionene	C ₁₃ H ₁₈	18,01	0,48
Isoeugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	18,13	0,80

Cerulignol	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	18,37	1,05
Cedrene-V6	C ₁₅ H ₂₄	18,58	1,18
β-Selinene	C ₁₅ H ₂₄	18,81	0,63
α-Cedrene	C ₁₅ H ₂₄	19,49	7,61
Naphthalene, 1,4-dimethyl-	C ₁₂ H ₁₂	19,67	2,31
Thujopsene	C ₁₅ H ₂₄	19,94	1,67
Indane,1,1,2,3,3-pentamethyl	C ₁₄ H ₂₀	20,31	0,27
Nonylbenzene	C ₁₅ H ₂₄	20,38	0,72
Isoeugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	20,50	1,73
Cyclopropa[d]naphthalene	C ₁₁ H ₈	20,95	0,92
1H-Cycloprop [e]azulene	C ₁₁ H ₈	21,10	1,74
α-Curcumene	C ₁₅ H ₂₂	21,28	0,77
δ -Selinene	C ₁₅ H ₂₄	21,66	1,26
α-Chamigrene	C ₁₅ H ₂₄	21,75	2,67
Cuparene	C ₁₅ H ₂₂	21,83	3,82
Mesitol	C ₉ H ₁₂ O	21,98	0,67
Calamenene	C ₁₅ H ₂₂	22,26	6,51
Guaiacylethanol	C ₉ H ₁₂ O ₃	22,51	1,12
β-Carbollin-1-one	C ₁₁ H ₆ N ₂ O	22,64	0,80
α-Calacorene	C ₁₅ H ₂₀	22,71	2,05
γ-Elemene	C ₁₅ H ₂₄	23,73	1,09
Cedrol alcol	C ₁₅ H ₂₆ O	24,09	1,67
4-Fluoro-2,6-Dimethylbiphenyl	C ₁₄ H ₁₃ F	24,58	0,43
Cedrene	C ₁₅ H ₂₄	24,71	0,54
Zingiberene	C ₁₅ H ₂₄	25,04	0,26
Cadalene	C ₁₅ H ₁₈	25,77	3,08
Cedr-8-en-13-ol	C ₁₅ H ₂₄ O	26,13	0,46
Aromadendrene	C ₁₅ H ₂₄	26,46	0,47
Mellein	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	27,90	0,39
methyl-α-methylCinnamate	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	30,29	1,00
Benz [a] anthracene, 7-ethyl-	C ₂₀ H ₁₆	31,50	0,44
18-Norabieta-8,11,13-triene	C ₁₉ H ₂₈	32,00	0,53
2-(2-Nitrophenyl) -1H-benzimidazole	C ₁₃ H ₉ N ₃ O ₂	32,19	0,95
1-methyl-10,18-bisnorabieta-8,11,19-triene	C ₁₉ H ₂₈	32,69	0,93
Canthiphytin	C ₁₅ H ₁₆ N ₂ O ₂	32,81	0,88
Di-p-Tolylacetylene	C ₁₆ H ₁₄	33,17	0,84
Simonellite	C ₁₉ H ₂₄	33,47	1,28
Aniline,2,5-dichloro-4-nitro	C ₆ H ₄ Cl ₂ N ₂ O ₂	33,61	0,62
Silane, chlorotriethoxy	C ₆ H ₁₅ ClO ₃ Si	33,72	1,29
Anthracene,1,4-dimethoxy	C ₁₆ H ₁₄ O ₂	34,16	0,68
3-(N,N-Diethylamino)carbazole	C ₁₆ H ₁₈ N ₂	34,79	0,90
Phenanthrene,2,3,5-trimethyl-	C ₁₇ H ₁₆	35,13	0,64
1-propene,1,2-bis(4-methoxyphenyl)-	C ₁₇ H ₁₈ O ₂	35,91	0,65
3,3-Dimethyl-3,4-dihydro-1,9(2H,10H)-acridinedione	C ₁₅ H ₁₅ NO ₂	36,00	0,71
Retene	C ₁₈ H ₁₈	36,26	3,79
Methylsandaracopimarate	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	37,68	1,11
Retinol	C ₂₀ H ₃₀ O	37,92	2,33
1-Methyl-1-silolanyl heptanoate	C ₁₂ H ₂₄ O ₂ Si	38,18	2,76
Ferruginol	C ₂₀ H ₃₀ O	38,26	6,33
Dehydroabietic acid	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	38,46	8,60
Chroman I	C ₂₄ H ₂₈ N ₄ O ₄	39,94	2,12
Acridin-9-yl-(2,4-dimethoxy-phenyl)-amine	C ₂₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	42,41	0,82
Sugiol	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	42,95	0,58
2-hydroxyhexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₃	43,32	0,50
10,11-(3,6-Dimethylbenzo) [3,2]paracyclophane	C ₂₃ H ₂₂	43,66	1,05
5-[p-methoxyphenylthio]-6-methoxy-8-aminoquinoline	C ₁₇ H ₁₆ N ₂ O ₂ S	44,90	0,82
TOTAL			99,76

Les pics du chromatogramme des essences végétales de chaque plante, sont comparés à ceux des composés de référence présents dans une bibliothèque de spectre avec une banque de données informatisées, la technique GC/MS nous a donné les différents chromatogrammes de masse et les indices de rétention des substances comparables qui constituent ces extraits.

Les chromatogrammes des huiles ont de nombreux pics, et beaucoup d'entre eux se chevauchent. Le profil chromatographique de chaque essence végétale est illustré dans la figure 30.

Les résultats obtenus ont permis d'identifier soixante-deux (62) constituants représentant environ 99,76 % de l'huile de pin d'Alep. La plupart des substances identifiées sont des hydrocarbures terpéniques (35,48% : α -pinène 0,31 %, limonène 0,40%) et des hydrocarbures terpéniques oxygénés (26,6%). Les principaux composés sont le dehydroabietic acid (8,6%), suivi par l' α -cedrène (7,61%), du calamenène (6,51%) et du ferruginol (6,33%).

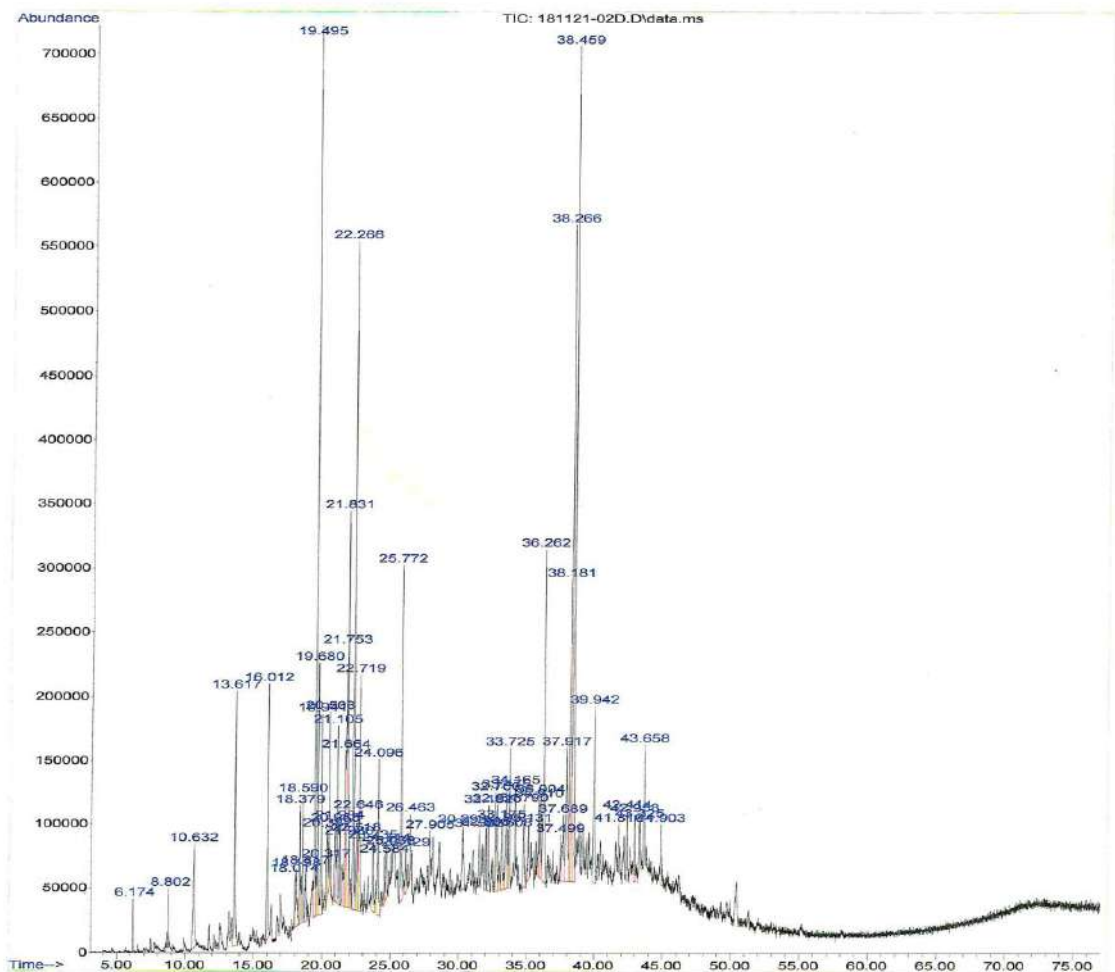


Figure 30. Profil chromatographique d'huile de *P. halepensis*

D'après **Fieser et al., (1938)** et **Dorvault, (1994)**, l'huile de pin contiendrait de l'acide acétique, des acides pyroligneux provenant de la distillation du bois et surtout des phénols (gaiacol ou crésol), du toluol, du xylol et des hydrocarbures tels que le naphthalène et l'antracène. Nos résultats (Fig. 31), relèvent effectivement des similitudes avec la composition chimique de l'huile de pin rapportée par la littérature. Toutefois, quelques différences relatives à la nature chimique des composés majoritaires sont mises en relief. En effet, nous remarquons que les acides pyroligneux tels que le dehydroabietic acid (8,6%), le 2-hydroxyhexadecanoic acid (0,5%) et les teneurs élevées en phénols terpéniques tels que le ferruginol (6,33%), le gaiacol (2,61%), le p-ethylguaiacol (2,63%) et le crésol (1,49%), sont majoritaires.

Une étude comparative montre l'existence d'une différence remarquable dans la composition chimique d'huile de pin (*P. halepensis*), en fonction de la partie utilisée du conifère (**Bartosz, 2003**). Selon ce même auteur, les parties aériennes généreraient de l' α -Pinène (16,4%), du myrcène (25,2%), du Trans-p-caryophyllène (10,9%) et du terpinolène (8,3%) alors que les racines donneraient de l' α -pinène (87,4%), du Trans-p-caryophyllène (3,5%) et du β -pinène (1,3%).

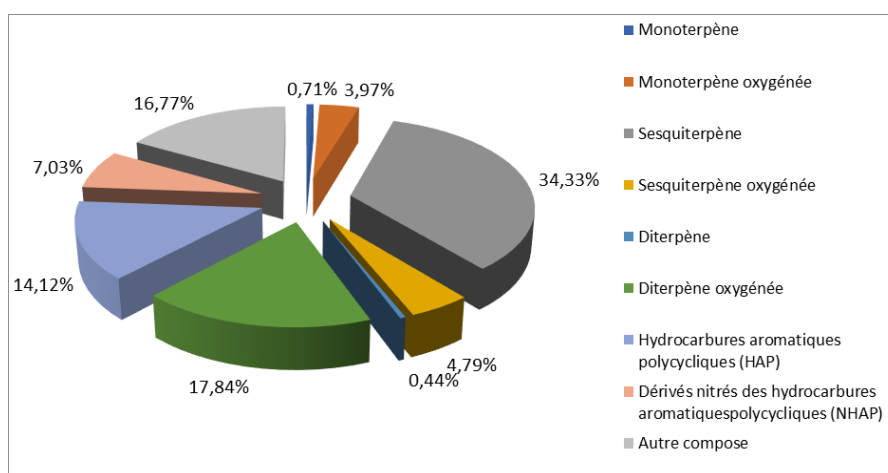


Figure 31. Classes terpéniques des composés identifiés dans l'huile de *P. halepensis*

Les différences observées dans la composition chimique des huiles, toutes origines confondues, pourrait s'expliquer par la méthode d'extraction utilisée ou l'adaptation de l'essence forestière aux facteurs abiotiques (climat, altitude, nature du sol...etc.) susceptibles d'orienter la biosynthèse vers la formation préférentielle de produits. Le patrimoine génétique, l'âge du végétal, la présence de chemotypes peuvent également y intervenir (**Baradat et al., 1991 ; Mansouri et al., 2010**).

En général, les essences végétales sont composées de centaines de substances chimiques, dont plusieurs sont considérées comme cancérigènes ou potentiellement dangereuses. Parmi celles-ci, on trouve notamment des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), des amines aromatiques et des composés inorganiques, qui existent dans l'huile de pin (Fig. 32).

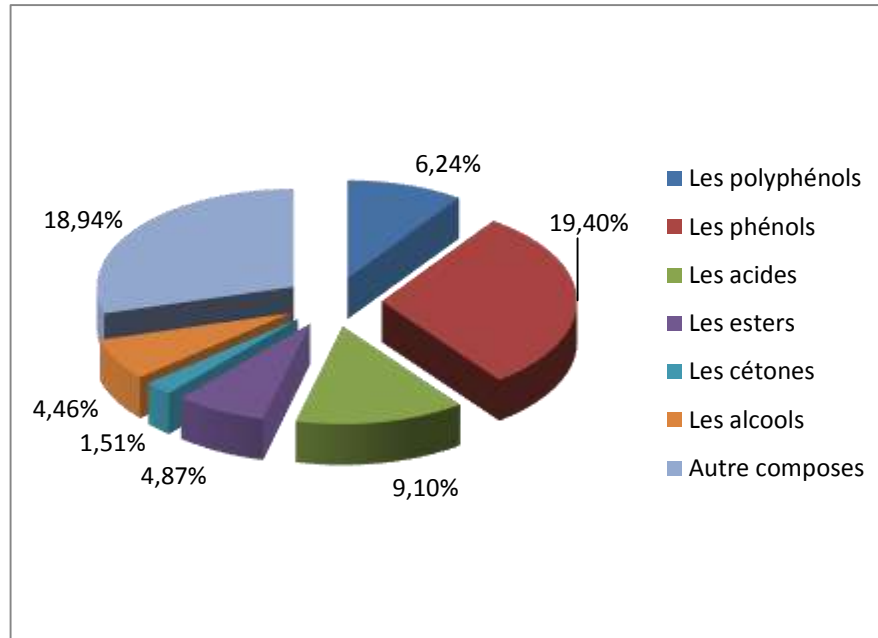


Figure 32. Classes chimiques des composés identifiés dans l'huile de *P. halepensis*

Les résultats de l'analyse par GC/MS de la composition chimique majoritaire d'huile de *J.oxycedrus* est présentés dans le tableau 17 et figure 33. Les composés majoritaires sont listés suivant l'ordre du temps de rétention. Quant aux différentes classes terpéniques caractérisent l'huile de *J. oxycedrus*.

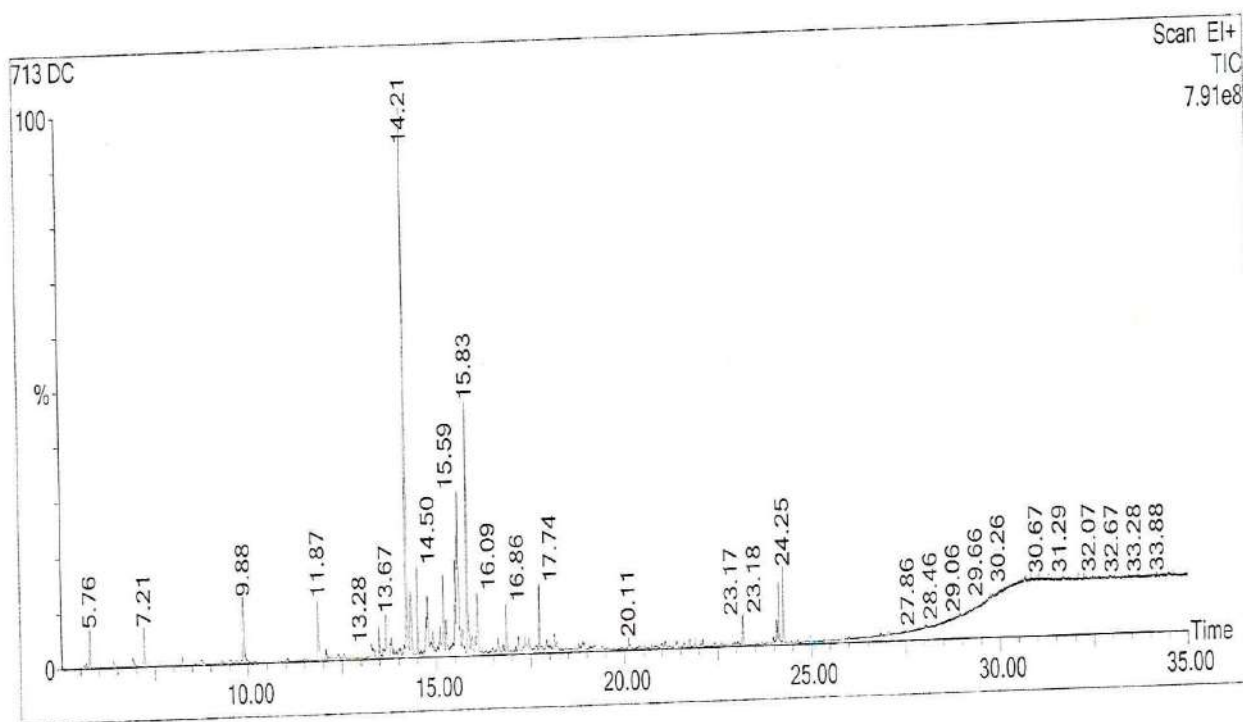


Figure 33. Profil chromatographique d'huile de *J. oxycedrus*

L'huile de cade et les goudrons végétaux en général, ne comportent pas de composés azotés tels que la pyridine ou la quinoléine (Lucas, 2000). Par ailleurs, les travaux de Keum et al., (2006), ont montré que l'huile végétal contenait deux cent vingt molécules dont les constituants majeurs sont des mono, des sesqui ou des diterpènes.

Tableau 17. Composés majoritaires de l'huile de *J. oxycedrus*

Composants	Formule chimique	TR (temps de rétention)	Pourcentage %
5-Methylguaïacol	C ₈ H ₁₀ O ₂	09,88	2,53
p-Ethylguaïacol	C ₉ H ₁₂ O ₂	11,87	2,12
Cedrane	C ₁₅ H ₂₄	14,21	13,78
β-Cedrene	C ₁₅ H ₂₄	14,33	2,26
Thujopsène	C ₁₅ H ₂₄	14,50	2,28
Longifolène-(V4)	C ₁₅ H ₂₄	15,19	2,26
α – Muurolène (B1-Cadinène)	C ₁₅ H ₂₄	15,51	2,69
α-4-Carène	C ₁₀ H ₁₆	15,55	2,99
α-Curcumène	C ₁₅ H ₂₂	15,59	3,89
α-Vatirène	C ₁₅ H ₂₂	15,83	6,77
Total			41,57

Selon la durée et la température de la pyrogénéation, on obtient des mélanges de compositions différentes. Une des caractéristiques de l'huile de cade est la présence d'un sesquiterpène bicyclique : le cadinène de formule C₁₅H₂₄. Plusieurs isomères sont présents

dont le principal est le β -cadinène. Les autres isomères sont le δ -cadinène, le γ -2 cadinène et le γ -1 cadinène. Le cadinène, extrait de l'huile de cade par distillation, se présente sous la forme d'un liquide incolore, peu odorant et fluide (**Fernet et Huerre, 1936 ; Mousseron et al.,1939 ; Hamba, 1982 ; Chalchat et al., 1988**). Le cadinol, alcool sesquiterpénique ($C_{15}H_{26}O$), est abondant dans l'huile de cade par 10% (**Belliot, 2007**).

Les analyses effectuées par GC-MS, confirment la proximité chimique entre les huiles de ces deux espèces. Néanmoins, quelques composés semblent être à même de nous permettre de discriminer certains d'entre eux ; en particulier, le cadinène n'a été identifié que dans l'huile de cade. Le cedrene le ferruginol, et le dehydroabietic acide quant à eux, sont présents dans les deux types d'huiles étudiées mais ils sont plus ou moins concentré (**Belliot, 2007**).

L'huile de cade est un antiseptique et est cicatrisante pour différentes plaies et blessures. Cette action antiseptique est essentiellement due à la présence de phénols ; tels que le crésol (**Chuyen, 1985 ; Gall et Litoux., 1989 ; Gérard et Vaillant., 1995**), le gaiacol, le cadinol, et le cedrol (**Benzeid et al., 2018**). L'huile de cade possède également un pouvoir parasiticide, antifongique, et bactériostatique (**Lucas, 2000**).

IV. Conclusion

Depuis quelques décennies, l'utilisation des moyens chromatographiques et spectroscopiques pour l'identification des composés a investi avec force les domaines de la recherche, de l'industrie chimique, agroalimentaires, des laboratoires médicaux et des sciences de l'environnement (**Rouessac, 1997**). En effet, l'identification des composés chimiques est désormais accessible et très fiable par la facilité d'emploi et l'efficacité de ces techniques. Cette fiabilité devient d'autant plus imposante lorsqu'il s'agit de déceler le nombre important de composés contenus dans les huiles (ou goudrons). Pour notre part et dans le cadre de ce chapitre, nous avons fait appel à des techniques chromatographiques pour identifier tous les composants à différentes concentrations. En effet, les espèces étudiées contiennent des métabolites intéressants, tels que : les phénols, et les terpènes. Par ailleurs, l'utilisation de la CG/MS dans l'analyse chimique des huiles, extraites par pyrogénéation des bois, a révélé une richesse en espèces chimiques diversifiées. De plus, l'espèce *P. halepensis* contient de l'acide dehydroabiétique à un taux plus élevé, comparée à l'espèce *J. oxycedrus* qui contient elle le cedrane à un taux plus élevé.

Chapitre VI
Activités biologiques des huiles
étudiées

Chapitre VI

Activités biologiques des huiles étudiées

I. Introduction

Les essences végétales (les goudrons végétaux) possèderaient de multiples activités biologiques. Parmi ces dernières, les activités, antimicrobienne, anticancéreuse, analgésique, antioxydante et anti-inflammatoire ont été rapportées (**Staberg et al., 1984 ; Schmidt et Korting, 1996 ; Lahlou, 2004 ; Belliot, 2007 ; Baser et Buchbauer, 2010**).

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel végétal

Dans cette partie, nous avons étudié les activités, antibactérienne et antifongique et l'effet antioxydant des huiles obtenues par pyrogénéation, à partir du bois de *J.oxycedrus* et *P.halepensis* originaires de l'atlas saharien.

II.2. Matériel chimique

Parallèlement, une solution d'eau de javel (NaClO) soumise aux mêmes tests que les huiles, servira de témoin (désinfectant de référence cité dans le chapitre V). Le NaClO est une solution aqueuse d'hypochlorite et de chlorure de sodium, en présence d'un excès d'hydroxyde de sodium. Sa composition varie en fonction du pH d'utilisation et du temps écoulé depuis sa fabrication. Son principe actif est, selon le pH, l'ion hypochlorite ClO^- , l'acide hypochloreux (HClO) ou le dichlore Cl_2 en solution. Elle est utilisée pour son action désinfectante et son pouvoir blanchissant. Ce produit à usage externe nous a été fourni par la société Flash Chemicals Industry (FCI), situé dans la zone d'activité de la commune au Sidi-Khouiled - Ouargla. L'hypochlorite de sodium liquide de 48° est distribuée à la société Algérie des Eaux (ADE)

II.3. Matériel microbiologique

Au cours de nos investigations, l'activité antimicrobienne a été évaluée vis-à-vis de 21 espèces microbiennes fréquentes en pathologie humaine, animale et végétale, de différentes provenances (Tabl. 18). Parmi ces microorganismes :

- Douze souches bactériennes à GRAM^+ et à GRAM^- souvent responsables de problèmes majeurs de santé publique, et connues pour leur résistance naturelle à divers agents désinfectants, proviennent de trois origines différentes : ATCC (*American Type Collection Culture*) fournies par le laboratoire de IBN ROCHD, d'autres non référencées isolées à partir de prélèvements sur des malades, fournies par le même laboratoire (source

hospitalière (a)), et d'autres d'origine hospitalière également récupérées de l'hôpital Mohamed BOUDIAF de Ouargla (source hospitalière (b)).

- Deux souches de *Candida albicans* dont l'une est référencée et l'autre fournie par l'hôpital Mohamed BOUDIAF de Ouargla (source hospitalière (b)).
- Sept souches de champignons dont 5 ont été isolés à partir du blé de la variété italienne « Simeto » et fournies par la semoulerie du SERSOU (Ghardaïa), ont été identifiées (Kemassi et al, 2017), et les autres provenances du laboratoire d'IBN ROCHD (source hospitalière (a)).

Tableau 18. Caractéristiques des microorganismes tester

n°	Nom de l'espèce	Référence	GRAM	Provenance	Code spécifique
Bactéries					
1	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-	Hospitalière (a)	<i>E. coli</i> 1
2	<i>Escherichia coli</i>	non référencée	-	Hospitalière (a)	<i>E. coli</i> 2
3	<i>Escherichia coli</i>	non référencée	-	Hospitalière (b)	<i>E. coli</i> 3
4	<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 19943	-	Hospitalière (a)	<i>S.typhi</i> 1
5	<i>Salmonella typhi</i>	4404540	-	Hospitalière (a)	<i>S.typhi</i> 2
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	-	Hospitalière (a)	<i>P. aeruginosa</i>
7	<i>Klebsiella sp</i>	non référencée	-	Hospitalière (b)	<i>K. pneumoniae</i>
8	<i>Proteus sp</i>	non référencée	-	Hospitalière (b)	<i>P. mirabilis</i>
9	<i>Staphylococcus Aureus</i>	ATCC 25923	+	Hospitalière (a)	<i>S. aureus</i> 1
10	<i>Staphylococcus Aureus</i>	ATCC 43300	+	Hospitalière (a)	<i>S. aureus</i> 2
11	<i>Staphylococcus Aureus</i>	non référencée	+	Hospitalière (b)	<i>S. aureus</i> 3
12	<i>Streptococcus sp</i>	non référencée	+	Hospitalière (a)	<i>Streptococcus sp</i>
Levures					
13	<i>Candida albicans</i>	7002	/	Hospitalière (a)	<i>C. albicans</i> 1
14	<i>Candida albicans</i>	non référencée	/	Hospitalière (b)	<i>C. albicans</i> 2
Champignons					
15	<i>Penicillium griseofulvum</i>	non référencée	/	Végétale	<i>E9</i>
16	<i>Aspergillus ochraceus</i>	non référencée	/	Végétale	<i>E5</i>
17	<i>Alternaria infectoria</i>	non référencée	/	Végétale	<i>E2</i>
18	<i>Trichoderma harzianum</i>	non référencée	/	Végétale	<i>E11</i>
19	<i>Cladosporium herbarum</i>	non référencée	/	Végétale	<i>E1</i>
20	<i>Aspergillus flavus</i>	88.3183	/	Hospitalière (a)	<i>Asp. f</i>
21	<i>Trichophyton Sp</i>	non référencée	/	Hospitalière (a)	<i>E3</i>

III. Méthodes d'évaluation des activités biologiques

Les plantes aromatiques possèdent plusieurs activités biologiques, parmi lesquelles on peut citer les activités antiseptiques et antimicrobiennes. Beaucoup d'entre elles, ont des propriétés antitoxiques, antivenimeuses, antivirales, anti-oxydantes, insecticide et antiparasitaires. Plus récemment, on leur reconnaît également des propriétés anticancéreuses (Staberg et al., 1984 ; Schmidt et Korting ,1996 ; Lahlou, 2004 ; Baser et Buchbauer, 2010). Dans notre étude, nous nous sommes focalisés sur trois activités biologiques : les activités antioxydante, antibactérienne et antifongique.

III.1. Activité antioxydante

Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques (Boyd et al., 2003). Les antioxydants sont des composés capables de minimiser efficacement les rancissements, retarder la peroxydation lipidique, sans effet sur les propriétés sensorielle et nutritionnelle du produit alimentaire. Ils permettent ainsi le maintien de la qualité et d'augmenter la durée de conservation du produit.

L'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* est faite par plusieurs techniques, qui se basent exclusivement sur la capacité réductrice ou capacité de piégeage des radicaux, comme étant un indicateur de son potentiel antioxydant (Javanmardi et al., 2003 ; Villaño, 2007).

La mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* des huiles de bois des deux plantes étudiées a suivi la méthode de piégeage du radical libre DPPH.

- **Méthode de DPPH**

L'évaluation de l'activité antioxydante est réalisée par le piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), et la mesure de l'activité antiradicalaire traduite par la réduction du DPPH• en DPPH (2, diphénylpicrylhydrazine), accompagné d'un virage de couleur de la solution, du bleu-violet au jaune (Brand et al., 1995 ; Morales et Perez, 2001). En effet, l'intensité de la couleur jaune suffisamment stable est proportionnelle à la teneur en composés phénoliques oxydés (Boizot et Charpentier, 2006). Ce test s'effectue à température ambiante, permettant ainsi d'éliminer le risque de dégradation thermique des molécules testées. Un millilitre de la solution de l'huile de pin, diluée préalablement dans l'éthanol, les dilutions sont mises en contact avec 1 ml de la solution DPPH à 0,1 mM dans de l'éthanol. Après 30 min d'incubation à l'obscurité, la lecture de l'absorbance à 517 nm est effectuée, à l'aide d'un spectrophotomètre UV- visible DR6000 (Fig. 05 de l'annexe2). Le mécanisme réactionnel est illustré dans la figure 34.

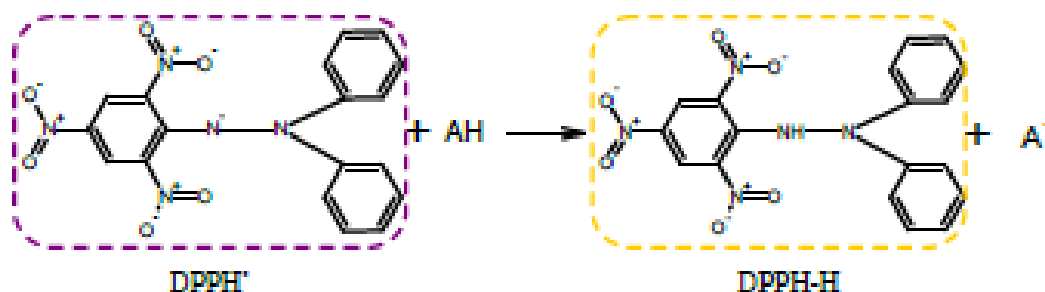


Figure 34. Mécanisme réactionnel du test DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH)

L'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH. La cinétique de l'oxydation du substrat par le DPPH est effectuée. Une solution de DPPH à 0,1Mm mise dans de l'éthanol, est utilisée comme témoin (blanc de l'essai). L'activité de piégeage du radical DPPH est calculée, suivante la formule :

$$(I\%) = \frac{A_0 - A_e}{A_0} 100 \quad (16)$$

Où, A_0 : Absorbance du témoin, A_e : Absorbance de l'échantillon.

A titre indicatif, l'acide ascorbique, comme standard, est connu pour son effet anti-radicalaire a été testé en parallèle. Quant à la concentration inhibitrice (IC50) ou la concentration équivalente à 50% de DPPH perdu, elle est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH (couleur), elle a été calculée par régression linéaire à partir des graphes des taux d'inhibition (**Michel, 2011**).

III.2. Activité antimicrobienne

Un agent antimicrobien est une substance d'origine naturelle ou synthétique, utilisée pour la destruction ou l'inhibition de la croissance des micro-organismes, notamment des bactéries, des levures, et des champignons (**Courvalin et al., 1990**).

III.2.1. Activité antibactérienne

Cette activité est recherchée sur milieux gélosés, Mueller Hinton (MHA), coulés en boîtes, qui sontensemencés en surface par les différentes souches pathogènes (bactéries et levures). Les tests sont effectués en triplicata, avec les substances d'étude, à savoir les essences végétales (l'huile de cade de *J. oxycedrus* et de pin de *P. halepensis*), ainsi que l'hypochlorite de sodium, déposés à la surface des milieuxensemencés (en contact des germes testées). Suivi d'une incubation à 37 °C pendant 24 h. Il est à rappeler que la lecture s'effectue en comparaison avec une boîte témoin ne contenant que le milieu de culture et le germe à tester.

Les tests antibactériens doivent être réalisés sur des cultures jeunes des bactéries à tester, obtenues sur gélose nutritive, en boîtes pétri, soumises à une incubation (Fig. 06 de l'annexe2), à 37 °C, durant 18 à 24 h (phase de croissance exponentielle).

A partir de ces cultures, 3 à 5 colonies bien isolées et identiques sont prélevées et mises dans 5 ml d'eau physiologique stérile, puis agitées au vortex pendant quelques secondes. La standardisation de la suspension à 10^6 UFC/ml (**Wade et al., 2001**), est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre (DR 6000) à 620 nm (Fig. 42). Selon Mac Farland, on admet qu'une

densité optique comprise entre 0,08 et 0,1 correspond à une concentration de 10^7 à 10^8 germes/ml. Pour ce faire, la suspension d'inoculum est diluée à 1 :10 dans de l'eau distillée stérile pour arriver à une standardisation (10^6 germes/ml).

Pour évaluer l'activité antibactérienne des huiles de cade et de pin, nous avons adopté trois approches :

III.2.1.1. Méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé (Aromatogramme)

L'évaluation de l'activité antimicrobienne du matériel d'étude (les huiles + l'hypochlorite de sodium), est réalisée par la méthode de diffusion par disques en milieu gélosé, validée par le NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard) (**Julia et al., 2000**). Cette technique de distribution du produit à tester à partir d'un disque de papier (Whatman n° 3) de 6 mm de diamètre, a été choisie pour sa simplicité et sa fiabilité (**Aouni et al., 2013**). Elle permet de fournir des résultats préliminaires sur la sensibilité des souches et sur les activités antibactériennes du produit, à travers l'évaluation des zones d'inhibition apparaissant autour des disques. Les "souches indicatrices" sont ensemencées au préalable à la surface d'une gélose Mueller Hinton (MHA) par inondation et les disques imprégnés de 10 μ l de l'huile y sont placés ; l'incubation à 37 °C pendant 24 h. Tous les tests ont été répétés trois fois.

On coule aseptiquement, sous la hotte, le milieu de culture gélosé, Mueller Hinton (M.H), en surfusion dans des boites de Pétri, à raison de 15 ml par boite. Après refroidissement et solidification du milieu de culture, 1 ml de chaque suspension de culture bactérienne, de concentration d'environ 10^6 UFC/ml, préparée comme indiqué précédemment à partir d'une culture de 18 heures, y est ensemencé en surface par étalement.

A l'aide d'une pince stérile, on dépose un disque de cellulose stérile (disque de papier filtre Watman) préalablement imbibée de 10 μ l de la matière étudiée, au centre de la boite de pétri coulée et ensemencée avec la souche indicatrice. Les boites de pétri sont ensuite fermées et abandonnées sur la paillasse à la température ambiante pendant 1 heure pour permettre la diffusion du produit test. On procède ensuite à une incubation à 37 °C pendant 24 heures. La même expérience est réalisée avec des disques imbibés d'une même quantité d'eau distillée stérilisée (témoin négatif).

