

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



Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Biotechnologies

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en
Sciences de la Nature et de la Vie
Spécialité : Phytopharmacie Appliquée

**Contribution à l'étude de l'activité biocide de *cytissus sp*, effet
saisonnier.**

Présenté par : Mlle. KAHLOUL Imane

Mlle. MEDJADBI Amel

Devant les membres de jury composé de :

Mme AMMAD.F	M.C.B	U.S.D.B	Présidente
Mr DJAZOULI Z. E.	PR	U.S.D.B	Promoteur
Melle DAGHBOUCHE	Doctorante	U.S.D.B	C0-Promotrice
. Mme BABA.AISSA.K	M.A.A	U.S.D.B	examinatrice

Année universitaire 2015/2016

Contribution à l'étude de l'activité biocide de *Cytisus sp*, effet saisonial.

Résumé

Ce travail vise l'étude de l'activité antibactérienne et antifongique ainsi que composition chimique de l'huile essentielle de *Cytisus sp* collecté de Chréa à différents stades phénologiques.

Les huiles essentielles des deux stades phénologiques (feuillaison et floraison) de *Cytisus sp* extraites par hydrodistillation-entraînement à la vapeur ont exprimés des rendements de 0,9 % au stade feuillaison, et de 0,7 % au stade pleine floraison.

La caractérisation des huiles essentielles par analyse CG-MS affiche une dominance en composés au profit de l'huile essentielle des feuilles issue de la phase de floraison (17 molécules) par rapport à l'huile essentielle issue de la phase feuillaison (11 molécules). la présence d'une forte proportion des cétones dans le stade feuillaison (5.78%) et une forte présence des alcools monoterpéniques au stade floraison (25.01%). sont notées.

Les huiles essentielles des deux stades phénologiques (feuillaison et floraison) du *Cytisus sp* ont été testées sur une gamme microbienne (***Escherichia coli***, ***Pseudomonas aeruginosa***, ***Staphylococcus aureus***, ***Bacillus subtilis***, ***Aspergillus brasiliensis***, ***Fusarium sp1***, ***Fusarium sp2***, ***l'Alternaria sp.***, ***Candida albicans***) à différentes doses.

Des zones d'inhibitions, il en ressort que l'huile essentielle de la phase floraison appliquée aux doses FD2 et FD3 contrôle mieux *Fusarium sp2*, et l'huile essentielle de la phase floraison appliquée à la dose FD1 contrôle mieux *l'Alternaria sp.*

Les huiles doses des essentielles de la phase de feuillaison (D1, D2 et D3), et celles des huiles essentielles de la phase floraison (D1 et D2) ainsi que l'antibiotique Vancomycine paraissent inhiber la croissance de *Staphylococcus*. En contraste, l'huile essentielle de la phase floraison appliquée à la dose D3, ainsi que les antibiotiques Streptomycine, Piperacilline et Tétracycline contrôlaient la croissance d'*E. Coli*, de *Pseudomonas* et de *Bacillus*

Mots clé : *Alternaria sp*, *Cytisus sp*, phase floraison, *Escherichia coli*, phase de feuillaison, zones d'inhibitions.

Contribution to the study of the activity biocide of cytissus sp, saisonial effect.

summary

This work aims at the study of the antibacterial and antifungal activity and the chemical composition of the essential oil of cytissus sp collected by Chr ea of the various phénologique stadiums.

Essential oil of both stadiums (leafing and blooming) of Cytissus sp extracted by hydrodistillation-training in the vapor expressed yields (efficiencies) on 0,9 % at the leafing stadium, and 0,7 % at the stage (stadium) full blooming.

The characterization of essential oil by analysis CG-MS post a dominance in compounds for the benefit of the essential oil of sheets stemming from the phase of blooming (17 molecules) with regard to the essential oil stemming from the phase leafing (11 molecules). We noted the presence of a strong proportion of cetones in the stage leafing (5.78 %) and a strong one presence alcohols monoterpenic at the stage blooming (25.01 %).

Essential oil of both stages leafing and blooming of Cytissus sp was tested on a microbial range (*Escherichia coli Pseudomonas aeruginosa Staphylococcus aureus Bacillus subtilis Aspergillus brasiliensis Fusarium sp1 Fusarium sp2 Alternaria sp. Candida albicans*) in various doses.

The zones of inhibitions, it emerges from it that the essential oil of the phase blooming applied to doses FD2 and FD3 checks (controls) better Fusarium sp2, and the essential oil of the phase blooming applied to the dose FD1 checks (controls) better Alternaria sp.

Essential oil of the phase of leafing (D1, D2 and D3), essential oil of the phase blooming (D1 and D2) and antibiotic Vancomycine adorned to inhibit the growth of Staphylococcus. In contrast, the essential oil of the phase blooming applied to the dose D3, as well as the antibiotics Streptomycin, Piperacilline and Tétracycline checked (controlled) the growth of E. Coli, of Pseudomonas and Bacillus.

Keywords: *Alternaria sp*, Cytissus sp, *Escherichia coli*, phase blooming, phase of leafing, zones of inhibition.

المساهمة في دراسة النشاط المبيد لنبات *Cytisus sp* التأثير الفصلي.

الملخص

يهدف هذا العمل الى دراسة النشاط المضاد للبكتيريا والفطريات و ايضا التركيب الكيميائي للزيوت الاساسية لنبات *Cytisus sp* الذي قمنا بجمعه في منطقة الشريعة خلال مرحلتين فيزيولوجيتين (التوريق و الازهار).

الزيوت الاساسية التي تم الحصول عليها عن طريق الاستخلاص بالتقطير Clevenger سمحت لنا من الحصول على مردود مختلف نجده في مرحلة التوريق (0.9%) وبنسبة (0.7 %) في مرحلة الازهار.

اظهر لنا التحليل الكروماتوغرافي GC-MS للزيوت الاساسية المستخلصة لمختلف المراحل الفيزيولوجية حيث اظهرت النتائج هيمنة المركبات الخاصة بمرحلة الازهار (17 جزئ) بالمقارنة مع مركبات الزيوت الاساسية لمرحلة التوريق (11 جزئ) لاحظنا وجود نسبة عالية من الكيتونات في مرحلة التورق بنسبة (5.78%) و الكحول Monoterpenes في مرحلة الازهار (25.01%).

تم اختبار هذه الزيوت الاساسية لنبات *Cytisus sp* علي مجموعة من البكتيريا و الفطريات (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Alternaria sp.*, *Fusarium sp*, *Fusarium sp21*, *Aspergillus brasiliensis*) بتركيز مختلفة.

وقد اثبتت التطبيقات التي تم إجراؤها على *Fusarium sp2* أن الزيوت الأساسية لنبات *Cytisus sp* في مرحلة الازهار المطبقة بالجرعات FD2 و FD3 لها فاعلية ضد هذه الفطريات و ايضا الجرعة FD1 اظهرت نشاط على *Alternaria sp.*

الزيوت الاساسية المستخلصة من مرحلة التوريق بتركيز مختلفة (D1, D2 , D3) و الزيوت الاساسية من مرحلة الازهار (D1 , D2) و المضاد الحيوي Vancomycine اظهروا نشاط على تثبيط نمو *Staphylococcus* بالمقابل الزيوت الطيارة لمرحلة الازهار ذات التركيز D3 و المضادات الحيوية Streptomycine, Piperacilline وTétracycline اظهروا فعالية في التحكم في نمو *E. Coli*, *Bacillus* و *Pseudomonas*.

الكلمات المفتاحية: *Cytisus sp.*, مرحلة الازهار, المرحلة التوريق, مناطق التثبيط, *Escherichia coli*, *Alternaria sp*.

Table des matières	
<i>Liste des abréviations</i>	
<i>Liste des tableaux</i>	
<i>Liste des figures</i>	
<i>Résumé</i> <i>Abstract</i> <i>الملخص</i>	
<i>Introduction</i>	1
Chapitre I– Synthèse bibliographique	
<i>I. Généralités sur les plantes médicinales</i>	3
<i>I.1.Principes actifs des plantes médicinales</i>	3
<i>I.1.1.Les métabolites secondaires</i>	3
<i>I.1.2.Les composés phénoliques</i>	3
<i>I.1.2.1.Activités biologiques des Polyphénols</i>	4
<i>I.1.3.Les alcaloïdes</i>	4
<i>I.1.3.1.Activités biologiques des alcaloïdes</i>	4
<i>I.1.4.Terpénoïdes.</i>	4
<i>I.1.4.1.Activités biologiques de certains composés terpéniques</i>	4
<i>I.2.Variabilité des substances végétales.</i>	5
<i>I.2.1.Variation nyctémérale</i>	5
<i>I.2.2.Variation saisonnière</i>	5
<i>I.2.3.Variation annuelle</i>	6
<i>I.3.Effet du séchage sur les principes actifs des plantes médicinales</i>	6
<i>I.3.1.Cas des sucres totaux</i>	6
<i>I.3.2.Cas des alcaloïdes totaux</i>	7
<i>I.3.3.Cas des huiles essentielles.</i>	7
<i>I.4.Présentation du genre <i>Cytisus</i></i>	8
<i>I.4.1.Description botanique</i>	8
<i>I.4.2.Biologie reproductive</i>	8
<i>I.4.3.Distribution géographique.</i>	9
<i>I.4.3.1.Dans le monde</i>	9
<i>I.4.3.2. En Algérie</i>	9
<i>I.4.4.Utilisations traditionnelles et effets thérapeutiques.</i>	9
<i>11.4.5.Chimiotaxonomie</i>	10

I.4.5.1.Alcaloïde quinolizidiniques	10
I.4.5.1.1.La spartéine	10
I.4.5.1.2.Cytisine.	10
I.5.Cytisus à trois fleurs (Cytisus triflorus L'her)	11
I.5.1.Place dans la systématique	11
I.5.2.Description botanique	11
I.5.3. Appellations locales	12
I.5.4.Répartition géographique	12
I.5.5.Utilisations traditionnelles	12
I.5.6.Composition chimique de cytissus triflorus (la région d'Azazga)	12
I.6.Chimie des huiles essentielles	12
I.6.1. Définition	13
I.6.2. Rôle des huiles essentielles pour le règne végétale	13
I.7. Méthode d'extraction des huiles essentielles.	13
I.7.1.Extraction par entraînement à la vapeur d'eau.	14
I.7.2.Extraction par hydro distillation d'huile essentielle	14
I.8.Méthodes d'analyses des huiles essentielles	14
I.8.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	14
I.8.2.Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie	15
I.9. Activités biologiques des huiles essentielles	15
I.9.1.Activité des HE s liée à la composition chimique	15
I.9.2. Activité antibactérienne	16
I.9.3. Activité antifongique	17
CHAPITRE II : Matériel et méthodes	
II. Lieu et période d'étude	18
II.1. Présentation de la région de collecte du matériel végétale	18
II. 2. Matériel et méthodes	19
II. 2.1. Présentation du matériel végétal	19
II. 2.2. Présentation du matériel microbien	19
II. 2.3. Milieu de culture	21
II. 3. Méthodes d'étude	21
II. 3. 1. Extraction des l'huiles essentielles de <i>Cytissus sp</i>	21

II. 3. 1.1. Procédé d'extraction des huiles essentielles	21
II. 3. 1.2. Calcul du rendement en huiles essentielles	22
II. 3. 1.3. <i>Analyse chromatographique des huiles essentielles</i>	22
II .3.2 . Activité antimicrobienne	23
II .3.2.1. Activité antimicrobienne de l'huile essentielle	23
II .3.2.1.1. Préparation des Inoculum	23
II .3.2.1.2. Activité antibactérienne de l'huile essentielle	23
II .3.2.1.3. Activité antifongique de l'huile essentielle	23
II. 3.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles	24
II. 3.3.1. Préparation des disques	24
II. 3.3.2. Ré-isolément des souches microbiennes.	24
II. 3.3.3. Préparation de l'inoculum	24
II. 3.3.4. L'ensemencement	24
II. 3.3.5. Application des disques	24
II. 3.3.6. Lecture de l'aromatogramme	25
II. 4. Analyse statistique des données	25
II. 4.1. Analyses de variance (SYSTAT vers. 12, SPSS 2009)	26
II. 4.2. Analyses multivariées (PAST vers. 1.37)	26
Chapitre III : Résultats	
III.1. Evaluation du rendement en huiles essentielles de <i>Cytisus sp</i>	27
III.2 .Caractérisation des huiles essentielles des feuilles de <i>Cytisus sp.</i> en fonction des stades phénologiques	28
III.3. Evaluation de l'activité biologique des huiles essentielles des feuilles de <i>Cytisus sp.</i> en fonction des stades phénologiques	32
<i>III.3.1. Evaluation de l'activité fongicide des huiles essentielles des feuilles de Cytisus sp. en fonction des stades phonologiques</i>	32
III.3.1.1. Tendance des zones d'inhibitions des champignons sous l'effet des huiles essentielles	32
III.3.1.2. Etude comparée de l'effet des huiles essentielles de <i>Cytisus sp</i> sur la croissance mycélienne	33
III.3.2. Evaluation de l'activité bactéricide des huiles essentielles des feuilles de <i>Cytisus sp.</i> en fonction des stades phonologiques	35
III.3.2.1. Tendance des zones d'inhibitions des bactéries sous l'effet des huiles essentielles	35

III.3.2.2. Etude comparée de l'effet des huiles essentielles de <i>Cytisus</i> sp sur la croissance bactérienne	36
Chapitre IV : Discussion	
IV.1. Evaluation du rendement et caractérisation des huiles essentielles des feuilles de <i>Cytisus</i> sp. en fonction des stades phénologiques	38
IV.2. Evaluation de l'activité microbienne des huiles essentielles des feuilles de <i>Cytisus</i> sp. en fonction des stades phénologiques	39
IV.2.1. Evaluation de l'activité fongicide des huiles essentielles des feuilles de <i>Cytisus</i> sp. en fonction des stades phénologiques	39
IV.2.2. Evaluation de l'activité bactéricide des huiles essentielles des feuilles de <i>Cytisus</i> sp. en fonction des stades phénologiques	40
Conclusion générale et perspectives	41
Référence bibliographique	

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
AFNOR	Association Française de Normalisation
AFD	Dose Avant floraison
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
CPG/SM	Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse
CMB	concentration minimale bactéricide
CMF	concentration minimale fongicide
CMI	concentration minimale inhibitrice
E.COLI	<i>Escherichia coli</i>
FD	Dose floraison
MH	Mueller Hinton
PSEUDO	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PDA	Potato Dextrose Agar

Liste des tableaux

Tableau	Titre de tableaux	Page
Tableau 1	Activités biologiques de certains composés terpéniques	5
Tableau2	Rendement des extraits d'alcaloïdes totaux dans les échantillons d'écorces d' <i>Alstonia boonei</i> en fonction du mode de séchage	7
Tableau3	Répartition de genre <i>Cytisus</i> en Algérie	9
Tableau4	Activités pharmacologiques in vitro de différentes espèces de <i>Cytisus</i>	11
Tableau5	Pouvoir pathogène des souches microbiennes utilisées	20
Tableau6	Résultats de l'analyse par CG-MS des huiles essentielles de <i>Cytisus sp.</i> issues des feuilles de différents stades phénologiques	29

Liste des figures

Figure	Titre de figures	Page
Figure 1	Evaluation des sucres totaux de <i>Cymbopogon Schoenanthus oudneya africana</i> et <i>helianthemum lippii</i> selon le mode de séchage	6
Figure 2	Présentation de limites du Parc National de Chréa	18
Figure 3	Présentation de <i>Cytisus sp</i>	19
Figure 4	Dispositif d'extraction de type de Clevenger	22
Figure 5	Dispositif d'évaluation de l'activité biologique des huiles essentielles de <i>Cytisus sp</i>	25
Figure 6	Estimation du rendement en huiles essentielles de <i>Cytisus sp.</i> en fonction des stades phénologiques	27
Figure 7	Caractérisation des huiles essentielles de <i>Cytisus sp.</i> Issues de la phase phénologique (feuillaison & Floraison)	30
Figure 8	Composés spécifiques des huiles essentielles <i>Cytisus sp.</i> issues de la phase phénologique (feuillaison & Floraison)	31
Figure 9	Projection des zones d'inhibition de la gamme fongique sur les deux axes de l'A.C.P	33
Figure 10	Etude comparée de l'inhibition de la croissance mycélienne sous l'effet des biopréparations à base d'huiles essentielles de <i>Cytisus sp</i>	34
Figure 11	Effet comparé des doses des biopréparations à base d'huiles essentielles de <i>Cytisus sp.</i> sur les différents champignons	34
Figure 12	Projection des zones d'inhibition de la gamme bactérienne et antibiotiques sur les deux axes de l'A.C.P	36
Figure 13	Etude comparée de l'inhibition de la croissance mycélienne sous l'effet des biopréparations à base d'huiles essentielles de <i>Cytisus sp.</i> par confrontation aux antibiotiques	37

Introduction

Depuis long temps l'homme reconnaît et utilise les plantes pour se nourrir et pour traiter diverses maladies.

