



UNIVERSITÉ DE BLIDA 1

Faculté des Sciences de la nature et de la vie

Département de Biotechnologie et Agro-écologie



MÉMOIRE DE MASTER

En Sciences Agronomiques

Spécialité : Phytopharmacie et Protection des Végétaux

Effet des extraits phénoliques des cyprès sur le développement de *Pseudomonas aeruginosa*

Par

BENHAMADI Meriem

Devant le jury composé de :

ALLAL-BENFEKIH L.	Professeur	Université Blida 1	Présidente
BENRIMA A.	Professeur	Université de Ghardaïa	Promotrice
DEGAÏCHIA H.	Docteur	Université Blida 1	Co-promoteur
DJEMAÏ	MCB	Université Blida 1	Examinatrice
MOUALHI N.	Doctorante	Université Blida 1	Invitée d'honneur

BLIDA, Juillet 2021.

RESUME

Effet des extraits phénoliques des cyprès sur le développement de Pseudomonas aeruginosa

Ce travail vise à rechercher des constituants chimiques « les métabolites secondaires » et d'évaluer *invitro* l'activité antibactérienne des extraits organiques, préparés à partir des feuilles de *Cupressus sempervirens* L. et *Cupressus arizonica* L. vis-à-vis d'une souche bactérienne pathogène *pseudomonasaeruginosa*.

C. sempervirens et le *C. arizonica* renferment d'importance qualité en métabolites secondaires, qui constitue la base scientifique de l'utilisation thérapeutique des feuilles étudiés.

Le criblage phytochimique a révélé la présence de divers métabolite secondaire : Leucoanthocyanes, Flavonols, Flavonones, Anthraquinones, Tannins catéchiques, Tannins galliques, Stéroïdes, Terpènes, Saponin, Cardiac glycosides, Terpénoides, Saponosides et les Quinones libres. La présence de ces métabolites secondaires est en étroite relation avec la polarité des solvants utilisés. En effet le méthanol aqueux (de faible polarité) permet l'extraction de la majorité des métabolites cités. Le meilleur rendement d'extraction des trois solvants utilisés, est le chloroforme avec un rendement d'extraction moyen de 61.23% (pour *C. sempervirens*) et 52.27% (pour *C. arizonica*), suivi par le solvant hydro-alcoolique 33.55% et d'éthérique avec 0.39%. Nos resultats indiquent que l'extraction hydro-alcoolique induit une sensibilité tres pronancée de *P. aeruginosa* avec un diametre de 16,20 mm pour *C. arizonica*. Les extraits éthériques et chloroformiques induisent une inhibition relativement faible.

P. aeruginosa est extrêmement sensible vis-à-vis de l'extrait hydro-alcoolique de *C. sempervirens* où l'organisme test est considéré comme extrêmement sensible avec une zone d'inhibition de l'ordre de 19,95 mm

Mots clés : *Cupressus sempervirens*, *Cupressus arizonica*, phytochimie, criblage, *Pseudomonas aeruginosa*, inhibition.

ABSTRACT

Effect of phenolic extracts from cypress trees on the development of Pseudomonas aeruginosa.

This work aims to search for chemical constituents "secondary metabolites" and to evaluate in vitro the antibacterial activity of organic extracts, prepared from the leaves of *Cupressus sempervirens* L. and *Cupressus arizonica* L. against a pathogenic bacterial strain, *Pseudomonas aeruginosa*.

C. sempervirens and *C. arizonica* contain high quality secondary metabolites, which form the scientific basis for the therapeutic use of the leaves studied.

Phytochemical screening revealed the presence of various secondary metabolites: Leucoanthocyanins, Flavonols, Flavonones, Anthraquinones, Catechic tannins, Gallic tannins, Steroids, Terpenes, Saponin, Cardiac glycosides, Terpenoids, Saponosides and Quinones.

The presence of these secondary metabolites is closely related to the polarity of the solvents used.

In fact, aqueous methanol (of low polarity) allows the extraction of the majority of the metabolites mentioned. The best extraction yield of the three solvents used is chloroform with an average extraction yield of 61.23% (for *C. sempervirens*) and 52.27% (for *C. arizonica*), followed by the hydro-alcoholic solvent 33.55% and etheric with 0.39%. Our results indicate that the hydro-alcoholic extraction induces a very pronounced sensitivity of *P. aeruginosa* with an inhibition diameter of 16.20 mm for *C. arizonica*. Ethereal and chloroform extracts induce relatively weak inhibition.

P. aeruginosa is extremely sensitive to the hydro-alcoholic extract of *C. sempervirens* where the test organism is considered extremely sensitive with an inhibition zone of around 19.95 mm

Key words: *Cupressus sempervirens*, *Cupressus arizonica*, phytochemistry, screening, *Pseudomonas aeruginosa*, inhibition.

ملخص

تأثير المستخلصات الفينولية من أشجار السرو على تطور الزائفة الزنجارية . *Pseudomonas aeruginosa*

يهدف هذا العمل إلى البحث عن المكونات الكيميائية "المستقلبات الثانوية" وتقييم النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلصات العضوية المحضرة من أوراق *Cupressus sempervirens* L. و *Cupressus arizonica* L. مقابل سلالة بكتيرية ممرضة ، *Pseudomonas aeruginosa* .

يحتوي *C. sempervirens* و *C. arizonica* على مستقلبات ثانوية عالية الجودة ، والتي تشكل الأساس العلمي للاستخدام العلاجي للأوراق المدروسة.

كشفت الفحص الكيميائي النباتي عن وجود مستقلبات ثانوية مختلفة: *Leucoanthocyanols* و *Flavonols* و *Flavonones* و *Antraquinones* و *Catechic tannins* و *Gallic tannins* و *Steroids* و *Terpenes* و *Saponin* و *Cardiac glycosides* و *Terpenoids* و *Saponosides* و *Quinones*.

يرتبط وجود هذه المستقلبات الثانوية ارتباطاً وثيقاً بقطبية المذيبات المستخدمة.

في الواقع ، يسمح الميثانول المائي (ذو القطبية المنخفضة) باستخراج غالبية المستقلبات المذكورة. أفضل عائد استخلاص للمذيبات الثلاثة المستخدمة هو الكلوروفورم بمتوسط إنتاجية استخلاص *C. sempervirens* (ل) 61.23% و *C. arizonica* (ل) 52.27% ، يليه المذيب المائي الكحولي 33.55% والإثيري بنسبة 0.39%. تشير نتائجنا إلى أن الاستخراج المائي الكحولي يؤدي إلى حساسية شديدة الوضوح لـ *P. aeruginosa* بقطر تثبيط يبلغ 16.20 مم لـ *C. arizonica*. تحفز مستخلصات الأثيرال والكلوروفورم على تثبيط ضعيف نسبياً.

P. aeruginosa حساس للغاية للمستخلص المائي الكحولي من *C. sempervirens* حيث يعتبر كائن الاختبار حساساً للغاية مع منطقة تثبيط تبلغ حوالي 19.95 مم

الكلمات الأساسية: *Cupressus arizonica* ، *Cupressus sempervirens* ، الكيمياء النباتية ، الفرز ، ، *Pseudomonas aeruginosa* تثبيط.

REMERCIEMENTS

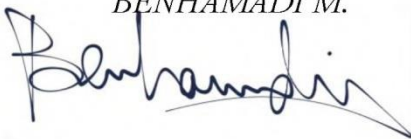
En premier lieu, je tiens à remercier DIEU, pour le courage, la patience et la santé qu'il m'a donnée afin de mener ce projet a terme.

J'exprime toute ma reconnaissance à ma promotrice, **Pr. BENRIMA A.** ainsi qu'au **Dr. DEGAÏCHIA H.** pour m'avoir supervisée directement, tout en me laissant une grande marge de manœuvre et de liberté pour gérer mon projet. Ils ont toujours été présents et disponible quand cela s'avérait nécessaire.

Mes remerciements vont également vers le **Pr. ALLAL-BENFEKIH L.** et le **Dr. DJEMAÏ I.** qui ont acceptés d'examiner ce modeste travail. La contribution de leurs compétences enrichira certainement le débat, nous en sommes plus que convaincus.

Je remercie également **Dr. MOUALHI N.** qui grâce à elle, ce projet a pu voir le jour, elle m'a toujours guidée, aidée et cru en moi même dans mes moments de doutes. Je la remercie pour ces qualités humaines, ça gentillesse et ton sens de professionnalisme. Qu'elle trouve ici l'expression de ma parfaite considération.

Je remercie tous mes enseignants et mes camarades de laboratoire qui m'ont soutenues et épaulées.

BENHAMADI M.




Dédicace

Je tiens à dédier ce modeste travail :

** A mes très chers parents GHOUTI et HABIBA **

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

Puisse Dieu, le très haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

** A ma chère sœur KHADIDJA **

** A mes chers frères MOHAMED et ABD EL JALIL **

En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.

** A tous mes collègues et ami(e)s **

À ma chère tante BENHAMADI SAKINA et mon cher oncle OULD EL SEDDIK MOHAMED qui ont toujours été là pour moi.

A mes sœurs SAMIRA et NACERA

Et toute la famille BENHAMADI.

Meriem



TABLE DES MATIERES

RESUME

ABSTRACT

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION -----	1
CHAPITRE I_ RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE -----	2
PARTIE 1 : Le Cyprès (<i>Cupressus</i>)-----	2
I. Généralité sur le Cyprès -----	2
I.2 Répartition géographique -----	3
I.3. Habitat et écologie -----	5
I.4. Cyprès sempervirent -----	6
I.5. Cyprès de l' Arizona-----	8
I.6. Métabolites secondaires des plantes -----	9
PARTIE 2 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -----	11
II. Généralité sur les <i>Pseudomonas</i> -----	11
II.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -----	13
II.1.1. Taxonomie -----	15
II.1.2. Habitat et distribution environnementale -----	16
II.1.3. Résistance aux antibiotiques -----	16
PARTIE 3 : Les composés phénoliques -----	18
1. Généralité-----	18
2. Distribution -----	19
3. Biosynthèse -----	19
3.1. Voie de l'acide shikimique : -----	20
3.2. Voie de l'acétate / malonate-----	20
4. Classification -----	20
5. Les flavonoïdes-----	21
5.1. Classification des flavonoïdes -----	22
5.2.1. Les tanins hydrolysables-----	23
5.2.2. Les tanins condensés -----	24
5.3. Coumarines -----	24

5.4. Les anthocyanes-----	24
5.5. Lignanes-----	25
5.6. Les stilbènes -----	25
5.7. Quinones -----	25
6. Les propriétés physico-chimiques -----	25
7. Activités biologiques de certains composés phénoliques -----	26
7.1. Activités antioxydant des composés phénoliques et des flavonoïdes -----	26
8. Rôles des polyphénols dans les plantes -----	27
CHAPITRE II :MATERIEL & METHODES -----	28
1. Matériel-----	28
1.1. Matériel végétal -----	28
1.2. Souche bactérienne -----	29
2. Méthodes -----	29
2.2. Extraction des polyphénols -----	29
2.3. Préparation des extraits bruts -----	30
2.3.1 Extrait végétal hydro-alcoolique -----	30
2.3.2. Extrait étherique -----	30
2.3.3. Extrait chloroformique-----	30
2.4. Rendement d'extraction-----	31
2.5. Screening phytochimique-----	32
a- Flavonoïdes -----	32
• Teste de bate-smith (teste de flavan-3,4-diols)-----	32
• Teste de Wilstater (teste de flavonols et flavonones) -----	32
b- Tannins -----	33
c- Saponosides-----	33
d- Anthraquinones -----	33
e- Saponines -----	33
f- Quinones libres -----	33
g- Terpénoïdes-----	33
h- Glycosides cardiaques-----	34
3. Evaluation de l'activité antibactérienne -----	34
3.1. Méthode de diffusion sur disques -----	34
• Ensemencement-----	34

• Lecture -----	34
4. Traitement statistique des données :-----	35
CHAPITRE III: RESULTATS & DISCUSSION -----	36
1. Rendement des extraits-----	36
2. Screening phytochimique : -----	38
3. Effet des extraits phénoliques de <i>C. sempervirens</i> et <i>C. arizonica</i> sur le développement de <i>P. aeruginosa</i> -----	39
CONCLUSION & PERSPECTIVES -----	42
ANNEXE : ANALYSES STATISTIQUES-----	44
ANOVA à 1 facteur (Zone d'inhibition) -----	44
ANOVA à 1 facteur (Rendement)-----	44
Test d'échantillons indépendants (Test de Student)-----	45
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -----	44

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Classification détaillée de l'ordre de cupressales -----	3
Figure 2 : Présence du cyprès vert en zone méditerranéenne-----	7
Figure 3 : Présence de cyprès d'Arizona en zone méditerranéen -----	8
Figure 4 Morphologie et mobilité de <i>P. aeruginosa</i> -----	13
Figure 5: Structure du noyau phénol. -----	19
Figure 6 : Structure de base de flavonoïde -----	22
Figure 7: Feuille de <i>Cupressus</i> -----	29
Figure 8:Schéma d'extraction des polyphénols (Originale, 2021)-----	31
Figure 9:Traitement des photos par le logiciel Digimizer des zones d'inhibition -----	35
Figure 10: Rendement d'extraction des extraits phénoliques-----	36
Figure 11 : Variation du diamètre de la zone d'inhibition selon la plante et le solvant-----	39
Figure 12 : Répartition des extraits issu de <i>C. arizonica</i> en groupes homogènes selon leurs effets sur l'inhibition de <i>P. aeruginosa</i> -----	41
Figure 13: Répartition des extraits issu de <i>C. sempervirens</i> en groupes homogènes selon leurs effets sur l'inhibition de <i>P. aeruginosa</i> -----	41

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Taxonomie de <i>P. aeruginosa</i>	15
Tableau 2 : Les principales classes des composés phénoliques	21
Tableau 3 : Activités biologiques de certains composés phénoliques.....	26
Tableau 4: Sensibilité et degré d'activité selon le diamètre d'inhibition	35
Tableau 5 : Screening phytochimique de <i>Cupressus arizonica</i> et <i>Cupressus sempervirens</i> selon la nature du solvant.....	38
Tableau 6 : Sensibilité de <i>P. aeruginosa</i> vis-à-vis des extraits phénoliques de <i>C. sempervirens</i> et <i>C. arizonica</i>	40

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les remèdes et les traitements naturels sont uniquement composés d'ingrédients issus de la nature. L'homme sait depuis des millénaires utiliser les plantes pour se soigner naturellement mais l'arrivée de la médecine moderne a fait disparaître certains traitements naturels qui s'avèrent pourtant tout aussi efficaces.

Les traitements naturels se révèlent être également très efficaces pour bon nombre de problèmes, selon L'OMS, 80% des populations vivants dans les pays en développement sont tributaire de la médecine traditionnelle pour leurs besoins en soin de santé **(EKoumou., 2003)**

Aujourd'hui, on estime que les principes actifs provenant des végétaux représentent environ 25% des médicaments prescrits. Soit un total de 120 composés d'origine naturelle provenant de 90 plantes différentes. Sur les milliers d'espèces de plantes à usage thérapeutique répertoriées en Algérie, très peu sont celles qui ont été valorisées sur le plan phytochimique **(Djahra, 2014)**.

Les cyprès sont des conifères de taille moyenne représentant, à travers une vingtaine d'espèces, affilié à la famille des Cupressacées, originaires des régions méditerranéennes. Il est considéré comme un arbre médicinal, largement utilisée en médecine traditionnelle, ou ses feuilles séchées sont utilisées pour le soulagement des douleurs à l'estomac ainsi que pour traiter le diabète et ses fruits séchés sont utilisés pour traiter les inflammations, le mal aux dents...etc **(Selim et al., 2014)**.

L'objectif de notre travail vise à faire une analyse qualitative (un screening phytochimique) des métabolites secondaires existants dans la partie aérienne de ces deux plantes afin d'évaluer in vitro l'activité antibactérienne contre les *pseudomonas*.

Notre travail s'articule autour de deux principales parties, à savoir :

- La première partie, est d'ordre bibliographique divisée en trois chapitres ; le premier est consacré à des données générales sur les deux plantes de Cyprès, le deuxième chapitre est réservé aux composés phénoliques et le dernier chapitre ...
- La seconde partie nous proposons l'étude phyto-chimique préliminaire et l'évaluation de l'activité antibactérienne afin de déterminer l'efficacité des extraits polyphénoliques vis-à-vis *pseudomonas aeruginosa*.

Nous clôturons notre étude par une conclusion générale et des perspectives.

CHAPITRE I

RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE 1 : Le Cyprès (*Cupressus*)

I. Généralité sur le Cyprès

La famille des Cupressacées est représentée par les genres *Cupressus* (cyprès), *Juniperus* (genévrier) et *Thuja* (thuya). (INRA PACA, 2011).

Selon Shahali et al., (2010), c'est la plus répandue de toutes les familles de gymnospermes. C'est la plus cosmopolite avec dix genres dans chaque hémisphère, mais la plupart des espèces se trouvent dans l'hémisphère nord. Par ailleurs, la distribution de cette famille est sous l'influence de facteurs divers : climat, sol, perturbations (catastrophes naturelles, exploitation humaine), etc (Bouyahyaoui, 2017 ; Sebbane et Khaldi, 2019).