La lecture du résultat se fait par la mesure, à l'aide d'un pied à coulisse, du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque (Fig. 35).

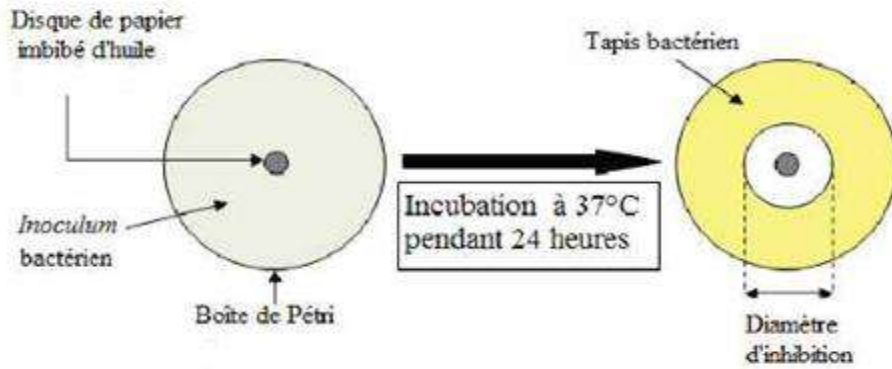


Figure 35. Principe de la méthode de diffusion par disque

Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d’inhibition et peut être symbolisé par des signes (+) ou (-) selon la sensibilité des souches vis-à- vis du produit test (Tabl. 19).

Tableau 19. Transcription des diamètres d’inhibition des disques imprégnés (Ponce et al., 2003)

Diamètres de la zone d’inhibition	Transcription	Interprétation
< 8	-	Résistant
9 - 14	+	Sensible
15 - 19	++	Très sensible
>20	+++	Extrêmement sensible

III.2.1.2. Méthode de diffusion en puits

La méthode de diffusion en puits, assure une diffusion radiale de la substance à tester à partir d’un puit en donnant une zone d’inhibition claire facilement mesurable. Elle consiste à effectuer un trou circulaire (de 6 mm) dans la gélose (Fig. 36) et y verser un volume de l’échantillon (dans notre cas 10 µl des différentes substances à tester). Cette huile diffuse radialement en donnant une zone d’inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablement ensemencée avec la suspension bactérienne (Eymard, 2003).

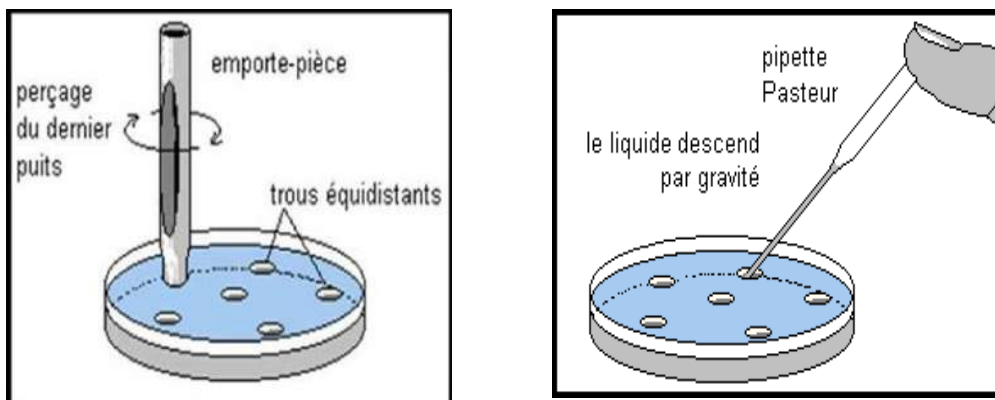


Figure 36. Principe de la méthode de diffusion en puits (Djenadi, 2011)

III.2.1.3. Méthode de micro-atmosphère

La méthode de micro-atmosphère consiste à cultiver les microorganismes à tester dans les boîtes de pétri sur un milieu de culture approprié. La différence réside principalement dans la position du disque imprégné d'huile qui est placé au centre du couvercle de la boîte de pétri, renversée après fixation (Fig. 37). Celle-ci n'est donc pas en contact avec le milieu gélosé. Le produit à tester en s'évaporant dans l'atmosphère de la boîte, exerce son effet inhibiteur (Pibiri, 2005).

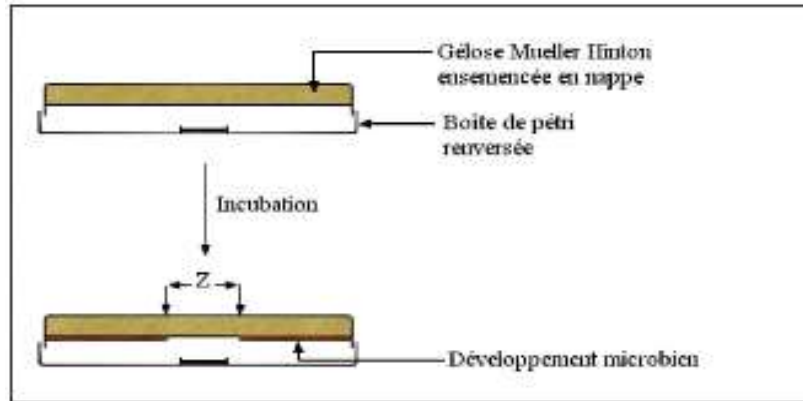


Figure 37. Principe de la méthode de micro-atmosphère (Djenadi, 2011)

A. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est déterminée selon la méthode de dilution en milieu gélosé (méthode de diffusion en milieu solide). Les suspensions microbiennes sont préparées selon les normes McFarland correspondant à 10^6 UFC /ml, des dilutions de 500 μ l/ml à 0,97 μ l/ml des huiles ont été testées (Tab. 20). Les huiles sont d'abord diluées dans du Tween 80, selon les proportions 1/9 (Emulsifiant/huile). Les disques imbibés de 10 μ l des solution (des différentes concentration), sont placés sur les géloses MH ensemencées par les souches indicatrices. L'incubation est réalisée 37 °C pendant 24 heures. Tous les essais, sont répétés trois fois (Oussou et al., 2004).

La méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé a été choisie pour sa simplicité et la fiabilité des résultats.

Tableau 20. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et dilutions expérimentées

Rapport de dilution	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
%	50	25	12,5	6,25	3,12	1,5	0,78	0,4	0,2	0,1
μ l en produit /ml	500	250	125	62,5	31,25	15,62	7,81	3,90	1,95	0,97

B. Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide

La détermination de l'effet bactéricide ou bactériostatique d'une substance est réalisée en procédant à un repérage des zones d'inhibition formées et ne présentant aucune croissance bactérienne visible à l'œil nu sur milieu de culture (**Mann et Markham, 1998**).

- S'il y a croissance bactérienne, la substance a un effet bactériostatique sur la souche testée.
- Si au contraire, il y a absence de croissance bactérienne, la substance présente un effet bactéricide vis-à-vis de cette souche.

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est définie comme étant la plus basse concentration capable d'empêcher une croissance bactérienne visible, c'est une concentration qui n'est pas totalement bactéricide et une partie de l'inoculum est capable de se développer après disparition du composé inhibiteur (**Mann et Markham, 1998**).

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) est la plus petite concentration de l'agent inhibiteur ne laissant subsister que 0,01% ou moins de l'inoculum initial, après 18 heures de culture à 37 °C. Cette valeur caractérise l'effet bactéricide de la substance (**Haddchi et al., 2009**).

Expérimentalement, pour juger nos produits bactériostatique ou bactéricide, on a détecté l'existence des germes après 18 heures avec toutes les zones inhibées de CMI.

III.2.2. Activité antifongique

Les souches fongiques utilisées au cours de cette étude sont : *Aspergillus flavus* référencée (88.3183) ; le *Trichophyton sp* responsable de dermatophytose humaine ; et d'autres champignons phytopathogènes : *Penicillium griseofulvum*, *Aspergillus ochraceus*, *Alternaria infectoria*, *Trichoderma harzianum*, et *Cladosporium herbarum*, isolées à partir du blé de la variété italienne « Simeto » (**Kemassi et al., 2017**).

III.2.2.1. Détermination de l'activité antifongique

L'évaluation de l'activité antifongique de l'huile de cade, de pin et de l'hypochlorite de sodium (contrôle positif) est réalisée par la méthode de contact direct. Pour ce faire, cinq mélanges de concentration différente chacun, sont obtenus par addition de 50, 100, 250, 500 et 1000 µl de produit à tester à 100 ml de milieu Potato Dextrose Agar (PDA) tiède avec addition de quelques gouttes de tween 20 (agent tensioactif) (Tab. 21). Après agitation pendant 5 min. (homogénéisation) de chacun des 5 flacons, les mélanges décrits précédemment, sont coulés dans des boîtes pétri.

L'inoculation se fait sous la hotte par le dépôt au centre de la boîte de pétri coulée et solidifiée, d'un disque de mycélien d'environ 0,6 cm de diamètre. Des témoins constitués

de la souche fongique, du milieu PDA et de Tween 20, sont réalisés dans les mêmes conditions, en l'absence du produit test. L'incubation est réalisée pour l'ensemble des essais à 25 ± 2 °C pour 7 jours (Mohammedi, et Atik., 2012). Tous les essais sont répétés trois fois.

La lecture des résultats commence à partir du 3^{ème} jour (72 h) d'incubation, par les mesures de la croissance radiale en fonction des différentes concentrations du produit test par rapport au témoin (Makhloufi et al., 2011 ; Mezouari et al., 2019 ; Bendjima et al.,2020).

La concentration minimale d'inhibition (CMI) est la plus petite concentration de produit test pour laquelle aucune croissance n'est visible, comparativement au témoin (sans produit test) (Mezouari et al., 2019 ; Bendjima et al.,2020).

Tableau 21. Concentrations produit test/ PDA

Concentrations Produit test	Produit test/ PDA (μ l/100ml)	Produit test/ PDA (% v /v)
	50	0,05
- Huile de cade,	100	0,10
- Huile de pin,	250	0,25
- Hypochlorite de sodium	500	0,50
	1000	1,00

III.2.2.2. Détermination de la concentration minimale fongicide

La concentration minimale fongicide (CMF) (méthode de contact direct sur milieu liquide) est définie comme étant la plus faible concentration qui tue 99,9% de la concentration cellulaire initiale. L'incubation des boîtes de pétri s'effectue à 25 °C pendant 21 jours. Si le diamètre de la croissance radiale des souches fongiques est légèrement supérieur à 6 mm, le produit test est considéré fongistatique (S). Si ce diamètre reste égal à 6mm, le produit testé est considéré fongicide (C) (Canton et al., 2003 ; Aouadhi, 2013 ; Goudjil, 2016).

La croissance mycélienne a été évaluée toutes les 24 heures en mesurant la moyenne de trois diamètres perpendiculaires passant par le milieu de rondelle.

Cette lecture doit être réalisée en comparaison avec les cultures témoins réalisées le même jour et soumises aux mêmes conditions. Tout développement de champignon, même léger, sera considéré comme action négative, c'est à dire que le produit test en question n'est pas un inhibiteur de la croissance fongique (Terzi et al., 2014).

III.2.2.3. Détermination de l'indice antifongique

Après l'incubation en tenant compte de la croissance de témoin, l'indice antifongique (TI) est déterminé selon la formule ci-dessus (**Chang et al., 1999**) :

$$(TI\%) = \frac{dC - dE}{dC} 100 \quad (17)$$

TI (%) : Taux d'inhibition exprimé en pourcentage

dC : Diamètre de la zone de croissance du témoin

dE : Diamètre de la zone de croissance de l'essai (l'extrait)

III.2.2.4. Détermination de la vitesse de croissance mycélienne (VC)

Selon Cahagnier et Molard (1998), la vitesse de la croissance mycélienne de chaque concentration est déterminée par la formule suivante :

$$VC = \frac{D_1}{Te_1} + \frac{D_2 - D_1}{Te_2} + \frac{D_3 - D_2}{Te_{12}} + \dots + \frac{D_n - D_{n-1}}{Te_n} \quad (18)$$

D : diamètre de la zone de croissance enregistré chaque jour

Te : temps d'incubation (jour)

IV. Résultats et discussion

IV.1. Activité antioxydante

L'activité antioxydante est tributaire de la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle des composés phénoliques des essences (pin et cade). En présence d'un radical libre DPPH•, l'atome H est transféré sur ce dernier qui devient stable sous sa forme DPPH•H, ceci provoque une diminution de la concentration du radical libre et également l'absorbance au cours du temps de réaction jusqu'à épuisement de la capacité de l'antioxydant donneur d'hydrogène (**Barkat et Laib, 2011 ; Laib, 2012**).

La figure 38 met en évidence l'efficacité des goudrons et de l'acide ascorbique à piéger le radical DPPH, une efficacité traduite par le taux d'inhibition (I%) en fonction des différentes concentrations.

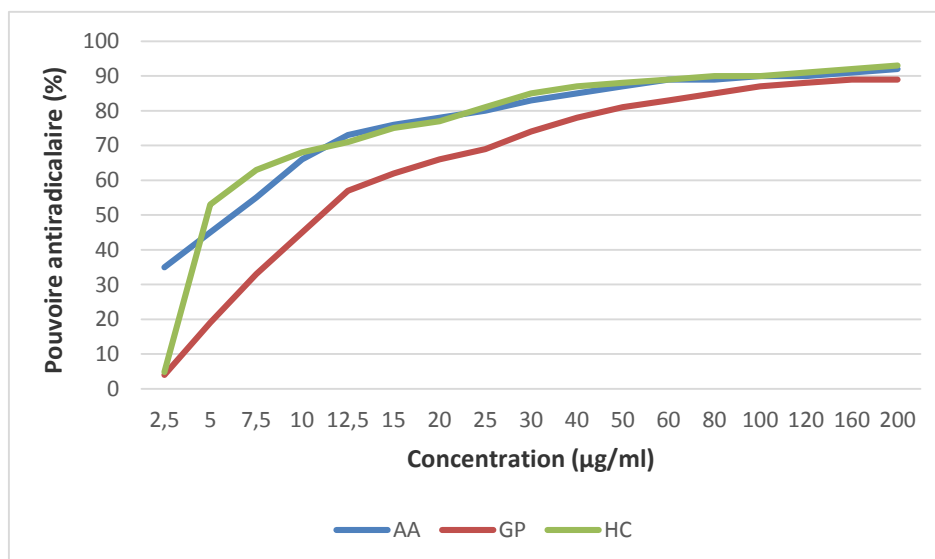


Figure 38. Activité antiradicalaire des huiles (goudrons) étudiés et de l'acide ascorbique

L'activité antioxydante des huiles étudiées a été déterminée par la méthode de piégeage du 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH), un radical stable, violet en solution et ayant une caractéristique d'absorption maximale à 517 nm. Lorsque le DPPH est réduit par un composé à propriété anti-radicalaire (piégeage), un changement de couleur du violet au jaune survient. La valeur IC_{50} (concentration inhibitrice à 50%), est alors déterminée. Elle représente la norme utilisée pour évaluer l'activité antiradicalaire. Elle est définie comme étant la concentration de l'échantillon requis pour provoquer une diminution de 50% de l'absorbance de la solution de DPPH, le tableau 22, reprend les résultats de la IC_{50} pour nos huiles et standard utilisés. Les IC_{50} sont inversement proportionnelles à l'effet piégeur, dont les faibles valeurs reflètent un effet anti-radicalaire significatif (Villano et al., 2007).

Tableau 22. Résultats de concentration inhibitrice à 50%, des huiles étudiées, et l'acide ascorbique (Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n = 3))

Produit	Acide ascorbique	Huile de <i>P. halepensis</i>	Huile de <i>J. oxycedrus</i>
IC_{50} (µg/ml)	6,19 \pm 0,24	10,93 \pm 0,63	4,38 \pm 0,66

D'après les résultats obtenus, l'activité antiradicalaire semble augmenter avec l'augmentation des concentrations en produits tests. Parmi les trois produits tests, l'huile de cade (*J. oxycedrus*) semble l'antioxydant le plus efficace et le plus actif puisqu'il affiche une IC_{50} égale à 4,38 \pm 0,66 µg/ml donc la moins élevée même par rapport à celle obtenue, dans les mêmes conditions, avec l'acide ascorbique, habituellement utilisé comme référence (6,19 \pm 0,24 µg/ml) pour son haut potentiel anti-radicalaire. L'huile de pin (*P. halepensis*) semble être le moins performant avec un IC_{50} de 10,93 \pm 0,63 µg/l. Toutefois, cette valeur n'est pas

négligeable, puisqu'elle est plus élevée par rapport à celle enregistrée pour l'huile essentielle issue des branches du Pin d'Alep, par hydrodistillation (187.31 µg/ml) (**Becissa, 2016**).

De surcroît, **Abdel Ghany et Hakamy (2014)** rapportent que l'activité antioxydante des fruits de *Juniperus procera* est due à la présence de limonène, α -terpinène, caryophyllène, germacrène D et l' α -humulène. Néanmoins, l'activité antioxydante d'une huile essentielle dépend beaucoup de sa composition chimique d'une part, et d'autre part de la sensibilité des méthodes mises en œuvre pour la mettre en évidence et de l'évaluer (**Miguel, 2010**). Par conséquent, les huiles des espèces de *Juniperus* sélectionnées dans notre étude sont riches en composés terpéniques et phénoliques, ce qui pourrait justifier l'activité antioxydante plus au moins élevée de cette plante.

Cette activité est attribuée à la composition qualitative et quantitative du matériel de la présente étude. En effet, il est connu de nos jours que les végétaux les plus riches en composés phénoliques possédaient les activités anti oxydantes les plus élevées (**Katsube et al., 2004 ; Kalia et al., 2008 ; Stagos et al., 2012 ; Amri et al., 2015 ; Guettaf et al., 2016**).

Par ailleurs, les propriétés de l'hypochlorite de sodium est d'autant plus oxydante que son pH est faible (11,64), mais même à pH 14 son pouvoir oxydant reste élevé. Ce produit désinfectant usuel peut ainsi oxyder de nombreux composés toxiques en composés inoffensifs, tels que : SO₂, H₂S, NH₃, ... Son action décolorante et désinfectante est, en partie, due à sa capacité d'oxyder de nombreux composés organiques.

En conclusion, l'activité antiradicalaire permet de les classer dans l'ordre décroissant suivant : ***Juniperus oxycedrus* > Acide ascorbique > *Pinus halepensis* > Hypochlorite de sodium.**

IV.2. Activité antimicrobienne

Dans la présente étude, l'activité antimicrobienne a été évaluée vis-à-vis de 12 souches bactériennes, 2 souches levurières, par trois méthodes sur milieu de Mueller-Hinton gélosé et de 7 souches de champignons par la méthode de contact direct sur milieu PDA, avec la détermination de la concentration minimale inhibitrice.

IV.2.1. Activité antibactérienne

Les résultats des tests de sensibilité bactérienne, aux produits tests, sont regroupés dans le tableau 23. Les valeurs indiquées représentent la moyenne des trois mesures. L'action inhibitrice se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier imprégné du produit test ou du puit contenant l'extrait brut étudié. Les résultats obtenus indiquent la présence de zones d'inhibition dont le diamètre, supérieur à 8 mm, diffèrent selon le microorganisme ciblé d'où efficacité des produits étudiés (**Moreira et al., 2005**).

Tableau 23. Activité antibactérienne des produits test en comparaison avec l'hypochlorite de sodium

Les souches microbiennes Espèces	Diamètre des zones d'inhibition (mm)								
	Goudron de <i>Pinus halepensis</i>			Huile de <i>Juniperus oxycedrus</i>			Hypochlorite de sodium		
	M D	M P	M M	M D	M P	M M	M D	M P	M M
Bactéries à Gram négatif									
<i>E. coli</i> 1 ATCC 25922	15,33 ± 0,25	24,22 ± 0,04	06,00	12,68±0,52	23,24±0,65	06,00	24,21±0,12	45,44±0,25	53,34±0,33
<i>E. coli</i> 2	14,06 ± 0,21	24,26 ± 0,21	06,00	12,23±0,57	22,14±0,37	06,00	24,04±0,21	44,08±0,27	51,00±0,12
<i>E. coli</i> 3	15,52 ± 0,36	16,14 ± 0,58	06,00	15,23±0,40	15,47±0,08	06,00	22,45±0,31	44,25±0,68	50,55±0,15
<i>S. typhi</i> 1 ATCC 25922	11,45 ± 0,35	20,07 ± 0,33	06,00	14,24±0,73	14,02±0,58	06,00	28,19±0,17	34,23±0,07	51,23±0,15
<i>S. typhi</i> 2 4404540	10,85 ± 0,78	22,11 ± 0,09	06,00	14,11±0,85	13,00±0,50	06,00	29,01±0,20	35,58±0,36	54,26±0,08
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	28,54 ± 0,21	28,04 ± 0,20	11,12 ± 0,52	24,13±0,83	28,02±0,45	06,00	38,48±0,01	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	18,45 ± 0,32	18,08 ± 0,45	06,00	16,12±0,29	15,84±0,07	06,00	29,12±0,46	50,63±0,12	59,22±0,04
<i>P. mirabilis</i>	22,33 ± 0,45	21,47 ± 0,44	06,00	18,31±0,18	20,82±0,31	06,00	32,25±0,23	55,81±0,47	58,12±0,31
Bactéries à Gram positif									
<i>S. aureus</i> 1 ATCC 25923	34,23 ± 0,50	34,31 ± 0,80	06,00	32,51±0,71	29,26±0,66	06,00	32,83±0,96	54,55±0,98	59,03±0,89
<i>S. aureus</i> 2 ATCC 43300	32,00 ± 0,33	33,39 ± 0,37	06,00	31,15±0,93	29,25±0,23	06,00	33,55±0,82	54,34±0,78	60,22±0,86
<i>S. aureus</i> 3	30,02 ± 0,74	30,04 ± 0,23	06,00	25,33±0,54	27,04±0,19	06,00	30,21±0,71	41,36±0,71	46,01±0,73
<i>Streptococcus</i> sp	30,31 ± 0,48	32,28 ± 0,54	15,09 ± 0,17	34,24±0,36	34,27±0,76	17,30±0,05	40,41±0,07	45,11±0,52	55,12±0,28
Levures									
<i>C.albicans</i> 17002	32,74 ± 0,67	26,23 ± 0,86	06,00	25,87±0,92	51,02±0,37	06,00	61.25±0.26	-	67,33±0,04
<i>C.albicans</i> 2	31,04 ± 0,85	27,42 ± 0,84	06,00	25,92±0,91	50,39±0,41	06,00	61.44±0.32	63,08±0,62	68,11±0,03

Les valeurs sont la moyenne des trois mesures (mm) ± SD, incluant le disque 6 mm, (-) : Non déterminé

M D : méthode de disque, M P : méthode de puit, M M : méthode de micro-atmosphère

Les produits testés semblent exercer une inhibition, même à faible concentration de la croissance de tous les micro-organismes ciblés. A titre d'exemple l'huile de pin, les diamètres d'inhibition les plus importants, soient $34,23 \pm 0,5$ mm et $34,31 \pm 0,80$ mm, obtenus par la méthode de disque (Fig. 39) et celle des puits (Fig. 40), ont été enregistrés avec la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Les diamètres les moins importants soient $10,85 \pm 0,78$ mm, avec la souche de *Salmonella typhi* 4404540, par méthode des disques et $16,14 \pm 0,58$ mm avec *E. coli* 3, par la méthode des puits ont été enregistrés. Il semblerait que la méthode de micro-atmosphère n'est pas efficace en comparaison avec les deux méthodes citées précédemment (Fig. 41), sauf pour les souches de *P. aeruginosa* (11,12 mm) et *Streptococcus sp* (15,09 mm).

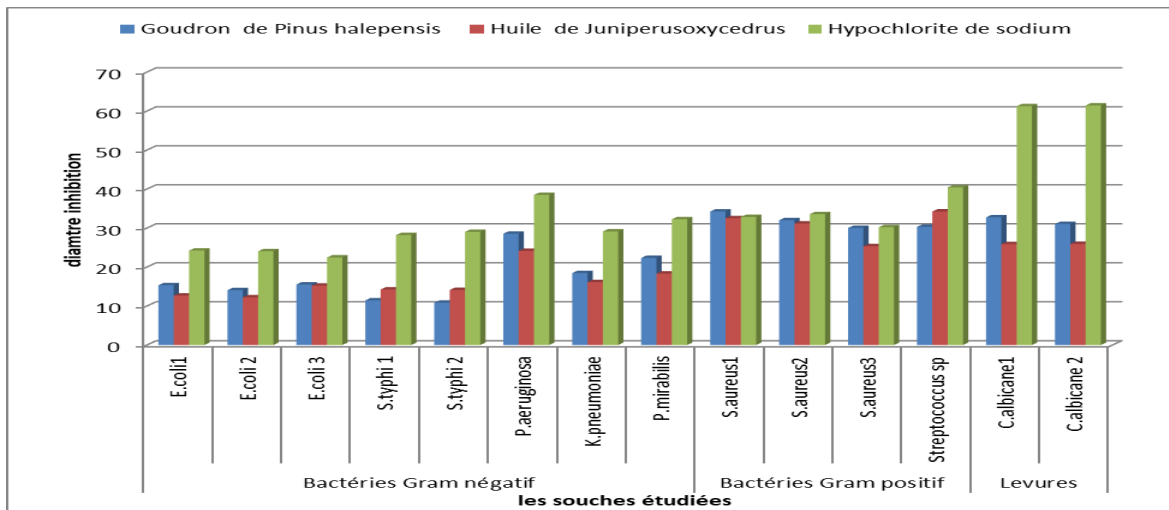


Figure 39. Activité antibactérienne des huiles et de l'hypochlorite de sodium, par méthode des disques

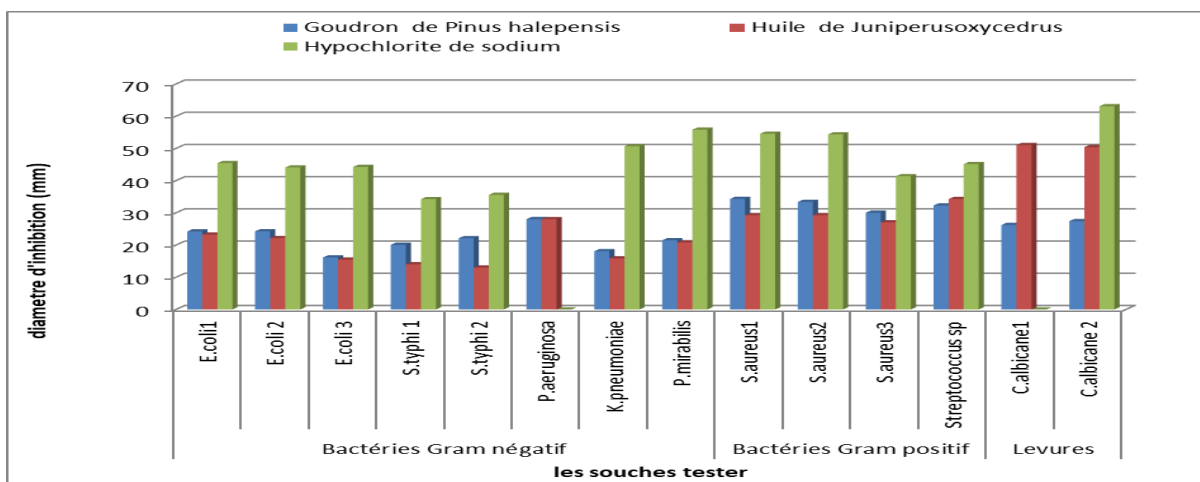


Figure 40. Activité antibactérienne des huiles en comparaison avec l'hypochlorite de sodium, par méthode de des puits

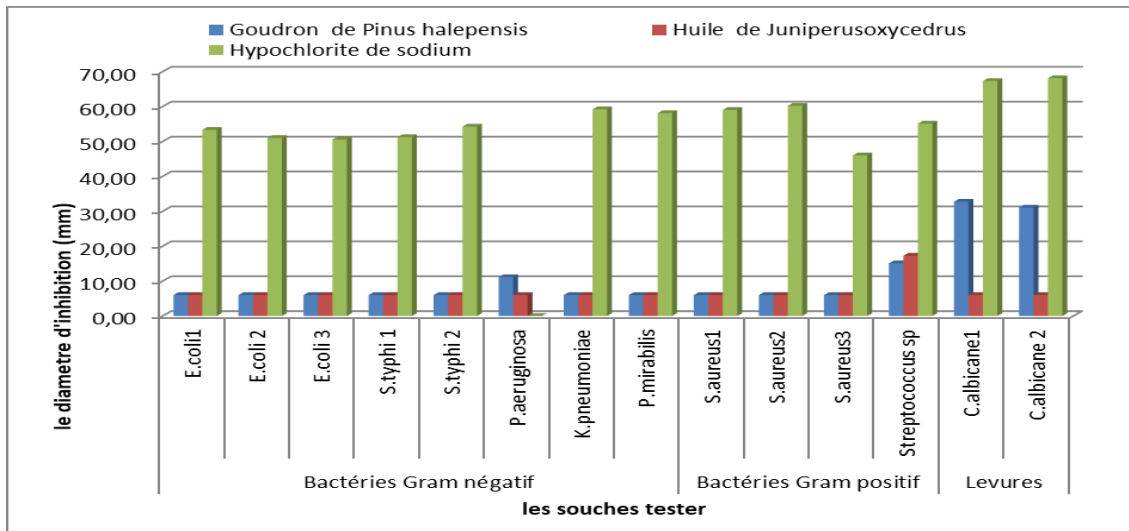


Figure 41. Activité antibactérienne des huiles et d’hypochlorite de sodium, par méthode de micro-atmosphère

De même, avec l’huile de cade, les diamètres d’inhibition les plus importants ($34,24 \pm 0,36$ mm, et $34,27 \pm 0,76$ mm), par la méthode de disque et la méthode des puits respectivement, relevé en présence de la souche de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Les diamètres les moins importants soient, $12,23 \pm 0,57$ mm avec la souche de *E. coli* 2, par méthode des disques et $13,00 \pm 0,50$ mm, avec *Salmonella typhi* 4404540 par la méthode des puits, ont été enregistrés dans cette étude. Il apparait que la méthode de micro-atmosphère n’est pas efficace en comparaison avec les deux méthodes citées précédemment excepté pour la souche de *Streptococcus sp* ($17,30 \pm 0,05$ mm).

Ces huiles étudiées semblent donc sensibles à extrêmement sensibles contre les souches bactériennes et les levures ciblées, puisque les diamètres d’inhibition de certaines souches sont supérieurs à 20 mm (Ponce et al., 2003 ; Moreira et al., 2005).

Les huiles étudiées semblent très actives contre les souches à GRAM positif (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus Sp*) et modérément actives contre les souches à GRAM négatif (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, et *Pseudomonas aeruginosa*).

En effet, les souches de *Escherichia coli*, *Salmonella. Typhi*, et *Pseudomonas aeruginosa* se révèlent être les plus résistantes, cela est lié à leur grande capacité à développer des résistances à de nombreux agents antimicrobiens, d’où leur fréquente implication dans les infections hospitalières (Mann.et al., 2000). Les résultats obtenus semblent en désaccord avec ceux obtenus par de nombreux auteurs qui rapportent la faible sensibilité des souches de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis des huiles essentielles (Biondi et al., 1993 ; Millezi et al., 2012 ; Yilmaz, 2013).

L'eau de javel a un effet antibactérien très connue (témoin positif), plus efficace comparé à l'huile de cade et de pin, quel que soit la méthode testée. Le pouvoir inhibitrice de l'huile de pin variée entre 37,40% et 100% (méthode de disque), et entre 35,71% et 71,55% (méthode de puit), par rapport l'hypochlorite de sodium. Mais l'effet inhibiteur de l'huile de cade varie entre 42,23% et 100% (MD), et entre 31,28% et 79,88% (MP) comparé à l'eau de javel étudiés.

Les résultats des tests d'antagonisme vis-à-vis des souches microbiennes (bactéries et levures) indicatrices, sont illustrés dans tableau 21. Ce pouvoir bioactif révélé est vraisemblablement dû à la composition chimique, particulièrement aux teneurs élevées en phénols et en polyphénols terpéniques (pour l'huile de pin 25,64% : Ferruginol, gaïacol, p-Ethylguaïacol, et le crésol, ...). Ces derniers peuvent en effet, déstabiliser la membrane cytoplasmique, interférant ainsi avec le métabolisme énergétique et l'intégrité cellulaire (**Ghedira et Goetz, 2012**) en augmentant la perméabilité membranaire. La membrane perd sa structure et devient plus perméable aux ions. La lésion de la membrane cellulaire peut également permettre la dissipation du gradient pH et la diminution du potentiel membranaire (Lambert., et al, 2001), induisant le collapsus du potentiel membranaire et inhibant l'activité respiratoire conduisant ainsi à une perte de la viabilité cellulaire (**Bouhdid et al., 2012**).

D'une façon générale, l'activité antimicrobienne des huiles essentielles selon leurs constituants majoritaire a été classée par plusieurs auteurs dans l'ordre décroissant suivant : phénols > alcools > aldéhydes > cétones > oxydes > hydrocarbures > esters (**Boukhebt et al., 2011 ; Gabriel et al., 2013**).

Il est certain que l'efficacité d'un extrait ne peut être due à un constituant actif majoritaire mais plutôt à l'action combinée des différents composés (Essawi et Srour, 2000). Les terpènes ont également montré des propriétés antimicrobiennes qui semblent avoir une activité antibactérienne forte à modérée, contre les GRAM positifs et les champignons pathogènes. Toutefois, une faible activité a été observée contre les GRAM négatifs (**Toshiko. H et al., 2003**). Ces renseignements semblent conforter les résultats auxquels nous sommes parvenus dans cette étude.

IV.2.2.1. Concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI (Fig. 42) de l'huile de cade est variable de 1,95 µl/ml, pour la souche de *Streptococcus sp*, à 62,5 µl/ml, pour les souches (*E.coli* 2, *E.coli* 3, *S.typhie* 2, et *K.pneumoniae*). En ce qui concerne l'huile de pin, la CMI varie entre 1,95 µl/ml pour la souche *Streptococcus sp* et 62,5 µl/ml pour *Candida albicans* d'origine hospitalière. Comparativement à l'hypochlorite de sodium qui affiche une CMI entre 1,95 µl/ml pour les

deux souches référencées de *Staphylococcus aureus* et 31,25 µl/ml pour les souches *E.coli 2*, *S.typhi 1*, *K. pneumoniae*, et *P.mirabilis*, c'est-à-dire que le pouvoir inhibitrice des huiles sont presque la même contre la *Streptococcus sp*, (Tab. 24).

D'après les valeurs de la CMI, l'huile de pin semble avoir des effets plus faibles que l'huile de cade. Ces effets sont toutefois plus faibles, ce qui est normal (usage interne), que ceux exercés par l'hypochlorite de sodium, puissant antiseptique à usage externe, utilisé dans cette étude comme témoin positif.

L'huile de pin exercerait également des actions, antiseptique et cicatrisante de différentes plaies et blessures (Gérard et Vaillant, 1995), selon Gall et Litoux (1989), Gérard et Vaillant (1995), Chuyen, (1985) et Benzeid et al., (2018), l'action antiseptique serait essentiellement due à la présence de phénols tels que le crésol et le gâiacol.

