



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche
Scientifique



Université SAAD DAHLAB BLIDA
Département de Biotechnologies
Laboratoire de recherche des Plantes Médicinales et Aromatiques

Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme de Master
Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Option: Biotechnologie et valorisation des Plantes

Thème

Recherche sur les activités biologiques et application industrielle
des extraits de plante cultivée de *Pelargonium rosat* L.

Présenté par:

- Ait zerrouk Dounia.
- Raoui Sabrina

Devant le jury composé de:

MmeGhanai R.	MAA	Présidente	USDB
MmeMoumene S.	MCA	Promotrice	USDB
MmeArrark	MAA	Examinatrice	USDB

Promotion2018/2019

Remerciement

Avant tout, nous remercions Dieu de nous avoir donné la volonté afin d'arriver à la finalité de ce modeste travail.

*Aux joyaux de notre vie "**nos parents**" qui sont la source de notre réussite, nous souhaitons qu'ils trouvent à travers ce mémoire le faible témoignage de leurs efforts et sacrifices.*

*Nous tenons à remercier notre promotrice **Mme Moumene S.** qui nous a permis de bénéficier de son encadrement tout au long de la réalisation de ce mémoire, Sa disponibilité, sa gentillesse, sa générosité, ses explications, sa bonne humeur et surtout ses qualités humaines et professionnelles ont suscité en moi une grande admiration et un profond respect, nous vous remercierions à jamais Madame. Nous remercions également **Mme GHANAI R.**, pour l'honneur qu'il nous fait de présider le jury de ce mémoire.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à **Mme ALLAL L.**, de nous fait l'honneur d'accepter d'examiner notre thèse.*

Nous remercions la technicienne de laboratoire pour son aide, sa gentillesse et sa simplicité.

*Un remerciement particulier à **Mme ALLAL L.**, le chef de laboratoire de Recherche des plantes Médicinales et Aromatiques de l'université de Blida1, pour sa bienveillance et ces conseils. Et toute l'équipe de son laboratoire. Pour leur aide dans les moments difficiles.*

Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont également à tous nos amis pour les sympathiques moments que nous avons passé ensemble.

Nous remercions gracieusement nos sœurs, nos frères qui nous ont soutenue, nous ont encouragé, pour que ce travail aboutisse.

*Nous tenons à remercier chaleureusement toute la promotion de **BVP 2017/2019***

Enfin, nous remercions toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dedicace

A l'aide de Dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère qui ma apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.

Aux joyaux de ma vie mon héros cher papa qui ma appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice ses conseils, ses encouragements et surtout ses prières pour moi.

A mes très chères sœurs Baya, Hadjera et Djazia qui m'ont soutenu, m'ont encouragé, pour que ce travail aboutisse.

Dédicace spécial A mes frères Mohammed, Walid , YASSINE et HASSAN qui m'ont soutenu, m'ont encouragé pour leurs conseils et leur pressasse à tout mes difficiles moments

A mes très chères nièces, Anfel, Tassnime et Romaisa

A mes meilleures cousines Youssra, Affef, Meriem.

A mes très chères amies que j'ai passé avec eux mes plus beaux moments

Dounia et kawther

A toute la famille Raoui et Bennamane.

SABRINA

Dédicace

j'ai l'honneur et le plaisir de dédier ce mémoire à tous mes chers .

A ma chère maman, pour tous ses sacrifices, son amour, sa tendresse, son soutien et ses prières tout au long de mes études, je te dédie ma vie toute entière car sans toi je n'aurais été ce que je suis aujourd'hui.

*A mes deux frères **YAHIA, MANIL** pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral, **leurs épouses ROZA et NADJWA**, mes sœurs **NABILA, ASSMA et MYRIAM** pour leur amour, leur encouragement, leur patience, leurs conseils, et leur confiance indéfectible en moi.*

*A mes neveux et nièces, **RAYAN, HANAA, AHCENE, BILEL, DAKIR** et **ABDELKRIM** que je les adore.*

*Je dédie spécialement mes cousins qui m'ont vraiment aider, **ASSIA, NAWEL** et **MOHAMED** merci beaucoup pour tous ce que vous avez fais pour moi.*

*A mes chères amies adorées **KAWTHER** et **SABRINA** que Dieu vous garde pour moi.*

*A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,
Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible.*

Merci d'être toujours là pour moi

Dounia.

Résumé

Notre étude a été basée sur la recherche des activités biologiques des extraits de plantes de *Pelargonium graveolens* cultivées sous l'effet de 8 traitements naturels en plein champ. Elle a porté sur l'extraction des huiles essentielles des parties feuillues récoltées au stade végétatif par hydro distillation à l'état sec, polyphenols et flavonoïdes , la récupération des hydrolats . L'évaluation des rendements ainsi que l'activité antioxydante des huiles essentielles par piégeage des radicaux libres .

L'étude de l'activité antimicrobienne a été réalisée selon la méthode d'antibiogramme vis-à-vis des bactéries phytopathogènes de *Pseudomonas* sp. *Pectobacterium caratovorum* et *Erwinia amylovora* , alors que l'activité anticandidose a concerné *Candida albicans*. Quelques formulations industrielles ont été réalisées dans le domaine cosmétique telles que la crème hydratante à base des HE et hydrolat de *Geranium rosat* ainsi que des bougies parfumées, une savonnette légèrement parfumée, l'eau micellaire anti vieillissement et un parfumé talc à l'eau floral rosé.

-Le rendement en HE a été compris entre $[6.81 \times 10^{-5}, 1 \times 10^{-5}]$. où l'échantillon de plants cultivés T1 a montré le meilleur rendement en HE.

-Les polyphenols totaux ont enregistré des teneurs comprises entre (0.05 mgEAG/GE et 0.29 mgEAG/GE) où l'extrait de plants cultivés ayant enregistré la plus forte teneur en polyphenols (0.29 mg/meq d'acide gallique) .Quant aux teneurs enregistrées en flavonoïdes ont été comprises entre (0.02 ,0.92 mg/meq de quercetine) où le même échantillon a montré la plus forte teneur en flavonoïdes.

- Le pouvoir antioxydant des HE a été faible d'une valeur comprise entre 0.8 g/ml et 0.11 g/ml pour les échantillons T07 et T08.par contre pour les échantillons T04 et T06 il avait une forte activité antioxydante d'une valeur comprise entre 0.87g/ml et 0.93g/ml. Pour les échantillons T02, T03 et T05 il avait une activité modérée.

-Le pouvoir anticandidose des HE de la plante étudiée testée à la concentration de 40% a confirmé une inhibition totale de la croissance de la souche de *Candida albicans* .

-L'activité antibactérienne des HE à une concentration de 1% a montré une forte activité inhibitrice sur la croissance de la souche de *Pseudomonas* sp. et de la souche *Erwinia*

amylovora où le diamètre d'inhibition compris entre [09,44] et [6 ,25] respectivement. Cependant la souche de *Pectobacterium caratovorum* a induit à une résistance.

Mots clés : Activité antimicrobienne, Activité antioxydante, Extraits de plante, Formulation *Pelargonium graveolens*.

Summary

Our study was based on the research of biological activities of *Pelargonium graveolens* plant extracts cultured and treated naturally. We used dry hydro- distillation method on extracted EO from plant leaves which were collected on the vegetative stage.

The study of the antimicrobial activity was realized using the antibiogram method on phyto pathogenic bacteria *Pseudomonas* sp. ,*Pectobacterium caratovororum* and *Erwinia amylovora*, while the *anti-Candida* activity was done on *Candida albicans*.

Some of the industry formulations were made in cosmetics such as moisturizing creams manufactured with EO and hydrosol of *Geranium rosat*,perfumed candles, slightly perfumed soap, anti aging micellar water and perfumed talc with pink floral water.

The yield on EO was between $[6.81 \times 10^{-5}, 1 \times 10^{-5}]$, where the cultured plant sample T1 has shown a better yield on EO.

Total polyphenols contents were recorded between (0.05 mgEAG/GE et 0.29 mgEAG/GE) ,where the plant extract recorded the highest polyphenols contents (0.29 mg/meq of galic acid). Flavonoids contents were between (0.02,0.92 mg/meq of **quercetine**), where the same sample has shown a high flavonoids content.

The antioxidant power of EO was low, valued between 0.8 g/ml and 0.11g/ml for the samples T07 and T08. On the other side, the samples T04 and T06 had a strong antioxidant activity valued between 0.87g/ml and 0.93g/ml, but it was moderated for the samples T02, T03, T05.

Regarding the *anti-candida* power, the EO of our studied plant, tested on 40% of concentration has confirmed *a total inhibition of Candida albicans strain growth*.

The antibacterial activity of the HE at a concentration of 1% showed a strong inhibitory activity on the growth of the strain of *Pseudomonas* sp. and *Erwinia amylovora* strain where the inhibition diameter is between [09,44] and [6, 25] respectively. However the *Pectobacterium caratovororum* strain induced resistance.

Key words: Antimicrobial activity, Antioxidant activity, Plant extracts, Formulation, *Pelargonium graveolens*.

ملخص :

استندت دراستنا إلى البحث عن الأنشطة البيولوجية لمستخلصات نباتات قبر Pelargonium التي تزرع تحت علاجات الحقول الطبيعية. ركزت على استخراج الزيوت الأساسية من الأجزاء الورقية التي يتم حصادها في المرحلة النباتية عن طريق التقطير المائي في الحالة الجافة ، والبوليفينول والفلافونويد ، واستعادة الهيدرات. تقييم الغلة وكذلك نشاط مضادات الأكسدة للزيوت الأساسية من خلال محاصرة الجذور الحرة.

أجريت دراسة النشاط المضاد للميكروبات وفقاً لطريقة المضادات الحيوية فيما يتعلق بالبكتريا المسببة للأمراض النباتية في الأديان يتعلق بالمبيضات البيض. تم صنع بعض المستحضرات الصناعية في مجال مستحضرات التجميل ، مثل كريم الترطيب الذي يستند إلى HE و Geranium rosat hydrolate ، بالإضافة إلى الشموع المعطرة ، وشريط الصابون المعطر برفق ، ومياه micellar المضادة للشيوخوخة ، والتلك المعطر بماء الأزهار. الورد.

- كان العائد في HE بين $[1 \times 10^{-5}, 6.81 \times 10^{-6}]$. حيث أظهرت عينة من النباتات T1 المزروعة أفضل عائد سعادة. تراوح إجمالي البوليفينول من (0.05 ملغم / GE إلى 0.29 ملغم / GE) حيث يحتوي المستخلص من النباتات المزروعة على أعلى نسبة من البوليفينول (0.29 ملغم / ميلي حمض الغالي). في الفلافونويد كانت بين (0.02 ، 0.92 ملغ / ميك كيرسيتين) حيث أظهرت نفس العينة أعلى محتوى من الفلافونويد.

- كانت قدرة مضادات الأكسدة في HE منخفضة ، حيث تراوحت بين 0.8 جم / مل و 0.11 جم / مل لعينات T07 و T08 ، لكن بالنسبة لعينات T04 و T06 ، كان لها نشاط مضاد للأكسدة عالي القيمة شمل بين 0.87 جم / مل و 0.93 جم / مل. بالنسبة للعينات T02 و T03 و T05 كان لديه نشاط معتدل.

أكد نشاط مضادات الأديان في النبات الذي تم اختياره بتركيز 40% تثبيطاً كاملاً لنمو سلالة المبيضات البيض. أظهر النشاط المضاد للبكتيريا في سلالة بتركيز 1% نشاط مثبط قوي على نمو سلالة Pseudomonas sp. و Erwinia amylovora حيث قطر تثبيط ما بين [09،44] و [6 ، 25] على التوالي. ومع ذلك Pectobacterium caratovorum سلالة المقاومة المستحثة.

الكلمات المفتاحية: النشاط المضاد للميكروبات ، نشاط مضادات الأكسدة ، المستخلصات النباتية ، صياغة قبر

Pelargonium graveolens

Liste des figures :

Figure1 : Aspect morphologique de <i>Pelargonium graveolens</i> .	8
Figure 2 : Séchage de la plante cultivée de <i>Pelargonium graveolens</i> .	18
Figure 3 : L'HE de notre échantillon.	19
Figure 4 : Rendement en HE de <i>Pelargonium graveolens</i> .	31
Figure 5 : Quantité d'hydrolat récupérée à l'état sec et frais.	33
Figure 6 : La courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	34
Figure 7 : Courbe d'étalonnage de la quercétine en fonction des concentrations.	35
Figure 8 : Pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique.	36
Figure 9 : Pouvoir antioxydant des HE d'échantillon T01.	36
Figure10 : Pouvoir antioxydant des HE d'échantillonT02.	36
Figure11 : Pouvoir antioxydant des HE d'échantillon T03.	37
Figure12 : Pouvoir antioxydant des HE d'échantillon T04.	37
Figure13 : Pouvoir antioxydant des HE d'échantillon T05.	37
Figur14 : Pouvoir antioxydant des HE d'échantillon T06.	38
Figure15 : Pouvoir antioxydant des HE d'échantillon T07.	38
Figure16 : Pouvoir antioxydant des HE d'échantillon T08.	38
Figure17 : L'activité antifongique des HE de <i>Pelargonium graveolens</i> .	41
Figure18 : Pouvoir antimicrobien des HE de <i>Pelargonium graveolens</i> sur la souche d' <i>Erwinia amylovora</i> .	42
Figure19 : Pouvoir antimicrobien des HE de <i>Pelargonium graveolens</i> sur la souche <i>Pseudomonas</i> sp.	42
Figure20 : Pouvoir antimicrobien des HE de <i>Pelargonium graveolens</i> sur la souche de <i>Pectobacterium caratovorum</i> .	43
Figure21 : Les deux crèmes hydratantes industrielles et bio.	44
Figure22 : Analyse de la variance des absorbances de différents traitements des polyphénols par le modèle GLM.	45
Figure23 : Concentration des polyphénols de différents échantillons de la plante cultivée de <i>Pelargonium graveolens</i> .	45
Figure24 : Analyse de la variance des absorbances de différents traitements des flavonoïdes par le modèle GLM.	46
Figure25 : Concentration des flavonoïdes de différents échantillons de la plante	47

cultivée de <i>Pelargonium graveolens</i> .	
Figure26 : Analyse de la variance de rendements en HE de différents traitements par le modèle GLM.	48
Figure27 : Analyse de la variance de la zone d'inhibition de différents traitements selon la souche de <i>Candida albicans</i> par le modèle GLM.	50
Figure28 : diamètre de la zone d'inhibition des différents traitements sur la souche de <i>Candida albicans</i> .	51
Figure 29 : Taux d'inhibition de l'échantillon T01 en fonction des souches.	52
Figure30 : Taux d'inhibition de l'échantillon T02 en fonction des souches.	52
Figure31 : Taux d'inhibition de l'échantillon T03 en fonction des souches.	52
Figure32 : Taux d'inhibition de l'échantillon T04 en fonction des souches.	53
Figure33 : Taux d'inhibition de l'échantillon T05 en fonction des souches.	53
Figure34 : Taux d'inhibition de l'échantillon T06 en fonction des souches.	54
Figure35 : Taux d'inhibition de l'échantillon T07 en fonction des souches.	54
Figure36 : Taux d'inhibition de l'échantillon T08 en fonction des souches.	55

Liste des tableaux

Tableau1 : Paramètres physicochimiques de l'HE de Géranium rosat .	11
Tableau2 : Maladies et leurs agents phytopathogènes	19
Tableau 3 : Rendement moyen des HE de <i>Pelargonium graveolens</i> .	32
Tableau4 : Comparaison des caractéristiques organoleptiques de l'HE de <i>Pelargonium graveolens</i> .	33
Tableau5 : Résultats de contrôles physicochimiques de la crème hydratante.	44
Tableau6 : Résultats des paramètres organoleptiques de la crème hydratante.	45

Liste des abréviations :

AFNOR :	Association française de normalisation.
HE :	Huile essentielle.
MHE :	Masse de l'huile essentielle.
MVS :	Matière végétale sèche.
UV :	Ultra violet.
MIN :	Minutes.
NM :	Nanomètre.
DPPH :	Diphenylpicrylhydrazyl.
IP :	Pourcentage d'inhibition .
DO :	Densité optique.
PH :	Potentiel d'hydrogène .
PAM :	Plante médicinale et aromatique .
HS :	Hydrolat frais .
HF :	Hydrolat sec.

Sommaire

Résumé	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	1

Chapitre 1 : Synthèses bibliographique

1- Généralités sur <i>Géranium rosat</i>	4
1-1 Historique	4
1-2 Taxonomie	5
1-2-1 Position systématiques des géraniacée	5
1-2-2 Aperçu sur <i>Pelargonium graveolen</i>	5
1-3 Description botanique	6
1-3-1 Données botaniques	6
• Appareil végétatif	6
• Appareil reproducteur.....	8
• Les poils	8
• Synonymes et vermiculaires	8
1-4 Culture et entretien	9
1-4-1 Multiplication et taille	9
1-4-2 Culture et phénologie	9
1-4-3 Données photochimiques sur le genre <i>Pelargonium</i>	9
1-5 Métabolites secondaires de la plante	10
1-5-1 Huile essentielle	10
1-5-1-1 Extraction et propriétés	10
1-5-1-2 Techniques d'extraction des Huiles essentielles	10
• Entraînement à la vapeur	10
• Hydro diffusion	11
• Hydro distillation	11

1-5-1-3 hydrolat	11
1-5-1-4 Composition d'huile essentielle de Géranium rosat	11
1-5-1-5 Propriétés des huiles essentielles	11
1-5-2 Polyphénols	12
1-5-3 Flavonoïdes	13
1-6 Activités biologiques d'huile essentielle	13
1-6-1 Pouvoir Antioxydant	13
1-6-2 Activité antifongique	14
1-6-3 Activité antibactérienne	14

Chapitre 2 :Matériel et méthodes

2-1 Matériel biologique	18
2-1-1 Huile essentielle	19
2-1-2 Hydrolat	20
2-1-3 Les polyphénols totaux	20
2-1-4 Matériels microbiologique	20
2-2 Méthode d'étude	21
2-2-1 Extraction et dosage de polyphénols totaux	21
2-2-2 Dosage des flavonoïdes	21
• Courbe d'étalonnage	21
2-2-3 Etude de l'activité antioxydante	22
2-2-4 Etude de l'activité antimicrobienne des extraits de <i>Pelargonium graveolens</i>	23
2-2-4-1 Préparation des extraits	24
2-2-4-2 Préparation des milieux de culture	24
2-2-4-3 Préparation d'inoculum	24
2-2-4-4 Ensemencement	25
2-2-4-5 Etude de pouvoir inhibiteur	25
• Technique d'antibiogramme	25
2-2-4-6 Lecture des résultats	25
2-3 Application industrielle des extraits de la plante étudiée	26
2-3-1 Formulation d'une crème hydratante	26
2-3-2 Matériel et méthode	26

2-3-2-1 Préparation de la crème	26
• Phase organique ou dite A	26
• Phase aqueuse ou dite B	26
2-3-2-2 Contrôle de la qualité de la crème hydratantes	27
• Détermination de la viscosité	27
• Evaluation du potentiel d'hydrogène	27
• Teste de stabilité	27
• Contrôle microbiologiques	28
a . Recherche des germes totaux	28
b. Recherche des levures et moisissures	28
2-3-3 Formulation d'un savon bio a base du Géranium rosat	28
2-3-3-1 La saponification par la soude (NaOH)	28
• Objectif	28
• composés utilisés	28
2-3-4 Mode opératoire	28
2-3-4-1 Préparation de la phase aqueuse (solution de soude)	28
2-3-4-2 Préparation de la phase huileuse	28
• Moulage	29
• Démoulage	29
2-3-5 préparation traditionnelle des produits de bien être	30

Chapitre 3 Résultats et discussion

3-1 Rendement en Huiles essentielles.....	32
3-1-1 Caractéristiques organoleptiques des HE de <i>Pelargonium graveolens</i>	32
3-2 Extraction des eaux aromatiques.....	32
3-3 Caractérisation t évaluation des polyphénols.....	33
3-3-1 Caractérisation organoleptique.....	34
3-3-2 Rendement en polyphénols.....	34
3-3-3 Dosage des composés phénoliques.....	34
3-3-4 Dosage des flavonoïdes	35
3-4 Evaluation de l'activité antioxydante	35
3-5 Evaluation de l'activité antimicrobienne	36

3-5-1 Résultat de l'antibiogramme	39
3-5-2 Résultats de l'activité antifongique	40
3-6 Application industrielle	43
3-6-1 Caractérisation physico chimiques de produit fini	43
3-6-1-1 Test physico chimiques	43
3-6-1-2 Evaluation de la stabilité de la crème	44
3-6-1-3 Contrôle microbiologique	45

3-7 Interprétation des résultats

3-7-1 Analyse de la variance des absorbances des polyphénols	46
3-7-2 Analyse de la variance des absorbances des flavonoïdes	47
3-7-3 Analyse de la variance de rendement en HE	47
3-7-4 Analyse de la variance de rendement en hydrolat sec et frais	47
3-7-5 Activité antioxydante	50
3-7-6 Activité anticandidosique	50
3-7-7 Activité anti bactérienne	51
Conclusion	57
Références bibliographiques	59
Annexes	65

Introduction

Introduction

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales (PAM) est associée à l'évolution des civilisations. De nos jours, ces plantes à parfum occupent une place prépondérante dans la découverte de nouvelles substances thérapeutiques. On estime que près de 50 % des agents thérapeutiques utilisés actuellement proviennent de sources naturelles, alors que moins de 10 % des espèces végétales ont été étudiées pour leurs activités biologiques. Ces chiffres indiquent qu'il subsiste encore une grande marge de progression et que l'étude approfondie de la « biomasse » où des espèces végétales pourraient mener à la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques. L'Algérie, de par sa position géographique, jouit de plusieurs facteurs de pédogenèse et de grandes variations climatiques à laquelle s'ajoutent les ressources hydriques, tous favorables au développement de cultures adaptées aux PAM . Cependant, rares sont les cultures des plantes à parfum qui ont fait l'objet d'études scientifiques très approfondies. Malheureusement, le géranium rosat est un exemple éloquent d'espèce qui n'échappe pas à cette règle.