Les plantes de cette famille possèdent les feuilles opposées, verticillées et étroitement imbriquées, aciculaires ou squamiformes, et a appareil reproducteur mâle en forme de petit cône et appareil reproducteur femelle de plusieurs types, bractées et écailles totalement ou presque concrescentes en une pièce unique de 1-20 ovules, cône mûr ligneux, à écailles anguleuses formant écusson à l'extérieur, contiguës par leur marge. Elles contiennent des matières résineuses, et un principe amer, et fournissent des extraits employés en médecine. Leur bois est souvent utilisé dans l'industrie (Sebbane et Khaldi, 2019).

I.1. Classification systématique des Cupressacées

Les Cupressaceae comprennent deux sous-familles : les Cupressoideae et les Callitroideae, chacune se divise en trois tribus (Haluk et Roussel, 2000 ; Sebbane et Khaldi, 2019), 162 espèces réparties en 32 genres. Ce sont des arbres ou arbustes, monoïques en général, avec ramification opposée ou verticillée par 3 (Sebbane et Khaldi, 2019).

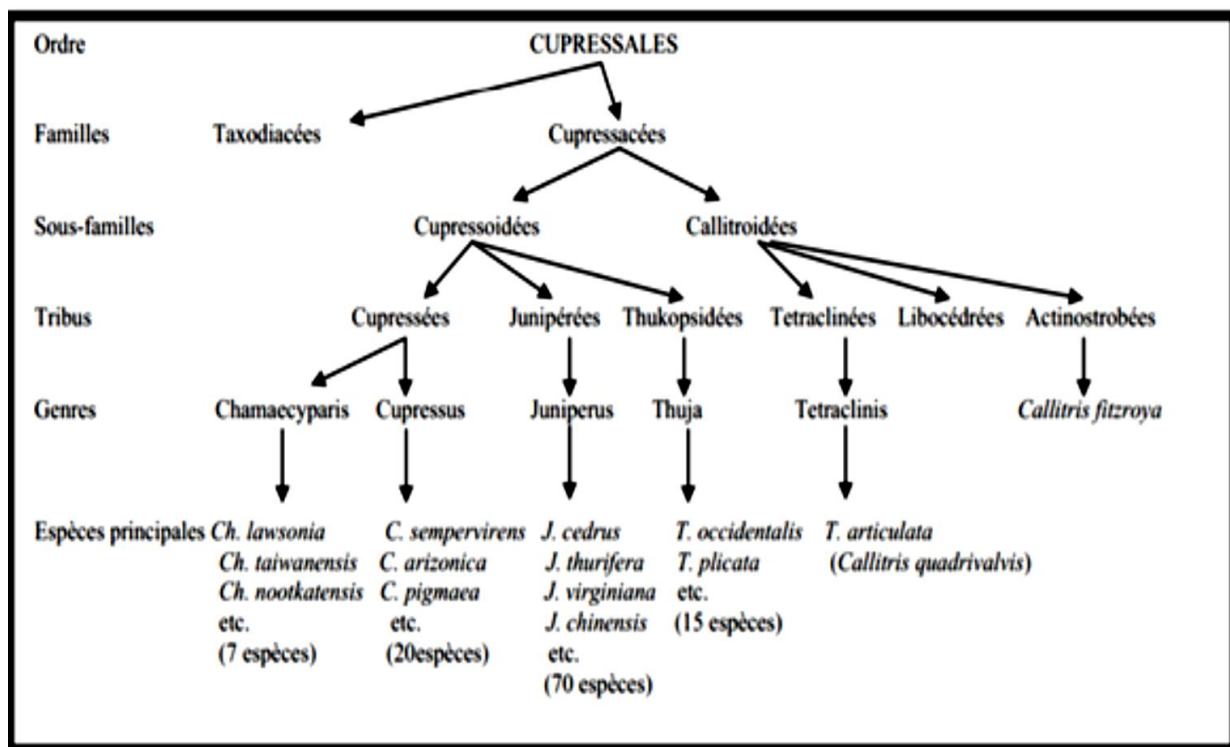


Figure 1 : Classification détaillée de l'ordre de cupressales(Haluk et Roussel, 2000 ; Bouyahyaoui, 2017 ; Hireche et Ferhat, 2019 ; Sebbane et Khaldi, 2019)

I.2 Répartition géographique

Au début du siècle, des peuplements spontanés de Cyprès ont été découverts. Il y a eu le *Cupressus dupreziana* au Tassili et le *Cupressus atlantica*. Ces deux espèces ont été, à un moment confondu avec le *Cupressus sempervirens*, ce n'est qu'après des études botaniques approfondies qu'il y a eu différenciation des trois espèces. (Hireche et Ferhat, 2019), Pensent qu'à l'origine il y a eu une seule espèce de *Cupressus* qui recouvrait toute la zone méditerranéenne. La différenciation entre le Cyprès vert, le Cyprès du Tassili et le Cyprès de l'Atlas s'est fait au cours du temps et serait due à l'influence du milieu climatique.

La répartition naturelle de ce cyprès n'est pas claire en raison de sa longue histoire horticole dans la région méditerranéenne. Des peuplements naturels se trouvent dans le bassin sud-ouest de la Méditerranée sur plusieurs zones géographiquement non adjacentes atteignant vers l'Est le Caucase et le sud-ouest de l'Iran, bien que des études récentes sur les enregistrements génétiques et paléobotaniques présumant la présence de populations naturelles de la Méditerranée centrale (Caudullo et de Rigo, 2016).

- **Dans le monde**

Le genre *Cupressus* représente, la famille des Cupressacée la plus cosmopolite avec dix genres dans chaque hémisphère, mais la plupart des espèces se trouvent dans l'hémisphère nord (**Hireche et Ferhat, 2019**).

Plus précisément, les boisés naturels de *Cupressus sempervirens* qui se trouvent en Anatolie du Sud, à Chypre, en Syrie, en Palestine, au Liban, en Cyrénaïque et dans les îles du sud-est de la Grèce. Des occurrences isolées sont signalées de la région d'Elburz aux montagnes du sud de l'Iran (**Brofas et al, 2006**).

Cupressus sempervirens L était indigène au bassin méditerranéen (**Shahali et al, 2010 ; Al-Snafi, 2016 ; Caudullo et de Rigo, 2016 ; Hireche et Ferhat, 2019**) et du Moyen-Orient, comme arbre ornemental (**Caudullo et de Rigo, 2016**). Cependant, la plante a été distribuée en Asie tropicale à haute altitude (**Hireche et Ferhat, 2019**) (Iran, Palestine, Jordanie, Liban, Syrie, Irak, Turquie), au sud d'Europe (la Grèce et l'Italie), en Amérique nordique et au Nord d'Afrique (**Al-Snafi, 2016 ; Hireche et Ferhat, 2019**) où trois espèces dans la flore nord-africaine (Algérie, Tunisie, Maroc), pour plus de commodité, appelé *Cupressus sempervirens* sont souvent confondus, étant étroitement apparentés et similaires en apparence extérieure (**Molino, 2005; Hireche et Ferhat, 2019**).

Ces espèces globales incluent une espèce endémique marocaine *C. atlantica* Gaussen, une espèce endémique algérienne *C. dupreziana* A. Camus et *C. sempervirens* L., pour cette dernière espèce en Tunisie on retrouve trois variétés, *pyramidalis*, *horizontalis* et *numidica*, qui diffèrent dans la direction des branches (**Hireche et Ferhat, 2019**).

Certaines populations sont reconnues comme des cépages séparés et pour certains auteurs sont traités comme des espèces différentes : *Cupressus sempervirens* var. *numidica* en Tunisie et *Cupressus sempervirens* var. *indica* dans le nord de l'Iran. Les cyprès marocains endémiques des montagnes du Haut Atlas sont considérés comme une espèce distincte (*Cupressuss atlantica*), mais certains auteurs le classent comme cépage du cyprès commun (*Cupressus sempervirens* var. *Atlantica*) ou du cyprès du Tassili (*Cupressuss dupreziana* var. *atlantica*) (**Caudullo et de Rigo, 2016**).

- **En Algérie**

En Algérie, les explorations botaniques faites montrent bien la richesse et la diversité floristique de l'Algérie. Cependant, l'abondance du couvert forestier se trouve influencée par plusieurs facteurs (altitude, bioclimat, action anthropique, catastrophes naturelles, etc.) ; ainsi, les groupements forestiers des deux atlas varient d'un secteur à un autre, voire même au sein d'un même secteur c'est-à-dire d'un district à un autre. Parmi les peuplements forestiers de l'atlas algérien qui nous intéressent ce sont bien les cupressinées.

Ces dernières, se rencontrent sur les deux massifs de l'atlas algérien à des taux de recouvrement variables, soit en association avec d'autres végétaux ou bien formant des peuplements clairsemés et isolés.

Mais, peu de données sont fournies quant à la répartition sectorielle et du peuplement du cyprès. Les espèces endémiques ou naturalisées du cyprès sont : le cyprès du Tassili (*Cupressus dupreziana* A. Camus), le cyprès de l'Atlas (*Cupressus atlantica* Gaussen), le cyprès toujours vert (*Cupressus sempervirens* L). Le cyprès de l'Arizona (*Cupressus arizonica* Greene) est une espèce introduite et pas très utilisée. Ces espèces tolèrent bien les conditions d'un milieu xérothermique. Le cyprès vert (*Cupressus sempervirens* L) est le plus répandu. Il offre une très grande diversité notamment en terme de forme et est utilisé à des fins ornementales, en brise vent ou encore entant qu'arbre forestier ; tandis que, le cyprès de Duprez (*Cupressus dupreziana* A. Camus) se rencontre naturellement dans le désert du Tassili N'Ajjer (Algérie) et représente une des espèces rares et menacées. Un récent inventaire fait état de 231 arbres survivants dans cette région désertique où la pluviométrie annuelle est d'environ 20 mm (Bouyahyaoui, 2017 ; Hireche et Ferhat, 2019).

I.3. Habitat et écologie

Dans les habitats naturels, ce cyprès est présent dans les climats méditerranéens avec des étés secs et chauds et des hivers pluvieux, ou dans des climats semi-arides dans les zones orientales et intérieures de son aire de répartition.

C'est une espèce exigeante en lumière, résistante à la sécheresse et à la chaleur, qui croît avec un taux de pluie de seulement 200 mm par an. Sa période de croissance végétative coïncide avec le printemps et l'automne, pendant la période hivernale et celle des grandes chaleurs elle est au repos, tandis qu'elle peut reprendre rapidement après la pluie grâce à son

grand système racinaire peu profond. Les jeunes plantes ne tolèrent pas les basses températures, tandis que les adultes peuvent survivre à des températures allant jusqu'à -20 ° C.

C'est une espèce pionnière qui croît rapidement lorsqu'elle est jeune sur la plupart des substrats, mais pas sur l'argile ou les sols engorgés d'eau. Il prospère mieux que les autres espèces sur des sols rocheux, secs et compacts, même s'il préfère des sols riches, profonds, humides et bien aérés avec un pH neutre, où cependant il est moins compétitif.

Ce cyprès peut vivre plus de cent ans en peuplements naturels. Les plantes âgées de 200 à 500 ans ne sont pas rares. L'un des plus anciens cyprès vivants est situé en Italie et date de plus de 800 ans.

Le cyprès méditerranéen forme des zones boisées ouvertes, car sa litière pourrait empêcher le développement d'une végétation de sous-étage en raison d'effets allélopathiques. Sur son aire de répartition naturelle, il développe des peuplements purs ou est mélangé avec du pin d'Alep (*Pinus halepensis*), du pin turc (*Pinus brutia*), du pin noir (*Pinus nigra*) ou des espèces de maquis souvent associées aux genévriers (*Juniperus* ssp.) (Caudullo et de Rigo, 2016).

I.4.Cyprès sempervirent

Introduit depuis plusieurs siècles, le cyprès sempervirent (cyprès vert, cyprès de Provence ou cyprès méditerranéen) se rencontre dans toutes les zones basses du pourtour méditerranéen français mais également en Italie. On le trouve souvent en limite de zones agricoles ou en alignement dans les parcs ou les propriétés, où leur forme particulière en fuseau marque les paysages. Il est également couramment utilisé comme haie dans les lotissements ou comme brise-vent pour lutter contre le Mistral et la Tramontane en Provence et en Languedoc. (Figure 2)

C'est une essence exigeante en chaleur, qui craint les grands froids. Elle est, par contre, très plastique du point de vue des exigences édaphiques et se rencontre à la fois sur des sols acides ou calcaires. Cette essence préfère les sols profonds et drainants (dominante sableuse ou limoneuse), elle supporte mal les terres argileuses ou trop gorgées d'eau. Néanmoins, le cyprès vert tolère les sols superficiels (moins de 50cm, voire 30cm) et caillouteux, pour peu qu'ils soient fissurés (enracinement puissant et pivotant).

Peu exigeant en eau, il résiste aux sécheresses estivales mais sa croissance s'en ressent. Il craint peu le vent, surtout dans sa forme fuselée, mais cela crée une irrégularité dans les cernes de croissance. Le cyprès vert peut résister à des températures négatives allant jusqu'à -

20°C. Ce conifère préfère une exposition au soleil et tolère la mi- ombre. Tout à fait adapté à la sécheresse, et préfère un sol sec à un sol humide.

C'est une des essences les plus intéressantes pour valoriser les secteurs chauds des zones basses, où sa croissance est respectable. La durabilité naturelle, la rectitude et les excellentes propriétés mécaniques de son bois permettent de fournir des pièces de charpente de petite taille et des éléments de menuiserie, notamment en extérieur (porté, croisées, volets...).



(A)

(B)

(C)

(D)

(E)

Figure 2 : Présence du cyprès vert en zone méditerranéenne (A : Brise-vent ; B : Cyprès vert taillé ; C : Cyprès vert isolée ; D : Cyprès vert dans le parc ; E : Cyprès vert dans la ville)

- **Systematique**

Selon la classification de Linnaeus, *Cupressus sempervirens L.* appartient au : **(Al-Snafi, 2016)**.

Domaine : Eukaryota

Règne : Plantae

Sous règne : Tracheobionta

Embranchement : Spermatophyta

Sous embranchement : Pinophytina

Division : Coniferophyta

Classe : Pinopsida / Coniferopsida

Ordre : Pinales

Famille : Cupressaceae

Sub-famille : Cupressoideae

Genres : Cupressus

Espèce : *sempervirens L.*

I.5. Cyprès de l'Arizona

Le cyprès de l'Arizona (*Cupressus arizonica*) porte également les noms de « cyprès glabre » et de « cyprès bleu ». Cette espèce a pris une extension forte importante en région méditerranéenne, surtout et d'abord en horticulture, en reboisement ensuite, et ce depuis quelques décennies. Elle a été découverte en 1880 par Edward Lee Greene dans les montagnes arides de l'Arizona, originaire du Sud-ouest de l'Amérique du Nord, ce conifère a été peu de temps après introduit en Europe, souvent cultivé comme arbre d'ornement.

Cette espèce arbore un très beau feuillage persistant bleu-argenté, sa frondaison puissante et conique donne un aspect particulier. Son écorce brune rougeâtre et ses gros cônes ronds brun chocolat ajoutent une touche décorative non négligeable. Le cyprès d'Arizona ne supporte la taille que si elle est légère et superficielle. Il supporte le froid, et étant plus résistant face aux maladies que le cyprès vert, il le remplace parfois.

Le Cyprès de l'Arizona, essence très rustique considérée comme résistante aux agents cryptogamiques, Coryneum en particulier. On lui reprochera pourtant le grand « encombrement » de son houppier, et la zone très large de terrain prospectée par ses racines de part et d'autre du brise-vent. (Figure 3)

Il tolère tout type de sol argileux, humide, calcaire et sablonneux. Il apprécie les terrains ensoleillés. Il résiste très bien à la sécheresse. En région méditerranéenne, le cyprès bleu pollinise de décembre à février.



(A)

(B)

(C)

Figure 3 : Présence de cyprès d'Arizona en zone méditerranéen (A : Cyprès bleu dans le parc ; B : Cyprès bleu comme brise-vent ; C : Cyprès bleu et vert taillés ;)

- **Systematique**

Selon la classification de Linnaeus, *Cupressus arizonica* L. appartient au : **(Al-Snafi, 2016)**.

Domaine : Eukaryota

Règne : Plantae

Sous règne : Tracheobionta

Embranchement : Spermatophyta

Sous embranchement : Pinophytina

Division : Coniferophyta

Classe : Pinopsida / Coniferopsida

Ordre : Pinales

Famille : Cupressaceae

Sub-famille : Cupressoideae

Genres : Cupressus

Espèce : *arizonica* L.

I.6. Métabolites secondaires des plantes

Les métabolismes secondaires représentent toute substance présentes chez un organisme, et qui ne participe pas directement aux processus de base de la cellule vivante par opposition aux métabolites primaires **(Tânia da et al., 2012)**.