D'après Yoshiyuki et al., (2016), le δ-cadinène a été identifié comme le premier composé le plus abondant (25,94%) de l'huile essentielle obtenue à partir de goudron des copeaux de bois de cèdre japonais (*Cryptomeria japonica*). Ce produit a permis également désactiver in vitro de l'ADN polymérase, dans un extrait de cellules bactériennes d'*Escherichia coli* avec une zone d'inhibition de $10,2 \pm 0,7$ mm.

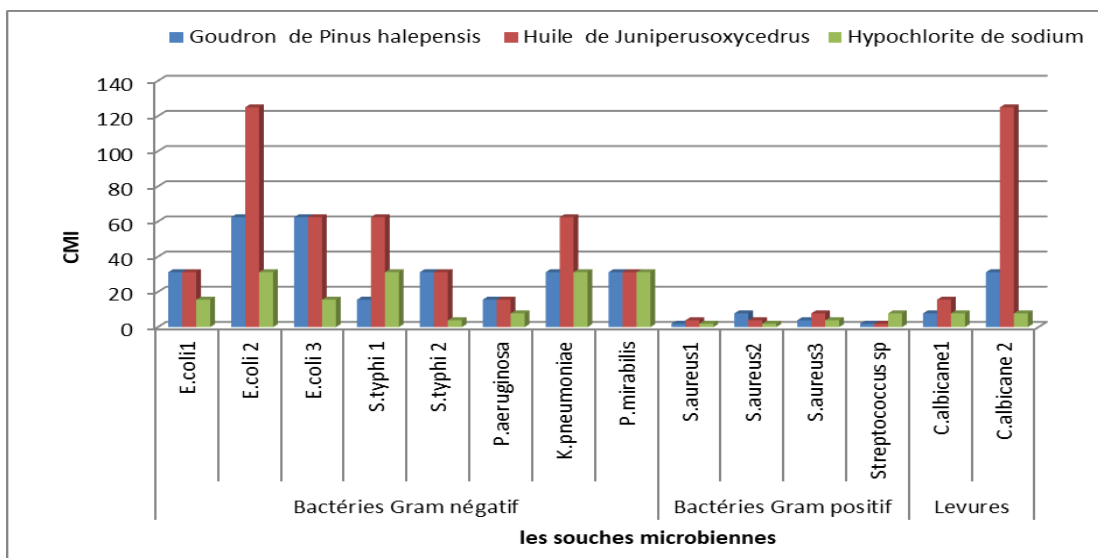


Figure 42. Concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles étudiées en comparaison avec l'hypochlorite de sodium

Tableau 24. Concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles étudiées et de l'hypochlorite de sodium

Les souches microbiennes	Concentration minimale inhibitrice (CMI)								
	Huile de <i>Pinus halepensis</i> Mill			Huile de <i>Juniperus oxycedrus</i>			Hypochlorite de sodium		
Espèces	Pourcentage (%)	Concentration (µl/ml)	Effet	Pourcentage (%)	Concentration (µl/ml)	Effet	Pourcentage (%)	Concentration (µl/ml)	Effet
Bactéries à Gram négatif									
<i>E. coli</i> 1 ATCC 25922	3,12	31,25	+	3,12	31,25	+	1,56	15,62	-
<i>E. coli</i> 2	6,25	62,50	+	12,5	125	+	3,12	31,25	-
<i>E. coli</i> 3	6,25	62,50	+	6,25	62,50	+	1,56	15,62	-
<i>S. typhi</i> 1 ATCC 25922	1,56	15,62	+	6,25	62,50	+	3,12	31,25	-
<i>S. typhi</i> 2 4404540	3,12	31,25	+	3,12	31,25	+	0,40	3,90	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1,56	15,62	+	1,56	15,62	+	0,78	7,81	-
<i>K. pneumoniae</i>	3,12	31,25	+	6,25	62,50	+	3,12	31,25	-
<i>P. mirabilis</i>	3,12	31,25	+	3,12	31,25	+	3,12	31,25	-
Bactéries à Gram positif									
<i>S. aureus</i> 1 ATCC 25923	0,20	1,95	+	0,40	3,90	+	0,20	1,95	-
<i>S. aureus</i> 2 ATCC 43300	0,78	7,81	+	0,40	3,90	+	0,20	1,95	-
<i>S. aureus</i> 3	0,40	3,90	+	0,78	7,81	+	0,40	3,90	-
<i>Streptococcus</i> sp	0,20	1,95	+	0,20	1,95	+	0,78	7,81	-
Levures									
<i>C.albicans</i> 17002	0,78	7,81	non détecté	1,56	15,62	non détecté	0,78	7,81	non détecté
<i>C.albicans</i> 2	3,12	31,25	non détecté	12,50	125	non détecté	0,78	7,81	non détecté

(+) : existe des germes (bactériostatique), (-) : absence des germes (bactéricide)

Dans ce contexte, certains auteurs rapportent que l'huile de cade (ou huile de génévrier) posséderait également, un pouvoir parasiticide. De par ses composés phénoliques, elle posséderait aussi une action fongistatique. Active également contre les trichophytons, *Candida albicans*, *Cryptococcus sp* et *Aspergillus sp*, sa CMI serait inférieure à 1 mg/ml. Ce mélange d'huiles essentielles entrant dans la composition de l'huile de cade, a révélé une activité importante contre une souche de *Candida albicans* 7002 avec un important diamètre d'inhibition de 32,74 mm, et une CMI de l'ordre de 7,81 µl /ml (**Lucas, 2000 ; Charles, 2013**). De telles activités antimicrobiennes, justifient l'utilisation de ce produit par les tradipraticiens.

Comparativement aux résultats relatifs aux CMB et aux CMI, enregistrés avec l'hypochlorite de sodium, agent bactéricide établi comme témoin positif, ceux obtenus avec les CMI du l'huile de pin et de l'huile de cade ont montré des effets bactériostatiques de ces derniers. Ces constatations expérimentales sont de nature à suggérer que l'huile de cade et de pin seraient des désinfectants à action temporaire bactériostatique.

Rappelons que les désinfectants bactériostatiques inhibent la croissance et la reproduction des bactéries, mais ne les tuent pas, alors que les désinfectants bactéricides tuent les bactéries. Les agents bactériostatiques doivent collaborer avec le système immunitaire pour évincer les micro-organismes du corps. De hautes concentrations de la plupart des agents bactériostatiques sont également bactéricides, alors que les basses concentrations d'agents bactéricides ne sont pas bactériostatiques. (**Van Bambeke et Tulkens, 2008 ; Berthet et Amar-Costesec, 2006**).

Globalement, d'après les résultats des analyses des CMI, l'effet inhibiteur des produits testés pourrait être classer dans l'ordre suivant :

Hypochlorite de sodium > Pinus halepensis > Juniperus oxycedrus.

IV.2.2. Activité antifongique

L'une des caractéristiques de certains essences végétales est leur capacité à ralentir et/ou à inhiber l'activité et la croissance des champignons. Dans cette optique, nous avons réalisé la méthode de contact directe pour évaluer cette activité.

Elle consiste à additionner aseptiquement un volume donné de l'extrait naturel en complétant le volume de milieu de culture en état de fusion pour observer l'activité antifongique du l'huile de pin et de cade. L'hypochlorite de sodium est utilisé comme témoin.

Les moyennes de croissance mycélienne radiale journalière des 07 isolats de souches testées,

incubés à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ sur milieu PDA sont indiquées dans les figures 43, 44, 45.

L'activité antifongique est témoignée par l'absence ou la présence de la croissance mycélienne. L'effet des extraits sur la croissance mycélienne a été enregistré à la concentration qui correspond à l'absence d'extrait (témoin), avec un diamètre de croissance égale à 2,6 cm, 5,2 cm, 8,4 cm, 8,4 cm, 8,4 cm, 2,6 cm, et 5,3 cm, respectivement pour *Penicillium griseofulvum*, *Aspergillus ochraceus*, *Alternaria infectoria*, *Trichoderma harzianum*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus flavus* 88.3183 et *Trichophyton Sp.*

Les diamètres enregistrés avec l'huile de pin (*P. halepensis*) montrent que la croissance mycélienne est importante par rapport au témoin (Fig. 43). Nous observons aussi l'effet des différentes doses de l'huile sur les souches fongiques à savoir 0,05%, et 0,10% qui indiquent la décroissance mycélienne pour toutes les souches, néanmoins une croissance mycélienne a été observée juste pour les souches de *Aspergillus flavus* : 88.3183, et *Trichophyton Sp* (0,25% et 0,5%). Mais aucune croissance mycélienne n'a été observée pour les souches d'origine végétale (des graines de blé). Il faut signaler qu'à une concentration de 1%, aucune croissance mycélienne n'est rapportée pour toutes les souches.

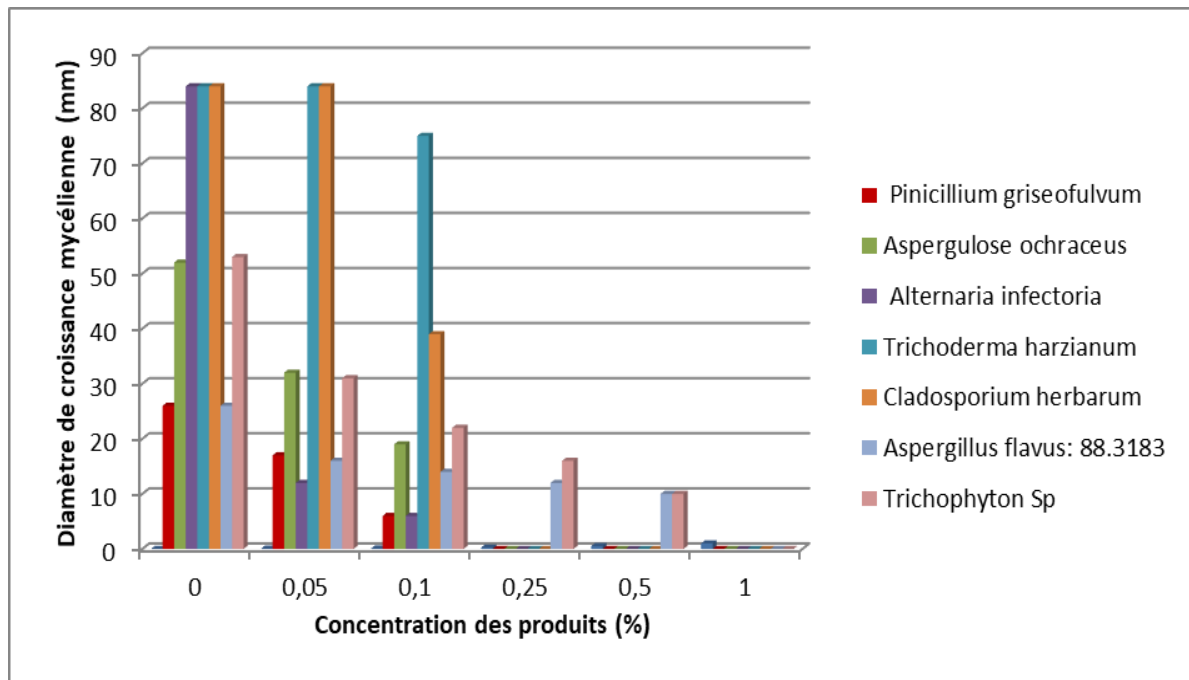


Figure 43. Effet du l'huile de pin sur le développement des souches fongiques

D'après la figure 44 qui représente l'activité antifongique des souches en fonction de la concentration d'huile de cade (*J. oxycedrus*), on remarque une diminution de la croissance mycélienne des champignons avec l'augmentation de la concentration.

Pour une concentration de 0,5 %, et 1%, aucune croissance n'est observée pour toutes les souches testées.

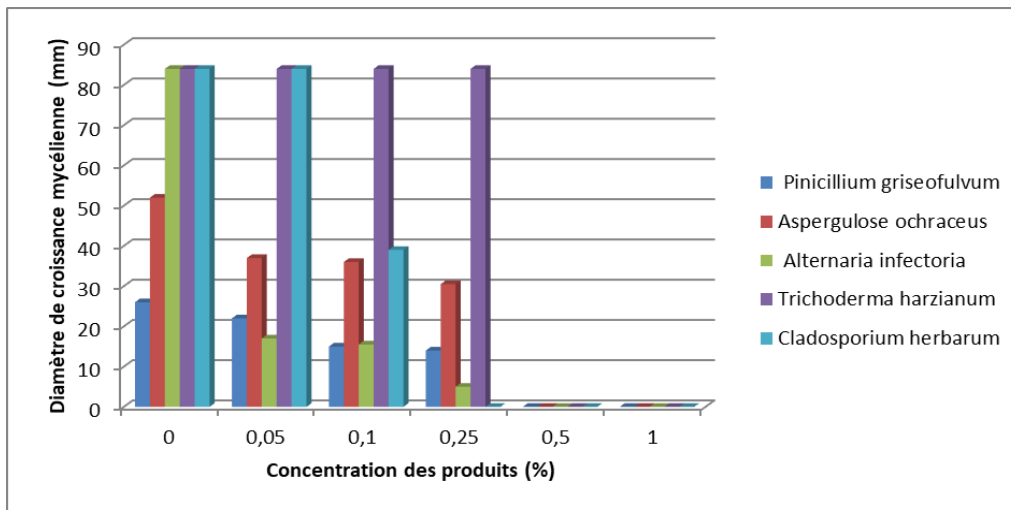


Figure 44. Effet d’huile de cade sur le développement des souches fongiques

Parallèlement, nous constatons que la croissance mycélienne en présence de l’hypochlorite de sodium (Fig. 45) est faible. Elle est d’autant plus réduite que la concentration de l’hypochlorite de sodium (par rapport au témoin (0%)) est élevée. Cette constatation est valable pour les souches de *Penicillium griseofulvum* et d’*Alternaria infectoria*. Toutefois, quelle que soit la concentration étudiée, les souches fongiques ne sont pas totalement détruites par l’eau de javel. Par contre *Trichoderma harzianum*, *Cladosporium herbarum* gardent le même diamètre (8.4cm), l’hypochlorite de sodium n’a donc aucun effet sur la croissance mycélienne de ces souches fongiques. Toutefois un résultat inattendu est obtenu avec la souche d’*Aspergillus ochraceus* : l’hypochlorite de sodium semble avoir un effet activateur de sa croissance mycélienne.

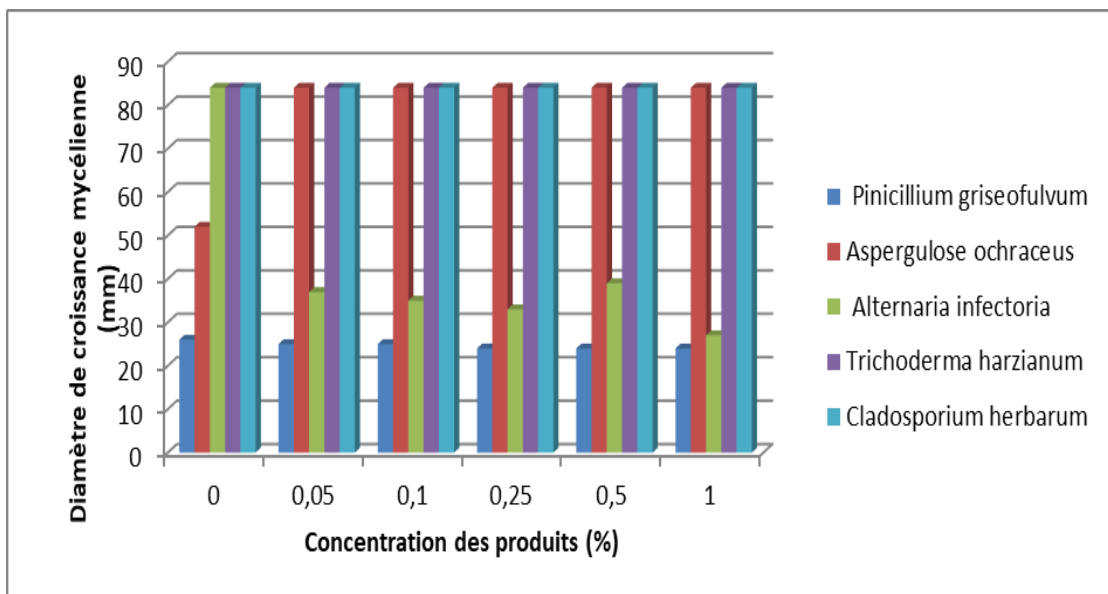
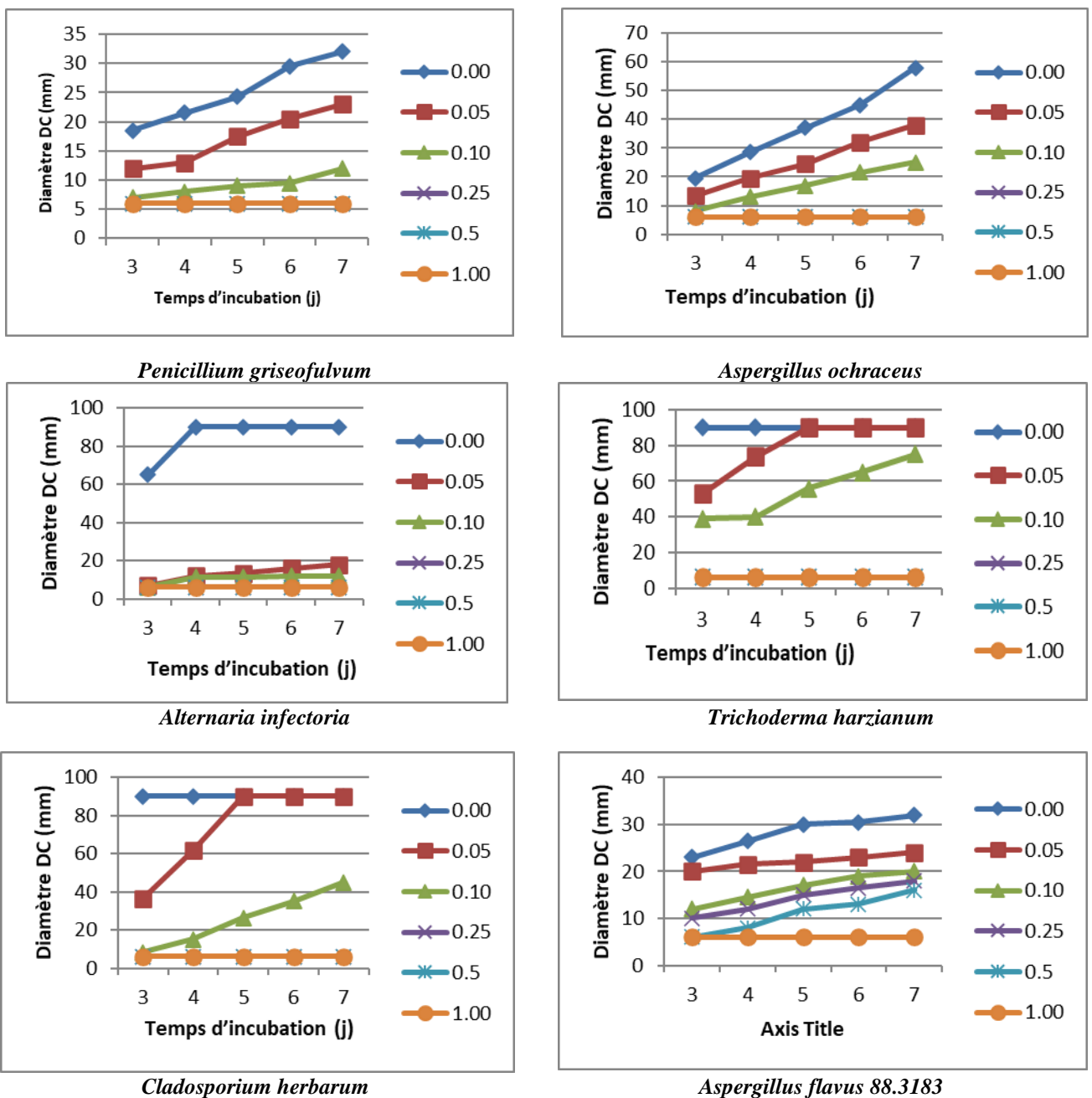
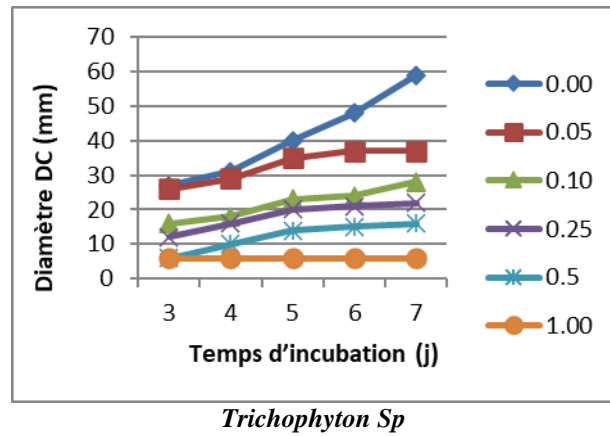


Figure 45. Effet de l’hypochlorite de sodium sur le développement des souches fongiques

IV.2.2.1. Cinétique de croissance mycélienne

La figure 46 résume les résultats de la croissance mycélienne (mm) des souches fongiques en fonction de la durée d'incubation et de la concentration d'huile de pin. Les courbes représentant la cinétique de croissance mycélienne en fonction de temps et de la concentration d'huile de pin, indiquent qu'il y a une augmentation de la croissance mycélienne avec le temps d'incubation à l'exception la concentration de 0,25%, 0,5%, et 1% qui ne montrent aucune croissance mycélienne pour toutes les souches, excepté les souches d'*Aspergillus flavus* : 88.3183 et celles d'origine hospitalière. En revanche, une diminution de la croissance mycélienne avec l'augmentation de la concentration en huile de pin est observée.

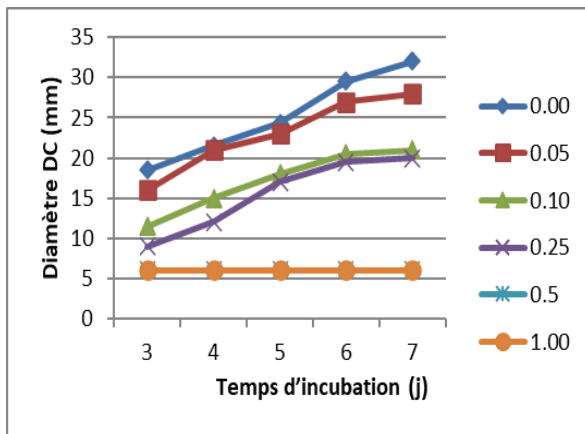




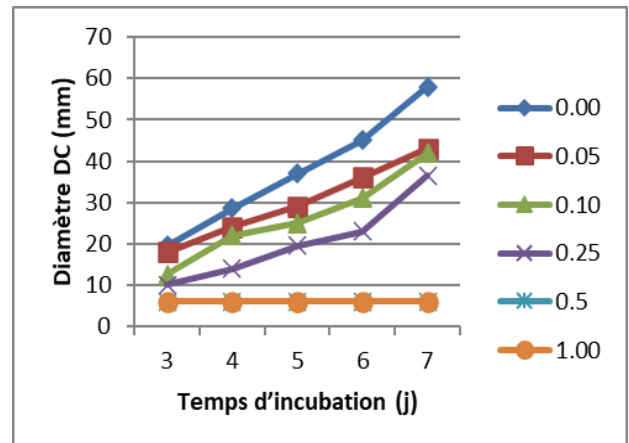
DC : croissance mycélienne

Figure 46. Cinétique de croissance mycélienne en fonction du temps et de la concentration de l'huile de pin

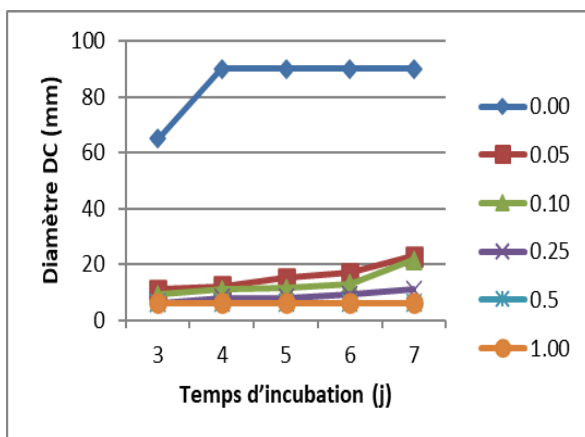
Une diminution de la croissance mycélienne avec l'augmentation de la concentration en produit test, est observée avec l'huile de cade. Les champignons d'origine végétale (des graines de blé) se révèlent les plus sensibles où aucune croissance n'a été enregistrée avec une concentration de 0,5% (Fig. 47).



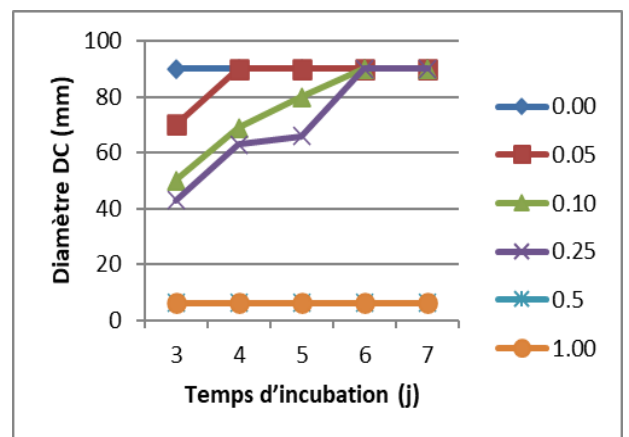
Penicillium griseofulvum



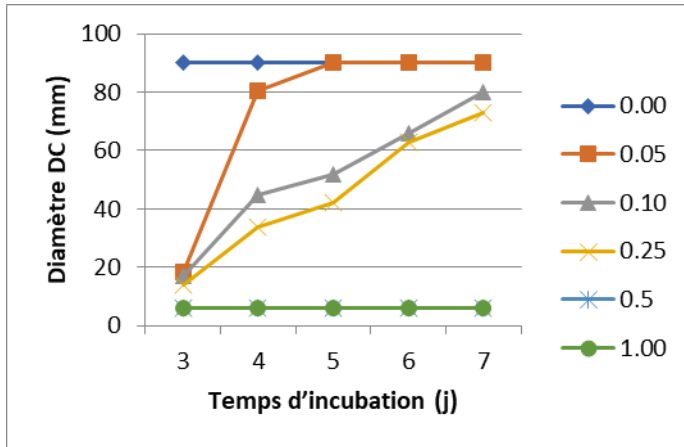
Aspergillus ochraceus



Alternaria infectoria



Trichoderma harzianum

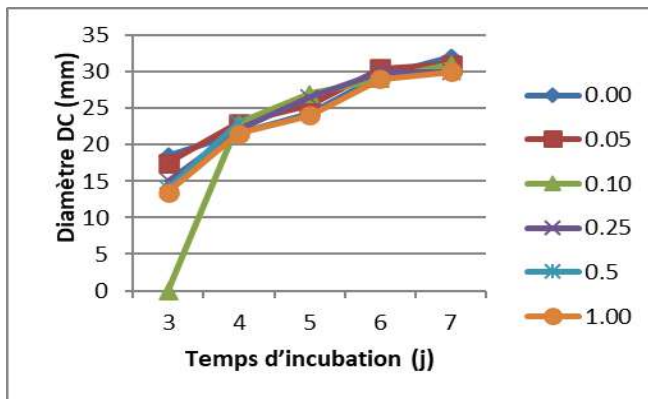


DC : croissance mycélienne

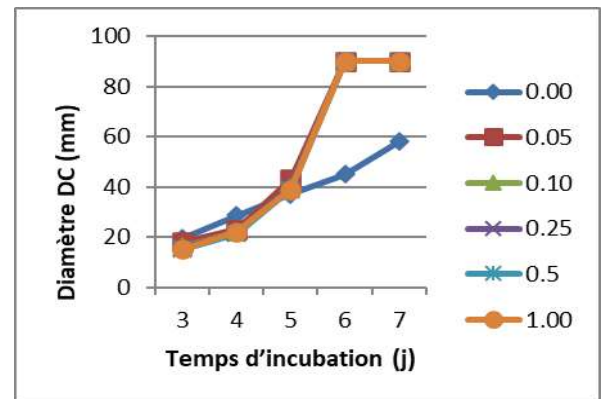
Cladosporium herbarum

Figure 47. Cinétique de croissance mycélienne en fonction du temps et de la concentration de l'huile de cade

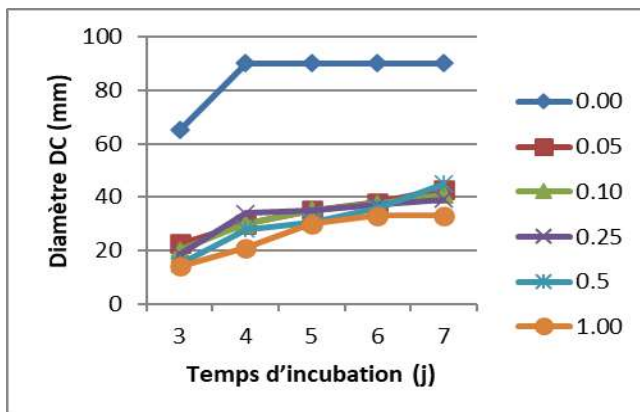
Avec les différentes concentrations des extraits, nous remarquons que la croissance mycélienne des souches est variable avec l'hypochlorite de sodium, qui joue un rôle désinfectant mais perd de son pouvoir vis-à-vis de *Penicillium griseofulvum* et *Alternaria infectoria*, la preuve en est que la courbe reste constante (Fig. 48).



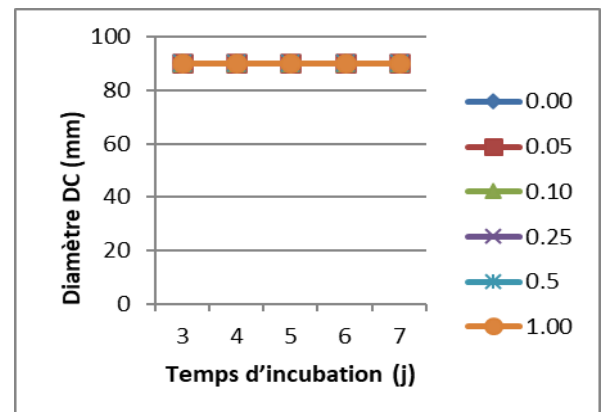
Penicillium griseofulvum



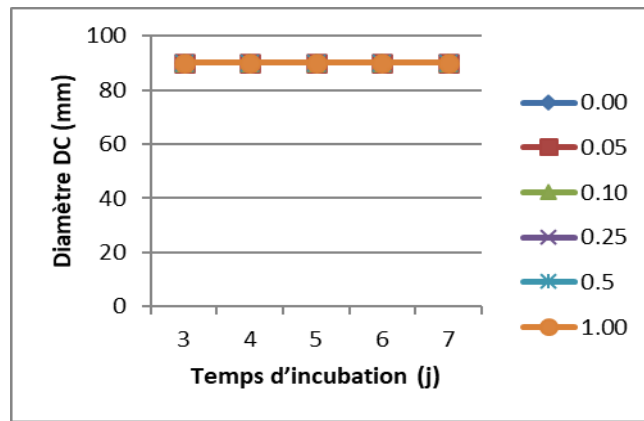
Aspergillus ochraceus



Alternaria infectoria



Trichoderma harzianum



Cladosporium herbarum

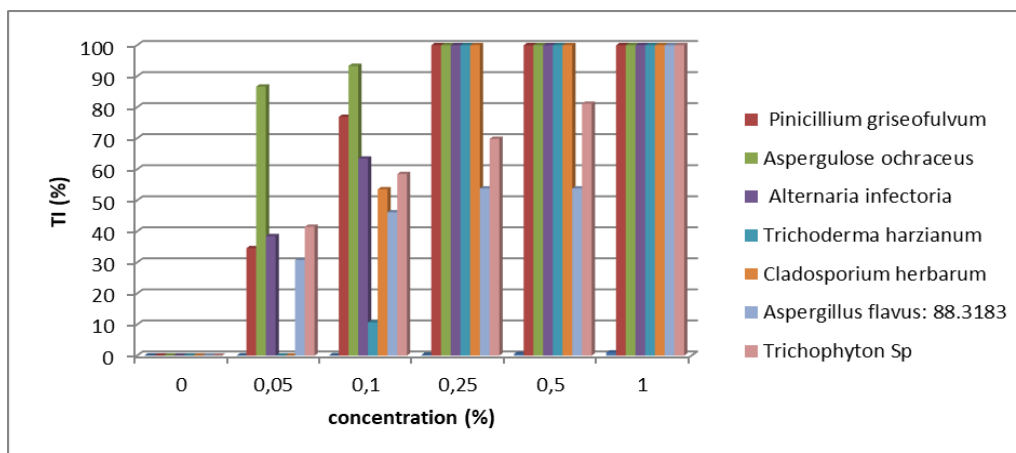
DC : croissance mycélienne

Figure 48. Cinétique de croissance mycélienne en fonction du temps et de la concentration de l'hypochlorite de sodium

IV.2.2.2. Indice antifongique (TI)

Les taux d'inhibition des produits étudiés sont illustrés dans les figures 64, 65, et 66. Nous remarquons que toutes les concentrations des huiles appliquées, ont réduit partiellement la croissance des souches fongiques testées. Les résultats démontrent que le taux d'inhibition a augmenté avec l'augmentation de la concentration des huiles extraites, et que la concentration minimale inhibitrice est inversement proportionnelle avec l'efficacité antifongique manifestée par l'huile de chaque plante étudiée.

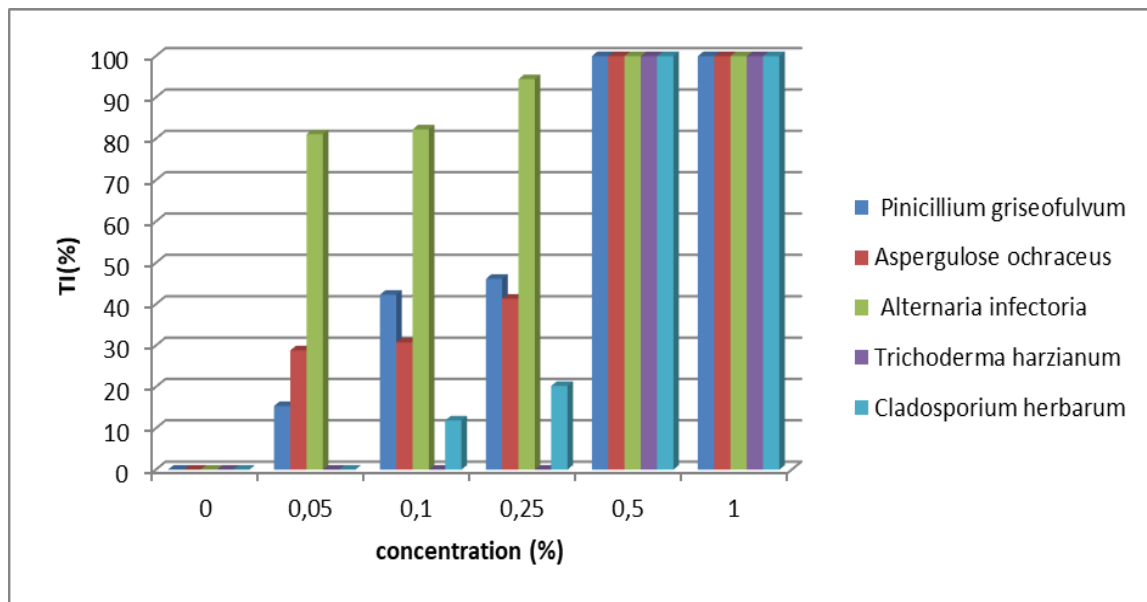
En effet, pour l'huile de pin, la CMI est de 0,25% pour les des champignons phytopathogènes de *Penicillium griseofulvum*, *Alternaria infectoria*, *Trichoderma harzianum*, et *Cladosporium herbarum*, avec un effet fongicide (C), et un effet fongistatique (S) avec *Aspergillus ochraceus* qui s'avère fongicide à une concentration de 0.5%. Pour le *Aspergillus flavus*: 88.3183 et *Trichophyton Sp*, la CMI est de l'ordre de 1.00% avec un effet fongicide (Fig. 49).