Toutes ces considérations nous ont amenés à envisager des possibilités de valorisation de l'essence des pélargoniums odorants en vue d'offrir une alternative aux ressources fossiles. L'importance indiscutable du géranium rosat comme plante médicinale et aromatique est liée à son huile essentielle ayant d'intéressantes propriétés thérapeutiques . Aussi, la nature chimique de ses essences leur confère de grandes perspectives d'application. C'est dans le cadre de contribution à la valorisation de notre patrimoine naturel que s'inscrit cette étude. Nous essayerons, lors de ce travail, de rapporter les différentes étapes qu'a connues l'exploitation industrielle du géranium rosat et d'élucider ainsi les mystères des traditions thérapeutiques confirmées par un long usage des utilisateurs . Ainsi, par cette mise au point bibliographique, nous participons à une meilleure connaissance et gestion de cette ressource naturelle pour un intérêt futur aussi bien ethnobotanique que pharmaceutique

Par ailleurs, les candidoses sont des infections fongiques les plus fréquentes en pathologie humaine qui ont vu leur localisation se diversifier. L'agent causal « *Candida albicans* » reste l'espèce la plus fréquente . Bien qu'on dispose aujourd'hui quelques traitements antifongiques ces derniers restent difficiles et liés d'une part au nombre limité des principes réellement efficaces et à leur coût très élevé et d'autres part à l'émergence des souches résistantes à certains antimycosiques usuels. Dans ce sens , nous avons jugé opportun de valoriser les extraits issus de la culture de cette plante sous différents traitements naturels . La thématique

de cette prescrite étude rentre dans le cadre de la préparation de la thèse de doctorat de Mlle Lillia Oulha dirigée par Dr Saida Moumene dont la culture de cette plante a été déjà installée en plein champ et dont les échantillons de la partie Feuillue des plants ont été récoltés pendant la phase végétative ont fait l'Object des parties d'étude suivantes :

- Extraction des dosages des métabolites secondaires (polyphénols et flavonoïdes) .
- L' étude de leur pouvoir antioxydant et antimicrobien ainsi qu'une formulation d'une crème hydratante à base d'hydrolat et huile essentielle.
- L'estimation *in vitro* de l'activité antibactérienne et antifongique de l'essence aromatique du *Pelargonium graveolens*.
- L'incorporation des extrait de *Pelargonium graveolens* dans le domaine industriel cosmétique . Ces différentes difficultés ont suscité notre intérêt pour la recherche d'autres substances fongitoxiques pouvant être une solution alternative aux médicaments actuels.

Chapitre I :
Synthèse
bibliographique

1-Généralités sur *Géranium rosat Pelargonium graveolens*

1 1-Historique

Des nombreuses espèces spontanées d’Afrique de sud furent introduites en Europe vers le XVème siècle à une époque où tout bon voyageur se rendant au pays des épices et de parfums passait par le cap de bonne espérance.

Le *Géranium rosat*, comme plante aromatique ne fut pas connu du monde méditerranéen. Pourtant à Constantinople, on recevait des parfums de géranium de Turquie et des Indes, lorsqu’au début du XIXème siècle la senteur rose est très demandée et que celle-ci est très chère, on importe des indes orientales les « huiles » de géranium rosat. L’extraction de cette huile ne peut se faire que sur matériel frais (**DEMARNE, 1985**).

Originnaire du cap, cette espèce a été introduite en Algérie en 1865 où elle a acquis des proportions gigantesques durant la période coloniale.

Aujourd’hui, la culture du *Pelargonium graveolens* pratiquée sur de petites parcelles dans des conditions de production difficiles, est menacée d’abandon malgré les immenses atouts qu’elle offrait la distillerie local « Extal bio » sise à Chiffa (W.Blida) en exploite quelques hectares de géranium destinées à l’extraction de l’HE. La possibilité d’incorporer ces extraits aromatiques dans l’industrie cosmétique constitue une activité plus lucrative pour la société et des études préliminaires sont en cours pour permettre l’application de la qualité des produits finis (**BOUKHATEM et al.**).

Le *Géranium rosat* est originaire d’Afrique. Connus comme ornements des balcons, seule une poignée de géraniums odorants sont distillés et utilisés pour leur huile essentielle (*roseum, odoratissimum, asperum*). Très prisée dans la cosmétique et la parfumerie, l’huile essentielle de *géranium rosat* est exploitée en Egypte, en Chine, mais la plus prisée est celle du type Bourbon, produite à Madagascar ou sur l’île de la Réunion.

Cultivé depuis très longtemps pour son feuillage aromatique très apprécié des parfumeurs, le géranium rosat recèle également de nombreuses vertus thérapeutiques. Antibactérienne, anti-inflammatoire, antispasmodique, apaisante... Cette plante, principalement utilisée sous forme d’huile essentielle.

1-2 Taxonomie

1-2-1 Position systématique des géraniacées

Pelargonium graveolense est une plante vivace de 40 à 50 cm de haut, la famille de dicotylédones renfermant selon **Watson et Dallwitz**, 3 genres regroupant 750 espèces herbacées ou arbustives, elle sont pleines de suc en début de végétation puis ligneuse à écorce brun clair, Le *Pelargonium graveolens* généralement actinomorphe, des carpelles plus souvent de 3 à 5, munis d'un bec généralement hygroscopique, se détache d'une colonne centrale en s'enroulant de bas en haut (**Judd et al., 2002**).

Les 3 genres de la famille des géraniacées sont: *Geranium* qui compte 375 espèces *Pelargonium* avec 220 espèces et *Erodium* comprenant une centaine (**Demarne, 1989**). Ces 3 genres possèdent une caractéristique commune au niveau de leurs fruits dont la forme est comparable à de longs becs d'oiseau, pour le genre *geranium* le bec héron (érodions) celle du *Erodium* et celui de la cigogne (pelargos) pour *Pelargonium* ,Autres différences entre ces 3 genres résident dans le nombre d'anthères : 5 pour *Erodium*, 7 pour *Pelargonium* et 10 pour *geranium*.

Selon **Demarne et al (1989)**.La plante est classée comme suit :

-Domaine	Eukaryota
-Règne	plantae (vegetal)
-Sous-règne	Tracheobionta
-Embranchement	Spermatophyta
-Sous-embranchement	Manoliophyta
-Classe	Magnoliopsida
-Sous-classe	Dialypetales
-Ordre	Geraniales
-Famille	Geraniaceae
-Genre	<i>Pelargonium</i>
-Espece	<i>Pelargonium graveolens</i> l'Her. ex Aiton

1-2-2 Aperçu sur *Pelargonium odorant* :

Le *Geranium* rosat appartient à la famille des géraniacée son nom vient du grec « **pelargos** » littéralement cigogne puisque son fruit ressemble à un bec de cigogne, il porte

différents noms dont *Geranium rosat*, *Geranium odorant* *Pelargonium asperum*, *Pelargonium graveolens*. Prés de 200 espèces regroupées en 15 sections, dizaine de variétés seulement sont exploitées pour la production de l'HE, il ne faut pas confondre le géranium commun des jardins (phortorum) et l' « Herbe à rhobert » *G. robertianum*. Tous différents du géranium rosat et ne produisant pas d'essence végétal (**Lis- balchin, 2012**)

Le *Pelargonium graveolens*, *P.roseum*, *P.capitatum*, *P.radula* sont les espèces les plus importants qui appartenant au genre *Pelargonium*, cultivées en gros à la réunion Madagascar, Chine et dans les régions méditerranéennes (**Vidalie 1998**).

L'appellation d'essence de géranium est une désignation erronée étant donnée que ces essences obtenues ne dévient point de « géranium ». Mais de plusieurs espèces variées, hybrides de la lignée « pélargonium » il semble que chaque région géographique affectionne son géranium, *P. gravelons*, *P. odoratissimum* ou *P. capitatum* pour la France, l'Algérie et l'Inde, *Pelargonium x asperum* pour la Réunion et l'Afrique du sud (**Peter Knove, 2004**) c'est le *P. graveolens* qui semble être l'espèce source des différents hybrides existants.

C'est une plante vivaces à feuillage odorant, persistantes. Les feuilles sont lobées et opposées couvertes de poils glanduleux microscopiques qui libèrent leurs parfums au toucher ou à la chaleur,. La distinction entre variétés est basée sur le type de parfum qu'elles dégagent (rose, agrume, menthe, épices... etc.) la forme et la coloration des feuilles aussi que la coloration des fleurs et le nombre de pétales. (**Skaria, 2007**).

1-3 Description botanique de *Pelargonium graveolens*

1-3-1 Données botaniques

Le Géranium rosat regroupe les plantes appartenant au genre *Pelargonium* cultivées pour la production d'huile essentielle leur origine est hybride: *P.radens x P.capitatum* . Elles sont stériles, Leur description botanique peut se résumer comme, plante vivace de 1m de hauteur pleine de suc en début de végétation puis ligneuse à écorce brun clair buissons à port érigé (**Demarne, 1968**).

- **Appareil végétatif**

Pelargonium graveolens est une plante buissonnante de 60 cm et parfois plus. Les tiges poussent vertes et tendres et se lignifient avec l'âge, Elle portent des feuilles odorantes

persistantes avec 5 à 7 lobes, opposées, recouvertes de poils glanduleux microscopiques qui donnent un aspect velouté elles ont une racine pivotante (**Demarne 1986**). (**figure 1**).

- **Appareil reproducteur**

Les fleurs sont groupées par paire de couleur rose disposées en ombelles et s'épanouissant tout à la longe de l'année. Chaque fleur est constituée de 5 sépales égaux présentant parfois une extrémité effilée. 5 pétales plus ou moins ondules dont 2 différents stries de rouge, plus ou moins prononcées qui serviront de marques pour guider ceux-ci vers les glandes à nectar. Avec 7 étamines groupées en 2 séries (internes et externes), portent à leur base nectaires, et 5 carpelles réunis en une colonne centrale surmontée d'un style commun qui se divise en 5 stigmates avec en dedans les papilles réceptives au pollen chaque carpelle contient 2 ovules dont un seul qui donnera une graine ce qui en résulte alors 5 graines par fleurs (**Demarne1986**). (**figure 1**).

- **Les poils**

Les poils donnent un aspect velouté, Il sont défensifs et rendent la plante poisseuse, Les poils glanduleux sont remplis d'essence aromatique et redent la plante odorante quand on la touche ils ont aussi un rôle dans la défense contre les insectes (**Demarne1986**). (**figure 1**).

- **Synonymes et noms vermiculaires**

D'après **Sidemann (2005)**, diverses appellations sont attribuées à cette plante suivant le pays de provenance:

- En français : Géranium rosat, géranium odorant
- En anglais : Attar of rose, rose scented géranium, scented, pelargonium, rose géranium
- En espagnol : malva rosa, geranio d'olor
- En chinois : xiang ye
- En arabe: العطرشة, عطر الورد

- La fleur (appareil reproducteur)



- La feuille



- Les poiles



Figure 1 : Aspect morphologique de *Pelargonium graveolens*.

1-4 Culture et entretien

1-4-1 Multiplication et taille

Pelargonium graveolens est une plante à croissance rapide au début du printemps. Les jeunes plants doivent être rabattus pour lignifier le tronc et pouvoir supporter le poids du feuillage (Demarne et al, 1989).

1-4-2 Culture

Géranium rosat préfère les climats subtropicaux mais, supporte peu les températures inférieures à 3 C° bien qu'il soit cultivé sur les hauteurs dans certaines régions (Réunion). Des précipitations de l'ordre de 1000 à 1500 mm d'eau par an sont recommandées, Idéalement cette plante croit dans des conditions climatiques et édaphiques pas trop humides). Mis à part les terres lourds et asphyxiantes cette plante s'adapte à tous les types de sols pourvus qu'ils soient correctement drainés. Friables et perméables. Cette plant s'adapte très bien aux terres de basses altitudes est à environnement côtier, Il semble que les huiles extraites de plantes cultivées en altitudes possèdent un parfum de rose plus subtil qu'en basses altitudes (Nyabyenda 2007).

1-4-3 Données phytochimiques sur le genre *Pelargonium*

La phytochimie des *Pelargoniums* odorants et particulièrement celle du *Pelargonium graveolens* a largement été étudiée ces dernières années faisant l'objet de revues générales (Lis-Balchin, 2002). Mais ne nous y trompons pas, ces spécimens appartiennent à une famille très peu explorée si l'on se réfère aux pléthores de travaux consacrées aux autres plantes à parfum.

L'ensemble des composés isolés et identifiés est très hétérogène. Ainsi, les métabolites secondaires les plus rencontrés sont des flavonoïdes, des tanins, des stérides et des lignines. Cependant inutile de mentionner que c'est la fraction aromatique en l'occurrence l'huile essentielle et l'hydrolat, source de produits naturels et potentiellement actifs, qui est la plus appréciée et suscite, de nos jours, les désirs d'un grand nombre de producteurs-distillateurs. un accent particulier a été mis sur ces molécules aromatiques de part leurs importances économiques et thérapeutiques, c'est aussi la majorité des molécules aromatiques de part leurs importances économiques et thérapeutiques c'est aussi la majorité des études qui lui ont été consacrées. (Bezanger et Beauquesne, 1980).

1-5 Métabolites secondaires de la plante

1-5-1 Huile essentielle

1-5-1-1 Extraction et propriétés

L'huile essentielle est un mélange de composés lipophiles, volatils et souvent liquides, synthétisés et stockés dans certains tissus végétaux spécialisés. Elle est extraite de la plante grâce à des procédés physiques tels que l'hydro distillation, l'entraînement à la vapeur ou par pression très élevée à froid dans le cas des agrumes, Les huiles essentielles sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante. Les produits obtenus par extraction avec d'autres procédés ne sont pas repris dans la définition d'huile essentielle donnée par la norme de l'Association Française de Normalisation (AFNOR, 2000).

1-5-1-2 Techniques d'extraction des HE

- **Entraînement à la vapeur**

C'est l'un des procédés les plus anciens d'extraction des matières volatiles (Bernard et al., 1988). Cette technique d'extraction est basée sur le fait que la plupart des composés odorants volatiles contenus dans les végétaux. Ils sont entraînés par la vapeur d'eau. Cet entraînement dépend de plusieurs facteurs tels que, le coefficient de partage des composés entre la vapeur d'eau et la plante, la vitesse de diffusion des composés, leur solubilité dans l'eau, la pression partielle de vapeur, la durée et la vitesse de transfert de chaleur (Boelens et al, 1990).

- **Hydrodiffusion**

L'hydrodiffusion consiste à faire passer un courant de vapeur d'eau à très faible pression (0,1 bar) à travers la masse végétale (Boelens et al., 1990). Dans cette technique, la matière végétale n'est pas en contact direct avec l'eau en ébullition mais seulement avec sa vapeur qui est pleinement saturée et humide mais jamais super-chauffée où le matériel végétal est introduit dans un cylindre de verre (long de 1 m) perforé aux deux extrémités de manière à permettre à la vapeur d'eau de circuler à travers le feuillage (Sandra et Bicchi, 1987).

• Hydrodistillation

Dans cette méthode, le matériel végétal (sec ou frais) est introduit directement dans l'eau et le mélange est porté à ébullition. La plante est coupée en fins morceaux et plassée dans l'eau. Le type d'appareil utilisé est le **clevenger (1928)**.

1-5-1-3 Hydrolat

c'est l'eau récupérée après l'extraction des HE. Malgré qu'elle présente une faible concentration en principes actifs, l'hydrolat possède certaines activités pharmacologiques intéressantes. Certains sont utilisés depuis des siècles dans des préparations cosmétiques, thérapeutiques et culinaires mais leur intérêt principal, c'est qu'ils sont toujours beaucoup mieux tolérés que les HE. (**Bosson et al, 2005**).

1-5-1-4 Composition de l'huile essentielle

Le profil chromatographique (CGMS) fait apparaître la présence de certains composants caractéristiques: citronellol, formate de citronellyle, isomenthone, géraniol, linalol, formate de géranyle, oxyde de rose. (**AFNOR, 2000**).

L'essence de géranium se compose majoritairement de 2 alcools: le géraniol et le citronellol qui existent pour 2/3 à l'état libre et pour 1/3 à l'état combiné sous forme d'esters: ce sont des composés oxygénés qui donnent la valeur aux essences de géranium (**Boukhatem et al, 2010**), les caractéristiques physico-chimiques sont consignées dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : paramètres physico-chimiques de l'HR de géranium rosat (**Dermene, 1985**)

Paramètres	Réunion	France
Densité à 20°C	0,889-0,897	0,894-0,904
Pouvoir rotatoire	-7,5 à -14°	-7,0 à -11,0°
Indice de réfraction	1,462-1,468	1,463-1,466
Indice d'acide (IA)	1,5-12,0	6,0-14,0
Indice d'ester (IE)	50-78	34-70
IE après acétylation	206-233	217-228
Esters	21-33	19-76

1-5-1-5 Propriétés d'huile essentielle de Géranium rosat :

Plusieurs travaux et recherches ont montré les différents vertus de géranium rosat dans plusieurs domaines que se soit médicaux, cosmétiques et alimentaires :

Selon **Peterson (2005)**, l'huile de géranium est utilisée pour des problèmes de vésicule biliaire, les ulcères gastriques, la jaunisse, le foie, des problèmes de stérilité, de calculs urinaires, d'inflammations et de flux menstruels trop abondants. Les feuilles sont utilisées sous forme de tisane pour lutter contre le stress, combattre l'anxiété, abaisser les tensions, améliorer la circulation et guérir les amygdalites. L'huile essentielle de *Geranium graveolens* possède des vertus antimicrobiennes, insecticides, antiseptiques et cicatrisantes (**Baydat et al., 2004 ; Burt, 2004 ; Prabuseenivasan et al., 2006 ; Kelen & Tepe, 2008**). Aux Comores, le géranium est aussi utilisé pour aromatiser le thé et pour le traitement de la fièvre et des maux de tête (**Faujour, 2004**). Pour leurs effet antibactérien les huiles essentielles de *Pelargonium graveolens* sont utilisées en cosmétique, en phytosanitaire et en alimentation. En général, les deux principales utilisations de cette huile essentielle sont la médecine et la parfumerie. Elle est très prisée dans la parfumerie, la savonnerie et les cosmétiques à cause de son odeur puissante. On s'en sert aussi comme source de rhodinol qui entre dans la composition des parfums High grade (**Dorman & Deans, 2000 ; Rajeswara, 2002**). Plusieurs antioxydants synthétiques ont été suggérés pour la prévention et les traitements antibactériens, les huiles essentielles de *Pelargonium asperum* sont utilisées en cosmétique, en phytosanitaire et en alimentation

1-5-2 Polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires. (**Lebham, 2005**). Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieures (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) ; et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogénèse, la germination des graines et la maturation des fruits (**Boizot et Charpentier, 2006**).

