

RÉPUBLIQUE ALGERIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA

RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ DE BLIDA I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Biotechnologies

THÈSE DE DOCTORAT

En Sciences Agronomiques

CARACTÉRISATION ET VALORISATION DES MÉTABOLITES
SECONDAIRES DE *TEUCRIUM POLIUM* ET *CYTISUS*
TRIFLORUS L'HER: EFFET SAISONNIÉR ET RÉGIONAL
SUR L'EXPRESSION DES MOLÉCULES BIOACTIVES.

Par

Selma DAGHBOUCHE

Devant le jury composé de:

A.GUENDOZ-BENRIMA	Professeure, U. Blida I	Présidente
S.A. SNOUSSI	Professeur, U. Blida I	Promoteur
Z.E. DJAZOULI	Professeur, U. Blida I	Co-promoteur
M.N. BOUKHATEM	M.C.A,U. Blida I	Examineur
F. ACHEUK	M.C.A, U. Boumerdès	Examinatrice

Blida, le 27 septembre 2018

RÉSUMÉ

L'impact de la variation saisonnière sur les effets interactifs entre, le contenu de synthèse métabolique secondaire et le pouvoir antimicrobien a été conduit sur deux espèces des hautes altitudes à savoir; la Fabacée; *Cytisus triflorus* L'Her(monts de l'Atlas Blidéen – région de Chréa)et la Lamiacée; *Teucrium polium* (monts des Aurès-Chélia - région de Khenchela).L'évaluation temporelle de la cinétique d'accumulation des molécules bioactives et leur bio-caractérisation selon l'indice phénologique visent de persuader la période d'incorporation ou d'exsudation des tissus contenant les molécules bioactives qui doivent coïncider avec le stade phénologique optimal et l'effet bioactif approprié.

Les résultats du profil saisonnier du contenu phytochimique des extraits aqueux et méthanoliques pendant les trois stades cruciaux du cycle phénologique (stade végétatif, stade floraison et stade fructification), ont met en évidence un important rendement en acides phénoliques, avec une concentration de phénols totaux et de flavonoïdes dans les extraits du stade végétatif de *C. triflorus* L'Her et de *T. polium*. De même, les extraits méthanoliques du stade végétatif ont fournis les meilleurs potentiels antibactériens contre *Staphylococcus aureus* et *Salmonella enterica* pour les extraits de *C. triflorus* et contre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, et *Salmonella enterica* pour *T. polium* par rapport aux extraits des stades floraison et fructification.

Cependant, l'analyse chimique par la CG/SM a montré que les huiles essentielles des différents stades arborent des variations qualitatives et quantitatives selon l'indice phénologique. Les stades phénologiques ont affiché d'une part, une variation en termes de composés volatiles majoritaires selon une gradation descendante; le β -linalool> le géraniol> l' α -Terpinène> le rétinal> l'eugénol, et d'autre part, par l'existence d'une similarité en composition dans les HE's des stades végétatif et fructification et d'une divergence très imposante par rapport à celle du stade floraison. Les résultats des activités antimicrobiens procédés par le test préliminaire; méthode de diffusion et par les paramètres quantitatifs; MIC et MMC ont dénoncés que l'activité des huiles essentielles était liée à l'indice phénologique en rapport avec l'accumulation de ces composés volatiles en particulier l'huile essentielle du stade végétatif qui a été la plus adaptative dans la consécration inhibitrice. Les mêmes résultats font apparaitre que les huiles essentielles exerçaient des activités à impact significatif envers les bactéries à Gram positif à savoir; *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*, ainsi qu'à la bactérie à Gram négatif *Escherichia coli*. L'activité antifongique a été signalé envers les champignons; *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* et *Alternaria alternata* et même envers la levure *Candida albicans*.

Néanmoins, l'apogée du rendement en huiles essentielles de *T. polium* a été signalé au niveau du stade végétatif, tandis que l'analyse par CG/SM a montré que les HE's présentent des variations qualitatives et quantitatives selon l'indice phénologique. Les stades phénologiques affichaient une variation en termes de composés majoritaires selon un gradient négatif; α -pinène > β -pinène > D- Limonène > β -myrcène > Guaia-1(10),11-diene. De même, les essais antimicrobiens effectués par les méthodes qualitatives et quantitatives ont dévoilés que l'activité des huiles essentielles était liée à la composition chimique. Les résultats font apparaitre que les bactéries *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* (Gram

positif) étaient plus sensible par rapport aux bactéries *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* et *Pseudomonas aeruginosa* (Gram négatif). En revanche, *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus brasiliensis* ont été les plus sensible par comparaison aux *Fusarium solani*, *Candida albicans* et *Alternaria alternata*, en tenant compte de l'importance marqué par l'efficacité des trois fortes doses (Dose1 au Dose 3) testées pour évaluer le pouvoir de tolérance des huiles essentielles des deux plantes modèles dans cette étude.

Mots clés: saisonnalité, métabolites secondaire, activité antimicrobienne, extrait méthanolique, extrait aqueux, huiles essentielles, stades phénologiques, stade végétatif, stade floraison, stade fructification.

ABSTRACT

Characterization and valorisation of the secondary metabolites of *Teucrium polium* and *Cytisus triflorus* L'Her: seasonal and regional effect on the expression of bioactive molecules.

The seasonal variation's impact on the interactive effects between secondary metabolic synthesis content and antimicrobial potency was conducted on two high altitude species ie; the Fabacea; *Cytisus triflorus* L'Her (Atlas Mountains Blidéen, Chréa region) and the Lamiacea; *Teucrium polium* (Aurès Mountains; Khenchela region). The temporal evaluation of the accumulation kinetics of bioactive molecules and their bio-characterization according to the phenological index aim at persuading the incorporation period or the tissues exudation containing the bioactive molecules which must coincide with the optimal phenological stage and the appropriate bioactive effect.

The seasonal profile of the phytochemical content of the aqueous and methanolic extract's during the three crucial stages of the phenological cycle (vegetative stage, flowering and fruiting), showed a high yield of phenolic acids with a concentration of total phenols and of flavonoids in the extracts of the vegetative stage from *C. triflorus* and *T. polium*. Similarly, methanolic extracts from the vegetative stage provided the best antibacterial potentials against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* for *C. triflorus* extracts and against; *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella enterica* for *T. polium* compared to extracts from flowering stages and fruiting.

However, chemical analysis by GC / MS revealed that the essential oils of the different stages display qualitative and quantitative variations according to the phenological index. The phenological stages indicated on the one hand a variation in terms of major volatile compounds according to a descending gradation; β -linalool > Geraniol > l¹-Terpinene > Retinal > Eugenol, and on the other hand the existence of a similarity in the Eo's composition of the vegetative and fruiting stages and a very large divergence with respect to that of the flowering stage. The results of the antimicrobial activities performed by the preliminary test; dissemination method and by the quantitative parameters; MIC and MMC denounced that the Eo's activity was linked to the phenological index in relation to the accumulation of these volatile compounds, in particular the Eo's of the vegetative stage which was the most adaptive in the inhibitory consecration. The same results make appear that the Eo's exerted activities with a significant impact against the Gram-positive bacteria, namely; *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*, as well as the Gram-negative bacteria *Escherichia coli*. Antifungal activity has been signaled against fungi; *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* and *Alternaria alternata* and even towards the yeast *Candida albicans*.

Nevertheless, the peak yield of *T. polium* Eo's has been reported at the vegetative stage, whereas GC / MS analysis has shown that the Eo's show qualitative and quantitative variations according to the phenological index. The phenological stages show a variation in terms of majority compounds according to a negative gradient; α -pinene > β -pinene > D-Limonene > β -myrcene > Guaia-1(10),11-diene. Similarly, the antimicrobial assays carried out by the qualitative and quantitative methods revealed that the activity of the Eo's was related to the chemical composition. The results showed that *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* bacteria (Gram positive) were more sensitive than *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria (Gram negative). However, *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus brasiliensis* were the most sensitive compared to *Fusarium solani*, *Candida albicans* and *Alternaria alternata*, taking into account the significant importance of the three high doses (Dose1 at Dose 3) tested to evaluate the tolerance power of the essential oils of the two model plants in this study.

Key words: seasonality, secondary metabolites, antimicrobial activity, methanolic extract, aqueous extract, essential oil, phenological stages, vegetative stage, fruiting stage.

ملخص

تحديد و تقييم الأيضات الثانوية ل *Teucrium polium* و *Cytisus triflorus* L'Her : التأثيرات الإقليمية والموسمية على المكونات الحيوية النشطة.

تمت دراسة تأثير التغيرات الموسمية على التأثيرات التفاعلية بين محتوى التوليف الأيضي الثانوي والفاعلية المضادة للميكروبات لنوعين من نباتات المناطق المرتفعة؛ القرنية؛ *Cytisus triflorus* L'Her المنتقاة من جبال الأطلس البليدي - منطقة الشريعة و كذا الشفوية؛ *Teucrium polium* من جبال الاوراس، مرتفع شلية - منطقة خنشلة. يهدف التقييم الزمني لحركية تكس الجزيئات النشطة بيولوجياً وتوصيفها الحيوي وفقاً للمؤشر الفينولوجي إلى تحديد فترة ادماج أو نضوج الأنسجة المحتوية على هذه الجزيئات والتي يجب أن تتزامن مع المرحلة الفينولوجية المثلى و كذا مع التأثير المناسب للفاعلية البيولوجية.

أظهرت نتائج الصيغة الموسمي للمحتوى الكيميائي النباتي للمستخلصات المائية والميثانولية خلال المراحل الثلاث من الدورة الفينولوجية (المرحلة الخضرية، مرحلة الإزهار ومرحلة الإثمار)، إنتاجية عالية من الأحماض الفينولية مرفقة بتركيز من الفينولات الكلج و الفلافونويدات و ذلك في المستخلصات الخاصة بالمرحلة الخضرية لكل من *C. triflorus* L'Her و *T. polium*. كذلك، فإن المستخلصات الميثانولية للمرحلة الخضرية أظهرت أفضل الإمكانيات المضادة للبكتيريا ضد *Staphylococcus aureus* و *Salmonella enterica* وذلك بالنسبة لمستخلصات *C. triflorus* و كذا ضد *Bacillus subtilis*، *Staphylococcus aureus*، و *salmonella enterica* و ذلك بالنسبة لمستخلصات *T. polium* وهذا بالمقارنة مع مستخلصات كل من مرحلتي الإزهار و الإثمار. بينما، أظهر التحليل الكيميائي بواسطة CG / SM أن الزيوت الأساسية في المراحل المختلفة تعرض اختلافات نوعية وكمية وفقاً للمؤشر الفينولوجي. أوضحت المراحل الفينولوجية من ناحية، تبايناً من حيث المركبات الطيارة الغالبة و ذلك حسب تدرج تنازلي لهذه المركبات؛ β -Linalool < Géraniol < Terpinene < Rétinal < Eugénol، ومن الناحية الثانية، وجود تشابه في تكوين الزيوت الأساسية للمرحلتين: الخضرية والإثمار و كذا وجود تباعد مقارنة مع زيوت مرحلة الإزهار. نتائج الأنشطة المضادة للميكروبات التي تمت عن طريق الاختبار الأولي؛ طريقة الانتشار و كذا عن طريق المعايير الكمية؛ CMI و CMM، أظهرت أن نشاط الزيوت الأساسية كان مرتبطاً بالمؤشر الفينولوجي و ذلك فيما يتعلق بتراكم هذه المركبات الطيارة وعلى وجه الخصوص الزيت الأساسي للمرحلة الخضرية التي كانت الأكثر تأقلماً في الحماية المثبطة. أظهرت نفس النتائج أن هذه الزيوت الأساسية تمارس أنشطة ذات تأثير ذو معنى على بكتيريا *Bacillus* " Gram positif و *Staphylococcus aureus* و *subtilis*، بالإضافة إلى بكتيريا *Escherichia coli* " Gram négatif. و قد تم الإشارة أيضاً إلى النشاط المضاد للفطريات ضد *Fusarium solani*، *Fusarium oxysporum*، و *Alternaria alternata* وحتى ضد *Candida albicans*.

بالإضافة إلى ذلك، فقد تم الإشارة إلى أن ذروة إنتاج الزيوت العطرية ل *T. polium* التي قد سجلت في المرحلة الخضرية، في حين أظهر التحليل بواسطة CG / SM أن زيوتها الأساسية تظهر اختلافات كمية و نوعية وفقاً للمؤشر الفينولوجي. أبدت المراحل الفينولوجية تبايناً من حيث المركبات الغالبة وفقاً لتدرج سلبى؛ β -pinène < α -pinène < D-Limonène < β -myrcène < Guaia-1(10),11-diene. وبالمثل، كشفت التجارب المضادة للميكروبات التي أجريت بالطرق النوعية والكمية أن نشاط الزيوت العطرية كان مرتبطاً بالتركيب الكيميائي. في حين انه أظهرت النتائج أن البكتيريا *Bacillus subtilis* و *Staphylococcus aureus* (Gram positif) كانت أكثر حساسية من البكتيريا *Escherichia coli*، *Salmonella enterica* و *Pseudomonas aeruginosa* (Gram négatif). من ناحية أخرى، كانت *Fusarium oxysporum* و *Aspergillus brasiliensis* الأكثر حساسية مقارنة مع *Candida albicans*، *Fusarium solani*، و *Alternaria alternata* مع الأخذ بعين الاعتبار الأهمية الكبيرة للجرعات الثلاث العالية (Dose 1 إلى Dose 3) التي تم تجربتها لتقييم قوة مقاومة الزيوت الأساسية للنباتتين النموذجيتين في هذه الدراسة.

الكلمات الرئيسية: الموسمية، الأيضات الثانوية، النشاط المضاد للميكروبات، المستخلص الميثانولي، المستخلص المائي، الزيوت الأساسية، المراحل الفينولوجية، المرحلة الخضرية، مرحلة الإزهار، مرحلة الإثمار.

REMERCIEMENTS

Avant tout, je remercie **Dieu** de m'avoir donné la force et le courage nécessaire pour réaliser ce travail.

Je tiens à exprimer mes remerciements et mes respects aux membres du jury de thèse d'avoir accepté d'honorer et d'enrichir mon travail. Pour cela, je leur exprime ma profonde reconnaissance.

Je commencerais par remercier Madame **GUENDOZ-BENRIMA Atika** professeure à l'Université de Blida 1 pour avoir aimablement accepté la responsabilité de présider le jury de ma thèse.

Je suis également honorée d'avoir eu comme rapporteur de cette thèse Monsieur le Docteur **BOUKHATEM Mohamed Nadjib** Maître de conférences A à l'Université de Blida I. Je le remercie énormément.

Je voudrais remercier aussi Madame **ACHEUK Fatma** Maître de conférences A à l'Université M'Hamed Bougara de Boumerdès, d'avoir accepté de faire partie du jury de ma thèse.

A l'issue de ce travail de recherche, Je tiens à exprimer mes remerciements à Monsieur **SNOUSSI Sid Ahmed**, professeur à l'Université de Blida 1, et directeur de cette thèse, pour m'avoir renouvelé sa confiance jusqu'à la fin de la thèse.

Au terme de quelques années de travail, cette modeste thèse a vu le jour et elle ne saurait être valorisée sans l'honoration d'avoir eu comme la pertinente co-direction de Monsieur **DJAZOULI Zahr-Eddine** professeur à l'Université de Blida 1. Je lui dois l'essentiel de ma formation en recherche. C'est à lui que reviennent mes plus vifs remerciements pour m'avoir conseillée et m'avoir renouvelé sa confiance jusqu'à la fin de la thèse. Tout au long de ces années de travail, il n'a pas cessé de me guider et de m'instruire, sans jamais se fatiguer. Je le remercie pour son savoir, sa disponibilité, son écoute, sa modestie, son honnêteté, sa bonté et son humanisme. Jamais je ne saurai lui exprimer toute ma gratitude tant il m'a aidé dans ce travail. Qu'il trouve au moins à travers ces quelques lignes l'expression sincère de mon profond respect et de ma profonde reconnaissance.

Je suis particulièrement reconnaissante envers les responsables de l'Institut National de Criminologie et de Criminalistique de Bouchaoui, de m'avoir accueillie au sein de leur établissement et de m'avoir facilité l'accès afin de réaliser mes analyses chimiques; Monsieur **ROMADI**, Monsieur **DEKHILI**, ainsi que Monsieur

BOULESSNAM, responsables des laboratoires d'incendies (unité de Chromatographie en phase Gazeuse couplé à un Spectrométrie de Masse et unité de Chromatographie phase liquide à haute performance couplée à un détecteur DAD) pour avoir consacré de leurs temps à ces analyses.

Je tiens à remercier très vivement Madame **CHORFI Rafika** directrice des laboratoires de Hall technologies de l'Université de Khenchela de m'avoir accordé sa confiance et de m'avoir permis de réaliser la partie de dosage semi-quantitatif de mes échantillons dans d'excellentes conditions scientifiques et matérielles. Je tiens à remercier toute son équipe.

C'est aussi avec beaucoup de gratitude que je remercie les responsables de la Station Météorologique pour leur aide à recueillir les données climatologiques.

Mes sincères remerciements vont également à monsieur **BALI Tarek** pour m'avoir fournit les souches utilisées dans l'étude de l'activité antibactérienne, et à Monsieur le professeur **EL-HATTAB** pour sa contribution significative pour son aide dans l'interprétation des spectres CG/SM des huiles essentielle et ainsi à monsieur le professeur **BOUTOUMI Hocine** pour m'avoir fourni certaines produits utilisées lors des préparations.

Je ne pourrais oublier de remercier toutes mes chères amies: **Fairouz, Hana, Kahina, Naouel** et plus spécialement **SARMOUM Radhia** doctorante à L'ENSA, **BENAZZOUK Salima**, Mme **LAMITTI Salima, Lina** et sa sœur **Manel** et Mlle. **MEBARKI Nadjat**.

A Madame **Amina DJEMAI**, pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Enfin, je remercie tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont aidé et soutenu afin d'accomplir ce présent travail.

DÉDICACES

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut. Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect et la reconnaissance.

Ainsi, c'est tout simplement que je dédie ce modeste travail à:

Ma tendre mère, pour son amour, ces efforts et ces sacrifices.