TI : Taux d'inhibition. C : Effet fongicide. S : Effet fongistatique

Figure 49. Taux d'inhibition des souches en fonction de la concentration d'huile de pin

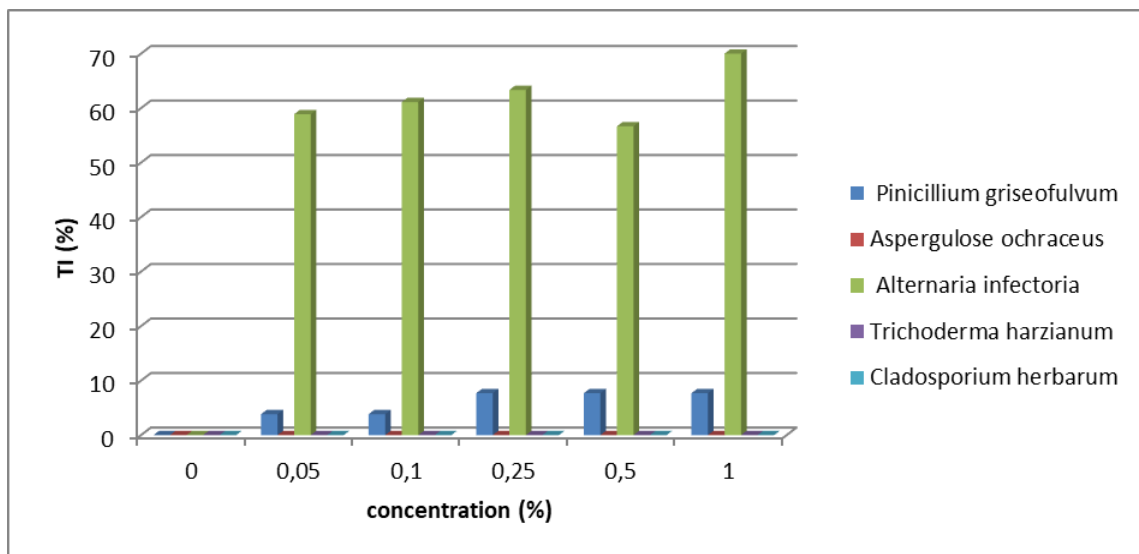
Quant à la CMI de l'huile de cade, elle est de 0,5% pour toutes les souches végétales testées avec un effet fongicide (Fig. 50). D'après les résultats de taux d'inhibition, on peut déduire que l'effet des essences végétales à 0,5% est létale sur tous les champignons testés.



TI : Taux d'inhibition. C : Effet fongicide. S : Effet fongistatique

Figure 50. Taux d'inhibition des souches en fonction de la concentration de l'huile de cade

Par contre, le désinfectant à large usage (eau de javel) semble perdre tout pouvoir vis-à-vis des souches fongiques testées (Fig. 51), n'ayant manifesté aucun taux d'inhibition, ni concentration minimale inhibitrice, ni encore un effet fongistatique ou fongicide relevés, contre les souches test dans la gamme des concentrations étudiées.



TI : Taux d'inhibition. C : Effet fongicide. S : Effet fongistatique

Figure 51. Taux d'inhibition des souches en fonction de la concentration de l'hypochlorite de sodium

IV.2.2.3. La vitesse de la croissance mycélienne

La vitesse de la croissance mycélienne des sept souches fongiques en fonction de la concentration des huiles est présentée dans les figures 52 et 53.

La vitesse de croissance mycélienne la plus significative 1.142 mm/h s'observe en l'absence totale de l'huile de pin (0%). Cette croissance prend allure décroissante jusqu'à l'inhibition totale (0 cm/h) à une concentration de 0,25% de l'huile de pin, pour *Penicillium griseofulvum*, *Aspergillus ochraceus*, *Alternaria infectoria*, *Trichoderma harzianum*, et *Cladosporium herbarum* au seuil de 1% pour les autres souches (*Aspergillus flavus*: 88.3183 et *Trichophyton Sp*) (Fig. 52).

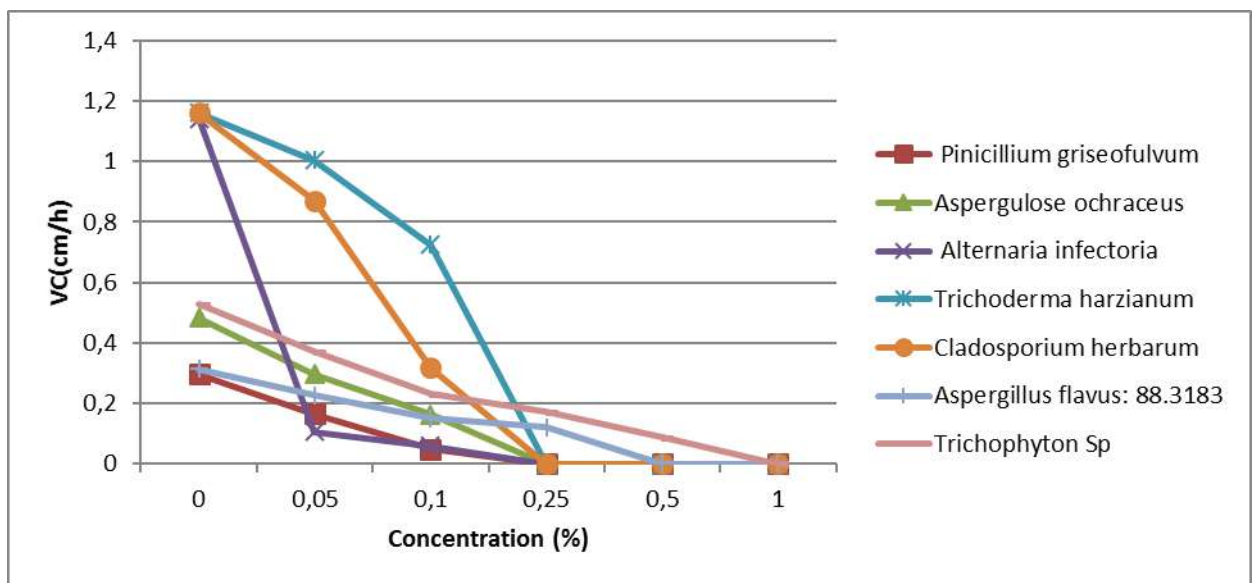


Figure 52. Vitesse de croissance mycélienne en fonction de l'augmentation de la concentration de l'huile de pin

Selon les résultats repris par la figure 53, on observe une diminution de la vitesse de la croissance mycélienne suite à l'augmentation de la concentration d'huile de cade. La vitesse de croissance des souches a diminué jusqu'à l'inhibition totale (0 cm/h) à une concentration de 0,5% de l'huile de cade, pour l'ensemble des champignons phytopathogènes testés.

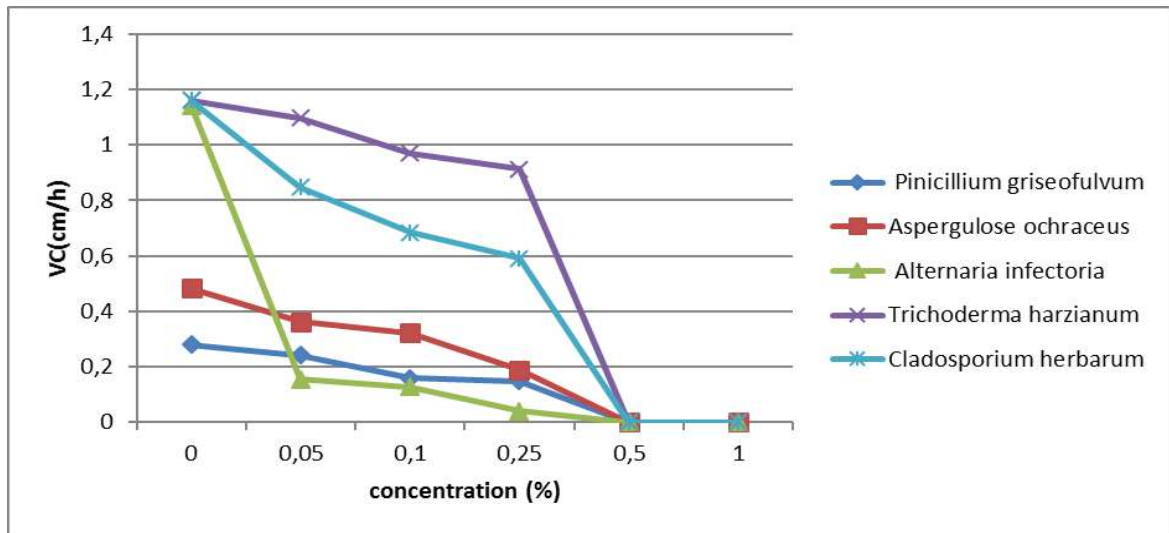


Figure 53. Vitesse de la croissance mycélienne sous l'effet de l'augmentation de la concentration de l'huile de cade

La vitesse de la croissance mycélienne des deux souches fongiques *Penicillium griseofulvum* et *Alternaria infectoria* diminue en fonction de la concentration de l'hypochlorite de sodium. Elle reste constante avec les *Trichoderma harzianum* et *Cladosporium herbarum* (Fig. 54).

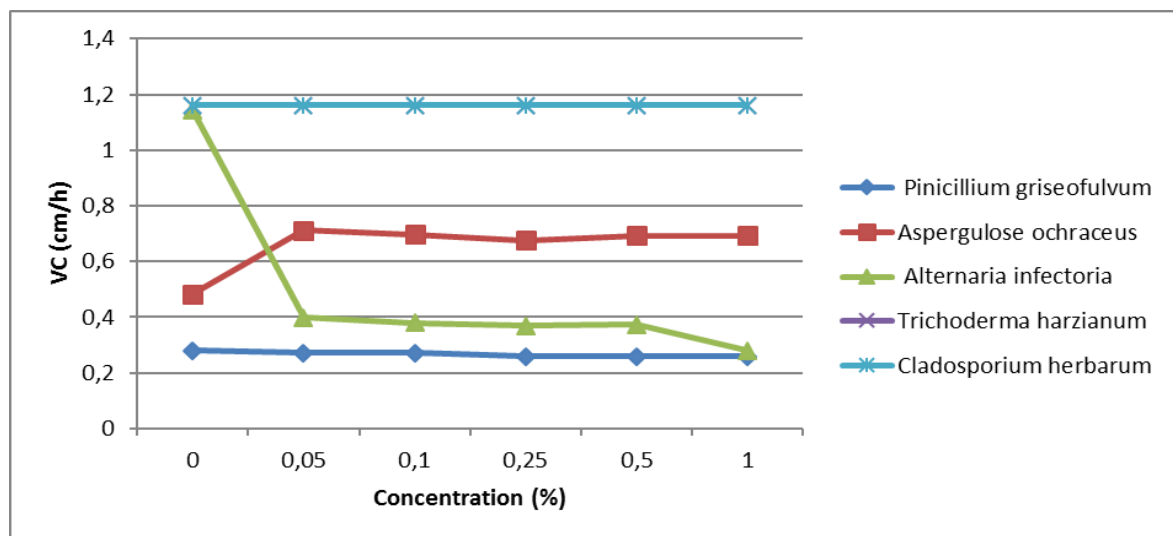


Figure 54. Vitesse de la croissance mycélienne sous l'effet de l'augmentation de la concentration de l'hypochlorite de sodium

La technique de contact direct consiste à mettre en contact de l'huile et les micro-organismes, puis à observer la croissance mycélienne de ces derniers. L'huile de pin et de cade ont exercé une importante activité inhibitrice vis-à-vis des souches testées. Les diamètres, la vitesse et l'indice antifongique de la croissance de mycélium diminuent toutes les fois avec l'augmentation de la concentration de chaque huile jusqu'au seuil de la non

germination (CMI déterminée), Cette constatation a été rapportée par Mehani et *al* (2014). En effet, la lutte biologique par l'utilisation des alternatives naturelles a connu un regain d'intérêt ces derniers temps. Plusieurs chercheurs admettent la possibilité de l'utilisation des extraits de plantes comme une alternative naturelle efficace.

Selon **Prasad et al., (2004), Chami (2005)**, la difficulté de développer une molécule antifongique, est liée à l'ultrastructure de la cellule fongique qui présente trois barrières : la paroi cellulaire, chitineuse, les ergostérols membranaires et le noyau eucaryote d'une part ; et d'autre part, les molécules antifongiques elles-mêmes qui peuvent engendrer des résistances.

En **2019, Benlarbi**, a étudié l'effet inhibiteur de trois essences végétales (*Acaccia raddiana*, *Juniperus oxycedrus*, *Juniperus phoenicea*) sur cinq souches de *Fusarium oxysporum f sp albedinis*, les résultats ont montrés un grand pouvoir fongique contre ces souches par les espèces genévrier, en soulignant que l'activité antifongique est due principalement aux substances renfermées dans les extraits de ces huiles de la plante.

Selon **Benlarbi et ces collaborateurs (2019)**, les acides résiniques oxydés (7-céto, 7-hydroxy acide dehydroabiétique, 13-hydroxy podocarpa-8, 11,13-trien-18-oïc acide), sont classés parmi les composés ayant une action fongistatique. Le dehydroabiétique est une molécule présentant un grand intérêt pour le développement d'une stratégie de lutte contre la fusariose du palmier dattier en raison de sa transformation en d'autres molécules souvent douées de pouvoir antimicrobien. Le dehydroabiétique peut aussi conduire à développer le SAR (système de résistances aux maladies acquises) chez certaines plantes vis-à-vis des agents phytopathogènes (**Adam, 2009**). L'acide dehydroabiétique isolés du résidu non volatil d'huile essentielle d'orange présenterait une activité antifongique contre les espèces phytopathogènes et les contaminants alimentaires ont montré une activité fongicide importante contre *Geotrichum candidum*, qui n'est pas inhibée par le fongicide commercial à large spectre Benomyl (méthyl-1- [butylcarbamoyle]-2-benzimidazolecarbamate) (**Van der Doelen.,1999**). Par ailleurs, les terpènes ont également montré des propriétés antimicrobiennes, exerçant une activité antibactérienne contre les GRAM positif et les champignons pathogènes. (**Toshiko H et al., 2003**).

Dans ce contexte, certains auteurs rapportent que l'huile de cade posséderait également, un pouvoir parasiticide, et antifongique. De plus, de par ses composés phénoliques, elle posséderait aussi une action fongistatique. Active également contre les trichophytons (**Charles et Denys, 2013**).

Les résultats de l'étude menée par **Terfaya et al (2017)**, sur deux types d'huiles

génévrier de *Juniperus phoenicea* L, les résultats ont montré un grand pouvoir fongicide contre dix souches de *Fusarium oxysporum* .

Le pouvoir antifongique des huiles étudiées, pourrait être attribué à la présence des composants qui possèdent une activité antifongique, provoquant des dommages membranaires sévères et une perte d'homéostasie qui entraîne l'inhibition totale ou la mort cellulaire. Le pouvoir antifongique des constituants majoritaires des huiles représenté par le cedrane et cadinène (13,78% et 2,69% respectivement dans l'huile de cade) a été effectivement validé par de nombreux chercheurs (**Dorman et Deans, 2000 ; Morcia, 2012**).

Par ailleurs, l'activité antifongique des deux huiles peut être expliquée par l'effet synergique entre les différents composés de l'huile, composés majoritaires comme dehydroabiétique, souvent responsables de l'activité antifongique ; toutefois, les composés mineurs (comme le cadinène et le cadinol), peuvent contribuer significativement à cette activité.

Globalement, l'activité antifongique des extraits étudiés se classe donc dans l'ordre suivant :

***Pinus halepensis* > *Juniperus oxycedrus* > Hypochlorite de sodium**

V. Conclusion

Il est bien démontré que les huiles « Gatrane », possèdent des activités biologiques diversifiées (antimicrobienne, antiparasitaire, insecticide, antidiabétique, anti- inflammatoire, etc.). Les résultats de l'activité antibactérienne, antifongique, et antioxydante des huiles de *J. oxycedrus* et *P. halepensis* de l'atlas saharien viennent une fois de plus consolider l'utilisation empirique de ces plantes dans la médecine traditionnelle. En effet, ces huiles ont révélé un profil fort intéressant, pour être exploités dans de nombreux domaines (pharmaceutique, cosmétique, alimentaire, etc.)

Afin d'identifier le support moléculaire responsable des activités biologiques (antifongiques, antibactériennes et antioxydante) des huiles étudiées, l'analyse chromatographique CG/MS de l'extrait a révélé la présence des composants phénoliques dont les activités biologiques sont très étudiées dans la littérature tel que le guaiacol et le creosol, mais aussi les terpènes. De plus, l'analyse a dévoilé la présence de l'acide dehydroabiétique, qui a donné d'excellents résultats en lutte biologique contre les souches testées.

Chapitre VII

Contribution à l'étude de la désinfection de l'eau par les huiles étudiées

Chapitre VII

Contribution à l'étude de la désinfection de l'eau par les huiles étudiées

I. Introduction

Cette partie présente la stratégie qui a permis de mener à bien la présente étude. Rappelons que l'objectif général de cette recherche consiste à évaluer puis caractériser l'effet désinfectant d'extraits (huile de cade et de pin), appliqués à la désinfection de l'eau. Ce travail se doit aussi de répondre aux quatre objectifs spécifiques suivants :

- Rechercher le meilleur milieu présentant un effet désinfectant ;
- Mettre en évidence la concentration efficace pour la désinfection ;
- Déterminer l'effet des deux huiles utilisées pour la désinfection et comparer leurs effets avec celui de l'hypochlorite de sodium, sans et avec la lumière ;
- Fixer les deux huiles sur un support solide tel qu'un filtre adsorbant.

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel d'étude (eau)

Pour tester l'efficacité ou pouvoir désinfectant des extraits des plantes, nous avons utilisé des eaux usées moins traitées (eau polluée) en provenance de la station d'épuration par lagunage aéré de la ville de Ouargla, située à Saïd Otba au Nord-Est de la ville d'Ouargla, de coordonnées géographiques : latitude de 31°59` 46,23" au Nord et une longitude de 5°21`55,77` au Est. (Fig. 55a). Elle est conçue pour palier un débit moyen de 37000 m³/j.

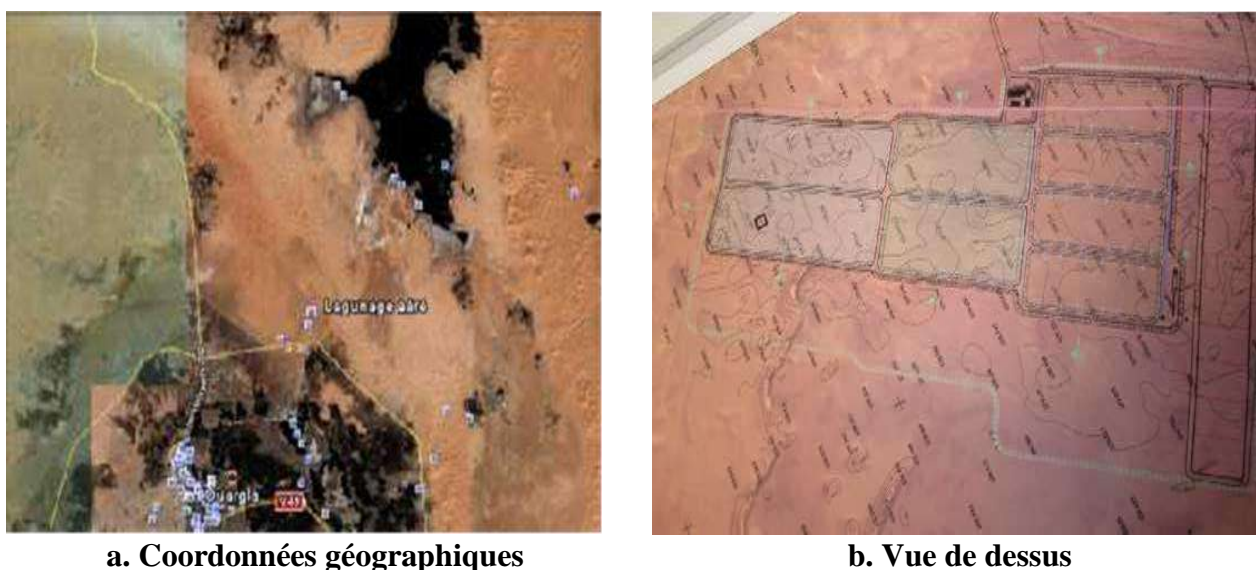


Figure 55. Situation géographique de la STEP d'Ouargla

Le lagunage est un procédé d'épuration biologique des eaux usées, qui consiste en un

long séjour de l'eau dans un ou plusieurs bassins (généralement trois : étage d'aération, étage de décantation et étage de finition), peu profonds où prolifèrent des bactéries, des algues microscopiques et d'autres organismes vivants de petite taille (protozoaires, rotifères et crustacés), en détruisant la matière organiques (**Ghetas, 2007**). Le fonctionnement repose sur la constitution d'une chaîne alimentaire complète, basée sur la symbiose entre de véritables êtres vivants. L'épuration par lagunage dépend des facteurs climatiques notamment la température (qui favorise l'action des bactéries et l'évaporation), du vent (qui favorise les échanges gazeux et le brassage de l'eau); la pluviométrie (qui détermine le niveau de l'eau), et l'ensoleillement (qui assure la photosynthèse) (**Degremont, 1989**).

Le lagunage est dit aéré, quand l'oxygénation est assurée par un aérateur de surface, contrairement au lagunage naturel où l'oxygène est fourni par la photosynthèse et le transfert à l'interface eau-atmosphère. Dans le cas du lagunage aéré l'oxygène est produit artificiellement (aérateurs mécaniques, insufflation d'air...). Il est recommandé lorsque la charge polluante devient trop importante. Le traitement se compose de deux types de lagunes : lagune d'aération et lagune de finition (Fig. 56).



Figure 56. Lagune d'aération. STEP de Ouargla

II.2. Méthodes

II.2.1. Techniques de prélèvement des eaux

Deux types de prélèvements des échantillons d'eau, ont été effectués. Une partie a été destinée aux analyses physico-chimiques et l'autre aux analyses bactériologiques.

Les échantillons d'eau nécessaires à l'analyse physico-chimique ont été prélevés selon la méthode décrite par **Rodier et al., (2009)**, dans des flacons en plastique (à usage unique) à l'aide d'une canne à prélèvement, exactement à la sortie de bassin de finition de la sortie de la station STEP. Les échantillons sont acheminés au laboratoire dans une glacière contenant un

bloc réfrigérant, puis conservés à 4°C. Pour les prélèvements destinés à l'analyse bactériologique, nous avons utilisé des flacons en verre de 250 ml, munis d'un cordon (plongeur). Au moment du prélèvement, on ouvre le flacon et on l'introduit dans la sortie de lagune de finition, en prenant soin de ne pas contaminer l'échantillon. Ensuite on retire le flacon rempli d'eau. On détache le cordon et le flacon est refermé dans les conditions aseptiques requises jusqu'au moment de l'analyse, et conservés dans un thermostat de 4 à 6°C (Une glacière munie d'un bloc réfrigérant), où la durée du transport ne dépasse pas une heure (**Rodier et al., 2009**). Avant l'usage, les flacons en verre doivent être soigneusement lavés, puis rincés à l'eau distillée puis stérilisés à 160°C pendant 2 heures (**Larpent, 1997**).

II.2.2. Méthodes d'analyses

Les analyses physico-chimiques ont concerné la mesure de la température (T), du pH, la conductivité électrique (CE), de l'oxygène dissous (DO), et du taux des sel dissous (TDS) ou salinité.

L'analyse bactériologique a pour but de déceler la présence des germes témoignant d'une pollution fécale dans les échantillons à analyser. Elle consiste en la recherche et en la numération des germes totaux (GT) à 22 °C et à 37 °C, des coliformes fécaux (CF), avec l'identification d'*Escherichia coli*, la recherche et le dénombrement des streptocoques fécaux (SF), la recherche et le dénombrement des *Clostridium* sulfito-réducteurs (CSR), de quelques bactéries pathogènes telles que *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), et *Salmonella typhi*, des levures et des moisissures.

II.2.2.1. Analyses physico-chimiques des eaux

La mesure de l'ensemble des paramètres physico-chimiques des échantillons d'eaux, ont été effectuée à l'aide d'un multi paramètre portatif de type HI 9829 (cf. fig. 03 de l'annexe2). Les étapes de mode opératoire sont :

- Allumer le multi paramètre, le laisser se stabiliser pendant quelques minutes, installer les électrodes aux entrées correspondantes sur l'appareil,
- Etalonner l'appareil à l'aide d'une solution tampon. Ensuite rincer l'électrode avec de l'eau distillée et avec l'échantillon à analyser,
- Plonger l'électrode dans l'échantillon d'eau à analyser pendant 5 minutes et lire les valeurs des paramètres directement,
- Après chaque détermination des paramètres, l'électrode est retirée, puis rincé et tremper dans l'eau distillée en fin de l'expérience (**Rodier et al., 2009**).

Les paramètres à déterminer sont :

II.2.2.1.1. Mesure de la température (T)

La température de l'eau, est le facteur le plus apprécié pour une eau destinée à la consommation humaine (**Gregorio et Pierre-Marie, 2007**). L'unité de température est la degré Celsius (°C).

II.2.2.1.2. Mesure du potentiel d'hydrogène (pH)

Tous les échanges physico-chimiques existant entre les êtres vivants en milieu aquatique et leur environnement sont influencés par le pH de l'eau, il est relié à la teneur en ions H^+ et aussi à l'acidité et l'alcalinité de l'échantillon. Il est l'une des mesures que l'on doit effectuer le plus fréquemment.

II.2.2.1.3. Mesure de la conductivité électrique (CE)

La conductivité électrique d'une eau est la conductance d'une colonne d'eau comprise entre deux électrodes métalliques de 1 cm^2 de surface et séparées l'une de l'autre de 1 cm. Elle est l'inverse de la résistivité électrique. L'unité de conductivité est le siemens par mètre (S/m) ($1\text{ S/m} = 10^4\mu\text{S/cm} = 10^3\text{ mS/m}$).

II.2.2.1.4. Mesure de l'oxygène dissous (DO)

La méthode utilisée pour le dosage de l'oxygène dissous est électrochimique. La réduction de l'oxygène, au niveau d'une cathode convenable, engendre un courant proportionnel à la pression partielle d'oxygène dans la solution.

II.2.2.1.5. Taux des sel dissous (TDS)

C'est la salinité, ou la masse de sels (composés ioniques), dissous dans 1 litre d'eau. Elle s'exprime en psu (Practical Salinity Unit) ou g par kg d'eau. Un composé ionique ou solide ionique cristallin est constitué de cations (ions chargés +) et d'anions (ions chargés -).

II.2.2.2. Analyses microbiologiques des eaux

L'analyse microbiologiques des eaux a été réalisée selon les méthodes présentées dans le tableau 25.

Tableau 25 . Méthodes d'analyses microbiologiques des eaux

Micro-organismes recherchés	Volume d'eau	Méthode	Milieux de culture appropriés	Incubation	Lecture
Micro-organismes revivifiables à 22°C	1ml	Ensemencement spirale	Gélose TGEA	72 h à 22 °C	Colonies de formes lenticulaires
Micro-organismes revivifiables à 37°C	1ml	Ensemencement spirale	Gélose TGEA	48 h à 37 °C	Colonies lenticulaires
Coliformes totaux	100 ml	Filtration sur membrane (0,45µm)	Gélose tergitol + additive TTC tergitol 7+ additive TTC tergitol	24-48 h à 37 °C	Colonies jaunes et jaunes orangés
<i>E. coli</i>	Liquide	10+1+0,1 ml	Le nombre le plus probable (NPP) - BCPL muni cloche D/C+S/C - Schubert muni cloche - Réactif de Kovacs	- 48 h à 37 °C - 24 h à 44 °C	- Trouble jaune et dégagement de gaz - Gaz + trouble - Anneau rouge
	Solide	100 ml	-Filtration sur membrane (0,45µm)	1.TSA 2.TBA 3.Kovacs	1,5 h à 37 °C 2,20 h à 44°C
Streptocoques fécaux	10+1+0,1 ml	Le nombre le plus probable (NPP)	- Rothe D/C+S/C - Eva Litsky - Réactif de Kovacs	- 48 h à 37 °C - 24 h à 44 °C	- Trouble - Pastille violette
	100 ml	Filtration sur membrane(0,22µm)	- Gélose slanetz et bartly + additive TTC slanetz - B.E. A	- 24 h-48 h à 37 °C - 2 h à 44 °C	- Rouge brique ou rose - Noire
<i>Clostridium</i> sulfito-réducteurs	20 ml	Incorporation en milieu solide	Gélose viande-fois+ sulfite de sodium+ alun de fer	24 h-48 h à 37 °C	Spore avec halo noire
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 ml	Etalement spirale	Chapman	24 h à 37 °C	Colonies jaunes
<i>Salmonella typhi</i>	1 ml	Étalement en surface	Gélose SS (Gélose Salmonella Shigella)	24 h à 37 °C	Colonies vertes ou bleu vert à centre noir
Moisissures et levures	1 ml	Etalement spirale	Sabouraud	72 h à 22°C	Colonies filamenteuses ou blanches brillantes

II.2.2.2. 1. Dénombrement des germes totaux

Les germes totaux sont les micro-organismes revivifiables à 22 °C et 37 °C, d'origine intestinale (humaine ou animale) (**El Haissoufi et al., 2011 ; CEAEQ, 2011**). Pour le dénombrement des germes totaux, la technique d'ensemencement spirale sur la gélose TGEA (glucosée tryptonée à l'extrait de levure) a été utilisée.

1 ml de l'échantillon mère est introduit aseptiquement dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique stérile, on obtient aussi la dilution au 1/10. Nous prélevons ensuite 3 fois 1ml d'échantillon soigneusement agité, et nous déposons deux des prélèvements dans une boîte de pétri stérile, et le troisième dans le premier des tubes contenant 9 ml.

Nous agitons soigneusement le tube de dilution au 1/10 ainsi préparé à l'aide d'un agitateur mécanique. Nous prélevons à l'aide d'une nouvelle pipette stérile 3 fois 1ml, et nous les déposons, d'une part dans le deuxième tube (réalisant ainsi la dilution au 1/ 100), d'autre part, dans deux autres boîtes de pétri. On continue ainsi jusqu'à ce que toutes les dilutions nécessaires aient été effectuées. A l'aide d'une nouvelle pipette stérile, 3 fois 1ml, seront prélever ; d'une part 1 ml sera inoculé dans le deuxième tube (réalisant ainsi la dilution au 1/100), d'autre part ; des deux boîtes de Pétri recevra 1ml. On continue ainsi jusqu'à ce que toutes les dilutions aient été effectuées. Porter les flacons contenant la gélose au bain-Marie bouillant jusqu'à fusion du milieu ; puis le laisser refroidir à 45 °C. Couler la gélose dans les boites pétries laisser refroidir (nous pouvons faire cette étape avant 24h). Placer les boites dans l'appareil d'ensemencement spirale (Fig. 07 de l'annexe2). Les boîtes serontensemencées avec chacune des différentes dilutions préparées précédemment puis incubées dans une étuve à 37°C durant 48 heures, et à 22°C durant 72 heures.

Pour les germes totaux, le nombre de colonies compté sur une boîte (à l'aide d'un compteur de colonies), multiplié par 10 et éventuellement par l'inverse du rapport de dilution, indique le nombre de germes totaux contenus dans 1 ml d'échantillon. Les résultats sont exprimés en nombre de micro- organismes revivifiables par ml (**Rodier et al., 2009**).

II.2.2.2.2. Recherche et dénombrement des coliformes totaux, fécaux, et d'*E. coli*

Les coliformes totaux sont d'origine animale et humaine, leur présence dans l'eau indique une contamination récente par des matières fécales (**Chevalier, 2003**). La présence des coliformes thermotolérants, signe l'existence quasi certaine de la contamination fécale d'une eau (**Richard, 1996; Figarella et Leyral, 2002; Rodier et al., 2009; El Haissoufi et**

al., 2011). L'OMS (2004), stipule que la présence d'*E.coli*, apporte la preuve incontestable d'une pollution fécale récente.

Pour le dénombrement des coliformes totaux et fécaux, deux techniques sont classiquement utilisées ; méthodes sur milieux liquide et méthodes sur milieux solides :

a. Méthode sur milieu liquide

La recherche et le dénombrement des coliformes (CT et CF) se fait selon la méthode du nombre le plus probable (NPP) (Tab. 26).

• **Recherche des coliformes totaux : Test présomptif**

Après inoculation de plusieurs dilutions de l'échantillon, chacune dans une série de tubes contenant un bouillon Lactosé au Bromo Crésol Pourpre (BCPL) ; en simple et double concentrations, on agite pour homogénéiser sans faire pénétrer d'air dans la cloche de Durham, puis incuber les tubes dans une étuve à 37 °C, pendant 48 heures. Ensuite nous procédons à une première lecture après cette incubation. Sont considérés comme positifs, les tubes où il se produit simultanément un trouble dans toute la masse liquide et un dégagement de gaz dans la cloche. Nous avons noté le nombre de tubes positifs dans chaque série et nous nous sommes reportés aux tables de Mac Grady pour obtenir le nombre de coliformes totaux présents dans 100 ml de l'échantillon (**d'après la norme ISO 7218 : 1996**).

• **Recherche d'*Escherichia coli* : Test confirmatif**

A partir de chaque tube positif de milieu BCPL du test présomptif ; 4 à 5 gouttes serontensemencés dans un milieu de Schubert muni d'une cloche de Durham, qui sera placé dans une étuve à 44 °C pendant 24 h. Les tubes qui présentent un trouble bactérien et un dégagement de gaz dans la cloche de Durham, confirme la présence de coliformes fécaux.

Les tubes positifs du milieu de Schubert, additionnés au réactif de Kovacs se caractérisent par la formation d'un anneau rouge cerise à la surface témoignant de la production d'indole et donc de la présence d'*E. coli*. (**Rodier et al., 2009**).

Le nombre de tubes positifs dans chaque série et noté reportés à la table de Mac Grady pour obtenir le nombre de coliformes totaux et d'*E. coli* présent dans 100ml de l'échantillon (**Rodier et al., 2005**).