Les composés phénoliques sont classés selon le nombre d'atome de carbone dans le squelette de base, ces structures peuvent être sous forme libres ou liées à l'ester ou hétérosides (**Bruneton, 1999**).

Comme la majorité des composés secondaires, les polyphénols sont produits par les plantes afin d'accomplir des fonctions précises, les plus notoires étant :

- Défense contre les pathogènes ; principalement les moisissures et les bactéries phytopathogènes.

-Dissuasion alimentaire. On parle du phénomène d'allélopathie : certaines plantes émettent des substances pour inhiber la croissance des autres plantes.

- Attraction des pollinisateurs : les couleurs, mais aussi les odeurs attirent les insectes. Exemple : certaines orchidées synthétisent des phéromones sexuelles qui sont des substances volatiles émises par les insectes femelles pour attirer les mâles.

- Protections contre les rayonnements UV. 5

-Molécules qui donnent des arômes et parfums aux plantes. Ce qui sert principalement à repousser les herbivores. Exemple : les polyphénols des pélargoniums (**Drayne 1999**).

1-5-3 Flavonoïdes

Les flavonoïdes ont un squelette de base formé par deux cycles en C6 (A et B) reliés entre eux par une chaîne en C3 qui peut évoluer en un hétérocycle (cycle C). Ils donnent des couleurs allant du jaune clair au jaune or. Selon les détails structuraux les flavonoïdes se divisent en 6 groupes : flavones, flavonols, flavonones, isoflavones, chalcones, aurones. Ces composés existent sous forme libre dite aglycone ou sous forme d'hétérosides, c'est à-dire liée à des oses et autres substances (**Heller et Forkmann 1993**).

1-6 Activités biologiques de l'huile essentielle

L'huile essentielle de Géranium rosat possède les nombreuses activités biologiques suivantes : antivirale puissante, antibactérienne, antivirale, antiseptique, antimycosique, fongicide, hémostatique, antalgique, anti-inflammatoire, tonique astringente cutanée, stimulante lymphatique, répulsive. (**Valnet, 2005**).

1-6-1 Pouvoir antioxydant

Le pouvoir antioxydant de ces huiles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Ce sont surtout les phénols et les polyphénols qui sont responsables de ce pouvoir (**Richard, 1992**). Lorsque l'on parle d'activité antioxydante, on distingue deux sortes selon le niveau de leur action : une activité primaire et une activité préventive (indirecte). Les composés qui ont une activité primaire sont interrompus dans la chaîne autocatalytique de l'oxydation (**Multon, 2002**). En revanche, les composés qui ont une activité préventive sont capables de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que la complexation des

ions métalliques ou la réduction d'oxygène... etc. (**Madhavi et al, 1996**). Des études ont montré que l'incorporation des huiles essentielles directement dans les aliments (viandes hachées, légumes hachés, purées de fruit, yaourts...) où l'application par vaporisation en surface de l'aliment (pièce de viande, charcuterie, poulet, fruits et légumes entiers...) contribuent à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydation (**Caillet et Lacroix, 2007**).

1-6-2 Activité antifongique

Dans le domaine phytosanitaire et agro alimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant la denrée alimentaire (**LisBalchin, 2002**). Pour les Levures, elles agissent sur la biomasse et la production des pseudomycelium alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures (**Oussalah et al. 2007**). De même, certaines huiles présentent une activité antifongique.

1-6-3 Activité antibactérienne

Dans le domaine microbiologique, plusieurs travaux ont été effectués dans le but de montrer leur activité anti- microbienne (**Boakye et al., 1977 ; Thomas, 1989 ; Garry et al., 1997 ; Amvam Zollo et al., 1998 ; Andriantseferana et al., 1998**). Elles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines.

Chapitre II :

Matériel et méthodes

2. Matériel et méthodes

Notre étude expérimentale s'est étalée sur une période de sept mois du mois de Décembre jusqu'au mois de Juin 2019, elle a été basée sur l'étude des activités microbiologiques, chimiques et la conservation des extraits de la plante étudiée réalisée au niveau de laboratoire des plantes médicinales et aromatiques de la Faculté de SNV au niveau de département des Biotechnologies ,université de Blida 1n d'une ainsi que la formulation d'une crème hydratante au niveau de laboratoire de conception et du développement de venus wilaya de Blida .

L'objectif de notre étude était de tester *in vitro* les activités biologiques des extraits préparés à partir des échantillons de plantes de *Pelargonium graveolens* cultivées sous l'effet de 8 traitements naturels en plein champ dans la région de Staoueli Wilaya d'Alger.

2-1 Matériel biologique

La récolte de la plante cultivée a été réalisée le 20/11/2018 d'un champ de culture situé à Staoueli wilaya d'Alger .Le séchage a été effectué à la température ambiante dans une chambre à l'abri de la lumière et la conservation de la plante après séchage a été réalisée dans des sachets en papier secs.

Notre étude a nécessité l'utilisation de deux types de matériels ; biologiques : les souches microbiennes et les extraits de plante de *Geranium rosat* cultivée en plein champ.

Les extraits sont représentés par les huiles essentielles, les hydrolats ainsi que les poly phénols et les flavonoïdes.



Figure 2: Séchage de la plante cultivée de *Pelargonium graveolens*.

2-1-1 huile essentielle

L'extraction des huiles essentielles a été réalisée par la méthode d'hydro distillation des plantes séchées et à l'abri de la lumière à l'aide d'un clevenger selon la pharmacopée européenne (**Clevenger 2002**).

Une quantité de 30g de matière végétale sèche a été introduite dans un ballon de capacité d'un litre rempli de 700 ml d'eau distillée .L'HE a été obtenue après 1heure .

Le ballon est chauffé à l'aide d'un chauffe-ballon, pendant 1 heure ceci engendre la formation de vapeurs. Ces vapeurs s'élèvent et passent dans un réfrigérant, les vapeurs chaudes se condensent et s'écoulent à l'état liquide goutte à goutte, dans le tube gradué de clevenger, où elles forment le distillat. Ce dernier est un mélange de deux phases non miscibles qui sont séparées l'une de l'autre par le robinet de clevenger le volume du distillat obtenu est placé au réfrigérant.



Figure 3 : L'HE de notre échantillon

2-1-2 Hydrolats

La vapeur condensée obtenue conduit à une phase organique (huile essentielle qui est séparée de l'eau aromatique par décantation. une quantité non négligeable d'essence aromatique sous forme solubilisée.

Les hydrolats ont été récupérés pendant deux états différents de la plante cultivée qui étaient état frais et état sec.

2-1-3 Polyphénols totaux

La préparation des polyphénols totaux consiste à réduire en poudre les parties aériennes de chacun des 8 échantillons séchés puis les faire macérer dans une solution de méthanol à 80% pendant 72 heures à la température ambiante de laboratoire. Les extraits de plante préparée sont recueillis après filtration à travers à un papier filtre Wattman puis évaporation à sec sous vide.

Les extraits secs ont été conservés à une température de 4 °C pour une utilisation ultérieure .

2-1-4 Matériel microbiologique

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des HE de *Pelargonium graveolens* a nécessité l'utilisation de 03 souches bactériennes provenant de la collection de Dr Saida

Moumene et 01 souche de levure (*Candida albicans*) issue des prélèvements de malades possédant des infections urinaires (**voir annexe 4**).

Cette souche a été identifiée au niveau de laboratoire de microbiologie de l'hôpital de la sûreté nationale Omar Haraig wilaya d'Alger.

Ces souches bactériennes et de levure ont été repiquées et conservées au laboratoire de microbiologie du laboratoire de Recherche des plantes Médicinales et Aromatiques.

Tableau 2 : Maladies et leurs agents phytopathogènes

Bactéries	Définition	Symptômes	Pertes
<i>Pectobacterium caratovorum</i>	sont des bactéries qui se développent à des températures allant de 5 à 36°C avec un optimum de 27 à 30°C. Ces espèces peuvent infecter différentes végétaux, est le responsable de la maladies de jambe noire au champ et pourriture molle des tubercules au cours du stockage(Gardan et al, 2003)	symptômes s'apparaissent sous forme d'un feuillage vert pâle ou jaunâtre suivis d'un rabougrissement de la plante Puis la maladie peut se manifester sous forme d'une nécrose humide sur les tiges qui prennent alors une couleur noire. (Hélias, 2012).	baisses de rendement des cultures, les tubercules récoltés atteints de pourriture molle peuvent engendrer des pertes importantes lors du stockage par une contamination rapide des tubercules (Priou et Jouan,)
<i>Erwinia amylovora</i>	Sont des bactéries de Gram-appartenant à la famille des Enterobacteriaceae Elle s'attaque à une gamme assez élargie de plantes hôtes de la famille des Rosacée elle est responsable de la maladie de	Les symptômes sont caractérisés par des gouttelettes suintantes puis d'un exsudat sur les pédicelles des fleurs. L'infection progresse ensuite vers le bas du	L'arrêt de la sève montante (la sève brute). La maladie se manifeste alors par le dessèchement de la zone infectée vers l'extrémité du rameau, en premier lieu, puis le

	<p>feu bactérien</p> <p>(Van der Zwet et Keil, 1979 ; Vanneste).</p>	<p>pédicelle et dans toutes les fleurs d'un bouquet les fleurs, qui se fanent, puis flétrissent et brunissent. Les pédoncules peuvent également apparaître imbibés d'eau, deviennent vert foncé, et enfin brun ou noir, parfois avec des gouttelettes suintantes d'exsudat bactérien (EPPO, 2013)</p>	<p>dessèchement des parties aériennes en progressant de haut en bas.</p> <p>Perte totale de la culture.(INPV.2018)</p>
<p><i>Pseudomonas</i> sp.</p>	<p>Le genre <i>Pseudomonas</i> est le groupe le plus hétérogène écologiquement significatif de bactéries connues,). Il est un agent de pourriture des tubercules . et comprend des bâtonnets aérobies Gram-négatives mais il a également été isolé des sujets cliniques, des solutions aseptiques, des cosmétiques et produits médicaux (Franzetti et</p>	<p>les tissus infectés et gorgés d'eau (water soaking) prennent un aspect huileux à la limite de la lésion ; ces tissus altérés brunissent rapidement</p>	<p>Elle est essentiellement un agent de type nécrogène qui provoque une destruction plus ou moins localisée des tissus parenchymateux. Des dégâts bactériens (nécroses) peuvent être observés sur fleurs (Mansvelt et Hattingh, 1987b; 1989), sur fruits (Luisetti, 1978), sur feuilles.</p>

<i>Candida albicans</i>	Des levures appartiennent au phylum des ascomycètes à la classe des saccharomycètes, à l'ordre des saccharomycetales et au groupe des saccharomycètes mitosporiques (Aurore, 2010), sont responsable de la candidose. (Essendoubi, 2007).	Les signes fonctionnels sont : douleurs, dysphagie, goût métallique. (ANOFEL, 2014)	des troubles digestifs qui peuvent devenir chroniques : aigreurs, douleurs oesophagiennes, douleurs stomacales, diarrhées, constipation, colite intdysphagie douloureuse, un pyrosis et une sensation de brûlure au passage des alimentssestinal(Céline LAGANE 2007)
--------------------------------	---	---	--

2-2 Méthode d'étude

Le rendement en huile essentielles a été évalué selon les normes AFNOR (2000).

Il est exprimé entre la masse de l'huile essentielle (MHE) extraite à partir de la plante étudiée et la matière végétale sèche (MVS) selon la formule suivante :

$$R_{HE} = \frac{M_{HE}}{M_{VS}} \times 100$$

R_{HE} : rendement en HE%

M_{HE} : Masse d'HE en (g)

M_{VS} : Masse de la matière végétale sèche en (g)

2-2-1 Extraction et dosage de polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé selon la méthode de Folin ciocalteu .

0.2ml d'extraits ont été mélangés avec 1ml du réactif Folin ciocalteu préalablement dilué avec 10ml d'eau distillée. Les solutions ainsi préparées ont été ajoutées à une solution de carbonate de Sodium 75mg/ml , après 120 min d'incubation à la température ambiante de

laboratoire , l'absorbance a été mesurée à 765nm à l'aide d'un spectrophotomètre à UV visible. La teneur en composés phénoliques totaux a été exprimé en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extraits (mg EAG /GE).

- **Courbe d'étalonnage**

L'acide gallique a été utilisé comme standard pour la courbe d'étalonnage

Dix mg d'acide gallique ont été dissous dans 100 ml de méthanol à 50% (100 ug / ml), puis dilués à 200 ug, 400 ug, 600 ug, 800 ug, 1000 ug. 1 ml de chaque dilution a été prélevé dans un tube à essai dilué avec 10 ml d'eau distillée. puis on a ajouté 1,5 ml de réactif de folin ciocalteu et on l'a laissé incuber à température ambiante pendant 5 min. On a ajouté 4 ml de Na_2CO_3 à 20% après incubation de 30min l'absorbance a été effectuée par le spectrophotomètre UV visible.

2-2-2 Dosage des flavonoïdes

Les mêmes extraits ayant servi pour le dosage des polyphénols ont été utilisé pour l'extraction des flavonoïdes . A cet effet , un volume de 400 μl de chaque extrait convenablement dilué dans le méthanol ont été ajoutée à 120 μl d' AlCl_3 à 10% . La solution est bien homogénéisée après 30min d'incubation à la température ambiante de laboratoire l'absorbance a été mesurée à 510nm à l'aide d'un spectrophotomètre à UV visible. Les teneurs en flavonoïdes extraits ont été calculée à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine.

- **Courbe d'étalonnage**

Cette dernière consiste à préparer une série de solutions aux concentrations composés entre 200 μl / et 1000 μl à partir d'une solution mère de la quercétine de 200mg/ml.

En effet, le même protocole a été entrepris pour doser les échantillons ainsi une courbe d'étalonnage a été pour déduire les teneurs en flavonoïdes en mg équivalent de quercétine par gramme d'extrait.

2-2-2 Etude de l'activité anti oxydante

L'activité anti oxydante des extraits préparés de la plante étudiée a concerné les hydrolats, les HE issus de 8 échantillons des plantes cultivées de Geranium rosat. A cet effet, une

solution mère a été préparée pour chaque type d'extrait en prélevant 5 ml auquel de méthanol a été ajouté.

Ainsi, 5 dilutions ont été préparées à partir de la solution mère à 1/10 (1 ml de 1^{ère} solution + 9ml du méthanol 97%).

Brièvement, 2 ml d'une solution méthanolique de DPPH à 4% (4mg du DPPH dans 100ml du méthanol) a été mélangée avec 0.5ml de la solution dans des tubes à essai secs. Le mélange obtenu a été conservé à l'abri de la lumière et à la température ambiante pendant 3 min, pour mesurer l'absorbance à 517nm contre un blanc représenté par une solution méthanolique de DPPH .

Les échantillons d'extraits, le blanc, la solution méthanolique de DPPH et le méthanol ainsi qu'une solution de 3mg d'acide ascorbique dans 10ml de méthanol (qui servira référence) ont été préparés dans les mêmes conditions opératoires.

La croissance de l'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à, UV visible à 517nm et le pourcentage d'inhibition (IP) a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{PI} = (\text{DO du blanc} - \text{DO d'échantillon}) \times 100 / \text{DO du blanc}$$

PI = Pourcentage d'inhibition

DO= Densité optique

2-2-4 Etude de l'activité anti microbienne des extraits de *Pelargonium graveolens*

L'étude de l'activité anti microbienne des extraits préparés à partir de la plante étudiée repose sur le pouvoir inhibiteur de la croissance des isolats de bactéries phytopathogènes et celle de la levure par la méthode d'antibiogramme . Cette étude a été réalisée selon 4 étapes suivantes :

- Préparation des extraits : hydrolats(à partir aérienne fraîche et sèche), polyphénols et les HE .

La préparation des dilutions des HE a été faite par l'utilisation de tween 80 à des concentrations à raison de : 1% , 2% , 4%, 5% , 10% , 20% , et 40% .

- Préparation des milieux de culture. (**voir l'annexe**).
- Préparation d'inoculum .
- Ensemencement .
- Technique d'antibiogramme .

2-2-4-1 Préparation des extraits

Pour obtenir la concentration de 40% , nous avons pris à l'aide d'une micropipette 0.2 ml d'HE ajoutée dans 0.5ml de Tween 80 et les mettre dans un tube à essai stérilisé en bien les agitant pour bien homogénéiser le mélange.

Pour préparer les autres concentrations , nous avons suivi les mêmes procédures , la quantité d'HE prélevée et de tween 80 se changent selon la concertation que nous avons voulu d'obtenir .

Pour les extraits poly phénols et hydrolats, ils ont été utilisés purs.

2-2-4-2 Préparation des milieux de culture

les milieux de culture préparés pour l'activité antimicrobienne sont :

King B , LPGA et NAS(**voir l'annexe**)

2-2-4-3 Préparation d'inoculum

La suspension mère de levure *Candida albicans* a été préparée dans le bouillon sabouraud, où 14 colonies de *Candida albicans* ont été prélevées et mises dans 3 ml de bouillon sabouraud. Ces derniers ont été mises à l'agitation de tube par un agitateur vortex. Ainsi 2 ml de la suspension bien homogénéisée a été placée sur une cellule de Malassez (**voir l'annexe**) pour évaluer la concentration par le comptage sous un microscope photonique à un grossissement 40 . cette dernière a été ajustée à 10^5 .

Les suspensions bactériennes ont été préparées pour les trois souches de bactéries phytopathogènes étudiées dans un bouillon nutritifs. A partir des colonies bactériennes âgées de 48heures des crèmes bactériennes ont été prélevées séparément par une pipette pasteur stérilisée pour les placer dans le bouillon nutritif peptoné après agitation, la suspension devient trouble, bien homogénéisée et prête à l'utilisation.

2-2-4-4 Ensemencement

Trois milieux de culture ont été utilisés pour l'étude de l'activité antibactérienne : milieu sabouraud pour *Candida albicans*, LPGA, King B et NAS (voir l'annexe) respectivement pour les bactéries phytopathogènes, *Pectobacterium caratovorum*, *Pseudomonas* sp. et *Erwinia amylovora*.

L'ensemencement a été réalisé séparément pour chaque bactérie dans un milieu de culture par inondation de chacune des suspensions puis l'étalement homogène s'est fait à l'aide des écouvillons stériles.

2-2-4-5 Etude de pouvoir inhibiteur

- **Technique d'antibiogramme**

Les disques stérilisés ont été prélevés à l'aide d'une pince stérilisée et imbibés par les extraits préparés pour être déposés sur le milieu de culture correspondant. Les boîtes ainsi préparées ont été incubées toutes dans l'étuve réglée à 27°C pour les bactéries phytopathogènes pendant 48h et à 30°C pour *Candida albicans* pendant 48h.

2-2-4-6 Lecture des résultats

La lecture de résultats a été faite après 48h pour les levures et 24h d'incubation pour les bactéries. elle consiste à rechercher la présence des zones claires qui entourent les disques ce qui indique la présence ou l'absence d'une zone d'inhibition.

Les diamètres de zone d'inhibition ont été évalués à l'aide d'une règle graduée.