Les métabolites secondaires font référence à des composés présents dans des cellules spécialisées, sont structurellement et chimiquement beaucoup plus diversifiés, et qui n'ont pas une fonction active dans la photosynthèse et la respiration mais ils sont nécessaires à la survie des plantes dans l'environnement **(Lattanzio., 2013)**.

La capacité à synthétiser des métabolites secondaires a été sélectionnée au cours de l'évolution dans différents lignée végétale lorsque ces composés s'adressent à ses besoins par exemple : Les substances volatiles et les pigments floraux ont évolué pour attirer les insectes pollinisateurs et ainsi améliorer la fertilisation, la synthèse des produits chimiques (produits secondaires) capables de réagir efficacement aux situations de stress imposées par des facteurs biotiques et abiotiques. **(Kleibenstein, 2004)**.

Ces voies, souvent recrutées parmi les voies essentielles du métabolisme primaire lors de la duplication génétique initiale, conduisant à des gènes dupliquésprésentant de nouvelles

fonctions et des rôles optimisés et diversifiés dans de nouvelles voies, font partie intégrante du programme de développement des plantes. (**Lattanzio, 2013**).

On distingue classiquement trois grandes catégories de métabolites secondaires chez les végétaux (**Anulika et al., 2016**).

- Les composés phénoliques
- Les composés terpéniques
- Les alcaloïdes

II. Généralité sur les *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* forment un large groupe colonisant le sol, les plantes et l'eau. Ces bactéries Gram négatives, non sporulantes, sont aérobies obligatoires, à l'exception de certaines pouvant utiliser le NO₃ comme accepteur d'électrons. Leur mobilité est assurée par plusieurs flagelles polaires, et elles ont un métabolisme mésophile et chimioorganotrophe, la plupart étant saprophytes (**Bossis et al. 2000**). Quelques espèces comme *P. syringae*, sont phytopathogènes et certaines peuvent causer des infections chez l'humain. Particulièrement *P. aeruginosa*, reconnu comme pathogène opportuniste et causant des infections pulmonaires mortelles chez les patients atteints de fibrose kystique (**Mavrodi et al. 2001**). Plusieurs études ont souligné le haut degré de diversité au sein de *P. fluorescens*, ce qui a mené à la subdivision de cette espèce en différents bio vars (**Bossis et al. 2000**).

Dans le sol, les *Pseudomonas* représentent une grande fraction de la communauté microbienne partageant leur milieu avec des commensaux représentant principalement les genres *Bacillus* et *Actinomyces*. On les retrouve sous tous les horizons, particulièrement sur les systèmes racinaires des plantes. Les différentes espèces de *Pseudomonas* qui colonisent la rhizosphère possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique. Premièrement, leur capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population est remarquable (**Haas and Keel 2003**). Cette grande rhizocompétence vient sans doute de leur taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres rhizobactéries et de leur capacité à métaboliser efficacement plusieurs composés des exudats racinaires (**Chin-A-Woeng et al. 2002**). De plus, ces bactéries sont très faciles à isoler et à cultiver au laboratoire et se prêtent aisément aux manipulations génétiques (**Chin-A-Woeng et al. 2001, Fenton et al. 1992**).

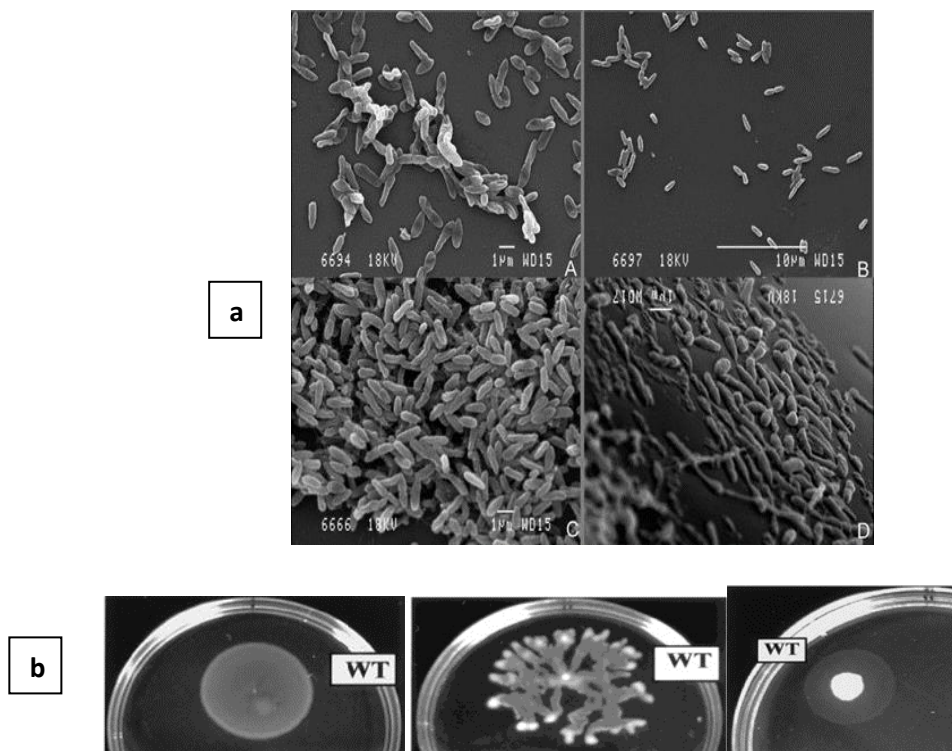
Les *Pseudomonas*, principalement l'espèce *P. fluorescens*, sont connues depuis longtemps pour leur aptitude à réduire l'incidence des maladies racinaires dans certains champs, ainsi qu'à inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes *in vitro*. Cette capacité d'inhibition peut se faire selon plusieurs mécanismes incluant la production d'une large gamme de métabolites antagonistes et de sidérophores. Ces derniers permettent de compétitionner farouchement pour l'acquisition du fer. Dans un milieu comme le sol où cet élément est présent en très faible quantité, cela peut nuire à la croissance saprophyte de

plusieurs agents pathogènes et ainsi réduire la sévérité de la maladie. On note également pour certaines souches une capacité à induire les mécanismes de défense chez la plante (**Kim et al., 2004, Iavicoli et al., 2000**). Mais dans la plupart des cas d'inhibition, le facteur déterminant est la production d'antibiotiques qui agissent directement sur l'agent pathogène.

Le premier rapport sur l'utilisation d'un *Pseudomonas* produisant un antibiotique pour le contrôle d'un agent pathogène racinaire, en l'occurrence *Rhizoctonia solani*, est venu de Howell et Stipatovic en 1979. Ces auteurs identifièrent la pyrrolnitrine produite par une souche de *Pseudomonas fluorescens* comme facteur permettant d'inhiber le pathogène. Par contre, on doit à Thomashow et Weller, neuf ans plus tard, la première démonstration expérimentale, utilisant une approche génétique pour démontrer l'implication d'un antibiotique produit par une souche de *Pseudomonas* dans la suppression d'un agent phytopathogène. Ces derniers ont utilisé une souche de *P. fluorescens* productrice d'acide phénazine carboxylique, isolée de la rhizosphère du blé, et fortement antagoniste envers *Gaeumannomyces graminis*. Des mutants de cette souche, déficients dans leur capacité à produire l'antibiotique, ont été comparés à la souche mère dans des tests d'inhibition *in vitro* et *in situ*. Les mutants étaient alors incapables d'inhiber le champignon en boîtes de pétris et de prévenir la fonte des semis au champ. De plus, une fois complétés génétiquement par un plasmide provenant d'une banque d'ADN génomique de la souche mère, les mutants voyaient leurs capacités d'inhibition restaurées (**Thomashow and Weller 1988**). Ce type de démonstration a depuis lors été réalisé également pour d'autres composés comme le DAPG, la pyrrolnitrine, la pyoluteorine et le HCN (**Haas and Keel 2003**). D'autre part, l'utilisation de mutants surproducteurs contribua plus tard à soutenir la thèse de l'importance du rôle des antibiotiques, car les souches produisant plus d'antibiotiques voyaient leur capacité de suppression d'autant augmentée. Certaines souches ont également été manipulées génétiquement afin de leur permettre de produire plusieurs antibiotiques (**Bakker et al. 2002, Chin-A-Woeng et al. 2001**). Ensuite, l'utilisation de gènes rapporteurs et de sondes pour mesurer l'expression des gènes impliqués dans la production d'antibiotiques a permis de détecter l'activité de ces gènes lors de la colonisation des racines (**Chin-A-Woeng et al. 1998**). Finalement, l'isolation et la quantification d'antibiotiques directement dans la rhizosphère a été réussie pour le PCA et le DAPG suite à l'introduction des souches productrices de ces composés, ce qui permet de confirmer que ces antibiotiques sont bien produits *in situ* (**Thomashow et al. 1990, Bonsall et al. 1997, Raaijmakers et al. 1999**).

II.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram négatif découverte dans des infections humaines en 1862 par Luke. Elle a ensuite été isolée par Carle Gessard en 1882, qui lui a donné le nom de bacille pyocyanique du fait de sa morphologie (bâtonnets) et de sa capacité à produire des pigments de couleur bleu-vert (la pyocyanine et la pyoverdine) (Lyczak et al. 2000).



Swimming(0,3% agar) Swarming (0,5% agar) Twitching (0,3% agar)

a) Cliché de microscopie électronique de *P. aeruginosa* d'après (Deligianni *et al.* 2010)

b) Photographie de boîtes de pétri montrant les différents types de mobilité de *P. aeruginosa* sauvage (noté WT), d'après (Rashid *et al.* 2000)

Figure 4 Morphologie et mobilité de *P.aeruginosa*

Comme illustré par ce cliché de microscopie (Figure 4), cette bactérie est un bacille d'environ 1 μm de long. Elle est mobile à la fois en milieu liquide, grâce à son unique flagelle polaire qui lui permet de nager (swimming), et en milieu solide, grâce aux pili qui lui permettent de se déplacer par glissement (twitching). Elle peut également se déplacer dans des milieux semi-solides par « swarming » grâce au flagelle.

P. aeruginosa possède un génome de 6,3 millions de paires de bases, bien plus important que les 4,6 millions de paires de bases de la bactérie *Escherichia coli*. Ses quelques 5570 séquences codantes lui confèrent une grande complexité génétique, proche d'organismes eucaryotes unicellulaires tels que la levure *Saccharomyces cerevisiae*, qui code pour 6200 protéines. Cela lui permet d'exprimer de nombreux systèmes protéiques pour capter, transporter et métaboliser des nutriments, permettant notamment le développement sur des substrats autres que le sucre. Peuvent aussi être cités des systèmes de chélation du fer, utilisant des sidérophores, des complexes macromoléculaires membranaires permettant l'export d'enzymes telles que des toxines, des lipases ou des protéases, des pompes à efflux conduisant à la résistance de la bactérie à certains antibiotiques. Enfin, 8% de son génome est consacré à la régulation fine de l'expression de ces systèmes, via des senseurs environnementaux et des protéines régulatrices. Finalement, cette grande complexité génétique, associée à une fréquence de mutations assez élevée permet à la bactérie de se développer et de s'adapter à des niches écologiques variées (**Stover et al. 2000**). Le taux de mutations est également connu pour augmenter lorsque la bactérie se développe dans des conditions de stress, par exemple en présence d'antibiotiques (**Alonso et al. 1999 ; Martinez et al. 2000**).

D'un point de vue métabolique, *P. aeruginosa* est donc très versatile. Sa température optimale de croissance est de 37°C mais elle peut se développer entre 25 et 42°C (**Tsuji et al. 1982**). La gamme de pH dans laquelle elle peut se développer est comprise entre 6 et 9 (**Rahman et al. 2005**). Elle peut métaboliser plus de 50 composés organiques mais également des composés inorganiques (**Vasil 1986**). En outre, cette bactérie est aérobie mais est capable de s'adapter à des conditions anaérobies. Lors de la respiration, elle utilise préférentiellement l'oxygène comme accepteur d'électrons, mais dans des environnements dépourvus d'oxygène elle utilise les nitrates (**Vasil 1986**).

Cette grande flexibilité métabolique permet à la bactérie de s'adapter et de se développer dans des conditions environnementales très diverses. Elle a en effet été détectée dans des échantillons provenant de niches écologiques variées, telles que les sols et la rhizosphère, l'eau (eaux usées, océans, piscines), les canalisations, les plantes ... (**Remold et al. 2011 ; Green et al. 1974 ; Berg et al. 2005 ; Cho et al. 2000 ; Regnath et al. 2004 ; Khan et al. 2008**). Par exemple, la présence de la bactérie a été mise en évidence lors d'une étude menée en Californie dans 24% des sols des champs analysés. Les conditions les plus favorables à son développement dans l'environnement semblent être une humidité relative élevée (80-95%) et

une température d'environ 27°C (**Green et al. 1974**). Il a également été montré que la bactérie est présente dans les environnements associés à l'homme, dans des prélèvements effectués dans des maisons : sur les surfaces, les déchets, l'eau, et même sur la peau et dans les selles de certains habitants/animaux de la maison. Cependant, la bactérie est principalement retrouvée dans les canalisations, et dans une moindre mesure dans les déchets et composts. Les canalisations auraient cinq fois plus de chances de porter ce bacille que les déchets/composts (**Remold et al. 2011**). Sa capacité à se développer dans des milieux si variés est d'ailleurs problématique puisque le bacille pyocyanique peut même se développer dans des solutions antiseptiques, des savons et sur des surfaces inorganiques (**Lanini et al. 2011 ; Pollack 1995**). En outre, *P. aeruginosa* est capable de coloniser et d'infecter un large spectre d'hôtes : les hommes tout d'abord, qui constituent son hôte usuel, mais aussi les souris, les insectes, les plantes, ... (**D'Argenio et al. 2001 ; Saitou et al. 2009 ; Fotedar et al. 1989 ; Young 1977**). Ce bacille est présent, en faible quantité, chez les personnes en bonne santé. Il est détecté sur la peau (0 à 2% des prélèvements), dans le nez (0 à 3,3% des prélèvements) ou la gorge (0 à 6,6% des prélèvements), mais également dans les selles (2,6 à 24% des prélèvements) puisqu'il vit de façon commensale dans le tube digestif de certaines personnes (**Morrison et al. 1984 ; Cavallo 2004**). Cependant, il s'agit d'un pathogène opportuniste, c'est-à-dire qu'il provoque une infection chez les hôtes fragilisés, immunodéprimés. Ainsi, le taux de *P. aeruginosa* détecté chez les personnes hospitalisées atteint 50% (Pollack 1995).

II.1.1. Taxonomie

Pseudomonas aeruginosa (*P.aeruginosa*) est une bactérie de la famille des *Pseudomonadaceae*. Cette famille renferme dix genres: *Azomonas*, *Azomonotrichon*, *Azorhizophilus*, *Azotobacter*, *Cellvibrio*, *Mesophilobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobacter*, *Rugamonas*, et *Serpens*. Le genre *Pseudomonas* regroupe 7 espèces: *P.aeruginosa*, *P.chlororaphis*, *P.fluorescens*, *P. pertucinogena*, *P.putida*, *P.stutzeri* et *P.syringae*. *P.aeruginosa* est l'espèce type du genre *Pseudomonas*. Sataxonomie est présentée dans le tableau1 :

Tableau 1: Taxonomie de *P. aeruginosa*

Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Prokaryota</i>
Division	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Pseudomonadales</i>
Famille	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genre	<i>Pseudomonas</i>
Espèce	<i>aeruginosa</i>

II.1.2. Habitat et distribution environnementale

P. aeruginosa est largement répandu dans l'environnement. C'est une bactérie ubiquitaire. Elle peut vivre à l'état saprophyte dans l'eau, le sol, les végétaux, les solutions antiseptiques et sur des surfaces inorganiques (Floret, 2009 ; Green *et al.*, 1974). Cette bactérie est également présente dans le tube digestif et sur la peau des mammifères. *P. aeruginosa* est très présente en milieu hospitalier et elle est responsable de nombreuses infections nosocomiales (11% des infections nosocomiales). Dans son environnement naturel, *P. aeruginosa* vit sous forme planctonique, mobile ou à l'état sessile dans un biofilm, attachée à une surface inerte ou une source de substrat.

II.1.3. Résistance aux antibiotiques

Employer des antibiothérapies répétitives contre *P. aeruginosa* a été à l'origine d'une augmentation des taux de mortalité chez les personnes infectées (Chung *et al.*, 2011; Cometta *et al.*, 1994; Harris *et al.*, 2002; Kollef *et al.*, 2008; Micek *et al.*, 2011; Rello and Diaz, 2003). Au cours des dernières décennies, il y avait dans le monde, une émergence rapide de souches multi résistantes de *P. aeruginosa*. Ces souches ont acquis une résistance à presque toutes les classes d'antibiotiques anti *Pseudomonas* disponibles, y compris celles à large spectre telles que les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes, les aminosides et les fluor quinolones (Carmeli *et al.*, 1999; Fish *et al.*, 1995; Kollef *et al.*, 2008; Quinn *et al.*, 1986; Seok *et al.*, 2011; Vettoretti *et al.*, 2009).