Je ne trouverai jamais de mots pour t'exprimer mon profond attachement et ma reconnaissance pour l'amour, la tendresse et surtout pour ta présence dans mes moments les plus difficiles, et si j'en suis arrivé là, ce n'est que grâce à toi ma maman adorée. Par cette thèse, je lui ai rendu une infime partie de ce qu'elle a fait pour moi durant toute ma vie.

Puisse ce jour être la récompense de tous les efforts et l'exaucement de tes prières tant formulées.

Mon cher père:

Merci pour ta présence rassurante. Que Dieu procure santé et longue vie afin que je puisse vous combler à mon tour.

Mon très cher mari:

Avec ton comportement agréable, je me sens à l'apogée des honneurs et imbattable. La compréhension, la clarté, la bonne entente et la sincérité dont tu as toujours fait preuve, m'ont tonifiée moralement et physiquement. Merci beaucoup. Je te souhaite une florissante santé, un prospère avenir et une vie couronnée de succès. Je te dédie ce travail en témoignage de mon très grand amour. Que Dieu te protège.

Mes trois chers frères:

Aucun mot ne saura exprimer tout l'amour que j'ai pour vous. Je vous dédie ce travail avec tous mes souhaits de bonheur et de prospérité.

Ma belle mère, mes chères belles soeurs, mes beaux frères, mes tantes et mes oncles:

Je vous dédie ce travail en témoignage de mon grand amour et ma profonde affection. Que Dieu vous procure bonne santé et longue vie.

Très cher Professeur Djazouli:

Votre aide et vos conseils constituaient les facteurs cruciaux de la réussite de ce travail. Vous êtes la source de mon savoir et vous m'avez donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. Je vous dédie ce travail en témoignage de mon très grand respect.

Que Dieu vous procure bonne santé et longue vie et que dieu te protège pour ta famille, pour tes étudiants et pour tes doctorants.

A tous ceux qui me sont chers et que j'ai omis de citer

...Je dédie ce travail.

DAHBOUCHE S.

SOMMAIRE

RÉSUMÉ.....	2
ABSTRACT.....	4
ملخص.....	6
REMERCIEMENTS.....	7
DÉDICACE.....	9
SOMMAIRE.....	11
LISTE DES ILLUSTRATIONS ET GRAPHIQUES.....	19
LISTE DES TABLEAUX.....	21
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	24
CHAPITRE 1: APERÇUS BIBLIOGRAPHIQUES.....	28
1. Nature et distribution des métabolites secondaires végétaux.....	28
2. Classification et voies de synthèse des métabolites secondaires.....	29
2.1. Terpénoïdes (Huiles essentielles).....	29
2.1.1. Variabilité phytochimique.....	30
2.1.2. Propriétés physico-chimiques	32
2.1.3. Méthodes d'extraction	32
2.1.3.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau.....	32
2.1.3.2. Extraction par hydro distillation.....	32
2.1.4. Méthodes d'analyses (Chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse «CPG/SM»).....	32
2.2. Composés phénoliques.....	33

	12
2.2.1. Méthodes d'extraction.....	34
2.2. 2. Méthodes de dosage et d'identification.....	34
2.3. Métabolites secondaires azotés.....	35
3. Propriétés et intérêts des métabolites secondaires.....	35
3.1. Diversité chimique.....	36
3.2. Caractéristiques et fonctions des métabolites secondaires les plus courants.....	36
4. Réponse des plantes au concept stress «facteurs biotiques et abiotiques» par requête au métabolisme secondaire.....	39
5. Facteurs d'influence imputés à la fluctuation des métabolites secondaires.....	41
5.1. Facteurs génétiques.....	41
5.2. Facteurs ontogéniques.....	42
5.3. Facteurs morphogénétiques.....	42
5.4. Facteurs environnementaux.....	43
5.4.1. Facteurs biotiques.....	43
5.4.2. Facteurs abiotiques.....	44
5.4.2.1. Stress hydrique.....	44
5.4.2.2. Stress salin.....	44
5.4.2.3. Stress thermique.....	45
5.4.2.4. Stress photosynthétique.....	45
5.4.2.5. Stress chimique (nutritionnel)	45
5.4.3. Variation saisonnière.....	46
5.4.4. Variation géographique et / ou régional.....	46
6. Confections d'acquisition des métabolites secondaires à partir des plantes.....	47
7. Implication des métabolites secondaires comme molécules de défense chez les plantes.....	47

	13
8. Substances antimicrobiennes d'origine végétale.....	48
8.1. Principaux composés phénoliques à pouvoir antimicrobiens.....	48
8.2. Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles.....	48
9. Expression des molécules bioactives en cas de bioagression par des agents pathogènes microbiens	50
9.1. Généralités sur le principe de résistance chez les plantes (Interaction plante hôte / agents pathogènes).....	50
9.1.1. La résistance passive.....	51
9.1.2. La résistance active.....	51
9.2. Les plantes, leurs activités et leurs composés antimicrobiens.....	51
9.3. Généralités sur l'effet antimicrobien et son mécanisme.....	54
9.4. Notion du microbiostatique et du microbicide.....	54
10. Investigation des caractéristiques des plantes modèles de hautes altitudes..	55
10.1. Présentation des caractéristiques de la Fabacée <i>Cytisus triflorus</i> L'Her.....	55
10.1.1. Famille botanique d'appartenance.....	55
10.1.2. Aire de répartition en Algérie et dans le monde.....	55
10.1.3. Description botanique.....	56
10.1.4. Attribution du genre <i>Cytisus</i>	56
10.1.5. Taxonomie et systématique de la plante.....	56
10.1.6. Composition en métabolites secondaires de la Fabacée <i>Cytisus triflorus</i> L'Her.....	56
10.1.7. Utilisation et intérêts du genre <i>Cytisus</i>	57
10.2. Présentation des caractéristiques de la Lamiacée <i>Teucrium polium</i>	58
10.2.1. Famille botanique d'appartenance.....	58
10.2.2. Aire de répartition en Algérie et dans le monde.....	58
10.2.3. Description botanique.....	58

	14
10.2.4. Attribution du genre <i>Teucrium</i>	58
10.2.5. Taxonomie et systématique de la plante.....	59
10.2.6. Composition en métabolites secondaires de la Lamiacée <i>Teucrium polium</i>	59
10.2.7. Utilisation et intérêts du genre <i>Teucrium</i>	60
CHAPITRE 2: MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	61
1. Localisation des sites d'échantillonnages du matériel végétal des impétrantes des hautes altitudes; la Lamiacée <i>Teucrium polium</i> et la Fabacée <i>Cytisus</i> <i>triflorus</i> L'Her.....	61
1.1. Etude sur le terrain: prélèvement du matériel végétal.....	61
1.2. Reconnaissance botanique.....	63
2. Proportions de métabolites secondaires préconisés reconquis en extraits aqueux et méthanoliques des plantes de hautes altitudes; la Fabacée <i>Cytisus</i> <i>triflorus</i> L'Her et la Lamiacée <i>Teucrium polium</i>	63
2.1. Préparation des extraits aqueux et des extraits méthanoliques des deux plantes des hautes altitudes.....	63
2.1.1. Broyage et tamisage.....	63
2.1.2. Protocol de préparation	63
2.1.2.1. Les extraits aqueux.....	63
2.1.2.2. Les extraits méthanoliques.....	63
2.1.2.3. Détermination du rendement.....	63
2.2. Étude phytochimique.....	64
2.2.1. Contenu en Phénols totaux.....	64
2.2.1.1. Principe.....	64
2.2.1.2. Mode opératoire.....	64
2.2.2. Contenu en Flavonoïdes.....	64
2.2.2.1. Principe.....	64

	15
2.2.2.2. Mode opératoire.....	65
3. Fraction volatile des métabolites secondaires; les huiles essentielles des plantes de hautes altitudes; la Lamiacée <i>Teucrium polium</i> et la Fabacée <i>Cytisus triflorus</i> L'Her.....	65
3.1. Extraction de la fraction volatile; huiles essentielles des impétrantes des hautes altitudes par Hydrodistillation.....	65
3.1.1. Principe.....	66
3.1.2. Technique.....	66
3.2. Caractérisation chimique (Analyse qualitative et approximative) des huiles essentielles par Couplage chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (CPG/SM).....	67
3.2.1. Principe.....	67
3.2.2. Technique.....	67
3.2.3. Identification des composés.....	68
4. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des différentes fractions des plantes modèles.....	68
4.1. Préparation des milieux de culture.....	68
4.2. Micro-organismes et conditions de culture.....	68
4.3. Préparation des dilutions des extraits à tester.....	70
4.4. Détermination de l'activité antimicrobienne par méthode de diffusion (test de sensibilité).....	70
4.4.1. Milieu.....	70
4.4.2. Préparation des inoculums.....	70
4.4.3. Ensemencement et dépôt des disques.....	71
4.4.4. Lecture.....	72
4.4.5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	72
4.4.6. Détermination des concentrations bactéricides / fongicides	73

minimales (CMB / CMF).....	
4.5. Détermination de l'indice CMI.....	74
5. Exploitations des données.....	75
CHAPITRE 6: RÉSULTATS.....	77
1. Profil saisonnier semi-quantitative du contenu phytochimique et pouvoirs antibactérien des extraits aqueux et méthanoliques chez la Lamiacée <i>Teucrium polium</i>	77
1.1. Rendement d'extraction des extraits aqueux et méthanoliques de <i>Teucrium polium</i>	77
1.2. Étude phytochimique des extraits de <i>Teucrium polium</i>	78
1.2.1. Tendance du contenu phytochimique des extraits de <i>Teucrium polium</i> sous l'effet saisonnier.....	78
1.2.2. Variation quantitative du contenu phytochimique accumulée dans les extraits de <i>Teucrium polium</i> sous les fluctuations saisonnières.....	77
1.3. Variation saisonnière des activités antibactériennes des extraits de <i>Teucrium polium</i>	80
1.4. Modèle d'ajustement et d'optimisation de la bioactivité des extraits de <i>Teucrium polium</i>	81
2. Profil saisonnier semi-quantitative du contenu phytochimique et pouvoir antibactérien des extraits aqueux et méthanoliques chez la Fabacée <i>Cytisus triflorus</i> L'Her.....	83
2.1. Rendement d'extraction des extraits aqueux et méthanoliques de <i>Cytisus triflorus</i> L'Her.....	83
2.2. Étude phytochimique des extraits de <i>Cytisus triflorus</i> L'Her.....	83
2.2.1. Tendance du contenu phytochimique des extraits de <i>Cytisus triflorus</i> L'Her sous l'effet saisonnier.....	83
2.2.2. Variation quantitative du contenu phytochimique accumulée dans les extraits de <i>Cytisus triflorus</i> L'Her sous les fluctuations saisonnières.....	84

	17
2.3. Variation saisonnière des activités antibactériennes des extraits de <i>Cytisus triflorus</i> L'Her.....	85
2.4. Modèle d'ajustement et d'optimisation de la bioactivité des extraits de <i>Cytisus triflorus</i> L'Her.....	87
3. Contribution à la caractérisation des huiles essentielles de la Lamiacée <i>Teucrium polium</i> et au comportement saisonnier de leur rendement, de leur composition chimique et de leur activité antimicrobienne.....	87
3.1. Optimisation et comportement saisonnier du rendement en huiles essentielles de <i>Teucrium polium</i>	87
3.2. Comportement saisonnier de la composition chimique des huiles essentielles de <i>Teucrium polium</i>	89
3.3. Comportement saisonnier des activités antimicrobiennes des huiles essentielles de <i>Teucrium polium</i>	94
3.3.1. Détermination par méthode de diffusion.....	94
3.3.2. Détermination par les paramètres CMI, CMM et par l'indice CMM/CMI.....	100
4. Contribution à la caractérisation des huiles essentielles de la Fabacée <i>Cytisus triflorus</i> L'Her de la Mitidja et au comportement saisonnier de leur rendement, de leur composition chimique et de leur activité antimicrobienne.....	102
4.1. Optimisation et comportement saisonnier du rendement en huiles essentielles de <i>Cytisus triflorus</i> L'Her.....	102
4.2. Comportement saisonnier de la composition chimique des huiles essentielles de <i>Cytisus triflorus</i> L'Her.....	103
4.3. Comportement saisonnier des activités antimicrobiennes des huiles essentielles de <i>Cytisus triflorus</i> L'Her.....	105
4.3.1. Détermination par méthode de diffusion.....	105
4.3.2. Détermination par les paramètres CMI, CMM et par l'indice CMM/CMI.....	109
CHAPITRE 7: DISCUSSION GÉNÉRALE.....	113
1. Profil saisonnier semi-quantitative du contenu phytochimique et pouvoir antibactérien des extraits aqueux et méthanoliques chez la Lamiacée <i>Teucrium polium</i>	113

2. Profil saisonnier semi-quantitative du contenu phytochimique et pouvoir antibactérien des extraits aqueux et méthanoliques chez la Fabacée <i>Cytisus triflorus</i> L'Her.....	115
3. Contribution à la caractérisation des huiles essentielles de la Lamiacée <i>Teucrium polium</i> et au comportement saisonnier de leur rendement, de leur composition chimique et de leur activité antimicrobienne.....	116
4. Contribution à la caractérisation des huiles essentielles de la Fabacée <i>Cytisus triflorus</i> L'Her de la Mitidja et au comportement saisonnier de leur rendement, de leur composition chimique et de leur activité antimicrobienne.....	122
CONCLUSION.....	125
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	128

LISTE DES ILLUSTRATIONS ET GRAPHIQUES

Figure 1.1:	Esquisse générale de la voie biosynthétique des métabolites secondaires chez les plantes [34].....	30
Figure 1.2:	Biosynthèse des composés phénolique par la voie shikimique [47].....	34
Figure 1.3:	Différents facteurs affectant la synthèse du contenu des métabolites secondaires chez les plantes [34].....	41
Figure 2.1:	<i>Teucrium polium</i> récolté aux monts des Aurès-Chéla durant trois stades phénologiques; (A): stade végétatif, (B): stade floraison, (C): stade fructification.....	61
Figure 2.2:	<i>Cytisus triflorus</i> L'Her récolté aux monts des Aurès-Chéla durant trois stades phénologiques; (A): stade végétatif, (B): stade floraison, (C): stade fructification.....	62
Figure 2.3:	Présentation des régions d'études; A: Djebel Chéla (Wilaya de Khenchela), B: monts de Chréa (wilaya de Blida).....	62
Figure 2.4:	Montage de l'appareil Clevenger du procédé de l'hydrodistillation.....	66
Figure 2.5:	Équipement d'analyse CG-SM.....	68
Figure 2.6:	Schéma illustrant la méthode de sensibilité (activité antimicrobienne) par méthode de diffusion.....	72
Figure 2.7:	Microplaque utilisées avec les suspensions microbiennes-extraits-milieu de culture avant et après incubation, et détection de la croissance par l'essai colorimétrique (INT).....	73
Figure 2.8:	Prélèvement des puits et ajout sur le milieu pour déterminer les CMB et les CMF.....	74
Figure 3.9:	Schéma représentatif des extractions, des préparations, des analyses et des estimations chimiques et des bioactivités reconquises chez la lamiacée <i>Teucrium polium</i> et la fabacée <i>Cytisus triflorus</i> L'Her.....	76
Figure 3.1:	Variation saisonnière du pourcentage des rendements des extraits aqueux et méthanoliques des parties aériennes de <i>Teucrium polium</i>	78

Figure 3.2:	Analyse en Composantes Principales (A.C.P.) du contenu phytochimique des extraits de <i>Teucrium polium</i>	79
Figure 3.3:	Fluctuations du contenu des extraits de <i>Teucrium polium</i> en terme de: phénols totaux et de flavonoïdes en fonction des solvants d'extraction et des stades phénologiques.....	80
Figure 3.4:	Fluctuations des diamètres des zones d'inhibition sous l'effet des extraits de <i>Teucrium polium</i> , des stades phénologiques et des souches bactériennes.....	81
Figure 3.5:	Analyse en Composantes Principales (A.C.P.) performée sur la variation saisonnière de la composition phytochimique des extraits de <i>Teucrium polium</i> et de l'activité antibactérienne.....	81
Figure 3.6:	Variation saisonnière du pourcentage des rendements des extraits aqueux et méthanoliques des parties aériennes de <i>Cytisus triflorus</i> L'Her.....	83
Figure 3.7:	Analyse en Composantes Principales (A.C.P.) de la composition phytochimique des extraits de <i>Cytisus triflorus</i> L'Her.....	84
Figure 3.8:	Fluctuations du contenu phytochimique des extraits de <i>Cytisus triflorus</i> L'Her en termes de phénols totaux et des flavonoïdes en fonction des solvants d'extraction et des stades phénologiques.....	85
Figure 3.9:	Fluctuations des diamètres des zones d'inhibition sous l'effet des extraits de <i>Cytisus triflorus</i> L'Her, des stades phénologiques et des souches bactériennes.....	86
Figure 3.10:	Analyse en Composantes Principales (A.C.P.) performée sur la variation saisonnière de la composition phytochimique des extraits de <i>Cytisus triflorus</i> L'Her et de l'activité antibactérienne.....	86
Figure 3.11:	Effet saisonnier sur le rendement des huiles essentielles (%) des parties aériennes de <i>Teucrium polium</i>	88
Figure 3.12:	Conditions climatiques dans la région d'étude (monts des Aurès-Chéla -wilaya de Khenchela) durant la période 1995-2015.....	89
Figure 3.13:	Analyse en Composantes Principales (A.C.P.) de l'activité antibactérienne des huiles essentielles sous l'effet des trois stades phénologiques (stade végétatif, floraison et fructification) de <i>Teucrium polium</i>	95