Un grand nombre de plantes, aromatiques, médicinales, des plantes épices et autres, possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent application dans divers domaines à savoir en médecine; pharmacie; cosmétologie et en agriculture.

L'Algérie, possède une flore très riche et offre des conditions de développement de nouvelles exploitations agricoles des plantes médicinales et aromatiques. Cependant, l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques, antioxydants et antimicrobiennes demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquentes ou non connues en médecine traditionnelles. Ces plantes représentent une nouvelle source de principes actifs. En effet, les métabolites secondaires font et reste l'objet de nombreux recherches in vivo comme in vitro, notamment la recherche de nombreux constituants naturels tels que les composés phénoliques, les saponosides et les huiles essentielles. Les huiles essentielles ou essences, font partie de ce groupe de métabolite avec les alcaloïdes et les phénols (**Haddouchi et al., 2008**). ces huiles sont nommé sous différents noms: essences végétales, essences aromatique, huiles volatiles ou parfums (**Belkou et al., 2005**)

Les végétaux supérieurs ont la capacité de synthétiser, par des voies métaboliques Complexes des métabolites dits secondaires. Ces composés sont utilisés par les plantes pour diverses fonctions adaptatives notamment en réponse aux stress biotiques et abiotiques qu'ils peuvent subir. (**Thomas, 2011**)

Ces métabolites sont situés dans l'un des trois classes, des Polyphénols, des alcaloïdes et des terpénoïdes. De nombreuses études ultérieures ont prouvé la bioactivité de ces molécules, citant les activités anti tumorale, antivirale, antimicrobienne, antioxydant, anti inflammatoire.....etc. Dû l'usage des plantes renfermant ces métabolites dans diverses domaines thérapeutiques, pharmaceutiques, cosmétologiques et alimentaires (**Thomas, 2011 ; Rispail et al., 2005**).

Cette large vertu d'utilisation des métabolites secondaires implique leur identification.

Cette dernière qui nécessite un trajet de procédure, commençant par l'extraction de des métabolites à partir de matériels végétale, séparation et purification de ces métabolites et enfin leur identification structurale

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle durant des différents stades phénologique de *cytissus sp.*

Notre étude sera répartie en quatre chapitres, initiés par une recherche bibliographique ou nous apportons dans le premier chapitre une généralité sur les plantes médicinales et leur principe actifs, les huiles essentielles, leurs compositions, activités biologiques et les méthodes d'extraction. Nous effectuerons une présentation botanique du genre *cytissus sp*, sa localisation géographique dans le monde et l'Algérie, et son utilisation.

Le deuxième chapitre présente les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail à savoir:

- l'extraction de l'huile essentielle de *cytissus sp*
- test de sensibilités, des bactéries et des levures vis-à-vis de nos huiles essentielles.

Le troisième chapitre abordera les différents résultats, le quatrième chapitre une discussion, enfin une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus.

Chapitre I : synthèse bibliographique

I. Généralités sur les plantes médicinales

Les plantes ont toujours fait partie de la vie quotidienne de l'homme, puisqu'il s'en sert pour se nourrir, se soigner et parfois dans ses rites religieux (**Benkiki, 2006**).

L'Algérie, pays connu pour sa biodiversité, dispose d'une flore particulièrement riche et variée. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% endémique et appartenant à plusieurs familles botaniques. Ce potentiel floristique constitué de plantes médicinales, toxiques et condimentaires, est peu exploré du point de vue chimique et pharmacologique. A cet effet, il constitue à notre avis, une source non négligeable de recherche de substances naturelles (**Quezel, 1963**).

I.1. Principes actifs des plantes médicinales

Le principe actif c'est une molécule contenu dans une drogue végétale ou dans une préparation à base de drogue végétale et utilisé pour la fabrication des médicaments (**Pelt, 1980**). Cette molécule présentant un intérêt thérapeutique curatif ou préventif pour l'homme ou l'animale, elle est issue de plantes fraîches ou des séchées, nous pouvons citer comme des parties utilisées: les racines, écorces, sommités fleuries, feuilles, fleurs, fruits, ou encore les graines (**Benghanou, 2012**).

I.1.1. Les métabolites secondaires

Les plantes contiennent des métabolites secondaires peuvent être considérées comme des substances indirectement essentiels à la vie des plantes par contre aux métabolites primaires qu'ils sont les principales dans le développement et la croissance de la plante, les métabolites secondaires participent à l'adaptation de la plante avec l'environnement, ainsi à la tolérance contre les chocs (**Sarnimanchado et Cheynier, 2006**).

I.1.2. Les composés phénoliques

L'appellation polyphénol ou composés phénoliques regroupe un vaste ensemble d'environ 8000 composées (**Remdane, 2009**).

Ils subdivisent en sous classe principales; les acides phénols, les flavonoïdes, les lignines, les tanins...

Comme ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes, elles ont un rôle principale à la vie de plante, à la défense contre les pathogènes; principalement les moisissures et les bactéries phytopathogènes et

la protection contre les rayonnements UV; sachant que tous les composés phénoliques absorbent les rayonnements solaires (**Manchado et Cheynier, 2006**).

I.1.2.1. Activités biologiques des Polyphénols

Les Polyphénols sont associés à de nombreux processus physiologiques interviennent dans la qualité alimentaire, impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures Mécaniques. La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques (**Bahorun, 1997**).

Ces composés montrent des activités anti-carcinogènes, anti-inflammatoire, antiathérogènes, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériens, antiviraux, anticancéreux (**Babar et al, 2007**), anti-allergènes, vasodilatateurs (**Falleh et al., 2008**) et antioxydants (**Gomez et al., 2006**).

I.1.3. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes figurent parmi les principes actifs les plus importants en pharmacologie et en médecine (**Guignard, 2000**). Ce sont des substances organiques azotées, à propriétés basiques ou amers et ayant des propriétés thérapeutiques ou toxiques (**Delille, 2007**).

I.1.3.1. Activités biologiques des alcaloïdes

Les alcaloïdes provoquent chez l'Homme diverses réponses physiologiques par ce qu'ils interfèrent avec les neurotransmetteurs. A forts dose la plupart des alcaloïdes sont très toxique par contre à faible dose ils peuvent avoir une valeur thérapeutique. De la préhistoire jusqu'à nos jours, les alcaloïdes ou des extraits qui en renferment ont été utilisés comme médicaments relaxants musculaires, analgésique et tranquillisants (**Hopkins, 2003**).

I.1.4. Terpénoïdes

Les terpènes sont des molécules très volatiles fréquentes dans la nature, surtout dans les plantes où ce sont les principaux constituants des huiles essentielles (**Bottin, 2006**).

I.1.4.1. Activités biologiques de certains composés terpéniques

Les terpènes sont une famille de composés chimiques responsables en partie du caractère fruité des baies et représentant la plus large classe de métabolites secondaires chez les plantes (**Bekhechi, 2008**).

Tableau 1 : Activités biologiques de certains composés terpéniques (Bekhechi, 2008).

Familles	Exemples	Propriétés
Hydrocarbure Aliphatique Monoterpènes	Limonène	Fongistatique Bactériostatique Insecticide
Sesquiterpènes	Bisabolème, alpha-humulème,	Calmants Anti-inflammatoire Antiallergique
Monoterpéniques	Menthol (menthe poivrée),	Antivirale Antiallergique Immunostimulants
Aldéhydes Terpéniques	Citral (mélisse citronnée), géraniol (verveine citronnée)	Antifongique Insecticide Anti hypertensifs

I.2. Variabilité des substances végétales

La quantité et la composition en métabolite primaire et secondaire varient en fonction de l'âge (stade phénologique), et de l'état physique de la plante (**Sauvion et al.,2013**)

I.2.1. Variation nyctémérale

Les composés des plantes fluctuent selon le jour et la nuit, par ce qu'ils dépendent de l'activité photosynthétique et du métabolisme de la plante. (**Sauvion et al.,2013**).

I.2.2. Variation saisonnière

la production de substance secondaire azotés (comme les alcaloïdes,et les acides aminés non protéique s'intensifie en générale au début du cycle végétatif (les jeunes feuilles étant plus riches en ce type de substance que les feuilles mature),alors que la production de substance secondaire carbonées (comme les tannins) s'intensifie plus tarde au cours du cycle végétatif(les feuilles mature possèdent plus tannins que les jeunes feuilles) (**Sauvion et al.,2013**).

I.2.3. Variation annuelle

Les facteurs externes, comme le climat et la disponibilité en nutriment, du sol influencent de façon considérable les tenures en substance secondaire des plantes.

la teneur foliaire en composés phénolique par exemple variée d'année en année chez certaine graminée par exemple (**Sauvion et al.,2013**).

I.3. Effet du séchage sur les principes actifs des plantes médicinales

I.3.1. Cas des sucres totaux

La concentration en sucre d'**Oudneya africana** est la plus élevée dans tous les modes de séchage; en ce qui concerne le séchage par séchoir solaire elle est de 0.12g, et pour le séchage en air libre elle est de 0.114mg/g.

Pendant chez **Cymbopogon schoenanthus** sa teneur en sucre est de 0.08mg/g quand la plante est séchée en étuve.

Chez **Helianthemum lippii** sa teneur en sucre est maximale à température ambiante 0.059mg/g, alors que de faibles quantités sont observées chez les échantillons à l'état frais et cela concerne toutes les espèces ainsi que les autres modes de séchage, la concentration en sucre varie en fonction des modes de séchage; c'est à dire selon la tolérance de ce composé à la température (**Nedjmi et Soussou, 2014**).

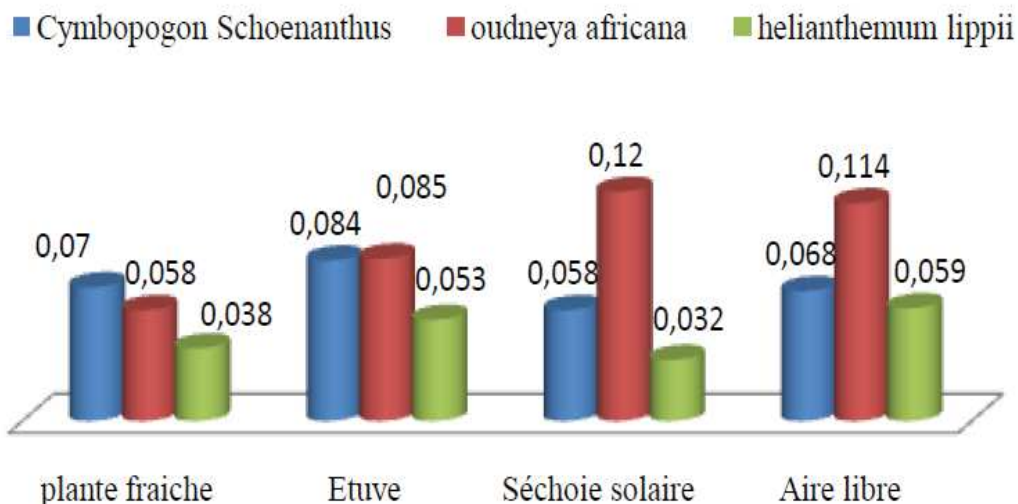


Figure 1: Evaluation des sucres totaux de *Cymbopogon Schoenanthus*, *oudneya africana* et *helianthemum lippii* selon le mode de séchage (Nedjmi et Soussou, 2014)

I.3.2. Cas des alcaloïdes totaux.

L'analyse quantitative des alcaloïdes contenus dans les écorces de la plante, *boonei* séchées au soleil, dans un séchoir électrique 40°C, 50°C et 60°C, Cette étude nous a permis d'évaluer l'influence de la température de séchage sur les principes actifs d'une plante médicinale, Le rendement des alcaloïdes totaux est de 0,043% lorsque le séchage des écorces se fait au soleil où la température moyenne est de 31°C, et décroît jusqu'à 0,0174% lorsque la température de séchage des écorces dans le séchoir électrique est de 60°C (*Kémajou et al., 2011*).

Tableau 2 : Rendement des extraits d'alcaloïdes totaux dans les échantillons d'écorces d'*Alstonia boonei* en fonction du mode de séchage. *Kémajou et al., 2011*.

Désignation	Masse échantillon(g)	Masse extrait brut (g)	Masse alcaloïdes totaux (g)	Rendement des d'alacoides:Rdt(%)
Echantillon frais	1000	29,096	0,436	0,0436
séchage au soleil	500	15,708	0,215	0,043
séchage à 40°C	500	20,872	0,159	0,0318
séchage à 50°C	500	14,017	0,098	0,0196
séchage à 60°C	500	16,453	0,087	0,0174

Le séchage naturel des écorces de l'*Alstonia boonei* à l'air libre pourraient limiter les pertes des alcaloïdes, l'un de ses principes actifs.

L'action de la lumière et/ou de la chaleur aurait une influence sur la teneur en alcaloïdes totaux en particulier et les autres groupes chimiques extraits de cette plante en général. (*Kémajou et al., 2011*).

I.3.3. Cas des huiles essentielles

Les rendements d'extraction de l'huile essentielle d'*O. Basilicum* subissent une variation notable en fonction du temps de séchage de la matière végétale. En effet, à l'état frais, le rendement est de 1,10% et passe à 0,97% après 24 heures de séchage et 0,79% après 23 jours de séchage, soit une baisse de près de 30%.

Après la récolte des feuilles d'*O. Basilicum*, l'activité de biosynthèse est réduite ce qui entraînerait une baisse de la production d'huile essentielle dans la matière végétale. La diminution du rendement peut être aussi due à des pertes par évaporation et/ou une activité de biosynthèse qui se poursuit longtemps après la récolte de la matière végétale (*Dabire et al., 2011*).

D'autres études sur l'effet de séchage de la biomasse sur le rendement d'extraction d'huile essentielle ont été réalisées avec d'autres espèces aromatiques

et rapportées dans la littérature. On peut citer par exemple les travaux de **Bonzi et al. (1997)** sur l'effet de séchage des feuilles d'*Eucalyptus camaldulensis* du Burkina Faso. En effet, après six mois d'expérience, les auteurs ont montré que l'effet du séchage des feuilles n'avait pas d'impact significatif sur le rendement d'extraction de l'huile essentielle et sur la composition chimique de l'huile essentielle.

Par contre, ceux de **Zrira et al. (1995)** montrent que le séchage des feuilles d'*E. Camaldulensis* acclimatées au Maroc pendant deux semaines, provoque une augmentation de 42% du rendement d'extraction de l'huile essentielle.

I.4. Présentation du genre *cytissus*

I.4.1. Description botanique

Cytissus est un genre de plantes de la famille des Fabaceae. Ses espèces sont généralement appelées « genêts » ou « cytisses ».

Arbustes ou arbrisseaux à feuilles en général trifoliolées. Les fleurs jaunes. Sont constituées d'un Calice turbiné ou cupuliforme, avec un disque glanduleux intérieur, su bilabié à dents courtes. 10 étamines monadelphes en un tube non fendu, 5 grandes et 5 petites. Ovaire multi ovulé. Leurs fruits sont des gousses linéaire ou oblongue, comprimée, déhiscente, polysperme (**Quezel et Santa, 1962**).

I.4.2. Biologie reproductive cas de *cytissus scoparius*

Le mode de reproduction est plutôt allogame. Les espèces possèdent des fleurs avec une structure typique de Papilionacée, pour lesquelles les filaments des étamines s'unissent à la base formant un androcée dit monadelphie.

Il a longtemps été considéré que les fleurs ne produisaient pas de nectar en raison de leur morphologie particulière qui ne permet pas la différenciation de tissus spécialisés. Pourtant, du nectar a été détecté chez certaines espèces de *Cytissus*, indiquant que le tube staminal lui-même est à l'origine de la production de nectar (**Galloni et Cristofolini, 2003**).

Le pollen est produit en quantité importante mais retenu sur les étamines enfermées dans la carène. Seule la visite de certains pollinisateurs ayant la capacité de déclencher le mécanisme d'explosion florale (en particulier les bourdons et les abeilles solitaires) va permettre la sortie des étamines et du pistil et l'expulsion du pollen. Ensuite, les pétales, restent ouverts et les étamines exposées, permettant à d'autres insectes plus petits de se nourrir et d'effectuer à leur tour une dispersion du pollen (**Suzuki, 2003; Galloni et al., 2008**).