Les infections causées par des souches multi résistantes représentent un problème majeur. Elles augmentent le risque d'échec thérapeutique (Maeda *et al.*, 2008; Sabuda *et al.*, 2008).

Elles sont également à l'origine de bactériémies, d'une forte mortalité et des coûts de prise en charge des malades considérables (Giamarellou, 2002; Kollef *et al.*, 2008; Sostarich *et al.*, 2008).

P. aeruginosa a une remarquable capacité de développer une résistance à la plupart des agents antimicrobiens par de multiples mécanismes. Un de ses mécanismes de résistance est lié à sa capacité de changer de phénotype en mutant d'une souche invasive non mucoïde à une souche mucoïde surexprimant l'alginate, une matrice d'exopolysaccharide favorisant une colonisation pulmonaire chronique (**Martin et al., 1993**). La mutation responsable de la forme mucoïde (*muc*) est associée à l'activation de la transcription du gène de l'alginate *algD*. La région responsable des formes mucoïdes et non mucoïdes contient trois gènes étroitement liés *algU*, *mucA*, et *mucB*. AlgU est un régulateur positif, *mucA* et *mucB* constituent le cluster de gènes contrôlant la conversion à la forme mucoïde. Une importante activation de la transcription d'*algD* et la conversion à la souche mucoïde sont observées quand *mucA* ou *mucB* sont inactivés au niveau du chromosome des souches initialement non mucoïdes. La production locale, par *P. aeruginosa*, d'exopolysaccharides (alginate) provoque la formation d'un biofilm enrobé d'une matrice d'exopolysaccharides (**Costerton et al., 1999**).

Des mécanismes de résistance intrinsèque sont également à l'origine d'une résistance aux antibiotiques (**Stover et al., 2000**). Ces mécanismes résultent d'une synergie entre une faible perméabilité de la membrane externe et la formation de pompes d'efflux spécifiques appelées Mex (multidrug efflux systems) incluant MexAB-OprM et MexXY-OprM. En plus de cette résistance intrinsèque, il existe trois autres systèmes MexCD-OprJ, MexEF-OprN et MexJK-OprM qui sont à l'origine d'une multirésistance acquise (**Lister et al., 2009; Nakamura et al., 2008; Vettoretti et al., 2009**). Cette dernière résulte de mutations causant une hyperactivation des gènes qui codent pour les systèmes d'efflux (**Barbier and Wolff, 2010; Maeda et al., 2008; Rodriguez-Martinez et al., 2009**). L'hyperexpression acquise des systèmes naturels d'efflux est un mécanisme majeur de multirésistance chez *P. aeruginosa* (**Lister et al., 2009**). Les mutations activatrices portant sur l'opéron MexAB-oprM (expression constitutive faible) sont les plus fréquemment impliquées dans l'émergence des résistances aux β -lactamines.

En plus de ces mécanismes de résistance, la bactérie peut produire certaines enzymes inactivatrices comme dans le cas des aminosides (**Bonomo et al., 2006**) ou muter les gènes des topoisomérases II (*gyrA*) et IV (*parC*) (**Lister et al., 2009**). Les souches multirésistantes peuvent cumuler plusieurs mécanismes de résistance par mutations et acquisitions de gènes (**Dubois et al., 2001; Lolans et al., 2005**).

PARTIE 3 : Les composés phénoliques

1. Généralité

Les polyphénols ou composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux (Macheix, *et al.*, 2005). Ils sont présents par tout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux. Les principales sources alimentaires sont les fruits et légumes, les boissons (vin rouge, thé, café, jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs. Les fruits et légumes contribuent environ pour moitié à notre apport en polyphénols (Middleton, *et al.*, 2000).

A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolés et identifiés (Tao, L., Lambert, J.D.; 2014). Ils présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (Hannebelle, *et al.*, 2004). (Crozier, *et al.*, 2006). Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000 Da (Sarni- Manchado, P., Cheynier, V.; 2006).

Ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, différenciation organogène, dormance des bourgeons, floraison, tubérisation. Les polyphénols sont aussi connus pour leurs effets protecteurs contre le rayonnement UV, l'effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs et pour ces propriétés antifongique et antibactérienne (Heimeur, *et al.*, 2004). Ils interviennent dans la qualité alimentaire des fruits en déterminant la saveur (Dubois, *et al.*, 1977).

En effet les polyphénols ont des propriétés bénéfiques pour la santé commes neurodégénératives (Bonfili, *et al.*, 2008). Et certains d'entre eux sont utilisés comme additifs pour les industries agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (Burta, *et al.*, 2008).

La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) (Macheix, *et al.*, 2005).

Le terme «phénol» englobe approximativement 10000 composés naturels identifiés (Druzyńska, *et al.*, 2007).

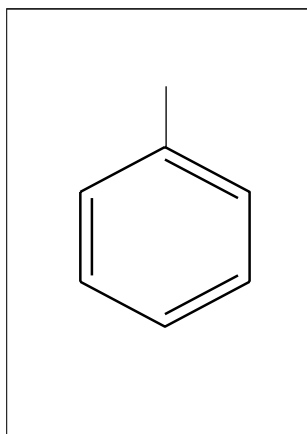


Figure 5: Structure du noyau phénol (Sarni- Machado, P., Cheynier, V.; 2006).

2. Distribution

En phytochimie les polyphénols sont les dérivés des acides benzoïques et cinnamiques (Belyagoubi, N., Benhammou, N. ; 2011). On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits (racines, tiges, bois et dans les cellules épidermiques des feuilles) (Marfak, A. ; 2003). La couleur et l'arôme, ou l'astringence des plantes dépendent de la concentration et des transformations des phénols. Ces composés représentent 2 à 3% de la matière organique des plantes et dans certains cas jusqu'à 10% (Walton, N. J., Brown, D. E.; 1999) .

- À l'échelle cellulaire, ils s'accumulent principalement dans deux sites : la paroi cellulaire et la vacuole.

- À l'échelle tissulaire, une repartions très inégales des différents composés phénoliques. Ainsi les anthocyanes et les flavonols sont généralement présents dans les couches cellulaires externes : épidermes des fruits et des feuilles (Sarni- Machado, P., Cheynier, V.; 2006).

3. Biosynthèse

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'élaboration de cycles aromatiques, la voie shikimate (également responsable de la synthèse des acides aminés Phe et Tyr) et la voie polyacétate, qui consiste en la condensation de molécules d'acétylcoenzymeA, Cette biosynthèse a permis la formation d'une grande diversité de molécules qui sont spécifiques d'une espèce de plante, d'un organe, d'un tissu particulière (Guignard, J.L. ; 2000) (Walton, *et al.*, 1999).

3.1. Voie de l'acide shikimique :

Cette voie débute par la condensation du phospho-énol-pyruvate qui provient de la glycolyse avec l'erythrose-4phosphate, qui est produit par la voie des pentoses phosphates au cours d'une succession des réactions, le glucide qui en résulte à 7 atomes de carbones, subit une cyclisation puis une réduction qui forme du shikimate d'où la dénomination de la voie **(Buchanan,et al., 2000)**.

Cette voie shikimate conduit à la formation des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acide benzoïque, acétophénones, lignanes et lignines, coumarines **(Bruneton, J. ; 1993)**.

3.2. Voie de l'acétate / malonate

La glycolyse et la β -oxydation aboutissent à la formation de l'acétyl CoA donnant le malonate. C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation répétée d'unités « Acétate » qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase **(Akroum,et al., 2010)**.

4. Classification

Les composés phénoliques (ou polyphénols) représentent un groupe de métabolites secondaires complexe comportant plusieurs familles : dérivés des acides benzoïque et cinnamique, flavonols, flavones, isoflavanones, flavanes, flavanones, chalcones, auronés et stilbène. Certains sont des précurseurs de polymères pariétaux, comme la lignine et la subérine. D'autres sont des polymères intracellulaires tels que les tanins condensés et les tanins hydrolysables **(Regnault-Roger, et al., 2008)**.

Les composés phénoliques sont commodément classés selon le nombre d'atomes de carbone dans le squelette de base **(Dacosta,Y.; 2003)**. Les principales classes des composés phénoliques sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Les principales classes des composés phénoliques

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine(exemple)
C6	Phénolssimple	Catéchol	Nombreusesespèces
C6-C1	Acideshydroxybenzoïque	p-Hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C6-C3	Acideshydroxycinnamiques Coumarines	Acidecaféique, Acideférulique Scopolétine	Pommedeterre, pomme Citrus
C6-C4	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C6-C2-C6	Stilbenes	Resvératrol	Vigne
C6-C3-C6	Flavonoïdes • Flavonols • Flavanols • Flavanones Isoflavonoïdes	Kaempférol, quercétine Catéchine, épicatechine Naringénine Daidzéine	Fruits, légumes, fleurs Pomme, raisin Citrus Soja, pois
(C6-C2)2	Lignanes	Pinorésinol	Pin
(C6-C3)n	Lignines		Bois, noyaudes fruits
(C15)	Tannins		Raisinrouge, Kaki

(Crozier, *et al.*, 2006)

5. Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde sont des pigments jaunes, désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Bouakaz, I. ; 2006), très répandus chez les végétaux, ils sont responsables en particulier de la coloration des fleurs, des fruits et même des feuilles. Abondants chez les plantes supérieures, ils sont présents dans tous les organes jeunes, feuilles et boutons floraux (Roux, D., Catier, O. ; 2007), dans les fruits, les légumes, les graines, les boissons tels le thé et le vin rouge (Tsimogiannins, D.I., Oreopoulou, V. ; 2006).

3'

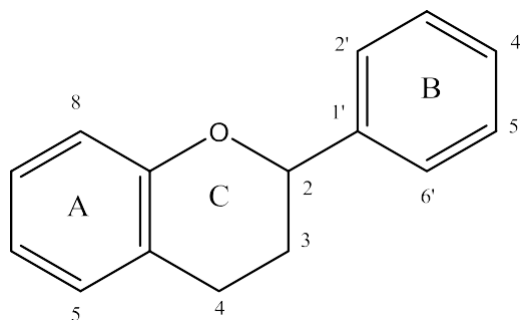


Figure 6 : Structure de base de flavonoïde (Dacosta, Y. ; 2003)

5.1. Classification des flavonoïdes

Comme il est représenté dans le tableau ci-dessous, plusieurs classes de flavonoïdes apparaissent en fonction du degré d'oxydation, de méthylation et de polymérisation du noyau pyranique central ainsi que la nature et la substitution portés sur le cycle C (Tsimogiannins,D.I., Oreopoulou,V. ;2006) (Lobstein,A.;2010).

• Les flavones

Les flavones sont très rencontrés dans les plantes supérieures, ils se trouvent sous les deux formes aglycones ou glycosylées, caractérisés par la même structure de base de flavonoïdes avec une liaison instaurée en position C2-C3 avec une fonction cétone tels que l'apigénine, Chrysin (Kim,*et al.*, 2004). Ces composés sont caractérisés par leurs activités physiologiques remarquables, spécialement leurs propriétés antimicrobienne et antivirale.

• Les flavonols

Les flavonols sont les constituants flavoniques les plus abondants des aliments. Ce sont des flavones qui se caractérisent par la présence d'un groupement hydroxyle (OH) en position 3 de l'hétérocycle central C tels que le kaempférol, la quercétine et la rutine qui sont les composants les plus représentatifs de cette famille. Ces dernières possèdent un très fort pouvoir antioxydant en raison de leur structure chimique favorable au piégeage des radicaux libres (Liu,*et al.*, 2012).

• Les flavanones

Ces constituants se définie par une structure similaire à celle des flavones mais ne possèdent pas d'instauration au niveau de l'hétérocycle. L'alimentation représente une source de ces

composant comme il est le cas des tomates, certaines plantes comme la menthe, et sont présents en grandes quantités dans les agrumes qui se caractérisent par la présence d'un grand pourcentage des flavanones (**Lobstein,A.;2010**).

- **Les flavanes**

Ce sont des composés dont l'hétérocycle central C est saturé et qui n'ont pas de fonction cétone. Les flavanes sont répons dans les écorces des végétaux. Ces composés sont connus sous forme de monomères ou polymères exemple de la catéchine qui existe dans de nombreux fruits comme la pomme, le chocolat et le thé qui sont les principales sources de ce composé (**Castaneda-ovando, et al., 2009**).

- **Iso flavonoïdes**

Les isoflavonoïdes se distinguent des flavonoïdes par la position C3 sur l'hétérocycle pyranique central C du noyau aromatique B. Ce sont des composés à 15 atomes de carbones comme les flavonoïdes. Ils dérivent d'une structure 1,2- diphénylpropane (**Schwarz, et al., 2007**).

Les isoflavonoïdes se trouvent essentiellement chez les fabacées ou les légumineuses (**Dewick,P.M. ;1993**). Ces composés sont classés en fonction du degré d'oxydation et de l'existence ou non d'hétérocycles supplémentaires. On trouve aussi, les isoflavones, les isoflavanones, les Isoflavanols, les isoflavanes, les roténoïdes, les ptérocarpanes, les coumaranochromones et les 3-arylcoumarines (**Iwashina, T. ; 2000**).

5.2. Les Tanins

Ils représentent une classe très importante des polyphénols localisés dans pratiquement toutes les parties des végétaux (écorces, racines, feuilles). Ils sont caractérisés par leur aptitude à se combiner aux protéines, aux glucides et aux enzymes, formant ainsi des complexes insolubles. Deux groupes de tanins différents, aussi bien par leur structure que par leur origine biogénétique, sont distingués (**Benyahia, A. ;2014**).

5.2.1. Les tanins hydrolysables

Ils sont composés de sucre et d'acide phénol. Ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique ou enzymatique, libérant ainsi une partie phénolique qui peut être soit de l'acide gallique (tanins galliques), soit de l'acide éllagique et une partie non phénolique, qui est souvent du glucose ou de l'acide quinine (**Sarni- Manchado, P., Cheynier, V.; 2006**).

5.2.2. Les tanins condensés

Les tanins condensés sont des oligomères de flavane-3-ols (des anthocyanidines) et des flavane-3,4-diols (des leucoanthocyanidines), dérivés de la catéchine ou de ses nombreux isomères (Stevanovic, T., Perrin, D. ; 2009). Très abondants dans certains organes végétaux consommés ou utilisés par l'homme, par exemple de nombreux fruits (pomme, prune, fraise ...) ou des boissons fermentées ou non (thé, vin, cidre. On peut également trouver chez certains mutants de maïs des pigments rougeâtres ou phlobaphènes qui sont des formes polymérisées proches des tannins condensés mais qui dérivent dans ce cas de flavane-4-ols (Macheix, *et al.*, 2005).

5.3. Coumarines

Coumarine vient de « coumarou », nom sud-américain de la graine du *Dipterix odorata* ou fève tonca, dont ce composé fut retiré pour la première fois en 1982 (Bruneton, J. ; 1993).

Les coumarines sont des composés phénoliques non volatils, sont très répandues chez les végétaux, notamment dans les racines et les écorces ; d'odeurs agréables, certaines servent en parfumerie ou pour aromatiser le tabac ; d'autre sont très toxiques telles que les aflatoxines des champignons inférieurs (Garabeth, *et al.*, 2007).

Leur squelette de base est constitué de deux cycles accolés avec neuf atomes de carbone (Ford, *et al.*, 2001).

Les coumarines sont substituées par un hydroxyle ou plus sur les six positions disponibles. La majorité des coumarines sont substituées en C-7 par un hydroxyle. Selon la nature des substituant sur leurs structures On peut classer les coumarines en cinq catégories : Coumarines Simples, furanocoumarines, pyranoco, dicoumarines, tricoumarines. La famille Thymeleacées est plus riches en coumarines, et elles se trouvent dans toutes les parties de la plante et notamment dans les fruits et les huiles essentielles des graines (Guignard, *et al.*, 1998). (Deina, *et al.*, 2003). (Booth, *et al.*, 2004).

5.4. Les anthocyanes

Les anthocyanes ou pigments anthocyaniques sont des composés hydrosolubles, de teinte rouge, violette ou bleue, qui colorent les fleurs, les fruits et parfois les feuilles. Ces pigments sont très répandus dans le règne végétal et proche des flavonoïdes sur le plan de l'origine, de la structure et des propriétés pharmacologiques (Catier, O., Roux, D.; 2007).

Leur structure de base est caractérisée par un noyau « flavonoïde » chargé positivement (C6-C3-C6). Ce dernier portera le nom d'anthocyanine ou d'anthocyanidine suivant qu'il soit glycosylé ou non (**VivasdeGaulejac,N.;2001**). Elles varient selon le nombre et la position des différents groupements hydroxyles et méthoxyles, la nature, le nombre et la position des sucres et l'acylation éventuelle de ces sucres (**Clifford, M.N. ; 2000**).