Figure 3.14:	Effet des stades phénologiques, des doses et de souches testées sur l'activité antibactérienne des huiles essentielles de <i>Teucrium polium</i>	97
Figure 3.15:	Analyse en Composantes Principales (A.C.P.) de l'activité antifongique des huiles essentielles des trois stades phénologiques (stade végétatif, floraison et fructification) de <i>Teucrium polium</i>	98
Figure 3.16:	Effet des stades phénologiques, des doses et de souches testées sur l'activité antifongiques des huiles essentielles de <i>Teucrium polium</i>	100
Figure 3.17:	Effet saisonnier sur le rendement des huiles essentielles (%) des parties aériennes de <i>Cytisus triflorus</i> L'Her.....	102
Figure 3.18:	Conditions climatiques dans la région d'étude (la Mitidja -monts de l'Atlas Blidéen) durant la période 1995-2015.....	103
Figure 3.19:	Analyse en composantes hiérarchiques (A.C.H.) du comportement saisonnier de la composition chimique des huiles essentielles de <i>Cytisus triflorus</i> L'Her.....	105
Figure 3.20:	Effet des stades phénologiques, des doses et des souches sur l'activité antibactérienne des huiles essentielles de <i>Cytisus triflorus</i> L'Her.....	107
Figure 3.21:	Analyse en Composantes Principaux (A.C.P.) de l'activité antifongique des huiles essentielles des trois stades phénologiques (Stade végétatif, floraison et fructification) de <i>Cytisus triflorus</i> L'Her.....	108
Figure 3.22:	Absence des effets significatifs des stades phénologiques, des doses et des souches sur l'activité antifongique des huiles essentielles de <i>Cytisus triflorus</i> L'Her.....	109
Figure 3.23:	Analyse en composantes hiérarchiques (A.C.H.) de l'effet saisonnier sur l'activité antimicrobienne (A: présenté par les valeurs du paramètre CMI; B: présenté par les valeurs du paramètre CMM) des huiles essentielles de <i>Cytisus triflorus</i> L'Her.....	112

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1.	Déterminisme des caractéristiques pathogènes des souches microbiennes testées [138].....	69
Tableau 3.1:	Présentation des équations prédictives de l'activité antibactérienne des composés des extraits de <i>Teucrium polium</i> vis à vis les microorganismes testés en fonction des stades phénologiques.....	82
Tableau 3.2:	Présentation des équations prédictives de l'activité antibactérienne des composés des extraits de <i>Cytisus triflorus</i> L'Her vis à vis les microorganismes testés en fonction des stades phénologiques.....	87
Tableau 3.3:	Comportement saisonnier de la composition volatile convenue dans les huiles essentielles des parties aérienne de <i>Teucrium polium</i>	89
Tableau 3.4:	Activité antibactérienne des huiles essentielles des trois stades phénologiques (stade végétatif, floraison et fructification) de <i>Teucrium polium</i> estimé par les diamètres des zones d'inhibition	95
Tableau 3.5:	Activité antifongique des huiles essentielles des trois stades phénologiques (stade végétatif, floraison et fructification) de <i>Teucrium polium</i> estimé par les diamètres des zones d'inhibition.....	98
Tableau 3.6:	Concentration minimal inhibitrice (CMI) ($\mu\text{g/ml}$), concentration minimal microbicide (CMM) ($\mu\text{g/ml}$) et l'indice (CMM/CMI) des huiles essentielles de <i>Teucrium polium</i> durant les différents stades phénologiques.....	100
Tableau 3.7:	Effet saisonnier sur la concentration minimal inhibitrice (CMI) ($\mu\text{g/ml}$), la concentration minimal microbicide (CMM) ($\mu\text{g/ml}$) et l'indice (CMM/CMI) des huiles essentielles de <i>Teucrium polium</i>	101
Tableau 3.8:	Comportement saisonnier de la composition volatile concédée chez les huiles essentielles des parties aérienne de <i>Cytisus triflorus</i> L'Her.....	104

Tableau 3.9:	Activité antibactérienne des huiles essentielles des trois stades phénologiques (stade végétatif, floraison et fructification) de <i>Cytisus triflorus</i> L'Her estimé par les diamètres des zones d'inhibition.....	106
Tableau 3.10:	Activité antifongique des huiles essentielles des trois stades phénologiques (stade Végétatif, floraison et fructification) de <i>Cytisus triflorus</i> L'Her estimée par les diamètres des zones d'inhibition.....	108
Tableau 3.11:	Effet saisonnier sur la concentration minimal inhibitrice (CMI) ($\mu\text{g/ml}$), sur la concentration minimal microbicide (CMM) ($\mu\text{g/ml}$) et sur l'indice (CMM/CMI) des huiles essentielles de <i>Cytisus triflorus</i> L'Her.....	110
Tableau 3.12:	Effet saisonnier sur la concentration minimal inhibitrice (CMI) ($\mu\text{g/ml}$), sur la concentration minimal microbicide (CMM) ($\mu\text{g/ml}$) et sur l'indice (CMM/CMI) des huiles essentielles de <i>Cytisus triflorus</i> L'Her.....	111

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protéides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits «secondaires» dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'alimentaire.

Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques variés (alcaloïdes, terpènes, composés phénoliques...) qui sont très inégalement répartis chez les végétaux mais dont le niveau d'accumulation peut quelquefois atteindre des valeurs élevées. La notion de «métabolites secondaires» résulterait initialement de trois groupes d'observations: d'abord une difficulté à attribuer à ces métabolites une fonction précise dans la physiologie même de la plante, ensuite une répartition très inégale selon les végétaux, quelquefois entre des espèces très voisines ou même entre différentes sous espèces ou variétés à l'intérieur d'une même espèce, et enfin une certaine «inertie biochimique» car ces substances sont rarement remobilisées dans la plante après qu'elles y ont été accumulées.

La phénologie est l'étude de l'apparition d'événements périodiques dans le monde vivant, déterminée par des variations saisonnières et climatiques. Chez les végétaux, les indices phénologiques sont nombreux: le débourrement, la floraison, la fructification, la coloration et la chute des feuilles sont de bons exemples. Le patron phénologique d'une espèce peut être décrit selon la durée, le moment d'apparition ou tout autre événement. Basé sur ces critères, l'échelle BBCH (Biologische Bundesanstalt Bundessortenamt et Chemische Industrie) développée par Meier [1], il permet de faire le suivi phénologique de plusieurs espèces. Cette échelle présente plusieurs lacunes. Tout d'abord, certains stades restent difficiles à évaluer. Par illustration, on utilise la taille des fruits à pépins pour suivre leur développement. Or, pour des fruits de petite taille, ce type de critère peut être difficile à évaluer. De plus, certains critères manquent de précision.

Le niveau de bioactivités des extraits des plantes est tributaire de la variation de leur profil de biosynthèse des composés qui s'avère être influencés par les facteurs génétiques, l'évolution, la variation géographique, les conditions environnementales, les variations physiologiques et le stade de développement [2]. Du même, la variabilité phytochimique pourrait être fortement liée à plusieurs facteurs, tant qu'abiotiques (conditions géographiques, nutriments et disponibilité de l'eau...) que biotiques (pathogènes et herbivores), dont les caractéristiques génotypiques et les stades phénologiques sont des éléments clés affectant directement le profil phytochimique des plantes [3].

Le bassin méditerranéen est l'un des points chauds dans lesquels se trouve une concentration de la biodiversité caractérisée par une richesse spécifique dont la richesse de la flore algérienne n'est plus à démontrer. L'Algérie dispose d'une grande biodiversité floristique à laquelle s'ajoute une tradition séculaire de pharmacopée traditionnelle. Dans cet ordre de réflexion, nous avons orienté nos travaux de recherche vers l'exploitation des ressources végétales locales. Malgré l'existence d'une bibliographie relativement riche sur les genres *Teucrium* et *Cytisus*, peu de données ont été proclamées sur ces espèces préconisées dans cette étude et sur leurs origines géographiques. Or, la valorisation de ces espèces passe principalement par leur évaluation biochimique et biotechnologique à travers l'extraction, l'analyse et l'identification de leurs constituants composés bioactifs. Suite à des bio-prospections nous nous sommes intéressés aux diverses familles de métabolites secondaires biologiquement actives notamment les huiles essentielles et les acides phénoliques.

Les balais *Cytisus sp* se développent principalement dans les zones anthropisées, leur présence favorise souvent la propagation rapide de l'incendie. Le reniement étendues des larges zones anciennement utilisées pour l'agriculture, le grand nombre de feux de forêt qui menacent la diversité végétale entraînent tous un déboisement de vastes espaces qui sont rapidement occupées par ces derniers arbustes. Ces facteurs favorisent l'évaluation de ces espèces comme source de molécules bioactives [4]. Le genre *Cytisus* comprend environ 60 espèces répandu dans le bassin méditerranéen [5]. De nombreuses études ont citées l'utilisation de plantes de ce genre à des fins médicales comme antidiabétique, anti-inflammatoire, diurétique [6] tandis que des études pharmacologiques ont confirmés certaines de ces formes ethnomédicales [7 et 8]. *Cytisus triflorus* L'Her est l'espèce la plus répandue parmi les huit espèces qui se développent naturellement dans tout le nord de l'Algérie [9], connue localement pour ses propriétés médicinales, utilisée notamment pour traiter les douleurs abdominales, la cicatrisation des plaies et conjointement comme antifongique. Le screening phytochimique préliminaire du genre *Cytisus* a montré la présence de terpènes, de tanins, de flavonoïdes, d'acides phénoliques, d'alcaloïdes et de coumarines [10 et 11].

Teucrium polium est une plante à dimorphisme saisonnier, qui présentait une apparence tout à fait différente en hiver et en été. La métamorphose saisonnière prononcée de la plante reflète son adaptation aux conditions climatiques stressantes qui prévalent en hiver ou en été. Ainsi, les plantes d'hiver et d'été développent un système défensif contrasté caractérisé par des variations en biosynthèse des composés phénoliques [12]. Le genre *Teucrium*, est représenté par plus de 340 espèces qui poussent principalement dans les zones arides et rocheuses du bassin méditerranéen [13], parmi les 340 espèces du genre *Teucrium* recensées en Afrique du nord, 20 d'entre elles sont signalées en Algérie [5 et 14]. Les Lamiaceae sont reconnus par leurs richesses en métabolites secondaires [15]. Les espèces du genre

Teucrium sont très riches en monoterpènes, en sesquiterpènes, en saponines, en stérols, en phénols, en flavonoïdes, en alcaloïdes, en huiles essentielles [16 et 17], en acides gras, en esters, et en diterpènes [18 et 19]. Ces composés sont connus par leurs implications dans les activités de défense des plantes [15]. Les extraits de *Teucrium* sont également utilisés contre les problèmes gastriques et intestinaux, les rhumatismes, les hémorroïdes et les inflammations rénales ainsi que l'asthme [20]. Des effets anticancéreux de sensibilisation chimiothérapeutique de diterpénoïdes sont rapportés par plusieurs études [21], tandis que certains diterpènes neoclerodane sont doués d'activités insecticide et fongicide [22]. La littérature signale leurs utilisations dans la médecine traditionnelle chinoise pour les morsures de chiens atteints de rage ou de serpents venimeux [23], aussi dans les industries alimentaires du fait que de nombreuses espèces montrent des activités antimicrobiennes et antioxydante qui les rendent utiles en tant qu'ingrédients conservateurs naturels [24].

Dans la lutte perpétuelle contre les infections microbiennes, les antibiotiques, toutes catégories confondues, ont été considérés comme l'arme absolue. Mais le phénomène de transfert de l'antibiorésistance à travers les différents genres et espèces et les effets secondaires des médicaments de synthèse, sous-estimés (parfois volontairement !) ont remis d'actualité la phytothérapie. Des résistances microbiennes se sont manifestées quand l'utilisation des antibiotiques était en tant qu'entités uniques, si la prise de conscience d'utilisation de mélanges croisés d'antibiotiques qui attaquent des sites moléculaires différents dans les microorganismes cibles avaient été employés à la place d'utilisation unique, un tel développement qui génère actuellement un problème sévère aurait peut-être été évité [25]. Dans ce contexte, les extraits de plantes ont suscité beaucoup d'intérêt scientifique en raison de leur potentiel en tant que source de composés actifs, également comme substances antibactériennes, antifongiques et insecticides [26], tandis que la connaissance de la fluctuation de ces composés pendant le développement physiologique de la plante permet de concevoir des programmes de récolte optimaux [27].

La valorisation des composés actifs des plantes ainsi que leurs activités de défense à tolérer certains stress (ex: un stress biotique mise en place par des agents pathogènes microbiens) nécessite une connaissance de leur composition chimique et du profil toxicologique tributaire des variations génétiques et de l'influence du stade phénologique. Ces facteurs intrinsèques, instaurent un paradigme quantitatif et qualitatif en termes de rendement et d'accumulation en substances bioactives [28].

Ce travail de thèse a été l'occasion de développer un travail méthodologique et appliqué totalement complémentaire. Le but était de mettre en évidence l'effet des stades phénologiques; végétatif, floraison et fructification sur la fluctuation de la cinétique d'accumulation des composés phytochimiques ainsi que leurs activités de défense et ou de tolérance vis-à-vis des agents microbiens pathogènes (stress abiotique), afin d'optimiser les programmes de récolte pour avoir des ressources de

qualité et de quantité en substances actives d'intérêt. L'indice phénologique pourrait être considéré comme base de projection des changements d'efficacité des composés naturels envisageaient comme source potentiellement importante de nouveaux types d'agents bioactifs et restreindre la pression sur les ressources phytogénétiques.

Pour cela, nous avons articulé notre travail autour de trois parties; dans la première partie, nous avons développé une analyse bibliographique. La deuxième partie est consacrée à la description de la méthodologie. La troisième partie est subdivisée en deux principaux volets qui sont totalement complémentaires en ressortons l'impact de la variation phénologique sur:

(i) Le premier volet est chimique (composition phytochimique), il concerne la caractérisation et l'estimation de l'accumulation en terme qualitatif que semi-quantitatif des composés chimiques reconquis dans les différentes fractions des plantes étudiées à savoir les fractions méthanoliques et aqueuses ainsi que les fractions volatiles;

(ii) Le deuxième volet se focalise sur la mise en évidence des activités de défense des plantes modèles via l'estimation des pouvoirs de tolérance; exprimés par leurs résistance face a un stress biotique induites par les différents agents pathogènes microbiens choisis pour cette étude (activités antimicrobiennes).

CHAPITRE 1:

APERÇUS BIBLIOGRAPHIQUES

1. Nature et distribution des métabolites secondaires végétaux

Les métabolites secondaires, également appelés produits secondaires ou produits naturels, sont des composés organiques qui ne sont pas directement impliqués dans la croissance ni dans le développement ou la reproduction. Ils ne participent même pas directement à la respiration, à la translocation, à la synthèse de protéines, à l'assimilation des nutriments, à la photosynthèse, ou à la différenciation. Bien que les métabolites secondaires n'aient aucun effet immédiat sur la survie des plantes, mais ont un effet à long terme. Cependant, l'absence de ces métabolites peut résulter non seulement à l'altération de la survie de la plante mais aussi à la mort immédiate. Ces composés ont tendance à être plus complexes que les métabolites primaires. De tels composés, comprennent généralement des pigments, des agents anti-tumoraux, des effecteurs de la compétition écologique et de la symbiose et des molécules de défense chimique des plantes telles que les alcaloïdes et les stéroïdes. Les métabolites secondaires sont généralement présents à de faibles concentrations dans tous les organismes vivants; cependant, ces composés sont largement distribués dans les plantes et jouent un rôle crucial pour la plante afin qu'elle puisse interagir avec son environnement [29].

Ces molécules bioactives sont produites à différents endroits de la plantes, ou dans des parties spécifiques de la plante en fonction du stade de développement (par exemple durant le développement de la plantule, de la fleur, du fruit, de la graine, ou de la racine). De façon générale, le rôle du métabolite secondaire est en lien avec sa localisation au sein de la plante. Par exemple, les furanocoumarines, sont de phytoalexines jouant un rôle de défense contre les bactéries et les champignons. Chez les plantes productrices, on les retrouve accumulées en grande quantité à la surface des feuilles où elles peuvent constituer une sorte de "première barrière chimique.

Chez les plantes supérieures, une grande variété de métabolites secondaires est synthétisée à partir de métabolites primaires (par exemple, des hydrates de carbone, des lipides et des acides aminés). Beaucoup de métabolites se comportent comme des signaux chimiques dont la plante utilise pour s'adapter aux changements environnementaux. D'autres, ont pour rôle la protection de la plante contre les herbivores, les pathogènes, les parasites ou l'inhibition de la germination et la croissance des plantes concurrentes. Certains assurent une protection contre les

radiations solaires, lorsque d'autres favorisent la dispersion du pollen et des graines grâce à la couleur ou au parfum des fleurs [30].

2. Classification et voies de synthèse des métabolites secondaires

Le règne végétal produit plus de 100 000 métabolites secondaires qui sont limités à certains groupes taxonomiques. Sur la base de leurs voies biosynthétique, les métabolites secondaires sont classés en trois groupes principaux, à savoir [31];

-Les terpénoïdes

Le terme terpénoïdes, désigne un ensemble de substances présentant le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc.). Les terpénoïdes sont classés en: monoterpènes (C_{10}), en sesquiterpènes (C_{15}), en diterpènes (C_{20}), en triterpènes (C_{30}), en tétraterpènes (C_{40}) et en polyterpènes ($>C_{40}$).

-Les composés phénoliques: phénols, flavonoïdes, tanins, lignines, etc.

- Métabolites secondaires azotés: alcaloïdes tels que la cocaïne, la caféine et la morphine; les glycosides cyanogène et les glucosinolates, etc.

2.1. Terpénoïdes (Huiles essentielles)

Les terpènes sont synthétisés par les plantes à travers deux voies différentes; l'une se produit dans le cytoplasme et l'autre dans les plasmides. Les voies du mévalonate et du méthylérythritol 4-phosphate sont impliquées dans la synthèse des terpènes. Néanmoins, la voie du méthylérythritol 4-phosphate offre un précurseur pour la synthèse des mono- et des diterpènes, des caroténoïdes, des phytohormones, des gibbérellines, de l'acide abscisique, du phytol, des phylloquinones, des tocophérols, des chlorophylles, etc., tandis que la voie de l'acide mévalonique fournit la synthèse de l'isopentényl diphosphate impliqué dans la synthèse des sesquiterpènes, des stérols, des brassinostéroïdes et des polyphénols [32].