Quand les gousses sont matures, les deux moitiés se séparent et s'enroulent, conduisant à l'expulsion des semences parfois à plusieurs mètres de la plante-mère. Les semences peuvent ensuite subir une dispersion secondaire entomochore.

I.4.3. Distribution géographique

I.4.3.1. Dans le monde

Originaire d'Europe, le genêt à balai pousse plus particulièrement dans les landes (résultant généralement de la dégradation de la forêt, où poussent des plantes sauvages, parfois quelques arbres; est une association de plantes qui dépassent rarement le stade d'arbustes et poussant sur des milieux pauvres, souvent acides et oligotrophes). Et les clairières (est un lieu ouvert dans une zone boisée (forêt, bois) où la lumière du soleil arrive jusqu'au sol). Il s'est acclimaté dans toutes les régions tempérées ainsi qu'en Afrique du Nord (*Iserin et al., 2001*).

I.4.3.2. En Algérie

L'Algérie est connue par sa richesse en plante médicinale, en regard de sa superficie et sa diversité bioclimatique (*Mebarki, 2010*), la répartition de genre *Cytisus* de la famille de fabacées (Tab 3).

Tableau 3 : répartition de genre *Cytisus* en Algérie (*Quezel et Santa 1962*).

Espèces	Localisation
<i>Cytisus triflorus</i> L'hér	Tell algéro-constantinois M'Sila, Tlemcen.
<i>Cytisus Fontanesii</i> Spach.	Forêts claires.
<i>Cytisus purgans</i>	El-Hodna, Djurdjura.
<i>Cytisus linifolius</i>	Forêts claires du littoral, à L'w d'Alger.
<i>Cytisus monspessulanus</i>	Forêts: broussailles dans le Tell.
<i>Cytisus arboreus</i>	Forêts et broussailles de zones littorales.

I.4.4. Utilisations traditionnelles et effets thérapeutiques

Cette plante est connue pour son utilisation traditionnelle comme plante cicatrisante et dans le traitement de certaines dermatoses (*Chebili, 2011*).

La spartéine abaisse le rythme cardiaque. On utilise le genêt à balai pour régulariser l'activité cardiaque. Cette plante est également un diurétique efficace, qui stimule la production d'urine. Par son action contractante des muscles de l'utérus (*Iserin et al., 2001*).

I.4.5. Chimiotaxonomie

La plante est riche en l'alcaloïde quinolizidiniques (**Chebili ,2011**) en particulier (spartéine, genistéine, cytisine), aminés aromatiques (dont tyramine), flavonoïdes, huile essentielle, acides caféique et p-coumarique, tanins et pigments (**Iserin et al., 2001**).

I.4.5.1. Alcaloïde quinolizidiniques

La quinolizidines est un hétérocycle azoté bicyclique particulièrement fréquent dans les structures alcaloïdiques. (**Ben Moussa, 2016**)

Les quinolizidines se rencontrent principalement dans les plantes appartenant aux familles de *Leguminosae* et *Fabaceae*. Ces alcaloïdes ont une action répulsive contre les herbivores et ils sont également connus pour provoquer des problèmes d'empoisonnement chez l'homme.

I.4.5.1.1. La spartéine

Est un ganglioplégique léger, bloquant la transmission et empêchent la dépolarisation de la membrane post-synaptique au niveau cardiaque.

La spartéine du ***cytissus scoparius*** (on utilise la fleur et le rameau florifère) a des propriétés tonocardiaques et diurétiques (**Botineau ,2010**).

I.4.5.1.2. Cytisine

La cytisine est un alcaloïde que l'on trouve dans toutes les parties de la plante ***Cytissus Laburnum***, et notamment dans ses graines. Son action est semblable à celle de la nicotine.

L'industrie du tabac a identifié la cytisine comme étant la substance ayant l'action pharmacologique la plus proche de la nicotine (**Jean-François, 2008**).

TABLEAU 4 : Quelques exemples d'activités pharmacologiques in vitro de différentes espèces. (Baba AISSA ,2011)

Espèce	Activité	Type de composés Impliqués
<i>Cytisus scoparius</i>	Cardiotonique, diurétique, Hypertenseur.	alcaloïde, huile essentielle, composé phénolique, pigment flavonoïque.
<i>Cytisus purgans</i>	Cardiotonique, diurétique	Les huiles essentielles, sels minéraux, alcaloïde
<i>Cytisus laburnum</i>	Action nicotinique paralysante au niveau du système cardio-vasculaire	Alcaloïde, cytisine, nicotine.

I.5. *Cytisus triflorus l'her*

I.5.1.Place dans la systématique :

La classification botanique de *cytisus triflorus l'her*. D'après (**Quezel et santa, 1962**).

Royaume : plantes

Embranchement : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Fabales

Famille : Fabaceae

Sous-famille : Faboideae

Genre : *cytisus*

Espèce : *Cytisus triflorus l'her*

I.5.2. Description botanique

Arbrisseau rameux hispide pouvant atteindre deux mètre de haut, à feuilles composées de trois folioles ovales, entièrement soyeuses, la médiane plus grande que les latérales, pétiole : fleure jeunes tachées de brun, à cinq pétales dont l'étendard est dressé et à calice courtement denté : les fleurs sont habituellement groupées par trois à l'aisselle des feuilles supérieures ; gousses brun, étroites, velues, d'environ 3.5cm. (**Quezel et Santa, 1962**).

I.5.3. Appellations locales

El-lougui, tellouguit, Guendoul, Chadjeret en nahal. — *Kabyle* : Houggui. (**Quezel et Santa, 1962**).

I.5.4. Répartition géographique

Espèce méditerranéenne des forêts humide, ravins humides du littoral et des montagnes siliceuses jusque vers 1500 m. (**Quezel et Santa, 1962**).

I.5.5. Utilisations traditionnelles

Les feuilles séchées de ce cytisque sont utilisées en infusion contre l'ulcère de l'estomac, en médecine traditionnelle, bien que la toxicité de la plante soit signalée.

La spartéine abaisse le rythme cardiaque. On utilise le genêt à balai pour régulariser l'activité cardiaque. Cette plante est également un diurétique efficace, qui stimule la production d'urine. Par son action contractante des muscles de l'utérus, le genêt à balai empêche les saignements après les accouchements (**Iserin et al., 2001**).

I.5.6. Composition chimique de *Cytisus triflorus* (la région d'Azazga)

L'huile essentielle des feuilles de l'espèce contient Les composés oxygénés terpénoïdes constituent la fraction la plus abondante.: linalool (20.9%), α -terpineol (6.4%) , nerol (1.2%), géraniol (6.5%) , 4-vinyl-2- ethoxy-phenol (3.5%), eugenol (1.7%), 3,4- dimethoxy-styrene (4.3%), 6,10,14- trimethyl-2-pentadecanone (7.6%), tetradecanoic acid (2.5%), geranyl acetone (1.6%), heneicosane (1.9%), tricosane, (2.1%), hexadecanoic acid (5.6%) et musk ambrette (2.3%) (**Aourahoum et al., 2013**).

I.6. Chimie des huiles essentielles

Les plantes de façon générale et aromatiques en particulier, se caractérisent par deux types de métabolismes : primaire fournit les constituants de base en quantité élevée. Les plus importants sont les sucres et leurs dérivés, les lipides et les protéines. Le métabolisme secondaire produit des métabolites en faible quantité, mais dont les applications dans différents domaines, en particulier à intérêt pharmaceutique et cosmétique, voir nutritionnel, sont de la plus grande importance. Les huiles essentielles ou essences, font partie de ce groupe de métabolite avec les alcaloïdes et les phénols (**Fekih, 2014**).

I.6.1. Définition

Ce sont des molécules à noyau aromatique et caractère volatil offrant à la plante une odeur caractéristique et on les trouve dans les organes sécréteurs (**Iserin et al., 2001**). Jouent un rôle de protection des plantes contre un excès de lumière et attirer les insectes pollinisateurs (**Dunstan et al., 2013**).

Ils sont utilisées pour soigner des maladies inflammatoires telles que les allergies, eczéma, favorise l'expulsion des gaz intestinales comme les fleurs frais ou séchées de plante "camomille" (**Iserin et al., 2001**).

La définition suivante d'une huile essentielle : «produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des *citrus*, soit par distillation sèche (**Bruneton, 1999**).

Les produits obtenus par extraction avec d'autres procédés ne sont pas repris dans la définition d'huile essentielle donnée par la norme AFNOR (Association Française de Normalisation) (**AFNOR, 2000**).

I.6.2. Rôle des huiles essentielles pour le règne végétal

L'activité biologique d'un huile essentiel est liée à sa composition chimique, aux groupe fonctionnels des composés majoritaire (alcools, phénols, composé terpénique) et à leurs effets synergiques.

plusieurs travaux ont mis en évidence les différentes activités biologique des plantes aromatiques et médicinales, en particulier leurs pouvoirs antifongique (**Dorman,2000**), antibactérienne (**Bourkhiss,2007**), antioxydants et insecticides (**Bouzouita ,2008**).

Les parfums émis jouent un rôle attractif pour les insectes pollinisateurs. (**Deroin, 1988**).

De plus, en règle générale, les huiles essentielles constituent un moyen de défense naturel contre les insectes prédateurs et les microorganismes. Les substances émises sont dans ce dernier cas appelées «phytoalexines». Ce type de toxine n'est produit qu'en cas d'infection et n'entre donc pas dans la composition d'une huile essentielle provenant d'une plante saine (**Mann, 1987**).

I.7. Méthode d'extraction des huiles essentielles

Le procédé d'obtention des HE intervient d'une façon déterminante sur sa composition chimique (**Garnero, 1977**).

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales, cette diversité est due à la variété des matières premières et à la sensibilité considérable de certains de leurs constituants (**Legrand, 1993**).

1.7.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée à travers de laquelle passe la vapeur d'eau.

La vapeur endommage la structure des cellules végétale et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Les vapeurs saturées en composés volatils sont condensées puis décantées. L'injection de vapeur se fait à la base de l'alambic (**Richard et Peyron, 1992**).

1.7.2. Extraction par hydro distillation d'huile essentielle

Ce mode d'extraction a été proposé par Garnier en 1891, c'est la méthode la plus utilisée pour extraire les HE et pouvoir les séparer à l'état pur mais aussi de fournir de meilleurs rendements. Le principe consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition, les vapeurs hétérogènes vont se condenser sur une surface froide et l'HE sera alors séparée par différence de densité (**Bruneton, 1993**). Cette technique a été appliquée dans de nombreux travaux (**Bruneton, 1999**).

1.8. Méthodes d'analyses des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont considérées comme une matière première destinée à divers secteurs d'activités tels que la parfumerie, la cosmétique, l'industrie pharmaceutique et de l'agroalimentaire, d'où la connaissance de la composition chimique reste une étape importante et nécessaire (**Cavalli, 2002**).

L'analyse chimique des huiles essentielles permet d'identifier et de quantifier ses constituants. Les progrès des méthodes analytiques permettent d'identifier rapidement un très grand nombre de composés. En effet, la CPG est la méthode de référence utilisée pour analyser les huiles essentielles, elle permet l'analyse de mélanges, qui peuvent être très complexes, de nature et de volatilité très variées (**Arpino et al., 1995**).

1.8.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

L'analyse des huiles essentielles est une opération délicate qui nécessite la mise en œuvre de plusieurs techniques (**Cavalli, 2002**).

La chromatographie en phase gazeuse CPG est une technique très répandue. Elle possède plusieurs avantages : sensibilité, polyvalence, rapidité de mise au point des analyses nouvelles (**Rouessac, 2007**).

La CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. C'est la technique de séparation la plus utilisée pour l'analyse de la composition chimique des huiles essentielles (**Paolini, 2005**).

I.8.2. Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse (CPG/SM)

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est une méthode d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse afin d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances.

Le principe de la spectrométrie de masse consiste à bombarder à l'aide d'électrons une molécule qui sera fragmentée ; les différents fragments obtenus, chargés positivement constituent le spectre de masse de la molécule. Cette technique permet d'identifier un composé en comparant son spectre à ceux contenus dans des bibliothèques de spectres informatisées ou sous format papier construites au laboratoire ou commerciales (**Lobskin 2005**).

I.9. Activités biologiques des huiles essentielles

Les HE possèdent de nombreuses activités biologiques (**Ziming et al., 2006**). En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, par exemple contre les bactéries endocanalaies (**Pellecuer et al., 1980**), elles possèdent également, des propriétés cytotoxiques (**Sivropoulou, et al., 1996**) qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre.

Par exemple dans des préparations pharmaceutiques, les terpènes phénoliques, comme le thymol et le carvacrole, sont souvent utilisés comme antiseptiques antibactériens et antifongiques (**Agnihotri et al., 2003**).

L'activité des terpènes des huiles essentielles est en corrélation avec leur fonction chimique

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique et les possibles effets synergiques entre ses composants. (**Lahlou, 2004**).

I.9.1. Activité des HE s liée à la composition chimique (notion de chémotype)

Le principal facteur modulant le spectre d'activité des HE's est le type et la structure moléculaire des composants actifs présents dans les HE's ; ainsi *in vitro* on observe une activité antimicrobienne plus élevée des terpènes oxygénés en comparaison aux terpènes à hydrocarbures. La structure moléculaire semble

présenter un rôle aussi important que le degré d'oxydation de la molécule de terpène : la caractéristique lipophile du squelette hydrocarboné ainsi que la propriété hydrophile des groupes fonctionnels sont déterminantes vis-à-vis de l'activité antimicrobienne des terpénoïdes (**Dorman et Deans; 2000**). Sur cette base l'ordre de l'activité antimicrobienne de ces composés est le suivant : (**Ouraini et al, 2007 ; Bekhechi et al, 2008**).

Phénols >Alcools > Aldéhyde > Cétones > Oxydes > Hydrocarbure > Esters.

Le pouvoir antimicrobien des HE's est probablement en rapport avec leur fort contenu phénolique, (**Sokmen et al, 2007**), mais les phénols ne sont pas les seuls responsables de l'intégralité de l'activité, la totalité de la composition chimique devant être prise en compte (**Cosentino et al 1999**). **Lahlou (2004)** a montré que les activités antimicrobiennes, antivirales, insecticides, larvicides des extraits totaux des HE's sont supérieures à celle des composés majoritaires testés séparément. Ces données ont été confirmées par **Rota et al (2008)** dans une étude *in vitro* sur les microbes pathogènes isolés des aliments.

1.9.2. Activité antibactérienne

L'une des premières mises en évidences *in vitro* de l'activité antibactérienne des HEs date de la fin du XIXème siècle, lorsque Buchholtz a étudié la croissance des propriétés inhibitrices de l'huile des graines de carvi et de l'huile de thym en 1875. Toutefois, il aura fallu attendre le début du XXème siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser (**Cox et al, 2000**). Dès lors, plusieurs recherches ont démontré le pouvoir antimicrobien de certaines essences sur une large palette de micro-organismes, y compris sur des bactéries résistantes aux antibiotiques.

De façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxiques des HEs sur les bactéries comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, fuite d'électron et la coagulation du contenu protéique des cellules (**Davidson, 1997**).

Néanmoins, le mécanisme d'action des HEs sur les cellules bactériennes et fongiques reste difficile à cerner, compte tenu de la composition complexe des huiles volatiles (**Burt, 2004**). La variabilité des constituants des huiles suggère qu'elles agissent sur plusieurs sites d'action dans les micro-organismes, étant donné que chaque composé possède son propre mode d'action (**Guinoiseau, 2010**).

Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane (**Cox et al., 2000**).

Les terpènes ainsi que les flavonoïdes peuvent pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne et induire sa rupture. Le

contenu cytoplasmique est déchargé à l'extérieur de la cellule impliquant sa destruction (**Wendakoon et Sakaguchi, 1995 ; Tsuchiya et al., 1996**). Egalement, une perturbation chémo-osmotique et une fuite de potassium intra-cytoplasmique peuvent subvenir, suivi de la libération d'acides nucléiques, de L'ATP, et du phosphate inorganique (**Tsuchiya et al., 1996 ; Hammer et al., 1999 ; Daroui-Mokaddem, 2011**).

D'après (**Wendakoon et Sakaguchi, 1995 ; Tsuchiya et al., 1996**) Les terpènes ainsi que les flavonoïdes peuvent pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne et induire sa rupture. Le contenu cytoplasmique est déchargé à l'extérieur de la cellule impliquant sa destruction.