La résistance et la sensibilité des isolats bactériennes et celui de *Candida albicans* ont été déterminées selon l'échelle établie par :

- Très fortement inhibitrices : $0 \geq 30$ mm +++
- Fortement inhibitrices : $21 \text{ mm} \leq 0 \leq 29$ mm ++
- Modérément inhibitrices : $16 \text{ mm} \leq 0 \leq 20$ mm +
- Légèrement inhibitrices : $11 \text{ mm} \leq 0 \leq 16$ mm (- ou +)
- Non inhibitrices $0 \leq 10$ mm (-)

2.3 Application industrielle des extraits de la plante étudiée

2-3-1 Formulation d'une crème hydratante

La formulation de la crème hydratante a été réalisée à base des huiles essentielles et l'hydrolats extraits à partir de l'échantillon qui a montré le meilleur rendement, le meilleur pouvoir anti candidose et la meilleure odeur .la préparation cosmétique a eu lieu au niveau de laboratoire de conception et de développement de venus , wilaya de Blida .

2-3-2 Matériel et méthodes

Notre travail a porté sur la formulation d'une crème hydratante à titre comparatif d'une crème biologique préparée à base des extraits de la plante étudiée et une autre a été préparé à base de l'extrait industriel choisi par le laboratoire.

2-3-2-1 Préparation de la crème

La préparation de la crème se fait selon les deux phases suivantes :

- **Phase organique ou dite A**

Dans un bécher, on a mélangé les composants organiques suivants :

Disodium cetearyl sulfosuccinate, glycol distearate, butyrospermum, coco-caprylate, dimethicone , cetearyl alcohol . les mettre dans le bain Marie jusqu'à remonter à la température du mélange de 75°C.

- **Phase aqueuse ou dite B**

Dans un bécher, on a mélangé les composants aqueux suivants :

L'hydrolat de la plante étudiée de *Pelargonium graveolens* (75%), son HE , la glycérine, le carbommer. L'ensemble a été placé dans le bain Marie jusqu'à atteindre la température 75°C.

On procède pour la mesure de la température de deux phases préparées pour s'assurer qu'elles soit de 75°C. Les deux phases ont été mélangées à l'aide d'un agitateur (rotor –stator) à 2000tours/min jusqu'à leur homogénéisation. A ce mélange ont été rajoutés les extraits de la

plante étudiée. Une fois la crème préparée le pH a été ajusté à 5.36 par l'ajout de quelques gouttes de NaOH.

2-3-2-2 Contrôle de qualité de la crème hydratantes

le contrôle de qualité a porté sur la caractérisation physicochimiques et la qualité microbiologique.

- **Détermination de la viscosité**

Le mode opératoire de la mesure de la viscosité consiste aux étapes suivantes :

- Monter le viscosimètre muni de son étiré de garde sur son support .
- Remplir le bécher avec la crème, en faisant attention à ne pas introduire les bulles d'air.
- Monter le mobile choisi sur l'axe de l'appareil en tenant fixe cet axe et en vissant le manchon de l'assemblage.
- Mettre le moteur en marche et passer à la vitesse désirée en respectant les indications de constructeur.

- **Evaluation du potentiel d'hydrogène**

La mesure du pH de la crème hydratante formulée consiste à introduire la sonde du pH mètre dans le bécher rempli de la crème puis, lire directement la valeur sur l'écran d'affichage.

- **Test de stabilité**

Le test de stabilité a été basé sur l'étuvage et la centrifugation :

l'étuvage consiste à prendre un échantillon de la crème dans un tube à essai et le placer dans l'étuve à la température réglée à 45°C pendant 15 jours.

La centrifugation est réalisée en mettant deux échantillons de 30g de la crème hydratante préparée dans une centrifugeuse dont la vitesse de rotation est de 10000 R.C.F

- **Contrôle microbiologique**

Le contrôle microbiologique de deux crèmes hydratantes formulées a été basé sur la recherche des germes totaux et celles des levures et des moisissures.

a. Recherche des germes totaux

La recherche des germes totaux a été réalisée selon la norme algérienne (82-87). Elle concerne l'ensemble des micro organismes capables de se multiplier à des températures comprises entre 20°C et 45°C .

Le test microbiologique a été réalisé sous hotte à flux laminaire. Il consiste à introduire 10g de la crème dans 100ml de bouillon D/E qui sert à les désinfectants , ensuite prélever 1ml et l'introduire dans une boîte de pétri , un volume de 10à 15ml du milieu PCA (**voir l'annexe**) est ajouté à la boîte , puis faire des mouvements circulaires pour une bonne dispersion du mélange.

L'incubation de la boîte a été faite à température de 32°C pendant 72h

b. Recherche des levures et moisissures

la recherche des levures et des moisissures a été réalisée selon la norme algérienne, la flore fongique représente un indice de qualité marchande des matières premières .

Le même protocole a été suivi pour la recherche des levures et moisissures, la seule différence qui a été présentée c'est que on a utilisé le milieu Sabouraud et pas le PCA.

L'incubation a été réalisée à la température de 25°C pendant 5 jours.

2-3-3 Formulation d'un savon bio a base du Géranium rosat :

2-3-3-1 La saponification par la soude (NaOH) :

Au cours de cette réaction les corps gras (graisses ou huiles) sont hydrolysés en milieu alcalin par une base, la soude (NaOH), à une température comprise entre 30 et 70° C. La température sert à accélérer la réaction de saponification. La saponification des corps gras produit du glycérol et un mélange de carboxylates qui constitue le savon. (**Boulekras, 2010**).

- **Objectif**

L'objectif est de préparer un savon à base d' HE et d' Hydrolat de *Pelargonium rosat*. En appliquant le procédé de fabrication à froid afin de conserver les différents principes actifs présents dans notre substance.

- **composés utilisés :**

- Soude caustique (NaOH).
- Hydrolat de *Pelargonium graveolens*.
- HE de *Pelargonium graveolens* .
- Huile d'olive.
- Huile de coco.
- Huile de jojoba.

2-3-4 Mode opératoire :

2-3-4-1 Préparation de la phase aqueuse (solution de soude) :

Peser séparément la solution du soude caustique dans l'hydrolat, transverse la soude caustique dans l'hydrolat (pas l'inverse), la température de la solution augment en agitant doucement jusqu'à ce que toute la soude soit dissoute. Laisser la température redescende à 40°C.

2-3-4-2 Préparation de la phase huileuse:

Dans un bol en inox , on a pesé les huiles (huile d'olive, huile de coco, huile de jojoba) et les chauffer délicatement à 40°.

Lorsque les deux phases soient à la même température nous versons doucement la phase aqueuse (solution de soude) dans la phase huileuses, et à l'aide d'un Mixeur en mixant les deux phases d'une manière discontinue jusqu'au l'obtention d'une pate. On ajoute une quantité de HE de *Pelargonium rosat* . Il faut que le mélange soit homogène .

- **Moulage:**

A l'aide d'une spatule en bois nous remplissons le moule, le couvrir par un papier film et laisser solidifier à l'abri de la lumière.

- **Démoulage :**

Après 24h le savon est démoulé et le laisser sécher pendant 1 mois pour assurer que le pH du savon devient neutre. L'arrêt de sa purification.

2-3-5 Préparation traditionnelle des produits de bien être

La préparation des produits pour le bien être (talc parfumé, l'eau micellaire , sel de bain et des bougies parfumées) a été réalisée à base des huiles essentielles et l'hydrolats extraits à partir de l'échantillon qui a montré le meilleur rendement, le meilleur pouvoir anti candidose et la meilleure odeur .La préparation a été faite traditionnellement qui a eu lieu au niveau de laboratoire de recherche des Plantes Médicinales et Aromatique de département de Biotechnologies université de Blida1 .

Chapitre III :

Résultats et discussion

3. Résultats et discussion

3.1 Rendement en HE

L'extraction d'huile essentielle du *Pelargonium gravelons* a été réalisée par hydro distillation et elle a donné des différents rendements exprimés en pourcentage selon différents traitements regroupés dans le tableau suivant :

Tableau3 : Rendement moyen des HE du *Pelargonium gravelons*

Traitements	Rendement HE%
T01	2×10^{-5}
T02	$1,44 \times 10^{-5}$
T03	1×10^{-5}
T04	$6,81 \times 10^{-5}$
T05	$1,61 \times 10^{-5}$
T06	$1,55 \times 10^{-5}$
T07	$1,09 \times 10^{-5}$
T08	$1,44 \times 10^{-5}$

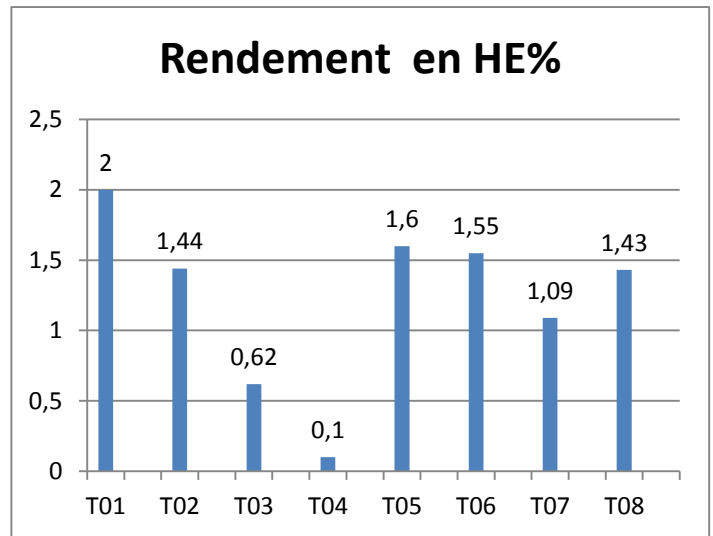


Figure 4: Rendement en HE de *Pelargonium graveolens* .

Le rendement en HE de *Pelargonium gravelons* issu de plante cultivée et récoltée pendant la période végétative, est compris entre ($6,81 \times 10^{-5}\%$, $1 \times 10^{-5}\%$).

Comparé à celui rapporté dans les normes **AFNOR** (0,15%)(**AFNOR, 2000**). Ce taux très faible comparé à celui rapporté par **BOUKHATEM et al. (2010)**(0,2%) obtenu à partir du *Pelargonium gravelons* issue de la région de la Chiffa. Durant la phase floraison. Cette différence est vraisemblablement due au site et à la période de récolte de *Pelargonium gravelons* effectuée à la fin de Novembre en plein champ situé à Staoueli pour notre échantillon et en mois de Mai au niveau de la région de la Chiffa pour l'échantillon de **Boukha tem et al. (2010)**, la période favorable pour une photopériode optimale propice à la biosynthèse des HE. Ce rendement a montré aussi une variation selon l'origine de la plante en France (0,15%), Portugal (0,2), USA (0,18%), et au Maroc (0,1%) (**Rodolfo et al, 2006**).

La variabilité entre les différents traitements a un rapport avec les différents traitements utilisés pour l'arrosage des plants .

Aussi ce rendement est tributaire de plusieurs facteurs : la température, l'humidité relative, la durée totale d'insolation, le régime des vents, les écartements entre plants (un espacement de 60X30 cm avec culture intercalaire (menthe) pour un meilleur rendement (RAO *et al*, 2002), le désherbage ou encore l'apport de la paille. Les amendements minéraux qui contribuent à l'augmentation de la masse végétale est donc celui du rendement en HE, notamment, les engrais organiques en combinaison avec l'azote (160Kg/ha), le temps de séchage (Demarne, 1985; Demarne, 2004), la nature des traitements, (bio stimulant) utilisés, la technique d'extraction et le cycle végétatif qui influent qualitativement et quantitativement sur le rendement en HE .

3.1.2 Etude analytique des HE du *Pelargonium graveolens*

3.1.2.1 Caractéristiques organoleptiques

Tableau4 : comparaison des caractéristiques organoleptiques de l'HE de *Pelargonium graveolens*.

Caractéristiques	Traitement	Aspect	couleur	Odeur
NOTRE ETUDE 2018	T01	Liquide, limpide	Jaune claire	Citronnée
	T02	Liquide, limpide	Jaune claire	Rosée
	T03	Liquide, limpide	Jaune foncée	Citronnée
	T04	Liquide, limpide	Jaune claire	Citronnée
	T05	Liquide, limpide	Jaune foncée	Rosée
	T06	Liquide, limpide	Jaune claire	Rosée
	T07	Liquide, limpide	Jaune claire	Citronnée
	T08	Liquide, limpide	Jaune claire	Citronnée
			Liquide, limpide	Jaune foncée
AFNOR (2000)		Liquide, limpide	Jaune ambre à jaune verdâtre	Rosee, menthee

Les Caractéristiques organoleptiques de l'HE de *Pelargonium graveolens* sont en conformité avec celle définie par les normes **AFNOR (2000)** (**Tableau**), mis à part l'odeur qui a montré une variabilité où l'odeur m'entrée de la norme **AFNOR** c'est l'odeur citronnée s'est revolée sur la plupart des échantillons des HE de la plante étudiée.

3.2 Extraction de l'eau aromatique :

La récupération des eaux aromatiques a été réalisée par hydrodistillation de la partie aérienne fraîche et sèche de la plante cultivée , nous avons obtenu une quantité élevée de 1000ml pour les 8 échantillons à l'états frais, et une quantité plus faible de 8.03ml à l'état sec d'aspect transparent, il a une odeur moins prononcée et fleurie a citronne légère.

l'hydrolat peut être plus ou moins saturé en constituants polaires (hydrophiles). Pour la majorité des auteurs (**Bosson et al2005**) (**Bruneton, 1999**), l'eau aromatique d'une plante contient une certaine quantité d'essence. Celle-ci peut être plus ou moins saturée en constituants polaires ayant plusieurs origines combinées.

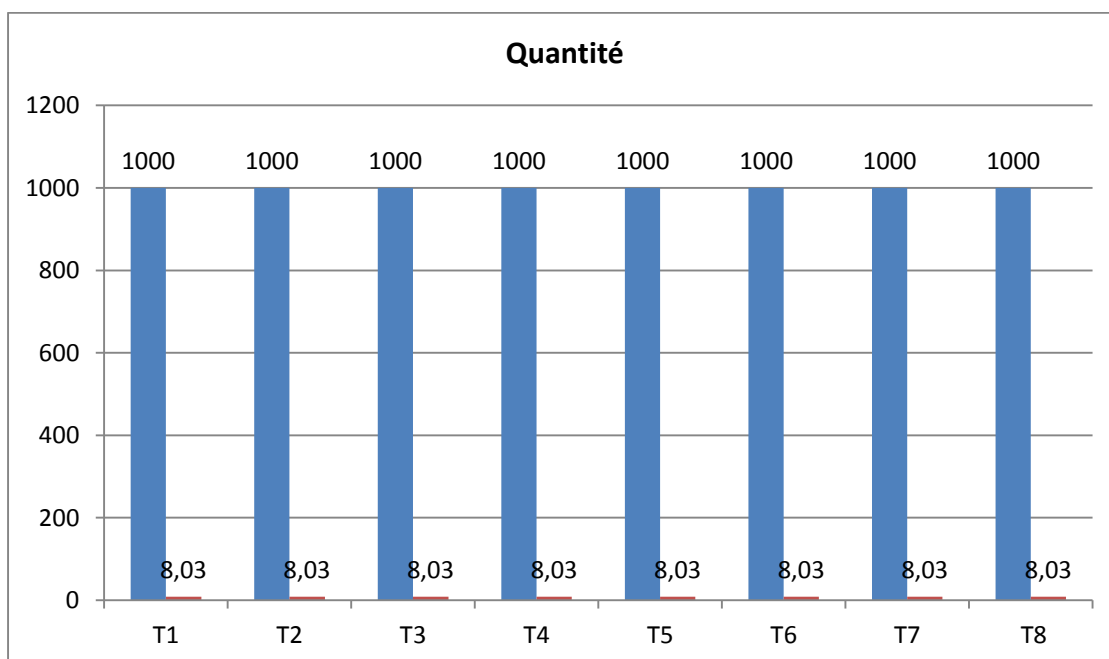


Figure 5 : Quantité d'hydrolat récupéré à l'état sec et frais

3.3 Caractérisation et évaluation des polyphénols

3.3.1 Caractérisation organoleptique

Les polyphénols totaux des échantillons de la plante cultivée de *Pelargonium graveolens* présentent un aspect visqueux de couleur rougeâtre qui varie selon les différents échantillons, ils possèdent une odeur caractéristique parfumée légèrement citronnée.

3.3.2 Rendement en polyphénols

Le rendement en polyphénols totaux des extraits de *Pelargonium graveolens* est de l'ordre de [0.08, 0.29], le rendement dépend de la période de récolte et des conditions climatiques de la région, du mode et la nature des traitements utilisés.

3.2.3 Dosage des composés phénoliques

L'extraction est une étape importante pour l'isolement et plus tard pour l'identification et la quantification des composés phénoliques, ces composés issus de différentes plantes présentent une variabilité dans leurs structures, il est donc très difficile de développer une méthode d'extraction standardisée qui extrait simultanément tous les composés phénoliques inhérents (Bucic Kojić et al.).

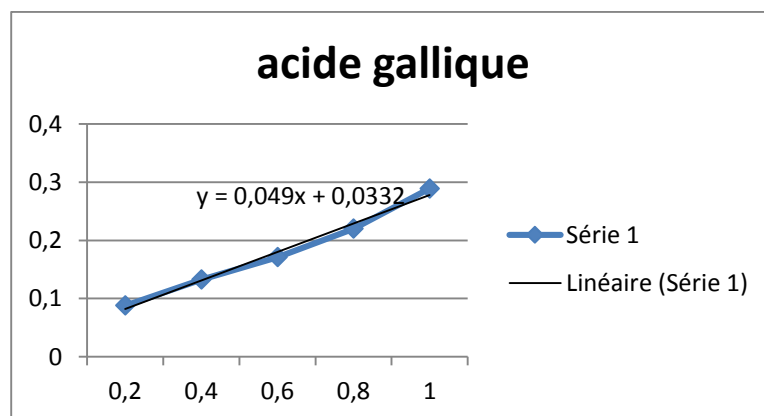


Figure 6 : La courbe d'étalonnage de l'acide gallique en fonction des concentrations.

D'après ce dernier nous pouvons estimer graphiquement la valeur des polyphénols de notre plante étudiée *Pelargonium graveolens* qui est de valeur de : T1(0.23), T2(0.29), T3 (0.26), T4 (0.23), T5(0.17), T6(0.1), T7(0.08), T8(0.05).

Les concentrations des polyphénols ont été exprimées en mgEAG/GE

3.2.4 Dosage des flavonoïdes

La concentration des flavonoïdes extraits de la plante étudiée de *Pelargonium graveolens* est obtenue à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine :

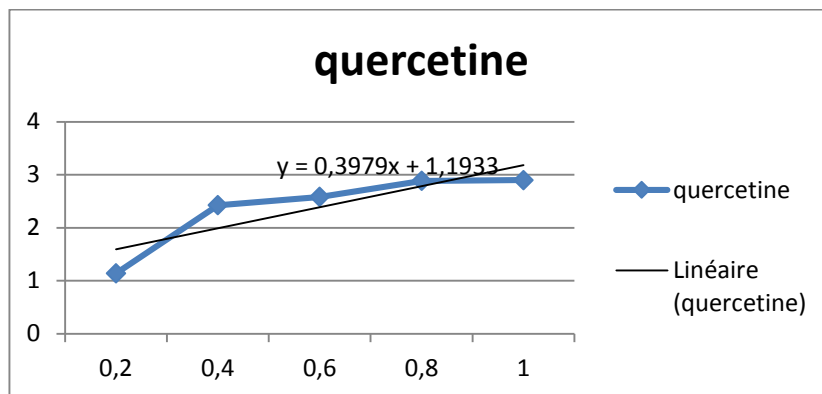


Figure 7: courbe d'étalonnage de la quercétine en fonction des concentrations.

Les concentrations estimées à partir de la courbe d'étalonnage sont :

T1(0.92), T2(0.56), T3(0.2) ,T4(0.91), T5(0.81), T6(0.80), T7 (0.1),T8 é (0.02),

Les concentrations des flavonoïdes ont été exprimée en mgEQ/GE.

3.4 Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante d'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* et de l'antioxydant standard (acide ascorbique) vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH•) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 517nm. Les résultats du pouvoir antioxydant de l'huile testée montrent que le pourcentage d'inhibition est supérieur à 70% pour les 8 échantillons pour une concentration de 1g/ml. Les graphiques (**Figure9 jusqu'à Figure16**) montrent le pourcentage d'inhibition de l'activité du DPPH de 8 échantillons en fonction de la concentration de l'HE de *Pelargonium graveolens*.