Le plus grand groupe de métabolites secondaires connus sous le nom de terpénoïdes sont généralement insolubles dans l'eau. La biosynthèse de ces composés, l'acétyl-coenzyme-A (acétyl Co-A) est le matériau de départ qui implique également la fusion de cinq unités d'isoprène de carbone appelées isoprénoïdes. L'isopentényl diphosphate est formé comme un intermédiaire dans les deux voies; celle de l'acide mévalonique et celle du méthylérythritol 4-phosphate, ce qui conduit finalement à la formation de terpènes (figure 1.1) [33].

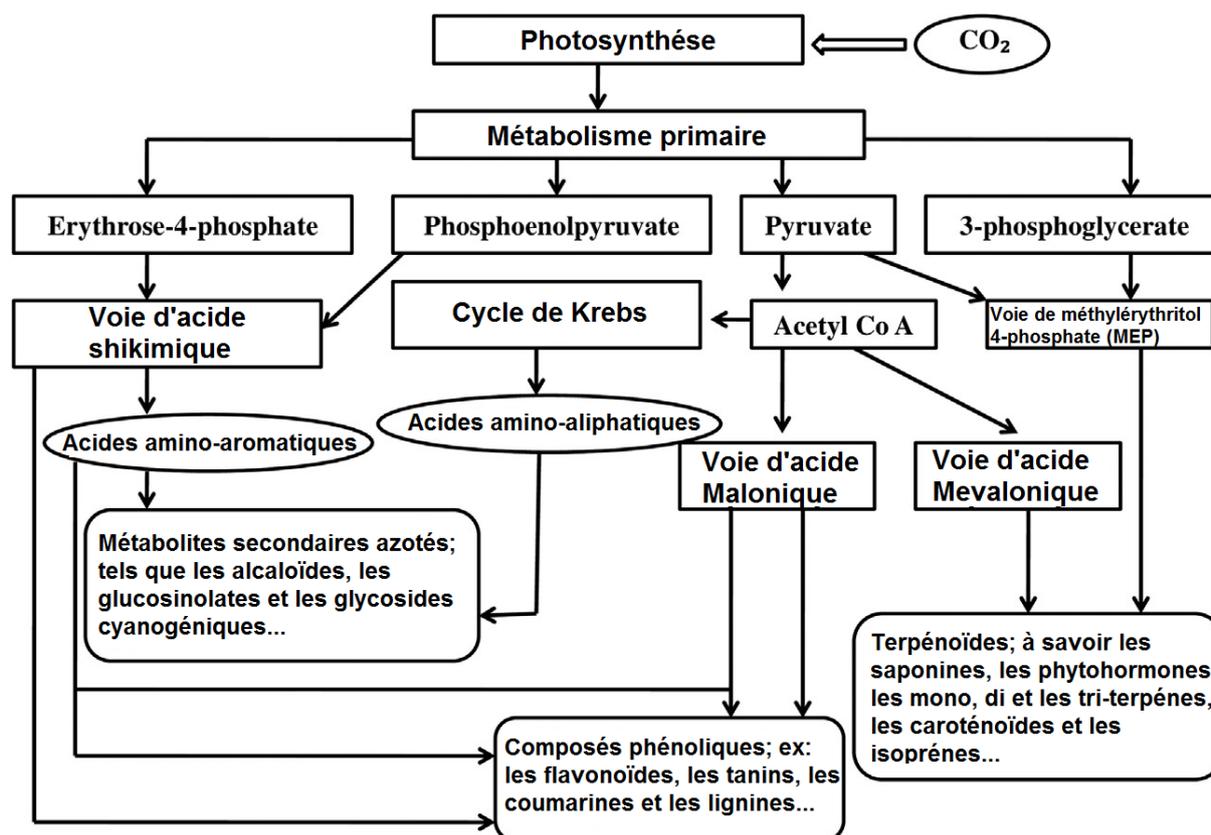


Figure 1.1: Esquisse générale de la voie biosynthétique des métabolites secondaires chez les plantes adaptée par Verma et Shukla [34].

Les terpènes représentent la famille biochimique la plus répandue et regroupent les principaux composants des huiles essentielles (HE's). Les composés terpéniques sont très variés dans les HE's lorsque des groupements fonctionnels (alcool, cétone, aldéhyde,...) sont présents, on va parler de terpénoïdes. Ainsi, selon le nombre de carbones et les groupements fonctionnels, il se distingue une multitude de terpènes.

2.1.1. Variabilité phytochimique

Il s'agit d'un mélange complexe constitué de plusieurs dizaines, voire plus d'une centaine de composés, principalement des terpènes. Le terme huile essentielle remonterait au XVI^{ème} siècle et dériverait d'une drogue *Quinta essentia*. D'autres pensent que les HE's ou encore essences doivent leur nom à leur inflammabilité comme l'essence.

On trouve ces substances volatiles dans de nombreux organes de la plante (feuille, fleur, fruit, graine, écorce, racine, ...). Cependant, la quantité d'HE produite est très variable selon l'espèce et généralement faible, de l'ordre de 1 %, avec quelques exceptions comme le bouton floral du giroflier où le taux d'HE's peut atteindre 15 %.

La biosynthèse des HE's est associée à la présence de structures histologiques sécrétrices spécialisées. Ces structures, également impliquées dans le stockage des HE's, peuvent varier selon la famille botanique et l'espèce végétale considérée. En effet, ils peuvent être des canaux sécréteurs (comme chez les Apiacées et les Astéracées), des cellules épidermiques (comme chez les Lauracées), des poches sécrétrices (comme chez les Fabacées, les Rutacées et les Myrtacées) ou des poils sécréteurs périphériques (comme chez les Lamiacées) [35].

A l'intérieur d'une même espèce végétale, on observe des variations chimiques (qualitatives et quantitatives) importantes ayant conduit à admettre l'existence de races chimiques (exemple: thymol, géraniol, carvacrol et linalool) et parmi les nombreux constituants d'une huile essentielle, l'un domine généralement; on l'appelle composé majoritaire. Selon les instituts de recherches des produits naturels, la composition chimique des huiles essentielles est très fluctuante [36].

La proportion des différents constituants de l'huile essentielle d'une espèce donnée varie en fonction du site de récolte comme le cas de l'Astéracée «*Tagetes lucida*». Plusieurs études menées sur cette espèce montrent une variation importante dans la composition chimique. En effet, elle se caractérise par plusieurs chémotypes: anéthol, estragol, méthyl eugénol, nérolidol qui diffère d'un site de récolte à l'autre [37].

La différence de composition constatée chez les huiles essentielles, est vraisemblablement à mettre en rapport avec les facteurs abiotiques tels que le climat des régions de provenance des échantillons, les facteurs géographiques comme l'altitude et la nature du sol. Au sein d'une même espèce la composition chimique de l'huile essentielle peut être différente, on parle alors de races chimiques ou de chémotypes. Il s'agit d'un polymorphisme chimique: une espèce peut être homogène au niveau de son caryotype et produire des huiles essentielles de compositions différentes. Un cas exemplaire, est le thym commun (*Thymus vulgaris*) dont la variabilité chimique est largement influencée par son environnement (sol, altitude, pression animale ou humaine) et le climat (température, pluviométrie, et ensoleillement). Le thym comprend 7 chémotypes différents: cinéol, géraniol, linalool, terpinéol, thuyanol, thymol, et carvacrol. Chaque chémotype étant responsable d'effets qui lui sont propres et qui peuvent parfois se révéler antagonistes [38]. De nombreux travaux révèlent la variation de la composition en fonction de la période de récolte, par exemple la menthe poivrée récoltée en début de floraison a une huile essentielle riche en néomenthol et en menthone tandis qu'en fin de floraison, cette huile est riche en menthol [39]. Une étude sud-africaine récente a révélé que les récoltes de géranium espacées de 8-12 semaines en période ensoleillée donnent de meilleurs résultats quantitatif et qualitatif [40]. En effet, la composition chimique des huiles essentielles peut être affectée par le climat, les températures maximales et minimales, les périodes (estivale ou hivernale), la durée d'ensoleillement, la pluviométrie, l'altitude, la nature du sol et son pH.

2.1.2. Propriétés physico-chimiques

On trouve généralement les HE's incolores ou jaune pâle à l'état liquide à température ordinaire. Toutes les HE's sont volatiles, odorantes et inflammables. Leur densité est le plus souvent inférieure à 1. Seules trois HE's ont une densité supérieure à celle de l'eau, ce sont les HE's de cannelle, de girofle et de saffras. Elles sont peu solubles dans l'eau, solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques. Elles sont altérables et très sensibles à l'oxydation [41].

2.1.3. Méthodes d'extraction

2.1.3.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable. Les vapeurs saturées en composés volatils sont condensées puis décantées [42].

2.1.3.2. Extraction par hydrodistillation

Ce mode d'extraction est la méthode la plus utilisée, pour extraire les HE's et pouvoir les séparer à l'état pur, mais aussi de fournir de meilleurs rendements. Le principe consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition, les vapeurs hétérogènes vont se condenser sur une surface froide et l'HE sera alors séparée par différence de densité [43].

2.1.4. Méthodes d'analyses (Chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse «CPG/SM»)

A cause de l'importance des huiles essentielles dans le marché des cosmétiques et des parfums, les besoins de l'industrie de luxe ont conduit les chimistes à analyser les composants de diverses huiles essentielles, considérée comme produits de base pour la fabrication de matières premières odorantes. Le développement de la technique dans le monde industriel, ainsi que les exigences d'une législation de plus en plus complexe et sévère quant à la qualité et à la limitation des nuisances des produits industriels, confrontent un double problème toujours croissant de la demande d'analyse et de leur complexité [44].

La séparation et l'identification des constituants volatils d'un extrait présente bien moins d'alternatives que sa préparation. En effet, la CPG est la méthode de référence dans l'analyse des huiles essentielles; elle permet l'analyse de mélanges, qui peuvent être très complexes, de nature et de volatilité très variées. Comme

toutes les méthodes chromatographiques, la CPG repose sur le principe de migration différentielle des constituants d'un mélange à travers une phase stationnaire [45].

L'identification des composés volatils caractéristiques des plantes aromatiques nécessite l'utilisation de méthodes dites couplées. Les extraits à étudier sont généralement tellement complexes que la simple utilisation des temps ou indices de rétention chromatographiques ne permet pas l'identification certaine des composés détectés. Chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcanes, à température constante (indice de Kováts) ou en programmation de température (indices de rétention) [46].

2.2. Composés phénoliques

Les composés phénoliques aromatiques représentent le deuxième groupe majeur de métabolites secondaires. Ils sont caractérisés par un cycle phényle portant un ou plusieurs groupes hydroxyle acide [48]. Les composés phénoliques est un groupe de molécules hétérogènes qui comprennent plus de 10 000 composés solubles et insolubles. Les composés phénoliques sont fondamentalement formés par les voies d'acide malonique et shikimique (figure 1.1). La voie de l'acide malonique, moins fréquente chez les plantes supérieures, engendre des composés à effet très significatif sur les bactéries et les champignons, tandis que la voie de l'acide shikimique, est très fréquente chez les bactéries, les champignons et les plantes, mais pas chez les animaux.

Les composés phénoliques constituent l'un des groupes les plus importants chez les végétaux, issus de la grande voie d'aromagenèse; shikimate ou acide shikimique et de la voie acétate-malonate (voie malonique). Pour la voie de l'acide shikimique, les précurseurs dérivés de la glycolyse et du phosphate de pentose qui sont converties en différents acides aminés aromatiques dans lesquels l'intermédiaire le plus fréquent est la phénylalanine [33]. Les deux acides aminés aromatiques, la phénylalanine et la tyrosine, sont à l'origine de la formation de la plupart des composés phénoliques chez les végétaux. Ils sont eux-mêmes formés à partir de sucres simples issus du métabolisme primaire par la voie bien connue de l'acide shikimique (figure 1.2).

Les composés phénoliques ont été divisés en différents groupes tel que les lignines, les lignanes, les coumarines, les flavonoïdes, les tanins, les stilbènes, les styrylpyrones et les arylpyrones [31].

La quantification des composés phénoliques est réalisée par analyse spectrophotométrique ou chromatographique.

- Analyse spectrophotométrique

Les méthodes de Folin-Denis et Folin-ciocalteu sont les plus utilisées pour l'estimation des composés phénoliques extractibles totaux [51].

La méthode à la vanilline est largement utilisée pour la quantification des Proanthocyanidines [53].

La méthode HCL-butanol est utilisée pour estimer les tanins condensés de haut poids moléculaire, elle est aussi utilisée en combinaison avec celle de la vanilline pour évaluer le degré de polymérisation des proanthocyanidines.

La méthode à la rhodanine est spécifique au dosage des gallotannins, celle à l'iodate de potassium permet la quantification des tanins hydrolysables en général [54].

- Analyse chromatographique

Selon Naczki et Shahidi [48], de diverses techniques de chromatographie en phase gazeuse ont été employées. Pour la séparation et la quantification des acides phénols et des isoflavones. Les techniques d'HPLC sont de nos jours largement utilisées pour identifier et quantifier les composés phénoliques.

La chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrophotométrie de masse est utilisée pour la caractérisation structurale des composés phénoliques.

2.3. Métabolites secondaires azotés

La troisième catégorie importante de métabolites secondaires comprend les composés azotés tels que les alcaloïdes, les glucosinolates et les glycosides cyanogènes. Les alcaloïdes sont des composés à petit poids moléculaire et ils ont plus de 12 000 composés contenant de l'azote [55]. Les alcaloïdes sont synthétisés à partir de certains acides aminés comme la lysine, la tyrosine et le tryptophane etc. Les alcaloïdes peuvent être classés en différents groupes comme les alcaloïdes indoliques, les alcaloïdes de benzylisoquinoléine, les alcaloïdes des purines, les alcaloïdes du tropane et la nicotine, etc. De nombreux composés protecteurs azotés se retrouvent également dans des plantes, autres que des alcaloïdes, comme les glucosinolates et les glycosides cyanogènes. Ils pourraient se transformer en poison volatile (figure 1.1) [33].

3. Propriétés et intérêts des métabolites secondaires

3.1. Diversité chimique

Plus de 100 000 types de métabolites secondaires différents ont été rapportés [64]. La caractéristique la plus éminente chez les métabolites secondaires, est leur grande diversité chimique représentative de toutes les principales classes de composés organiques y compris: les aliphatiques, les aromatiques, les hydroaromatiques et les hétérocycliques.

3.2. Caractéristiques et fonctions des métabolites secondaires les plus courants

Les métabolites secondaires sont les composés clés à intérêt physiologique, technologique, pharmacologique et thérapeutique. Apportent de l'odeur, du goût et de la couleur aux plantes et les protègent des conditions défavorables; des pathogènes, des herbivores et des stress environnementales. Ces composés ont une contribution significative dans les domaines pharmaceutique et les industries de la nutrition et de la cosmétique, etc. [31]. Les métabolites secondaires comportent aussi un large éventail de fonctions protectives, y compris les fonctions antimicrobiennes, les photoprotectives, la stabilisation des structures et la signalisation dans des situations de stress biotique et abiotique. Leur diversité chimique peut être le déterminant de diverses fonctions.

Les stress abiotiques induisent la production de divers métabolites secondaires comme les flavonoïdes et d'autres phénylpropanoïdes. Des études ont montré que les lipides de la membrane thylacoïdale sont stabilisés et photoprotégés par divers caroténoïdes de la famille des xanthophylles et de certains terpénoïdes tels que l'isoprène et l' α -tocophérol en conditions de stress extrêmes [33]. Le niveau de flavonoïdes est ajusté dans les tissus végétaux dans des conditions de stress [56]. De même, les températures élevées diminuent la synthèse des anthocyanes chez les Astéracées «Chrysanthème et l'aster» [57].

L'accumulation de certains composés volatils appartenant à la famille des isoprénoïdes a permis de conférer une tolérance au stress abiotique chez les plantes. Ils fournissent une protection du photosystème à l'encontre des effets dommageables des ROS [33]. Le groupe des alcaloïdes indoliques comprend plus de 3000 composés tels que les agents antipaludiques (la quinine) et la strychnine (un poison de rat) sont principalement synthétisés à partir du tryptophane. Certaines jouent un rôle dans la protection des plantes contre les parasites et les agents pathogènes. Tandis que certaines espèces comme les deux apocynacées; «*Catharanthus roseus*» et «*Rauvolfia serpentina*», présentent une source de certains alcaloïdes indoliques médicalement importantes à savoir; la vinblastine contre le cancer et l'ajmaline pour les troubles cardiaques. En outre, le groupe des alcaloïdes de benzyloquinoléine contient environ 2500 composés de propriétés pharmacologiques comme la morphine (analgésique), la codéine (suppression de la

toux), la papavérine (relaxant musculaire), la sanguinarine et la berbérine (agent antimicrobien), etc. Ces alcaloïdes sont présentés principalement par les plantes des familles Berbéridacées, Renonculacées et Papavéracées. Alors que les alcaloïdes du tropane, comprennent l'hyoscyamine et la scopolamine qui sont dérivées des espèces de la famille Solanacées (*Hyoscyamus*, *Atropa* et *Datura*), bien que les alcaloïdes de purines sont synthétisés à leur tour à partir de nucléotides de purine à titre d'exemple la caféine et la théobromine qui sont les alcaloïdes de purines les plus courants [55]. Les espèces végétales produisant les glycosides cyanogènes autant que métabolites secondaires azotés, elles possèdent également des enzymes pour l'hydrolyse des sucres et libèrent un gaz cyanhydrique d'hydrogène (HCN), ce dernier inhibe les métalloprotéines comme le fer. Les tubercules de manioc de la famille des Euphorbiacées; *Manihot esculenta* contiennent une grande quantité de glycosides cyanogènes et provoquent une paralysie des membres [33].

Des travaux plus anciens ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques: croissance cellulaire, différenciation organogène, dormance des bourgeons, floraison et tubérisation [58].

Les composés phénoliques participent aux mécanismes d'inhibition tégumentaire: au moment de la germination, l'oxydation des phénols capte une partie de l'oxygène nécessaire à la reprise de l'activité respiratoire de l'embryon ce qui retarde la sortie de la plantule [35].

Les flavonoïdes montrent des propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance [59].