Tableau 26. Méthode de nombre le plus probable (NPP) (table de Mac Grady) d'après la norme ISO 7218 : 1996

Nombre des tubes donnant une réaction positive			N.P.P dans 100 ml	Limite de confiance à 95 %	
3 tubes de 10 ml	3 tubes de 1 ml	3 tubes de 0,1 ml		Limite inférieure	Limite supérieure
0	0	1	3	< 0,5	9
0	1	0	3	< 0,5	13
1	0	0	4	< 0,5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	1	149
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	379
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800

b. Méthode par ensemencement en milieu solide (méthode de Colimétrie par filtration)

- **Recherche des coliformes totaux**

La recherche et le dénombrement des coliformes se fait selon la méthode en filtration sur membrane à (0,45 µm), (qui retient les micro-organismes à sa surface) en milieu solide (**Lebres et Mouffok, 2008**). La colimétrie par filtration est une méthode rapide, simple, normalisée nécessitant la disponibilité d'une appaillage de filtration (Fig. 08 de l'annexe2).

Pour la recherche des bactéries coliformes par cette méthode, il faut au préalable un essai standard ; qui débute par une stérilisation de l'entonnoir gradué, ainsi que de la membrane poreuse à l'aide d'un bec bunsen. Les refroidir aussitôt après, avec l'eau à analyser ou avec de l'eau distillée stérile. Mettre en place de façon aseptique, une membrane de porosité minimale de 0,45 µm à l'aide d'une pince stérile. Fixer ce dispositif avec la pince appropriée. Déposer ensuite aseptiquement 100 ml d'eau à analyser, devant un bec bunsen. Actionner ensuite la pompe à vide (pompe péristaltique) pour absorber l'eau à travers la membrane. Retirer l'entonnoir puis transférer immédiatement et

aseptiquement la membrane à l'aide d'une pince à bouts arrondis stériles, sur la surface d'une plaque de gélose tergitol au chlorure de 2,3,5-triphényltetrazolium (TTC tergitol) et heptadécylsulfate de sodium (TTC tergitol 7), préalablement préparée. Cette dernière sera incubée couvercle en bas à 36 ± 2 °C pendant 21 ± 3 h voire 44 ± 4 h et servira à la recherche des bactéries coliformes. Après la période d'incubation spécifiée, dénombrer les colonies caractéristiques qui se présentent sous forme de petites colonies lisses légèrement bombées à contours réguliers et pigmentés en jaune orangé ou en jaune (lactose positives) (Rodier et al., 2005).

- **Recherche des coliformes fécaux**

Repiquer de façon aléatoire 5 à 10 colonies, qui serviront aux tests de confirmation basée sur le test à l'oxydase d'une part et la production d'indole d'autre part. Pour les tests à l'oxydase, effectuer tout d'abord un repiquage de quelques colonies sur gélose tryptonée au soja (TSA) à la caséine, qui sera incubée à 36 ± 2 °C pendant 21 ± 2 heures. Imbiber un disque d'oxydase avec une goutte d'eau distillée stérile puis déposer une colonie caractéristique. La réaction positive est immédiate et se traduit par un virage au bleu violet foncé. Pour le test à l'indole, il faut transférer chaque colonie caractéristique séparément (5 à 10 colonies) dans un tube contenant 3 ml de bouillon au tryptophane. Bien triturer la colonie dans le milieu et incuber ce dernier à $44 \pm 0,5$ °C pendant 21 ± 3 heures. La production d'indole est recherchée en ajoutant 2 à 3 gouttes du réactif de Kovacs. La présence d'une coloration rouge cerise à la surface du bouillon traduit la production d'indole à partir du tryptophane présent dans le milieu (Rodier et al., 2005).

- **Recherche d'*Escherichia coli* (méthode rapide)**

Elle consiste à titrer 100 ml d'eau à analyser, devant un bec bunsen à travers la membrane (0,45 µm) qui sera placée dans un premier temps sur une plaque de gélose tryptonée au soja (TSA) à incuber couvercle en bas d'abord à 36 ± 2 °C pendant 4 à 5 h, puis transférer la membrane sur gélose tryptonée contenant des sels biliaires (TBA) à incuber à $44 \pm 0,5$ °C pendant 19 à 20 h. Cette méthode sert à la recherche sélective des *Escherichia coli*. Une fois la durée d'incubation écoulée, transférer la membrane sur un papier filtre imbibé de réactif de Kovacs puis l'irradier sous une lampe UV pendant 10 à 30 minutes. Seront considérés comme des *E.coli*, les colonies qui prennent une coloration rouge. Le nombre de colonies sera rapporté à 100 ml d'eau à analyser.

Le comptage des colonies se fait sur les boîtes à l'aide de compteur de colonies (Fig. 09 de l'annexe2).

Le résultat est exprimé en unité formant colonie par ml (UFC/ml) (**Lebres et Mouffok, 2008**).

II.2.2.2.3. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux

La détection d'entérocoques (streptocoques) dans l'eau doit faire penser à une contamination d'origine fécale et la présence de micro-organismes entéropathogènes (**Chevalier, 2002; Ladjel, 2009**). Selon **Figarella et Leyral (2002)** ; et **Rodier et al., (2005)**, la présence des streptocoques fécaux doit s'accompagner de la présence de coliformes fécaux pour confirmer la contamination fécale d'une eau. Pour le dénombrement des Streptocoques fécaux, nous avons utilisé la méthode en milieu liquide et celle en milieu solide :

a. Méthode en milieu liquide

La recherche et le dénombrement des streptocoques fécaux se fait par deux tests : le test présomptif sur le milieu de Rothe et le test confirmatif sur le milieu Eva Litsky. L'incubation se fait à 37 °C pendant 24 h à 48 h. La présence des streptocoques fécaux se manifeste par l'apparition d'un trouble microbien dans tout le milieu de Rothe et éventuellement par la formation d'une pastille violette au fond du tube du milieu Eva Litsky (**Rodier et al., 2009**).

- **Test présomptif**

On ensemence 3 tubes de 10 ml de bouillon Rothe à double concentration (D/C) avec 10 ml de l'échantillon, 3 tubes de 10 ml de bouillon Rothe à simple concentration (S/C) avec 1 ml de l'échantillon et 3 tubes de 10 ml de bouillon Rothe à simple concentration (S/C) avec 0,1 ml de l'échantillon. Puis homogénéiser soigneusement, le contenu des tubes par agitation, en s'assurant, une fois terminée, que la teinte du bouillon est uniforme en haut et en bas du tube, de façon à ce que la concentration en inhibiteur soit identique en tous points.

Incuber les tubes à 37 °C, la lecture est faite au bout de 24 et 48 heures. Les tubes présentant un trouble microbien pendant cette période sont présumés contenir des streptocoques fécaux et sont soumis au test confirmatif. (**Rodier et al., 2009**).

- **Test confirmatif**

Après agitation des tubes positifs, prélever sur chacun d'eux successivement quelques gouttes avec pipette Pasteur stérile, et les ensemencer dans des tubes du milieu de Litsky à l'éthyl violet et azide de sodium (Eva Litsky). Après incubation à 37 °C

pendant 24 h, tous les tubes présentant une culture et un jaunissement sont considérés comme positifs. Parfois, la culture s'agglomère au fond du tube en fixant le colorant et en formant une pastille violette de signification identique à celle du trouble.

Le nombre de tubes positifs est relevé dans chaque série puis reporté à la table de Mac Grady pour déduire le nombre de streptocoques fécaux présents dans 100 ml de l'échantillon (**Rodier et al., 2009**).

b. Méthode par filtration (en milieu solide)

Cette méthode de recherche se fait selon le protocole de **Lebres et Mouffok (2008)**, qui est la colimétrie par filtration, c'est aussi une méthode rapide, simple, et normalisée. L'échantillon d'eau (100 ml), à analyser est filtré à travers une membrane (0,22 µm), qui retient les micro-organismes par une rampe de filtration. Retirer ensuite la membrane à l'aide d'une pince stérile et la placer dans une boîte de Pétri de 45 mm de diamètre contenant de la gélose Slanetz et Bartly (ajouté additive TTC Slanetz). Cette membrane sera incubée à $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 44 ± 4 heures. Après incubation, les streptocoques fécaux apparaissent sous forme de petites colonies rouge brique ou roses, à dénombrer.

Pour la confirmation mettre les boîtes de gélose BEA (bile esculine azoture) à $44\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ pendant 10 à 15 minutes. Les colonies caractéristiques prennent une coloration noire traduisant ainsi l'hydrolyse de l'esculine présente dans le milieu. Le nombre de colonies trouvées sera exprimé par 100 ml d'eau à analyser (**Lebres et Mouffok, 2008**).

II.2.2.2.4. Dénombrement des *Clostridium* sulfito-réducteurs

Les *Clostridium* sulfito-réducteurs sont des germes capables de sporuler et de se maintenir longtemps dans l'eau. Ils sont donc les témoins d'une pollution ancienne. Plus difficilement tués que les coliformes par les désinfectants, ils constituent donc un bon indicateur de l'efficacité de la désinfection (**Hamed et al., 2012**).

La recherche et le dénombrement des *Clostridium* sulfito-réducteurs s'effectuent en utilisant la méthode par incorporation en gélose Viande-foie.

Placer 25 ml d'eau à analyser dans un tube de 220×22 mm, porter le tube au bain marie à 80°C de façon à ce qu'il demeure dix minutes sous cette température. Ensuite le refroidi rapidement à environ 55°C .

Placer quatre tubes de milieu viande-foie (contenant chacun 20 ml de milieu), au bain Marie bouillant pour assurer la fusion du milieu. Maintenu 10 minutes dans ce bain d'eau pour assurer l'élimination des gaz dissous. Puis, les refroidi à 55°C environ.

Ajouter par la suite à chaque tube 1 ml de la solution de sulfite de sodium et 4 gouttes de la solution d'alun de fer. Enfin, mélanger sans faire de bulles.

Répartir 20 ml d'eau traitée à raison de 5 ml par tube pour détruire les formes végétatives. Puis, verser dans chacun d'eux le contenu d'un tube de milieu VF, mélanger doucement sans incorporer d'air et y ajouter une couche de paraffine. Faire une première lecture après 24 heures d'incubation à 37 °C, et une deuxième après 48 heures. Il est indispensable de procéder à une lecture chaque 24 heures ; car en présence de nombreuses des colonies de CSR, le risque de diffusion des halos peut conduire à une coloration noire uniforme du tube et tout dénombrement devient impossible aux 48 heures. Par contre, s'il y a une faible quantité de colonies à la première lecture, et si les colonies sont petites, il peut y avoir un développement de nouvelles colonies dans les 24 heures suivantes.

On considère comme résultat positif (présence de spore de bactérie anaérobie sulfito-réductrice), toute colonie entourée d'un halo noir. L'expression du résultat est en nombre des spores par 20 ml d'eau (**Lebres et Mouffok, 2008**).

II.2.2.2.5. Dénombrement des *Staphylococcus aureus*

Les *Staphylocoques* ont été recherchées selon la méthode en milieu solide. Un ensemencement d'1 ml d'eau à analyser est effectué en surface de la boîte de Pétri ; contenant environ 15 ml de gélose sélective (Chapman). L'ensemble est incubé à 37 °C pendant 24 heures. La lecture ou le dénombrement est réalisé par comptage direct des colonies caractéristiques de l'espèce. Les colonies jaunes sont des *Staphylococcus aureus* (le plus pathogène), par contre les colonies blanches sont les autres *Staphylocoques* (pas ou moins pathogènes) (**Lebres et Mouffok, 2008 ; Hamed et al., 2012**).

II.2.2.2.6. Dénombrement des *Salmonella typhi*

On applique la méthode sur milieu solide. Dans la boîte de Pétri qui contenant environ 15 ml de gélose SS (Gélose *Salmonella Shigella*), un étalement spiral est réalisé sur une surface contenant 1 ml d'eau à analyser. L'ensemble est mis en incubation à 37 °C pendant 24 heures. La lecture ou le dénombrement est réalisé par comptage direct des colonies caractéristiques de l'espèce. Les *Salmonella* forment des colonies incolores avec centre noir.

- **Remarque importante** : d'après les résultats des analyses, l'eau polluée recueillie à la sortie de STEP, ne contient aucune espèce de *Salmonella*, de ce fait ; on a procédé à l'inoculation de quelques colonies des *Salmonella typhi* ATTC 19943 et

Salmonella typhi 4404540, dans l'eau à tester (étape exceptionnellement réalisée pour les analyses portant sur *Salmonella*).

II.2.2.2.7. Dénombrement des moisissures et levures

Selon la méthode en milieu solide, par ensemencement spirale sur une surface contenant 1 ml d'eau à tester est effectué dans la boîte de Pétri qui contenant environ 15 ml de gélose sélective (Sabouraud), incubé à 22 °C pendant 72 heures. Le dénombrement est réalisé par comptage direct des colonies filamenteuses ou blanches brillantes.

III. Stratégie de recherche

Rappelons que le but essentiel de nos investigations est l'évaluation puis la caractérisation du pouvoir désinfectant susceptible d'être exercé sur l'eau, par l'huile de cade et le goudron de pin. Pour se faire, nous avons adopté une stratégie en vue d'atteindre les 4 objectifs spécifiques (OS) suivants, à savoir :

- **OS1** : Rechercher le matériau le plus efficace pour un effet désinfectant optimal (effet type de récipient : jarre en terre cuite, bouteille en verre, bouteille en plastique);
- **OS2** : Mettre en évidence de la concentration optimale pour la désinfection (l'effet concentration);
- **OS3** : A partir de cette concentration optimale, comparer le pouvoir désinfectant des produits testés avec celui de l'hypochlorite de sodium, en présence et à l'abri de la lumière (effet lumière);
- **OS4** : Etudier l'effet de la fixation des produits testés, sur une surface poreuse telle que l'argile (effet adsorption).

Tous ces objectifs reliés par des questionnaires sur l'utilisation traditionnel de ces huiles.

III.1. Rechercher le matériau le plus efficace pour un effet désinfectant optimal (effet type de récipient)

III.1.1. Préparation des échantillons

L'eau polluée provenait de la STEP de Ouargla. Après les tests bactériologiques (présomption, dénombrement et confirmation de la présence des coliformes fécaux), des dilutions au 1/50^{ème} et 1/25^{ème} avec de l'eau distillée, ont été effectuées afin de ramener la concentration en coliformes entre 30 et 300 UFC/ml (**Rodier et al., 2009**). La méthode de colimétrie par filtration a été appliqué. Des prélèvements sont effectués après 1 h,

5 h et 24 heures.

Trois types de flacon d'un litre en verre, en plastique et en terre cuite ou argile (poterie ou jarre), sont préparés (Fig. 57). On à induire copieusement les parois internes des récipients avec de l'huile de cade à la même concentration (10 ml), puis on les exposés au soleil à la température ambiante, jusqu'à au séchage complet, conformément à la méthode traditionnellement connue. Les flacons sont remplis ensuite par 1 litre d'eau polluée respectivement, puis fermés à l'aide d'un bouchon.



a. Jarre traditionnelle

b. Flacon en verre

c. Flacon en plastique

Figure 57. Les trois types de récipients utilisé

Parallèlement, à un litre de même eau polluée, on ajoute 2 ml de l'huile de cade, dans des récipients vides.

Le choix de cette concentration de 0,2% repose sur deux raisons :

- La CMI relative à l'action de l'huile de cade sur *Streptococcus sp* (chapitre VI) est égale à 1.95 µl/ml donc de l'ordre de 0,2% ;
- D'après **Sunda (2008)**, la concentration optimale de désinfection de l'eau de rivière par l'huile essentielle de *Citrus bergamia* est de 2ml/l soit 0,2%.

III.1.2. Résultats et discussions

Les résultats des tests de traitement de l'eau polluée par l'huile de cade pour les différents flacons, sont présentés dans les figures 58 et 59.

Quelle que soit la méthode utilisée nous avons constaté qu'il n'y a aucune relation entre la nature du récipient et le taux des coliformes fécaux.

Un abattement non significatif en coliformes fécaux a été noté après 24 heures de réaction de cette huile avec l'eau polluée non traitée dans tous les flacons utilisés, quelle que soit la méthode. Où le pourcentage de cette bactérie sa augmente de 64.07%, 65.26%, et 65.13% (méthode traditionnel) et de 18.56%, 25.74%, 27.54% (méthode contact direct), respectivement par le flacon en poterie, en plastique, et en verre. Cependant, une inhibition complète a été notée après cinq heures de réaction pour l'eau traitée avec l'huile de cade par l'injection directe dans l'eau (méthode de contact direct).

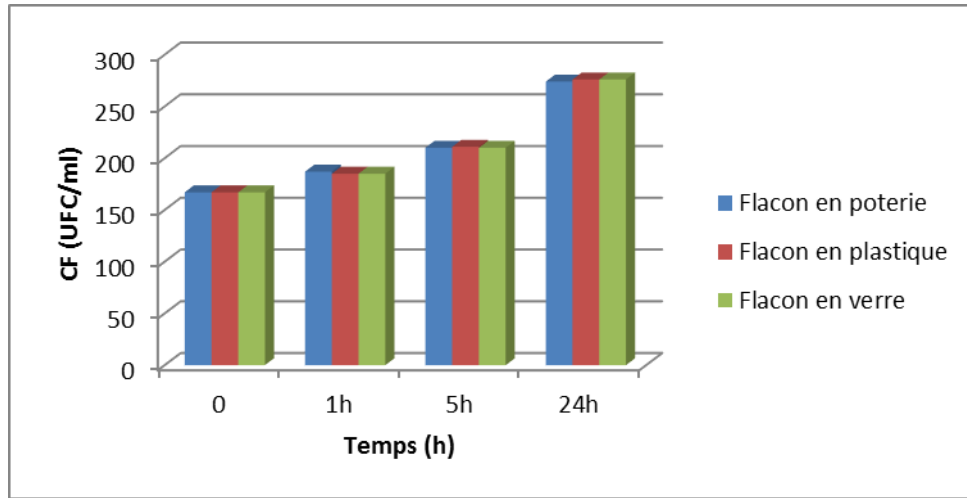


Figure 58. L'effet désinfectant de l'huile de cade sur le taux de coliformes fécaux selon le milieu par la méthode traditionnel

D'autre part, il est noté que les valeurs des coliformes fécaux sont proches, lorsque ont varié des milieux, quelle que soit la méthode (traditionnel ou non), c'est à dire qu'ils n'ont aucune relation entre le récipient (le milieu), et les taux des coliformes fécaux.

Les résultats obtenus, montrent que l'huile de cade conduit à une désinfection nette de l'eau après cinq heures de réaction

L'huile de cade semble avoir un effet bactériostatique, figure 59 le met en évidence; la désinfection de l'eau par l'huile de cade est totale, s'observe après 5 h. Toutefois, un effet rebond des coliformes fécaux après 24 h de réaction est constaté. Cette constatation expérimentale semble avoir pour explication les particularités inhérentes à la désinfection des eaux polluées. En effet, celle-ci comporterait deux étapes essentielles conduisant à deux effets différents exercés par le désinfectant à savoir :

Un effet bactéricide consistant en sa capacité de détruire des germes à une étape donnée du traitement ;

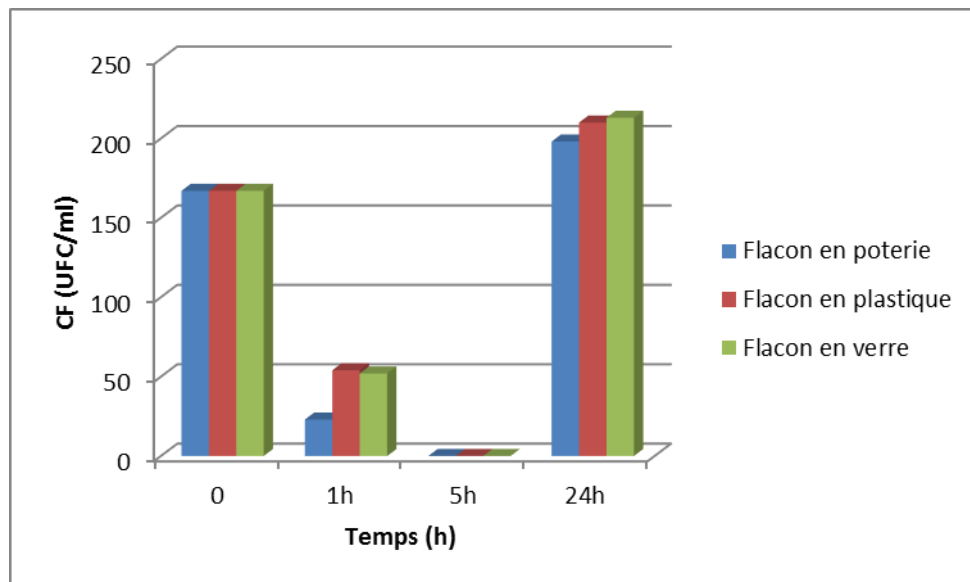


Figure 59. L'effet désinfectant de l'huile de cade sur le taux de coliformes fécaux par contact direct

Un effet rémanent du désinfectant qui se maintient dans l'eau, en particulier dans le réseau de distribution, et qui permet de garantir la qualité bactériologique de l'eau jusqu'au robinet du consommateur.

Il s'agit donc probablement à la fois d'un effet bactériostatique contre les reviviscences bactériennes et un effet bactéricide contre des pollutions faibles et ponctuelles survenant dans le réseau, en même temps qu'une prévention des développements de micro-invertébrés dont des formes de résistance ou de reproduction auraient pu traverser la station.

Donc, l'effet désinfectant de l'huile de cade à 0,2 % est bactériostatique, puisque reprise au bout de 24 heures de réaction, nous assistons à un rebond (Merlet, 2009).

III.2. Mettre en évidence de la concentration optimale pour une meilleure désinfection (effet concentration)

III.2.1. Préparation des échantillons

Pour tester l'effet de l'huile de cade sur l'activité de la bactérie pathogène (*Staphylocoques aureus*) susceptibles d'être présentes dans l'eau polluée faisant l'objet de ce travail, deux protocoles différents, ont été suivis :

D'une part ; dans des flacons en verre de 250 ml, on y verse de l'eau polluée puis on y ajoute des concentrations aléatoires (0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, et 12 ml/l) d'huile de cade, ensuite on agite vigoureusement, pendant deux heures à la température ambiante. On

procède alors à des prélèvements au niveau de chaque flacon. Ces expériences ont été effectuées à trois reprises. La cinétique de croissance bactérienne de *Staphylococcus aureus* en fonction de la concentration de l'huile de cade est alors réalisée.

D'autre part ; une quantité d'huile de cade est versée dans des flacons en verre (d'un litre), remplis d'eau polluée de la station d'épuration de Ouargla. Au terme de 10 jours de réaction à une température ambiante, les concentrations suivantes sont préparées : 7,81 ml/l, 31,25 ml/l, et un témoin négatif (sans l'huile de cade). Le dénombrement de *Staphylocoques aureus*, est réalisés à partir des prélèvements de trois jours (J1 ; J4 ; J7; J10).

Le choix de ces concentrations n'est cependant pas aléatoire. Il se justifie par ce qui suit :

- La plupart des valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des produits étudiés vis-à-vis des espèces, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300, et *S. aureus*, précédemment déterminées (chapitre VI); sont de l'ordre de 7,81 ml/l (soit 0,78 %).

- D'après **Burt (2004)**, Pour qu'elles aient le même effet dans une matrice alimentaire, la CMI d'un produit désinfectant doit être multipliée par 4 fois. L'auteur suggère à cet effet que les valeurs des CMIs des huiles essentielles, obtenues "in vitro", soient corrigées d'un coefficient correcteur allant de 2 à 100. Dans notre cas, le choix du coefficient correcteur a été établi après avoir procédé préalablement à des tests de dégustation d'une eau traitée avec de l'huile de cade concentrée (ou pur. Nous avons jugé utile de multiplier la valeur de la CMI, par le coefficient 4 d'où 31,25 ml/l correspondant à 4 CMI.

III.2.2. Résultats et discussions

III.2.2.1. Effet de la concentration sur les Staphylocoques

L'étude de l'influence de la concentration de l'huile de cade sur l'évolution de la concentration des *Staphylocoques*, montre que la concentration des bactéries diminue au fur et à mesure que la concentration de l'huile de cade augmente (Fig. 60). Nous constatons par ailleurs une disparition de cette souche à une concentration de 4ml/l (c'est la CMI/2), correspond presque à la CMI de *S aureus* non référenciées. Cette concentration n'est autre que la CMI retenue pour les souches référenciées de staphylocoques (*S aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300). Et d'autres termes ; en ajoutant l'huile à la CMI relative d'une souche dans l'eau, la désinfection devient nette et la bactérie ciblée est détruite.

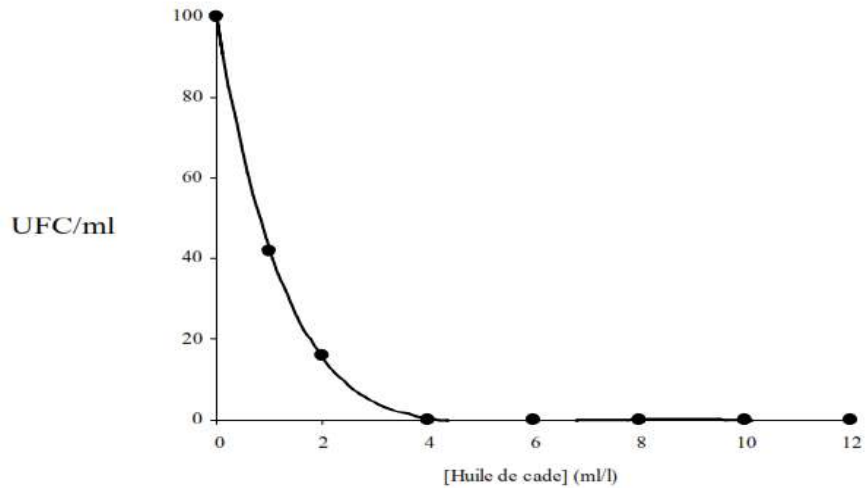


Figure 60. Evolution de la concentration des Staphylocoques en fonction de la concentration en huile de cade

III.2.2.2. Effet inhibiteur de l'huile de cade, à différentes concentrations

En se basant sur les résultats obtenus, "in vitro", en présence de l'huile de cade, il est possible de suivre la cinétique de développement des bactéries du genre *Staphylocoque* présentes dans l'eau polluée (Fig. 61). Les concentrations utilisées d'huile de cade correspondent à la CMI obtenue avec *S aureus*, soit 7,81 µl/ml, valeur corrigée par le coefficient 4, soit 31,25 µl/ml (4 CMI = 31,25 ml/l). L'allure des courbes relatives à l'effet de l'huile de cade selon la CMI et 4x la CMI sur cette souche est similaire. Ce résultat semble indiquer qu'une CMI est suffisante pour éliminer ces souches pathogènes.

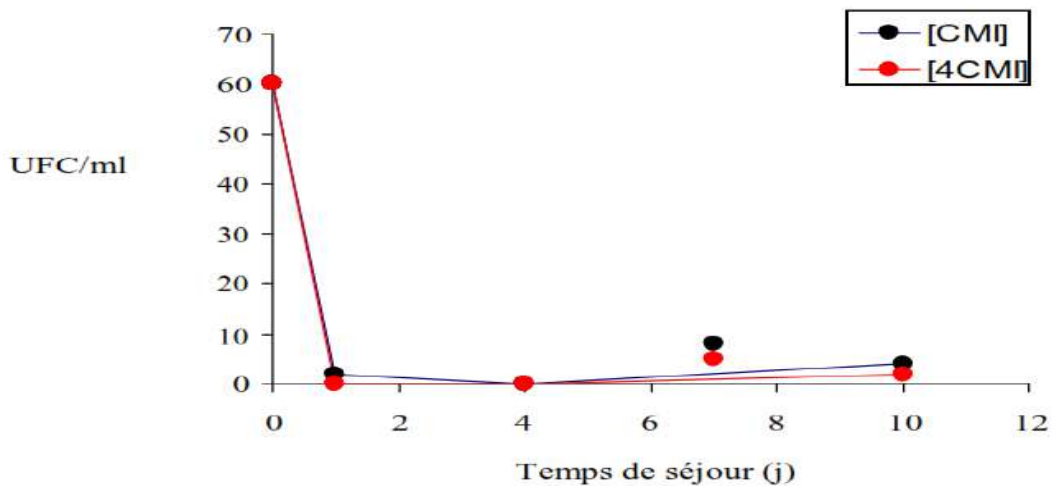


Figure 61. Effet inhibiteur de l'huile de cade, à différentes concentrations sur les souches de staphylocoques

Les résultats des expériences effectuées sur une eau polluée, montrent que 97% des *Staphylocoque* étaient détruits en 24h de réaction (de 60 à 2 UFC/ml), lorsque la

concentration en huile de cade est égale à la valeur CMI (7.81µl/ml), leur disparition totale (100%) est obtenue avec une concentration égale 4 x CMI (Fig.61).

Par ailleurs, l'analyse de l'effet de la concentration de l'huile de cade sur l'évolution des Staphylocoques, montre que la charge bactérienne des *Staphylocoques* diminue exponentiellement quelle que soit la concentration de l'huile de cade.

III.3. Effet des huiles utilisées sur le procédé de désinfection en comparaison avec l'hypochlorite de sodium.

A partir de la concentration optimale préalablement déterminée, nous nous sommes proposés de comparer le pouvoir désinfectant des produits testés avec celui de l'hypochlorite de sodium, en présence et à l'abri de la lumière (effet lumière).

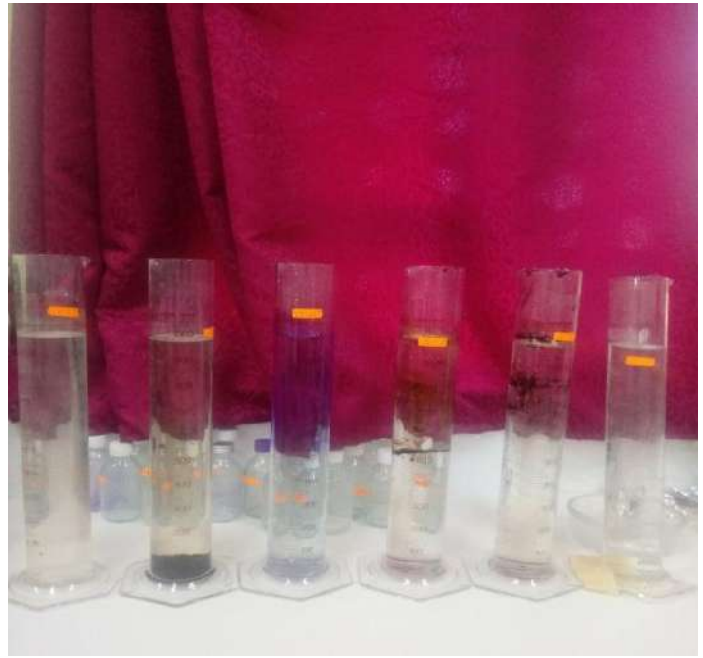
III.3.1. Mode opératoire

A 1 litre d'eau polluée recueillie à l'entrée de la STEP (diluée au 1/100^{ème} et 1/50^{ème} avec de l'eau distillée), on ajoute 2 ml de produit désinfectant (huile de cade et de pin et de l'hypochlorite de sodium). Tous les paramètres bactériologiques sont effectués en appliquant la méthode sur milieu solide, et la méthode sur liquide (NPP) selon le type d'analyses.

Un lot de quatre flacons en verre fumé (sombre), est placé à l'obscurité (Fig. 62a), un deuxième lot de 5 éprouvettes graduait en verre d'un litre (Fig. 62b), sont exposés à la lumière électrique pendant 5 heures (de 9h :00 à 14h :00, Saison : Hiver, Ouargla). L'eau polluée sans désinfectant a servi de témoin négatif. Et une solution de bleu de méthylène (1 g dans 50 ml d'eau distillée) dont les effets photodynamiques avec la lumière sont connus (**Sabbahi et al., 2000 ; Cooper et Yogi, 2002**); a servi de témoin positif. On procède alors à des prélèvements, après chaque heure, (0h, 1h, 2h,3h, 5h) (**Taba et Luwenga, 1999 ; Sunda et al., 2008**). Des analyses bactériologiques sont effectuées pour chaque échantillon de chacun des 2 lots. L'expression des résultats bactériologiques soit de fraction entre la valeur obtenue au temps t_i sur la valeur obtenue au temps t_0 , avec tous les germes testés. En parallèle, les mesures des paramètres physico-chimiques, sont effectués.



a. En l'absence de la lumière électrique



b. En présence de la lumière électrique

Figure 62. Effet des produits utilisés au cours du processus de désinfection

III.3.2. Résultats et discussions

III.3.2.1. Paramètres physico-chimiques

Il s'agit des paramètres facilement mesurables et utiles pour voir l'évolution des éléments chimiques les plus dominants dans les eaux de la STEP de la région d'étude. Les résultats des paramètres physico-chimiques étudiés sont représentés dans les figures ci-dessous :

L'eau polluée analysée ; est caractérisée par une température initiale de 19,22 °C, et un pH de 9,34, une teneur en oxygène dissous de 0.2 mg/l. Sa conductivité électrique est de 432 $\mu\text{s}/\text{cm}$, avec une salinité de 0,049 psu. D'après les réactions chimiques et bactériologiques, sa qualité varie selon les figures ci-dessous :

- **La température**

D'une façon générale, la température des eaux est influencée essentiellement par les variations climatiques (**Dib, 2009**), et par l'origine dont elles proviennent, sa température augmente selon la température ambiante. Cette augmentation est illustrée par la figure 63 suivante :

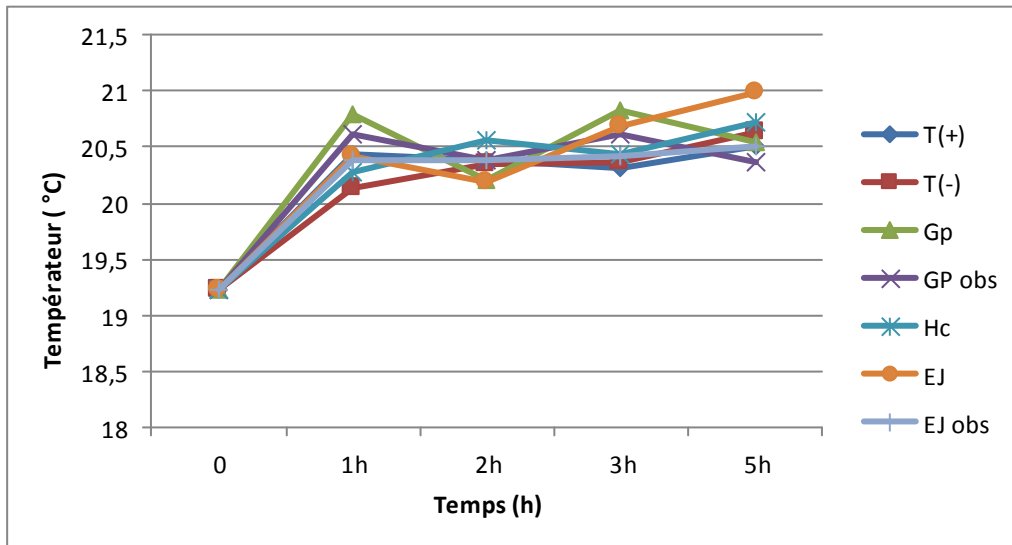


Figure 63. Variation de la température des eaux traitées avec des huiles (Gatrane) et l'hypochlorite de sodium en fonction du temps.