La courbe ci-dessous montre le pourcentage d'inhibition de l'activité du DPPH en fonction de la concentration de l'acide ascorbique :

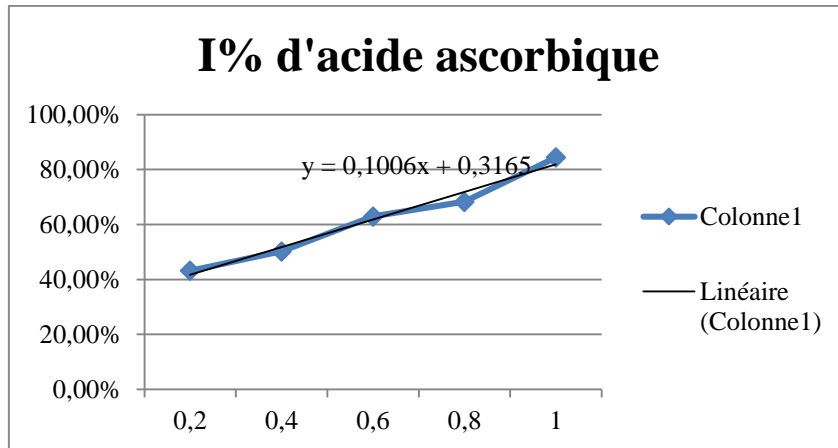


Figure8 : Pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique

Les graphiques ci-dessous montrent le pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction de la concentration des HE de *Pelargonium graveolens* pour les 8 échantillons :

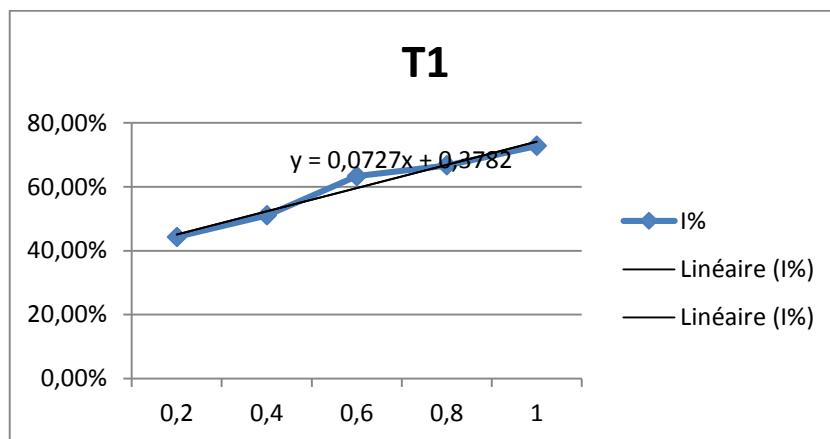


Figure9 : Pouvoir antioxydant des EH d'échantillons T1

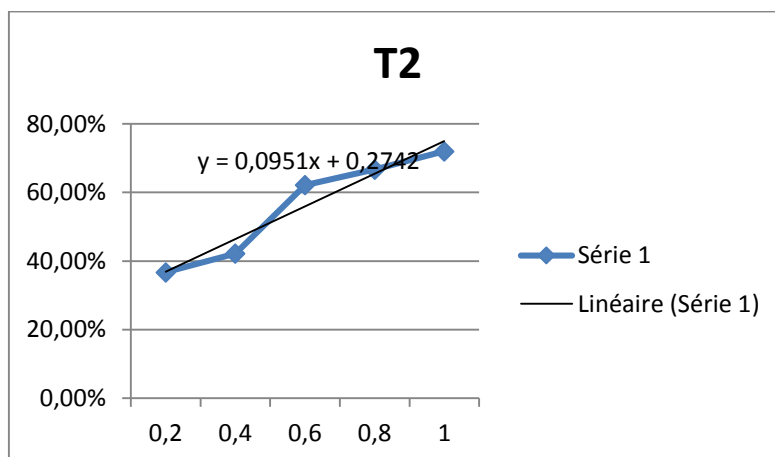


Figure10 : Pouvoir antioxydant des HE d'échantillon de T2

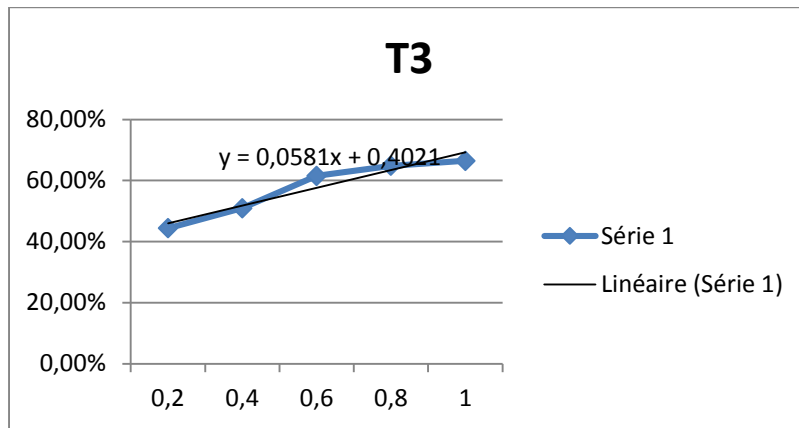


Figure11 : Pouvoir antioxydant des HE d'échantillon de T3

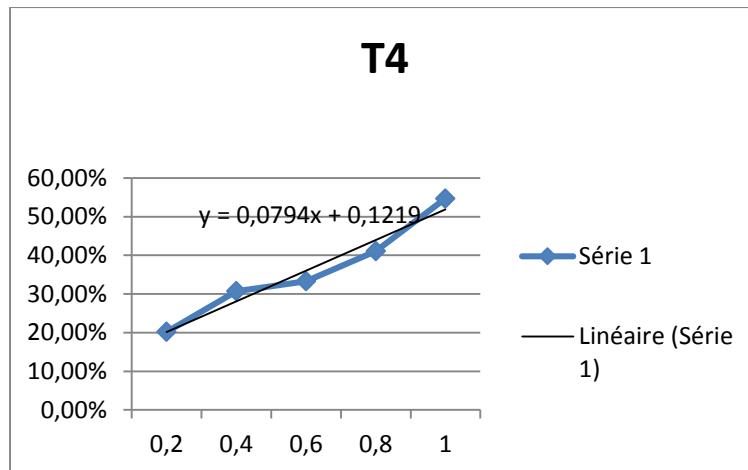


Figure 12: Pouvoir antioxydant des HE d'échantillon T4

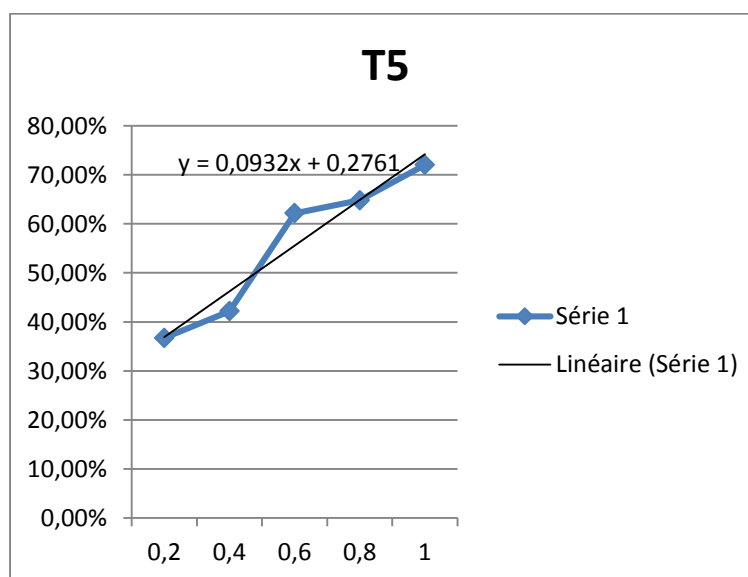


Figure13 : Pouvoir antioxydant des HE d'échantillon de T5

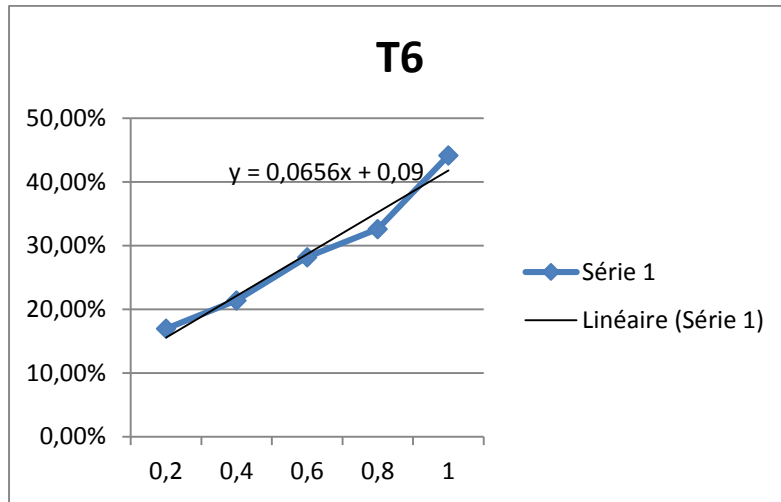


Figure14 : Pouvoir antioxydant des HE d'échantillon de T6

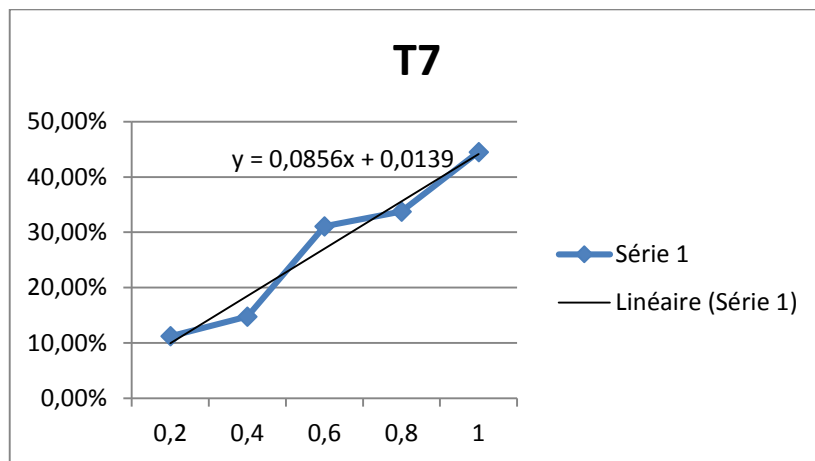


Figure 15: Pouvoir antioxydant des HE d'échantillon T7

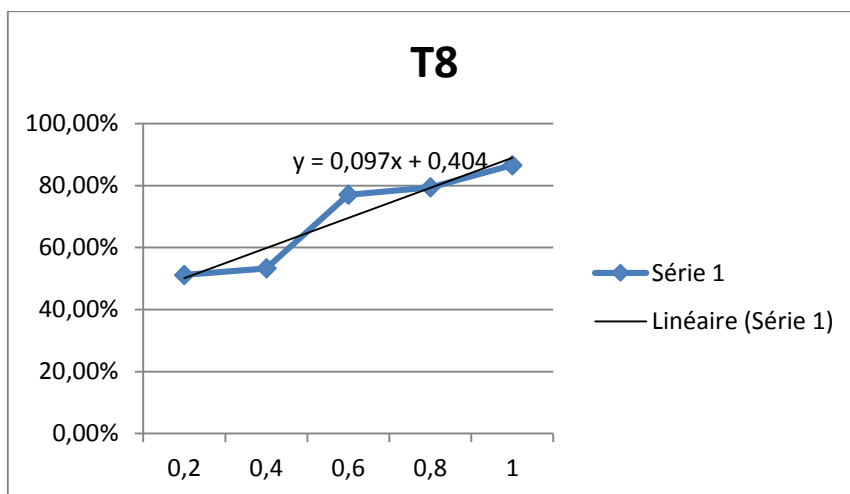


Figure16 : Pouvoir antioxydant des HE d'échantillon T8

D'après les résultats obtenus on a remarqué que :

Les échantillons T1, T2, T3 et T5 ont présenté une bonne activité antioxydante par rapport à l'activité d'acide ascorbique (0.43g/ml), les échantillons T4 et T6 ont présenté une forte activité antioxydante, alors que l'échantillon T8 a présenté une faible activité antioxydante.

3.5 Evaluation de l'activité antimicrobienne de *Pelargonium graveolens*

L'évaluation qualitative de l'activité antibactérienne de notre HE de Géranium rosat a été fait sur 3 souches bactériennes provenant de laboratoire de Recherche des Plantes Médicinale et Aromatique de département des Biotechnologie université de Blida 1

L'activité antibactérienne de l'HE de géranium rosat a été effectuée par la méthode d'antibiogramme.

Les résultats de ce screening sont consignés à noter que le diamètre du disque (5mm) a été incluse dans le calcul de la zone d'inhibition. L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par **Mutai et al (2009)** cet auteur a classé les diamètres des zones d'inhibitions (D) de la croissance microbienne en 5 classes:

- très fortement inhibitrices : $D \geq 30$ mm +++
- fortement inhibitrices : $21 \text{ mm} \leq D \leq 29$ mm ++
- modérément inhibitrices : $16 \text{ mm} \leq D \leq 20$ mm +
- légèrement inhibitrices : $11 \text{ mm} \leq D \leq 16$ mm (- ou +)
- non inhibitrices $0 \leq D \leq 10$ mm (-)

Alors de ce test, le diamètre du disque utilisé est de 5 mm avec une dose supplémentaire d'HE.

3.5.1 Résultats d'antibiogramme

L'HE a présenté *in vitro* une activité inhibitrice sur la croissance de certains germes microbiens, si on prend en considération les diamètres d'inhibition, l'HE était plus active sur *Pseudomonas* sp. qui a été plus sensible avec l'échantillon T2. *Erwinia amylovora* a été plus sensible avec l'échantillon T6 avec des diamètres d'inhibition selon les échantillons.

Il est montré aussi que ce diamètre augmente avec l'augmentation de la concentration en HE .avec la concentration de 1% nous remarquons que la majorité des souches bactériennes

qui ont montré une sensibilité, ont vu leurs diamètres d'inhibition augmenter avec l'augmentation des concentrations comme T03 et T06 qui ont montré une forte activité inhibitrice contre la souche *Erwinia amylovora* avec des diamètres compris entre [6,25] T01, T02, T04, T05 et T07 ont montré une forte activité inhibitrice contre la souche *Pseudomonas* sp. avec des diamètres d'inhibition compris entre [09, 44], par contre, l'inhibition chez *Pectobacterium caratovorum* a été modérée avec les traitements T03 et T04.

En Comparant les résultats de notre étude à ceux des travaux réalisés par **Tepe et al, (2005)** et **(Gilles et al, (2010))**, qui ont mentionné la sensibilité des bactéries Gram + au pouvoir antimicrobien des HE de la plante étudiée. nous confirmons cette différence de sensibilité entre les bactéries à Gram – vu leur résistance intrinsèque aux agents biocides, qui est en relation avec la nature de leur paroi bactérienne (**Cummins et Harris, 1956**).

La souche *Pectobacterium caratovorum* s'est avérée plus résistante à notre HE, cette résistance n'est pas surprenante, ceci a été confirmé par plusieurs études antérieures **Hammer et al, (1999)** ; **Dorman et Deans, (2000)**.

3.5.2 Résultats de l'activité antifongique

Concernant l'activité inhibitrice d'HE sur la souche fongique utilisée, il apparaît clairement que cette HE présente un fort pouvoir anti-candidosique avec une inhibition totale dans la concentration 40%, et avec un diamètre de la zone d'inhibition qui est compris entre 9mm et 24 mm selon les différents traitements à la concentration de 20%, cependant les faibles concentrations de 10% n'ont pas engendré une inhibition avec les échantillons T01 T03 T04 T07 par ailleurs les autres traitements montrent une légère inhibition à 5%. aucune inhibition n'était apparente pour le traitement T05 qui a montré une faible inhibition, ce ci confirme que le diamètre de la zone d'inhibition est proportionnellement augmente avec les concentrations croissantes.

Conclure sur la sensibilité des souche étudiées et les HE issues des différents échantillons concorde avec les études rapportées par la bibliographie **Pauli et al. (2006)** **Ionuy et al. (2009)**, **Hassan et al. (2011)**. **Maryama et al. (2008)**. leur travaux ont souligné que l'HE de *Géranium rosat* a un pouvoir fongicide puissant contre la souche mycélienne, en particulier *Candida albicans*.

L'étude réalisée par **Mahboobi et al (2008)** a démontré que la même huile essentielle particulière ses constituants majoritaires dont le géraniol et le citronellol est douée d'une

action inhibitrice sur les *Candida albicans* dans le même sillage, **Hammer et al (1999)** ont réalisé une étude complète sur l'activité antimicrobienne d'une dizaine d'HE et leurs composés majoritaires, ils en ressort de cette étude l'essence du *Géranium* possède un fort pouvoir inhibiteur contre *Candida albicans* que vis-à-vis contre d'autres souches fongiques, ces résultats rapportés coïncident avec les résultats obtenus dans notre recherche.

Zore et a. (2011) a publié dans « Mycoses » et a mis en évidence le mécanisme d'action d'HE vis-à-vis la souche fongique. Il a confirmé que l'HE de *Géranium* et même ces composés majoritaires tels que géraniol, acétate de geranyle et le citronellol agissent sur la cellule fongique par l'endommagement de l'intégrité physique de sa membrane et par inhibition de la formation de tube germinatif, et par conséquence, l'arrêt de la croissance cellulaire.

L'activité antifongique des HE est sujet de plusieurs études scientifiques *in vitro* depuis plusieurs années.

Cependant, les méthodes utilisées pour évaluer cette activité sont nombreuses et donnent parfois résultats différents selon les conditions expérimentales adoptées par chaque manipulation.

Le mécanisme de l'action fongicide des HE a été abordé par quelques études qui sont arrivées à la conclusion que ce mécanisme se manifeste par une altération de la membrane plasmique de la cellule fongique. Cependant les méthodes biochimiques utilisées dans ces travaux ne permettent pas de déceler d'autres altérations éventuelles notamment au niveau de la paroi cellulaire (**Cox et al, 2001**).

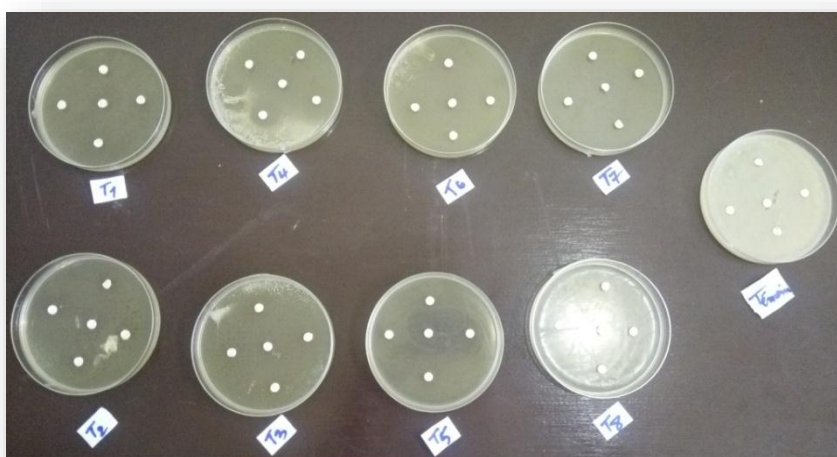


Figure17 :l'activité antifongique des HE de *Pelargonium graveolens*.