I.9.3. Activité antifongique

De plus en plus, les essences sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire comme arômes également comme conservateurs alimentaires. Les huiles essentielles agissent sur un large spectre de moisissure et de levure en inhibant la croissance des levures et la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures.

Comme pour l'activité antibactérienne, le pouvoir antifongique est attribué à la présence de certaines fonctions chimiques dans la composition de l'huile essentielle, Plusieurs travaux ont révélé que le pouvoir inhibiteur était essentiellement dû à la réactivité de la fonction aldéhyde avec le groupement thiol des acides aminés impliqués dans la division cellulaire (**Kurita et al, 1979**).

D'autres auteurs ont démontré que la formation d'un complexe entre le donneur d'électrons et l'aldéhyde induit un changement de l'état ionique de la membrane traduisant par un déséquilibre d'échange avec le milieu extérieur. Ce déséquilibre entraîne la mort cellulaire (**Baser et Buchbauer, 2010**).

Cependant, les phénols (eugénol, chavicol 4-allyl-2-6- diméthoxyphénol) sont plus antifongiques que les aldéhydes testés (cinnamique et hydro cinnamique) (**Laib, 2010**).

Chapitre II: Matériel et méthodes

Notre travail consiste à étudier l'activité biocide à l'égard d'une gamme microbienne (bactérienne et fongique) des huiles essentielles synthétisées chez la plante spontanée *Cytisus sp* de la région de Chréa pendant deux phase cruciales du cycle phénologique à savoir la feuillaison et la phase de floraison.

II. Lieu et période d'étude

L'ensemble de ce travail a été effectué au laboratoire de phytopharmacie du département des Biotechnologies de l'Université de Saad Dahleb-Blida 1. Pendant une durée de 6 mois (décembre-juin).

II. 1. Présentation de la région de collecte du matériel végétale

Le matériel végétal de la présente étude est échantillonné du parc National de Chréa. Ce dernier se situé à 50 km au sud-ouest d'Alger, il s'étend en écharpe sur 26587 ha. Le long des parties centrales de la chaîne de l'Atlas Tellien, comprises entre les latitudes Nord $36^{\circ}19' / 36^{\circ}30'$, et les longitudes Est $2^{\circ}38' / 3^{\circ}02'$.

Le parc domine vers le Nord, l'opulente plaine de la Mitidja où s'agencent les riches terroirs agricoles de l'avant pays, le bourrelet anticlinal du Sahel sillonné en profondeur par l'imposante cluse de l'Oued Mazafran, et les monts du Djebel Chenoua, formant une véritable barrière perpendiculaire à l'Atlas blidéen incrustée à la fois dans la chaîne de l'Atlas et dans la mer Méditerranée (Fig. 2) (Anonyme, 2016).



Figure 2: Présentation de limites du Parc National de Chréa (Anonyme, 2016)

II. 2. Matériel et méthodes

II. 2.1. Présentation du matériel végétal

Le genêt à balais *Cytisus sp* a été choisi pour la présente étude d'après ses vertus ethnobotaniques. Elle a été récoltée au Parc National de Chréa entre le mois de décembre et le mois de mai 2016. Cette période couvre les trois phases phénologiques à savoir (Fig. 3): (i) phase de feuillaison (avant floraison), (ii) phase de floraison, (iii) phase de nouaison (formation des gousses). L'échantillonnage s'est limité aux feuilles de *Cytisus sp*.

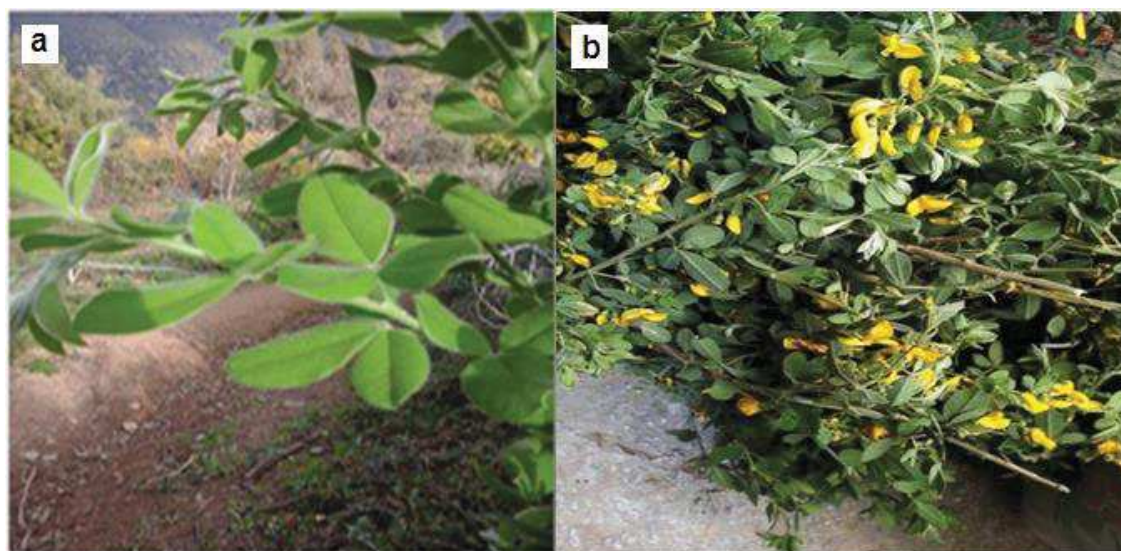


Figure 3: Présentation de *Cytisus sp*. (Originale, 2016)

(a) Feuilles (b) fleurs

Les feuilles fraîchement collectées ont été séchées dans une étuve ventilée à 53°C pendant 1 heure.

II. 2.2. Présentation du matériel microbien

L'activité antimicrobienne (activité biocide et/ou biostatique) de l'huile essentielle de *Cytisus sp* a été évaluée sur plusieurs souches bactériennes qui proviennent de l'American Type Culture Collection ATCC qui sont ***Escherichia coli***, ***Bacillus subtilis***

Staphylococcus aureus et la levure ***Candida albicans*** provenant de laboratoire microbiologiques, USA, et des souches fongiques qui sont ***Pseudomonas aeruginosa***, ***Fusarium sp1***, ***sp2*** et ***Alternaria sp*** provenant par Mdm Ammad. Leurs caractéristiques sont regroupées sur le tableau suivant :

Tableau 5 : Pouvoir pathogène des souches microbiennes utilisées (Assous et al, 1999 ; Lansing et al, 2003; Joffin et Leyral, 2006).

Souches microbiennes	Familles	Pouvoir pathogène
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 (Gram⁻)	Enterobacteriaceae	Différentes formes de diarrhées, dysenterie, rôle des enterotoxines, de l'endotoxine, des adhésines, certains de ces facteurs sont également impliqués dans des infections des tissus profonds.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 (Gram⁻)	Pseudomonaceae	Infection pulmonaire peut être primitive ou secondaire à une septicémie.
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 (Gram⁺)	Micrococcaceae	Staphylococcie cutanées, sous cutanées et muqueuses, osseuses, pulmonaire, toxi-infection alimentaire, entérocolites aiguës.
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 (Gram⁺)	Bacillaceae	Sont fréquemment en cause dans les infections oculaires succédant à des traumatismes accidentels ou chirurgicaux. Responsable de quelques cas de toxi-infections alimentaires.
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	Trichocomaceae	Aspergillose invasive nosocomiale. producteur d'aflatoxines B1 (la plus importante), B2, G1 et G2. L'aflatoxine B1 est actuellement considérée comme le plus important agent carcinogène d'origine naturelle connu.
<i>Fusarium sp</i>	Hypocreaceae	sont bien connues pour être des contaminants communs et des pathogènes des plantes; elles peuvent aussi causer diverses infections chez l'homme. Elles sont surtout reconnues en tant que productrices de puissantes mycotoxines.
<i>Alternaria sp</i>	Pleosporaceae	<i>Alternaria sp.</i> est reconnu comme l'espèce aéroallergène type, et, dans une majorité de cas, les problèmes de santé chez les humains et les animaux ont été associés à cette espèce.
<i>Candida albicans</i>		il entraîne un muguet au niveau de la bouche, des rougeurs et démangeaisons au niveau cutané.

II. 2.3. Milieu de culture

Dans notre travail nous avons utilisé comme milieux de culture les suivants:

Pour tester l'activité biologique des souches bactériennes nous avons utilisé le milieu gélose Muller Hinton (MH).

Pour évaluer l'activité antifongique, nous avons utilisé le PDA (Potato Dextrose Agar ou pomme de terre glucosée et gélosée), et pour les levures on a utilisé le milieu saboraud.

II. 3. Méthodes d'étude

II. 3. 1. Extraction des l'huiles essentielles de *Cytisus sp*

II. 3. 1.1. Procédé d'extraction des huiles essentielles

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydro distillation en utilisant l'appareil de Clevenger (**Fig. 4**).

La matière végétale (dans notre cas *cytissus triflorus*) est immergée directement dans un ballon rempli d'eau, placé sur une source de chaleur (Chauffe-ballon), le tout est en suite porté à l'ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant puis elle récupérées dans une ampoule à décanter et l'huile essentielle se séparé de l'hydrolat par simple différence de densité (**Hellal, 2011**).

Le milieu réactionnel constitué par la matière (100 à 150g) végétale et de l'eau distillé (600 ml) est porté à l'ébullition grâce à un chauffe-ballon. Une fois, l'ébullition s'effectue les cellules éclatent et se commencent à dégager leurs contenu en huiles essentielles, qui par la suite transportent avec le vapeur d'eau jusqu'à le réfrigérant, et après la condensation dans ce dernier l'huile se rassemble dans une ampoule à décantation. Les huiles essentielles récupérées dans de petits flacons opaques et stockée à 4°C.

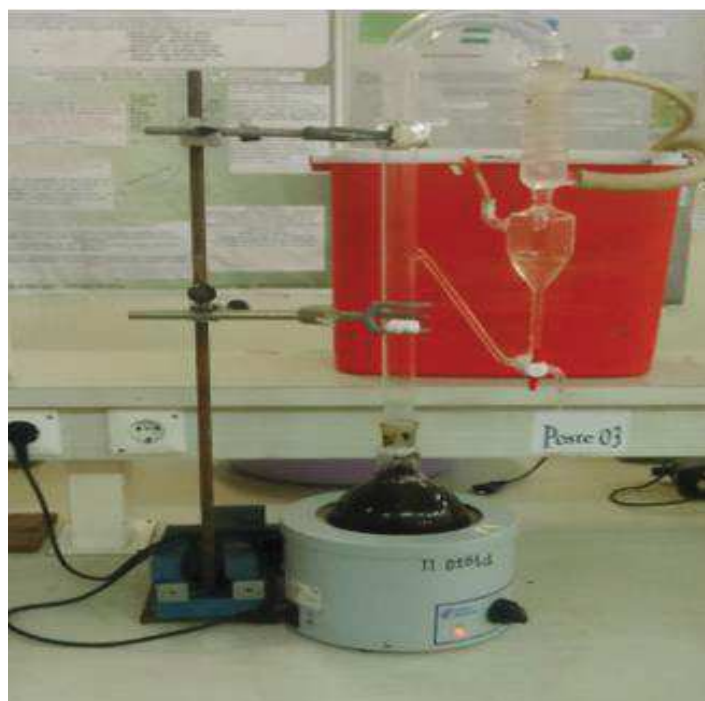


Figure 4: Dispositif d'extraction de type de Clevenger (Originale, 2016)

II. 3. 1.2. Calcul du rendement en huiles essentielles

Le rendement en huiles essentielles (RHE) est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). Le rendement est exprimé en pourcentage, il est exprimé par la formule suivante :

$$\text{RHE}\% = (\text{mh} / \text{mv}) \times 100$$

Avec :

RHE : Rendement en huile essentielle en %.

mh: Masse d'huile essentielle en gramme.

mv: Masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme

II. 3. 1.3. Analyse chromatographique des huiles essentielles

L'analyse chromatographique de l'huile essentielle a été effectuée à l'aide d'un chromatographe de type Thermo Electron : Trace GC Ultra équipé d'une colonne capillaire HP-5 (5% diphényl- 95% diméthyl-siloxane) (30 m x 0,25 mm, épaisseur du film : 0,25µm). L'appareil est équipé d'un injecteur PVT (Température de Vaporisation Programmée) de type split-splitless. Le mode d'injection est split. Le volume injecté est de 1µl. La programmation de température va de 50 à 300°C avec un gradient de 3°C/min. La spectrométrie de masse est réalisée avec un

chromatographe en phase gazeuse de type Thermo Electron Trace MS system. La fragmentation est effectuée par impact électronique d'intensité 70eV. La colonne capillaire est de type HP-5MS (5% diphényl- 95% diméthyl-siloxane) (30 m x 0,25 mm, épaisseur du film : 0,25µm). La température de la colonne est programmée de 50à300°C à raison de 3°C/min. Le gaz vecteur hélium a un débit de 1,0 ml/min. L'injection est faite en mode split (rapport de fuite : 1/70, débit ml/min). L'appareil est relié à un système informatique gérant la bibliothèque de spectres de masse du National Institute of Standards and Technology (NIST 98). Les composés de l'huile essentielle sont identifiés par les spectres de masse.

II .3.2 . Activité antimicrobienne

II .3.2.1. Activité antimicrobienne de l'huile essentielle

II .3.2.1.1. Préparation des Inoculums :

En premier lieu une suspension microbienne d'une opacité de 0.5 Mc Ferland est préparée à partir d'une culture pure et jeune .Cette opacité, équivalente à une densité optique de 0.08 – 0.1 à 600 nm, à partir des précultures, on racle 3 colonies à l'aide d'une pipette pasteur, puis on la décharge dans un tube de l'eau physiologique stérile.

II .3.2.1.2. Activité antibactérienne de l'huile essentielle

Le protocole suivi est celui décrit par **Mazari et al (2010)** :

Ensemencer la gélose Mueller-Hinton avec la suspension par la méthode d'écouvillonnage. Laisser sécher.

A l'aide d'une pince stérile, imbiber un disque de papier Whatman (6 mm de diamètre) dans 15 ul de l'huile essentielle puis le déposer au milieu de la gélose ensemencée, après diffusion de l'extrait durant 1 heure étuver les boites à 37C° durant 24 heures.

L'activité antimicrobienne est déterminée à l'aide d'une règle mesurant le diamètre de la zone d'inhibition.

II .3.2.1.3. Activité antifongique de l'huile essentielle

Le protocole suivi est celui d'**EI-Sawi et al (2007)**.

Ensemencement d'une gélose PDA avec 1mL de la suspension de spores. Des disques de papier Whatman de 6 mm de diamètre sont imprégnés dans 15 uL de l'HE, et déposer stérilement sur la gélose.

Laisser diffuser durant 1 heure.

Incubation à 28 C°, durant 7 jours.

II. 3.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

Pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne de *Cytisus sp* effet saisonial nous avons utilisé la méthode de diffusion sur disques.

II. 3.3.1. Préparation des disques

Les disques sont préparées à partir du papier wattman de 6 mm de diamètre, ensuite elles sont mises dans un tube à essai, stérilisés à l'autoclave 20 minutes à 120°C, puis stockés à une température ambiante.

La méthode de diffusion sur disque (l'aromatogramme) a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne. Une suspension microbienne de 18 à 24 heures de chaque souche antimicrobienne est préparée avec l'eau physiologique (NaCl).

Des boîtes de Pétri contenant la gélose de Mueller Hinton pour les bactéries, PDA pour les champignons, et les milieux SABORAUD pour les levures sont inoculées. A la surface de chaque boîte on dépose cinq disques de papier Whatman stériles de 6 mm de diamètre imbibés par de différentes concentration d'huile essentielle. Cette méthode est dite l'aromatogramme.

II. 3.3.2. Ré-isolement des souches microbiennes.

On a fait un prélèvement des souches microbienne par anse de platine et ensemencés selon la méthode de stries sur une boîte de Pétri coulée par gélose nutritive puis incubé, pour l'obtention des souches pures et jeunes.

II. 3.3.3. Préparation de l'inoculum

En premier lieu une suspension microbienne d'une opacité de 0.5 Mc Ferland est préparée à partir d'une culture pure et jeune. Cette opacité, équivalente à une densité optique de 0,08 – 0,1 à 600 nm, à partir des précultures, on racle 3 colonies à l'aide d'une pipette pasteur, puis on la décharge dans un tube de l'eau physiologique stérile.

II. 3.3.4. L'ensemencement

Cette opération se fait après la préparation de l'inoculum, avec un écouvillon on prend des colonies microbienne et on met dans 5ml d'eau physiologique, on trempe l'écouvillon stérile dans la suspension microbienne. Puis on flotte l'écouvillon sur la totalité de la surface de MH, PDA, et saboraud.