La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des micro-organismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques [60], et c'est l'exemple de l'implication des composés phénoliques du palmier dattier dans les réactions de défense à l'égard du bayoud; maladie infectieuse due à un champignon tellurique: le *Fusarium oxysporum* [61].

Les polyphénols interviennent dans la qualité alimentaire des fruits. Les anthocyanes et certains flavonoïdes participent à la coloration des fruits mûrs. Ils confèrent aux fruits et légumes leurs teintes rouges ou Bleutées [59].

Les composés phénoliques déterminent également la saveur des fruits: les tanins sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non mûrs, les flavanones sont responsables de l'amertume des *Citrus* et peuvent donner naissance, par transformation chimique, à des dihydro chalcones à saveur sucrée [62].

Il devient de plus en plus évident que les métabolites secondaires jouent un rôle important en tant que molécules de signalisation. Cependant, la logique chimique de

leur implication dans les cascades de transduction du signal reste complètement élucidée [63]. La production de couleur et parfum par métabolites secondaires peut attirer ou repousser les insectes et les herbivores, alors que les toxines peuvent être impliquées dans des interactions allélopathiques plantes-plantes, protégeant ainsi les plantes du stress biotique [64].

La fonction photoprotective de divers métabolites secondaires y compris les flavonoïdes, les anthocyanes, les dérivés de l'acide cinnamique et les xanthophylles s'explique par la présence de doubles liaisons. En raison de cette configuration électronique, ils ont tendance à absorber le rayonnement visible et UV, ce qui provoque des transferts faciles d'électrons et d'énergie [65].

Autant de preuves ont montré que les métabolites secondaires fonctionnent comme des antioxydants, aidant les plantes à faire face au stress oxydatif qui se produit dans des environnements hostiles, auquel la liste croissante comprend des composés contenant des groupes hydroxy et thiol tels que l'acide ascorbique et l'acide lipoïque, les flavonoïdes contenant du groupe O-dihydroxy tels que la quercétine, les aliphatiques et les arylamines, les acides gras insaturés et les caroténoïdes [66].

Les composés phénoliques peuvent en effet intervenir:

- Dans certains aspects de la physiologie de la plante, tels que la lignification, la régulation de la croissance, les interactions moléculaires avec certains micro-organismes symbiotiques ou parasites;
- Dans les interactions des plantes avec l'environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux ultraviolets), soit directement dans la nature, soit lors de la conservation après récolte de certains végétaux;
- Certains composés phénoliques sont des précurseurs des composés volatils; ainsi, les acides hydroxycinnamiques libres peuvent se transformer par oxydation ou décarboxylation en composés volatils (4-éthylphénol, 4-vinylphénol, 4-phénylguaiacol, ...) responsables d'arômes particuliers [67].

Les terpènes représentent le plus grand groupe de métabolites secondaires de plantes. Dix mille composés terpéniques ont été isolés et purifiés et leurs structures ont été élucidées. Ils sont de nature répandue, et se produisent dans presque toutes les plantes [68]. Ils engagent plusieurs fonctions dans les plantes; par exemple, ils agissent comme régulateurs de croissance des plantes, molécules de défense contre les herbivores et les agents pathogènes, attirant des composés pour les pollinisateurs et comme composés qui influencent (directement ou indirectement) la croissance et le développement des plantes adjacentes.

Au cours du cycle végétatif des plantes, il est par ailleurs impossible d'attribuer une fonction commune à l'ensemble des terpènes; leurs fonctions peuvent varier d'une espèce à une autre et d'un organe à un autre. La teneur élevée du feuillage de certaines familles (Lamiacées, Lauracées,...) en composés terpéniques a un effet répulsif vis-à-vis des herbivores. Cette fonction nécessite une localisation épidermique, soit sous forme de cellules isolées (épiderme des pétales de roses), soit le plus souvent, sous forme de poils sécréteurs (menthe). La présence de composés terpéniques au niveau des racines, des écorces et du bois correspond à un effet antiseptique vis-à-vis des parasites présents dans le sol ou attaquant le bois. Toutefois, certains composés terpéniques ont une fonction énergétique. De ce fait, ils sont mis en réserve pendant le jour et dégradés durant la nuit en acétyl-CoA [35].

Jusqu'à maintenant, la fonction de l'émission de terpène (l'oxydation) provenant de certaines plantes qui ne stockent pas ceux ci dans leurs tissus a été un mystère. Après avoir signalé que l'isoprène, augmente la thermotolérance et la photosynthèse chez certaines espèces, il a été découvert que la thermotolérance des monoterpènes chez la fagacée *Quercus ilex* (chêne vert) augmente lorsque les feuilles sont fumigées avec des monoterpènes. Le stockage de terpènes permet aux plantes de maintenir des quantités suffisantes pour être repérées par les animaux (dans le cas d'attirer des pollinisateurs), ou d'être libérés lors d'un endommagement tissulaire (dans le cas de la défense contre les herbivores). Ainsi, l'interaction avec les insectes nécessite généralement le stockage de terpènes dans les tissus végétaux [69].

Les stérols sont des dérivés des terpènes, sont des composés essentiels de la membrane cellulaire, ils la stabilisent en interagissant avec les phospholipides. Les caroténoïdes rouges, orange et jaune sont des tétraterpénoïdes qui flânent comme des pigments accessoires dans la photosynthèse et protègent les tissus photosynthétiques de la photo-oxydation [33].

4. Réponse des plantes au concept stress «facteurs biotiques et abiotiques» par requête au métabolisme secondaire

Une attention particulière a été rémunérée aux changements de métabolites secondaires qui peuvent survenir au cours de leurs synthèses. Un large éventail de contraintes environnementales (sécheresse, alcalinité, salinité, stress UV, infection pathogène, carence en nutriments et traitement aux herbicides) est potentiellement nocif pour les plantes et augmente souvent l'accumulation de ces composés [30].

Le stress nutritif avait toujours présenté un effet marqué sur le contenu phénolique dans les tissus végétaux. Les concentrations de divers métabolites secondaires dépendent fortement des conditions de croissance, qui ont un impact sur les voies métaboliques responsable de l'accumulation de ces produits naturels. Les déficiences de l'azote et du phosphate influencent directement l'accumulation de

métabolites secondaires. La carence en éléments à savoir; le potassium, le soufre et le magnésium est également signalée pour augmenter les concentrations phénoliques. En outre, le faible niveau de l'élément fer peut provoquer aussi une libération accrue des acides phénolique provenant des racines [70].

L'exposition à la sécheresse ou au stress salin provoque de nombreuses réactions fréquentes chez les plantes. Les deux stress entraînent une déshydratation cellulaire qui provoque le stress osmotique et l'élimination de l'eau du cytoplasme aux vacuoles. Bryant et *al.* [71], ont émis l'hypothèse que lorsque les plantes sont stressées, un échange se produit entre la production de carbone et la formation de composés secondaires défensifs. Ce qui laisse entendre que les métabolites secondaires sont impliqués dans des fonctions de protection en réponse aux conditions de stress abiotique.

De même, l'accumulation d'anthocyanines est stimulée par différents stress environnementaux tels que les UV, la lumière bleue, la lumière de haute intensité, les blessures, les attaques pathogènes, la sécheresse et la déficience en éléments nutritifs [72].

Néanmoins, le contenu en molécules secondaire fluctue en raison de facteurs climatiques et d'autres facteurs, liés à l'espèce, ou individus de la même espèce. Ainsi, le transport et le stockage de ces métabolites sont influencés par des facteurs biochimiques et cellulaires. L'initiation et la différenciation de structures cellulaires spécifiques pour la synthèse et l'accumulation des métabolites secondaires sont également influencées par les facteurs de développement [73]. À côté de cela, leurs concentrations dépendent également des conditions de croissance et des voies métaboliques apparentés. L'induction de leur biosynthèse et leur forte concentration dépend également de la réponse aux attaques des pathogènes (facteurs biotiques) pour pousser les plantes hôtes à se défendre.

Les métabolites secondaires comme les composés phénoliques des plantes montrent des variations dans différents niveaux à savoir; les niveaux génétiques, les niveaux physiologiques et les niveaux de développement en réponse à des facteurs environnementaux comme la disponibilité des nutriments et l'intensité de la lumière, etc. Leur concentration et leur accumulation sont également affectées au niveau génétique. Les gènes impliqués dans la voie de la biosynthèse des métabolites secondaires sont généralement contrôlés au niveau de la transcription par divers facteurs de transcription dont ces facteurs jouent un rôle important dans la régulation de la concentration, de l'accumulation et de la biosynthèse des différents métabolites secondaires. L'augmentation de la production de différents métabolites secondaires peut être induite grâce à la culture de tissus *in vitro* en utilisant des inducteurs et des régulateurs de croissance des plantes qui démontrent clairement que leur concentration peut être modifiée.

5. Facteurs d'influence imputés la fluctuation des métabolites secondaires

Généralement, il a été noté que les métabolites secondaires ne se stabilisent pas comme d'autres traits qualitatifs et quantitatifs de la plante. De ce fait, les facteurs d'influence responsables de la fluctuation en taux de métabolites secondaires peuvent être divisés en quatre groupes principaux:

(i) facteurs génétiques, (ii) facteurs ontogéniques (iii) facteurs morphogénétiques et (iv) facteurs environnementaux (biotiques et abiotiques).

Dans cette optique, un effort a été réalisé pour comprendre les faits régissant les fluctuations du contenu de différents métabolites secondaires et comment le paramètre saisonnalité contribue de manière significative à la biosynthèse de ces composés (figure 1.3) [74].

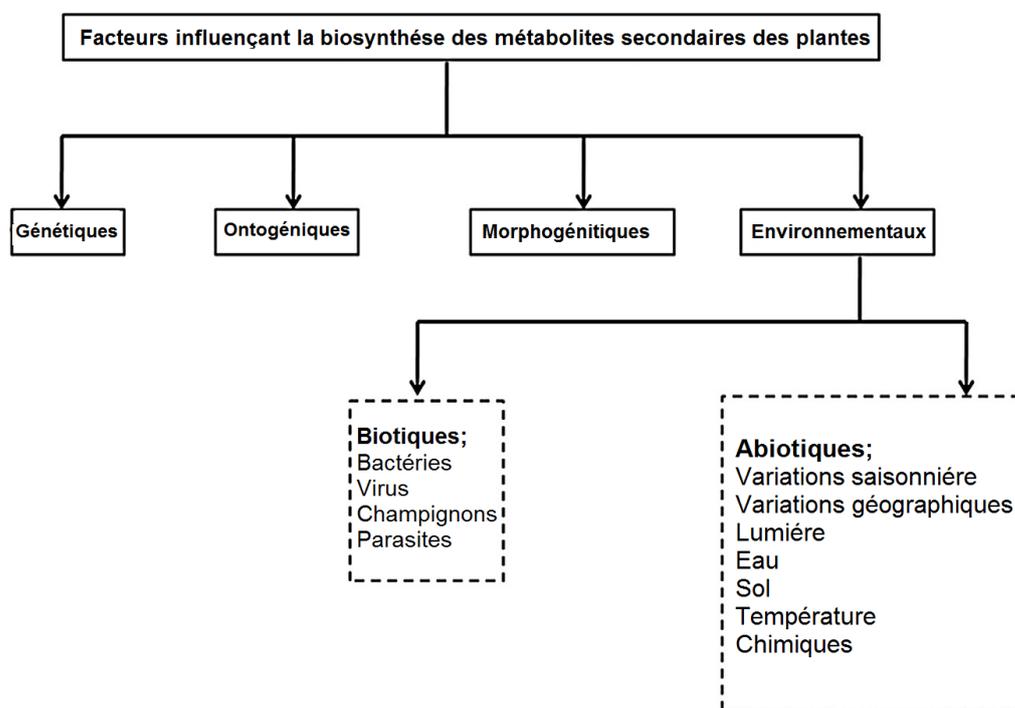


Figure 1.3: Différents facteurs affectant la synthèse du contenu des métabolites secondaires chez les plantes adapté par Verma et Shukla [75].

5.1. Facteurs génétiques

Les voies de biosynthèse des métabolites secondaires sont encore le sujet de très grand nombre de recherches; il existe très peu de connaissances à leur sujet; cependant, il a été montré que la production de ces métabolites dans les plantes se manifeste sous contrôle génétique. Il existe plusieurs milliers de gènes dans les génomes végétaux à partir desquels on suppose que seulement 15 à 25% des gènes contribuent au métabolisme secondaire qui résulte de la synthèse des métabolites secondaires. Ces gènes sont régulés par différents facteurs de

transcription qui affectent le flux métabolique en influençant l'expression génique [76]. Cependant, il a été démontré que les enzymes sont des substrats spécifiques et assure un seul produit à partir d'un seul substrat. Cependant, Tous les gènes suivent différents profils d'expression dans différents tissus, bien que le niveau accru de ces gènes contribue à l'amélioration de l'accumulation des métabolites secondaires [32]. Woldemariam et *al.* [77], dans leur étude ont indiqué clairement que les gènes et les enzymes participent activement aux pistes de biosynthèse des métabolites secondaires, où le facteur de transcription (NaMYC2), joue un rôle significatif dans la régulation des voies biosynthétiques des molécules de défenses chez la solanacée *Nicotiana attenuata*. Ces études ont prouvé que la biosynthèse des métabolites secondaires est indubitablement influencée par les différents gènes régulateurs, par les enzymes, par les facteurs de transcription et par les stress causés par les agents pathogènes, entraînant ainsi une incapacité d'accumulation ou de production de différents métabolites secondaires [34] (figure 1.3).

5.2. Facteurs ontogéniques

L'ontogenèse est l'ensemble des événements impliqués dans le développement d'un organisme. Elle commence à partir de graines et passe à travers les différentes étapes de développement, comme le stade végétal juvénile jusqu'au stade maturation qui se termine par un stade de sénescence. Il existe des caractères spécifiques qui sont associés à chaque étape, comme le stade des semis, dépend des réserves de graines stockées, des réserves de graines d'échappement pendant la phase juvénile alors que la phase de maturation (floraison et fructification) est soumise à la reproduction. Différents stades ontogéniques peuvent affecter la concentration de divers produits végétaux primaires et secondaires tels que les alcaloïdes, les composés phénolique [78], les terpénoïdes [79] et les glycosides cyanogéniques en réponse à la défense. Des concentrations différentes de la teneur en morphine (alcaloïde) à différents stades de développement ont été observées chez la papavéracée *Papaver somniferum* [80]. De même, les huiles essentielles, les composés phénoliques ainsi que les saponines montrent des concentrations variables à différents stades ontogéniques chez la légumineuse *Astragalus compactus*, où sa composition changeait en phase de floraison avec une dominance du phytol qui été le principal composé. De même, la croissance et le développement ont une influence notable sur la qualité et la quantité de l'huile essentielle de l'arbuste *Myrtus communis* [81]. Sur la base de différentes études ontogéniques qui s'articulent sur l'accumulation des métabolites secondaires, ils ont pu conclure que les différents stades de développement du cycle de vie de la plante affectent le contenu des métabolites secondaires. Ces métabolites n'ont pas une concentration constante pendant toute la vie végétale, mais ils changent face aux différentes conditions environnementales en fonction de leur besoin [34] (figure 1.3).

5.3. Facteurs morphogénétiques

Les plantes ont des tissus qui sont performés à exercés des fonctions spécialisées à savoir: la sécrétion, le stockage, le support mécanique, etc. La plupart de substances naturelles sont générées par les tissus sécrétoires des plantes vasculaires. Les tissus sécrétoires varient en structure, en localisation et par rapport à la substance sécrétée. Ces tissus sont classés selon la substance produite, à savoir; les laticifères, les glandes salines, les cellules sécrétrices de mucilages, les cellules sécrétrices d'enzymes, les trichomes sécrétrices d'huiles essentielles, les tissus sécrétant des flavonoïdes, etc. [82]. Ces tissus différenciés compromettent également une dissemblance dans leurs voies métaboliques. Un groupe de gènes se coordonne pour assurer les différentes fonctions telles que la division cellulaire et la différenciation. La synthèse et l'accumulation du latex chez la papavéracée *Opium poppy* dans les laticifères est un bon exemple d'une telle hypothèse [83] (figure 1.3).

5.4. Facteurs environnementaux

Les plantes interagissent avec l'environnement pour leur survie, sont donc influencées par plusieurs facteurs environnementaux incluant des stimuli abiotiques qui régulent la biosynthèse des métabolites secondaires [84]. Les plantes de la même espèce cultivées dans des environnements différents peuvent avoir des distinctions en concentration d'un métabolite secondaire particulier. Les facteurs abiotiques (intensité lumineuse, la température, l'indice saisonnalité, etc) causent des stress chez les plantes en raison de conditions défavorables. En réponse à ces stress, les plantes produisent des métabolites secondaires spécifiques en réponse de chaque type de stress. Ainsi, les facteurs environnementaux sont les facteurs décisifs dans la biosynthèse de ces composés. [85].

5.4.1. Facteurs biotiques

Les plantes sont physiquement attaquées par de nombreux agents biologiques comme les champignons, les virus, les bactéries, les nématodes, etc., ce qui provoque un stress dans les plantes connues sous le nom de stress biotique. En raison de la nature sessile des plantes, ils ne peuvent pas se déplacer pour se protéger. Les plantes n'ont pas non plus de système immunitaire comme les animaux, mais elles présentent une résistance à ces agents pathogènes par des métabolites secondaires. Certains métabolites secondaires (phytoalexines) ont des activités antimicrobiennes qui fonctionnent comme un système défensif des plantes contre ces agents pathogènes. Pendant le processus de défense contre les agents pathogènes, l'exigence de concentrations élevées de métabolites secondaires par les plantes déclenche rapidement leur biosynthèse. Ces métabolites comme les composés phénoliques montrent des changements dans leur concentration comme chez la Fabacée hôte «*Lupinus angustifolius*» face à l'infection fongique causés par l'espèce *Colletotrichum lupini* [33]

Les plantes développent un système immunitaire inné en réponse à une attaque pathogène. Ce système est déclenché par deux mécanismes, à savoir; l'immunité basale et l'immunité déclenchée par un effecteur. Illustrons ces mécanismes par le système d'immunité basale, dont les motifs moléculaires associés aux microbes sont perçus par les récepteurs de la surface cellulaire (récepteurs de reconnaissance de motifs). Ces effecteurs se distinguent chez les plantes en tant que signal d'infection, et de réaction contre ces effecteurs, qui activent diverses voies métaboliques qui aboutissent à la synthèse de différents métabolites secondaires, alors que leur concentration se culminent en réponse à une attaque pathogène pour protéger la plante [86].