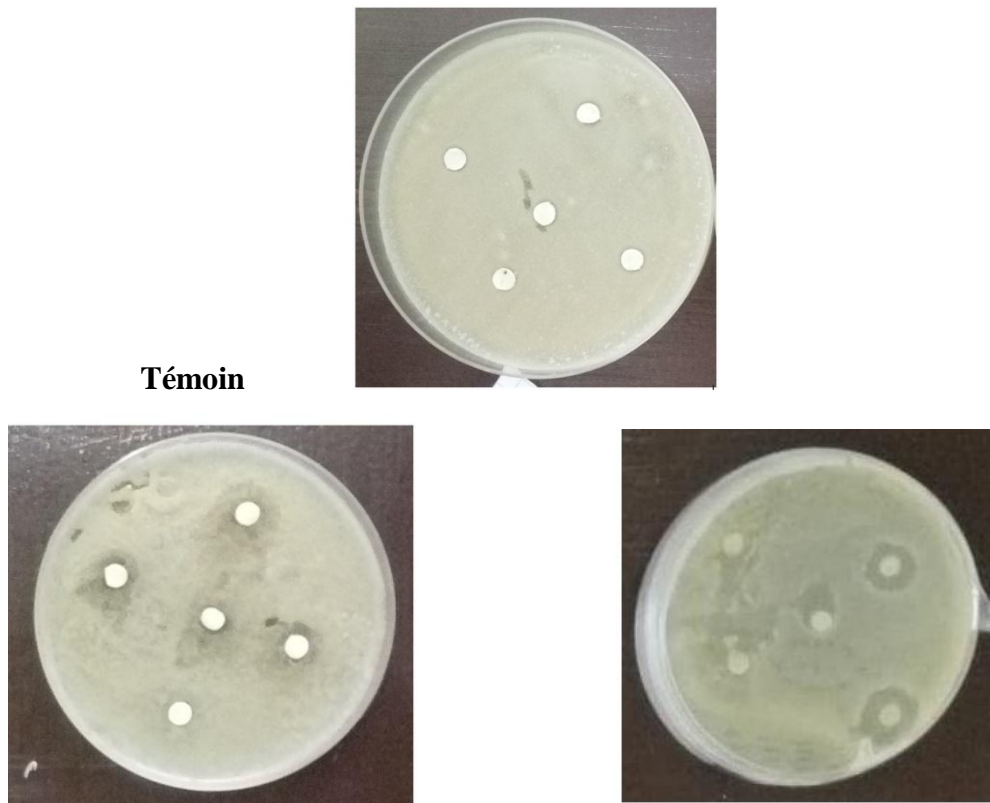


Figure18 : Pouvoir antimicrobien des HE de *Pelargonium graveolens* sur les souches d'*Erwinia amylovora*.

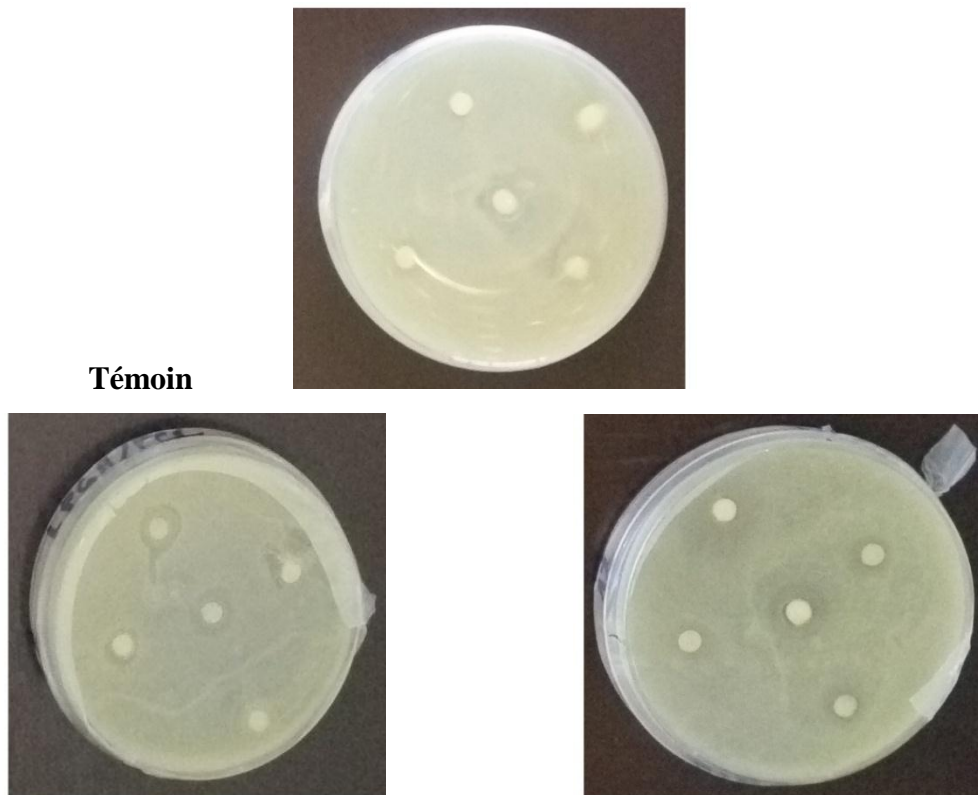


Figure 19: Pouvoir antimicrobien des HE de *Pelargonium graveolens* sur les souches de *Pseudomona* sp.

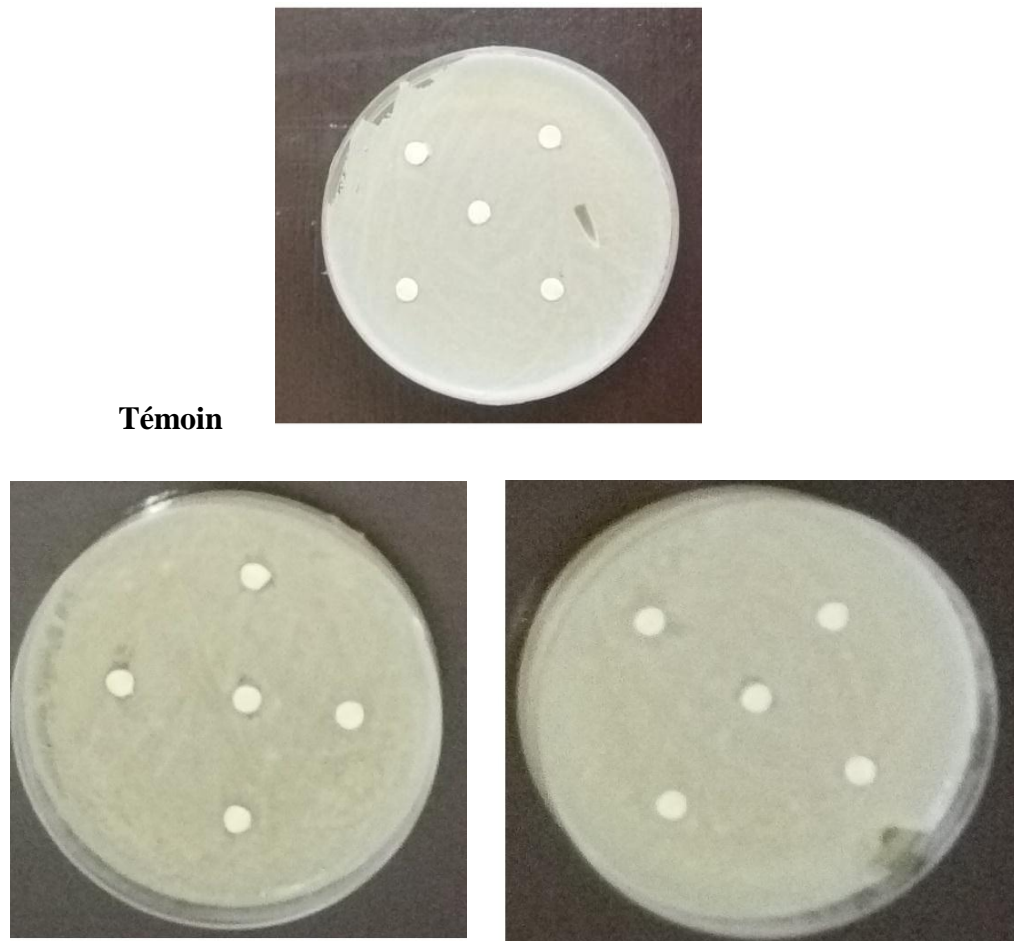


Figure20 : Pouvoir antimicrobien des HE de *Pelargonium graveolens* sur les souches de *Pectobacterium carotovorum*..

3.6 Application industrielle

3.6.1 Caractérisation physico chimique de produit fini

3.6.1.1. Test physico chimique

Les résultats des contrôles physico chimiques sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau5 : résultats des contrôles physico-chimiques de la crème.

Paramètres	Résultats
Viscosité	100000 mPas
Ph	5.36

Le Ph de la peau conditionne l'ionisation et la capacité d'absorption des principes actifs. sur le plan dermatologique, le Ph de la crème se rapproche du Ph de la peau qui est de 5.5 (Goetz et Busse 2007).

3.6.1.2 Evaluation de la stabilité de la crème

Le contrôle de la crème formulée à base d'hydrolat et de l'huile essentielle de géranium rosat a été basé sur les paramètres physicochimiques, la texture, l'odeur et la couleur. ces derniers n'ont pas montré une variabilité durant une période d'incubation à la température réglée à 45°C durant 15 jours.

La crème hydratante a gardé sa texture intacte cependant la variabilité n'a affecté que la couleur où la crème préparée à partir des extraits de *Geranium rosat* présente une couleur blanchâtre alors que celle préparée à partir d'extrait industriel était de couleur beige.

Tableau6 : Résultats des paramètres organoleptiques de la crème hydratante.

Durée	7 ^{ème} jours	15 ^{ème} jours
Texture	Gélifiée	Gélifiée
Odeur	Citronnée douce	Citronnée douce
Couleur	Blanchâtre	Blanchâtre



Crème hydratante Bio.



crème hydratante par extrait industriel.

Figure 21: Les deux crèmes hydratantes industrielles et bio.

3.6.1.3 Contrôle microbiologique

Le contrôle microbiologique a montré une absence totale des germes totaux, des moisissures et des levures. Ceci confirme la bonne qualité microbiologique de la crème hydratante formulée en collaboration avec venus.

3.7 Interprétation des résultats

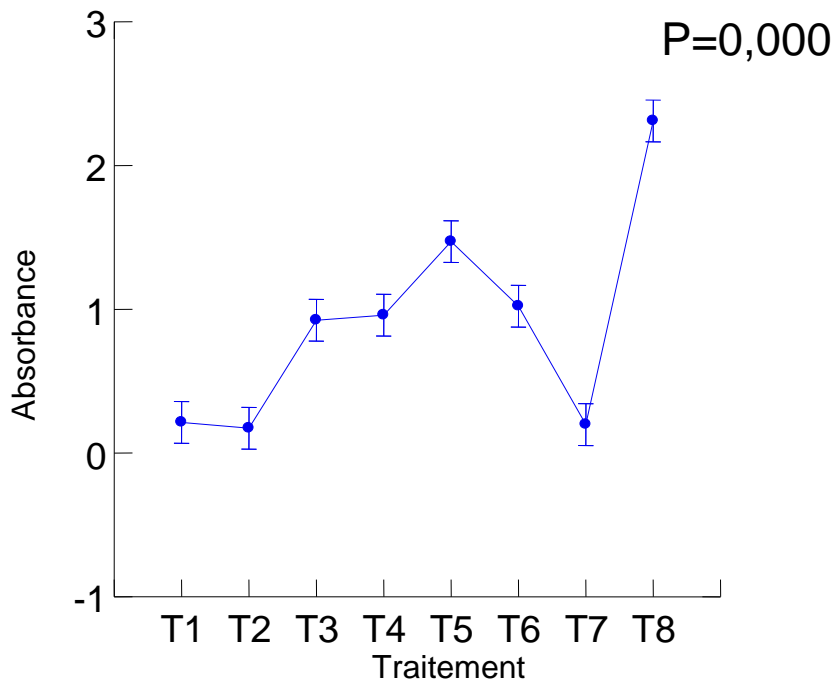


Figure 22: Analyse de la variance des absorbances des différents traitements des polyphénols par le modèle GLM.

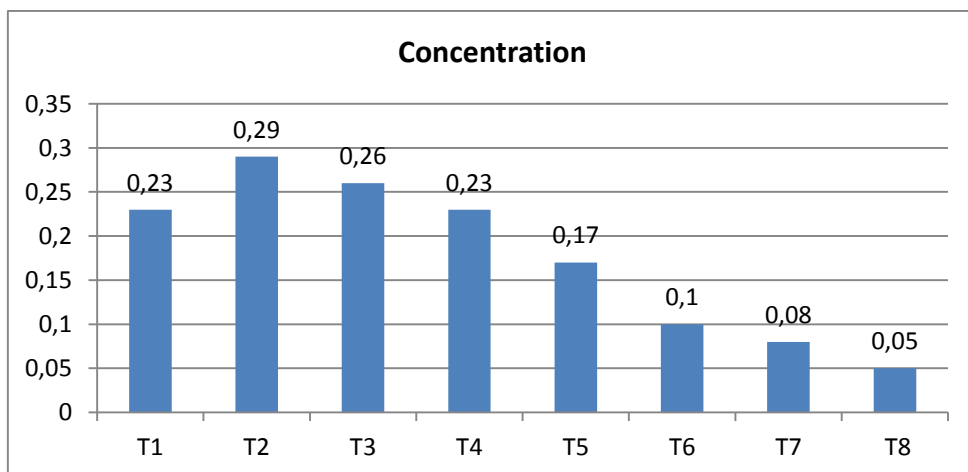


Figure23 : concentration des polyphénols de différents échantillons de la plante cultivée de *Pelargonium graveolens*.

3.7.1 Analyse de la variance des absorbances des polyphénols

L'analyse de la variance des absorbances des polyphénols des échantillons de la plante cultivée a montré une différence très hautement significative ($P=0,000$, voir l'annexe) selon le modèle GLM. Les traitements ont été classés dans l'ordre décroissant selon les absorbances: T08(2,574), T05(1,499), T06(1,233), T04(1,625), T03(0,994), T07(0,342), T01(0,188),T02(0,187)

Les concentrations des polyphénols des échantillons de la plante ont été déterminées à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**figure 6**) en fonction des absorbances ce qui a permis les classements selon les concentrations en polyphénols suivants: T8(0,33mgEAG/GE), T05(0,29 mgEAG/GE), T06(0,26 mgEAG/GE), T04(0,23 mgEAG/GE), T03(0,17 mgEAG/GE), T07(0,10 mgEAG/GE), T01(0,08 mgEAG/GE), T02(0,05 mgEAG/GE).

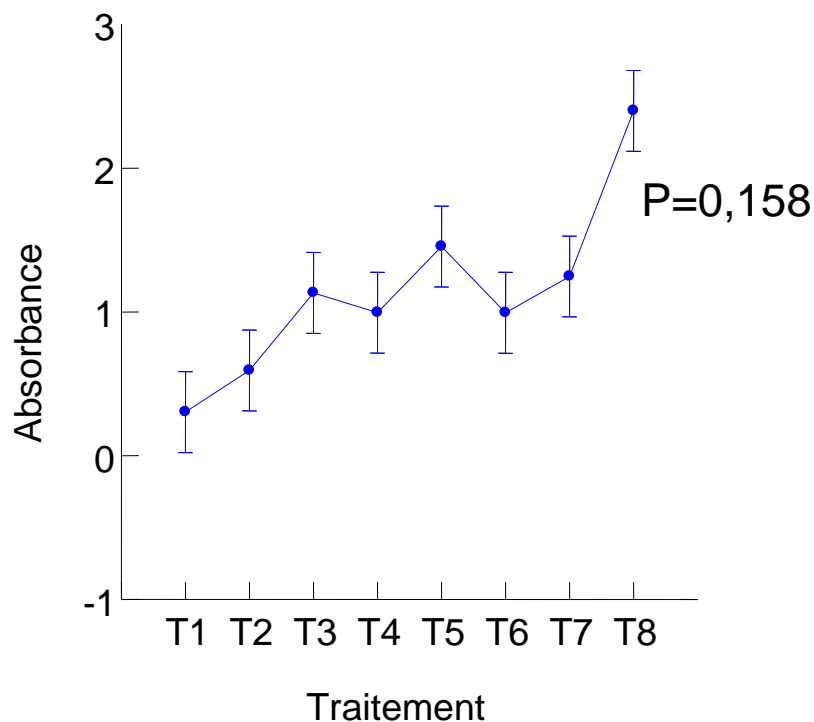


Figure 24: Analyse de la variance des absorbances des différents traitements des flavonoïdes par le modèle GLM

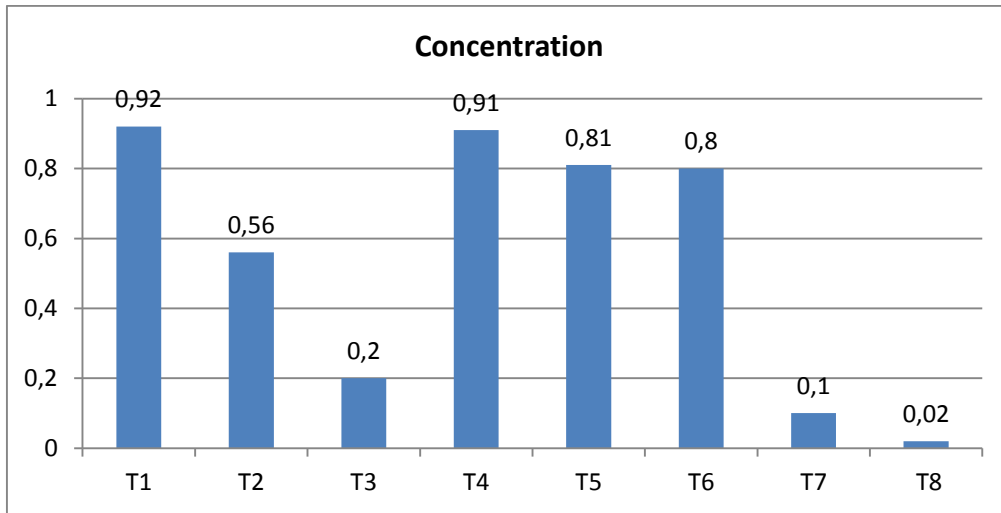


Figure 25 : concentration des flavonoïdes de la plante cultivée *Pelargonium graveolens*.

3.7.2 Analyse de la variance des absorbances des flavonoïdes

L'analyse de la variance des absorbances des flavonoïdes des échantillons de la plante cultivée a montré une différence non significative ($P=0,158$, voir l'annexe) selon le modèle GLM. Les traitements ont été classés dans l'ordre décroissant selon les absorbances: T08(2,574), T05 (1,629), T07 (1,590), T03(1,499), T06(1,233), T04(1,003), T02(0,996), T01(0,412).

Les concentrations des flavonoïdes des échantillons de la plante ont été déterminées à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine (**figure 7**) en fonction des absorbances ce qui a permis les classements selon les concentrations des flavonoïdes suivants: T08(0,92 mgQG/GE), T05(0,56 mgQ/GE), T07(0,2mgQ/GE), T03(0,91 mgQG/GE), T06(0,81 mgQ/GE), T04(0,80 mgQ/GE), T0(0,1 mgQ/GE), T01(0,02 mgQ/GE).