II. 3.3.5. Application des disques

On utilise une pince pour mettre 5 disques dans la boîte, à l'aide d'une micropipette on imbibe chaque disque par 15 μ l d'HE.

Après diffusion de l'extrait durant 1 heure :

- (i) Étuver les boîtes à 37C° durant 24 heures pour les souches bactériennes.
- (ii) Incubation à 28 C°, durant 7 jours pour les souches fongiques.

II. 3.3.6. Lecture de l'aromatogramme

L'activité antimicrobienne est déterminée à l'aide d'une règle mesurant le diamètre de la zone d'inhibition.

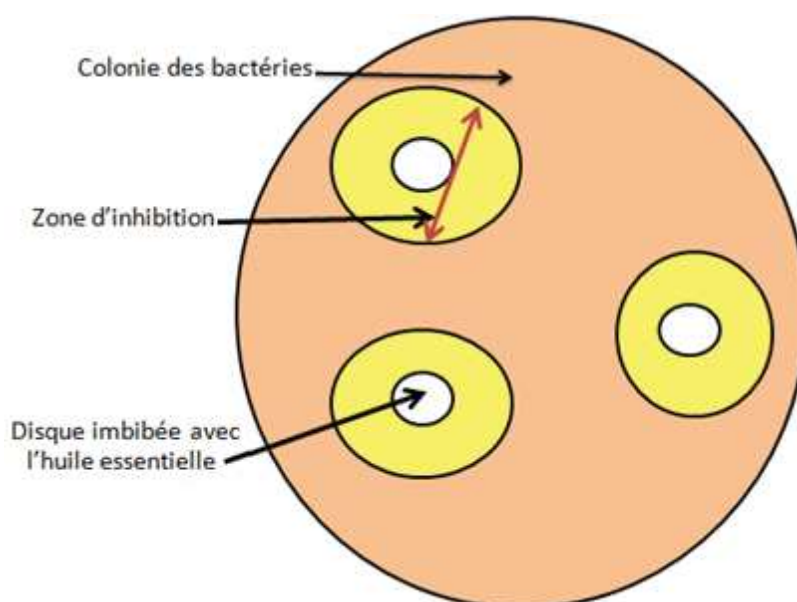


Figure 5: Dispositif d'évaluation de l'activité biologique des huiles essentielles de *Cytisus sp.* (Originale, 2016)

L'échelle de l'estimation de l'activité antimicrobienne est donné par **Mutai et al (2009)**; ils ont classé les diamètres de zones d'inhibition (D) de la croissance bactérienne en 5 classes ;

- Très fortement inhibitrice : >30mm
- Fortement inhibitrice : 21mm- 29mm
- Modérément inhibitrice ; 16mm-20mm

- Légèrement inhibitrice : 11mm-16 mm
- Non inhibitrice : $D < 10$

II. 4. Analyse statistique des données

II. 4.1. Analyses de variance (SYSTAT vers. 12, SPSS 2009)

Lorsque le problème est de savoir si la moyenne d'une variable quantitative varie significativement selon les conditions (Stade phénologique, souches microbiennes, etc...), il est préconisé de réaliser une analyse de variance. Dans les conditions paramétriques (ANOVA pour Analysis of Variance), la distribution de la variable quantitative doit être normale. Dans certains cas, une transformation logarithmique a été nécessaire afin de normaliser cette distribution. Dans les cas où plusieurs facteurs sont en jeu, il peut arriver que toutes les interactions entre facteurs ne soient pas pertinentes à tester. Nous avons alors utilisé le modèle linéaire global (G.L.M.).

II. 4.2. Analyses multivariées (PAST vers. 1.37, Hammer *et al*, 2001)

Dans le cas de variables quantitatives, les relations multivariées sont étudiées à l'aide d'une analyse en composantes principales (A.C.P.) (Ter Braak et Prentice, 1988). Dans cette analyse, les zones d'inhibition souches microbiennes ainsi que les traitements à base d'huiles essentielles de *Cytisus sp.* sont groupées selon leur réaction aux différents stades phénologiques étudiés. A partir des trois premiers axes de l'analyse factorielle, une classification ascendante hiérarchique de l'activité des huiles essentielles sont réalisées dans le but de détecter des discontinuités inter-applications.

Chapitre III : Résultats

Les résultats relatifs à la caractérisation des huiles essentielles issues des feuilles relatives à deux stades phénologique (feuillaison & floraison) de *Cytisus sp* ainsi que l'évaluation de l'effet biocide et/ou biostatique sur une gamme microbienne sont exposés dans ce chapitre.

III.1. Evaluation du rendement en huiles essentielles de *Cytisus sp*.

Les huiles essentielles de deux stades phénologiques de *Cytisus sp* ont été extraites par hydrodistillation-entraînement à la vapeur. La figure 6 montre clairement que le stade feuillaison (avant floraison) affiche un rendement moyennement marqué par comparaison au stade floraison. Nous avons appliqué le test de Mann-Whitney afin d'apprécier l'écart enregistrée dans les rendements en huiles essentielles. Ce dernier confirme l'absence d'une différence entre les rendements des deux stades phénologiques de *Cytisus sp*.

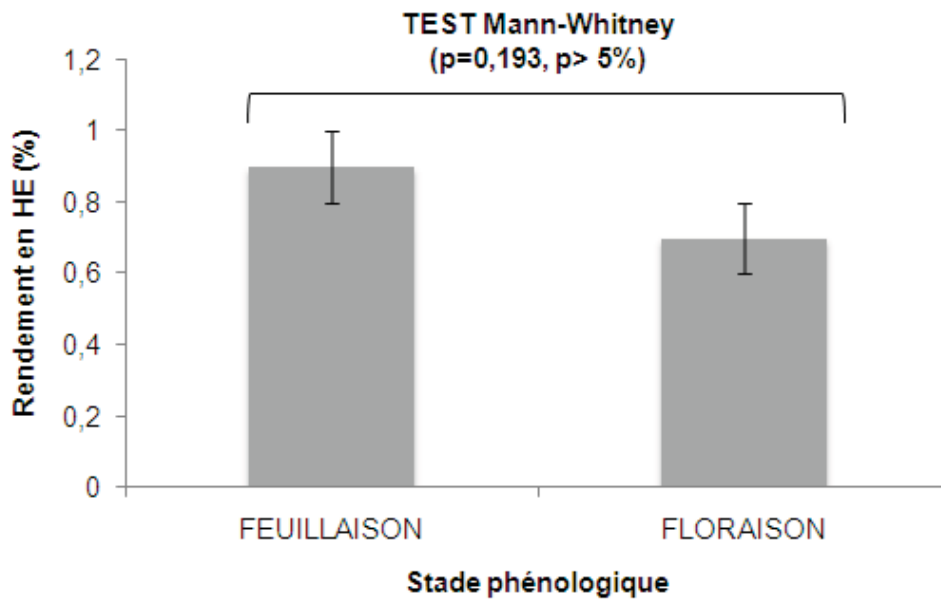


Figure 6: Estimation du rendement en huiles essentielles de *Cytisus sp*. En fonction des stades phénologiques

III.2 .Caractérisation des huiles essentielles des feuilles de *Cytisus sp.* en fonction des stades phénologiques

Les huiles essentielles obtenues par hydrodistillation-entraînement à la vapeur de *Cytisus sp.* Issues des feuilles de différents stades phénologiques ont été caractérisées par analyse CG-MS. Une quantification individuelle des composants des deux huiles essentielles a été établie.

Les analyses chimiques ont permis de décrire le profil des huiles essentielles de *Cytisus sp.* Issues du stade de feuillaison et floraison. Les résultats analytiques sont regroupés dans le tableau 6

Les huiles essentielles est un complexe mixte très diversifié, globalement la caractérisation nous a permis d'identifier 17 composés. L'huile essentielle issue du stade feuillaison (avant floraison) est caractérisée par 11 molécules à savoir : 1-Octen-3-ol, p-menth-1-en-8-ol, o-cymene, β -Linalool, B-Damascenone, B-Ionone, Tétratétracontane, Tricosane, Heptacosane, 2-pentadécane, 6, 10, 14 triméthyl, n-Hexadécanoic acid. En revanche, l'huile essentielle issue du stade floraison est caractérisée par 17 molécules à savoir : 1-Octen-3-ol, p-menth-1-en-8-ol, 2,6-Octadien-1-ol 3,7-diméthyl, o-cymene, β -Linalool, B-Damascenone, B-Ionone, Hénéicosane, Tétratétracontane, Tricosane, Heptacosane, Caryophyllène oxide, 2-pentadécane, 6,10,14 triméthyl, Stearaldehyde, n-Hexadécanoic acid, Phenol 2-méthyl-5-(1-méthylethyl), Benzoic acid, 2,6-bis(triméthylsilyl)oxyl-triméthylsilylester..

Les résultats d'analyse affichent une dominance en composés au profit de l'huile essentielle des feuilles issue de la phase de floraison (17 molécules) par rapport à l'huile essentielle issue de la phase feuillaison (11 molécules).

Le 1-Octen-3-ol, p-menth-1-en-8-ol, o-cymene, β -Linalool, B-Damascenone, B-Ionone, Tétratétracontane, Tricosane, Heptacosane, 2-pentadécane, 6, 10, 14 triméthyl, n-Hexadécanoic acid étant des composés communs pour les deux huiles essentielles de *Cytisus sp.*, alors que le 2, 6-Octadien-1-ol 3,7-diméthyl, Hénéicosane, Caryophyllène oxide, Stearaldehyde, Phenol 2-méthyl-5-(1-méthylethyl), Benzoic acid, 2, 6-bis (triméthylsilyl) oxyl-triméthylsilylester caractérisent uniquement l'huile essentielle de la phase de la phase floraison (Fig.7).

Tableau 6: Résultats de l'analyse par CG-MS des huiles essentielles de *Cytisus sp.* issues des feuilles de différents stades phénologiques (Dagbouche 2016).

Composés	Tr (min) AF	Tr (min) F	AF %	F%	Familles chimiques
1-Octen-3-ol	13,49	12,87	2,55	3,98	Alcools monoterpéniques
p-menth-1-en-8-ol	27,09	26,98	0,02	15,05	Alcools monoterpéniques
2,6-Octadien-1-ol 3,7-dimethyl-	0	31,63	0	5,98	Alcools monoterpéniques
o-cymene	15,41	15,3	0,07	0,69	Monoterpènes
β-Linalool	20,76	21,4	0,3	12,37	Monoterpènes oxygénés
B-Damascenone	39,69	39,45	4,36	3,67	Cétones
B-Ionone	45,67	45,56	1,42	1,12	Cétones
Heneicosane	0	77,45	0	0,36	Hydrocarbures saturés
Tetratetracontane	108,86	81,83	0,1	0,13	Hydrocarbures saturés
Tricosane	86,07	86,06	0,31	0,62	Hydrocarbures
Heptacosane	101,47	101,37	0,73	0,19	Hydrocarbures alcanes
Caryophyllene oxide	0	51,07	0	3,96	Sesquiterpènes
2-pentadecanone,6,10,14 trimethyl-	65,43	65,37	0,64	1,04	Sesquiterpènes
Stearaldehyde	0	58,58	0	0,31	Aldehydes
n-Hexadecanoic acid	71,84	71,43	0,04	0,35	Acides gras saturés
Phenol 2-methyl-5-(1-methylethyl)-	0	34,43	0	3,15	Phénols monoterpénoïdes
Benzoic acid, 2, 6-bis (trimethylsilyl) oxyl-trimethylsilylester.	0	56,66	0	0,56	Autres

AF : Avant floraison (feuillaison), F : Floraison

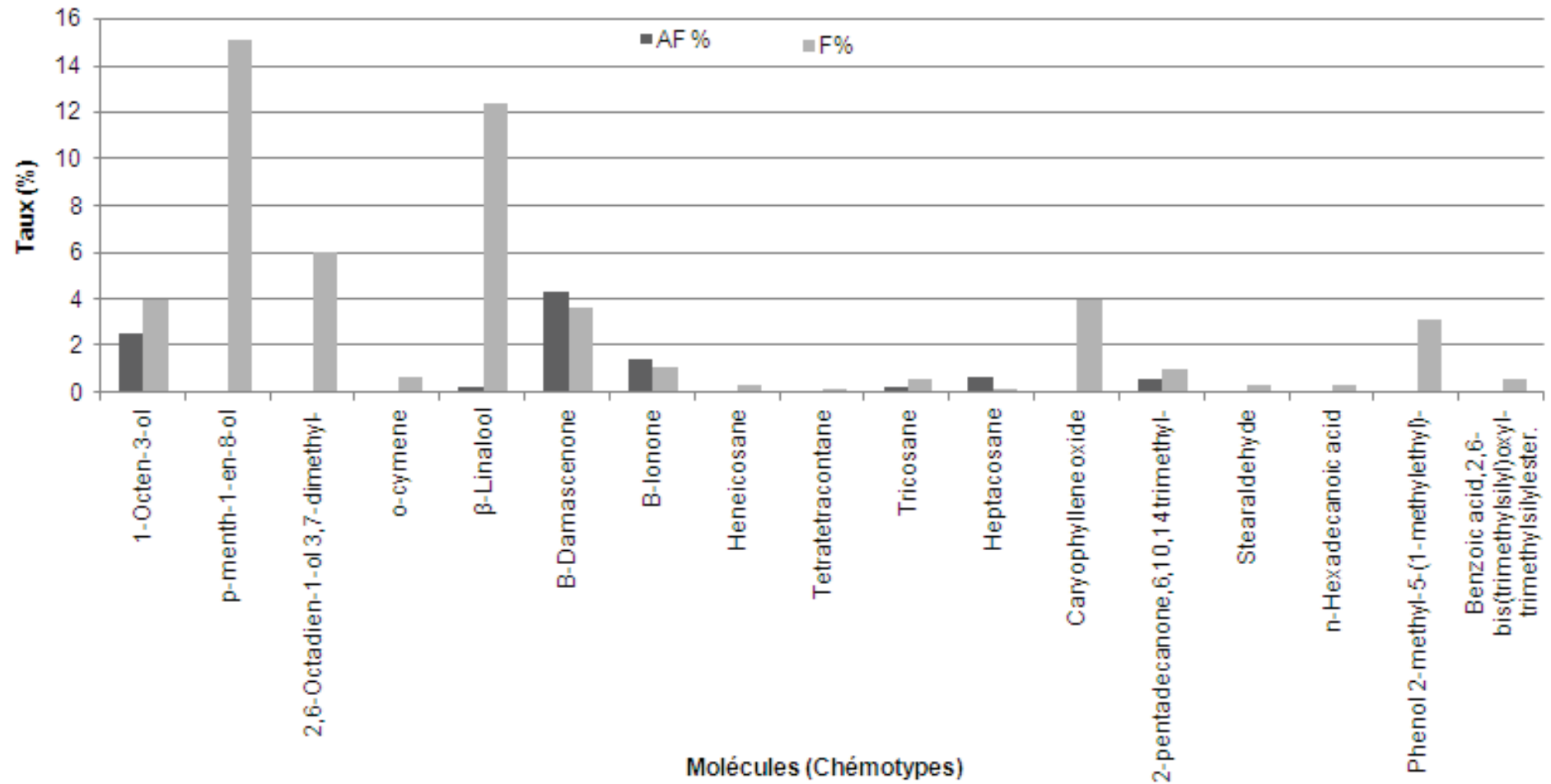


Figure 7: Caractérisation des huiles essentielles de *Cytisus sp.* Issues des phases phénologiques (feuillaison & Floraison)

AF : Avant floraison (feuillaison), F : Floraison

Les résultats nous informent que chez les huiles essentielles du stade floraison, les familles chimiques d'Alcools, de Monoterpènes, d'Hydrocarbures et des Sesquiterpènes dominent significativement les quantités enregistrées chez les huiles essentielles du stade feuillaison (Test Wilcoxon, $p < 5\%$). En contraste, les Cétones sont accumulés en quantité très appréciable en phase de feuillaison par comparaison au stade de floraison (Test Wilcoxon, $p < 5\%$) (Fig. 8a).

Nous signalons que les Alcools monoterpéniques et les Cétones constituent la fraction majoritaire chez les huiles essentielles de *Cytisus sp.* en phase de feuillaison (Fig. 8b). Cependant, les Alcools monoterpéniques et les Monoterpènes caractérisent les familles chimiques majoritaires de l'huiles essentielles de *Cytisus sp.* en phase de floraison (Fig. 8b).