Soit : T (+) : Témoins positif, T (-) : Témoins négative, EJ : Eau de Javel, Gp : Huile de pin (*P. halepensis*),
Hc : Huile de cade (*J. oxycedus*) , Obs : Obscurité.

- **Le potentiel d'hydrogène (pH)**

D'après les résultats (Fig. 64), le pH de l'eau varie selon le pH du milieu réactionnel, il augmente avec l'hypochlorite de sodium (pH 11,64) et diminue avec les deux huiles végétales ; (notant que le pH initial d'huile de pin est de 3,81, pH initiale de l'huile de cade est de 2,95, et ce quelle que soit la luminosité.

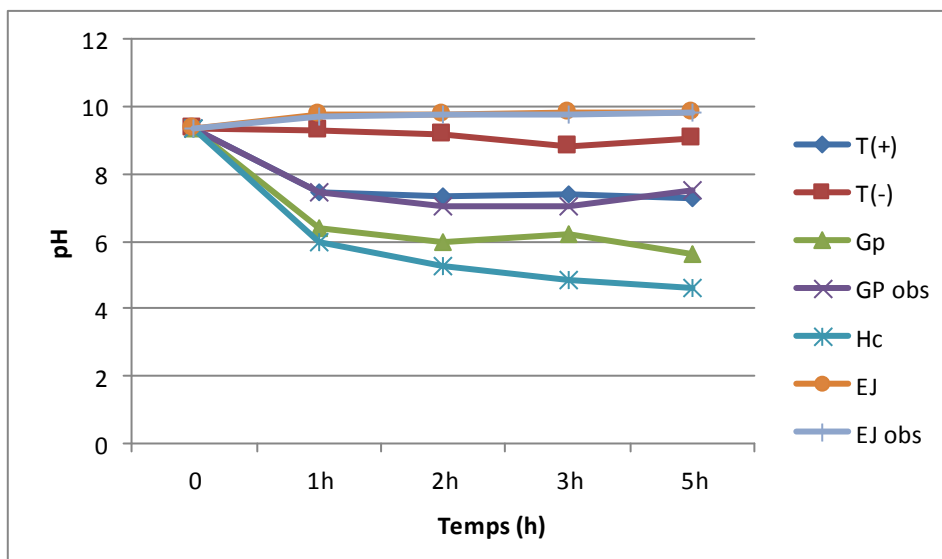


Figure 64. Variation du pH des eaux traitées avec des huiles (Gatrane) et l'hypochlorite de sodium en fonction du temps

Soit : T(+): Témoins positif, T(-): Témoins négative, EJ : Eau de Javel, Gp : Huile de pin (*P. halepensis*),
Hc : Huile de cade (*J. oxycedus*) , Obs : Obscurité

- **L'oxygène dissous**

La solubilité de l'oxygène dans l'eau est liée à plusieurs facteurs, en particulier la température, la pression atmosphérique et la salinité. Les résultats de la figure 65, montrent que le taux d'oxygène dissous diminue quel que soit le milieu, et s'annule au bout d'une heure dans les échantillons d'eau traitée par l'huile de cade et l'huile de pin. Le milieu pauvre en oxygène défavorise le développement des bactéries.

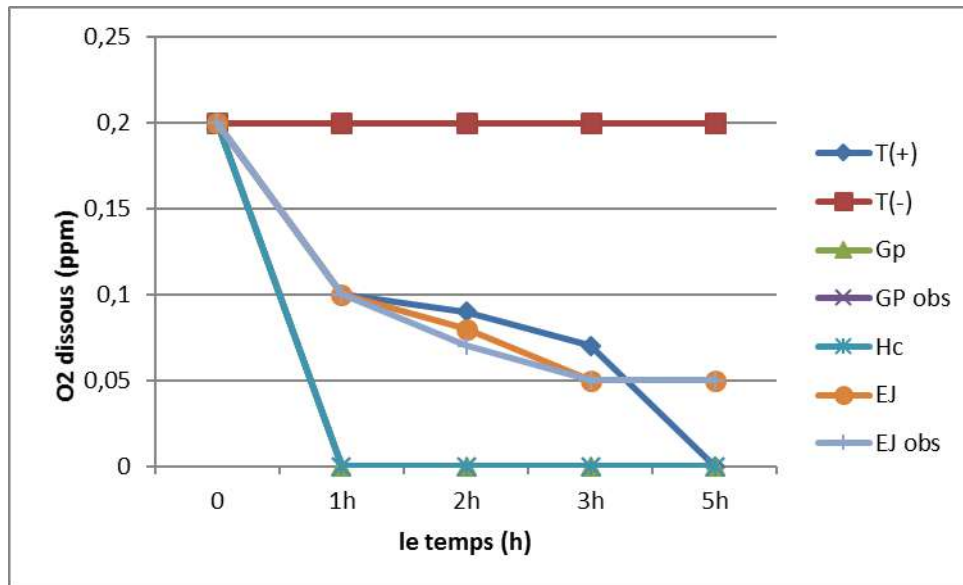


Figure 65. Variation de l'oxygène dissous des eaux traitées avec des huiles (Gatrane) et l'hypochlorite de sodium en fonction du temps.

- **La conductivité électrique (CE)**

Rodier et al. (2009), signalent que la variation de la conductivité est induite par la présence dans le milieu d'ions, qui sont mobiles dans un champ électrique. Cette mobilité dépend de la nature des ions dissous et de leur concentration. On remarque que la conductivité électrique des eaux traitées par l'huile de cade (Gatrane) reste à peu près constante pendant les 5 heures (Fig. 66), la CE de ces huiles en l'état, est égale à zéro, par contre la CE de l'eau traitées par l'hypochlorite de sodium augmente ($CE_{\text{hypochlorite de sodium}} = 184 \mu\text{s/cm}$), et on plus, pendant l'opération de désinfection l'hypochlorite de sodium réagit avec les matières organiques, qui transféré à matières minérales (illustré au chapitre II).

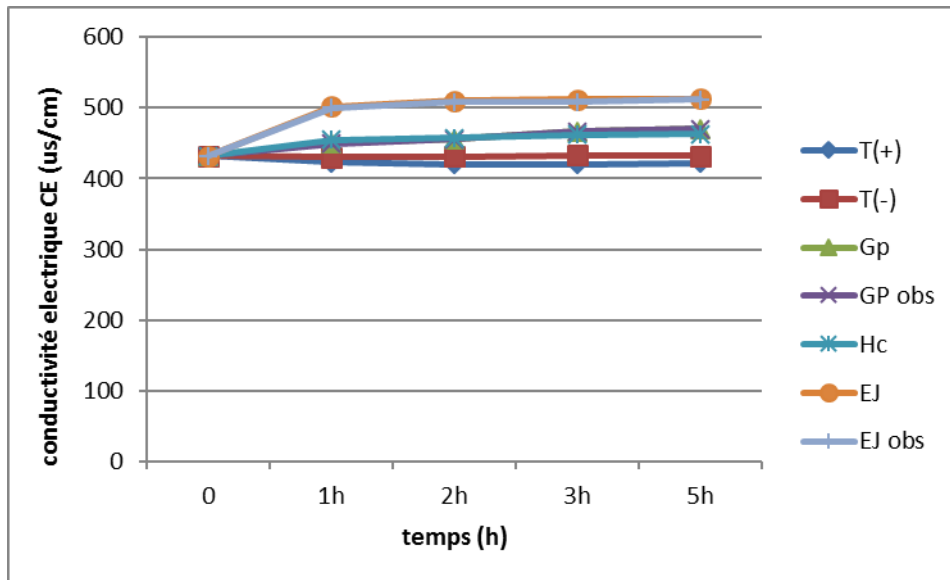


Figure 66. Variation de la conductivité électrique des eaux traitées avec des huiles (Gatrane) et de l'hypochlorite de sodium en fonction du temps

- **La salinité**

Elle indique la quantité de sels dissous existant dans l'eau. Les résultats montrent que la salinité du milieu augmente selon l'extrait ajouté, le taux élevé de salinité est élevé avec l'eau de javel (la composition chimique, à partir de chlore de sodium), est resté constant avec les huiles étudiées (Fig. 67).

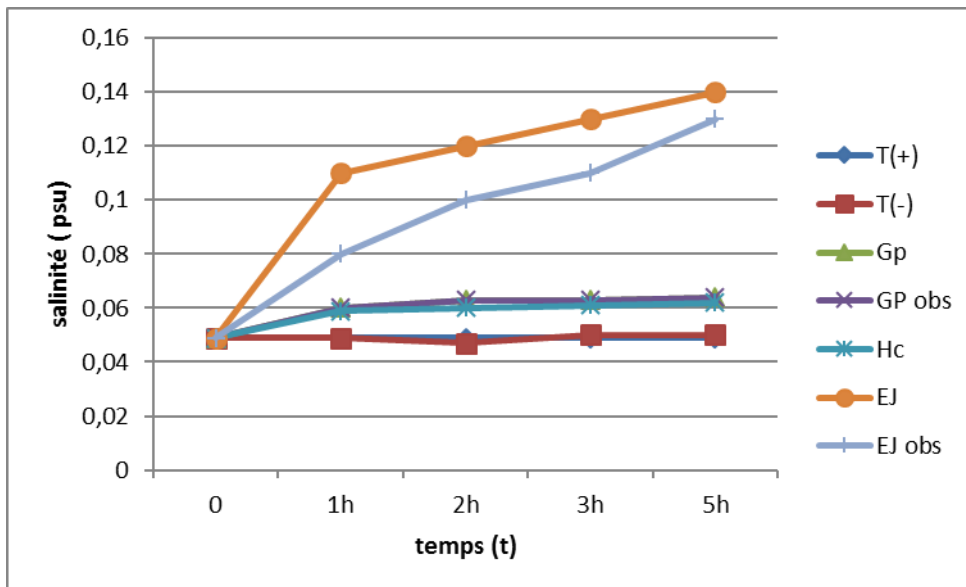


Figure 67. Variation de la salinité des eaux traitées avec des huiles (Gatrane) et l'hypochlorite de sodium en fonction du temps

III.3.2.2. Paramètres bactériologiques

L'analyse bactériologique permet de mettre en évidence la pollution fécale de l'eau. Les organismes pathogènes sont très nombreux et très variés et ne peuvent donc pas faire l'objet d'une recherche spécifique. De plus leur identification est très difficile voire impossible dans le cas des virus, car leur durée de vie peut être très courte. Pour ces multiples raisons, il est préalable de rechercher des germes qui sont toujours présents en grand nombre dans la matière fécale des hommes et des animaux à sang chaud, et qui se maintiennent plus facilement dans le milieu extérieur; il s'agit des : Germes totaux, les Coliformes fécaux, *Escherichia coli*, les Streptocoques fécaux, les *Clostridium* sulfito-réducteurs, les *Staphylococcus aureus*, les *Salmonella typhi*, levures et moisissures.

Les résultats des tests de traitement de l'eau polluée par la désinfection avec les huiles de Cade (Gatrane), sont présentés dans les figures 68 à 76 ci-dessous.

1. Les Germes totaux (GT)

Appelés aussi les micro-organismes aérobies revivifiables ou la flore mésophile aérobie totale (FMAT), d'origine intestinale (humaine ou animale) à 37 °C sur une période d'incubation de 24 heures. Les germes aérobies mésophiles psychrotrophes dont la température optimale de croissance est de 25 °C, d'origine résiduaire (environnementale) sont dénombrées à 22 °C sur une période de 72 heures d'incubation. Le dénombrement des germes aérobies mésophiles ou germes totaux est utilisé comme indicateur de pollution et également comme indicateur d'efficacité de traitement, en particulier des traitements physiques, qui devrait entraîner soit une très forte diminution de la concentration bactérienne par rapport à l'entrée, soit même une absence de bactéries (**El Haissoufi., et al, 2011**).

Les expériences menées à 37 °C (Fig. 68) et à 22 °C (Fig. 69), montrent une diminution remarquable du nombre des bactéries dans les eaux traitées, quel que soit le type des bactéries. Cependant, et comparativement avec l'eau de javel, on constate que cette diminution est faible pour les germes, revivifiable à 37 °C.

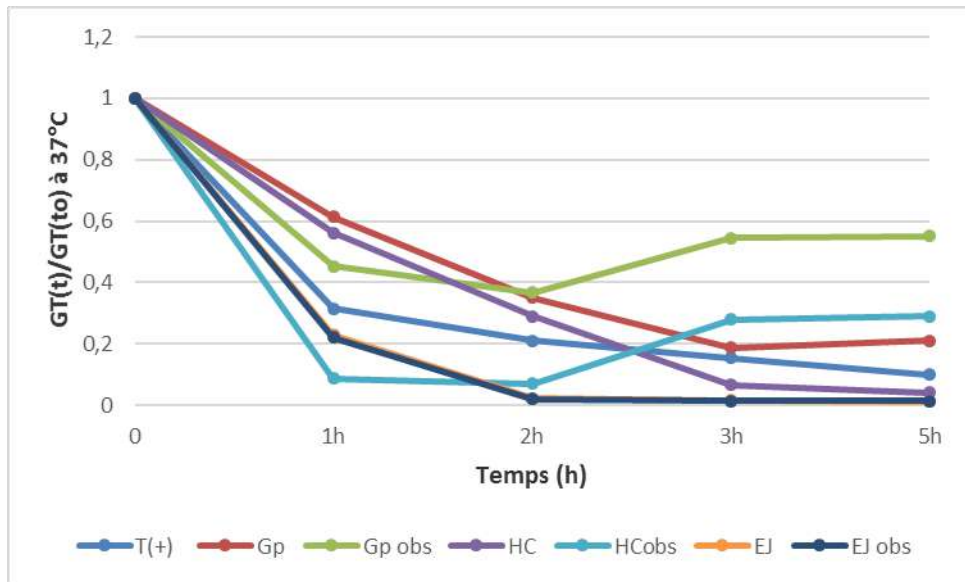


Figure 68. Effets des huiles et de l'hypochlorite de sodium (à 37 °C) sur les germes totaux contenus dans l'eau polluée en fonction du temps

Soit : T(+) : Témoins positif, T(-) : Témoins négative, EJ : Eau de Javel, Gp : Goudron de pin (*P.halepensis*), Hc : Huile de cade (*J. oxycedus*) , GP_{obs} : Goudron de pin à l'obscurité, HC_{obs} : Huile de cade à l'obscurité

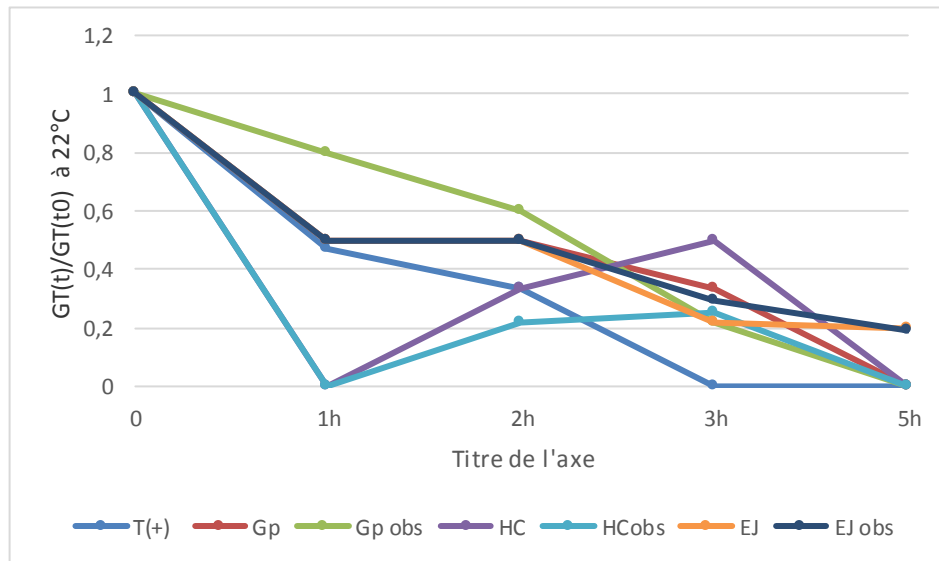


Figure 69. Effets des huiles (Gatrane) et l'hypochlorite de sodium (à 22°C) sur les germes totaux contenus dans l'eau polluée en fonction du temps

Après 5 h, on remarque une diminution des GT (37°C et 22 °C) avec tous les désinfectants et surtout à 22°C où on remarque une disparition totale de ces germes après 5 heures de réaction,

2. Les coliformes fécaux (CF)

La figure 70 ci-dessous illustre l'effet des divers désinfectants sur des coliformes fécaux dans l'eau :

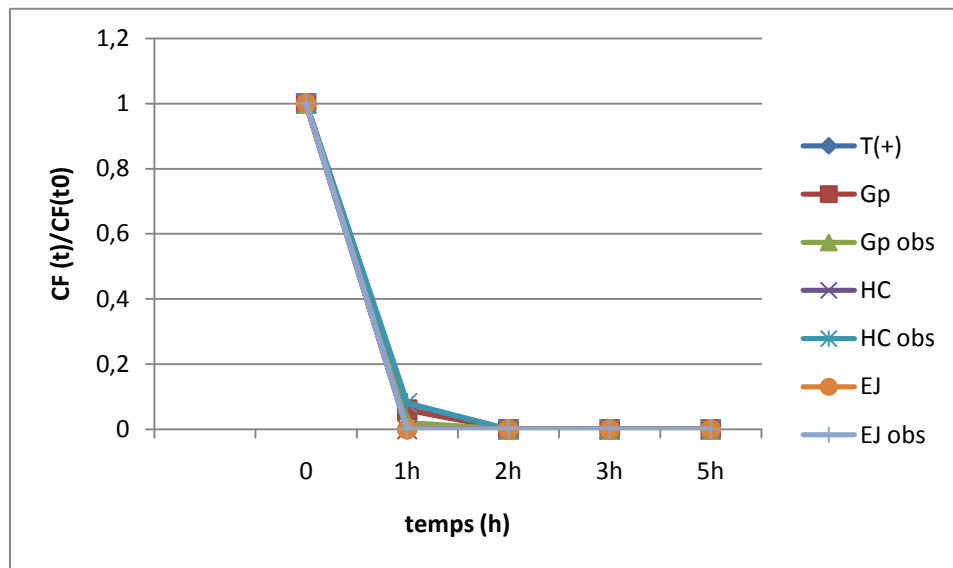


Figure 70. Evolution des coliformes fécaux en fonction du temps suite au traitement avec le « Gotrane » et l'hypochlorite de sodium

Soit : T(+) : Témoins positif, T(-) : Témoins négative, EJ : Eau de Javel, Gp : Goudron de pin (*P. halepensis*), Hc : Huile de cade (*J. oxycedus*), GP_{obs} : Goudron de pin à l'obscurité, HC_{obs} : Huile de cade à l'obscurité.

Nos résultats montrent un abattement net des coliformes fécaux sous l'effet de l'hypochlorite de sodium et de l'huile de cade. Et entre 94% et 98% par l'huile de pin exposé à la lumière, ou à l'obscurité respectivement.

3. Les streptocoques fécaux (SF)

La figure 71 suivante présente les résultats des essais dans l'eau sur les streptocoques fécaux (les entérocoques fécaux):

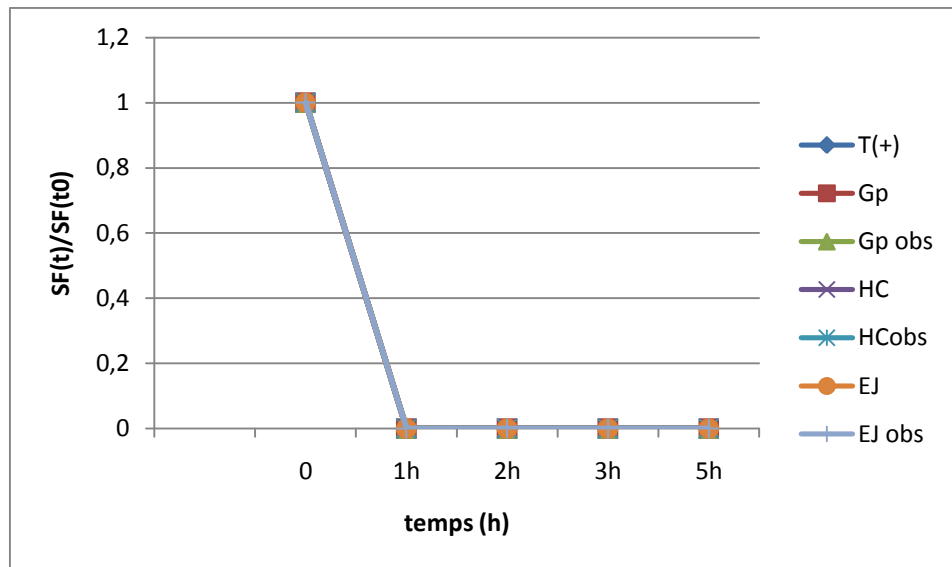


Figure 71. Evolution des entérocoques fécaux en fonction du temps suite au traitement avec des (Gatrane) et l'hypochlorite de sodium.

Au bout d'une heure de réaction, un abattement total des entérocoques fécaux présents dans tous les échantillons des eaux traitées, exposés ou non à lumière.

4. *Salmonella typhi*

La figure 72 ci-dessous, présente les résultats des analyses de *Salmonella typhi* dans l'eau. Après une heure de contact, nous observons dans tous les cas, une chute du taux de *Salmonella typhi* qui finissent par disparaître totalement, sauf dans le cas du témoin où la chute observée également après 1 heure de contact est moins importante (82.7%). Toutefois, une élimination totale de ces germes est observée après 5 heures de réaction.

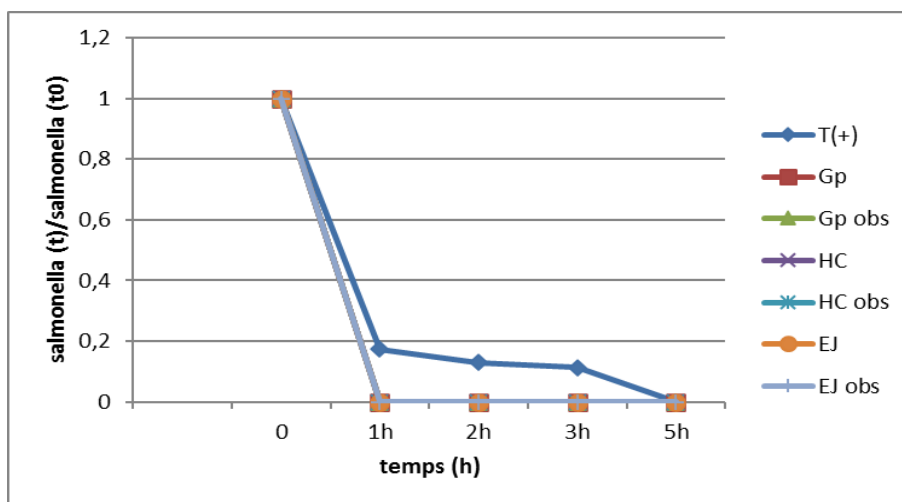


Figure 72. Evolution des *Salmonella typhi* en fonction du temps suite au traitement avec des (Gatrane) et l'hypochlorite de sodium

5. *Staphylococcus aureus*

La figure 73 suivante indique les résultats des analyses de l'eau pour les *Staphylococcus aureus* :

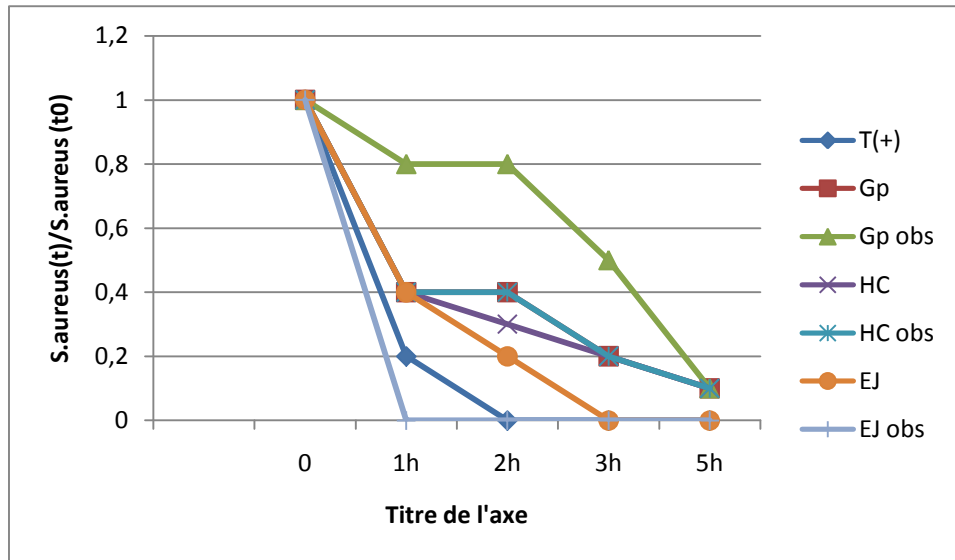


Figure 73. Evolution des *Staphylococcus aureus* en fonction du temps suite au traitement avec des (Gatrane) et l'hypochlorite de sodium

Pour le *Staphylococcus aureus*, les huiles étudiées exercent un effet bactéricide contre cette espèce bactérienne, puisque 60% des *Staphylococcus aureus*, ont été détruite en une heure de réaction exposée à la lumière mais la cinétique de lyse est faible en comparaison avec les autres germes.

6. *Escherichia coli*

La figure 74 suivante indique les résultats des analyses de l'eau pour *l'escherichia coli*:

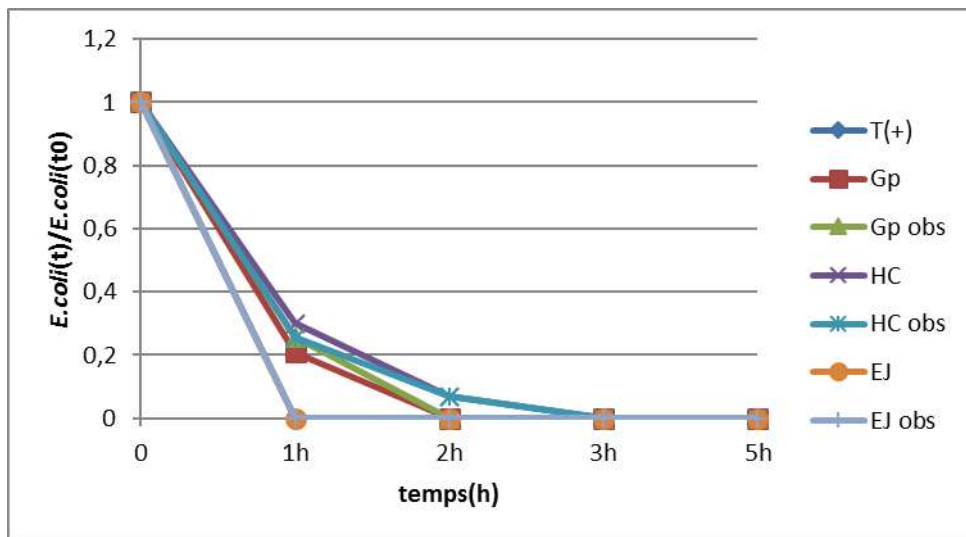


Figure 74. Evolution d'*Escherichia Coli* en fonction du temps suite au traitement avec des huiles (Gatrane) et l'hypochlorite de sodium

L'espèce *Escherichia Coli*, relativement plus résistante, est détruite plus efficacement comparativement aux autres espèces pathogènes préalablement citées. En effet, on note que plus de 79% ; 70% voir 100% des *E. coli* ont été détruites au bout d'une

heure de réaction exposée à la lumière, aussi bien pour le l'huile de pin que pour l'huile de cade et l'hypochlorite de sodium. A l'obscurité, le taux d'*E. coli* est réduit de 74% par les deux huiles respectivement. Nous remarquons une diminution de leur taux à partir de 3 heures de réaction pour tous les produits testés.

7. *Clostridium* Sulfito-réducteurs

La figure 75 montre les résultats d'analyses d'eau sur les *Clostridium* Sulfito-réducteurs.

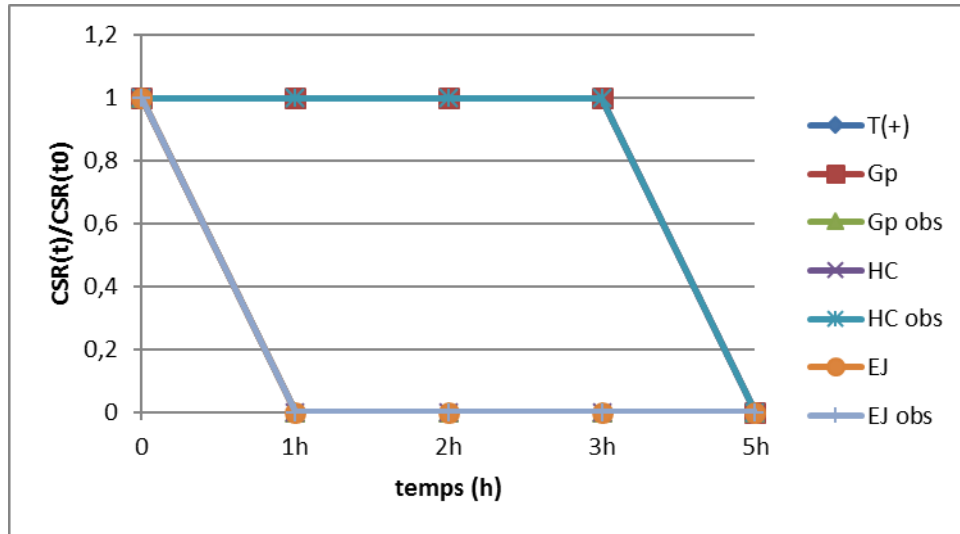


Figure 75. Evolution des *Clostridium* sulfito-réducteurs en fonction du temps suite au traitement avec des (Gatrane) et l'hypochlorite de sodium

On remarque que le taux des *Clostridium* sulfito-réducteurs reste constant, durant quatre heures de réaction, puis diminue jusqu'à la disparation complète, excepté avec eau de Javel et l'huile de cade exposés à la lumière. Néanmoins une destruction totale est observée après 5 heures de réaction.

8. Levures et moisissures

La figure 76 ci dessous illustre l'effet des divers désinfectants sur les levures et les moisissures.

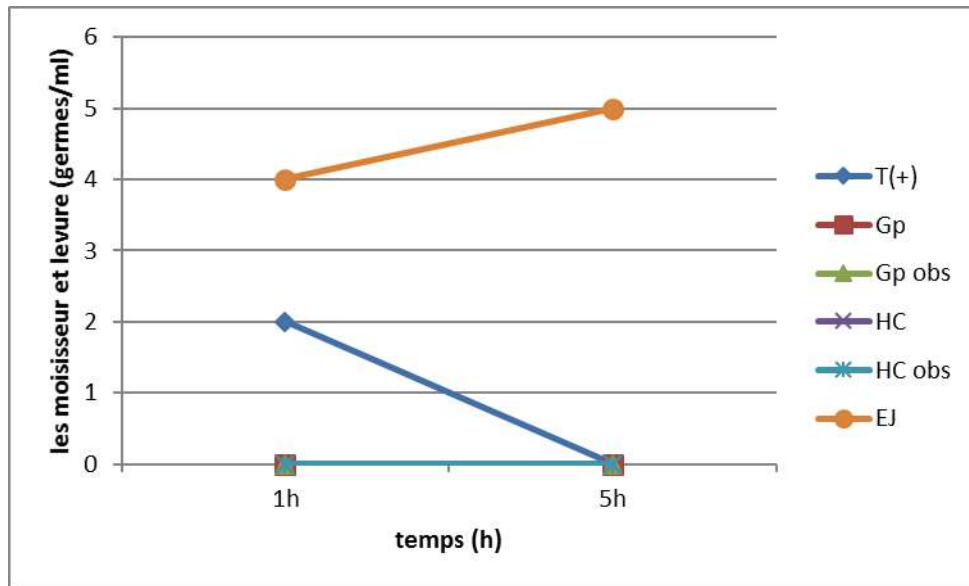


Figure 76. Évolution des levures et moisissures en fonction du temps suite au traitement avec des huiles (Gatrane) et l'hypochlorite de sodium

D'après cette figure, on remarque un effet désinfectant efficace des huiles étudiées, sur les levures et moisissures. Cette constatation est d'autant plus importante si l'on prend en considération l'effet négatif de l'eau de javel contre cette flore fongique, leur croissance se poursuit et leur taux augmente, un constat déjà rapporté antérieurement (Cf.chapitre VI).

Un abaissement significatif du taux de l'ensemble des germes a été noté après cinq heures de stockage de l'eau polluée non traitée (témoin négatif). Une inhibition totale de la croissance des coliformes fécaux, des streptocoques fécaux et de *Salmonella typhi* (exposée à la lumière ou non) est remarquée après une heure de réaction de l'eau polluée, traitée par les huiles et l'hypochlorite de sodium ; l'action de l'huile de cade semble plus efficace. Les concentrations en bactéries, à la première heure de contact sont nulles.

Quant au témoin positive au bleu de méthylène ; en présence de la lumière, ce composé est capable d'attaquer et endommager la plupart des micro-organismes présents dans le milieu sous la lumière, mais n'a aucun effet sur les microorganismes à l'obscurité (Sabbahi *et al.*, 2000 ; Cavalcante *et al.*, 2002). C'est ce qui a d'ailleurs été remarqué lors du traitement de l'eau polluée avec les extraits non alcaloïdiques de *Cassia occidentalis*, *Cassia alata*, *Carica papaya* et de *Coleus kilimandschari* (Sunda, 2012).

D'après Sunda (2012), il a été remarqué que les extraits alcaloïdiques inactivent les micro-organismes à l'obscurité et aussi en présence de la lumière. Cette inactivation pourrait être due à un effet bactéricide généré par les alcaloïdes présents dans le milieu. Le

fait que l'inactivation soit indépendante de la durée de l'exposition à la lumière, milite en faveur d'un effet bactéricide important. Dans ce contexte, nous pouvons suggérer que l'effet bactéricide constaté dans le cas du Gatrane, objet de la présente étude, serait peut-être dû à la présence des alcaloïdes. Cette hypothèse est confortée par de nombreux travaux. La présence des alcaloïdes a en effet révélé une importante activité bactéricide conduisant à l'inactivation des germes indésirables, en présence de la lumière tout comme à l'obscurité (**Lance, 2003 ; Iteman, 2004 ; Davenport, 2006**).

III.4. Désinfection de l'eau polluée par d'huile adsorbé par une surface poreuse : l'argile (effet adsorption)

On applique les mêmes étapes que celles suivies pour le 3^{ème} objectif sauf que les prélèvements d'eau sont effectués à la sortie de la STEP Les produits désinfectants sont utilisés à raison de 1ml par litre d'eau. Les analyses sont réalisées pendant les deux premières heures de réaction. Malgré leur pouvoir désinfectant non négligeable, ces produits présentent l'inconvénient de persister dans l'eau après l'action. Leur fixation sur une surface adsorbante pourrait pallier à cet inconvénient. C'est dans cette optique que s'inscrit cette dernière étape de notre recherche qui consiste en l'étude du pouvoir désinfectant de ces produits sous cette forme.