5.4.2. Facteurs abiotiques

Pendant l'ontogenèse, les plantes interagissent avec l'environnement avoisinant, elles entrent en contact avec différents éléments abiotiques comme l'eau, la lumière, la température, le sol et les produits chimiques (minéraux / engrais). Les plantes nécessitent ces composants pour leur croissance et le développement et la survie en quantité appropriée. Cependant, une quantité plus ou moins importante de ces éléments provoquent un stress pour les plantes conduisant finalement à une variation de la production ou de l'accumulation des métabolites secondaires [34].

5.4.2.1. Stress hydrique

L'eau est une molécule clé dans les activités physiologiques des plantes, car elle sert de moyen de transport de métabolites et de nutriments à toutes les parties de la plante. Lorsque l'approvisionnement en eau devient limitatif ou le taux de transpiration augmente dans les plantes, il provoque un stress hydrique qui préconise la production et l'accumulation des métabolites secondaires [34].

5.4.2.2. Stress salin

La concentration élevée principalement les ions comme le Na^+ dans le sol peut diminuer l'absorption de l'eau et des nutriments, la croissance et le niveau de photosynthèse dans les plantes. Cela peut provoquer une déshydratation de cellules végétales en raison de l'élimination de l'eau du cytoplasme, qui provoque le stress osmotique. Ce type de stress dans les plantes peut augmenter ou diminuer la teneur en métabolites secondaire [87]. La concentration des alcaloïdes à savoir; la réserpine et la vincristine chez l'apocynacée *Rauvolfia tetraphylla* augmente sous stress salin. L'augmentation du contenu des acides phénoliques chez certaines plantes a été observée avec l'augmentation de la salinité. Certaines plantes comme la *Mentha piperita*, le *Thymus maroccanus* et l'*Origanum vulgare* montrent une diminution de la teneur en huiles essentielles sous un stress salin, alors que d'autres comme l'Astéracée *Matricaria recutita* et la Lamiacée *Satureja hortensis* montrent une augmentation de la teneur en huile essentielle sous les mêmes conditions [88].

5.4.2.3. Stress thermique

La croissance des plantes dépend de la température appropriée. Les températures élevées et basses ont un effet néfaste sur les plantes, qui confèrent respectivement la chaleur et le stress au froid [89]. Un certain nombre d'études ont montré une augmentation de la biosynthèse des métabolites secondaires en réponse à une température élevée, alors que d'autres ont montré un effet contraire à cette hypothèse [90]. Cependant, le stress au froid augmente le niveau de protéines solubles et diminue la teneur en chlorophylle a et en chlorophylle totale, avec un impact significatif sur la variation du contenu des métabolites secondaires [91].

5.4.2.4. Stress photosynthétique

La lumière est un élément abiotique essentiel requis par les plantes pour la photosynthèse et la croissance qui influence l'accumulation et la qualité des métabolites secondaires. La lumière du soleil favorise l'accumulation de coumarines chez la Fabacée *Muhlenbergia glomerata*. Une période de lumière plus courte diminue le niveau de ceux-ci dans les feuilles et les tiges des plantes, tandis qu'une période de lumière plus longue augmente significativement le niveau de ces coumarines. En conséquence, l'intensité lumineuse et la photopériode ont des effets significatifs sur l'accumulation des métabolites secondaires [92].

5.4.2.5. Stress chimique (nutritionnel)

Les plantes nécessitent des produits chimiques différents sous forme de nutriments, d'engrais, d'éliciteurs, de régulateurs de croissance, etc., pour leur bonne croissance y compris la biosynthèse des métabolites secondaires. Cependant, lorsque ces produits chimiques sont déficients en concentrations appropriées, ils provoquent un stress chimique. L'application de micronutriments entraîne une amélioration des métabolites primaires susceptibles d'améliorer les métabolites secondaires chez la fabacée «*Cassia angustifolia*». Les teneurs en chlorophylle, en protéines et en phénol totaux sont également influencés par les éléments à savoir; le FeSO_4 , le ZnSO_4 , et le CuSO_4 [93]. Les engrais azotés et phosphorés affectent la teneur en flavonoïdes de l'Hypericacée *Hypericum perforatum*. L'azote et le phosphore sont les deux facteurs nutritifs clés qui jouent un rôle important dans la croissance et le développement des plantes [94]. À côté de ces facteurs, les plantes nécessitent également des gaz atmosphériques comme le dioxyde de carbone, l'oxygène et l'azote pour compléter leur processus biologique et leur synthèse des métabolites secondaires. La concentration des métabolites secondaires de plantes augmente directement ou indirectement par le CO_2 chez la Taxacée *Taxus bacatta* et l'Astéracée *Echinacea purpure*. De telles études sur divers effets chimiques sur les métabolites secondaires indiquent clairement que les produits chimiques requis par

les plantes pour leur croissance et leur développement affectent également la biosynthèse des ces métabolites de sorte que leur concentration peut fluctuer [95].

5.4.3. Variation saisonnière

Le taux des métabolites secondaires dans les plantes peut varier en fonction du paramètre saisonnalité ainsi que des particularités intra, inter-plantes et interspécifiques, en dépit de l'existence d'un contrôle génétique [28], des facteurs biologiques et environnementaux ainsi que des processus biochimiques, physiologiques, écologiques et évolutifs [73]. La Papavéracée *Papaver somniferum* est une source riche de plus de 80 alcaloïdes dans lesquels la morphine, la codéine, la thébaïne, la narcotine et la papavérine sont les plus importantes et sont largement utilisées dans les industries pharmaceutiques. Ces alcaloïdes présentent une variation saisonnière de leur contenu à différents stades de développement. Le temps optimal de récolte de l'alcaloïde et la variation diurne doit être prise simultanément en considération, sinon le composé principal se transforme ou se dégrade, pourrait être dû à une augmentation ou à une diminution de l'activité enzymatique dans la voie de biosynthèse des alcaloïdes suivant un chemin irréversible, une fois converti en un autre composé [96].

5.4.4. Variation géographique et/ou régional

La concentration des métabolites secondaires est également affectée par d'autres facteurs, entre autres; la variation géographique qui peut modifier la teneur des métabolites secondaires dans les espèces végétales ainsi que l'interruption des activités assumées par les plantes [97]. L'emplacement et les conditions climatiques influencent le contenu de l'alcaloïde «camptothécine» chez la Stemonuracée *Nothapodytes nimmoniana* [98]. Il a été suggéré que l'impact des localités sur l'activité antibactérienne chez la Lamiacée *Mentha spicata* de différentes régions donne des rendements différents, tandis que les activités antibactériennes des plantes des régions à haute altitude sont plus affectées en raison de la grande production de métabolites secondaires responsables de ces activités [99]. Différentes régions écologiques avec une latitude, une longitude, une température moyenne et des conditions climatiques différentes ont un effet sur l'activité antioxydante et les composés phénoliques totaux de l'Apocynacée *Catharanthus roseus* [100]. Ces études démontrent clairement que les lieux et les conditions environnementales ont définitivement un impact sur la biosynthèse des métabolites secondaires.

En conclusion, les métabolites secondaires des plantes sont des sources uniques pour les produits pharmaceutiques, les additifs alimentaires, les arômes et les produits biochimiques. L'accumulation de ces métabolites se produit souvent dans des plantes soumises à des stress incluant divers éliciteurs ou molécules de signaux. Les métabolites secondaires jouent un rôle majeur dans l'adaptation des plantes à l'environnement et à surmonter les conditions de stress. Les facteurs

environnementaux à savoir la saisonnalité, la température, l'humidité, l'intensité lumineuse, l'approvisionnement en eau, les minéraux et le CO₂ influencent la croissance d'une plante et la production de métabolites secondaires.

6. Confections d'acquisition des métabolites secondaires à partir des plantes

L'une des étapes les plus importantes de l'analyse quantitative des composés secondaires dans les échantillons est l'extraction, qui vise à séparer sélectivement, avec une bonne récupération, des composés cibles de l'échantillon et d'éliminer les interférences [101]. De nombreux facteurs peuvent influencer l'extraction de ces composés, comme la structure chimique, la méthode d'extraction utilisée et le temps de stockage des échantillons à tester. Sefidkon et *al.* [102] ont comparé l'influence du séchage (étuve, soleil et ombre) et des méthodes d'extraction sur le rendement et la composition chimique de l'huile essentielle de la lamiacée *Satureja hortensis*. Dans ce cas, les méthodes de séchage n'ont pas de différence significative sur la composition de l'huile, mais l'hydrodistillation s'est mieux développée par rapport à la distillation à la vapeur. Des mélanges de méthanol, d'éthanol, d'acétone et hydro-alcooliques sont fréquemment utilisés pour effectuer l'extraction, ou plusieurs auteurs rapportent également des études comparant différents solvants [103]. L'extraction est souvent effectuée avec agitation ou dans un bain à ultrasons, où la température et le temps sont réglés. Le temps d'extraction peut varier considérablement en fonction de la procédure utilisée, généralement du 30 s jusqu'à 72 h [104]. Néanmoins, les temps d'extraction prolongés augmentent les chances de réactions d'oxydation des biomolécules [103].

De nombreux tests spectrophotométriques ont été utilisés pour quantifier les différentes classes de composés phénoliques, tels que les anthocyanines, les flavonoïdes ou les tanins (condensés ou hydrolysables). Les principaux inconvénients de ces méthodes sont liés à une estimation excessive aux résultats en raison d'interférences. En outre, ils produisent souvent des résultats non comparables. Par conséquent, les techniques chromatographiques combinées avec différents détecteurs, sont préférées afin d'identifier individuellement et de quantifier les différentes classes des métabolites secondaires dans les plantes. Dans certains cas, l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse nécessite une dérivation préalable pour les composés non volatiles, par contre, cette dérivation n'est plus nécessaire lorsque des composés phénoliques volatils comme l'eugénol, le carvacrol et le thymol sont analysés [48].

7. Implication des métabolites secondaires comme molécules de défense chez les plantes

Une plante exprimant une résistance partielle vis-à-vis a un agent pathogène, est en fait une plante capable de réagir à l'agression. Cette réaction, appelée défense, permet à la plante de diminuer l'impact de l'agent agresseur et se

matérialise de différentes façons, comme la formation de formes actives de l'oxygène (ROS), l'expression de gènes de défense (ex. protéines) ou la production de métabolites de défense. La plupart des plantes possèdent la capacité de produire ces métabolites secondaires qui auraient un rôle de protection contre les attaques pathogènes; ces molécules de défense préexistent dans la plante (phytoanticipines) ou leur synthèse est induite en réponse à l'attaque par un agent pathogène (phytoalexines).

8. Substances antimicrobiennes d'origine végétale

8.1. Principaux composés phénoliques à pouvoir antimicrobiens

De nombreuses études «in vitro» menées sur le pouvoir des composés phénoliques, confirment que ces composés sont considérés comme agents antimicrobiens contre un grand nombre de microorganismes pathogènes, avec des spectres d'activités variables [105].

En effet certains quinones, présentent un effet bactériostatique sur les bactéries à Gram positif, mais pas vis à vis des bactéries à Gram négatif [106]. Tandis que les acides phénoliques ont des propriétés antiseptiques urinaires, antifongiques et antibactériennes [43].

De récentes études ont montré que les coumarines exercent plusieurs activités antimicrobiennes, spécialement dans l'inhibition de la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* et de la germination des spores d'*Aspergillus niger* [107]. Pour leur activité antibactérienne, il a été noté qu'ils sont plus efficaces contre les Gram positifs [108].

Les flavonoïdes avec leurs différentes classes dont les plus importantes sont: les flavones, flavonols, flavonones, flavonones 3-oles, flavanes-3,4 dioles, et les anthocyanidines [59] ont révélés avoir un grand potentiel antibactérien [109]:

- En se complexant avec des composants des parois avec inhibition de la croissance microbienne;
- En perturbant leurs métabolismes énergétiques [110].

D'autre part, les tanins sont largement connus par leurs propriétés inhibitrices des microorganismes grâce à leur pouvoir à former des complexes stables avec les protéines et en les précipitant [111]. Ils exercent une activité antibactérienne par interaction avec la membrane cellulaire, qui induit un changement morphologique de la bactérie, en inhibant l'activité des protéases, des protéines de transport et des adhésines [112].

8.2. Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles

En phytothérapie les HE's sont utilisées contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, comme les bactéries endocanaliaires ou la microflore vaginale, ou d'origine fongique comme les dermatophytes, les moisissures allergisantes ou les champignons opportunistes [113]. Elles représentent aussi des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants entant qu'agents antimicrobiens à large spectre [114]. Cette activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, en particulier de leurs composés volatils majeurs [115].

Le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles est liée à plusieurs paramètres et principalement à:

- à la composition chimique (notion de chémotype)

Une même plante aromatique présentera une composition différente en HE's, suivant les parties utilisées, la période de cueillette, la localisation géographique et même suivant le protocole d'extraction ou le mode d'utilisation [116]. C'est la notion de chémotype qui présente de grandes variabilités, quantitatives et qualitatives et qui explique les divergences des résultats rapportés pour une plante donnée [117].

Le principal facteur modulant le spectre d'activité des HE's est le type et la structure moléculaire des composants actifs présents dans ceux ci; ainsi qu'in vitro on observe une activité antimicrobienne plus élevée des terpènes oxygénés en comparaison aux terpènes hydrocarbonés.

La structure moléculaire semble présenter un rôle aussi important que le degré d'oxydation de la molécule de terpène: la caractéristique lipophile du squelette hydrocarboné ainsi que la propriété hydrophile des groupes fonctionnels, sont déterminantes vis-à-vis de l'activité antimicrobienne des terpénoïdes [118]. Sur cette base l'ordre de l'activité antimicrobienne de ces composés est le suivant [119]:

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

Le pouvoir antimicrobien des HE's est probablement en rapport avec leur fort contenu phénolique [120], mais les phénols ne sont pas les seuls responsables de l'intégralité de l'activité, la totalité de la composition chimique devant être prise en compte [36]. Lahlou [121], a montré que les activités antimicrobiennes, antivirales, insecticides, larvicides des extraits totaux des HE's sont supérieures à celle des composés majoritaires testés séparément. Ces données ont été confirmées par Rota et al. [122] dans une étude «in vitro» sur les microbes pathogènes isolés des aliments.

- Aux germes cibles

Un autre paramètre important déterminant l'activité antimicrobienne des HE's est le type de microorganismes ciblés, c'est ce qu'on appelle le spectre d'activité. En général les différents microbes n'ont pas une sensibilité similaire vis-à-vis les HE's [115], car une HE peut être biocide vis-à-vis de certaines souches et biostatique en vers d'autres ou n'avoir aucun effet [121]. Donc il est important de mentionner la dénomination complète: le Gram des microorganismes ainsi que l'espèce botanique et le chémotype des HE's [115].

Il n'y a pas de règles majeures déterminant le spectre d'activité:

- Marzouk et *al.* [123], ont aperçu que la bactérie à Gram positif serait plus résistantes aux HE's que la bactérie à Gram négatif;
- D'autres travaux rapportent que les bactéries à Gram négatif apparaissent plus résistantes que celles à Gram positif vis-à-vis des HE's [36].

Ces affirmations n'ont cependant pas été confirmées par d'autres travaux. La susceptibilité des bactéries serait en effet indépendante du Gram ou dépend des HE's utilisées [119]. Ceci souligne encore l'importance de la notion de chémotype.

En effet concernant le mode d'action antimicrobien des huiles essentielles, certains chercheurs ont montré que la puissance de l'action des HE's varie selon leurs constituants majoritaires, et que le mode d'action est principalement lié au profil chimique des constituants de chaque HE, qui est largement diversifié [124 et 125]. Jusqu'à présent, il n'existe pas d'étude qui puisse nous donner une idée claire et précise sur le mode d'action des HE's. Etant donné la complexité de leur composition chimique, tout laisse à penser que ce mode d'action est assez complexe et difficile à cerner du point de vue moléculaire. Du fait de la variabilité des teneurs et des profils des composants des HE's, il est probable que leurs activités antimicrobiennes n'est pas attribuable à un mécanisme unique, mais à différentes cibles d'action au niveau cellulaire. Quelques investigations sur le mécanisme d'action antimicrobienne des HE's ou de leurs constituants ont été menées par différents auteurs dont Cox et *al.* [124], ont rapporté que l'activité antifongique des HE's est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique, suivie de sa rupture, entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la cellule. De même, les composés terpéniques des HE's et plus précisément leurs groupements fonctionnel, tels que les phénols et les aldéhydes qui réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique.

9. Expression des molécules bioactives en cas de bioagression par des agents pathogènes microbiens

9.1. Généralités sur le principe de résistance chez les plantes(Interaction plante hôte / agents pathogènes)

Au cours de leur évolution, toutes les plantes ont élaboré un véritable « système immunitaire » capable de détecter un danger, que ce dernier soit de nature biotique (microorganisme pathogène, insecte ravageur) ou abiotique (pluie, grêle, gel, vent). En l'absence des lymphocytes et anticorps que l'on retrouve dans le système immunitaire humain, le « système phytoimmunitaire » se distingue par la variété des molécules de défense qu'il produit en réponse via un stress. Cette stratégie défensive activée par l'agression, conduit à des modifications considérables de l'activité métabolique des cellules végétales, se traduisant par une cascade d'événements destinés à restreindre la progression des agents infectieux et à réduire les dommages causés par des blessures. On retrouve chez les plantes deux types de résistance: la résistance passive; impliquant des barrières préformées ou constitutives dont la plante s'est dotée à la suite d'une adaptation climatique, et la résistance active; impliquant des barrières nouvellement formées en réponse au stress.