5.5. Lignanes

Les lignanes proviennent de la composition initiale de deux molécules phénoliques de type monolignol comme l'alcool coniférikique. Diverses oxydations, réductions ou alkylations conduisent ensuite aux lignanes présents chez les végétaux (**Macheix,et al., 2005**). Ils sont très répandus dans les plantes, autant les gymnospermes que les angiospermes, mais plus fréquents dans les pinacées, les podophyllacées, les rutacées et les lauracées, ils sont moins abondants chez les Astéracées (**Regnault-Roger, et al., 2008**).

5.6. Les stilbènes

Les stilbènes (C6-C2-C6) caractérisés par une structure ayant un noyau 1,2-diphényléthylène avec des groupements hydroxyles substitués sur les cycles aromatiques et existent sous forme de monomères ou d'oligomères. Ces molécules sont présentes dans notre alimentation en petite quantité. Le plus connu d'entre eux est le trans-resvératrol, possédant un squelette trihydroxystilbène dont leur propriété anticancéreuse a été prouvée par des études scientifiques sur les plantes médicinales (**Han,et al., 2007**). (**Kundu, J.K., Surh, Y.; 2008**).

5.7. Quinones

Ce sont des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques avec deux substitutions cétoniques. Elles sont caractérisées par un motif 1,4-dicéto cyclohexa-2,5-diénique (para-quinones) ou, éventuellement, par un motif 1,2-dicéto cyclohexa- 3,5-diénique (ortho-quinones) (**Bruneton, J. ; 1993**). Elles sont ubiquitaires dans la nature, principalement dans le règne végétal et sont fortement réactifs (**Cowan,M.M. ;1999**).

6. Les propriétés physico-chimiques

Les composés phénoliques sont hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre (500 et 3000) Dalton. Les deux propriétés fondamentales que partagent toutes les classes de polyphénols sont :

6.1. Les propriétés réductrices : qui sont à la base de la capacité de ces substances à piéger les espèces oxygénées (activité antioxydante) et de leur capacité à s'oxyder (**Sarni-Manchado, P., Cheynier, V.; 2006**).

6.2. Les propriétés complexantes : la complexation métallique des polyphénols est susceptible de limiter l'absorption intestinale des ions métallique d'importance biologique comme le fer (**Bruneton, J. ; 1993**).

7. Activités biologiques de certains composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des molécules biologiquement actives, elles manifestent diverses activités qui sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 3 : Activités biologiques de certains composés phénoliques

Composés phénoliques	Activités biologiques
Acidesphénols	antipyrétiques et anti-inflammatoires. antioxydantes et antiradicalaires. antivirales, antibactériennes, antifongiques. anticancéreux antiproliférative, antitumorales,
Coumarines	anti-agrégation plaquettaire, anti-inflammatoire, anticoagulante, antitumorale, diurétiques, antimicrobienne, antivirale et analgésique
Flavonoïdes	antiallergique, anti-atherogénique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardioprotective et vasodilatatoire, antioxydant
Quinones	activités antidépressives (hypericin), anti-protozoaires, antivirales, antibactériennes, fongicides et antiallergiques.
Anthocyanes	Protection des veines et capillaires
Tanins	anti-nutriments, vasculoprotectrices, cicatrisantes et anti-diarrhéiques, antioxydant, stopper les hémorragies et de lutter contre les infections. Antioxydantes, propriétés vasculoprotectrices, cicatrisantes et anti-diarrhéiques, antimicrobien

7.1. Activités antioxydant des composés phénoliques et des flavonoïdes

Ces dernières décennies, plusieurs travaux scientifiques sur les polyphénols ont été publiés pour informer et sensibiliser les consommateurs et les pouvoirs publics sur l'intérêt des fruits et des légumes riches en polyphénols ; source naturel d'antioxydants. Ces molécules sont reconnues par leurs considérables potentiels antioxydants qui sont en relation direct avec la santé humaine (**Bouayed, et al., 2008**).

Les polyphénols ont la capacité de piéger les radicaux libres, générés en permanence par notre organisme ou formés en réaction à des agressions de notre environnement (tabac, polluants, infections ...). Quand ils sont ingérés avec les aliments, ils renforcent nos défenses naturelles en protégeant nos cellules et nos tissus contre le stress oxydant (**Scalbert, A. ;2004**).

Les flavonoïdes, peuvent empêchés les dommages oxydatifs par différentes mécanismes d'actions : soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (**Hodek, et al.,**

2002). Soit par chélation des métaux (le fer et le cuivre) qui sont d'importance majeure dans l'initiation des réactions radicalaires ; soit l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres (**Benavente-Garcia, et al., 1997**). Concernant le pouvoir antioxydant des tannins, cette propriété est très remarquable due à leurs noyaux phénols (**Zimmer, N., Cordesse, R.; 1996**). Les autres composés phénoliques qui possèdent les activités antioxydantes et antiradicalaires sont l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide chlorogénique (**Bossokpi, I.P.L.; 2002**).

8. Rôles des polyphénols dans les plantes

Les flavonoïdes sont responsables de la coloration des fleurs et des fruits qui couvrent une large gamme de couleur allant du rouge au violet en passant par le jaune. Leur couleur dépend de leur structure, mais aussi de l'acidité du milieu (**Bruneton, J. ; 2009**). On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes. Les flavonoïdes montrent d'autres propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec diverses hormones végétales de croissance. Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire des métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries (**Ghedadba, et al., 2015**). De plus ils sont impliqués dans la photosensibilisation, la morphogénèse, la détermination sexuelle, la photosynthèse et la régulation des hormones de croissance des plantes (**Lhuillier, A.; 2007**).

CHAPITRE II :

MATERIEL & METHODES

Objectifs

Notre travail vise à rechercher des constituants chimiques « les métabolites secondaires » et d'évaluer *in vitro* l'activité antibactérienne des extraits organiques, préparés à partir des feuilles de *Cupressus sempervirens* L. et *Cupressus arizonica* L. vis-à-vis d'une souche bactérienne pathogène *pseudomonas aeruginosa* pour cela nous avons fixé les objectifs suivants :

- ✓ Extraction et analyse qualitative des différents extraits des feuilles de *Cupressus sempervirens* L. et *Cupressus arizonica*.
- ✓ Etudier la sensibilité de *pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis des différents antibiotiques.
- ✓ Etude de l'activité antibactérienne des extraits préparés par la méthode de diffusion en milieu solide.

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

La plante qui a fait l'objet de notre étude a été choisie sur la base d'une recherche bibliographique méticuleuse qui a montré que cette espèce végétale est très peu étudiée.

Les feuilles du *Cupressus sempervirens* L. et *Cupressus arizonica* utilisés dans cette étude ont été récoltés durant le mois d'avril 2021, au niveau du département des Biotechnologie de l'université de Blida 1. Pour ne pas endommager l'arbre, nous avons choisi des feuilles de couleur bien verte qui se présente à l'extrémité des rameaux.

L'identification des deux espèces a été faite par Monsieur DEGAICHIA Hoceme, Docteur au niveau de département des biotechnologies - Université Blida 1. Il s'agit de l'espèce *Cupressus sempervirens* L. et *Cupressus arizonica*. Cette dernière se différencie par une couleur pale des rameaux et des cônes ainsi la présence d'une odeur de citronnelle chez les feuilles. Cette étude a été réalisée pendant une durée de trois mois au niveau du laboratoire de recherche en Biotechnologie des Productions Végétales, département des biotechnologies, faculté des sciences de la nature et de la vie - Université de Blida 1-

1.2. Souche bactérienne

La souche bactérienne utilisée dans cette étude est *Pseudomonasaeruginosa*, une bactérie pathogène, de catégorie Gram-négative, isolé cliniquement, son prélèvement et son isolement se faisait en respectant les normes d'hygiène.

Le choix de cette souche a été porté sur la base de son importance dans le domaine clinique (Infections...etc.) et sa multirésistance envers les antibiotiques chimiques.

2. Méthodes

2.2. Extraction des polyphénols

L'objectif de cette extraction est de libérer les polyphénols présents dans des structures vacuolaires par rupture du tissu végétal et par diffusion. Ces derniers sont extraits par extraction solide-liquide en utilisant différents solvants à polarité croissante à savoir : Ether diéthylique, Chloroforme, et le Méthanol aqueux.

- **Séchage**

Après la récolte, les échantillons ont été bien nettoyés (débarrassés des débris) et établis sur papier. Les parties aériennes de la plante ont été séchées à l'abri de la lumière, à une température ambiante. Nous avons aéré les échantillons chaque trois jours pour éviter tout développement de moisissures, pendant 30 jours en moyenne (**Figure 7**).



Figure 7: Feuille de Cupressus
(A : *Cupressus sempervirens* et B : *Cupressus arizonica*) (Originale, 2021)

- **Broyage**

Les feuilles séchées ont été broyées dans un broyeur de cuisine (Moulinex) puis tamisées et conservées à sec dans des bocaux hermétiques (température ambiante) à l'abri de l'humidité jusqu'à leur utilisation. Le broyage des feuilles permet d'augmenter la surface de contact solvant-échantillon et une meilleure filtration du solvant au sein du matériel végétal ce qui a pour conséquence une augmentation de l'extraction.

2.3. Préparation des extraits bruts

Plusieurs procédés d'extraction peuvent être utilisés, du fait de la diversité des métabolites secondaires, en particulier des polyphénols. Pour l'extraction des polyphénols on a opté pour l'utilisation de trois solvants (**Figure 8**):

2.3.1 Extrait végétal hydro-alcoolique (A) (Romani et al., 2006) avec quelque modification.

10g de chaque matériel végétal était mis en contact avec 100 ml un mélange de méthanol 70% (v/v) et eau. Après 24 heures d'agitation mécanique à température ambiante et à l'abri de la lumière, le mélange est filtré et évaporé à sec sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif à 45°C afin d'obtenir l'extrait hydro-alcoolique. Les résidus obtenus sont conservés à 4°C jusqu'à utilisation.

2.3.2. Extrait étherique (E) (Drissa et al., 2004) avec quelque modification.

10g de chaque matériel végétal est d'abord macérée dans 100 ml d'éther diéthylique. Après 10 min d'agitation mécanique à température ambiante et à l'abri de la lumière. Le mélange est filtré et concentré au Rotavapeur à la température de 30°C afin d'obtenir l'extrait éther diéthylique. Les résidus obtenus sont conservés à 4°C jusqu'à utilisation.

2.3.3. Extrait chloroformique (C)(Drissa et al., 2004) avec quelque modification.

10g de chaque matériel végétal est d'abord macérée dans 100 ml de chloroforme. Après 10 min d'agitation mécanique à température ambiante et à l'abri de la lumière. Le mélange est filtré sous vide avec filtre 0,4µm et concentré au Rotavapeur à la température de 40°C afin d'obtenir l'extrait chloroformique. Les résidus obtenus sont conservés à 4°C jusqu'à utilisation.

Les résidus secs pesés sont repris par
phytochimique et par le DMSO pour

les solvants pour l'étude
l'activité antibactérienne

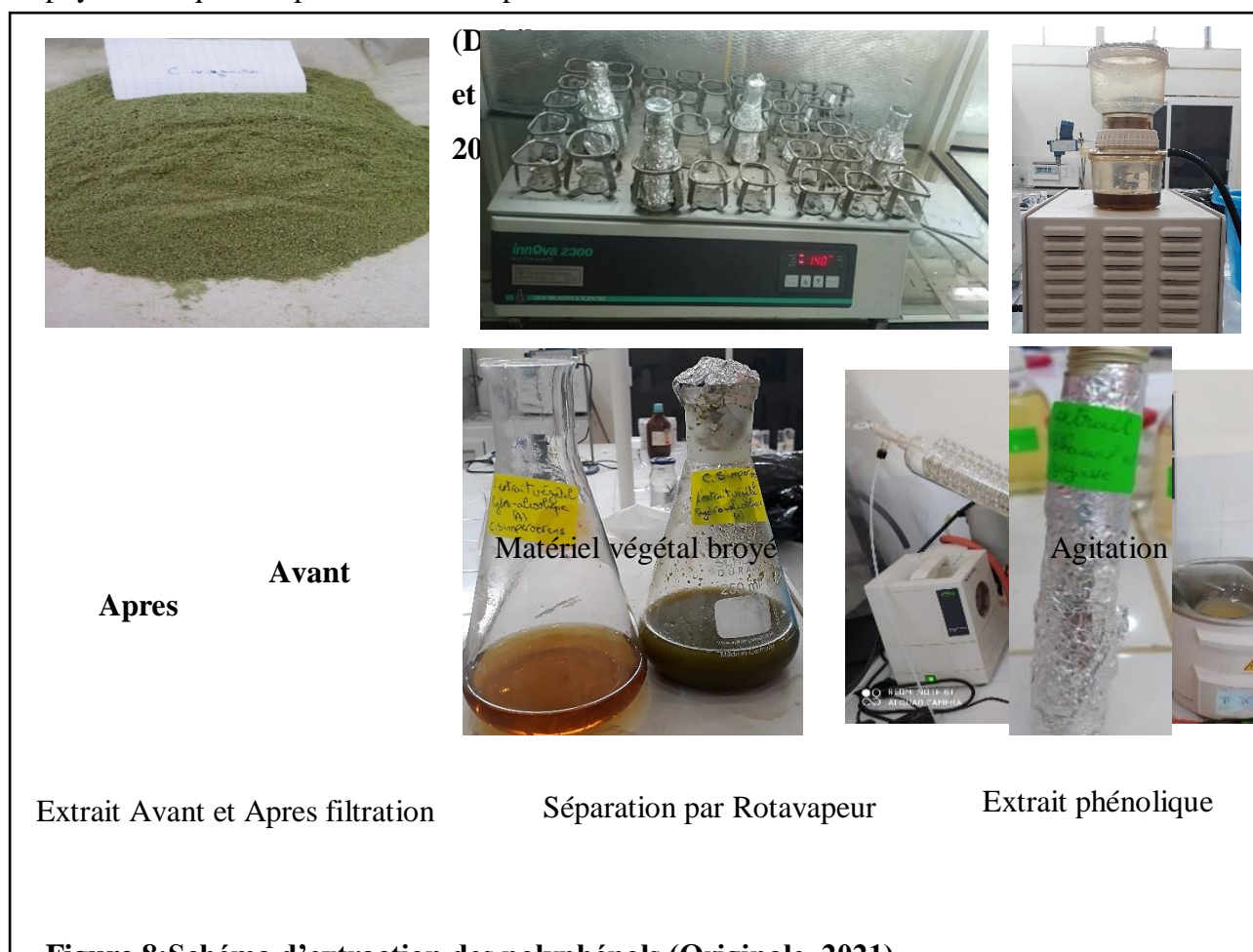


Figure 8: Schéma d'extraction des polyphénols (Originale, 2021)

2.4. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est calculé par la formule donnée par **Falleh et al., (2008)** :

$$R (\%) = \frac{M_{ext}}{M_{ech}} \times 100$$

Où :

R : Rendement en pourcentage %

M_{ext} : Masse de l'extrait après évaporation du solvant en g.

M_{éch} : Masse sèche de l'échantillon végétal en g.

2.5. Screening phytochimique

Le screening phytochimique est un test qualitatif qui permet de mettre en évidence les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal, les résultats sont classés en :

- Réaction franchement positive : + + +
- Réaction positive : + +
- Réaction très faible ou douteuse : +
- Réaction négative : -

Les tests phytochimiques ont été effectués sur les extraits préparés à partir des feuilles des *Cupressus*. La détection de quelques composés est réalisée par l'utilisation des méthodes décrites par **Harbone, (1973)** ; **Trease et Evans (1989)** ; **Evans, (1996)** avec quelques modifications.

a- Flavonoïdes

- **Teste de bate-smith (teste de flavan-3,4-diols)**

On met dans deux tubes 1 ml de l'extrait dont :

-Le 1^{er} tube témoin.

-Dans le 2^{ème} tube additionné 250 µl de HCL concentré.

-Porter au bain marie pendant 30 minutes.

L'apparition d'une coloration rouge dénoté la présence de Leucoanthocyanes qui sont des dérivés des flavan-3,4-diols.

- **Teste de Wilstater (teste de flavonols et flavonones)**

On met dans deux tubes 1 ml de l'extrait dont :

-Le 1^{er} tube témoin.

-Dans 2^{ème} tube additionné 0,1 g de magnésium.

-On ajoute quelque goutte de HCL, on laisse agir sous la hotte.

L'apparition d'une couleur qui vire vers le rouge pourpre (flavonols) ou le rouge violacées (flavonones ou flavonols) confirme l'existence des flavonoïdes.

b- Tannins

On met dans deux tubes 1 ml de l'extrait dont :

-Le 1^{ier} tube témoin.

-Dans le 2^{ème} tube additionné 100 µl de la solution de FeCl₃ à 1%.

En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre ou bleu - noir. La couleur vireau brun noir en présence de tanins galliques (tanins hydrolysables) et au bleu verdâtre en présence de tanins catéchiques (tanins condensés).

c- Saponosides

On prend de 0,5 g de la plante dans 80 ml d'eau distillée pendant quelques minutes. L'apparition d'une mousse dans le milieu prouve la présence des saponosides.

d- Anthraquinones

On met dans deux tubes 1 ml de l'extrait dont :

- Le 1^{ier} tube témoin.