III.4.1. Méthode de fixation de l'adsorbant

Nous nous sommes inspiré sur les pratiques traditionnelles pour le choix de l'argile, matériau poreux à haut pouvoir adsorbant. Pour ce faire, nous avons broyé puis tamisé à l'aide d'un tamis (mailles de 1 à 2mm de diamètre) de laboratoire en inox de l'argile (Fig. 10 de l'annexe2), on incorpore cette argile avec les huiles étudiées (10 ml avec 50 g), on séché durant 72 heures, à température ambiante.

L'adsorbant est lavé plusieurs fois avec l'eau distillée, puis séché. Il se présente sous forme de poudre brune. Deux concentrations de ce produit final ont été utilisés. Nous les avons nommés ad1 et ad2; AD représentant de l'argile seule (milieu adsorbant) n'ayant subi aucun traitement

ad1 : 5 g de l'absorbant sont versés dans flacon de 250 ml d'eau polluée.

ad2 : 2,5 g de l'absorbant sont versés dans flacon de 250 ml d'eau polluée.

AD :5 g d'argile seule introduits dans flacon de 250 ml d'eau testée.

Cette expérience a été réalisée sous agitation à l'aide d'un agitateur rotatif (Fig. 77).

L'expression des résultats bactériologiques sont exprimés par le rapport entre les taux au temps t_i et les taux au temps t_0 , pour tous les germes testés. En parallèle, nous avons mesuré les paramètres physico-chimiques après 2 heures de réaction. En utilisant la méthode de NPP avec les coliformes fécaux et les streptocoques fécaux.



Figure 77. Expérience de l'effet désinfectant de l'eau avec les huiles adsorbantes sur support solide

III.4.2. Résultats et discussions

III.4.2.1. Paramètres physico-chimiques

Les résultats des paramètres physico-chimiques relevés après 2 heures de réaction, soit reportés dans le tableau 27 ci-dessous :

Tableau 27. Résultats des paramètres physico-chimiques des eau traitées, après 2 heures de réaction

Paramètres	T (-)	AD	EJ	Gp	Gp _{ad1}
Température (°C)	23,42	20,35	22,88	22,59	22,01
pH	6,99	8,71	8,42	5,87	7,43
Oxygène dissous (ppm)	1,02	0,56	0,29	0,18	0,22
Conductivité électrique (µs/cm)	2777	3679	4037	2688	3022
Salinité (psu)	2,00	1,95	2,14	2,00	2,00

Les résultats de tableau montrent plusieurs phénomènes qui agissent sur les produits étudiés, le paramètre le plus variable suite à une adsorption du « Gotrane » par l'argile est le potentiel hydrogène. On remarque que pH du milieu agit directement sur le milieu (pH de l'argile 8,71 et celui de l'hypochlorite de sodium 8,42) sont élevés, alcalins. Le pH d'huile de pin est acide (pH = 5,87), concernant et le milieu combiné l'argile et l'huile de pin (milieu adsorbant) son pH est neutré (pH = 7,43).

La qualité de l'eau à l'entrée et à la sortie de la STEP est variable. La teneur en oxygène dissous augmente progressivement par les aérateurs mécaniques intervenant dans

le procédé du lagunage aérée (entre 0,2 à 1,2 ppm). Après les tous les traitements cette valeur a baissé.

III.4.2.2. Paramètres bactériologiques

1. Les germes totaux au 37 °C (FMAT)

On remarque une augmentation franche a l'ensemble des produits (Fig. 78).

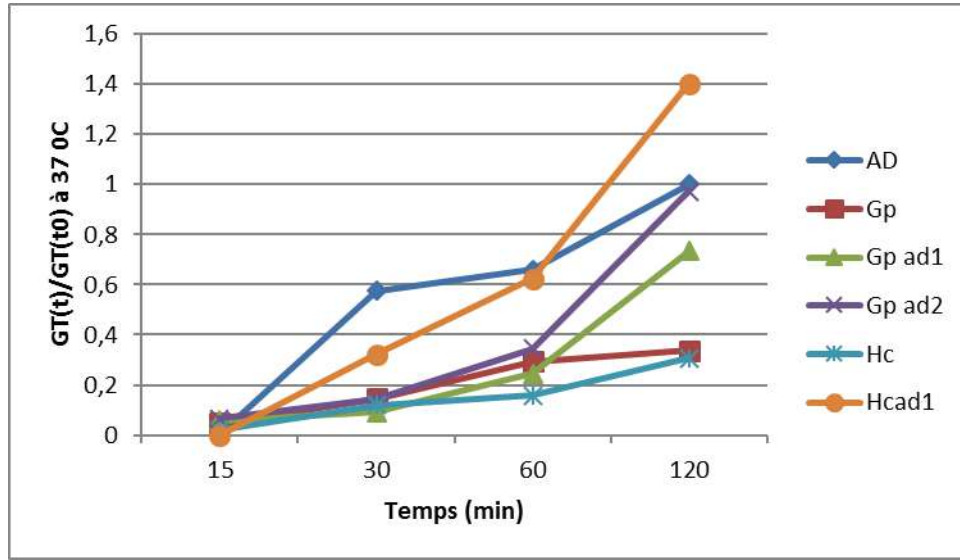


Figure 78. Évolution des germes totaux (à 37 °C) en fonction du temps suite au traitement avec des huiles adsorbant sur support solide

Où, AD : Milieu adsorbant (argile), Gp : Goudron de pin, Hc : Huile de cade, Gp ad1 : goudrons de pin adsorbant (5g/250 ml), Gp ad2 : goudrons de pin adsorbant (2,5g/250 ml), Hc ad1 : Huile de cade adsorbant (5g/250ml),

2. Coliformes fécaux (CF)

La figure 79 ci dessous illustre l'effet des divers produits sur les coliformes fécaux :

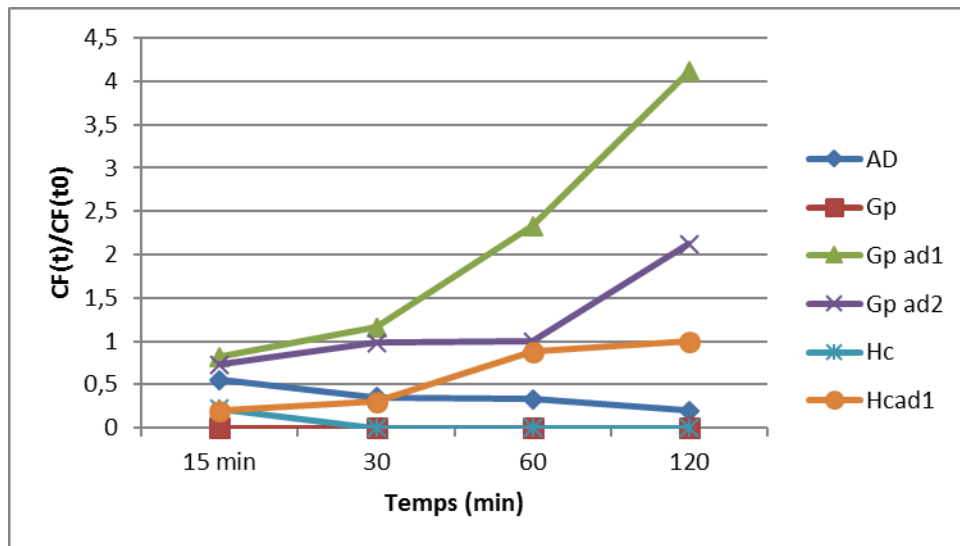


Figure 79. Évolution des coliformes fécaux (CF) en fonction du temps suite au traitement

avec des huiles adsorbant sur support solide

Où, AD : Milieu adsorbant (argile), Gp : Goudron de pin, Hc : Huile de cade, Gp ad1 : goudrons de pin adsorbant (5g/250 ml), Gp ad2 : goudrons de pin adsorbant (2,5g/250 ml), Hc ad1 : Huile de cade adsorbant (5g/250ml),

Après 15 min de réaction, un abattement net de 100% et 88% des coliformes fécaux contenus dans l'eau traité par l'huile de pin et l'huile de cade respectivement, est observé. Après 2 heures de traitement une diminution de 80% de CF, par l'échantillon traité par l'argile seul (AD). Cependant, une croissance des coliforme fécaux dont le nombre a quadruplé et doublé avec le l'huile de pin adsorbant (GPad1, et GPad2) respectivement, après 2heures de réaction.

Par rapport au « Gotrane » non adsorbé, les produits testés dans cette partie du travail (adsorption) semblent n'exercer aucun effet antibactérien à l'encontre des CF.

Les streptocoques fécaux (SF)

La figure 80 montre les résultats d'analyses d'eau sur les entérocoques fécaux.

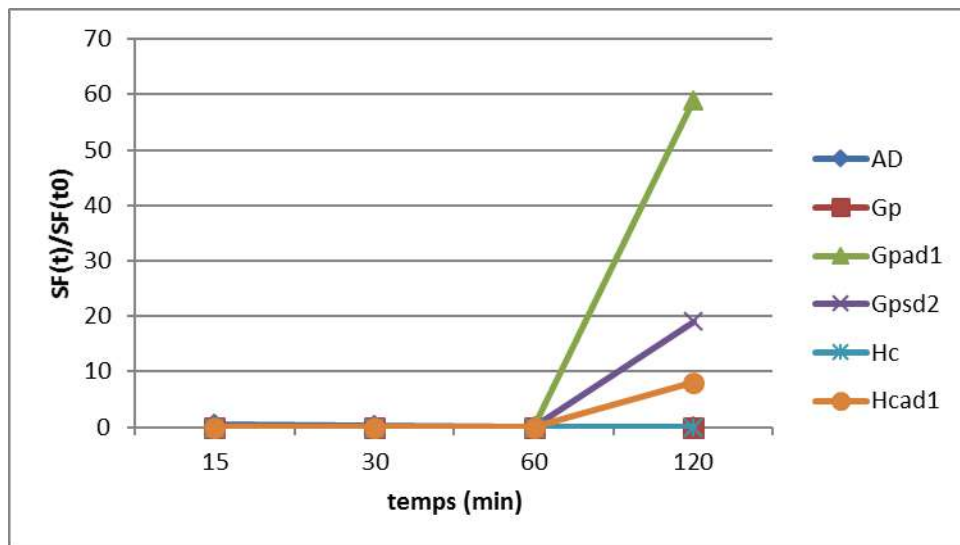


Figure 80. Évolution des Streptocoques fécaux (SF) en fonction du temps, suite au traitement avec des huiles adsorbées sur un support solide

Il en ressort que ; les huiles non adsorbées sont plus désinfectantes que celles adsorbées, qui au contraire semblent provoquer la prolifération des SF comme l'indique la figure 80. On remarque un abattement net de 100%, après 15 minutes de traitement par tous les procédés, excepté pour l'échantillon AD. Une augmentation progressive est observée après 1 heure de réaction par le traitement par les huiles adsorbées, elle est de 60, 20 et 8 fois plus sur GPad1 ; GPad2 ; et Hcad1 respectivement, après 2 heures de réaction.

3. *Salmonella typhi*

La figure 81 suivante indique les résultats des analyses de l'eau pour les *S. typhi*.

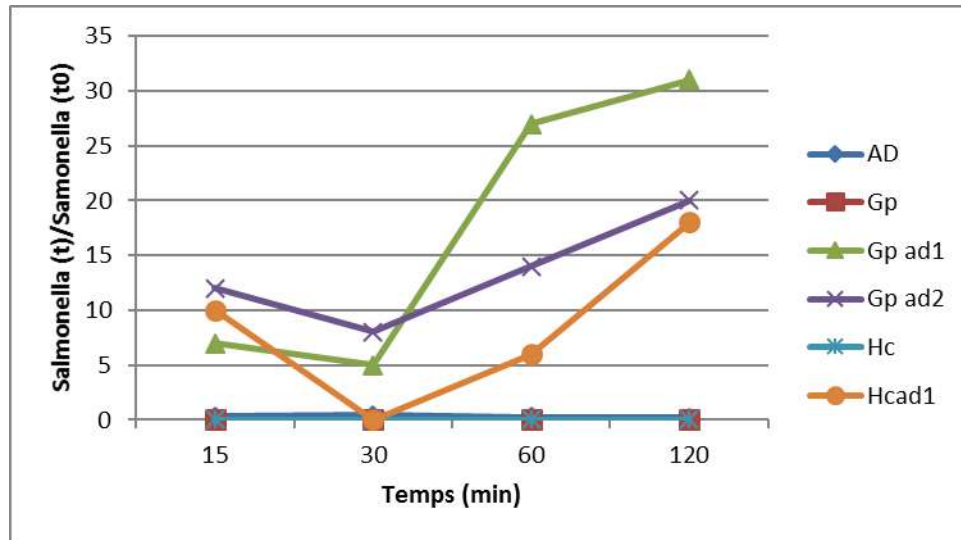


Figure 81. Évolution de *Salmonella typhi* en fonction du temps, suite au traitement avec des huiles adsorbées sur un support solide

Les résultats de figure 81, laissent voir un abattement net après 15 minutes de traitement par les huiles. Une augmentation progressive de 31 fois, 20 fois, et 18 fois est relevé pour les échantillons traités par les huiles absorbées GPad1 ; GPad2 ; et Hcad1 respectivement, au bout de deux heures de contacte.

4. *Staphylocoque aureus*

La figure 82 suivante indique les résultats des analyses de l'eau pour les *S. aureus*

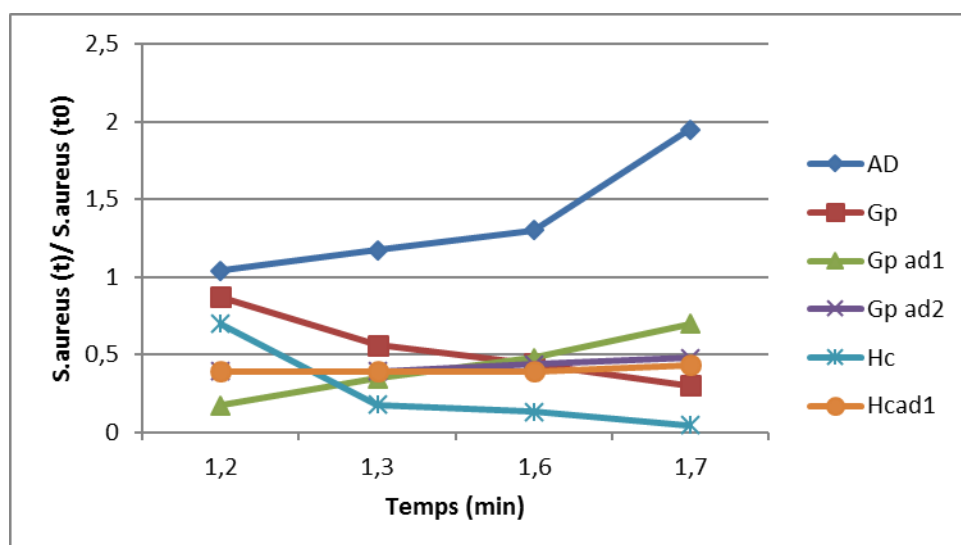


Figure 82. Évolution des *Staphylocoque aureus* en fonction du temps suite au traitement avec des goudrons adsorbés sur un support solide

Concernant les *S. aureus* une décroissance est relevée avec tous les procédés des traitements, sauf le milieu adsorbant où une augmentation (2 fois) est relevé au bout de deux heures de réaction. Toutefois l'effet désinfectant de l'huile de cade semble plus important que celui du « Gotrane » de pin

5. *Escherichia coli*

La figure 83 suivante présente les résultats des essais dans l'eau sur les *E. coli*.

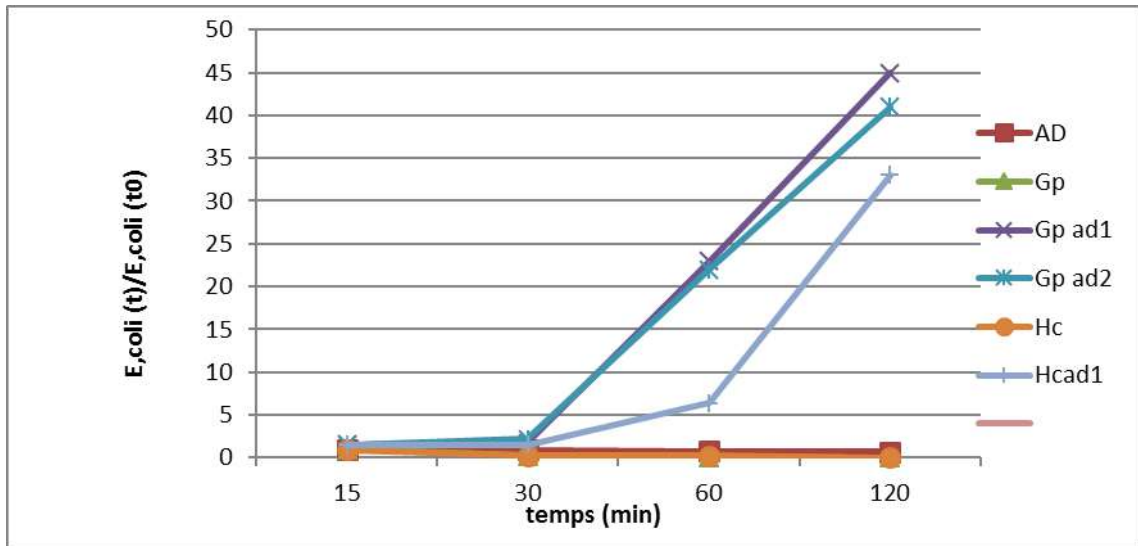


Figure 83. Évolution de *Escherichia coli* en fonction du temps suite au traitement avec des huiles adsorbées sur un support solide

La figure ci dessus représente un abattement net des *Escherichia coli* après 2 heures de réaction avec les huiles étudiées, par contre elle augmente des taux de 45,41, et 33 fois sont notés pour les milieux traités avec huiles adsorbé : GPad1 ; GPad2 ; et Hcad1 respectivement.

6. Levures et moisissures

La figure 84 ci-dessous illustre l'effet des divers désinfectants sur des levures et moisissures dans l'eau.

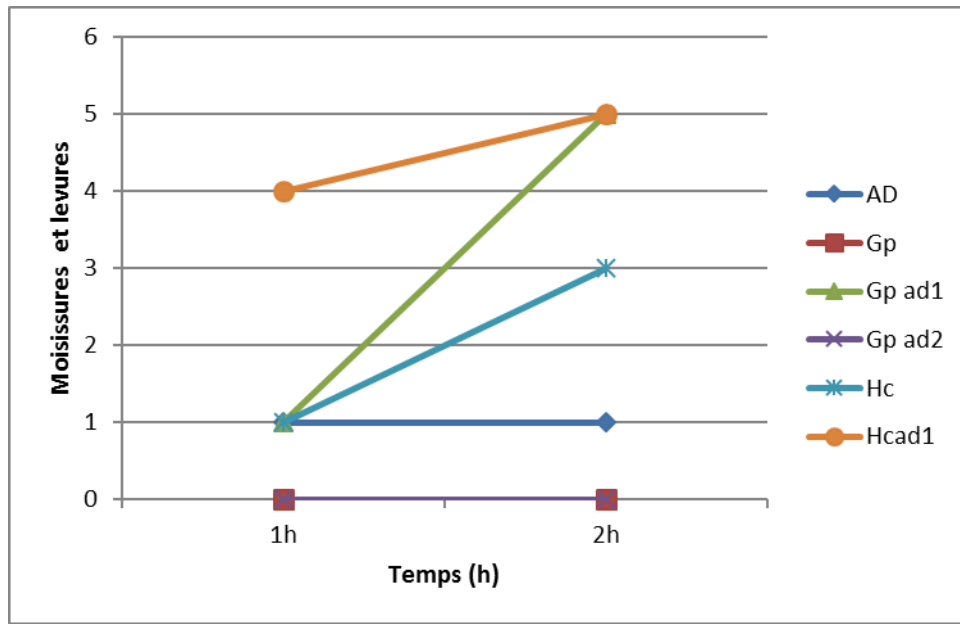


Figure 84. Évolution des levures et moisissures en fonction du temps suite au traitement avec des huiles adsorbées sur support solide

Même résultat est observé avec les levures et les moisissures, lesquels au bout d'une heure ou moins de réaction, avec les huiles adsorbées, notent une croissance exponentielle de cette flore fongique.

IV. Discussion

Ces résultats montrent que les entérocoques fécaux (GRAM+) sont plus sensibles à la désinfection par l'huile de cade et de pin que les coliformes fécaux (GRAM-). Cette différence de sensibilité pourrait être attribuée à la différence de la composition de leurs parois cellulaires. La paroi des bactéries Gram+, dépourvue de cette couche (membrane externe), est facilement détruite par les huiles. Après la destruction de la membrane, la matière active pénètre dans la cellule et attaque les constituants cellulaires. Ce qui conduit à la mort cellulaire. C'est donc la présence de la couche de lipopolysaccharides qui rend les bactéries Gram- plus résistantes à l'attaque des oxydants que les bactéries Gram+. Bien que résistante, la membrane cellulaire des bactéries Gram- finit toujours par être détruite par cette matière active. Il s'ensuit une mort certaine de la cellule bactérienne.

Les résultats rapportés par ce présent travail sont en accord avec ceux mentionnés par plusieurs auteurs. En effet, lors de l'étude de l'activité désinfectante du colorant curcumin vis-à-vis des bactéries Gram- et Gram+, **Dahl et al. (1989a)**, ont remarqué que les bactéries (GRAM +) étaient moins résistantes par rapport aux bactéries Gram-. Etudiant le pouvoir oxydant vis-à-vis des bactéries GRAM - et GRAM +. **Dahl et al. (1989b)** ont constaté que les bactéries Gram- sont plus résistantes que les bactéries

Gram+. Lors de l'étude de la désinfection de l'eau, **Rincon et Pulgarin (2004)** et **Sunda (2009)**, ont observés que les entérocoques fécaux sont moins résistants que les coliformes fécaux. Ces derniers sont moins résistants qu'*Escherichia coli*, ainsi l'ordre de sensibilité des bactéries à la désinfection de l'eau par le Gatrane, est comme suit : Entérocoques fécaux > coliformes fécaux > *E. coli*.

L'eau traitée avec l'huile de cade (ou huile de pin), a montré des abattements fort intéressants. En effet, après 60 minutes de traitement, il a été constaté une réduction de plus de 80%. Aucune inhibition significative n'a été notée après 120 minutes dans l'eau non traitée avec ces huiles (témoin). Il a été aussi constaté une inhibition complète des coliformes fécaux, des streptocoque fécaux et *salmonella typhi* après une heure de réaction pour les échantillons d'eau traités avec ces huiles. En ce qui concerne les échantillons d'eau non traités, une diminution non significative a été notée après une heure. Aucune inhibition n'a été relevée dans l'eau traitée avec l'huile adsorbée dans l'argile, par contre il y a une augmentation spectaculaire dans tous les germes étudiés, comme observé précédemment dans les poteries d'eau (la premier objectif). Cette augmentation des microorganismes corrélée avec l'augmentation de pH de solution qui contient l'argile (variation de 6,99 à 8,71 : Tableau 25).

Généralement, la sensibilité des bactéries à l'action des huiles essentielles semble augmenter avec la diminution du pH de milieu, de la température de conservation et de la concentration en oxygène dans le milieu. En effet, à pH bas l'hydrophobicité d'une huile essentielle augmente, lui permettant de se dissoudre plus facilement dans les lipides membranaires de bactéries cibles (**Mejlholm et Dalgaard, 2002**). Par ailleurs, la présence de graisse et/ou les protéines dans le milieu réduit la disponibilité des molécules actives. L'huile essentielle se dissout dans la phase lipidique du milieu, il y aura relativement moins d'huile essentielle disponible pour agir sur les bactéries. Par contre, les glucides ne semblent pas protéger les bactéries de l'action des huiles essentielles autant que les lipides et les protéines (**Burt, 2004**).

Le pH du milieu d'absorbance de l'argile est basique (pH élevé), alors que le pH de l'huile est acide, on obtient un nouveau composant (l'huile adsorbé), de pH neutre, c'est-à-dire l'hydrophobicité de l'huile est diminuée et perd de ce fait son efficacité antibactérienne.

Tout ce qui augmente la concentration d'adsorption dans le milieu, augmente la proportion de bactéries présentes, ce qui signifie qu'il y a une relation croissance entre eux. Ceci a été observé dans le milieu absorbant de l'huile de pin.

D'autre part, le séchage des huiles (ou goudrons) - se forme de milieu adsorbant- il joue un rôle important dans la perte de son pouvoir efficace des huiles essentielle, et leur matière active par l'évaporation rapide des huiles essentielle.

Le milieu adsorbant est un biofilm, les biofilms présentent ainsi une population hétérogène, structurée et fixée ce qui rend les microorganismes qui sont beaucoup moins accessibles que ceux présents dans l'eau (**Luppens et al., 2002**). Ils peuvent d'ailleurs, par leur structure, développer différents niveaux de résistance face à un biocide (**Mah et O'Toole, 2001**). Ainsi, les cellules proches de l'interface biofilm / eau, seront partiellement protégées par la matrice des exopolysaccharides et par des enzymes qui inactivent certains agents microbiens (**Phull et al., 1997**).

En d'autres termes, l'utilisation de la méthode traditionnelle est très dangereuse pour la santé humaine. En augmentant le taux des micro-organismes existant dans l'eau. Mais ces huiles peuvent être utilisées à l'extérieur de poterie ou jarre d'eau, comme un agent insecticide ou une matière de décoration, Comme le montre la figure 85.



Figure 85. Poterie d'eau décorée extérieurement avec du Gotrane

V. Conclusion

L'étude de la désinfection de l'eau avec les huiles essentielles a montré une inhibition complète des coliformes fécaux, Streptocoques fécaux, et *Salmonella typhi*, après une heure ou moins, et un abattement fort sur tous les microorganismes testés au bout de 2 h de réaction. Cet effet désinfectant des huiles est rémanent (bactériostatique), puisque reprise au bout de 24 heures de réaction

Malgré cette efficacité, aucune inhibition n'a été relevée dans l'eau traitée avec les huiles fixées sur un support solide (l'argile ; la méthode traditionnelle) par contre il y a une augmentation spectaculaire dans tous les germes étudiés, cette forme fixée, stimule la prolifération bactérienne, avec la neutralisation du pH de la solution et la perte du pouvoir efficace des huiles essentielles et leur matière active.

En d'autres termes, l'utilisation de la méthode traditionnelle est très dangereuse pour la santé humaine.

Conclusion générale

Conclusion générale

La présente étude consacrée à la désinfection de l'eau par les extraits de plantes, avait pour objectif la recherche des plantes à activité antimicrobienne. A partir de ces plantes, il s'agissait d'identifier les composés chimiques et de préciser la structure des molécules concernées. En effet, si l'utilisation des extraits de plantes est largement répandue dans la pharmacopée traditionnelle, il existe à ce jour peu d'études réalisées dans le cadre de la désinfection de l'eau par ces extraits. Nous avons pu démontrer à partir de ce travail que des plantes utilisées pour soigner certaines maladies de la peau peuvent aussi être utilisées comme agent désinfectant.

Dans cette étude, nous avons essayé de caractériser l'huile de cade (*J. oxycèdrus*), et de pin (*P. halepensis*), connu sous le nom « Gotrane ». Ce produit est utilisé par de nombreux consommateurs dans le but de préserver la qualité hygiénique de l'eau de boisson et de lui conférer une certaine sensation de fraîcheur et une saveur très appréciée. Les rameaux de ces deux plantes proviennent de la région de Djelfa située dans le Sud-Est de l'Algérie. Ces huiles obtenues par la méthode de distillation sèche (pyrogénéation) conformément à la méthode traditionnelle.

Les résultats ont permis d'identifier des composés parmi lesquels les terpènes (le Dehydroabietic acid, α -Cedrene, et Calamenene), et (Cedrane, et α -Vatirenene) représentent les composés majoritaires de l'huile de pin et de l'huile de cade. Les tests d'antagonisme ont révélé que les huiles possédaient un pouvoir antibactérien important contre les bactéries GRAM positif, et les levures (*Candida albicans*). Une activité modérée a été observée contre les bactéries GRAM négatif. Ils sont dotés d'activités fongicides très intéressantes, contre tous les champignons testés à une CMI de 1%.

Une activité anti oxydante du l'huile de pin, bien que moins accentuée que celle de l'antioxydant de référence (l'acide ascorbique), a été mise en exergue par la méthode de piégeage du DPPH, soit IC50 égales à 10,93 $\mu\text{g/ml}$ et 6,19 $\mu\text{g/ml}$, respectivement. Par contre l'huile de cade a une activité anti oxydante importante inférieure à celle de référence (4,38 $\mu\text{g/ml}$).

Les analyses ont été effectuées sur des échantillons en mesurant les paramètres physico-chimiques suivants : La température, le pH, la conductivité électrique (CE), l'oxygène dissous (DO) et la salinité, en recherchant éventuellement les germes indésirables: Germes totaux, Coliformes fécaux, Streptocoques fécaux et *Clostridium* sulfito-réducteurs, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, et *salmonella typhi*.

La recherche de meilleur milieu (verre, plastique, ou poterie) présentant un effet désinfectant a révèlé des effets égaux quel que soit le récipient utilisé. On déduit qu'aucun effet de la lumière sur la désinfection par les huiles étudiées n'est observé.

Les résultats des tests de traitement de l'eau polluée par la désinfection avec les huiles (1ml/l) montrent un abattement significatif de tous les germes ont été noté après deux heures de réaction avec l'eau polluée. Une inhibition complète a été remarquée au bout de 15 minutes de réaction de l'eau traitée par ces huiles avec les Coliformes fécaux, les Streptocoques fécaux, et les *Salmonella typhi*, on parallèle avec l'effet de l'hypochlorite de sodium. Ce dernier il perd son pouvoir inhibitrice avec les levures et moisissures.

D'autre part, le séchage des huiles sur un support (l'argile), joue un rôle important dans la perte au pouvoir efficace des huiles essentielle, et leur matière active, provoquant l'augmentation de toutes les bactéries testées. En outre que l'utilisation de la méthode traductionnelle augmente le taux des micro-organismes existant dans l'eau. Cette pollution constitue, sans doute, un danger non négligeable pour la santé des populations consommatrices de ces eaux.

Notre recherche doit être considérée comme un premier travail instigateur qui ouvre la voie vers un nouveau processus de désinfection de l'eau à partir les huiles essentielles, cependant l'application concrète de ce procédé se trouve à ce jour confrontée à de nombreuses difficultés, notamment, la toxicité des ces huiles, la quantité des composés à utiliser, le coût de production et de désinfection, et la stabilité du système à long terme. Dans ce sens, il conviendra de préciser les modalités pratiques d'application après avoir confirmé les potentialités offertes par les divers composés testés.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Adam A.**, (2009); -Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxygénase par des rhizobactéries non-pathogènes. Thèse Doc. Univ. Liège Belgique.
2. **AFNOR.**, (2000); -Huiles essentielles. Echantillonnage et méthodes d'analyse Monographies relatives aux huiles essentielles. Vol.Tome 2, Paris.
3. **A.G.1.f.f.M.**, (1991); -Faut-il maintenir une désinfection résiduelle dans les réseaux de distribution d'eau ?, Synthèse des communications exposées au cours de la journée du 13 Juin 1991 à l'institut Pasteur de Lyon , Département d'hygiène appliquée à l'homme et à son environnement, 117 p.
4. **Alliance Healthcare.**, (2007); -Répartiteur Base de données : Alliance Pharmathèque.
5. **Aouadhi Chedia**, Ghazghazi Hanene, Hasnaoui Brahim, et Maaroufi Abderrazak., (2013) ; -Comparaison de l'activité antifongique d'extraits méthanoliques de trois plantes collectées du nord- ouest de la Tunisie. Microbiol. Hyg. Alim. -Vol 25, N° 73.
6. **Aouni M**, Pelen F, and Soulimani R., (2013) ; -Etude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles et domaines d'application. Phytotherapie, 11 : 225-236.
7. **Ashour Abdul Latif.**, (1992); -Médecin à base de plantes naturelles : Herbal et plantes, Dar Al-Huda Aine Melilla, l'Algérie.
8. **Aupic M.C.**, (1985) ; -Traitement de l'eau et comportement du consommateur Thèse Méd. Dijon,74 p.
9. **Baser**, K.H.C. and G. Buchbauer., (2010); -Handbook of Essential Oils: Science. Technology, and Applications, ISBN-10. 1420063154.
10. **Baylet R.**, Sinagre F., Krim S., (1981) ; -Etude de la résistance au chlore des Salmonella isolées des eaux d'alimentation. Tech. Sei. Munie. L'eau, p :163 – 165.
11. **Belliot Anouck.**, (2007); -Huile de cade, goudron de houille, ichthyol : utilisations dermatologiques et cosmétiques. These Doc, Univ de Nantes, France.
12. **Bendjima Khadidja**, Makhloufi Ahmed, Mezouari Amina, Makhloufi Khadidja., (2020); - Antifungal activity of *Olea europaea subsp. sylvestris* tar against *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis*, the causal agent of Bayoud of the date palm in Southwest Algeria sajeb Vol 10, No 290-94.
13. **Benlarbi Larbi.**, (2019); -Contribution à l'étude de *Fusarium oxysporum f sp albedinis* agent causal de la fusariose vasculaire du palmier dattier et moyens de lutte. These Doc, Univ Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, Algérie.
14. **Bentouati A.**, (2006) ; -Croissance, productivité et aménagement des forêts de pin d'Alep (*Pinus halepensis Mill.*) du massif d'Ouled Yaagoub (Khenchela-Aurès). Thèse Doctorat, p 116 -119.

15. **Benzeid Hanane**, Gouaz Fadma, Abba Hamadoun Touré, Mustapha Bouatia, Mohamed Oulad Bouyahya Idrissi, and Mustapha Draou., (2018); -Inventory of Toxic Plants in Morocco: An Overview of the Botanical, Biogeography, and Phytochemistry Studies. *Journal of toxicology*.
16. **Bertaudiere-Montes V**, et Montes N., (2004) ; - Le genévrier, Ed Actes Sud, 12-71p
17. **Biondi, D., P.** Cianci, C. Geraci, G. Ruberto, and M. Piattelli., (1993); - *Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from sicilian aromatic plants*. *Flavour and Fragrance Journal*, 8(6): p. 331-337.
18. **Boles, B.R.** et Singh, P.K., (2008); -Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (34): 12503-12508.
19. **Boles, B.R.**; Thoendel, M. et Singh, P.K., (2004); -Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (47): 16630-16635.
20. **Bott, T.R.**, (1998); -Techniques for reducing the amount of biocide necessary to counteract the effects of biofilm growth in cooling water systems. *Applied Thermal Engineering* 18 (11): 1059-1066.
21. **Bosman B.**, Matthiesen T., Hess V., Friderichs E., (1992); -A quantitative method for measuring antipsoritic activity of drugs by the mouse tail test. *Skin pharmacol*, 5, 41-8p.
22. **Bouhdid S**, Abrini J, Baudoux D , Manresa A , Zhiri A., (2012) ; - Les huiles essentielles de l'origan compact et de la cannelle de Ceylan : pouvoir antibactérien et mécanisme d'action. *J Pharm Clin*. 31 (3) : 141-8.
23. **Boyd, B.**, C. Ford, C. Koepke Michael, K. Gary, E. Horn, S. McAnelley, and C. McAnelley., (2003); - Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *GlycoScience et Nutrition*. 4(6): p. 7.
24. **Branda, S.S.**, Vik, A.; Friedman, L. et Kolter, R., (2005); -Biofilms: the matrix revisited." *Trends in Microbiology* 13 (1): 20-26.
25. **Bridier, A.**, Briandet. R., Thomas. V., et Dubois-Brissonnet. F., (2011); -Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review." *Biofouling* 27 (9): 1017-1032.
26. **Brochot Etienne.**, (2012) ; -virus des gastro-entérites ; faculté de pharmacie ; Diaporama ; <https://slideplayer.fr/slide/9458297/>.
27. **Brözel, V.S.** et Cloete, T.E., (1991); -Fingerprinting of commercially available water treatment bactericides in South Africa. *Water Research SA* 17 (1): 57-66.
28. **Brözel, V.S.** et Cloete, T.E., (1993); -Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to 2,2'-methylenebis (4-chlorophenol). *Journal of Applied Microbiology* 74 (1): 94-99.