9.1.1. La résistance passive

Chaque plante possède, de façon naturelle, une variété de moyens de défense constitutifs. Ces mécanismes varient d'une plante à l'autre, car ils sont très souvent le résultat d'une adaptation temporelle à des conditions climatiques ou environnementales particulières. Par conséquent, les feuilles des plantes poussant dans des zones tropicales auront tendance à être recouvertes d'une cuticule plus épaisse que celles poussant sous des climats pluvieux. De même, les plantes aromatiques qui poussent à l'état sauvage dans les pays méditerranéens ont une concentration plus élevée en métabolites secondaires (plus particulièrement les huiles essentielles) en raison de leur adaptation à une certaine sécheresse du sol sur une longue période. La résistance passive, serait responsable de la protection des plantes à la plupart des agents pathogènes et des prédateurs auxquels elles sont confrontées en permanence. Elle existe donc chez toutes les plantes, mais à des degrés divers. Elle se divise en deux grandes catégories: (i) les barrières structurales constitutives et (ii) les substances chimiques préformées [126].

- Les barrières structurales constitutives

Représentent le premier obstacle qu'un agent pathogène rencontre avant son contact avec les parois des cellules épidermiques de la plante où s'effectuera le premier niveau de reconnaissance responsable du devenir de l'interaction. Les virus et les bactéries pénètrent ces barrières de façon purement passive en profitant des microblessures causées, par exemple, par les piqûres d'insectes, par les pluies, le gel... Les champignons pathogènes peuvent aussi traverser ces barrières de façon passive, mais ils ont également acquis au cours de leur évolution la capacité de produire des enzymes susceptibles d'hydrolyser certains composés structuraux de ces barrières. Parmi toutes les barrières constitutives présentes chez les plantes, la cuticule de nature hydrophobe est probablement la structure de protection la plus

efficace, composé de cutine qui un polymère insoluble intimement imbriqué dans un réseau de cires [127]. La plupart des champignons pathogènes ont acquis la capacité de traverser cet obstacle au moyen d'enzymes spécifiques que l'on nomme cutinases [128]. Les autres barrières structurales susceptibles de contrer la progression d'un agent pathogène sont représentées par les poils, les trichomes et les épines.

- Les barrières chimiques constitutives

Sont fabriquées continuellement, même en l'absence d'agents pathogènes. Au sein de ces molécules; appelées phytoanticipines, sont regroupés des composés phénoliques, des alcaloïdes, des lactones, des saponines, des glycosides cyanogéniques et des huiles essentielles [129]. Il existe quatre principales familles de composés phénoliques à savoir; les acides phénoliques simples, comme le catéchol et l'acide protocatéchuique, les flavones, l'acide chlorogénique et les quinones [130]. Les composés phénoliques sont bien connus pour leur potentiel antifongique et antibactérien. En règle générale, les composés phénoliques peuvent avoir un effet délétère sur: (i) la germination des spores; (ii) la croissance mycélienne; (iii) la production d'enzymes hydrolytiques comme les pectinases; et (iv) la synthèse et l'activité biologique des toxines fongiques (par une détoxification).

Lorsque cette résistance dite passive est considérée insuffisante pour contrer une attaque par des agents biotiques ou abiotiques particulièrement agressifs, une résistance active se met alors en place ayant pour objectif la destruction de l'agresseur ou, à tout le moins, son confinement au site de pénétration potentielle. La résistance induite, dite active parce qu'elle est induite en réponse à un stress, est un phénomène très bien synchronisé sur le plan spatiotemporel. Elle est la résultante de toute une cascade d'évènements cytomoléculaires impliquant une large gamme de molécules produites de façon coordonnée, selon divers sentiers métaboliques [126].

9.1.2. La résistance active

Lorsqu'un agent pathogène réussit à contourner la première ligne de défense passive (ex: la cuticule), un nouveau système de résistance se met en place au moment, où il est détecté par la plante ayant pour unique objectif le confinement de l'agresseur dans les cellules attaquées; la plante est prête, dans certains cas, à sacrifier ces cellules pour assurer sa survie. Cette confrontation plante-agent pathogène est responsable de l'activation de plusieurs voies métaboliques pour:

(i) renforcer les barrières externes, comme la paroi, afin de retarder ou même d'empêcher la pénétration de l'agent pathogène; et (ii) favoriser la création d'un environnement toxique au cas où le parasite parviendrait à franchir les barrières structurales nouvellement formées. Bien que les modalités de la résistance soient variables (résistance généralisée ou spécifique), on assiste dans tous les cas à un scénario relativement identique au cours duquel les cellules végétales, ayant perçu

une alarme, réagissent en émettant à leur tour des signaux d'alerte. Ces cellules « alertées » s'activent pour élaborer une stratégie défensive qui sera coûteuse sur le plan énergétique.

Tout au long de leur coévolution, les plantes sont continuellement confrontées à un grand nombre de microorganismes potentiellement pathogènes. Ces plantes et les microorganismes pathogènes ont développé des relations complexes résultant d'un échange constant d'informations moléculaires. Les agents pathogènes ont élaboré toute une gamme de stratégies offensives pour parasiter les plantes. L'effet des plantes sur les microorganismes et les rétroactions entre les microbes et les plantes sont devenus le focus de beaucoup de recherche. Les dernières avancées dans le domaine des interactions plantes-microbes montrent que les plantes sont capables de façonner le microbiome via des mécanismes divers. Un aspect important dans la mise en évidence du rôle joué par les molécules de défense (métabolites secondaires) au niveau de l'expression de la résistance est une connaissance exacte de leur localisation spatio-temporelle dans les tissus en état de stress. En outre, nous discutons les rôles de différentes substances phytochimiques dans la médiation de ces effets [126].

9.2. Les plantes, leurs activités et leurs composés antimicrobiens

Un antibiotique est défini comme un composé chimique dérivé ou produit par des organismes vivants, capable à de faibles concentrations d'inhiber la croissance microbienne [131]. Cette définition est limitée à des antibiotiques produits par des micro-organismes, mais celle-ci peut être étendue pour inclure des substances similaires présentes dans les plantes supérieures. Les plantes ont de nombreuses façons de générer des composés antimicrobiens pour se protéger contre les pathogènes [132]. Les surfaces végétales externes sont souvent protégées par des biopolymères tel que les cires, les esters d'acides gras comme la subérine et la cutine. En outre, les tissus externes peuvent être riches en composés phénoliques, alcaloïdes, terpénoïdes et d'autres composés qui inhibent le développement de champignons et de bactéries [133].

L'utilisation des antibiotiques conduit dans la très grande majorité des cas à la sélection de populations microbiennes résistantes. Cette résistance est due à des mutations chromosomiques ou à l'acquisition de gènes de résistance portés par des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages, transposons, intégrons). Ces résistances ont conduits à chercher de nouveaux agents antimicrobiens possédant une efficacité plus importante que les agents synthétiques d'une part, et bien accepté par l'organisme d'autre part (sans exercer des effets délétères) [134]. Beaucoup d'études ont apprécié l'activité antimicrobienne des extraits de plantes médicinales, telles que l'Apiacée *Foeniculum vulgare*, les Lamiacées; *Mentha piperita* et *Thymus vulgaris*, qui présentaient des effets actifs non seulement contre les bactéries, mais aussi contre les champignons, les levures et les virus. D'autres groupes de

chercheurs ont franchi une étape plus loin, où ils ont isolé et identifié les métabolites responsables de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes, cette étape constitue une plateforme pour plusieurs implications incluant les industries pharmaceutique, la médecine alternative, et la thérapie naturelle [135].

9.3. Généralités sur l'effet antimicrobien et son mécanisme

Un grand intérêt est suscité pour la découverte de nouveaux agents antimicrobiens, due à une augmentation alarmante du taux des infections avec les microorganismes résistant aux antibiotiques. Une des approches courantes pour la recherche des substances biologiquement actives est le criblage des microorganismes ou des plantes, qui sont des sources de beaucoup d'agents thérapeutiques utiles. En particulier, l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits de plantes ont formé la base de beaucoup d'applications, y compris, pharmaceutiques, médicales et agro-alimentaires [136].

Il est sans doute très complexe, de limiter les multiples modes d'actions, tels que l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes, la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation du fer et l'inhibition du métabolisme microbien [137], la dégradation de la paroi cellulaire, la perturbation de la membrane cytoplasmique (ce qui cause une fuite des composants cellulaires), l'influence sur la synthèse de l'ADN et de l'ARN [138], des protéines et des lipides. Ces mécanismes ne sont pas des cibles séparées, certains peuvent être la conséquence d'un autre mécanisme. Le mode d'action des agents antimicrobiens dépend également du type de micro-organismes et de l'arrangement de la membrane externe [139].

9.4. Notion du microbiostatique et du microbicide

Quand un agent ou une substance antimicrobienne inhibe seulement la croissance des microbes, on parle ici de l'effet microbiostatique, mais lorsqu'il provoque la mort de ceux-ci on parle de l'effet microbicide [141].

- Effet microbiostatique

C'est une activité microbienne au cours de laquelle il ne se manifeste aucune destruction microbienne, on remarque une inhibition de la croissance microbienne, croissance qui reprend dès que la substance disparaît. En limitant la croissance microbienne, la molécule permet aux défenses naturelles de l'organisme d'entrer en jeu sans être dépassées. L'effet microbiostatique d'une molécule est évalué par la concentration minimale inhibitrice. Pour une souche microbienne donnée, la CMI est la plus faible concentration inhibitrice pour la quelle il n'a plus de germes microbiens visibles [141].

- Effet microbicide

C'est un effet qui se manifeste par une accélération de la mort des pathogènes aux concentrations utilisées *in vivo* ou *in vitro*; s'il persiste moins de 0,01% de survivants après culture [141].

10. Investigation des caractéristiques des plantes modèles de hautes altitudes

L'Algérie avec son unique situation géographique et par conséquence ça diversité climatique, allant des régions côtières vers les forêts aux déserts, est riche en biodiversité. Ces éléments clés de biodiversité laissent l'Algérie disposer d'une importante collection de ressources naturelles, avec 3.139 espèces de plantes appartenant au bassin Méditerranéen. L'Algérie fait partie d'une des huit zones géographiques considérées comme zones de diversification secondaires et donc comme zones disposant d'un haut potentiel de variabilité génétique. En outre, du fait de l'immensité relative de son territoire, l'Algérie dispose d'un large éventail d'écosystèmes différents, ce qui multiplie de manière plus que proportionnelle la diversité de ses ressources génétiques. Des menaces latentes pesent depuis plusieurs décennies déjà sur la diversité biologique et la société n'a pas su les prévenir et encore moins les contrer. En conséquence, du Nord au Sud et de l'Est à l'Ouest du pays, la biodiversité est soumise en permanence à de multiples formes de dégradation et d'appauvrissement. Les menaces pesent sur toutes les composantes, et sur tous les niveaux de la biodiversité.

10.1. Présentation des caractéristiques de la Fabacée *Cytisus triflorus* L'Her

10.1.1. Famille botanique d'appartenance

La famille des Fabacées aussi appelée famille des Légumineuses, constitue la troisième famille de plantes à fleurs en nombre d'espèces. Elle est constituée d'environ 18000 espèces et 650 genres regroupant arbres tropicaux, arbustes de toute taille, lianes et petites herbacées annuelles. En termes d'importance économique et agricole, Les Fabacées occupent la seconde place après les Poacées et incluent diverses plantes à vocations alimentaire, ornementale, médicinale ou pharmaceutique telles que les pois, les haricots ou la luzerne [142].

10.1.2. Aire de répartition en Algérie et dans le monde

Le genre *Cytisus* est répandu dans le bassin méditerranéen. Il comprend 60 espèces, dont huit poussent en Algérie. *Cytisus triflorus* L'Her est l'espèce la plus répandue, qui se développe naturellement dans tout le nord Algérien, propagée aussi en Afrique du nord plus précisément dans les montagnes du centre et du nord du Maroc, aux montagnes du Cap Bon en Tunisie, en Europe centrale et occidentale et en Amérique du Nord.

10.1.3. Description botanique

Cytisus triflorus L'Her, communément appelé « **Genêt** », « **Cytise** » ou « **Broom** », **localement appelée** Tellouguit. Arbuste de la famille des Fabacées peut atteindre 1 à 3 m d'hauteur, à folioles brièvement pubescentes. D'avril à juin, cette plante peut produire des fleurs jaunes médiocres disposées par 4-8 en petits corymbes situés au sommet de petits rameaux secondaires avec des feuilles très petites. En stade fructification, la plante forme des fruits en gousse brunes longue de 20-30 mm [5].

10.1.4. Attribution du genre *Cytisus*

Le genre *Cytisus* se présente sous plusieurs noms vernaculaires [5];

Nom vernaculaire Algérien: Tellouguit; El-lougui; Chadjeret el Nahal

Nom Arabe: Saroutamnousse; Cytsepsse

Nom Amazigh: Guendoul

Nom Français: Genêt à balais

Nom Latin: *Cytisus*

Nom Scientifique binominal: *Cytisus triflorus* L'Her

10.1.5. Taxonomie et systématique de la plante

La classification botanique de *Cytisus triflorus* L'Her selon Battandier et Trabut [143], est la suivante:

Embranchement: Angiospermes

Classe: Magnoliopsida

Ordre: Fabales

Famille: Fabacées

Genre: *Cytisus*

Espèce : *triflorus* L'Her

10.1.6. Composition en métabolites secondaires de la Fabacée *Cytisus triflorus* L'Her

L'étude systématique des composés chimiques du genre *Cytisus* a révélé la présence de plusieurs types de composés entre autres; les huiles essentielles, les flavonoïdes, les composés phénoliques, les stéroïdes, les polysaccharides, les alcaloïdes, les acides organiques, les acides aminés et certains éléments inorganiques [144].

La première étude sur la composition volatile du genre *Cytisus* a été pour l'huile essentielle provenant des fleurs de l'espèce *Cytisus scoparius* L qui a été réalisée en

1980 [145]. L'(E) -3-hexène-1-ol, l'1-octène-3-ol, l'alcool benzylique, l'alcool phényléthylique, le phénol, le crésols, le guaiacol, l'eugénol, l'acide isovalérique, l'acide benzoïque, l'acide palmitique et l'n-paraffine ont été considérées comme les principaux composés. En outre, d'autres composés volatiles ont également été isolés d'extraits d'huile essentielle appartenant aux autres espèces de *Cytisus*, tels que l'orobol, la génistéine, la quercétine, le kaempferol, l'acide p-coumarique et l'acide caféique. Une étude en 1997 a porté sur un composé aromatique isolé à partir des tiges fraîches de *Cytisus scoparius* L qui libère une odeur caractéristique dans l'air, ce composé aromatique a été identifié comme un type de thiol appelé 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one [146].

La caractérisation de l'huile essentielle de *Cytisus triflorus* L'Hér de la région d'Azazga à été procédé par Aourahoum et *al.* où elle a dévoilé la présence de linalool, de géraniol, de 4-vinyl-2-ethoxy, de triméthyl-2-pentadecanone, de l'acide tétradecanoïque, de géranyl acétone, de l'heneicosane, de tricosane, de l'acide hexadecanoïque et de la musc ambrette comme composés volatiles majoritaires [147].

Bien que le genre *Cytisus* renferme d'autres groupements chimiques entre autres de nombreux types d'alcaloïdes discernés chez l'espèce *Cytisus scoparius* L [148]. L'iso-spartéine, la spartéine, la 17-oxo-spartéine, la lupanine et les alcaloïdes de la quinolizidine. Ces alcaloïdes ont marqués une distribution significativement différente dans les divers compartiments de la plante, tandis que les tiges ont signalées un contenu plus élevé en ces métabolites, tandis que la spartéine a été signalée comme composé principal parmi les alcaloïdes précédemment cités. En outre, certains flavonoïdes ont également été annoncés chez la même espèce. Ces flavonoïdes comprennent la rutine, la quercétine, l'isorhamnetin et le kaempferol [149]. En 2004, Ammar et *al.*, ont apprêté le contenu des composés phénoliques totaux extractibles, des tanins et des tanins condensés dans les fleurs et les feuilles de *Cytisus scoparius* L [150].

10.1.7. Utilisation et intérêts du genre *Cytisus*

Aux États-Unis, les Balais *Cytisus* sp sont utilisées pour prévenir l'érosion et renforcer la stabilisation des dunes côtières [151]. Les branches de celles-ci sont utilisées non seulement pour faire des balais, mais aussi pour faire des paniers dans certains endroits. Les tiges de ce genre contiennent également des fibres qui peuvent être utiles pour la fabrication du papier. Bien que les résidus isolés de certaines espèces tels que le *Cytisus scoparius* L, aurait un pouvoir calorifique élevé, avec le potentiel d'être un supplément comme source d'énergie [152]. Des études pharmacologiques ont révélé certaines activités biologiques parmi; l'activité antispasmodique, diurétique, antimicrobienne [153], antioxydante, cardiotonique, cathartique, émétique, vasoconstrictrice, dépurative, hépatoprotective, anti-hémorragique, lithotriptique, hypnotique et anxiolytique [7].

10.2. Présentation des caractéristiques de la Lamiacée *Teucrium polium*

10.2.1. Famille botanique d'appartenance

Cette famille de plantes angiospermes dicotylédones à fleurs gamopétales irrégulières qui regroupe surtout des plantes herbacées et sous-arbustives réparties dans le monde entier. Les Lamiacées représente une importante famille de plantes dicotylédones comptent plus de trois mille cinq cents espèces, quelque deux cents genres, répartis en sept sous-familles. Les Lamiacées herbacées, annuelles ou vivaces, sont très nombreuses dont certaines genres sont surtout abondants dans les régions méditerranéennes comme les romarins. La forme de la fleur et la présence d'huiles essentielles signent la famille des Lamiacées (Labiées) [154].

10.2.2. Aire de répartition en Algérie et dans le monde

Le genre *Teucrium* est l'un des genres les plus riches en espèces. Ces germandrées comptent plus de 340 espèces, on les retrouve un peu partout à travers le monde; au sud-ouest de l'Asie, en Europe et au nord d'Afrique, mais elles poussent principalement dans les zones arides et rocheuses du bassin méditerranéen. En revanche, ce genre se représente aussi en Turquie par 27 espèces et en Iran par 13 espèces [155].