- Dans le 2^{ème} tube on ajoute 500 µl de KOH.

Après agitation, la présence des Anthraquinones est confirmée par le virage de la phase aqueuse en rouge.

e- Saponines

Réaction de Libermann-Burchard : À 5 ml de nos extraits, on ajoute 5 ml d'anhydride acétique (C₄H₆O₃) et quelques gouttes d'H₂SO₄ concentrée. Les stéroïdes donnent avec cette réaction une coloration rouge, alors que, les terpènes donnent une coloration verte.

f- Quinones libres

L'identification des quinones libre dans notre extrait fait par l'addition de 1 ml de l'extrait avec quelques gouttes de l'hydroxyde de sodium *NaOH*(1%). Leurs présences sont indiquées par l'apparition de couleur violet ; jaune ou rouge.

g- Terpénoïdes

5 ml d'extrait ont été mélangés à 2 ml de chloroforme dans un tube à essai. 3 ml d'acide sulfurique concentré ont été soigneusement ajoutés le long de la paroi du tube à essai pour

former une couche. Une interface avec une coloration brun rougeâtre indique la présence de terpénoïdes.

h- Glycosides cardiaques

1 ml d'acide sulfurique concentré a été versé dans un tube à essai. 5 ml d'extrait ont été mélangés à 2 ml d'acide acétique glacial contenant une goutte de chlorure ferrique. Ce mélange a été soigneusement ajouté à 1 ml d'acide sulfurique concentré. La présence de glycosides cardiaques a été détectée par la formation d'un anneau brun.

3. Evaluation de l'activité antibactérienne

3.1. Méthode de diffusion sur disques

Le test de sensibilité des bactéries est réalisé par la méthode de diffusion en milieu gélosé, encore appelée méthode des disques (Celiktas et al., 2007 ; Bssaibis et al., 2009). Son principe consiste à tester la sensibilité des souches bactériennes par diffusion de l'extrait sur le milieu solide et avec la création d'un gradient de concentrations entre le composé et le micro-organisme ciblé.

- **Ensemencement**

Dans des boîtes de Petri stériles, 20 ml de gélose (Mueller-Hinton) sont coulés et laissés pendant 20 minutes pour se solidifier. Sur ce milieu de culture, 1 ml de suspension bactérienne de 10^8 UFC/ml a été ensemencé sur toute la surface à l'aide d'un écouvillon, l'écouvillon doit passer sur toute la surface de manière à obtenir un ensemencement homogène (Shunying et al., 2005).

Des disques vierges stériles de 6 mm de diamètre sont imprégnés d'un volume de 10 μ l et disposés à la surface du milieu solidifié (Ngameni et al., 2009). Les boîtes de Petri ont été incubées pendant 18-24h, à 37 °C.

Pour le témoin positif les disques d'antibiotique (Pénicilline et Vancomycine) ont été utilisés, quant au témoin négatif on imbibe le disque vierge stérile avec du DMSO.

- **Lecture**

La détermination de l'activité antibactérienne a été estimée en mesurant le diamètre (en millimètre) de la zone d'inhibition autour des disques, induit par les extraits. Le calcul c'est fait grâce au logiciel de traitement et de mesure Digimizer (Figure 9).

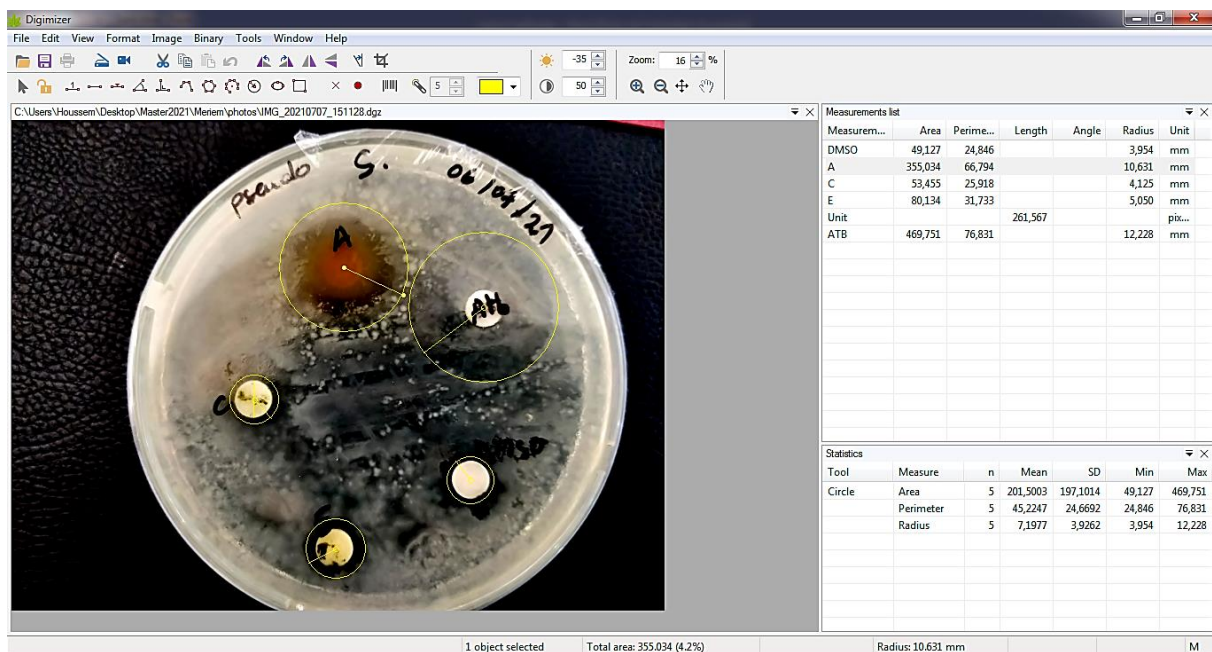


Figure 9: Traitement des photos par le logiciel Digimizer des zones d'inhibition (original, 2021)

L'apparition et l'importance du diamètre de la zone d'inhibition reflètent l'efficacité des extraits phénoliques sur la souche bactérienne testée. Les résultats sont symbolisés par des signes suivant la sensibilité des souches vis-à-vis de l'extrait (Tableau 4) (Ponce et al., 2003).

Tableau 4: Sensibilité et degré d'activité selon le diamètre d'inhibition

Diamètre du halo d'inhibition (Ø)	Degré de la sensibilité des germes	Résultat
$\text{Ø} < 08 \text{ mm}$	Non sensible ou résistant	-
$09 > \text{Ø} > 14 \text{ mm}$	Sensible	+
$15 > \text{Ø} > 19 \text{ mm}$	Très sensible	++
$\text{Ø} > 20 \text{ mm}$	Extrêmement sensible	+++

(Ponce et al., 2003)

4. Traitement statistique des données :

L'analyse statistique des résultats obtenus a été réalisée par le logiciel SPSS© version 20.0.0 pour Windows™. Les expériences ont été répétées trois fois et les résultats montrent les mêmes tendances. Une analyse de la variance (ANOVA) suivie d'un test post-hoc de Tukey au seuil 5% est réalisée pour voir l'existence de différences statistiquement significatives entre les méthodes d'extraction selon la plante teste en prenant en compte le rendement des extraits et l'inhibition du développement de *P. aeruginosa*. Le test de Student est réalisé pour voir les différences entre les deux plants vis-à-vis de chaque type d'extrait

CHAPITRE III

RESULTATS & DISCUSSION

1. Rendement des extraits

L'extraction par solvants organiques consiste à épuiser la matière végétale en molécules extractibles par un solvant puis à éliminer ce dernier par évaporation. Pour choisir un solvant très efficace pour nos échantillons, et selon la recherche bibliographique qui suggère quelle méthode d'extraction doit permettre l'extraction complète des composés d'intérêt et doit éviter leur modifications chimiques (Turkmen *et al.*, 2007), on a testé trois solvants à polarité croissante : Ether de pétrole, Chloroforme, et un mélange Méthanol-Eau.

Les rendements obtenus, exprimés par rapport à la masse de feuilles sèches mise audépart sont présentés dans la Figure 10.

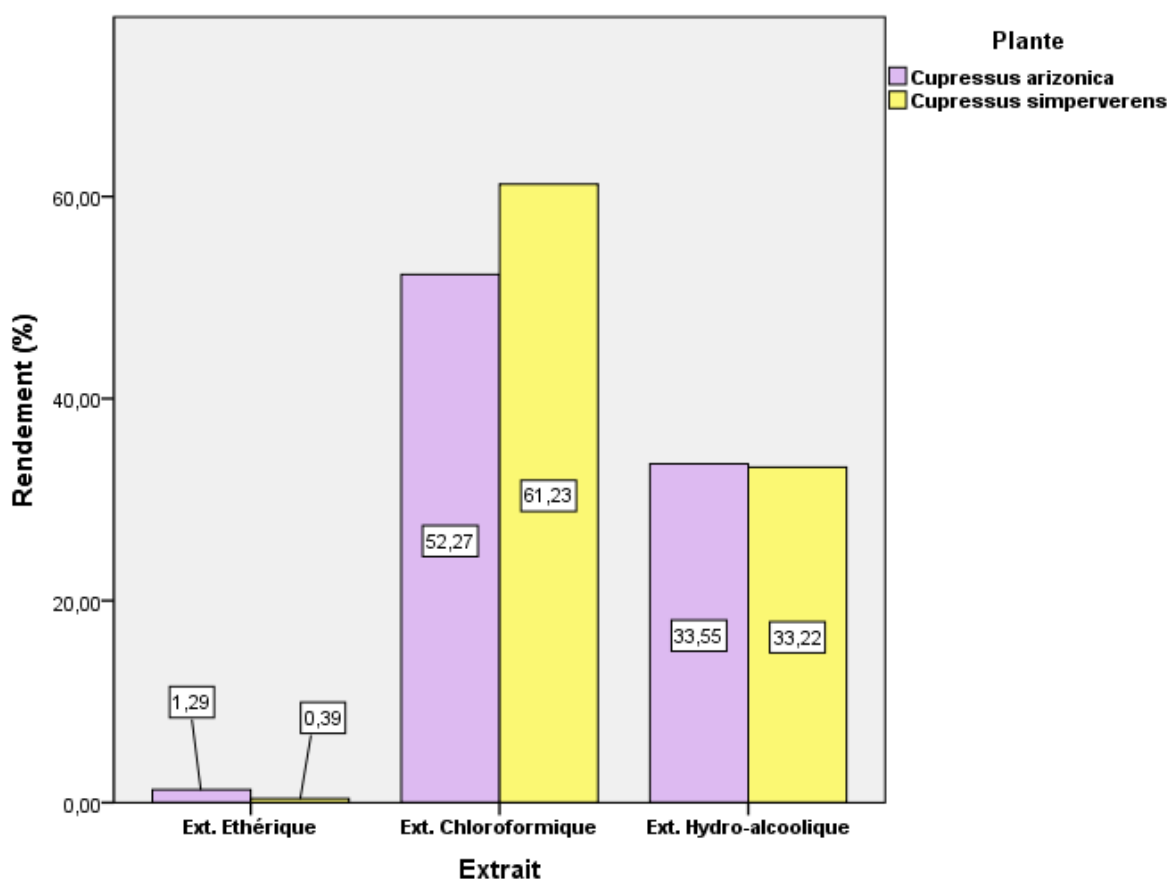


Figure 10: Rendement d'extraction des extraits phénoliques

Les rendements d'extraction illustrés dans la figure, révèlent une différence significative ($p < 0,05$) (**Annexe 2**); Le test ANOVA révèle trois groupes homogènes (**Annexe 2**).

- Groupe homogène (1) : Comprenant les extraits chloroformiques des deux espèces étudiées
- Groupe homogène (2) : Regroupant les extraits hydro-alcooliques
- Groupe homogène (3) : Comprend les extraits éthériques

Pour les deux plantes *Cupressus sempervirens* et *Cupressus arizonica*, le meilleur rendement d'extraction des trois solvants utilisés, est le chloroforme avec un rendement d'extraction moyen de 61.23% et 52.27% respectivement, suivi par le solvant hydro-alcoolique 33.55% et d'éthérique avec 0.39%. Statistiquement, et selon le test t de Student, les trois solvants (chloroforme, hydro-alcoolique, éthérique) ne diffèrent pas significativement pour les deux plantes (**Annexe**). Ces similitudes sont fréquentes chez les arbres récoltés au même endroit. Il est clair que les conditions environnementales ont une influence importante sur la production de métabolites, on peut donc s'attendre à ce que les rendements d'extraction des plantes poussant au même endroit soient très similaires (**Graglia et al., 1996**).

Ces résultats corréleront avec celle de **Farhat et al., (2009)** qui explique que le rendement variable des extraits revient à la solubilité différentielle des différents composés phénoliques dans les solvants et que cette solubilité est en fonction de leurs degrés de polymérisation, l'interaction avec les autres constituants et de la nature et des caractéristiques physico-chimiques des solvants utilisés et notamment leur polarité. En effet, la solubilité des substances contenues dans la matière végétale dans un solvant donné dépend de ces propriétés. Il s'ensuit que les rendements d'extraction et la composition des extraits varient d'un solvant à l'autre et d'un végétal à l'autre. (**Falleh et al., 2008**).

2. Screening phytochimique :

Le screening phytochimique de *C. arizonica* et de *C. sempervirens* indique que les deux espèces présentent des composés phénoliques dont la présence diffère selon le type de solvant utilisé (Extrait hydro-alcoolique ; étherique et chloroformique) (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Screening phytochimique de *Cupressus arizonica* et *Cupressus sempervirens* selon la nature du solvant

	<i>Cupressus arizonica</i>			<i>Cupressus sempervirens</i>		
	Extrait (A)	Extrait (E)	Extrait (C)	Extrait (A)	Extrait (E)	Extrait (C)
Leucoanthocyanes	++	-	-	++	+	-
Flavonols	++	-	-	++	-	-
Flavonones	+	-	-	+	-	-
Anthraquinones	++	-	-	++	-	-
Tannins catéchiques	++	-	-	++	-	-
Tannins galliques	-	-	++	-	-	++
Stéroïdes	+	-	-	+	+	-
Terpènes	-	+	+	-	+	+
Saponin	+	+	+	+	+	+
Cardiac glycosides	+	-	-	++	-	-
Terpénoides	+	-	-	+	-	++
Saponosides		+++			+++	
	++	-	-	++	-	-
Quinones libres	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-

Extrait (A) : Extrait hydro-alcoolique / Extrait (E) : Extrait Ethérique / Extrait (C) : Extrait Chloroformique

- Réaction franchement positive : + + +
- Réaction positive : + +
- Réaction très faible ou douteuse : +
- Réaction négative : -

Le screening phytochimique de *C. arizonica* et de *C. sempervirens* indique que les deux espèces présentent des composés phénoliques dont la présence diffère selon le type de solvant utilisé (Extrait hydro-alcoolique ; étherique et chloroformique).

En effet le chloroforme permet l'extraction des tanins galliques tandis que l'extraction par l'alcool permet la mise en évidence des tanins catéchiques. Les saponosides sont fortement présents dans les feuilles de *C. arizonica* et de *C. sempervirens*

L'extraction par l'éther de pétrole des feuilles de *C. sempervirens* permet de noter une réaction faible aux Leucanthocyanes et au Stéroïdes. Par contre, l'utilisation de ce solvant pour les feuilles de *C. arizonica* aboutit à une réaction négative.

Les Terpenoïdes sont observés fortement quand l'extrait par le chloroforme est utilisé et ce pour les feuilles de *C. sempervirens*. Ce qui n'est pas le cas pour les feuilles de *C. arizonica*. On dégage de ces résultats que l'utilisation d'un solvant hydro-alcoolique permet une meilleure extraction des composés phénoliques sauf pour les tannins galliques, qui, comme mentionné plus haut, sont mis à disponibilité par l'utilisation du chloroforme dans le procédé d'extraction.

3. Effet des extraits phénoliques de *C. sempervirens* et *C. arizonica* sur le développement de *P. aeruginosa*

Le calcul du diamètre d'inhibition de *P. aeruginosa* induit par les différents extraits et par les antibiotiques (Penicilline et Vancomycine) est consigné dans la Figure 11.