29. **Burri Sylvain**, Mohamed Alifriqui, Sok-Siya Bun, Carine Cenzon-Salvayre, Ibrahim Hakki Cigerci., (2018);- Des ressources naturelles à la santé : Approche interdisciplinaire de la production des goudrons de conifères et de leur usage médicinal en Méditerranée sur la longue durée. Les Nouvelles de l'archéologie, Maison des Sciences de l'Homme, 2018, Les Nouvelles de l'Archéologie, pp.62-6
30. **Cahagnier B** and Richard-Molard D., (1998) ; - Moisissures des aliments peu-hydratés, les moisissures. Collection sciences et techniques agroalimentaires ed : Lavoisier.
31. **Calvert Churn C.**, Bates R.C. Boardman G.D., (1983); -Mechanism of chlorine Inactivation od DNA containing Parvovirus H.1 Appl.Envir. Microbiol.,46, (6):1394 - 1402
32. **Canton E.**, Pema N., Viudes G., Gobernado M. and Espinel-Ingroff A., (2003); - Minimum fungicidal concentration of amphotericin B for bloodstream Candida Species. Diagn. Microbial. Infect. Dis; 45 :203-206.
33. **Cantor K.P.**, Hoover R., Hartgel P., Mason T.J., (1990); -Silverman D. Blader cancer, tap water consumption and drinking water source. In: Water chlorination, Jolly R.L., Brungs W.A., Cummings R.B, Eds. Lewis publish., Chelsea, Mich, USA, Vol.6: 411 – 419
34. **Chalchat J.C.**, Garry R.P., Michet A., (1988); -Chemical composition of the hexane fraction of empyreumatic wood oils from Juniperus oxycedrus and Juniperus phoenica L. Flavour fragrance J , 3, 19-22
35. **Chami, F.**, (2005) ; -Evaluation in vitro de l'action antifongique des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composés majoritaires in vivo : Application dans la prophylaxie et le traitement de la condidose vaginale sur des modèles de rat et de souris immunodéprimés. Thèse de Doctorat, Université Sidi Mohamed Ben Abdallah- Fès.
36. **Chang S.L.**, Berg G., Clarke N.A, Kabler R.W., (1986); - Survival and protection against chlorination of human enteric pathogens in free-living nematodes isolated from water supplies. Am. J. Trop. Med. and Hyg, p: 136 - 142
37. **Chang, S.-T.**, S.-Y. Wang, C.-L. Wu, Y.-C. Su, and Y.-H. Kuo., (1999);- Antifungal compounds in the ethyl acetate soluble fraction of the extractives of Taiwania (Taiwania cryptomerioides Hayata) heartwood. Holzforschung. 53(5): p. 487-490.
38. **Charles**, Denys J, Peppermint., (2013); -in Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources. Springer New York. p. 469-475.
39. **Chen, X.** et Stewart, P.S., (1996); -Chlorine Penetration into Artificial Biofilm Is Limited by a Reaction Diffusion Interaction. Environmental Science & Technology 30 (6): 2078.
40. **Chevala.**, (1982) ; -La désinfection des eaux de consommation AFEE, Centre National pour l'étude des eaux, , 117 p.
41. **Chuyen C.**, (1985) ; -Sur la composition des essences de genévrier commun de l'oxycèdre et du goudron de cade. Thèse Doctorat Pharmacie, , Marseille.

42. **Christensen, B.E.** et Characklis, W.G., (1990); -Physical and chemical properties of biofilms. Biofilms. Characklis WG & Marshall KC, New York, John Wiley and Sons.
43. **CJB.**, (2020) ; -Base de données des plantes d'Afrique - Ville de Genève : <https://www.ville-ge.ch> > CJB > Base de données > Africa.
44. **Cliver D.O.**, (1985); -Significance of water and environment in the transmission of virus disease. In "Enteric viruses in water", MELNICK J.L. Monog. Virol., 15.: 30 – 42.
45. **Collin J.F.**, Aupic M.C., Cherrier M., Boulange M., (1986) ; - Influence de la chloration de l'eau sur le comportement des usagers Water Supply, , Q., vol.4: 173 -182
46. **Communicable Disease.**, (1984); -Repport. Great Britain Surveillance, Community Medecine, Q.: 238 - 241.
47. **Costerton, J.W.**, (2007); -"The biofilm primer". Springer. Berlin Heidelberg New-York.
48. **Costerton, J.W.**, Cheng, K.J.; Geesey, G.G.; Ladd, T.I.; Nickel, J.C.; Dasgupta, M. et Marrie, T.J., (1987) ; - Bacterial Biofilms in Nature and Disease. Annual Review of Microbiology 41 (1): 435-464.
49. **Courvalin, P.**, H. Drugeon, J.P. Flandrois, and F. Goldstein., (1990); - Bactericide, Aspects théoriques et thérapeutiques.: p. 110.
50. **CRAUN G.F.**, (1981);-Outbreaks of waterborne disease in the United States (1971-1978) J. Am. Water Works Assoc., 80: 360 - 367.
51. **Daniel F.B.**, Ringhand H.P., Robinson M., Stober J.A., Olson G.R. Page N.P., (1991);- Comparative subchronic toxicity of chlorine and monochloramine in the B6C3F1 mouse. JAWWA, , 93, (11): 68- 75.
52. **De Beer, D.**; Srinivasan, R. et Stewart, P.S., (1994); -Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. Appl. Environ. Microbiol. 60 (12): 4339-4344.
53. **Derreumaux A.L.**, Jadin J.B., Willaert E., Moret R., (1974) ;- Action du chlore sur les amibes de l'eau. A1in. Soc. Belge Med. Trop., , 5 4 : 415 – 428.
54. **Degremont.**, (1989) ; -Mémento technique de l'eau, tome I, tome II, 5^{eme} édition, France.
55. **Djenadi F.**, (2011) ;- Contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne du genévrier (*Juniperus phoenicea*) : essai des huiles essentielles et composés phénoliques. Mémoire de Master en biologie, Université A Mira de Béjaia, Algérie, 31 p.
56. **Donlan, R.M.** et Costerton, J.W., (2002); - "Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms." Clinical Microbiology Reviews 15 (2): 167-193.
57. **Dorman, H.** and S. Deans., (2000); -Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of applied microbiology. 88(2): p. 308-316.

- 58. Dorvault F.**, (1994);- L'officine. Vigot Ed, 23^{ème} Ed, Evreux.
- 59. El Haissoufi H.**, Berrada S., Merzouki M., Aabouch M., Bennani L., Benlemlih M., Idir M., Zanibou A., Bennis Y., El Ouali lalami A., (2011) ; - Pollution des eaux de puits de certains quartiers de la ville de Fès, Maroc, Rev. Microbiol. Ind. San et Environn, Vol 5, N°1, PP : 37-68.
- 60. Engelbrecht R. S.**, Weber M.J., Salter B.L., Schmidt C.A., (1980); - Comparative Inactivation of Viruses by Chlorine. Appl. Envir. Microbiol., vol. 40, 2 : 249 – 256.
- 61. Emmanuel Lucas.**, (2000);-Un produit d'avenir en thérapeutique dermatologique : le distillat moléculaire de cade. Thèse Doctorat Pharmacie, Montpellier.
- 62. Essawi T** and Srour M., (2000); -Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. J. Ethnopharmacol, 70, 343-349.
- 63. Ettahir Aziz**, Oumaima ninich, Abdellaziz Chaouch., (2020) ; -Valorisation des goudrons végétaux au Maroc : Aspects biochimique et usage médicinal
- 64. Evins C.**, Greaves G.F., (1979);- Penetration of water treatment works by animais. Water research centre (W.R.C), TR 115, april : 1 - 33
- 65. Eymard S.**, (2003) ; - Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et la transformation chinchard (*Trachurus trachurus*), choix des procédés. Thèse de doctorat en génie des procédés, Nante, France, 58 p.
- 66. Fauris C.**, Danglot C., Vilagines R., (1986) ; -Inactivation of viruses by disinfection methods IWSA-AIDE, Atelier Internat : Desinfection eau, Mulhouse, France : 9 – 31.
- 67. Fernet P.**, Huerre R., (1936) ; - Traitement externe des dermatoses. Etude des produits chimiquement définis ou de composition complexe employés en dermatologie. Nouvelle pratique dermatologique. Ed Masson et Cie ; tome VIII : 458-548
- 68. Fiorenza, S.** et Ward, C.H., (1997) ; - Microbial adaptation to hydrogen peroxide and biodegradation of aromatic hydrocarbons. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 18 (2): 140-151.
- 69. Flemming, H.-C.**, Murthy, P.S., Venkatesan, R. et Cooksey, K., (2009); -Why Microorganisms Live in Biofilms and the Problem of Biofouling". Marine and Industrial Biofouling, Springer Berlin Heidelberg, 4: 3-12.
- 70. Gall Y.**, Litoux P., (1989) ; -Les goudrons en pratique dermatologique. Bulletin d'esthétique Dermatologique et Cosmétologique, , 48, 25-35.
- 71. Geesey, G.G.**, (1982); -Microbial exopolymers: Ecological and economic considerations." American Society for Microbiology News 48 (1): 9-14.
- 72. Gérard L**, Vaillant L., (1995) ; -Traitements locaux en dermatologie. Coll. Dermatologie pratique, 174-178.

73. **Gernandt** David S., Gretel Geada LópezSol., Ortiz GarcíaAaron., Liston., 2005. Phylogeny and classification of Pinus. *Taxon*. 54. 29-42.
74. **Gernandt** David S., Susana Magallón, Gretel Geada López, Omar Zerón Flores, Ann Willyard, and Aaron Liston.,(2008);-Use of Simultaneous Analyses to Guide Fossil-Based Calibrations of Pinaceae Phylogeny.
75. **Gerba**, CP, Wallis, C. and Mel nick. J.L., (1975); - Faste of waste-water bacteria and viruses in soil. *J. Irrig.Drain. Div., ASCE*, Vol. 101, P. 157-174
76. **Ghetas N.**, (2007) ;- Epuration des eaux usées : cas de la ville de Touggourt, thes, Ing, Eco, Univ.de Ouargla.
77. **Ghanmi M.**, el abid A., Chaouch A., aafi A., el alami A. & aberchane M., (2009) ; - Caractérisation chimique de l'essence de térébenthine du pin mari- time (*Pinus pinaster*) et du pin d'Alep (*Pinus halepensis*) du Maroc, *Annales de la recherche forestière*, 40 : 95-102.
78. **Ghedira K**, Goetz P., (2008) ; - Le Jeune R, *Plantago major L.* et *Plantago lanceolata L.* (*Plantaginaceae*). *Phytother*, 6, 367-371.
79. **Goudjil Mohamed Bilal.**, (2016) ; - Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de trois plantes aromatiques., thèse Doc., Univ Kasdi Merbah, Ouargla, Algérie.
80. **Guit Brahim**, et Bouzid Nedjimi., (2020) ;- Croissance radiale du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) en fonction des paramètres stationnels dans les massifs forestiers naturels de l'Atlas saharien algérien. *Bois & forets des tropiques*, 345 (3) : 3–13.
81. **Gulluddec Christèle**, (1995) ; -La désinfection par le chlore des eaux destinées à la consommation humaine, Thèse de doctorat en pharmacie.
82. **Haas C.N.**, Engelbrecht R.S., (1980); -Physiological alterations of vegetatives microorganismes resulting from chlorination *J. W. P. C, F* , 52: 1976 – 1989
83. **Haddouchi F**, Lazouni H, Ahammer K.A, Carson C.F. & Riley T.V., (1999); - Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*.
84. **Hall, B.G.**, (1990); -Spontaneous Point Mutations That Occur More Often When Advantageous Than When Neutral." *Genetics* 126 (1) : 5-16.
85. **Hamba A.**, (1982) ; -Cadier et huile de cade (*Juniperus oxycedrus L.* et *Pix Cadi*). Thèse Doctorat Pharmacie, Montpellier
86. **Hauchman F.S.**, Noss C.I., Olivieri V.P., (1986); -Chlorine dioxyde reactivity with Nucleic Acids *Wat. Res*, 20, (3): 357 – 361.
87. **Heinzel M.**, (1988); -The phenomena of resistance of disinfectants and preservatives. In: Payne KR (Ed) *Industrial Biocides* (pp 52-67). John Wiley and Sons, Chichester

88. **James M.** Vaughn, Yu-Shiaw Chen, Mc Harrell Z. Thomas., (1986); - Inactivation of Human and Simian Rotaviruses by Chlorine. *Appl. Envir. Microbiol.*, vol.51, p: 391 - 394
89. **Jensen H.**, Thomas K., Sharp D.G., (1980); -Inactivation of Coxsackievirus B3 and B5 in Water by Chlorine. *Appl. Envir. Microbiol.* vol.40, .3.: 633 – 640
90. **Javanmardi, J.**, C. Stushnoff, E. Locke, and J. Vivanco., (2003);-Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food chemistry.* 83(4): p. 547-550.
91. **Julia A.** Kiehlbauch, George E. Hannett, Max Salfinger, Wendy Archinal, Catherine Monserrat, and Cynthia Carlyn., (2000);- Use of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) Guidelines for Disk Diffusion Susceptibility Testing in New York State Laboratories, *J Clin Microbiol*, 38(9): 3341–3348.
92. **Kadik B.**, (1987) ; - Contribution à l'étude du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) en Algérie. *Ecologie, dendrométrie, morphologie.* Alger, Algérie, Office des publications universitaires, 580 p.
93. **Kadik-Achoubi L.**, (2005) ; - Etude phytosociologique et phytoécologique des formations à pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) de l'étage bioclimatique semiaride algérien. Thèse de doctorat, USTHB, Alger, 341 p.
94. **Kaneko M.**, and Igarashi H., (1983);- Effects of suspended solids on inactivation of poliovirus by chlorine. *Wat. Sei. Tech*, 15.: 137 - 143
95. **Kemassi R.**, Azouzi H., (2017) ;-Etude de la potentialité antifongique de l'extrait aqueux d'*Asphodelus tenuifolius* sur quelque champignons des céréales.,Mém MAS, Univ Ouargla, Algérie.
96. **Kuljanac I.**, Knezevic E., Cvitanovic H., (2006);-Epicutaneous patch test results in patients with allergic contact dermatitis in Karlovac county : a retrospective surve, *Acta Dermatovenerol. Croat*, 14, 156-9
97. **kurt Y.** & isik K., (2012); -Comparison of tar produced by traditional and laboratory methods, *Ethno-Medicine*, 6-2: 77-83. www.krepublishers.com/.../S-EM-06-2-077-12-227-Kurt-Y-Tt.pdf.
98. **Lachat B.**, (1990) ; - *Juniperus oxycedrus* L ; Le cadier et son huile ; Thèse, Doctorat Pharmacie, Besançon
99. **Lahlou, M.**, (2004); -Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, 18(6): p. 435-448.
100. **Lambert, R.**, P.N. Skandamis, P.J. Coote, and G.J. Nychas, A., (2001); -*study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol.* *Journal of applied microbiology.* 91(3): p. 453-462.

101. **Leclerc H.**, Festy B., (1982) ; - Lazar P. Connaissances actuelles de la pathologie hydrique Rev. Epidém. et Santé , 30 : 363 - 385.
102. **Leclerc H.**, Mossel D.A.A., (1989) ; - Microbiologie, le tube digestif, l'eau et les aliments Ed. DOIN,529 P.
103. **Lenntech BV.**, (2020) ;- Purification et traitement de l'eau Holding B.V. Février 2020
104. **Levi, Y.**, (2001) ; -Écologie microbienne des réseaux d'eau potable et risque microbiologique : l'exemple de Legionella pneumophila." Revue Française des Laboratoires 2001 (336): 33-37.
105. **Lewis, K.**, (2001); -Riddle of Biofilm Resistance.Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45 (4): 999-1007.
106. **Liu O.C.**, Seraichekas H.R., Akim E.W., Brashear D.A., Katz E.L., Hill W.J., (1971); - Relative resistance of Twenty Human Enteric Viruses to free Chlorine in potomac Water. In proceedings 13th Water quality Conference, Virus and Water Quality: Occurrence and contrai, University of Illinois, Bulletin N° 69, Urbana, 1971:171-195.
107. **LMS.**, (2017) ;- World Water Treatment. « Désinfection de l'eau ».
108. **López Gretel Geada**, Koichi Kamiya, and Ko Harada., (2002) ;- Phylogenetic relationships of Diploxylon pines (Subgenus Pinus) based on plastid sequence data. International Journal of Plant Sciences. 163. 737-747.
109. **Louppe Dominique.**, (2014) ;- Fabrication du charbon de bois CIRAD UPR BASEF
110. **Lucas E.**, (2000) ; -Un produit d'avenir en thérapeutique dermatologique : le distillat moléculaire de cade ; Thèse, Doctorat Pharmacie, 2000, Montpellier
111. **Lorette G**, et Vaillant L., (1995) ; -Traitements locaux en dermatologie ; Coll. Dermatologie pratique, 174-178
112. **Luppens, S.B.I.**, Reij, M.W., van der Heijden, R.W.L., Rombouts, F.M. et Abee, T. (2002); -Development of a Standard Test To Assess the Resistance of Staphylococcus aureus Biofilm Cells to Disinfectants.Appl. Environ. Microbiol. 68 (9): 4194-4200.
113. **Mah, T.-F.C.** et O'Toole, G.A., (2001); -Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in Microbiology 9 (1): 34-39.
114. **Mai-Prochnow, A.**; Lucas-Elio, P.; Egan, S.; Thomas, T.; Webb, J.S.; Sanchez- Amat, A. et Kjelleberg, S., (2008); -Hydrogen Peroxide Linked to Lysine Oxidase Activity Facilitates Biofilm Differentiation and Dispersal in Several Gram-Negative Bacteria." Journal of Bacteriology 190 (15): 5493-5501.
115. **Maire R.**, (1952) ; - Flore de l'Afrique du Nord. Encyclopedie Biologique. Paris, pp.129-150.

- 116. Makhloufi A**, Belhadef M, Cherouili K, Fethi M., (2018); - Physico-chemical Analysis and Microbial Quality of Three Date Cultuvars Grown in Aoulef Oasis of Adrar Region. *Applied Biology in Saharan Areas* 2(1) :6-10.
- 117. Mann C.M**, & Markham J.L., (1998); - A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*.
- 118. Mann, C.M.**, S.D. Cox, and J.L. Markham., (2000);-The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Letters in Applied Microbiology*, 30(4): p. 294-297.
- 119. Mansri N.**, satrani B., ghanmi M., el ghadraoui L., guedira A. & aafi A., (2011a) ; - Composition chimique et biologique des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea ssp. lycia et Juniperus phoenicea ssp. turbinata* du Maroc, *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 15-3 : 415-424.
- 120. Mansouri N.**, satrani B., ghanmi M., el ghadraoui L., guedira A. & aafi A., (2011b) ; - Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Juniperus communis* du Maroc », *Bulletin de la Société royale des sciences de Liège*, 2011, 80 : 791-805.
- 121. Martin J.** Blaser, Paul F. Smith, Wen-Lan L., Wang, John C. Hoff., (1986); - Inactivation of *Campylobacter* Jejun by chlorine and monochloramine. *Appl. Envir. Microbiol.*, vol. 51, p: 307 – 311.
- 122. McDonnell, G.** et Russell, A.D. (1999). "Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance." *Clinical Microbiology Reviews* 12 (1): 147-179.
- 123. Mc Fetters G.A.**, (1983); -Camper A.K. Enumeration of bacteria exposed to chlorine *Adv. Appli. Microbiol*, 29: 177 - 193
- 124. Mehani, M.**, N. Salhi, T. Valeria, and S. Ladjel., (2014); - Antibacterial and Antifungal Activity of Essential Oil of *Eucalyptus camendulensis* on a Few Bacteria and Fungi. *Int J Biol Biomol Agr Food Biotech Eng.* 08(08): p. 916-919.
- 125. Mezouari A.**, A. Makhloufi, K. Bendjima, L. Benlarbi, A. Boulanouar, K. Makhloufi and M.D. Jesús Gonzalez., (2019); - Antifungal activity of *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* tar on *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, the cause of Bayoud Disease of the date palm in Southwest
- 126. Miguel M.G.**, (2010); - Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: Short Review. *Molecules*, 15(12), pp.9252–9287.
- 127. Millezi, A.F.**, D.S. Caixeta, D.F. Rossoni, M.d.G. Cardoso, and R.H. Piccoli., (2012);- In vitro antimicrobial properties of plant essential oils *thymus vulgaris*, *cymbopogon citratus* and *laurus nobilis* against five important foodborne pathogens. *Food Science and Technology (Campinas)*. 32 : p. 167-172.
- 128. Ministère Charge De La Sante** Les eaux d'alimentation de France : La désinfection des eaux par le chlore. DDASS, Fiche technique n°3

- 129. Mohammadi, Z.** and F. ATIK., (2012) ;- Pouvoir antifongique et antioxydant de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* L. Revue «Nature & Technologie».: p. 35.
- 130. Morcia, C.,** M. Malnati, and V. Terzi., (2012); -In vitro antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 29(3): p. 415-22.
- 131. Moreira, M.R.,** A.G. Ponce, C.E. del Valle, and S.I. Roura., (2005);-Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. LWT - Food Science and Technology, 38(5): p. 565-570.
- 132. Morton, L.H.G.;** Greenway, D.L.A.; Gaylarde, C.C. et Surman, S.B., (1998); - Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. International Biodeterioration & Biodegradation 41 (3-4): 247-259.
- 133. Mousseron M.,** Granger R., Ronayroux M., (1939) ;- Sur la constitution de l'essence et de l'huile pyrogénée de *Juniperus oxycedrus* L.C.R. Acad. Sci., ; 208 : 1411-1413
- 134. Ousseron M.,** Granger R., Ronayroux M., (1939) ; - Sur la constitution de l'essence et de l'huile pyrogénée de *Juniperus oxycedrus* L.C.R. Acad. Sci ; 208 : 1411-1413
- 135. O'Toole, G.;** Kaplan, H.B. et Kolter, R., (2000); -Biofilm formation as microbial development. Annual Review of Microbiology 54 (1): 49-79.
- 136. Oussou Kouamé Raphaël,** Coffi Kanko Nathalie Guessend Séri Yolou Gérard Koukoua Mireille Dosso Yao Thomas N'Guessan Gilles Figueredo Jean-Claude Chalcha., (2004);- Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire, Académie des sciences. Publié par Elsevier SAS.
- 137. Payment P.,** Trudel M., (1985); - Elimination of Viruses and Indicator Bacteria at Each Step of Treatment during Preparation of Drinking Water at Seven Water Treatment Plants. Appl. Envir. Microbiol. vol. 49, p: 1418 - 1428
- 138. Peterson D. A.,** Hurley T.R., Hoff J.C., Wolfe L. G., (1983); - Effect of Chlorine Treatment on Infectivity of Hepatitis A Virus. Appl. Envir. Microbiol., vol. 45,p: 223 - 227
- 139. Phull, S.S.;** Newman, A.P.; Lorimer, J.P.; Pollet, B. et Mason, T.J., (1997); -The development and evaluation of ultrasound in the biocidal treatment of water." Ultrasonics Sonochemistry 4 (2): 157-164.
- 140. Pibiri M.C.,** (2005) ;- Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle. Thèse de doctorat. Polytechniques Fédérale de Lausanne. 66 p.
- 141. Ponce A. G.,** Fritz R., del Valle C. E. et Roura S. I., (2003); - Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie, 36: 679-684.

- 142. Porte L.**, (1994) ; -Fours à cade, fours à poix dans la Provence littorale, Ed Les Alpes de Lumière, 3-26.
- 143. Prasad R.** and K. Kapoor., (2004);- Multidrug Resistance in Yeast *Candida*, in International Review of Cytology. Academic Press. p. 215-248.
- 144. Price R.A.**, Liston A., Strauss S.H., (1998);- Phylogeny and systematic of *Pinus*. In: Richardson D.M. (Ed.) Ecology and Biogeography of *Pinus*. Cambridge University Press. Coambrige (UK): 49-68.
- 145. Quézel P.**, (1986) ; -Les pins du groupe-*Halepensis*|| Ecologie, Végétation, Ecophysologie. CIHEAM- Options Méditerranéennes. pp. 11-23.
- 146. Quézel P & Médail F.**, (2003) ; -Écologie et biogéographie des forêts du bassin méditerranéen. Elsevier (collection environnement), Paris : 573 p.
- 147. Quézel P & Santa S.**, (1962) ; - Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I. CNRS, Paris: 1-570 + 65 planches h.-t.
- 148. Rhafouri R.**, satrani B., Zair T., ghanmi M., aefi A., el omari M. & bentayeb A., (2014); -Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of *Cedrus atlantica* (Endl.) Manettiex Carrière seeds essential oil, Journal of Medicinal Chemistry,3-5:1034-1043.
- 149. Richard Alan. Price.**, Liston A., Strauss S.H., (1998); - Phylogeny and systematic of *Pinus*. In Richardson D.M. (Ed.) Ecology and Biogeography of *Pinus*. Cambridge University Press. Cambridge (UK). 49-68.
- 150. Rodier, Jean,** et Bernard Legube., (2009) ; - L'analyse de l'eau. Dunod, 1526 p.
- 151. Roesyanto I.**, Van Der Akker T., Van Joost T., (1990); - Wood tars allergy, cross-sensitization and coal tar; Contact Dermatitis. 22, 95-8
- 152. Rouessac Francis.**, (1997) ; -Analyse chimique : méthodes et techniques instrumentales modernes., Masson, 123 p.
- 153. Roy D.**, Wong P.K.Y., Engelbrecht R.S., Chian E.S.K., (1981); - Mechanism of enteroviral inactivation. Appl. Envir. Microbiol., 11. (3): 718 - 723
- 154. Satrani B.**, aberchane M., farah A., chaouch A. & talbi M., (2006) ; -Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites par hydrodistillation fractionnée du bois de *Cedrus atlantica* Manetti. Acta Botanica Gallica, 153-1 : 97-104.
- 155. Satrani B.**, farah A. & talbi M., (2004) ; -Composition chimique et activité antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle extraite du bois de *Tetraclinis articulata* du Maroc, Annales des falsifications de l'expertise chimique 964 : 75-84.
- 156. Schmidt M.H.**, Korting C., (1996); - Coal tar, pine ta rand sulfonated shale oil preparations: comparative activity, efficacy and safety. Dermatology, 193, 1-5

- 157. Schoket B.**, Horkay I., Kosa A., Paldeak L., Hewer A., Grover Pl., Phillips Dh.,(1990);- Formation of DNA adducts in the skin of psoriasis patients, in human skin organ culture, and in mouse skin and lung following topical application of coal tar and juniper tar J. Invest. Dermatol. 94, 241-6
- 158. Schulte, S.;** Wingender, J. et Flemming, H.C., (2005); -Efficacy of biocides against biofilms". Directory of microbicides for the protection of materials and processes. Paulus W. -, Kluwer academic, Doorrecht, The Netherlands : 90-120.
- 159. Schwartzbrod L.**, (1991) ; -Virologie des milieux hydriques. Ed. Tee et Doc, Lavoisier, 303p.
- 160. Sinigre F.**, Baylet R., Chapat M., (1975); -Salmonella isolées des eaux d'alimentation. Rev. Epidém., Méd. soc. et Santé Publ., t. 23, 7-8: 469 - 474
- 161. Smith H.V,** Patterson W.J, Hardie R, Greene L.A, Benton C, Tulloch W, Gilmour R.A, Girdwood R.W, Sharp J.C, and Forbes G.I., (1989);- An outbreak of waterborne cryptosporidiosis caused by post treatment contamination. Epidemiology and infection; 103(3): 703 - 715
- 162. Snow J.**, (1855); -On the mode of communication of choiera. 1vol., 2nd Ed., John Churchill, London.
- 163. Snow J,** Richardson B W, Forst W H., (1936); -Snow on cholera; being a reprint of two papers; On the mode of communication of cholera; On continuous molecular changes., Oxford University Press, New York London.
- 164. Staberg B.**, Klemp P., (1984); - Skin blood flow in psoriasis during Goeckerman or beech tar therapy. Acta. Derm. Venereol. 64, 331-64
- 165. Stewart, P.S.;** Grab, L. et Diemer, J.A., (1998); -Analysis of biocide transport limitation in an artificial biofilm system." Journal of Applied Microbiology 85 (3): 495-500.
- 166. Sunda M.**, Rosillon F. et Taba K.M., (2008) ; - Contribution à l'étude de la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec les extraits de plantes, Eur. Jour. of Water Quality, Tome 39, Fasc. 2, p. 199-209
- 167. Sunda M.**, Rosillon F., Taba K.M. et Lami N., (2009) ; - Désinfection de l'eau par photosensibilisation avec les huiles essentielles de Citrus bergamia, Citrus reticulata et Citrus limonum, 8ième congrès International du Gruttee, Nancy, Actes p. 86-89.
- 168. Sutherland, I.W.**, (2001); -Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework." Microbiology 147 (1): 3-9.

- 169. Terfaya B.**, A. Makhloufi, A. Mekboul, L. Benlarbi, D. Abdelouahid., (2017);- Antifungal Activity of Juniperus oxycedrus Tar; Growing Wild in North-west of Algeria. Applied Biology in Saharan Areas Vol. 1, N. 1, p. 33-36.
- 170. Terzi, V.**, G. Tumino, A.M. Stanca, and C. Morcia., (2014);- Reducing the incidence of cereal head infection and mycotoxins in small grain cereal species. Journal of Cereal Science, 59(3): p. 284-293.
- 171. Toshiko H**, Shiraishi A, Furuse S, Inoue Y, Hamashima H, Masuda K, Shiojima K, Shimada J., (2003);- Inhibitory effects of terpene on the growth of Staphylococcus aureus. Nature Medicine, 57: 464-467.
- 172. Yilmaz, E.S.**, M. Timur, and B. Aslim, (2013);- Antimicrobial, Antioxidant Activity of the Essential Oil of Bay Laurel from Hatay, Turkey. Journal of Essential Oil Bearing Plants, . 16(1): p. 108-116.
- 173. Van Bambeke F**, et P. Tulkens., (2008) ;-Pharmacologie et pharmacothérapie anti-infectieuse
- 174. Van der Doelen, G.A.**, (1999); -Molecular studies of fresh and aged triterpenoid varnishes. Thèse Doc, Univ d'Amsterdam, Pays-Bas.
- 175. Venkobachar C.**, Iyengar L., Prabhakara Rao A. V.S., (1975) ; -Mechanism of disinfection. Water res9,: 119 – 124.
- 176. Viera, M.R.**; Guiamet, P.S.; de Mele, M.F.L. et Videla, H.A., (1999); -Use of dissolved ozone for controlling planktonic and sessile bacteria in industrial cooling systems." International Biodeterioration & Biodegradation 44 (4): 201-207.
- 177. Villaño, D.**, M.S. Fernández-Pachón, M.L. Moyá, A.M. Troncoso, and M.C. García-Parrilla., (2007); - Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. Talanta, 71(1): p. 230-235.
- 178. Wade D.**, Silveira A., Rollins-Smith L., Bergman T., Silberring J., Lankinen H., (2001); - Hematological and antifungal properties of temporin A and a cecropin A-temporin A hybrid. Acta Biochim Pol., vol. 48, p1185 - 1189.
- 179. White G.C.** Désinfection des eaux potables - Pratiques et méthodes. Edition Cifec réf. 177
- 180. Wingender, J.**; Neu, T. et Flemming, H.C., (1999); -What are bacterial extracellular polymer substances? Microbial extracellular polymer substances : Characterization, Structure and Function. J. Wingender, T. Neu et H.C. Flemming (eds.), Heidelberg, Berlin, Springer.
- 181. Xu, X.**; Stewart, P.S. et Chen, X., (1996); -Transport limitation of chlorine disinfection of Pseudomonas aeruginosa entrapped in alginate beads." Biotechnology and Bioengineering 49 (1): 93-100.

- 182. Yoshiyuki Mizushima, Isoko Kuriyama., (2016);** -Cedar (*Cryptomeria japonica*) Oils; Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety; Pages 317-324.
- 183. Zhang, X.;** Bishop, P.L. et Kupferle, M.J., (1998); -Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers." *Water science and technology* 37 (4-5) : 345-348.

Annexes

Annexe 01 : Fiche d'enquête ethnopharmacologique

Date :

Localité :

Age :

Sexe :

Niveau académique :

Activité (profession) :

1. Connaissez-vous ces deux plantes ?



Plante (a)



Plante (b)

2. Quels sont leurs noms vernaculaires ?

a-

b-

3. Existent –t- elles dans la région ?

.....

4. Quelles parties sont utilisées en médecine traditionnelle ? :

.....

.....

.....

5. Pouvez-vous citer quelques usages ? :

.....

.....

.....

.....

.....

6. Pouvez-vous citer quelques modes de préparation ? :

.....

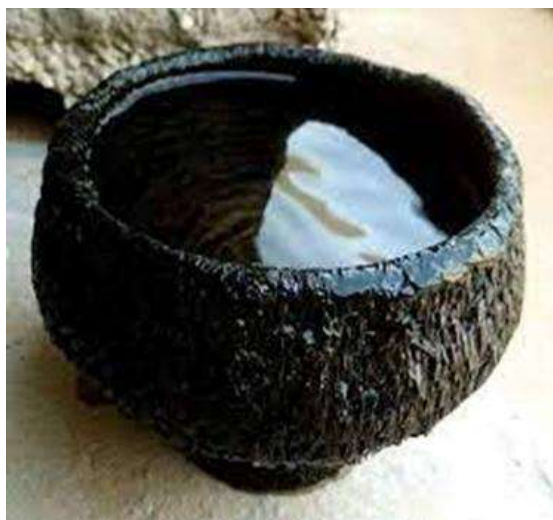
.....

.....

.....

.....

.....



Produit (c)

7. Connaissez-vous ce produit (c) ?.....

.....

8. Quel est son nom vernaculaire ?.....

.....

9. Connaissez-vous sa source ?.....

.....

10. Pouvez-vous citer quelques usages :

.....
.....
.....
.....
.....
.....

11. Savez-vous pourquoi on enduit les jarres avec ce produit ?

.....
.....
.....
.....
.....

Annexe 02 : Matériel utilisé lors de la recherche



Fig 01. Thermocouple portatif, marque Cobra4 mobile-link



Fig 02. Densimètre portable, type Dma 35 V3, marque Anton Paar



Fig 03. Multiparamètre portatif, type HI 9829



Fig 04. Chromatographe GC/MS (INRAP)



Fig 05. Spectrophotomètre UV-visible DR6000



Fig 06. Etuve bactériologique



Fig 07. Ensemenceur en spirale



Fig 08. Appareil de filtration doté d'une pompe à vide



Fig 09. Compteur de colonies



Fig 10. Tamis en inox avec agitateur