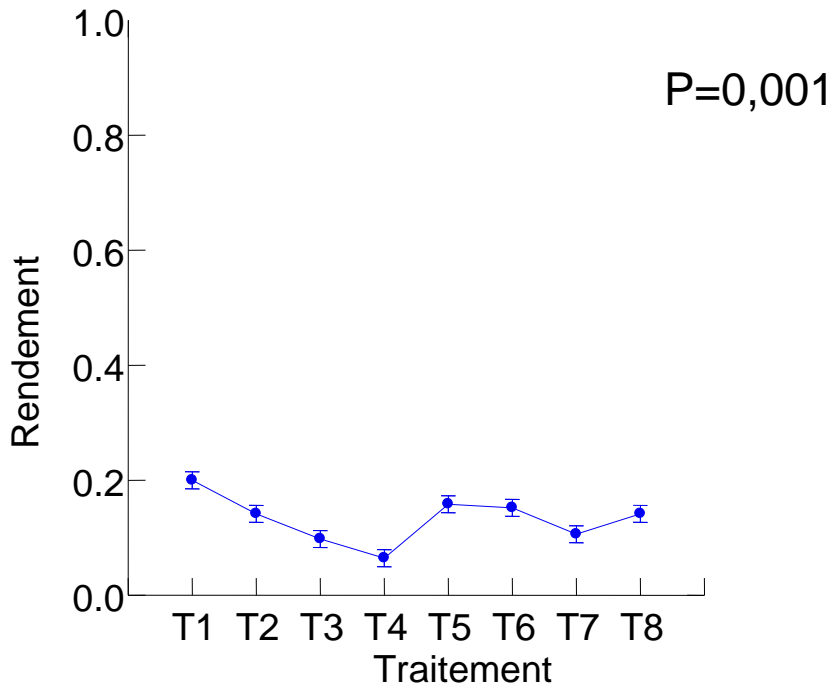


Figure 26 : Analyse de la variance de rendement de différents traitements en HE par le modèle GLM

3.7.3 Analyse de la variance de rendement en HE

L'analyse de la variance du rendement en HE des échantillons de la plante cultivée a montré une différence hautement significative ($P=0,001$), (**voir l'annexe**) selon le modèle GLM on a un rendement de [0,001% à 0,006%]. Les traitements ont été classés dans l'ordre décroissant selon le traitement qui a montré le meilleur rendement T04(6.81×10^{-5} %). T01 (2×10^{-5} %), T05($1,6 \times 10^{-5}$ %), T06 ($1,55 \times 10^{-5}$ %), T02($1,44 \times 10^{-5}$ %), T08($1,43 \times 10^{-5}$ %), T07($1,09 \times 10^{-5}$ %), T03(1×10^{-5} %),

3.7.4 Analyse de la variance de rendement en hydrolats sec et frais

L'analyse de la variance de rendement en hydrolats sec et frais des échantillons de la plante cultivée a montré une différence non significative ($P=0,978$)($P \leq 0,05$), (**voir l'annexe**) selon le modèle GLM. Les traitements n'ont pas engendré une différence sauf le traitement T03 a montré une variabilité très faible.

3.7.5 Activité antioxydante

Les résultats du pouvoir antioxydant des HE des échantillons de la plante cultivée de *Pelargonium graveolens* par le piégeage du radical libre DPPH ont donné des valeurs d'EC50

Selon les 8 échantillons des valeurs comprises entre 0.11 g/ml et 0.93g/ml .

Said. Et al 2011 en étudiant l'effet antioxydant de *Pelargonium asperum* ont trouvé une valeur d'EC50 de 0.006g/ml ce qui a montré que notre échantillon possède une forte activité antioxydante .la valeur d'EC50 trouvée par **Sayed et Fayed 2009** pour l'HE de *Pelargonium graveolens* de la région d'Egypt est de 0.665g/ml ce qui montre que notre échantillon possède une bonne activité antioxydante.

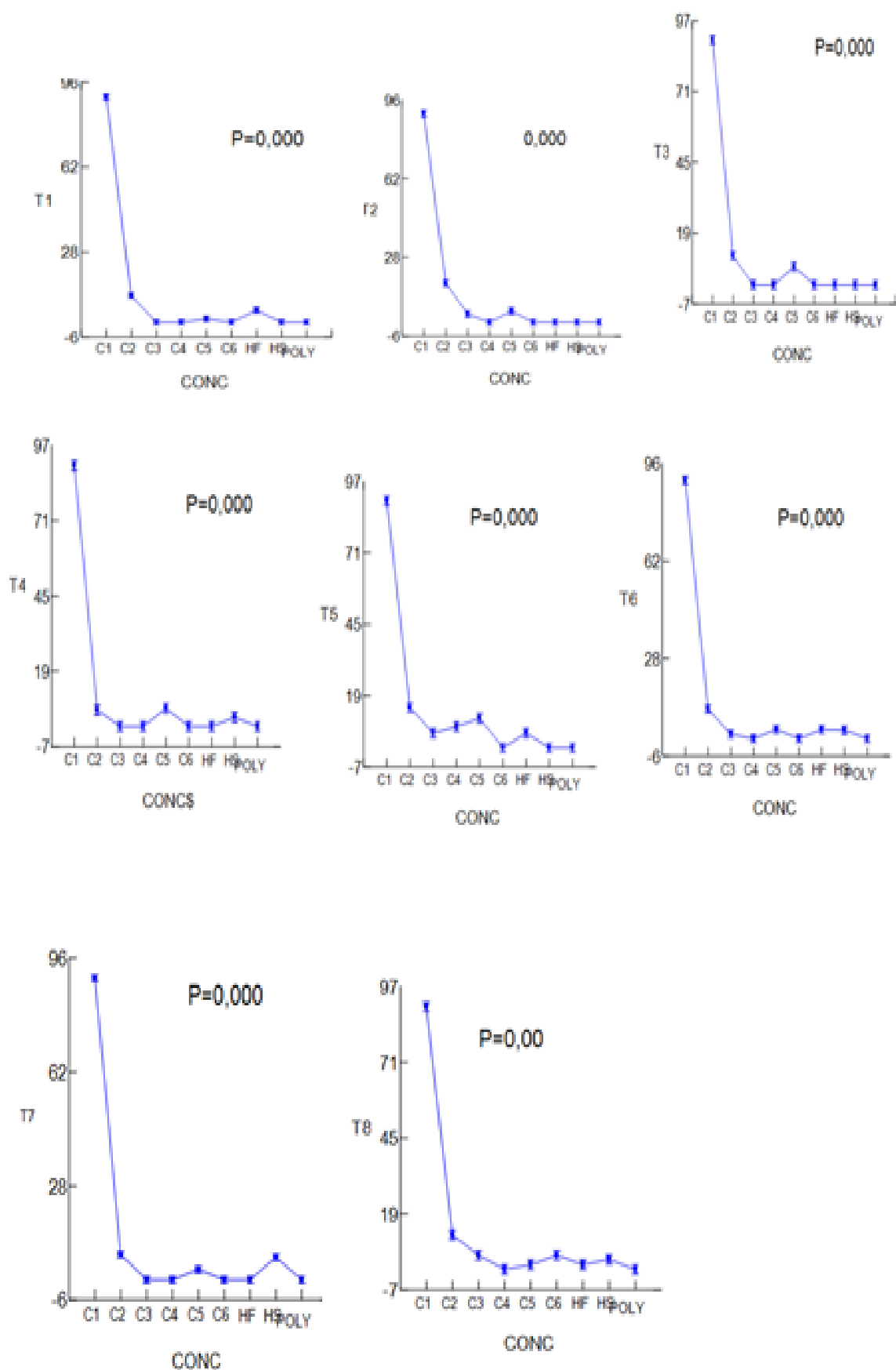


Figure 27: Analyse de la variance de diamètre de la zone d’inhibition de différents traitements selon la souche *Candida albicans* par le modèle GLM

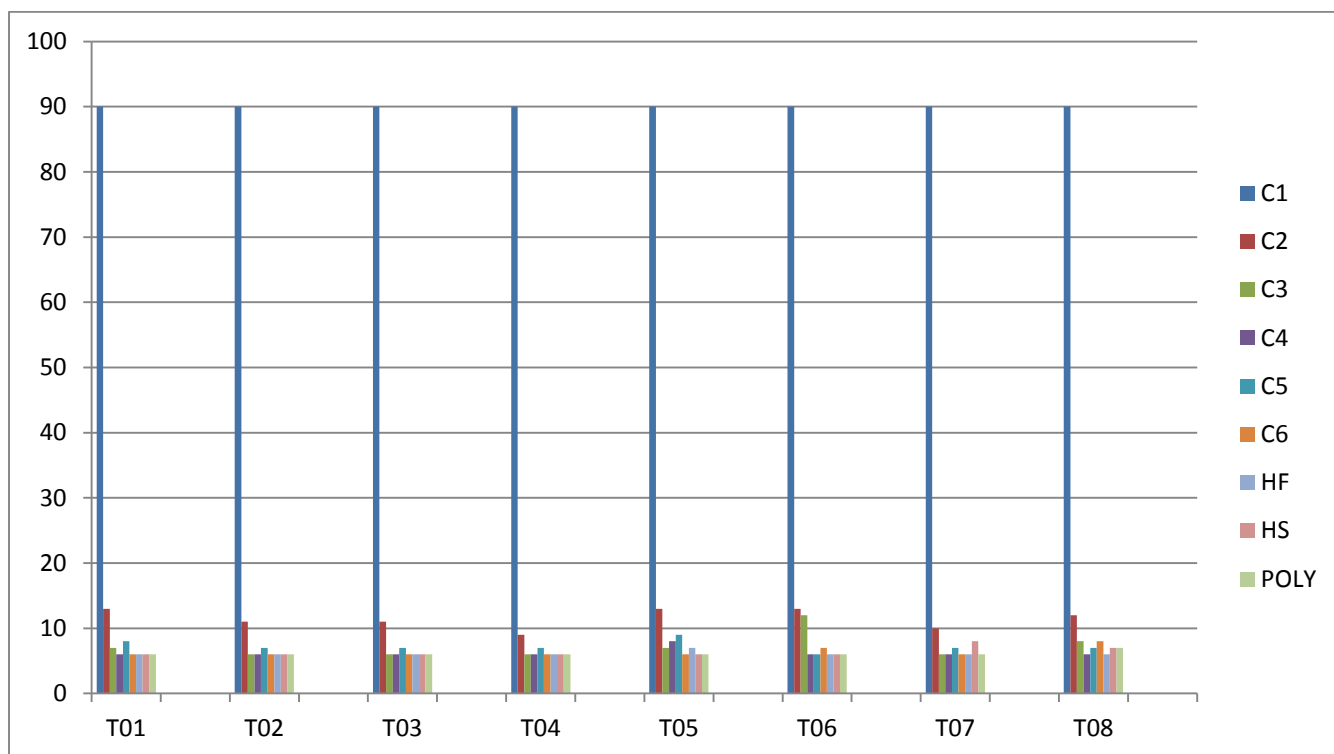


Figure28 : diamètre de la zone d'inhibition des différents traitements sur la souche *Candida albicans* par le modèle GLM.

C1: (40%), C2 : (20%), C3 : (10%), C4 : (5%), C5 : (4%), C6 :(2,5)

HF: hydrolat frais , **HS** : hydrolat sec,

T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8 : extrais des échantillons de la plante cultivée selon les traitements naturels.

3.7.6 Activité anticandidosique

L'analyse de la variance de taux d'inhibition des extraits des échantillons de la plante cultivée contre la souche fongique *Candida albicans* selon différentes concentrations C1 (40%), C2 (20%), C3 (10%), C4 (5%), C5 (4%), C6(2,5), plus les extrais de polyphénol et, de l'hydrolat selon la matière sec et frais.

Le diamètre le plus élevé a été montré avec C1 (concentration40%) avec inhibition totale de 90mm avec tous les traitements de T01 à T08. Les autres concentrations ont donné presque le même taux d'inhibition qui varie entre [7-19].

La concentration qui a montré un taux d'inhibition intéressant avec tous les échantillons et bien montré entre la C1 et C2 c'est la concentration minimale inhibitrice.

3.7.7 Activité anti bactérienne

L'efficacité inhibitrice des HE des échantillons de la plante cultivée a montré une variabilité selon les souches bactériennes: S2, S3, S4

L'analyse de la variance des taux d'inhibitions des échantillons de la plante cultivée a montré une différence très hautement significative ($P=0,000$; $P\leq 0,05$) (voir l'annexe) sauf l'échantillon T01 qui a montré une différence non significative ($P=0,214$; $P\leq 0,05$) selon le modèle GLM.

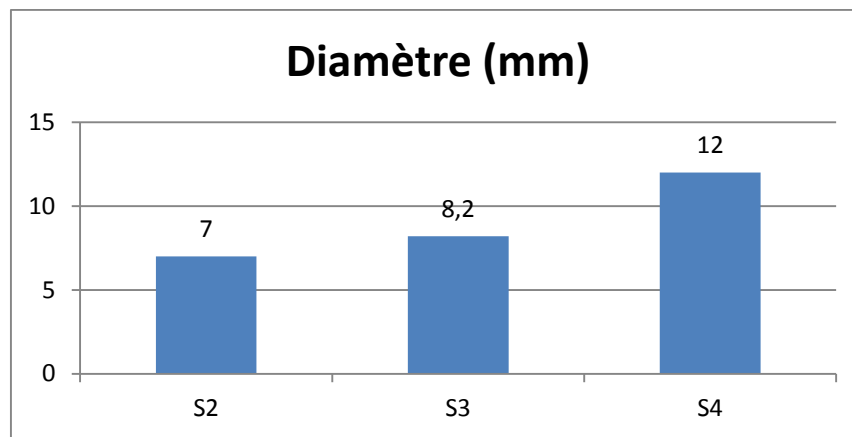


Figure29 : taux d'inhibition de l'échantillon T01 en fonction des souches.

S2 : souche de la bactérie de *Pectobacterium caratovorum*

S3 : souche de la bactérie d'*Erwinia amylovora*

S3 : souche de la bactérie de *Pseudomonas* sp.

L'inhibition engendrée par T01 a montré un diamètre compris entre [7mm-12mm] où il a montré une efficacité sur la S4 dite légèrement inhibitrice.

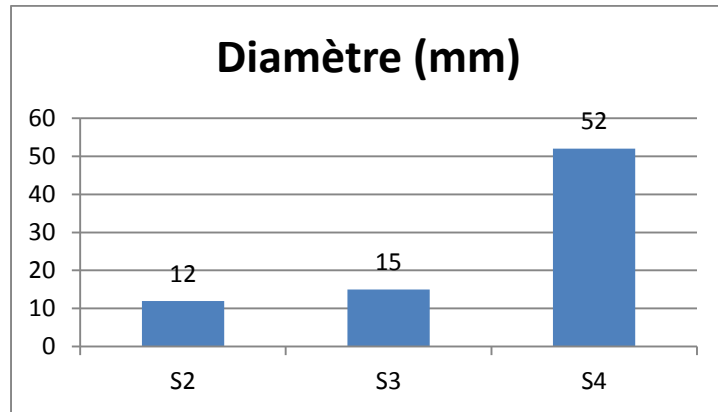


Figure 30: taux d'inhibition de l'échantillon T02 en fonction des souches.

L'inhibition engendrée par T02 a montré un diamètre compris entre [12mm-52mm] où il a été très fort sur la S4 dite très fortement inhibitrice.

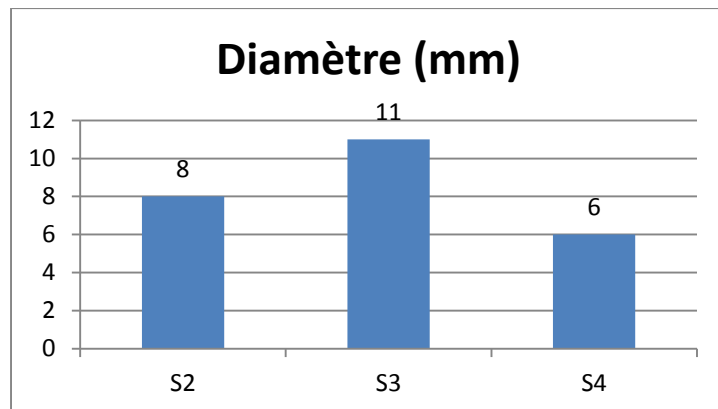


Figure 31 : taux d'inhibition de l'échantillon T03 en fonction des souches.

L'inhibition engendrée par T03 a montré un diamètre compris entre [6mm-11mm] où il a été efficace sur la souche S3 dite légèrement inhibitrice.

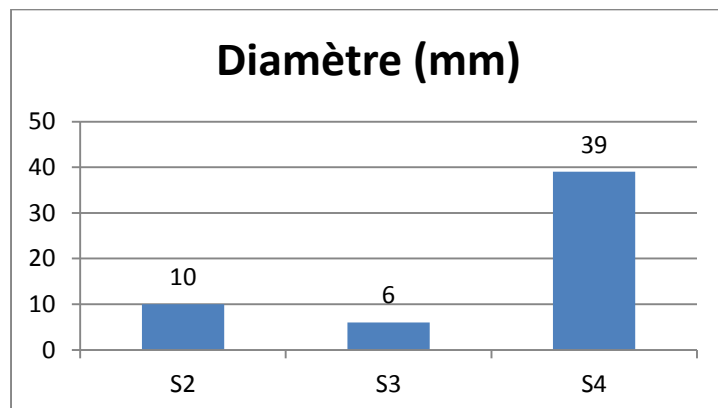


Figure 32 : taux d'inhibition de l'échantillon T04 en fonction des souches.

L'inhibition engendrée par T04 a montré un diamètre compris entre [6mm-39mm] où il a été très fort sur la S4 dite fortement inhibitrice.

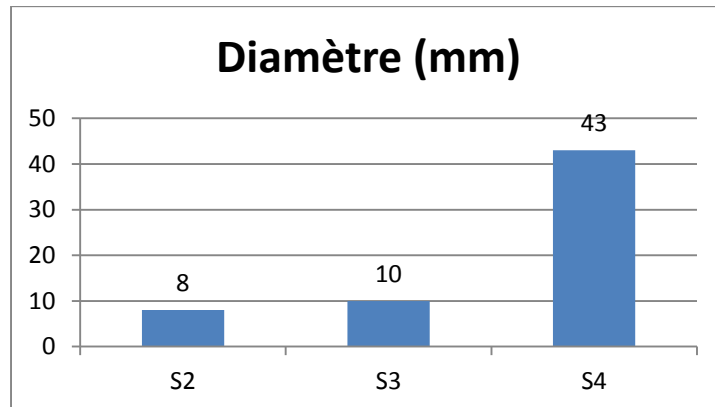


Figure 33: taux d'inhibition de l'échantillon T05 en fonction des souches.

L'inhibition engendrée par T05 a montre un diamètre compris entre [8mm-43mm] où il a été très fort sur la S4 dite très fortement inhibitrice

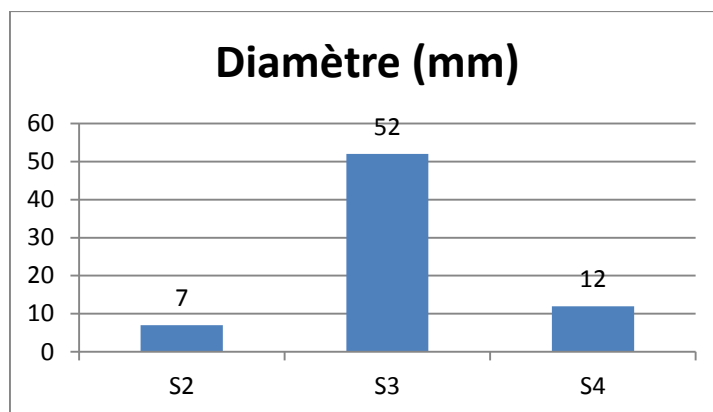


Figure 34 : taux d'inhibition de l'échantillon T06 en fonction des souches.

L'inhibition engendrée par T06 à montre un diamètre compris entre [7mm-52mm] où il a été très fort sur la S3 très fortement inhibitrice.

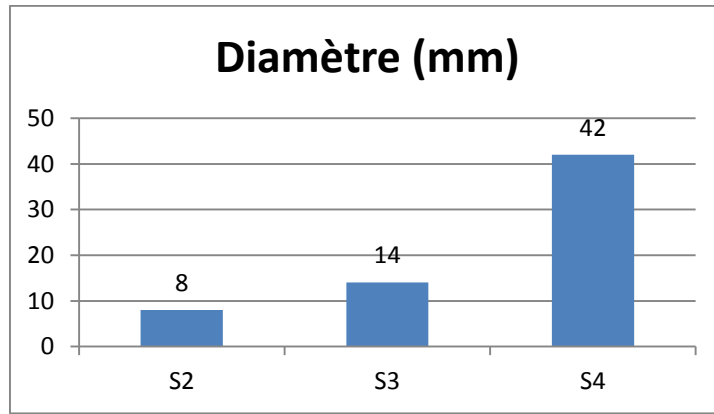


Figure 35: taux d'inhibition de l'échantillon T07 en fonction des souches.

L'inhibition engendrée par T07 a montré un diamètre compris entre [8mm-42mm] où il a été très fort sur la S4 très fortement inhibitrice.