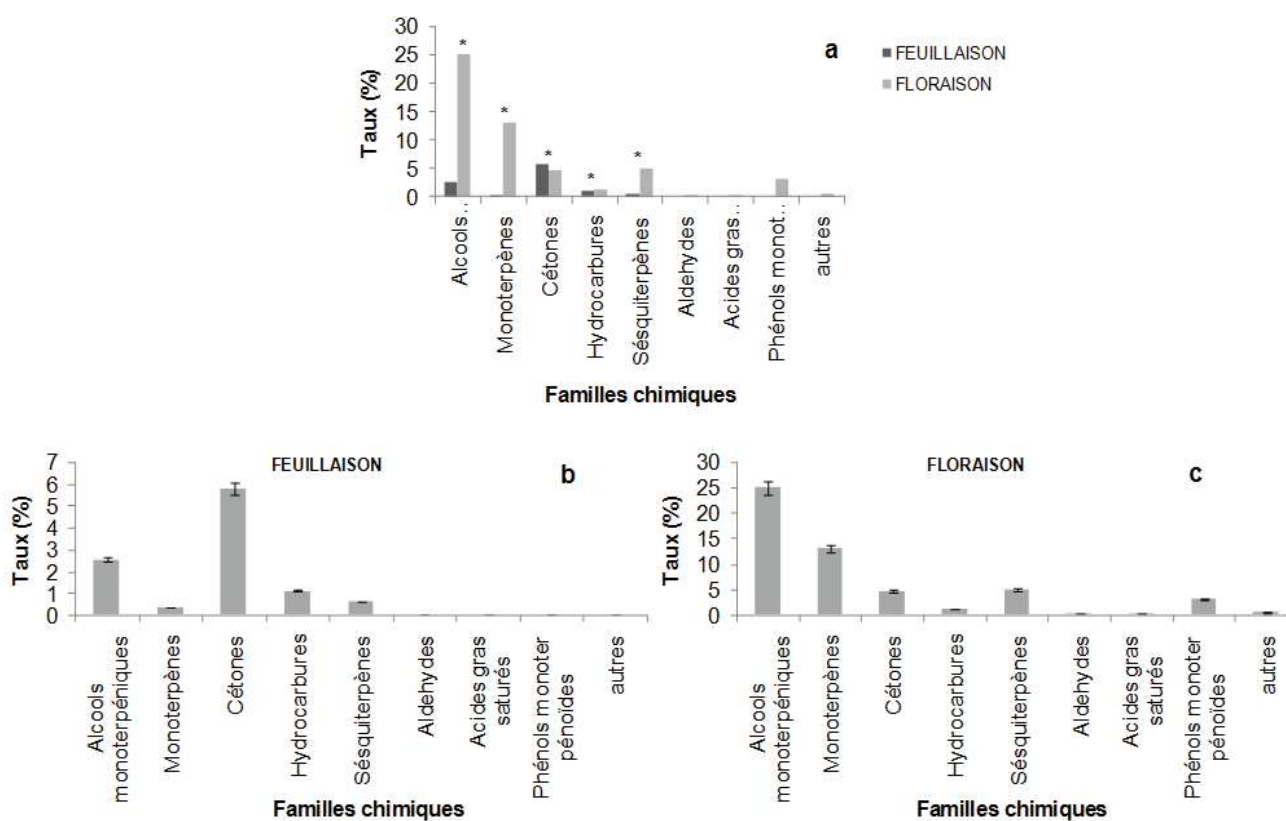


Figure 8: Composés spécifiques des huiles essentielles *Cytisus sp.* issues des phases phénologiques (feuillaison & Floraison)

III.3 . Evaluation de l'activité biologique des huiles essentielles des feuilles de *Cytisus sp.* en fonction des stades phénologiques

Cette partie de l'étude a pour objectif d'évaluer l'efficacité de deux d'huiles essentielles issues des stades phénologiques feuillaison et floraison de *Cytisus sp.* par l'étude *in-vitro* de leur pouvoir antifongique et antibactérien sur une gamme microbienne.

III.3.1. Evaluation de l'activité fongicide des huiles essentielles des feuilles de *Cytisus sp.* en fonction des stades phénologiques

L'étude du pouvoir antifongique des biopréparations à base d'huiles essentielles de *Cytisus sp.* A été testée sur gamme de champignon phytopathogène (*Fusarium sp.1*, *Fusarium sp.2* et *Alternaria sp.*), de champignon pathogène (*Aspergillus*) et de levure (*Candida*)

III.3.1.1. Tendance des zones d'inhibitions des champignons sous l'effet des huiles essentielles

L'analyse en composantes principales (A.C.P.), effectuée avec le logiciel PAST, à partir des valeurs des zones d'inhibitions des champignons est satisfaisante pour le paramètre étudié dans la mesure où plus de 80% de la variance sont exprimés sur les 2 premiers axes (Fig. 9).

La projection des valeurs des zones d'inhibitions en vecteurs à travers le premier axe 1 (47,17 %), montre que l'inhibition de la croissance mycélienne de l'agent pathogène *Aspergillus*, de l'agent phytopathogène *Fusarium sp1* et de la levure *Candida* est corrélée négativement avec le type d'huiles essentielles ainsi qu'aux doses appliquées. Les projections des vecteurs relatifs aux zones d'inhibitions informent que les deux huiles aux doses appliquées montrent à un effet inhibiteur restreint de la croissance mycélienne de *Fusarium sp1*, d'*Aspergillus* et de *Candida*. Les mêmes projections révèlent que l'huile essentielle de la phase phénologique floraison aux doses appliquées paraît la plus performante en termes d'inhibition de la croissance mycélienne. Cette tendance est vérifiée par les valeurs positives du coefficient de corrélation de Pearson (Fig. 9 axe1).

En revanche, la projection des mêmes données à travers le deuxième axe (35,54 %) montre que la zone d'inhibition évolue différemment en deux groupes à savoir : (i) les trois doses de l'huile essentielle de la phase feuillaison et la dose D1 de l'huile essentielle de la phase floraison (AFD1, AFD2, AFD3 et FD1), (ii) les deux doses de l'huile essentielle de la phase floraison (FD2 et FD3). Cette tendance est vérifiée par les valeurs du coefficient de corrélation de Pearson (Fig. 9 axe2).

Sur la base des orientations des vecteurs des zones d'inhibitions, il en ressort que l'huile essentielle de la phase floraison appliquées aux doses FD2 et FD3 contrôle mieux *Fusarium sp2.*, alors que l'huile essentielle de la phase feuillaison appliquées aux doses AFD1, AFD2, AFD3 et l'huile essentielle de la phase floraison appliquée à la dose FD1 contrôle mieux *Alternaria sp.*,

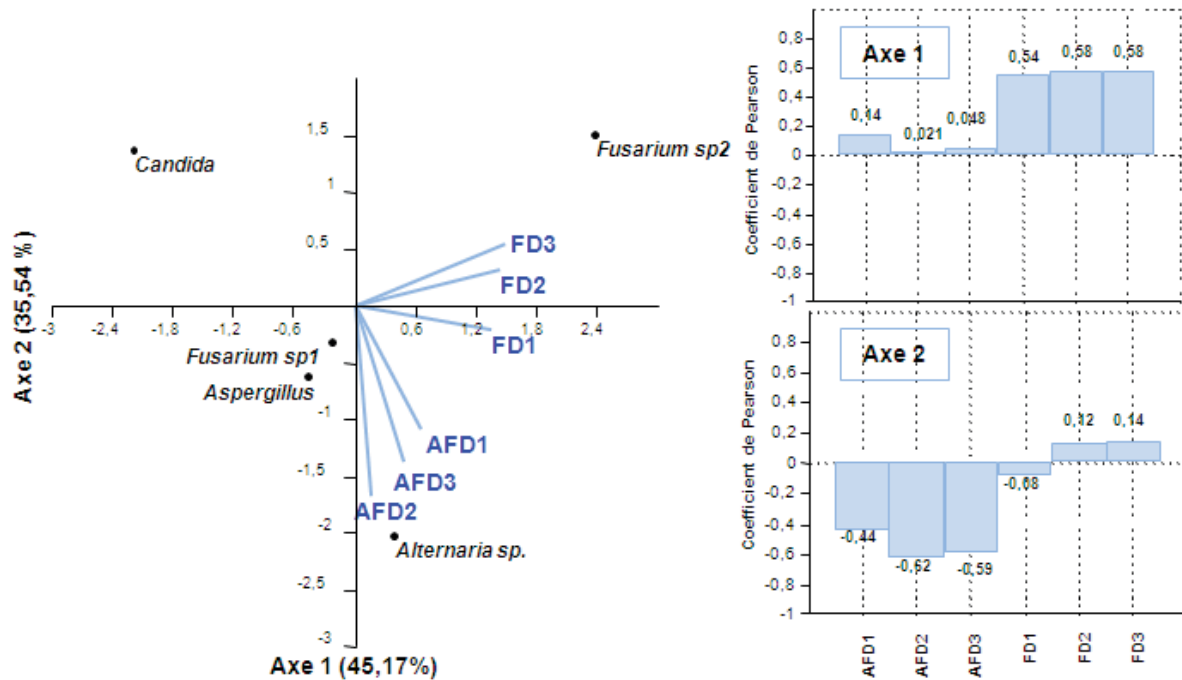


Figure 9: Projection des zones d'inhibition de la gamme fongique sur les deux axes de l'A.C.P.

III.3.1.2. Etude comparée de l'effet des huiles essentielles de *Cytisus sp* sur la croissance mycélienne

Le recours au modèle général linéaire (G.L.M.) a été sollicité dans le but d'étudier la croissance des zones d'inhibition sous l'effet strict des trois facteurs à savoir : les stades phénologiques, les doses d'huiles essentielles et les souches phytopathogènes. Les résultats de l'analyse de la variance stipulent que les huiles essentielles issues des phases phénologiques de feuillaison et de floraison n'exercent aucun effet significatif sur la croissance mycélienne (Fig. 10a). Cependant, l'analyse signale la présence de différence marginalement significatives quant à l'effet des dilutions des huiles essentielles de *Cytisus sp*. Les zones d'inhibitions se trouvent très liées à la gradation positive de la dilution des huiles essentielles (Fig. 10b). En fin, le test GLM, estime qu'*Alternaria sp.* et *Fusarium sp2* sont les souches phytopathogènes les plus touchées par les huiles essentielles de *Cytisus sp*. (Fig. 10c).

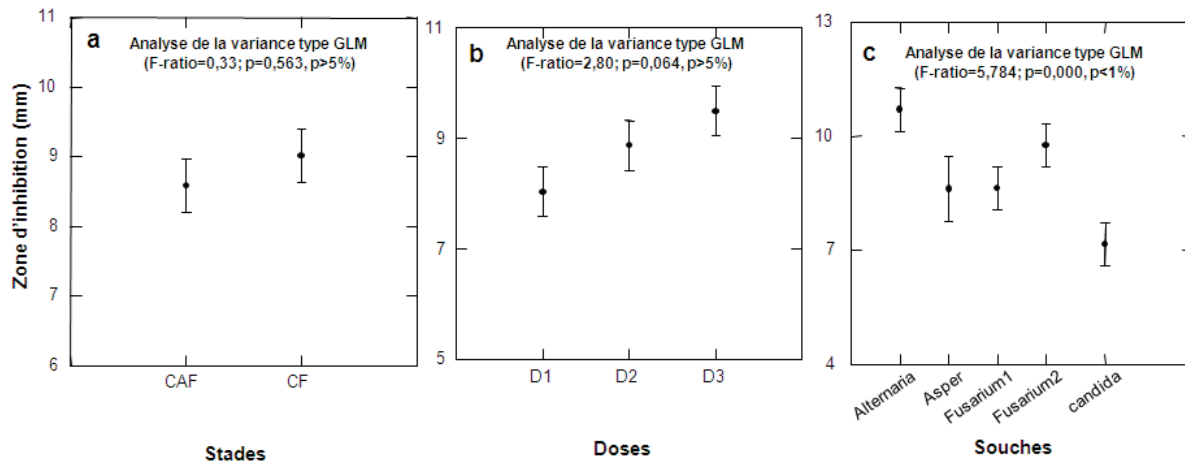


Figure 10 : Etude comparée de l'inhibition de la croissance mycélienne sous l'effet des biopréparations à base d'huiles essentielles de *Cytisus sp.*

La confrontation du facteur dose des biopréparations à base d'huiles essentielles de *Cytisus* aux souches phytopathogènes, nous indique une progression d'efficacité se traduisant par l'augmentation du principe actif dans les dilutions, plus plausible chez *Alternaria* et *Fusarium sp2* (Fig. 11).

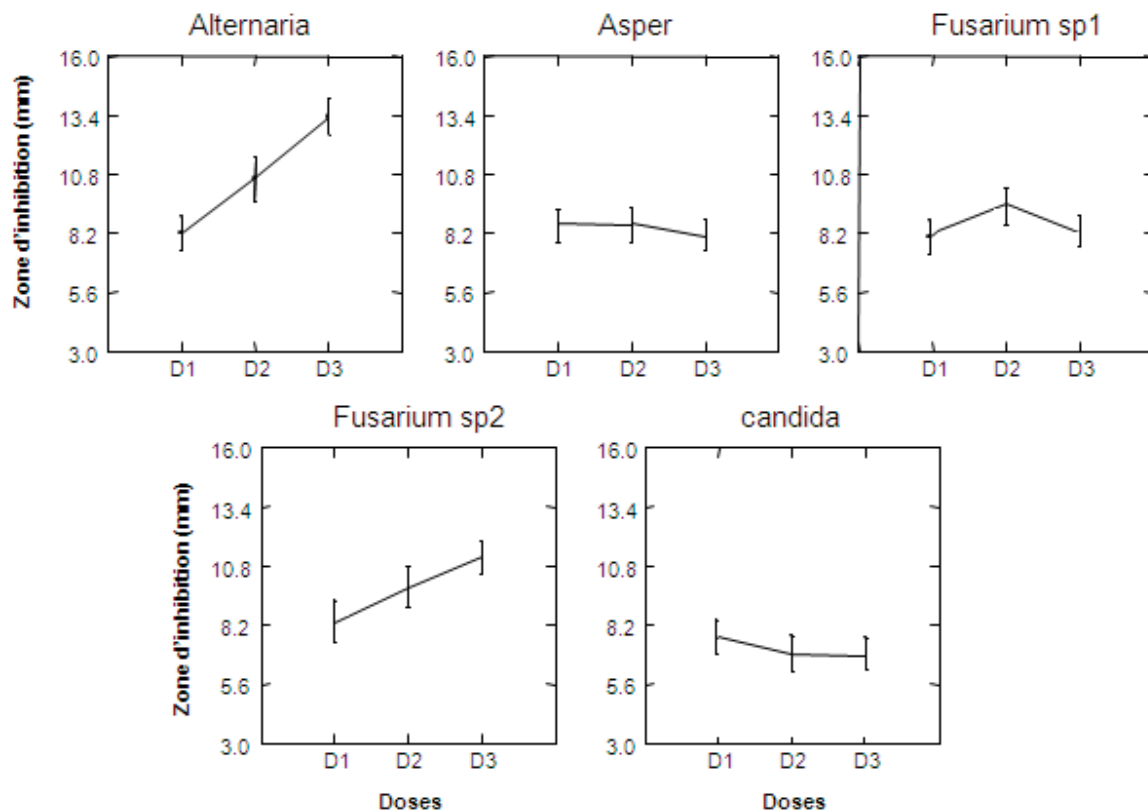


Figure 11 : Effet comparé des doses des biopréparations à base d'huiles essentielles de *Cytisus sp.* Sur les différents champignons

III.3.2. Evaluation de l'activité bactéricide des huiles essentielles des feuilles de *Cytisus sp.* en fonction des stades phénologiques

L'étude du pouvoir antibactérien des biopréparations à base d'huiles essentielles de *Cytisus sp.* a été testée sur des bactéries pathogènes (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*) par confrontation gamme d'antibiotiques (Tétracycline, Piperacilline, Vancomycine et Streptomycine).