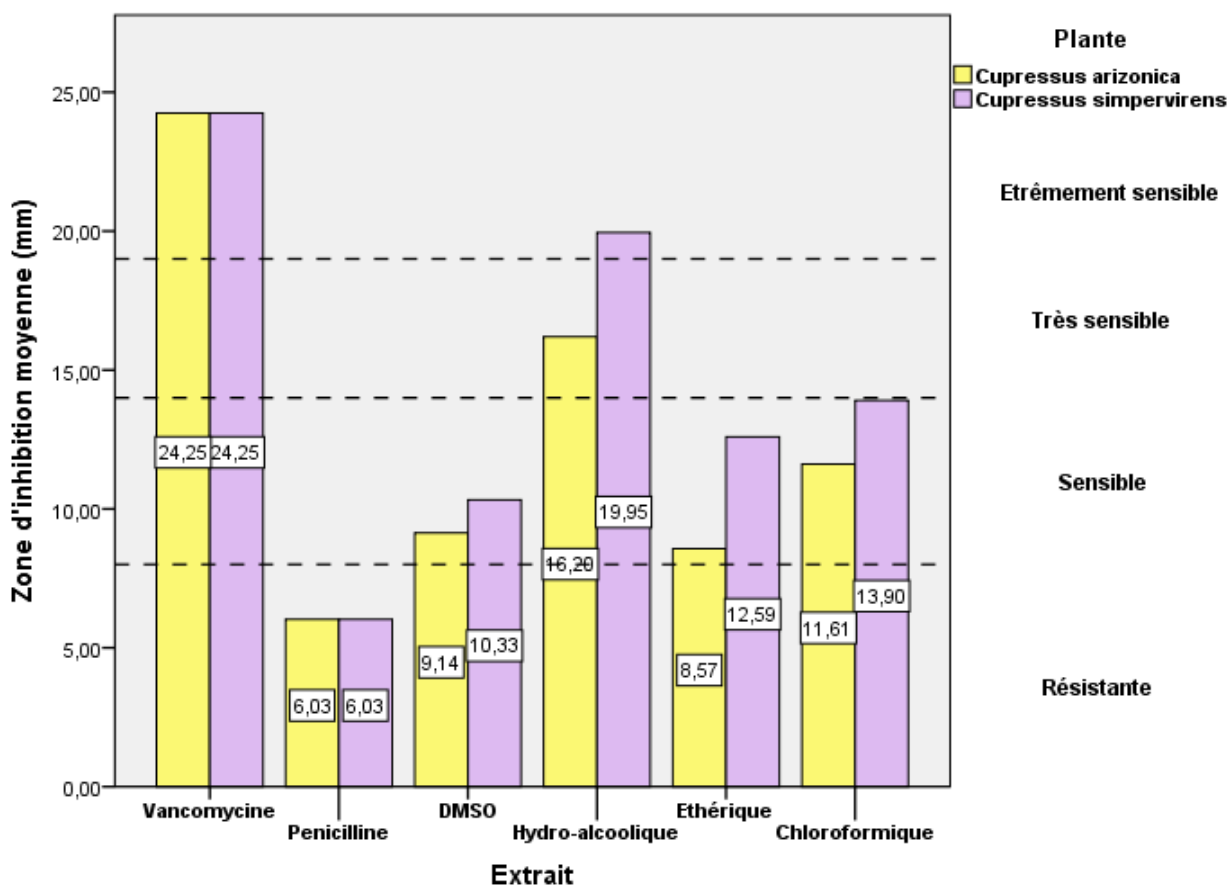


Figure 11 : Variation du diamètre de la zone d'inhibition (mm) selon la plante et le type de solvant

P. aeruginosa est extrêmement sensible vis-à-vis au témoin positif, la Vancomycine, où on note un diamètre de la zone d'inhibition de 24,25 mm il est de même pour l'extrait hydro-alcoolique de *C. sempervirens* où l'organisme test est considéré comme extrêmement sensible avec une zone d'inhibition de l'ordre de 19,95 mm. Nos résultats indiquent que l'extraction hydro-alcoolique induit une sensibilité très prononcée de *P. aeruginosa* avec un diamètre de 16,20 mm pour *C. arizonica*. Les extraits éthériques et chloroformiques induisent une inhibition relativement faible. (Tableau 6)

Tableau 6 : Sensibilité de *P. aeruginosa* vis-à-vis des extraits phénoliques de *C. sempervirens* et *C. arizonica*

Plante	Extrait	Interprétation de la zone d'inhibition
<i>C. arizonica</i>	Hydro-alcoolique	Très sensible
	Ethérique	Sensible
	Chloroformique	Sensible
<i>C. sempervirens</i>	Hydro-alcoolique	Extrêmement sensible
	Ethérique	Sensible
	Chloroformique	Sensible
Témoins	DMSO (Témoin -)	Sensible
	Pénicilline (Témoin +)	Résistante
	Vancomycine (Témoin +)	Extrêmement sensible

C. arizonica présente de faibles chiffres de la zone d'inhibition par rapport à *C. sempervirens*. Le test de Student (Test t) au seuil de 5% indique que cette différence n'est pas statistiquement significative ($p > 5\%$) (Annexe 1)

Une analyse de la variance par le test ANOVA au seuil 5% suivie par un post-hoc de Tukey permet de répartir le diamètre d'inhibition en groupes homogènes.

Chez *C. arizonica*, on note la répartition des diamètres d'inhibition en 03 groupes homogènes. Le premier est représenté par la Pénicilline, l'extrait éthérique, DMSO et l'extrait chloroformique. Le second groupe est représenté par l'extrait chloroformique et hydro-alcoolique. La Vancomycine s'isole dans le 03ème groupe (**Figure 12**)

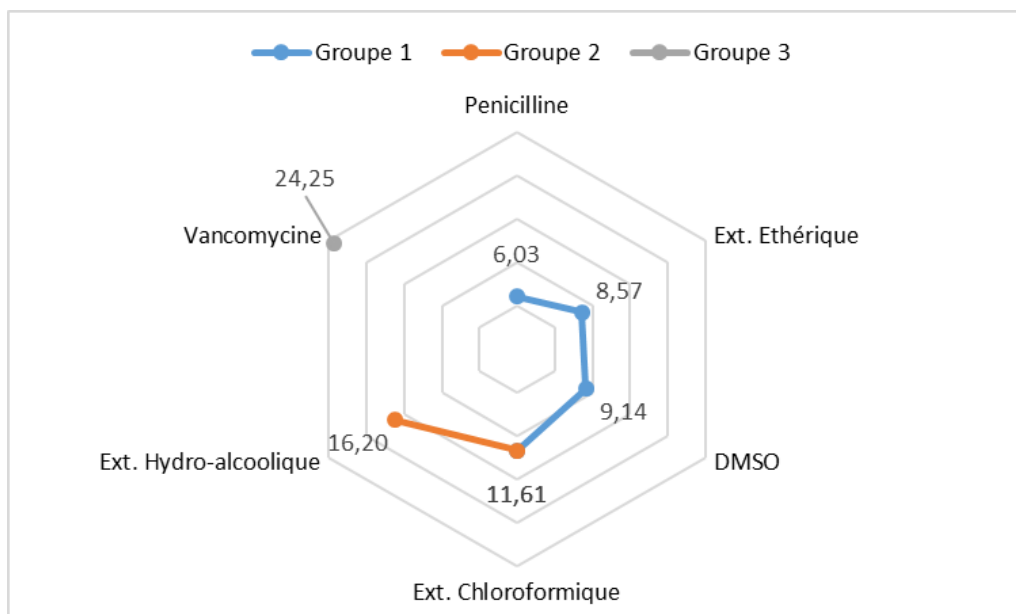


Figure 12 : Répartition des extraits issu de *C. arizonica* en groupes homogènes selon leurs effets sur l'inhibition de *P. aeruginosa*

Le test de Tukey fait ressortir 04 groupes homogènes chez *C. sempervirens*. Le premier est représenté par la Pénicilline, et le DMSO. Le second groupe est représenté par le DMSO, l'extrait éthérique. Le troisième groupe est représenté par l'extrait éthérique, chloroformique et hydro-alcoolique. L'effet de l'extrait hydro-alcoolique est similaire à l'effet de la Vancomycine s'isolent dans le 04eme groupe (**Figure13**)

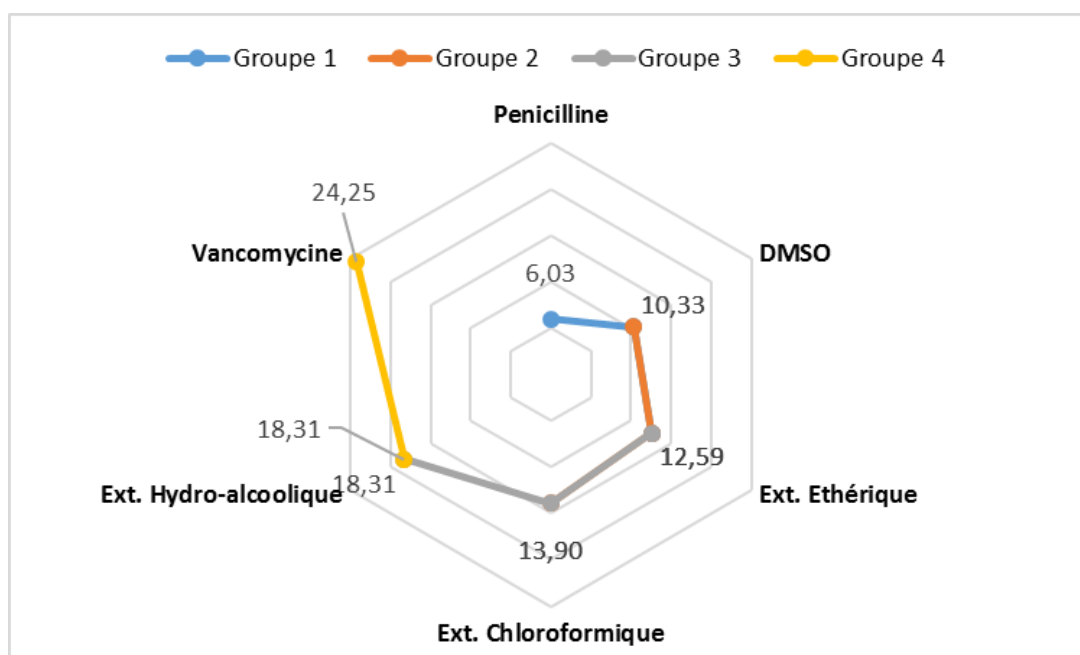


Figure 13: Répartition des extraits issu de *C. sempervirens* en groupes homogènes selon leurs effets sur l'inhibition de *P. aeruginosa*

On peut constater des résultats obtenus que les diamètres des zones d'inhibition augmentent avec l'augmentation de la quantité des extraits phénoliques testés.

L'activité antibactérienne de ces extraits est due principalement à leur profil chimique. Il à noter que la différence entre les activités antimicrobiennes des extraits peut s'expliquer par la différence des composés actifs obtenus. Par conséquent, cette activité est liée à la polarité des substances bioactives extraite et les solvants d'extraction (**Machiex et al., 2005**).

Ces résultats sont meilleurs à ceux obtenus par **Hayouni et al. (2007)** avec les extraits chloroformiques des fruits de *Juniperus phoenicea* (Cupressaceae) vis-à-vis de *P. aeruginosa* ATCC 9027, où ils ont trouvé des halos des zones d'inhibition de $3.03\text{mm} \pm 0.21$.

L'étude de **Oussalah et al. (2006)** a révélé que l'huile essentielle de *C. sempervirens* n'avait aucun effet sur des souches de *Pseudomonas putida*.

L'étude de **Chéraif et al. (2007)** ont démontré que les diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles issues des feuilles de *C. arizonica* étaient de 15mm pour *P. aeruginosa* ATCC 27853. Ces résultats sont faibles que ceux obtenus pour l'extrait hydroalcoolique de *C. arizonica* rapporté dans la présente étude. On constate que les extraits des feuilles de ces deux arbressont efficaces sur *P. aeruginosa* comparés à leur huile essentielle.

Le rendement variable des extraits revient à la solubilité différentielle des différents composés phénoliques dans les solvants et que cette solubilité est en fonction de leur degré de polymérisation, l'interaction avec les autres constituants et le type de solvant utilisé (**Falleh et al., 2008 ; Debib et al., 2014**)

En combinant les résultats du criblage phytochimique nous avons pumettre en évidence que l'activité antibactérienne est liée à la présence de molécules phénoliques dans les feuilles des deux plantes. Ces métabolites secondaires sont responsables de diverses activités biologiques. Par conséquent, une grande attention a été accordée aux produits naturels dérivés principalement des plantes (**Chaudhary et al., 2012 ; Chaitra et al., 2015**)

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Le présent travail montre le *C. sempervirens* et le *C. arizonica* renferment d'importance qualité en métabolites secondaires, qui constitue la base scientifique de l'utilisation thérapeutique des feuilles étudiés.

Cette étude est donc une contribution phytochimique à la connaissance des deux espèces de Cyprès pour un intérêt considérable dans le domaine de la pharmacologie. Le criblage phytochimique a révélé la présence de divers métabolite secondaire : Leucoanthocyanes, Flavonols, Flavonones, Anthraquinones, Tannins catéchiques, Tannins galliques, Stéroïdes, Terpènes, Saponin, Cardiac glycosides, Terpénoides, Saponosides et les Quinones libres.

La présence de ces métabolites secondaires est en étroite relation avec la polarité des solvants utilisés. En effet le méthanol aqueux (de faible polarité) permet l'extraction de la totalité des métabolites cité à l'exception des Tannins galliques et des Terpènes qui sont présent dans les extraits Chloroformique et Ethérique, respectivement.

Le meilleur rendement d'extraction des trois solvants utilisés, est le chloroforme avec un rendement d'extraction moyen de 61.23% (pour *C. sempervirens*) et 52.27% (pour *C. arizonica*), suivi par le solvant hydro-alcoolique 33.55% et d'éthérique avec 0.39%.

Nos resultats indiquent que l'extraction hydro-alcoolique induit une sensibilité tres pronancée de *P. aeruginosa* avec un diametre de 16,20 mm pour *C. arizonica*. Les extraits ethériques et chloroformiques induisent une inhibition relativement faible

P. aeruginosa est extrêmement sensible vis-à-vis au témoin positif, la Vancomycine, où on note un diamètre de la zone d'inhibition de 24,25 mm il est de même pour l'extrait hydro-alcoolique de *C. sempervirens* où l'organisme test est considéré comme extrêmement sensible avec une zone d'inhibition de l'ordre de 19,95 mm

Il serait intéressant de pousser notre étude au-delà de l'aspect qualitatif et procéder à une identification et une quantification des composés des extraits des Cyprès par une HPLC afin d'identifier avec précision les métabolites secondaires qui jouent un rôle dans l'activité antimicrobienne ainsi élargir le spectre des microorganismes étudiés afin d'évaluer les potentialités des extraits des deux espèces et identifié le/les microorganisme(s) les plus sensibles du fait que l'abondance de ces phytocomposés dans les feuilles de *C. sempervirens* et *C. arizonica*, fait que ces plantes sont prometteuses contre les maladies parasitaire

ANNEXE 1

ANALYSES STATISTIQUES

ANOVA à 1 facteur (Zone d'inhibition)

Plante		Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Cupressus arizonica	Inter-groupes	663,142	5	132,628	24,088	,000
	Intra-groupes	66,073	12	5,506		
	Total	729,215	17			
Cupressus sempervirens	Inter-groupes	607,007	5	121,401	15,124	,000
	Intra-groupes	96,326	12	8,027		
	Total	703,333	17			

ANOVA à 1 facteur (Rendement)

Rendement (%)

Plante		Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Cupressus arizonica	Inter-groupes	2661,052	2	1330,526	5238291,058	,000
	Intra-groupes	,001	3	,000		
	Total	2661,053	5			
Cupressus sempervirens	Inter-groupes	3711,218	2	1855,609	2724829,377	,000
	Intra-groupes	,002	3	,001		
	Total	3711,220	5			

Test d'échantillons indépendants (Test de Student)

Extrait_			Test-t pour égalité des moyennes				
			t	ddl	Sig. (bilatérale)	Intervalle de confiance 95% de la différence	
						Inférieure	Supérieure
Ext. Ethérique	Rendemen t (%)	Hypothèse de variances égales	83,415	2	,000	,8493091	,9416909
		Hypothèse de variances inégales	83,415	1,515	,001	,8317694	,9592306
Ext. Chloroformique	Rendemen t (%)	Hypothèse de variances égales	-333,212	2	,000	-9,0878525	-8,8561475
		Hypothèse de variances inégales	-333,212	1,312	,000	-9,1708633	-8,7731367
Ext. Hydro- alcoolique	Rendemen t (%)	Hypothèse de variances égales	13,980	2	,005	,2294763	,4335237
		Hypothèse de variances inégales	13,980	1,984	,005	,2286914	,4343086

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A.Romani, P. Pinelli, C. Cantini, A. Cimato and D. Heimler. Characterization of Violetto di Toscana, a typical Italian variety of artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J. Food Chem.* Vol. 95. (2006). pp.221-225.
- Alonso, A., E. Campanario and J. L. Martinez (1999). "Emergence of multidrug-resistant mutants is increased under antibiotic selective pressure in *Pseudomonas aeruginosa*." *Microbiology* 145 (Pt 10): 2857-62.
- Al-Snafi A.E.,2016. Medical importance of *Cupressus sempervirens*- A review. *IOSR Journal Of Pharmacy*, 6(6) : 66-76.
- Anulika N.P., Ignatius E.O., Raymond E.S.,Osasere O-I., AbiolaA.H.,2016 -The Chemistry Of Natural Product: Plant Secondary Metabolites. *InternationalJournalOfTechnologyEnhancementsAndEmergingEngineeringResearch*,volume 4(8),pp.2347-4289.
- Bakker, P. A., D. C. Glandorf, M. Viebahn, T. W. Ouwens, E. Smit, P. Leeftang, K. Wernars, L. S. Thomashow, J. E. Thomas-Oates, and L. C. van Loon. (2002). Effects of *Pseudomonas putida* modified to produce phenazine-1-carboxylic acid and 2,4- diacetylphloroglucinol on the microflora of field grown wheat. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81:617-624.
- Barbier, F. & Wolff, M. (2010). [Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: towards a therapeutic dead end?]. *Med Sci (Paris)* 26, 960-968.
- Berg, G., L. Eberl and A. Hartmann (2005). "The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria." *Environ Microbiol* 7(11): 1673-85.
- Bonomo, R. A. & Szabo, D. (2006). Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 43, S49-56.
- Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X., and L. Gardan. (2000). The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* 20, 51-53.
- Bouyahyaoui A., 2017. Contribution à la valorisation des substances naturelles : Etude des huiles essentielles des cupressacées de la région de l'Atlas algérien. Thèse Pour l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences biologique. Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, 89p.