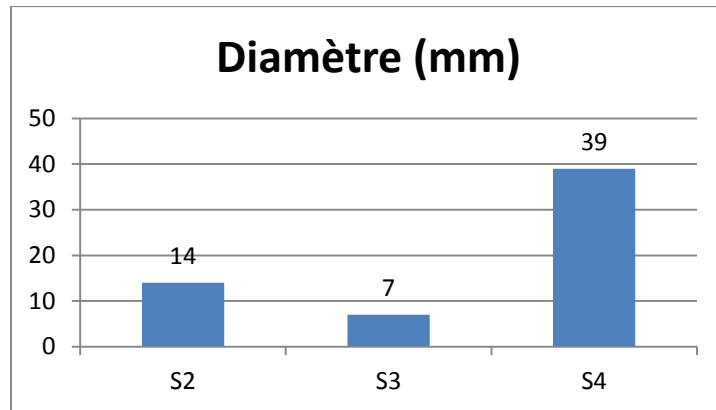


Figure 36 : taux d'inhibition de l'échantillon T08 en fonction des souches.

L'inhibition engendrée par T08 a montré un diamètre compris entre [7mm-39mm] où il a été très fort sur la S4 dite très fortement inhibitrice.

L'échantillon qui a montré une efficacité sur les souches bactériennes et qui a engendré un diamètre d'inhibition très important c'est bien le T02 contre la S4 qui a été très sensible avec un diamètre de 52 mm dite fortement inhibitrice, et l'échantillon T06 contre la souche S3 qui a été très sensible avec un diamètre de 53 mm.

Concernant la S2 a montré une résistance avec tous les échantillons testés.

Conclusion

Cette étude a porté sur la recherche des activités biologiques des extraits des échantillons de la plante *Pelargonium graveolens* sous l'effet de différents traitements naturels. Ces derniers concernent les HE extraites par hydro distillation et les hydrolats des échantillons frais et secs, les polyphénols et les flavonoïdes.

L'expérimentation a été basée sur l'extraction et l'évaluation des rendements et l'étude de l'activité antioxydante basée sur le piégeage des radicaux libres de métabolites secondaires des échantillons de plants cultivés précités complétée par l'étude de l'activité antibactérienne traduite par la méthode d'antibiogramme .

L'activité anticondidoze sur *Candida albicans* ainsi que l'activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries phytopathogènes redoutables telles que *Pectobacterium carotovorum* agent responsable de la maladie de la jambe noire de la pomme de terre, *Erwinia amylovora* , agent du feu bactérien , *Pseudomonas* sp. agent de pourriture des tubercules de pomme de terre. Les principaux objectifs de cette étude antimicrobienne visent la recherche d'une solution naturelle à pouvoir anticondidoze et à pouvoir bactéricide utiles à l'application pharmaceutique et dans le biocontrôle des maladies cultures. Une dernière étape consiste à l'application industrielle résumée à la formulation de quelques produits cosmétiques et bien être à partir des extraits des échantillons de la plante étudiée. Ainsi les parties étudiées ont révélé les résultats suivants :

- Extraire les huiles essentielles de *Pelargonium graveolens* pendant la phase floraison.
- Méthode d'extraction par entrainement à la vapeur et micro onde
- Valoriser la plante dans le domaine alimentaire.
- Formuler d'autres produits cosmétiques tels que les champoings qui ont un effet anti pelliculaire.
- Evaluer des activités insecticides et fongicides de *Geranium rosat*
- Evaluer le pouvoir conservateur.
- Etudier les critères de qualité des échantillons d'hydrolat et HE .
- Valoriser la partie racinaire de la plante.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- **Adjanooun et Al . E.J., L. Aké Assi, A. Ali, J. Eymé, S. Guinko,A. Kayonga, A. Keita & M. Lebras, 1982.- Contributionaux études ethnobotaniques et floristiques aux Comores. ACCT, Paris, 217 p.**
- **AFNOOR 2000** Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 1. Echantillonnage et méthodes d'analyse. AFNOR, Paris, 440 p.
- **(ANOFEL)2014** Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie
- **Aurore S. (2010)** .Les glycanes pariétaux de levures et leurs implication dans l'induction et la régulation de la réponse immunitaire de l'hôte. Thèse de Doctorat. Université Lille 2.
- **BERNARD 1982** Bernard T., Periau F., Brav O., Delmas M. & Gaset A., 1988. Extraction des huiles essentielles. Chimie et Technologie. Information chimie, 298 : 179-184.
- **Boakye . Y.D., M.J. Stark, S.L. Roach, S.E. Sen & P.L.Crowell, 1997.-** Inhibition of pancreatic cancer growth by the dietary isoprenoids farnesol and geraniol. *Lipids*, **32**
- **BOELENS 1990** Valverde F., Sequeiros L. & Jimenez R., 1990. Ten years of hydrodistillation of oils. *Perfumer and Flavorist*, 15 : 11-14.
- **Boizot, N ; Charpentier, J.P.** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour d'observation et l'évaluation des milieux forestiers, partiels et aquatiques, *INRA*, 2006, pp 79-82
- **Boukhatem MN., Saidi F , Hamaidi MS , Hakim Y ,Mekarnia M.**2011 culture et exploitation industrielle du Geranium rosat (*Pelargonium graveolens*) en Algérie :état des lieux et perspective phytothérapie.
- **Bosson, et G. Dietz. (2005).** p. 3-20. L'hydrolathérapie : Thérapie des eaux florales. Coll. Douce Alternative - EdAmyris, Bruxelles.
- **Caillet et Lacroix, 2007** Effect of the addition of cosolvent on the supercritical fluid extraction of bioactive compounds from *Helianthus annuus* L. *Journal of Supercritical Fluids*, 41: 43-49
- **Céline LAGANE 2007** ROLE DE L'IL-13 ET DES LIGANDS DE PPAR- γ DANS LA REPONSE ANTI-INFECTIEUSE DES MACROPHAGES MURINS ET DES MONOCYTES HUMAINS VIS-A-VIS DE CANDIDA ALBICANS. IMPLICATION DE PPAR- γ .
- **Clevenger J.F., 1928.-** Apparatus for the determination of volatile oil. *J. Am. Pharm. Assoc.*, 17 (4), 346-351.
- **Demarne 1985** Le géranium rosat ». *Parfums, Cosmétiques et Arômes*, n°62, 1985.

- **Demarne FE**, 1989 l'amélioration variétale de *geranium rosat* contribution systémique caryologique et biochimique ORSQY(France) ; université de Paris-Sud, pp : 180-250
- **Dorman & Deans, 2000 ; Rajeswara et al., 1996 ; Rajeswara, 2002** H.J.D. & S.G. Deans, 2000.- Antimicrobial agent from plants: antibacterial activity of plant volatile oils.*J. Appl. Microbiol.*, **88** (2), 308-316
- **Druyne T.** Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochem. Syst. Ecol.* 1999, 27 (4): 445-59
- **Essendoubi M. (2007)** Identification et typage par microspectroscopie IRTF des levures du genre *Candida* d'origine clinique. Thèse de Doctorat. Université de Reims champagne-Ardenne.
- **EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization), 2013. Diagnostics PM 7/20 (2) *Erwinia amylovora*. EPPO Bulletin,
- **Franzetti L and Scarpellini M (2007)**. Characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from foods. *Annals of Microbiology.* 57(1): 39-47. *Immunol*, 322: 249-
- **Gardan, L., Gouy, C., Christen, R. and Samson, R. (2003)**. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* .53: 38
- **Guenther, 1950 ; Chaumont & Léger, 1989 ; Lis-Balchin & Deans, 1996 ; The essential oils**, 4. D. Van Nostrand Company Inc, New-York, 752 p.
- **Hélias V.** 2012. Jambe noire: Evolution des souches et risques associés. La pomme de terre française.
- **Heller W, Forkmann G.** The flavonoids. Advances in research since 1986. In Harborne JB. *Secondary Plant Products. Encyclopedia of plant physiology.* Ed. Chapman & Hall, London, 1993, 399-425
- **INPV2018 ; note technique** *Erwinia amylovora*, agent pathogène du feu bactérien
- 289Interface•, *Microbes and Microbial Technology*, Springer, New York, pp. 59-85.
- **J. Bruneton. (1999)**. p. 483-560. *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales.* Editions Tec & Doc, Paris.
- **Judd Ws.** Bouharmont J, Campbell CS. Evrard CM, Kellogg EA Sternes P. 2002 *Botanique systémique , une perspective photogénique .* Edition de Boeck université , Bruxelles. Pp : 240-488.

- **Khalid El mansouri** 2013 - Recherche et évaluation de l'activité antifongique des extraits de plantes médicinales.
- **L. Bosson**, et G. Dietz. (2005). p. 3-20. L'hydrolathérapie : Thérapie des eaux florales. Coll. Douce Alternative - Ed Amyris, Bruxelles.
- **Lebham**. Thèse au laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues au sein de l'Institut Universitaire Européen de la Mer. (IVEM). Université de Bretagne Occidentale (UBO). 2005.
- **LisBalchin, 2002** Lis-Balchin M., 1996.- Geranium oil. *Int. J. Aromather.*, 7,10-11.
- **Luisetti J**, Gaignard JL (1987a) Bacterial populations in buds and probability of frost injury on grapevine. Proc 6th Int Conf Plant Pathogen Bacteria 983-993 Maryland June 1985 (Martinus Nijhoff Publishers, ends) Dordrecht
- **MADHAVI 1996** D. L., Deshpande S. S. & Salunkhe D. K., 1996. Food Antioxidants. Technological, Toxicological, and Health Perspectives. Marcel Dekker, Inc. New York. P:
- **Mansvelt EL**, Hattingh MJ (1987b) Scanning electron microscopy of pear blossom invasion by *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Can J Bot* 65, 2523-2529 65
- **Matsuda et al., 1996 ; Chang et al., 2001 ; Baydat et al., 2004 ; Burt, 2004 ; B.M., G.A.** Surgeoner, J.D. Heal, A.O. Tucker & M.J. Marciarello, 1996.- Essential oil analysis and field evaluation of citrus plant '*P. citrosum*' as a repellent against population of *Aedes mosquito*. *J. Amer. Mosquito Control Ass.*, **12** (1), 69-74.
- **MULTON 2002** Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés : Céréales, oléagineux, aliments pour animaux. Lavoisier Technique & Documentation, Paris Apria. Volume 1, 576 p.
- **Nouioua. W et al** 2017 Gaamoune Sofiane, Djaout Ouarda -Antioxydant, Antimicrobienne et Anti-Inflammatoire Activités Valorisation of Methanol Extract of Two Geranium Species Growth in Setif Algeria.
- **Nyabyenda,P2(2007)**. Les plantes cultivées en régions tropicales d'altitude d'Afrique : culture industrielles et d'exportation cultures fruitières , cultures maraichères(vol 2) presses agronomiques agronomique de Gembloux (Belgique).120p
- **Oussalah 2007** Caillet S., Saucier L. et Lacroix M., 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on four pathogen bacteria growth: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 18 (5), 414-420.
- **Peterson (2005)**, A., M. Goto, S.B. Machmuah, B.C. Roy, M.Sasaki & T. Hirose, 2005. Extraction of essential oil from geranium (*Pelargonium graveolens*) with supercritical carbon dioxide. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **81**, 167-172.

- **Peter Knovel KV.2004** .Handbook of herbs and SpecisWoodhead Publishing.Cambridje England .pp 162-178.
- **Prabuseenivasan et al., 2006 ; Kelen & Tepe, 2008 S., M. Jayakumar & S. Ignacimuthu,2006.-** *In vitro* antibacterial activity of some plantessential oils. *BMC Complem. Altern. Medicine*, **6** (1),39.
- **Priou S, Jouan B.** Les maladies provoquées par les bactéries pathogènes du genre *Erwinia*. In : Rousselle P, Robert Y, Crosnier JC, eds. Mieux comprendre la pomme de terre
- **RICHARD 1992** Manuel des corps gras, Paris, Ed: Lavoisier, Tec. & Doc., p : 1228-1242.
- **Said.O et al 2011, Mohammed Ghanmi, Badr Satrani, Nazik Mansouri, Hayri Mohammed,Hanane El Hajaji et Abdelaziz Chaouch ;** composition chimique et activités antibacteriennes, antifongiques et antioxydante de l'huile essentielle de *Pelargonium asperum* Ehrh. EX wilde des comores.
- **SANDRA AT BICCHI 1987** Frattini C., Raverdino V., 1987. Considerations and remarks on the analysis of *Anthemis nobiblis* L. essential oil by capillary gas chromatography and“hyphenated” techniques, *J. Chromatogr.*, **411**, 237-249.
- **Sayed et Fayed 2009 ;** Antioxidant and anticancer activities of citrus reticulare(Petitgrain Mandarin) and *Pelargonium graveolens* (Geranium) essential oils.
- **Seiemanne j. 2005.**World spice plants.E.conomic usages Botany Taxonomy. Springer London pp:275-277
- **Van der Zwet, T. and Keil, H.A. (1979).** Fire bright, a bacterial disease of Rosaceous plants. USDA Agricultural Hand- book, **510**, 1-200.
- **VALNET 2005** Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth International. *Journal of Food Microbiology*.**85**, p: 73-81
- **Vidalie H.**1998 les productions florales .Editions TEC &Doc , Paris (France). P252.254
- **Y. El Ouadi et al 2017 , H. Bendaif, H. N. Mrabti, H. Elmsellem, Y. Kadmi M.A. Shariati, I. Abdel-Rahman, B. Hammouti1, A.Bouyanzer1-** Antioxidant activity oh phenols and flavonoides contents of aqueous extract of *Pelargonium graveolens* orgin in the north-east Morocco.
- **Zhiri & Boudeaux, 2005 A. & D. Boudeaux, 2005.-** Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies. *Aromathérapie scientifique*,**80** p.

Annexes

Annexe 1.

- **Matériel non biologique utilisé**

- Hydro distillateur de type Clevenger.
- Ballons en verre.
- Balance de précision.
- Eprouvette.
- Mixeur.
- Papier filtre Wattman.
- Entonnoir.
- Béchers.
- Tubes à essai.
- Etuve.
- Bain Marie.
- Autoclave.
- Pipette pasteur.
- Bec benzène.
- Rotavapore.
- Ecouvillon.
- Flacons.

- **Matériel utilisé pour la préparation de la crème hydratante**

- Balance de précision.
- Bain Marie.
- Agitateur rotor-stator.
- Viscosimètre Brookfield.
- pH mètre.
- Etuve.

Annexe 2.

- **Composition des milieux de culture**

Milieux de culture	Composition
NAS	Peptone Extrait de levure Saccharose Agar Agar
LPGA	Extrait de levure Peptone Glucose Agar Agar
KB	Peptone Agar Agar K ₂ HPO ₄ MgSO ₄
PCA	Tryptone Hiveg hydrolysate Extrait autolytique de levure Glucose Agar Agar.

Annexe 3 :

- **Composition et mode opératoire de cellule de Malassez**

	Principe de comptage	Mode opératoire
Cellule de Malassez	<p>-Humidifier les glissières latérales sur lesquelles va reposer la lamelle ;</p> <p>-Déposer la lamelle sur les rebords, celle-ci doit adhérer par un "effet ventouse" ;</p> <p>- Placer l'extrémité de la pipette contre la lamelle et délivrer par capillarité le liquide en évitant tout débordement vers les rigoles.</p>	<p>La totalité de la cellule est composée de 100 rectangles dont les dimensions sont:</p> <p>-Long.= 0,25 mm / larg.= 0,20 mm / Prof. = 0,20 mm.</p> <p>-Le volume total de la cellule est de 1 mm³ (100 -Le quadrillage est donc constitué de 10 bandes verticales (0,25 mm) et de 10 bandes horizontales (0,20 mm) formant ainsi 100 rectangles.</p> <p>-On ne compte les cellules que dans 10 des 25 rectangles non contigus pris au hasard dans la cellule.</p> <p>-On totalise le nombre de cellules présentes dans chaque rectangle.</p> <p>-On calcule le nombre moyen de cellules par rectangle (total des cellules observées dans 10 rectangles divisé par le nombre de rectangles comptés).</p> <p>-On multiplie le nombre obtenu par 100 pour connaître le nombre d'entités cellulaires par mm³.</p>

Annexe 4 .

Tableau 1: Analyse de la variance des absorbances des polyphénols selon ANOVA

Paramètres	Sommes des Carrés	Ddl	Carré moyen	P
TRT §	11,476 7	1,639	25,870	0,000
Erreur	1,014 16			0,063

Tableau 2: Analyse de la variance des absorbances des flavonoïdes selon ANOVA

Paramètres	Sommes des Carrés	Ddl	Carré moyen	P
TRT §	5,474 7	0,782	4,942	0,019
Erreur	1,266 8			0,158

Tableau3 : Analyse de la variance des rendements en HE selon ANOVA

Paramètres	Sommes des Carrés	Ddl	Carré moyen	P
TRT §	0,037 7			0,000
Erreur	0,011 16			0,001

Tableau 4: Analyse de la variance des rendements en hydrolats selon ANOVA

	source	Sommes des Carrés	Ddl	Carré moyen	p
H S	TRT §	710,24 7	101,463	0,211	0,978
H F	TRT	0,0 7	0,0	0,000	1,000
	erreur	4494,000	16		280,875

Tableau 5: Analyse de la variance du diamètre d'inhibition de l'activité antibactérienne selon ANOVA

	Source	Sommes des carrés	ddl	Carré moyen	p
T01	souche	134,067 2	67,033	1,633	0,214
T02	souche	1258,467 2	6294,233	10,434	0,000
T03	souche	422,867 2	211,433	10,475	0,000
T04	souche	10327,267 2	5163,633	9,261	0,001
T05	souche	9067,467 2	4533,733	9,054	0,001
T06	souche	13512,067 2	6756,033	11,490	0,000
T07	souche				
T08	souche	7799,400 2	3899,700	6,245	0,006
	erreur	16861,400 27			624,496

Tableau 6: Analyse de la variance du diamètre d'inhibition de l'activité antifongique selon ANOVA

	Source	Sommes des carrés	ddl	Carré moyen	p
T01	CONC	3485,000 8	4356,250	811,724	0,000
T02	CONC	34718,400 8	4339,800	499,465	0,000
T03	CONC	34895,24 8	4361,906	364,843	0,000
T04	CONC	34775,200 8	4346,900	329,588	0,000
T05	CONC	3277,244 8	4096,156	312,949	0,000
T06	CONC	34306,578 8	4288,322	491,655	0,000
T07	CONC	3467,044 8	4334,506	1065,862	0,000
T08	CONC	33774,444 8	4221,806	361,869	0,000
	erreur				

Tableau7: Analyse de la variance du diamètre d'inhibition de *Pectobacterium carotovorum* selon ANOVA

Source	Sommes des carrés	ddl	Carré moyen	p
souche	211,600 1	211,600	6,771	0,032
souche	0,0 1	0,0	0,0	1,000
souche	52,900 1	52,900	4,853	0,059
souche	25,600 1	25,600	0,764	0,407
souche	36,100 1	36,100	0,875	0,377
souche	1,600 1	1,600	0,069	0,799
souche	3,600 1	3,600	0,224	0,649
souche	36,100 1	36,100	1,866	0,209

Tableau8: Analyse de la variance du diamètre d'inhibition de d'*Erwinia amylovora* selon ANOVA

	Source	Sommes des carrés	ddl	Carré moyen	p
T01	souche	291,600 1	291,600	25,357	0,001
T02	souche	4,900 1	4,900	0,051	0,827
T03	souche	2,500 1	2,500	0,050	0,829
T04	souche	2,500 1	2,500	0,179	0,684
T05	souche	15366,400 1	35366,400	420,973	0,000
T06	souche				
T07	souche	3,600 1	3,600	0,105	0,754
T08	souche	302,500 1	302,500	6,576	0,033
	erreur	154,800 8			19,350

Tableau8: Analyse de la variance du diamètre d'inhibition de *Pseudomonas* sp. selon ANOVA

	Source	Sommes des carrés	Ddl	Carré moyen	p
T01	souche	44,100 1	44,100	1,612	0,240
T02	souche	1459,400 1	14592,400	231,075	0,000
T03	souche	1466,900 1	14668,900	1286,746	0,000
T04	souche				
T05	souche				
T06	souche	0,100 1	0,100	0,003	0 ,960
T07	souche	1482,500 1	1482,500	1743,824	0 ,000
T08	souche	1600,000 1	16000,0000		1,000
	erreur	8			0,00