III.3.2.1. Tendance des zones d'inhibitions des bactéries sous l'effet des huiles essentielles

L'analyse en composantes principales, effectuée avec le logiciel PAST, à partir des valeurs des zones d'inhibitions des souches bactériennes est satisfaisante pour l'ensemble des paramètres étudiés dans la mesure où plus de 80% de la variance sont exprimés sur les 2 premiers axes (Fig. 12). La projection des valeurs des zones d'inhibitions en vecteurs à travers le premier axe 1 (52,12 %), montre une certaine disparité d'effet des différents traitements sur l'ensemble des bactéries pathogènes. Il ressort que les huiles essentielles de la phase de feuillaison (D1, D2 et D3), les huiles essentielles de la phase floraison (D1 et D2) et l'antibiotique Vancomycine paraient inhiber la croissance de *Staphylococcus*. En contraste, l'huile essentielle de la phase floraison appliquée à la dose D3, ainsi que les antibiotiques Streptomycine, Piperacilline et Tétracycline contrôlaient la croissance d'*E. coli*, de *Pseudomonas* et de *Bacillus*. Le contraste d'effet des différents traitements est vérifié par les valeurs positives et négatives du coefficient de corrélation de Pearson (Fig. 12 axe1).

En revanche, la projection des mêmes données à travers le deuxième axe (28,42 %) montre l'existence de deux assemblages de traitement qui présentent une similitude d'effet inhibiteur de la croissance des bactéries pathogènes. Il s'agit (i) l'huile essentielle de la phase de floraison (D1, D2 et D3), l'huile essentielle de la phase feuillaison (D3), Vancomycine et Streptomycine, (ii) l'huile essentielle de la phase feuillaison (D1 et D2), Piperacilline et Tétracycline. Cette similitude d'effet tendance est réconfortée par les valeurs du coefficient de corrélation de Pearson (Fig. 12 axe2).

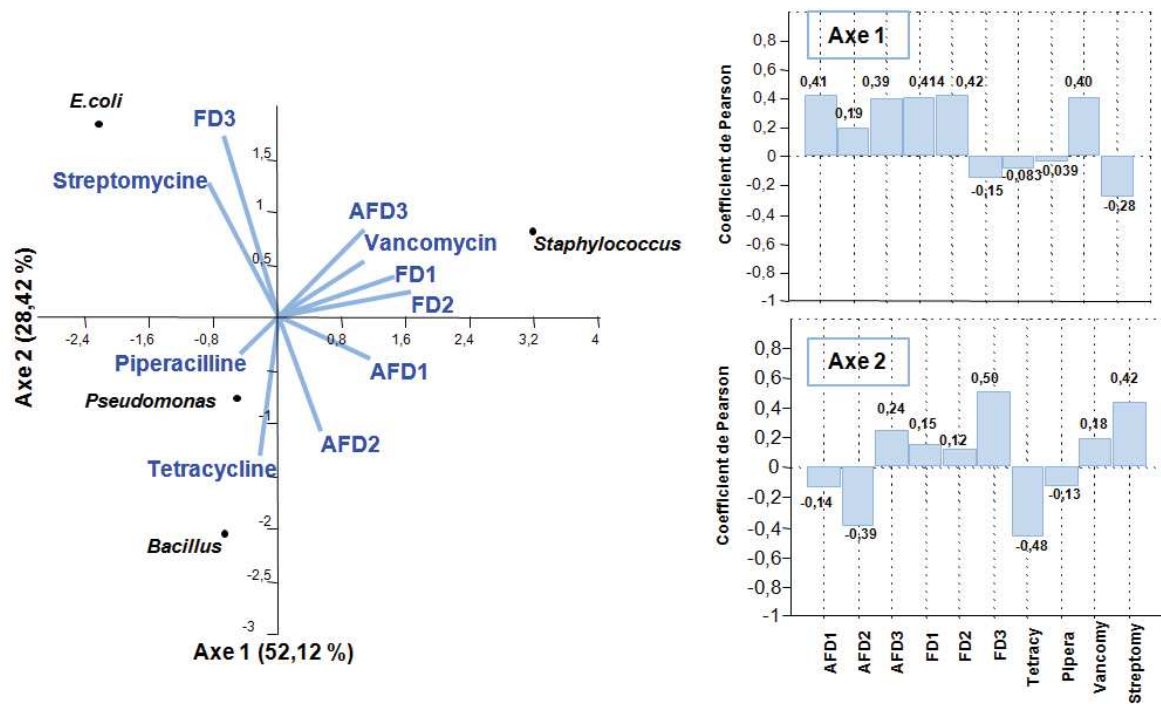


Figure 12: Projection des zones d'inhibition de la gamme bactérienne et antibiotiques sur les deux axes de l'A.C.P.

III.3.2.2. Etude comparée de l'effet des huiles essentielles de *Cytisus* sp sur la croissance bactérienne

Les résultats du test GLM obtenus de l'effet antibactérien des huiles essentielles de *Cytisus* sp et des antibiotiques sur les bactéries pathogènes présentent une nette sensibilité des souches testées aux antibiotiques par comparaison aux huiles essentielles (Fig. 13a).

Concernant l'effet des doses appliquées, l'analyse expose trois paliers générant des différences très significatives en termes d'efficacité. Le premier palier est représenté par les antibiotiques Piperacilline, Streptomycine et Tetracycline, il est secondé par les trois biopréparations à base d'huiles essentielles de *Cytisus* sp. et enfin l'antibiotique Vancomycine (Fig. 13b). En final, la bactérie pathogène *Staphylococcus* est la plus sensible aux différents traitements par rapport à *E. coli*, *Pseudomonas* et *Bacillus* (Fig. 13c).

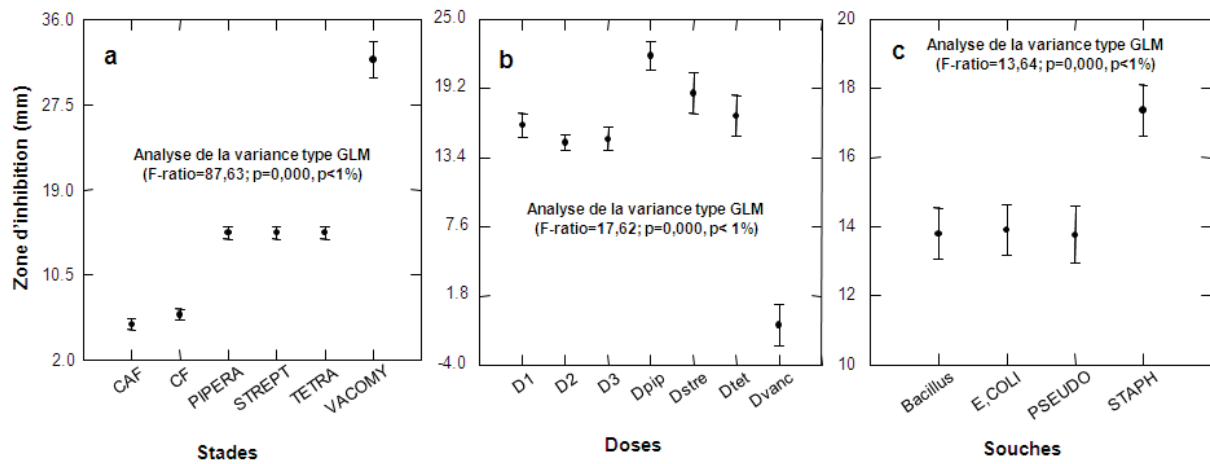


Figure 13 : Etude comparée de l'inhibition de la croissance mycélienne sous l'effet des biopréparations à base d'huiles essentielles de *Cytisus sp.* par confrontation aux antibiotiques

Chapitre IV : Discussion

Les métabolites secondaires sont un groupe de molécules qui interviennent d'une part dans l'adaptation de la plante à son environnement, et d'autre part, par la régulation des interactions plantes-animaux, en termes de défense contre les bioagresseurs. La production des substances secondaires azotées s'intensifie en générale au début du cycle végétatif, alors que la production de substances secondaires carbonées (comme les tannins) s'intensifie plus tard au cours du cycle végétatif. Dans ce contexte la présente étude est consacrée à l'étude de l'activité biocide à l'égard d'une gamme microbienne des huiles essentielles synthétisées chez la plante spontanée *Cytisus sp* de la région de Chréa pendant deux phases cruciales du cycle phénologique à savoir la feuillaison et la phase de floraison. Les résultats de l'activité biocide des huiles essentielles de *Cytisus sp*. Nous ont permis de dégager les hypothèses suivantes :

IV.1. Evaluation du rendement et caractérisation des huiles essentielles des feuilles de *Cytisus sp*. en fonction des stades phénologiques

Les huiles essentielles des deux stades phénologiques (feuillaison et floraison) de *Cytisus sp* extraites par hydrodistillation-entraînement à la vapeur ont exprimés des rendements de 0,9 % au stade feuillaison, et 0,7 % au stade pleine floraison.

La caractérisation des huiles essentielles par analyse CG-MS affichent une dominance en composés au profit de l'huile essentielle des feuilles issue de la phase de floraison (17 molécules) par rapport à l'huile essentielle issue de la phase feuillaison (11 molécules). Nous avons noté la présence d'une forte proportion des cétones dans le stade feuillaison(5.78%) et une forte présence des alcools monoterpéniques au stade floraison(25.01%).

Nos résultats supposent que les conditions environnantes affectent sensiblement le métabolisme en huiles essentielles ainsi que leurs compositions en composés chimiques. Cette hypothèse rejoint, les travaux de **Cosentino et al. (1999)**, qui estiment qu'à l'intérieur d'une même espèce végétale, on observe des variations chimiques (qualitatives et quantitatives), parmi les nombreux constituants d'une huile essentielle, l'un domine généralement ; on l'appelle composé majoritaire. En effet, sa composition chimique peut varier considérablement en fonction de plusieurs paramètres, La composition et le rendement des huiles essentielles peuvent varier selon l'âge, le cycle végétatif de l'organe.

La proportion des différents constituants de l'huile essentielle d'une espèce donnée peut varier au cours de son développement (**Croteau, 1986**).

Une menthe poivrée récoltée en début de floraison a une huile essentielle riche en néomenthol et en menthone tandis qu'en fin de floraison cette huile est riche en menthol (**Bruneton, 1987**).

IV.2. Evaluation de l'activité microbienne des huiles essentielles des feuilles de *Cytisus sp.* en fonction des stades phénologiques

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celles des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs. Elles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Pour les levures, elles agissent sur la biomasse et la production des pseudomycélium alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures.

Le principal facteur modulant le spectre d'activité des HE's est le type et la structure moléculaire des composants actifs présents dans les HE's ; ainsi *in vitro* on observe une activité antimicrobienne plus élevée des terpènes oxygénés en comparaison aux terpènes à hydrocarbures. La structure moléculaire semble présenter un rôle aussi important que le degré d'oxydation de la molécule de terpène : la caractéristique lipophile du squelette hydrocarboné ainsi que la propriété hydrophile des groupes fonctionnels sont déterminantes vis-à-vis de l'activité antimicrobienne des terpénoïdes (**Dormans et Deans; 2000**). Sur cette base l'ordre de l'activité antimicrobienne de ces composés est le suivant : Phénols > Alcools > Aldéhyde > Cétones > Oxydes > Hydrocarbure > Esters (**Ouraini et al, 2007 ; Bekhechi et al, 2008**). De ce qui est avancé dans l'énoncé, nous présentons ci-après les résultats de l'activité biologique des huiles essentielles de *Cytisus sp.*

IV.2.1. Evaluation de l'activité fongicide des huiles essentielles des feuilles de *Cytisus sp.* en fonction des stades phénologiques

D'après les résultats des zones d'inhibitions, il en ressort que l'huile essentielle de la phase floraison appliquées aux doses FD2 et FD3 contrôle mieux *Fusarium sp2*, et l'huile essentielle de la phase floraison appliquée à la dose FD1 contrôle mieux *Alternaria sp.*. Cette activité accrue à l'encontre d'un modèle biologique par rapport à un autre permet de dire que les composés des huiles essentielles ont pu être assimilés par le champignon et par conséquent, il en ressort l'effet biocide des huiles essentielles. L'hypothèse avancée corrobore avec les résultats de **Cox et al (2000)** dont ils stipulent que l'activité antifongique des HE's est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie de sa rupture entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la cellule.

Les composés terpéniques des HE's et plus précisément leurs groupements fonctionnel tels que les phénols et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique de la levure (**Glodani et Kaloastran , 2006**).

IV.2.2. Evaluation de l'activité bactéricide des huiles essentielles des feuilles de *Cytisus sp.* en fonction des stades phénologiques

Les résultats font ressortir que les zones d'inhibition étaient inférieures à celles des antibiotiques, qui ont montré des zones d'inhibition larges par rapport à celles obtenues en testant l'huile essentielle de *Cytisus sp.* Divers paramètres contribuent à expliquer cette différence d'efficacité entre les antibiotiques et les huiles essentielles, entre autres, la concentration (peut être exagérée dans les disques), le degré de pureté et la toxicité du principe actif.

Les mêmes résultats informent que les huiles essentielles de la phase de feuillaison (D1, D2 et D3), les huiles essentielles de la phase floraison (D1 et D2) et l'antibiotique Vancomycine paraient inhiber la croissance de **Staphylococcus**. En contraste, l'huile essentielle de la phase floraison appliquée à la dose D3, ainsi que les antibiotiques Streptomycine, Piperacilline et Tétracycline contrôlaient la croissance **d'E. Coli**, de **Pseudomonas** et de **Bacillus**. De même, les résultats exposent deux assemblages de traitement qui présentent une similitude d'effet inhibiteur de la croissance des bactéries pathogènes. Il s'agit (i) l'huile essentielle de la phase de floraison (D1, D2 et D3), l'huile essentielle de la phase feuillaison (D3), Vancomycine et Streptomycine, (ii) l'huile essentielle de la phase feuillaison (D1 et D2), Piperacilline et Tétracycline.

Ces résultats montrent une activité vis-à-vis des Gram positifs que les Gram négatifs. D'après **Nikaido (2003)**, ces résultats pourraient être dus à la composition de la membrane des bactéries Gram négatifs. En effet, ces dernières possèdent une membrane qui présente une perméabilité sélective; la surface des lipopolysacharides contient des charges négatives, qui empêchent la diffusion des molécules hydrophobes, et des porines qui bloquent le passage des molécules à haut poids moléculaire. **Pseudomonas aeruginosa** contient dans sa membrane des porines de faibles perméabilités. Contrairement aux Gram négatif, les bactéries à Gram positif se sont montrées plus sensibles. (**Garrett et Grisham, 2000**).

Conclusion générale et perspectives

La flore Algérienne est l'une des plus riches au monde et possède de nombreuses plantes utilisées en médecine traditionnelle. Les plantes médicinales sont utilisées depuis longtemps comme remède contre plusieurs maladies, elles constituent une source naturelle de molécules chimiques telles que les métabolites secondaires qui représentent une variété très large de composés organiques sans fonction directe dans la croissance et le développement des plantes.

Dans un premier temps, notre travail s'est consacré en une extraction et une caractérisation par CPG/MS des huiles essentielles de *Cytisus sp.* Dans le but d'identifier et de quantifier les constituants chimiques des huiles essentielles des phases phénologique de feuillaison et de floraison. La valeur du rendement en huile essentielle de la partie aérienne de *Cytisus sp.*, était de 0.9 % au stade feuillaison et 0.7% au stade floraison, et la CPG/SM a permis d'identifier 17 composés de la phase de floraison par rapport à l'huile essentielle issue de la phase feuillaison 11 molécules. Ces résultats ont pu mettre en évidence la variabilité de la composition chimique des huiles essentielles par rapport au stade phénologique. Egalement la prédominance des cétones au stade feuillaison et les alcools monoterpéniques pour le stade floraison.

Par la suite une étude de leur effet antimicrobien des HEs de *Cytisus sp* via l'évaluation de l'activité antibactérienne et de l'activité antifongique

Les huiles essentielles de la phase floraison appliquées aux doses FD2 et FD3 contrôle mieux *Fusarium sp2*, et l'huile essentielle de la phase floraison appliquée à la dose FD1 contrôle mieux *Alternaria sp.*. Cette activité accrue à l'encontre d'un modèle biologique par rapport à un autre permet de dire que les composés des huiles essentielles ont pu être assimilés par le champignon et par conséquent, il en ressort l'effet biocide des huiles essentielles

Aussi, les huiles essentielles de la phase de feuillaison (D1, D2 et D3), les huiles essentielles de la phase floraison (D1 et D2) et l'antibiotique Vancomycine paraient inhiber la croissance de *Staphylococcus*. En contraste, l'huile essentielle de la phase floraison appliquée à la dose D3, ainsi que les antibiotiques Streptomycine, Piperacilline et Tétracycline contrôlaient la croissance d'*E. coli*, de *Pseudomonas* et de *Bacillus*. De même, les résultats exposent deux assemblages de traitement qui présentent une similitude d'effet inhibiteur de la croissance des bactéries pathogènes. Il s'agit (i) l'huile essentielle de la phase de floraison (D1, D2 et D3), l'huile essentielle de la phase feuillaison (D3), Vancomycine et Streptomycine, (ii) l'huile essentielle de la phase feuillaison (D1 et D2), Piperacilline et Tétracycline.