- Brofas G., Karetos G., Dimopoulos P., Tzagari C., 2006. The natural environment of *Cupressus sempervirens* in Greece as a basis for its use in the Mediterranean region. *Land Degrad. Develop.*, 17 : 645–659.
- Bssaibis F, Gmira N, Meziane M (2009) Activité antibactérienne de *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter. *Rev Microbiol Ind San Environ* 3:44–55
- Carmeli, Y., Troillet, N., Eliopoulos, G. M. & Samore, M. H. (1999). Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 1379–1382.
- Caudullo G., de Rigo D., 2016. *Cupressus sempervirens* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. *European Atlas of Forest Tree Species*, 3 :87-89.
- Cavallo, J. D. F., R. (2004). *Pseudomonas aeruginosa*, Pôle santé sécurité soins du médiateur de la République.
- Celiktas OY, Hames-Kocabas EE, Bedir E, et al. (2007) Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis* L., depending on location and seasonal variations. *Food Chem* 100:553–9
- Chaitra, S., Kumar, N.N., Shalini, P., Sindhu, R., and Raj, K.S., *Phytochemical analysis and antibacterial activity of dalbergia paniculata roxb.* *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2015. 6(2): p. 712-716.
- Chaudhary, H.J., Shahid, W., Bano, A., Ullah, F., Munis, F., Fahad, S., and Ahmad, I., *In vitro analysis of Cupressus sempervirens L. plant extracts antibacterial activity.* *Journal of Medicinal Plants Research*, 2012. 6(2): p. 273-276.
- Chéraif I., Ben Jannet H., Hammami M., Khouja M.L. & Mighri Z. (2007). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cupressus arizonica* Greene *Biochem. Syst. Ecol.* 35:813-20.
- Chin-A-Woeng, T. F., D. van den Broek, G. de Voer, K. M. van der Drift, S. Tuinman, J. E. Thomas-Oates, B. J. Lugtenberg, and G. V. Bloemberg. (2001). b. Phenazine-1- carboxamide production in the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is regulated by multiple factors secreted into the growth medium. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14:969-979.
- Chin-A-Woeng, T. F., G. V. Bloemberg, I. H. Mulders, L. C. Dekkers, and B. J. Lugtenberg. (2000). Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13:1340-1345.

- Chin-A-Woeng, T. F., G. V. Bloemberg. and B. J. Lugtenberg. (2003). Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New. Phyto.* 157 : 503-523.
- Chin-A-Woeng, T. F., J. E. Thomas-Oates, B. J. Lugtenberg, and G. V. Bloemberg. (2001). Introduction of the *phzH* gene of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 extends the range of biocontrol ability of phenazine-1-carboxylic acid-producing *Pseudomonas* spp. strains. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14:1006-1015.
- Cho, J. C. and J. M. Tiedje (2000). "Biogeography and degree of endemicity of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil." *Appl Environ Microbiol* 66(12): 5448-56.
- Chung, D. R., Song, J. H., Kim, S. H., Thamlikitkul, V., Huang, S. G., Wang, H., So, T. M., Yasin, R. M., Hsueh, P. R., Carlos, C. C., Hsu, L. Y., Buntaran, L., Lalitha, M. K., Kim, M. J., Choi, J. Y., Kim, S. I., Ko, K. S., Kang, C. I. & Peck, K. R. (2011). High Prevalence of Multidrug- Resistant Non-Fermenters in Hospital-Acquired Pneumonia in Asia. *Am J Respir Crit Care Med* 184, 1409-1417.
- Cometta, A., Baumgartner, J. D., Lew, D., Zimmerli, W., Pittet, D., Chopart, P., Schaad, U., Herter, C., Eggimann, P., Huber, O., Ricou, B., Suter, P., Auckenthaler, R., Chiolerio, R., Bille, J., Scheidegger, C., Frei, R. & Glauser, M. P. (1994). Prospective randomized comparison of imipenem monotherapy with imipenem plus netilmicin for treatment of severe infections in nonneutropenic patients. *Antimicrob Agents Chemother* 38, 1309–1313.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322.
- D'Argenio, D. A., L. A. Gallagher, C. A. Berg and C. Manoil (2001). "Drosophila as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection." *J Bacteriol* 183(4): 1466-71.
- Debib A., Tir-touil A., Mothana RA., Meddah B ET Sonnet P., 2014. Phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of two fruit varieties of *Algerian Ficus carica L.* *Journal of Food Biochem.* Volume (n°38), P: 207–215.
- Deligianni, E., S. Pattison, D. Berrar, N. G. Ternan, R. W. Haylock, J. E. Moore, S. J. Elborn and J. S. Dooley (2010). "*Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates of similar RAPD genotype exhibit diversity in biofilm forming ability in vitro." *BMC Microbiol* 10: 38.
- Drissa D, Rokia S, Hamsétou Y, Aminata T, Kassoum C, Ababacar M. Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au mali. *C.R. Chimie* 7 (2004).pp.1073-1080
- Dubois, V., Arpin, C., Melon, M., Melon, B., Andre, C., Frigo, C. & Quentin, C. (2001). Nosocomial outbreak due to a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12: efficacy

of cefepime-amikacin therapy and analysis of beta-lactam resistance. *J Clin Microbiol* 39, 2072-2078.

- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. and Abdelly C.(2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Compt. Rend.Biol.* Vol. 331. pp. 372-379.
- Farhat, A., Ginies, C., Romdhane, M. and Chemat, F. (2009) Eco-friendly and cleaner process for isolation of essential oil using microwave energy: Experimental and theoretical study. *Journal of Chromatography A*, 1216(26), 5077-5085.
- Fenton, A. M., P. M. Stephens, J. Crowley, M. O'Callaghan, and F. O'Gara. (1992). Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3873-3878.
- Fish, D. N., Piscitelli, S. C. & Danziger, L. H. (1995). Development of resistance during antimicrobial therapy: a review of antibiotic classes and patient characteristics in 173 studies. *Pharmacotherapy* 15, 279–291.
- Floret, D. (2009). [Immunization: process of elaborating guidelines and their evolution in France]. *Ann Pharm Fr* 67, 219-223.
- Fotedar, R., E. Nayar, J. C. Samantray, Shriniwas, U. Banerjee, V. Dogra and A. Kumar (1989). "Cockroaches as vectors of pathogenic bacteria." *J Commun Dis* 21(4): 318-22.
- Giamarellou, H. (2002). Prescribing guidelines for severe *Pseudomonas infections*. *J Antimicrob Chemother* 49, 229–233.
- Graglia E, R Julkunen-Tiito, G R Shaver. (2001) Environmental control and intersite variations of phenolics in *Betula nana* in tundra ecosystems. *New Phytologist*. 151: 227-236.
- Green, S. K., Schroth, M. N., Cho, J. J., Kominos, S. K. & Vitanza-jack, V. B. (1974). Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol* 28, 987-991.
- Haas, D., and C. Keel. (2003). Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Peudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41:117-153.
- Haluk J., Roussel C., 2000. Caractérisation et origine des tropolones responsables de la durabilité naturelle des Cupressacées. Application potentielle en préservation du bois. *Annals of Forest Science*, 57(2000) :819–829.

- Harris, A. D., Perencevich, E., Roghmann, M. C., Morris, G., Kaye, K. S. & Johnson, J. A. (2002). Risk factors for piperacillin–tazobactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 854–858.
- Hayouni E.A., Abedrabba M., Bouix M. & Hamdi M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian (*Quercus coccifera* L.) and (*Juniperus phoenicea* L.) fruit extracts. *Food Chem.* 105:1126-34.
- Hireche B., Ferhat H., 2019. Etude de l'effet inhibiteur des huiles essentielles de Cyprés (*Cupressus Sempervirens*. L) sur la corrosion de l'acier X70 (sans et avec soudure). Mémoire de master. Université Mohamed Khider de Biskra, faculté des sciences exactes et des sciences de la nature,154p.
- INRA PACA. 2011. Prévention des allergies au pollen de Cupressacées. www.inra.fr/les_partenariats/collaborations_et_partenaires/entreprises/en_direct_des_labos/prevention_des_allergies_au_pollen_de_cupressacees
- Khan, N. H., M. Ahsan, S. Yoshizawa, S. Hosoya, A. Yokota and K. Kogure (2008). "Multilocus sequence typing and phylogenetic analyses of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from the ocean." *Appl Environ Microbiol* 74(20): 6194- 205.
- Kim, M. S., Y. C., Kim, and Cho, B. H. (2004). Gene expression analysis in cucumber leaves primed by root colonization with *Pseudomonas chlororaphis* O6 upon challenge- inoculation with *Corynespora cassiicola*. *Plant Biol.* Mar-Apr ;6(2):105-108.
- Kliebenstein D.J.,2004-Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. *Plant, Cell and Environment*, volume 27(6), pp 675_684
- Kollef, K. E., Schramm, G. E., Wills, A. R., Reichley, R. M., Micek, S. T. & Kollef, M. H. (2008). Predictors of 30-day mortality and hospital costs in patients with ventilator-associated pneumonia attributed to potentially antibiotic-resistant Gram-negative bacteria. *Chest* 134, 281–287.
- Lanini, S., S. D'Arezzo, V. Puro, L. Martini, F. Imperi, P. Piselli, M. Montanaro, S. Paoletti, P. Visca and G. Ippolito (2011). "Molecular epidemiology of a *Pseudomonas aeruginosa* hospital outbreak driven by a contaminated disinfectant- soap dispenser." *PLoS One* 6(2): e17064.
- Lattanzio V., 2013 - *Phenolic Compounds: Introduction*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 1543-1573.

- Lister, P. D., Wolter, D. J. & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 22, 582-610.
- Lolans, K., Queenan, A. M., Bush, K., Sahud, A. & Quinn, J. P. (2005). First nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing an integron-borne metallo-beta-lactamase (VIM-2) in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 3538-3540.
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L. and Pier, G. B. (2000). "Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist." *Microbes Infect* 2(9): 1051-60.
- Macheix J.J., Fleuriet A. et Jay-Allemand C., 2005 – les composées phénoliques des végétaux.
- Maeda, K., Kobayashi, Y., Oie, S., Ishida, S., Okano, Y., Kobayashi, T., Shikichi, K., Mizuno, H. & Kamiya, A. (2008). Antimicrobial effects of drugs against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Biol Pharm Bull* 31, 1898–1901.
- Martin, D. W., Schurr, M. J., Mudd, M. H., Govan, J. R., Holloway, B. W. & Deretic, V. (1993). Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8377-8381.
- Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F., Delaney, S. M., Soule, M. J., Phillips, G., and Thomashow, L. S. (2001). Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 183:6454- 6465.
- Micek, S. T., Welch, E. C., Khan, J., Pervez, M., Doherty, J. A., Reichley, R. M., Hoppe-Bauer, J. Dunne, W. M. & Kollef, M. H. (2011). Resistance to empiric antimicrobial treatment predicts outcome in severe sepsis associated with Gram-negative bacteremia. *J Hosp Med* 6, 405-410.
- Molino P., 2005. A guide to medicinal plants in North Africa.Spain. IUCN centre for Mediterranean cooperation, 269p.
- Morrison, A. J., Jr. and R. P. Wenzel (1984). "Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*." *Rev Infect Dis* 6 Suppl 3: S627-42.
- Nakamura, S., Higashiyama, Y., Izumikawa, K., Seki, M., Kakeya, H., Yamamoto, Y., Yanagihara, K., Miyazaki, Y., Mizuta, Y. & Kohno, S. (2008). The roles of the quorum-sensing system in the release of extracellular DNA, lipopolysaccharide, and membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa*. *Jpn J Infect Dis* 61, 375–378.
- Ngameni B, Kuete V, Simo IK, et al (2009) Antibacterial and antifungal activities of the crude extract and compounds from *Dorstenia turbinata* (Moraceae). *S Afr J Bot* 75:256–61

- Oussalah M., Caillet S., Saucier L. & Lacroix M. (2006). Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*. 73: 236-44.
- Pollack, M. (1995). *Pseudomonas aeruginosa*. Churchill Livingstone, New York, NY, G. L. Mandell, R. Dolan, and J. E. Bennett.
- Ponce AG, Fritz R, Del Valle C, et al (2003) Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lwt-Food Sci Technol* 36:679–84
- Quinn, J. P., Dudek, E. J., DiVincenzo, C. A., Lucks, D. A. & Lerner, S. A. (1986). Emergence of resistance to imipenem during therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis* 154, 289– 294.
- Raaijmakers, J. M., D. M. Weller., and L. S. Thomashow. (1997). Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Appl Environ Microbiol* Vol. 63, No. 3, 881-887.
- Rahman, R. N., L. P. Geok, M. Basri and A. B. Salleh (2005). "Physical factors affecting the production of organic solvent- tolerant protease by *Pseudomonas aeruginosa* strain K." *Bioresour Technol* 96(4): 429-36.
- Rashid, M. H. and A. Kornberg (2000). "Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(9): 4885-90.
- Regnath, T., M. Kreutzberger, S. Illing, R. Oehme and O. Liesenfeld (2004). "Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* in households of patients with cystic fibrosis." *Int J Hyg Environ Health* 207(6): 585-8.
- Rello, J. & Diaz, E. (2003). Pneumonia in the intensive care unit. *Crit Care Med* 31, 2544–2551.
- Remold, S. K., C. K. Brown, J. E. Farris, T. C. Hundley, J. A. Perpich and M. E. Purdy (2011). "Differential Habitat Use and Niche Partitioning by *Pseudomonas* Species in Human Homes." *Microb Ecol*.
- Rodriguez-Martinez, J. M., Poirel, L. & Nordmann, P. (2009). Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 4783-4788.
- Sabuda, D. M., Laupland, K., Pitout, J., Dalton, B., Rabin, H., Louie, T. & Conly, J. (2008). Utilization of colistin for treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 19, 413–418.

- Saitou, K., K. Furuhashi, Y. Kawakami and M. Fukuyama (2009). "Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from cockroaches Captured in hospitals in Japan, and their antibiotic susceptibility." Biocontrol Sci 14(4): 155-9.
- Sebbane B., Khaldi M., 2019. Quelques composés secondaires isolés à partir des plantes de la famille de Cupressacée (*Cupressus sempervirens*, *Juniperus oxycedrus* et *Juniperus communis*) : extraction, caractérisation et activité antibactérienne. Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme master. Université Akli Mohand Oulhadj – Bouira, faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre, 67p.
- Shahali Y., Sutra J.P., Peltre G., Charpin D., Sénéchal H. Poncet P., 2010. IgE Reactivity to Common Cypress (*C. sempervirens*) Pollen Extracts: Evidence for Novel Allergens. WAO Journal, 3 :229–234.
- Shunying Z, Yang Y, Huaidong Y, et al (2005) Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. J Ethnopharmacol 96:151–8
- Sonnleitner, E. & Haas, D. (2011). Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species. *Appl Microbiol Biotechnol* 91, 63-79.
- Sostarich, A. M., Zollmann, D., Haefner, H., Luetticken, R., Schulze-Roebecke, R. & Lemmen, S. W. (2008). Impact of multiresistance of Gram-negative bacteria in bloodstream infection on mortality rates and length of stay. *Infection* 36, 31–35.
- Thomashow, L. S. (1996). Biological control of plant root pathogens. *Curr Opin Biotechnol* 7:343-347.
- Thomashow, L. S., and D. M. Weller. (1988). Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J Bacteriol* 170:3499-3508.
- Tsuji, A., Y. Kaneko, K. Takahashi, M. Ogawa and S. Goto (1982). "The effects of temperature and pH on the growth of eight enteric and nine glucose non-fermenting species of gram-negative rods." Microbiol Immunol 26(1): 15-24.
- Vasil, M. L. (1986). "*Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology." J Pediatr 108(5 Pt 2): 800-5.
- Vettoretti, L., Floret, N., Hocquet, D., Dehecq, B., Plesiat, P., Talon, D. & Bertrand, X. (2009). Emergence of extensive-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a French university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28, 1217–1222.
- Young, V. M. (1977). *Pseudomonas aeruginosa*: Ecological Aspects and Patient Colonization, Books on Demand.