A la base des résultats trouvés on peut prédire que nos huiles essentielles peuvent servir comme base de lutte biologique.

En perspective plusieurs travaux peuvent être envisagés dans la continuité des travaux entamés:

Il serait intéressant de mener des études complémentaires et plus approfondie sur *Cytisus sp* afin d'isoler, de purifier, et d'identifier les différents principes actifs pour la mise en valeur de cette plante. Une exploitation de leurs propriétés antimicrobienne en vers d'autre souches implique une recherche plus poussés de ses principes actifs;

Les travaux sur les différents compartiments de la plante peuvent se poursuivre afin de révéler de nouvelles molécules actives.

Élargir le spectre des activités biologiques ciblées, en incluant les activités anti-inflammatoire, insecticides ou autres;

Notre recherche suggère une potentialité d'activité antimicrobienne dans les produits naturels. Cette action sera évolué est mise en évidence par les différents tests microbiologiques comme la CMI (concentration minimal inhibitrice), la CMB(concentration minimal bactérienne) et la CMF(concentration minimal fongique)

La toxicité de cette plante n'a pas pu être évaluée dans ce travail, elle fera l'objet d'une étude ultérieure.

Les études in vivo des modèles animaux peuvent aussi être intéressantes dans l'approche d'une utilisation pratique des produits. Pour ces modèles animaux, il faudra orienter les recherches au niveau des infections fréquentes par les micro-organismes Gram positifs et Gram négatifs ainsi que les moisissures

AFNOR. (1986) Recueil des Normes Françaises (huiles essentielles), AFNOR, Paris, 57p.

AFNOR. (2000) Huiles essentielles, Monographies relatives aux huiles essentielles, Tome 2, 6ème édition, AFNOR, Paris.

Agnihotri S. Khatoon M. (2003) Shanta. Pharmacognostic evolution of an antioxidant plantacorus calamus linn Nat. Prod. Sci. 9(4) : 264-269.

Aourahoun K., Fazouane F. et Benayache S. The essential oil composition of *Cytisus triflorus* l'hérit : 276-279.

Anonyme. (2016) (Page consultée le 1/06/2016). [en ligne]. Adresse URL : [<http://www.parcnationalchrea.dz/>]

Anton R. et Lobskin A. (2005). Plantes Aromatiques. Epices, Aromates, Condiments et huiles essentielles, Tec et Doc, Paris, 522p.

Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A. et Witier P. (1995) "Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse." Ed. Masson, Paris.

Assous M-R., Basse- Guérineau A-L., Bourhy R-D., et Paugam A. (1999) Microbiologie et Pathologie Infectieuse. 2eme Edition. Ed. De Boeck Université. 979p.

Baba aissa F. (2011) ENCYCLOPEDIE des plantes utiles (Maghreb, Europe méridionale): Flore Méditerranéenne, Substance végétale d'Afrique, d'Orient et d'Occident. Ed. EL Maarifa. 471p.

Babar A. M., Hahn E.J., Paek K.Y. (2007) Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor Root Suspension Cultures. *Molecules*, 12: 607-621.

Bahorun T. (1997) Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Food and agricultural resarch council, Réduit, Mauritus : 83-94.

Baser K.H.C. et Buchbauer G. (2010) Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications, CRC Press NW. 48p.

Bekhechi C., Attk- Bekkara F. et Abdelouhib D.E. (2008) Composition et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *organum glandulosum* d'Algérie-phytothérapie. 6 : 153-159.

Belkou., Beyoud E. et Talebbah M. (2005) Approche de la composition biochimique de la menthe verte (*mentha spicata* Z) dans la région d'Ouargla. Univ, Ouargla : 7-8.

Benghanou M. (2012) La phytothérapie entre la confiance et méfiance. Mémoire professionnel infirmier de la sante publique, institut de formation paramédical CHETTIA (Alger). 56p.

Benkiki N. (2006) etude phytochimique des plante médicinal algériennes : ruta montana, matricaria pubescens et hypericum perfoliatum-these de doctoret ; université El-hadj-lakhdar.batna.

Bourkhiss M., HNACH M., Bourkhiss B., OUHSSINE M.et CHAOUCH A. (2007) composition chimique et propriété antimicrobiennes de l'huile essentiel extradite des feuilles de tetraclinis articulate du MAROC, Afrique science ,3(2) :232-242.

Bouzouita N., kachouri F., ben hlima M et chaabouni mm. (2008) composition chimique et activité antioxydant, antimicrobienne et insecticides de l'huile essentielle de juniperus phoenicea, j Soc.Chim Tunis., 10 :119-125.

Bonzi-Coulibaly Y., Bado J., N'Guessan YT Sib SF. (1997) Effet des facteurs de variabilité du rendement et de la composition chimique d'huiles essentielles de plantes aromatiques: Cas d'*Eucalyptus camaldulensis* en zone soudano-sahélienne. *J. Soc. Ouest-Afri.Chim.*, 3: 55-67.

Bottin L. (2006) Déterminants de la variation moléculaire et phénotypique d'une espèce forestière en milieu insulaire: cas de *Santalum austrocaledonicum* en Nouvelle-Calédonie, *Montpellier*.

BRUNETON J. (1987) Éléments de Phytochimie et de Pharmacognosie., Tec. et Doc. Lavoisier, Paris. 230p.

Bruneton J. (1999) Pharmacognosie, photochimie, plante médicinales. EDITION technique et documentation, 3eme Edition Lavoisier, paris.1120p.

Bruneton J. (1993) Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales, Tec & Doc, Lavoisier, Paris. 915p.

Bruts: in Richard H. et Cavalli J.F. (2002) Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar, *Thèse université de Corse Pascal Paoli. Aromates &épices, Tec. &Doc. Lavoisier, Paris, : 17-69*

Burt S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 223-253.

Cavalli J.F. (2002) Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar, Thèse de doctorat. 3p.

Chebili S. (2011) ETUDE COMPARATIVE DES METHODES D'EXTRACTION DES ALCALOIDES DE LA PLANTE MEDICINALE CYTISUS TRIFLORUS l'Hérit. Le 2ème Séminaire International sur les Plantes Médicinales SIPM'2 Ouargla 43p.

Cosentino S., Tuberoso C.I.G., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E. and Palmas F. (1999) In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils, Letters in Applied Microbiology: 130-135.

Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.F., Warmington J.R. et Wyllie S.G. (2000) the mode of antimicrobial action of the essential oil of Malaleuca Alternifolia (tee tree oil), Journal of Applied Microbiology: 170-175.

Crouteau F. (1986) Biochemistry of monoterpenes and sesquiterpenes of the essential herbs: spices and medicinal plants, Recent advances in botany, horticulture and pharmacology. Vol., 1, Craken, Simon, Oryx Press, Phoenix.

Dai J. et Mumper R. J. (2010) Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxydant and Anticancer Propertes. *Molécules* 15(10), 73 :13-52.

Daroui-Mokaddem H. (2011) Etude phytochimique et biologique des espèces : *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae), *Smyrniium olusatrum* (Apiaceae), *Asteriscus maritimus* et *Chrysanthemum trifurcatum* (Asterarceae). Thèse de Doctorat. Option : Biochimie appliquée. Université Badji-Mokhtar, Annaba.

Davidson P.M. (1997) Methods for testing the efficacy of food antimicrobial, Food Technology : 148-155.

Delille L. (2007) Les plantes médicinales d'Algérie. Édition BERTI. Alger, 122
Lorraine BOTTIN Déterminants de la variation moléculaire et phénotypique d'une espèce forestière en milieu insulaire : cas de Santalum austrocaledonicum en Nouvelle-Calédonie, Montpellier. (2006).

Deroin T. (1988) Biologie florale d'une Annonaceae introduite en Cote D'Ivoire : Cananga diagnosis and epidemiology of fungal infections: 249-257.

Dorman H.J.D. et Deans S.G. (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. - *J. Appl. Microbiol.* 88 : 308-316.

Dunstan H., Florentine S. K., Calvino-Cancela M., Westbrook M.E et Palmer G. C. (2013) Dietary characteristics of Emus (*Dromaius novaehollandiae*) in semi-arid

New South Wales, Australia, and dispersal and germination of ingested seeds. CSIRO PUBLISHING, 113: 168-176.

Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray - Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C. (2008) Phenolics composition of *Cynara carunculosa* L. organs, and their biological activities .C. R. Biologies. 331: 372-379.

Galloni M. et Cristofolini G. (2003) Floral rewards and pollination in *Cytisaceae* (Fabaceae). *Plant Systematics and Evolution* 238: 127-137.

Galloni M., Podda L., Vivarelli D., Quaranto M. et Cristofolini G. (2008) Visitor diversity and pollinator specialization in Mediterranean legumes. *Flora* 203: 94-102.

Garrett R.H. et Grisham Charles M. (2000) Les transports membranaires. In *Biochimie*. Ed De Boeck.314p.

Garnero M.J. (1977) Problèmes rencontrés au cours de l'étude de la composition Chimique des huiles essentielles *in* Parfumes cosmétiques, arômes : 31-40.

Gomez-Caravaca A.M., Gomez-Romero M., Arraez-Roman D., Segura-Carretero A. et Fernandez-Gutierrez A. (2006) Advances in the Analysis of Phenolics compounds in Products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41: 1220-1234.

Guignard J. L. (2000) Biochimie végétale. 2ème édition. *Edition Dunod*, Paris, : 198-207.

Guinoiseau E. (2010) Molécules, antibactérienne issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de Doctorat de l'Université de Corse, option : Biochimie- Biologie moléculaire, France. 50p.

Hellal Z. (2011) Des propriétés antibactériennes et antioxydants de certaines huiles essentielles extraites des Citrus Application sur la sardine (*Sardina Pilchardus*). Magistère, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou : 1-8-45-78.

Hammer KA., Carson CF. et Riley TV. (1999) Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 86: 985–990.

Hammer Ø., Harper D.A.T. et Ryan P.D. (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis, *Palaeont. Electron.* 4(1):9, [http://palaeoelectronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm].

HOPKINS. et WILLIAM G. (2003) Physiologie végétale de bock université 2ème édition : 276-268.

Iserin P., Masson M., Restellini J. P., YBERT E., DE LAAGE DE MEUX A., Moulard F., Zha E., De la Roque R., De la Roque O., Vican P., Deelesalle -Feat T., Biaujeaud M., Ringuet T .J., Bloth J. et Botrel A. (2001) Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins. 2^{ème} édition de VUEF, Hong Kong. 335p.

Joy Bowes E. (2003) the chemistry of Aroma therapeutic Oils, 3rd Edition, 56p.

Kartal N., Sokmen M., T epe B., Daferera D., Polissiou M. et Sokmen A. (2007) Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*. 100: 584–589.

KURITA N., MIYAJI M., KURANE R. et AL. (1979) Antifungal activity and molecular orbital energies of aldehyde compounds from oils of higher plants. *Agric Biol Chem* 43: 23 .65-71.

Lahlou M. (2004) Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils, *Phytotherapy Research* : 435-448.

Laib I. (2010) Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula Officinalis* sur les moisissures des légumes secs. Option : Technologie alimentaire. Université Mentouri Constantine. : 44-52

Lansing M., Prescott J., Harley P. et Klein DA. (2003) Microbiologie. 2^{ème} Edition française : De Boeck. 1164 p.

Legrand G. (1993) Manuel de préparateur en Pharmacie, Masson, Paris.
Franc homme, P., D. Phénol, et al. (1990). "Clefs pour l'aromathérapie. La molécule aromatique: matière, énergie, information". *L'aromathérapie exactement*. R. J. Editeur. Limoges. 2 : 73-227.

Luque de Castro M. D., Jiménez-Carona M. D. et Fernandez-pérez V. (1999) Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from Plants. *Trends in analytical chemistry*. Vol : 18 (11): 708.

Mann J. (1987) Secondary metabolism, Clarendon Press, Oxford. 374p.

Martinetti P. (2013) Mon guide des huiles essentielles, Ed. Lanore : 5-6.

Mohammedi Z. (2006) « Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelque plantes de la région de Tlemcen » ; thèse de magister ; université Abou bakr belkaid-Tlemcen .

Moro Buronzo A. (2008) Le Grand Guide Des Huiles Essentielles: Santé, Beauté, Bien être; Ed : HACHETTE PRATIQUE : 14- 43.

Mutai C. et Raoult R. (2009) La préparation : mode d'emploi (officine, sous-traitance et BP). 2eme édition. Porphyre France. 468p.

Nedjmi A., Aichouche S. (2014) Caractérisations biochimiques de quelques plantes spontanées médicinales à travers des différents modes de séchage. 35p. mémoire master.

Nekaido C., Anderson L. and Phillips on J. (2003) Herbal Medicines. A Guide for Health Care Professionals. London: The Pharmaceutical Press.

Ouibrahim A. (2014) Evaluation de l'effet antimicrobien et antioxydant de trois plantes aromatiques (*Laurus nobilis* L., *ocimum basilicum* L. et *Rosmarinus officinalis* L) de l'Est Algérien. These Doctorat, UNIVERSITE BADJI MOKHTAR – ANNABA. 81p.

Ourini D., Agouni A., Alaoui Ml., Alaoui K., Alaoui MA et Belabbas MA. (2007) Activité antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de thymus saturjoïdes L. et de mentha puleguim L. comparé aux antifongiques dans les dermatoses nyosiques. *Phytothérapie*. 1 : 6p.

Paolini J. (2005) Caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM-(IE et IC) et RMN du carbone 13 de *Citrus albidus* et de deux *Asteracea* endémiques de corse : *Eupatorium* subsp. *Corsicum* et *Doronicum Corsicum*. Thèse doctorat.

Pelt J. M. (1980) Les drogues, leur histoire et leurs effets. Édition Dion, Paris, 221p.

Paul Iserin et al. (2001) Encyclopédie des plantes médicinales, 2ème édition, ,267p.

Pellecuer J., Roussel J.L. et Andary C. (1980) Recherche du pouvoir antifongique de quelques huiles essentielles, Rivista Italiana Essenzo (EPPOS). 23 :45-50.

Quezel P. et Santa S. (1962) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I, édition du centre national de la recherche scientifique, Paris (France) : 11- 251.

Remdane F. (2009) Analyse et caractérisation de quelques métabolites secondaires de la plante *Nauplius gravolens* (Shousb) de Tamanrasset. Thèse de magister, université Kasdi Merbah d'Ouargla : 16-88.

Richard H. et Peyron F. (1992) Epices et aromates, Ed .Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 339p.

Rouessac F., Rouessac A., Brooks S. (2007) Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques, Ed. John Wiley and Sons, 31p.

Roulier G. (2000) Les huiles essentielles pour votre santé, Ed. Dangles, 336p.

Sarni-Manchado P. et VERONIQUE C. (2006) Les polyphénols en agroalimentaires. Collection sciences et techniques agroalimentaires, édition TEC et DOC, Paris (France): 398p.

Sauvion N. calatayud.p, thiery, de et marion-poll.f interaction insecte-plant, ED quae, 743p.

Sivropoulou A., Papanikolaou E., Nikolaou C., Kokkini S., Lanaras T. and Arsenakis M. (1996) Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils. J. Agric. Food Chem. 44 :1202-1205.

Suzuki N. (2003) Significance of flower exploding pollination on the reproduction of the Scotch broom, *Cytisus scoparius* (Leguminosae). Ecological research 18: 523-532.

S.P.S.S. Inc. (2009) SYSTAT 12 for Windows, statistics and graphics.

Ter Braak C. J. F. et Prentice I. C. (1988) A theory of gradient analysis. *Advances in ecological research* 18: 271-317.

Tsuchiya H., Sato M., Miyazaki T., Fujiwara S., Tanigaki S., Ohyama M., Tanaka T. et Linuma M. (1996) Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J.Ethnopharmacol. 50: 27-34.

Wendakoon CN. et Sakaguchi M. (1995) Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *J Food Prote*, 58: 280-283.

Ziming W., Lan D., Tiechun L., Xin Z., Lu W., Hanqi Z., Li L., Ying L., Zhihong L., Hongju W., Hong Z. et Hui H. (2005) Journal of chromatography A, 1102 (2006):11-17

Zrira S., Benjilali B. et Lamaty G. (1995) Effet du séchage à l'air libre des feuilles d'*E. Camaldulensis* sur le rendement et la composition de l'huile essentielle. *Actes Inst. Agron. Vet.*, 15(4): 27-35