Une vingtaine de l'espèce *Teucrium polium* poussent spontanément en Algérie, elles prédominent dans la région du Tell [9], très répandue dans les hauts plateaux Algérois, Oranais et Constantinois [5]. Elle se rencontre aussi au sommet de Chélia jusqu'au étage Saharien [156].

10.2.3. Description botanique

Selon Quezel et Santa [9], Le genre *Teucrium* se présente en arbustes vivaces ou sous-arbrisseaux, rarement annuelles. Nous signalons ici la germandrée *Teucrium polium* Algérienne polymorphe et cosmopolite à corolle bilabiée; à lèvre inférieure de la corolle à cinq lobes inégaux corolle caduque blanche. Calice vert grisâtre, à feuilles linéaires ou lancéolées vert grisâtre à marge en général révolutée, denticulées-crénelées et à Inflorescences en têtes denses un peu allongées, à bractées florales réduites mais semblent aux feuilles. La floraison est en avril à juin [157].

10.2.4. Attribution du genre *Teucrium*

Le genre *Teucrium* reconnue sous plusieurs noms vernaculaires [5];

Nom vernaculaire Algérien: Djàdaa; Jaàd; Djaida

Nom Arabe: Khayata; Harcha

Nom Amazigh: Goutiba; Felfla-Timzourin; Haida; Timtchich

Nom Français: Germandrée

Nom Latin: *Teucrium*

Nom scientifique binominal: *Teucrium polium*

10.2.5. Taxonomie et systématique de la plante

La classification botanique de *Teucrium polium* selon Caddik et al.[158] est la suivante:

Embranchement: Angiospermes

Classe: Dicotylédones

Ordre: Tubiflorale

Famille: Lamiacées

Genre: *Teucrium*

Espèce: *polium*

10.2.6. Composition en métabolites secondaires de la Lamiacée *Teucrium polium*

Les investigations chimiques ont montré que les plantes appartenant au genre *Teucrium* sont soupçonnés d'être riches en monoterpènes, en sesquiterpènes, en saponines, en stérols, en polyphénols, en flavonoïdes, en quelques alcaloïdes, en huiles essentielles [159 et 17], en acides gras, en esters, et en diterpènes [18 et 19].

L'étude menée par Djabou et al. [160], montre que les huiles essentielles de la partie aérienne des deux variétés de *Teucrium polium* (*album* et *pilosum*) sont caractérisées par une richesse en sesquiterpènes, de 78.61% à 92.07% respectivement pour les deux variétés. D'autre part, les mêmes auteurs rapportent que l'huile essentielle de *Teucrium polium* poussant à l'état spontané en Jordanie, a donné un faible rendement et contient une forte teneur en 8-cedron-13-ol. D'autres composés sont également présent en quantités appréciables: le β -caryophyllène, le D- germacrène et le sabinène. L'huile essentielle de *Teucrium polium* spp *aurasiacum* récoltée en Algérie a révélé un rendement important, et a donné une composition chimique caractérisée par la présence de l' α -cadinol, l' α -muurolène, l' α -pinène et le β -pinène essentiellement. Moghtader [161], restitue que *Teucrium polium* L à comme composés volatiles majoritaires; l' α -pinène, le linalool, le caryphyllène-oxyde et le caryophyllène.

Autres principes actifs ont été isolés de certaines espèces de *Teucrium* entre autres; le tyrosol, la lutéoline, l'acide benzoïque, la quercétine, l'acide vanillique, l'acide gentisique, l'acide férulique et l'acide caféique de l'espèce *Teucrium polium* [162]. De plus, une gamme de polyphénols et de flavonoïdes à savoir la cirsimarine, le cirsilol, le cirsilincol, le 5-hydroxy-6,7,3', le 4'-tetraméthoxyflavone, la salvigenine,

l'apigénine-5-galloylglucoside, l'apigénine-7-glucoside, la vicénine et la lutéoline-7-glucoside a été repéré chez l'espèce *Teucrium polium* européen [18]. Le phényléthanoïde glycoside et les glycosides phénylpropanoïdes ont été détecté chez l'espèce *Teucrium polium* L [163], de même chez l'espèce *Teucrium polium* subsp *polium*, il a été signalé la présence de la teuloline A et la teuloline B, de l'auropoline, de la capitatine, et de l'acétylauropoline lactone [164].

10.2.7. Utilisation et intérêts du genre *Teucrium*

Teucrium polium a été reconnue depuis longtemps en médecine populaire dans le traitement physiopathologique de nombreuses conditions [165], telles que les inflammations et les rhumatismes. Les extraits de l'espèce *Teucrium montanum* ont montrés des pouvoirs hypotenseurs, antispasmodiques, diurétiques, analgésiques anti-inflammatoires, anthelminthiques [17], hypolipidémiques, antinociceptives, anorexiques, diaphorétiques, antiseptiques, antipyrétiques et antispasmodiques [166].

Ce genre aussi a été utilisé en médecine traditionnelle iranienne comme agents antibactériens, antipyrétiques, tonifiants, Il détient aussi des effets analgésiques, antioxydants, hypolipidémiques, insulino-tropiques, cholagogiques, antiphytoviral, insecticides, hépatoprotectives, antimutagéniques [167], par voie orale comme antidiabétique et en externe comme astringent, pour guérir les éruptions cutanées et les plaies, adopté ainsi pour traiter plusieurs maladies comme les douleurs abdominales, les ulcères gastriques les indigestions, les inflammations intestinaux, les rhumes, la toux, l'asthme, les leucorrhées, les bronchites chroniques , les convulsions, la stérilité féminine, la maladie de la goutte et même pour les maladies génito-urinaires [166], alors qu'en médecine traditionnelle chinoise pour; l'hémoptysie, l'hématémèse, les abcès pulmonaires, les lésions traumatiques et les morsures de chiens atteints de rage ou de serpents venimeux [17].

L'infusion des parties aériennes de ce genre a été aussi usagée en médecine traditionnelle, par voie orale comme antidiabétique et en externe comme astringent, pour guérir les éruptions cutanées et les plaies [18].

CHAPITRE 2: MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Localisation des sites d'échantillonnages du matériel végétal des plantes des hautes altitudes; la Lamiacée *Teucrium polium* et la Fabacée *Cytisus triflorus* L'Her

L'échantillonnage est l'ensemble des opérations qui ont pour objet de relever dans une population des individus devant constituer l'échantillon. Pour la présente étude l'échantillonnage a été réalisé par un prélèvement aléatoire.

1.1. Etude sur le terrain: prélèvement du matériel végétal

Les échantillons de la Lamiacée *Teucrium polium* ont été collectés durant les différentes saisons de l'année végétative 2015 tous les débuts des mois. Les collectes ont eu lieu au même endroit, au moi de janvier pour le stade végétatif, moi de mai pour le stade floraison et le moi de juillet pour le stade fructification, aux monts des Aurès-Chélia situé dans la région de Khenchela au nord-est algérien à une altitude de 1200m, d'une latitude de 35°36' (N) et d'une longitude 6°77' (E) (figure 2.1).

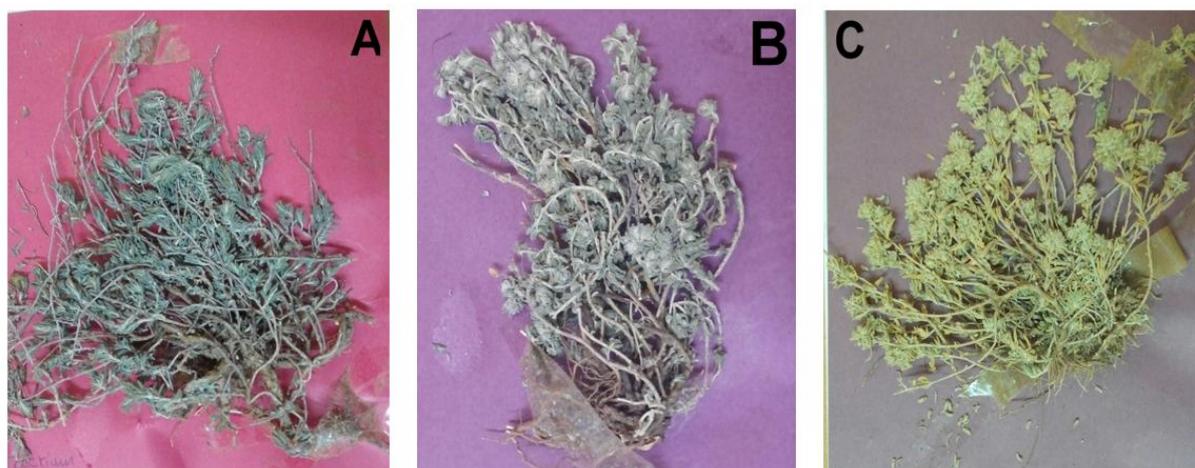


Figure 2.1: *Teucrium polium* récolté aux monts des Aurès-Chélia durant trois stades phénologiques; (A): stade végétatif, (B): stade floraison, (C): stade fructification (originale 2015).

Le genre *Cytisus* pousse spontanément dans les monts de l'atlas Blidéen. La fabacée *Cytisus triflorus* L'Her été recueillie pendant trois stades phénologiques; stade végétatif, stade floraison et stade fructification. La cueillette s'est effectuée dans la région de Chréa (à 800 m d'altitude; de latitude de 36°21' (N) et d'une longitude de 2°45' (E)). Au début de chaque stade phénologique de l'année 2015:

stade végétative (mi-avril), stade floraison (fin mai) et stade fructification (fin juin) (figure 2.2).

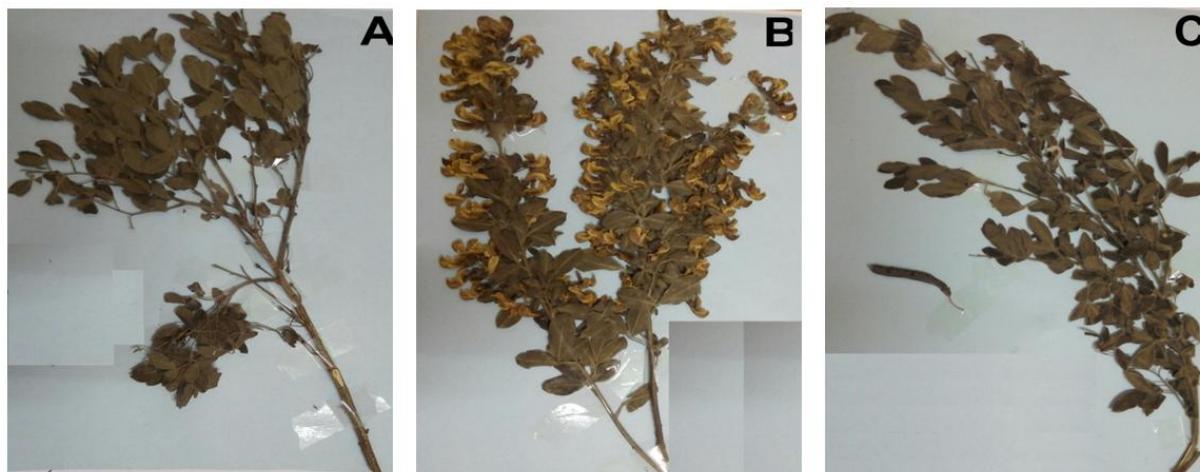


Figure 2.2: *Cytisus triflorus* L'Her récolté aux monts des Aurès-Chélia durant trois stades phénologiques; (A): stade végétatif, (B): stade floraison, (C): stade fructification (originale 2015).

Des carto-photographies ont été prises à chaque collecte de chaque espèce végétale étudiée durant les différents stades cruciaux (figure 2.3).



Figure 2.3: Présentation des régions d'études; A: Djebel Chélia (Wilaya de Khenchela), B: monts de Chréa (wilaya de Blida) (Google Maps, 2018).

Seulement les parties aériennes des plantes ont été utilisées. Le matériel végétal obtenu pour chaque indice phénologique a été séché séparément à l'abri de la lumière et de l'humidité, à la température ambiante (24 ± 1 °C) pendant 21 jours au laboratoire [1]. Après séchage, les plantes ont été broyées avec un broyeur à billet (RETSCH) en poudres fines et stockées soigneusement dans un endroit sec en vue de leurs analyses.

1.2. Reconnaissance botanique

L'identification des deux plantes choisies pour cette étude; *Teucrium polium* et *Cytisus triflorus* L'Her à été réalisée selon la nouvelle flore de l'Algérie [5 et 9] par l'équipe du jardin d'essai d'EL Hamma à Alger.

2. Proportions de métabolites secondaires préconisés reconquis en extraits aqueux et méthanoliques des plantes de hautes altitudes; la Fabacée *Cytisus triflorus* L'Her et la Lamiacée *Teucrium polium*.

2.1. Préparation des extraits aqueux et des extraits méthanoliques des deux plantes des hautes altitudes

2.1.1. Broyage et tamisage

Avant l'extraction des composés phénoliques, les parties aériennes sont séchées et passées dans un broyeur à billet (RETSCH) pour avoir une poudre fine, puis tamiser la poudre dans un tamiseur à mains (cents= 250µm). Les poudres sont stockées soigneusement dans un endroit sec à l'abri de lumière le temps d'extraction (figure 3.9).

2.1.2. Protocol de préparation

Ces procès seront destinés à préparer l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique respectivement des poudres fines des parties aériennes de chaque stade phénologique provenant des deux plantes à savoir la lamiacée *Teucrium polium* et la fabacée *Cytisus triflorus* L'Her (figure 3.9).

2.1.2.1. Les extraits aqueux

1g de poudre végétale a été extrait avec 10 ml d'eau à 80°C pendant 3h [168].

2.1.2.2. Les extraits méthanoliques

60 mg de poudre végétale ont été rajoutés à 2 ml de méthanol à 80% à, et les extraits ont été homogénéisé à température ambiante pendant 2h sur un homogénéiseur rotatif à 15 tr / min, puis centrifugés à 10.000 g. pendant 15 min (SIGMA 2-16K, UK) [169].

Les surnageants provenant des extraits aqueux et méthanoliques ont été récupérés et utilisés pour le screening phytochimique. La procédure d'extraction a été performé trois fois et exprimée comme (moyennes ± SE).

2.1.2.3. Détermination du rendement

Le poids de l'extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein (après évaporation) et le poids du ballon vide (avant évaporation).

$$R\% = \frac{\text{Masse d'extrait sec}}{\text{Masse de la matière végétale}} \times 100$$

2.1.3. Etude phytochimique

2.1.3.1. Contenu en Phénols totaux

2.1.3.1.1. Principe

Les métabolites secondaires constituent une large gamme de molécules végétales, dont leur nature chimique et teneurs sont extrêmement variables d'une espèce à une autre. Plusieurs méthodes analytiques peuvent être utilisées pour la quantification des phénols totaux. L'analyse par le réactif de Folin-Ciocalteu (1927) est la plus utilisée.

Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Lors de l'oxydation, il est réduit en un mélange d'oxyde bleu. La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait analysé.

2.1.3.1.2. Mode opératoire

La proportion en polyphénols totaux a été estimée par recours à l'utilisation de la méthode adaptée de SINGLETON et ROSS (en 1965) avec le réactif Folin-Ciocalteu [170] (figure 3.9). Dans un mélange de molybdène bleu et d'oxydes de tungstène, la concentration maximale de couleur varie entre 725 et 760 nm et elle est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux. Pour la détermination des Phénols totaux. Un volume de 200 ml de chaque extrait a été mélangé avec 1 ml de réactif Folin-Ciocalteu dilué 10 fois et 0,8 ml d'une solution de carbonate de sodium à 7,5%. Après agitation, l'absorbance a été mesurée par spectrophotomètre UV-vis (Jenway 6305) à la longueur d'onde de 760 nm. La teneur en phénols totaux a été exprimée en mg équivalent d'acide Gallique/g. de matière végétale (mg EAG/g. mv) en utilisant la courbe d'étalonnage de l'acide Gallique ($R^2=0,977$). Chaque essai a été répété en triple et exprimé comme (moyennes \pm SE).

2.1.3.2. Contenu en Flavonoïdes

2.1.3.2.1. Principe

La coloration jaunâtre exprimée dans cette méthode est due à la formation d'un complexe entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes [171].

2.1.3.2.2. Mode opératoire

La quantification des flavonoïdes a été procédée avec la méthode du trichlorure d'aluminium et de l'hydroxyde de sodium [172] (figure 3.9). Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et de l'hydroxyde de sodium forme un complexe en rose qui absorbe à la longueur d'onde de 510 nm. 0,3 ml de nitrite de sodium à 5% a été ajouté. Après 5 min, on a ajouté 0,3 ml de chlorure d'aluminium à 10%. À 6 min, on a ajouté 2 ml d'hydroxyde de sodium 1 M au mélange. En même temps, le mélange a été dilué en volume avec addition de 2,4 ml d'eau distillée et bien mélangé. L'absorbance du mélange a été déterminée à 510 nm par spectrophotomètre UV-vis (Jenway 6305). La teneur en flavonoïdes a été exprimée en mg d'équivalent de quercétine/g. de matière végétale (mg EQ/g. mv) en utilisant la courbe d'étalonnage de quercétine ($R^2=0,962$). Chaque essai a été répété en triple et exprimé comme (moyennes \pm SE).

3. Fraction volatile des métabolites secondaires; les huiles essentielles des plantes de hautes altitudes; la Lamiacée *Teucrium polium* et la Fabacée *Cytisus triflorus* L'Her

3.1. Extraction de la fraction volatile; huiles essentielles des plantes des hautes altitudes par Hydrodistillation

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de substances organiques aromatiques liquides qu'on trouve naturellement dans diverses parties des végétaux. Elles sont très concentrées, volatiles et sensibles à la décomposition sous l'effet de la chaleur [43]. L'étude proposée a trait à l'étude des huiles essentielles extraites pendant les différents stades phénologiques des plantes étudiées (stade végétatif, stade floraison et stade fructification) à partir des parties aériennes des deux plantes *Teucrium polium* et *Cytisus triflorus* L'Her par Hydrodistillation (figure 3.9). C'est une technique d'extraction dans laquelle le solvant est l'eau. Elle peut être utilisée pour extraire des espèces insolubles dans l'eau (figure 2.4).



Figure 2.4: Montage de l'appareil Clevenger du procédé de l'hydrodistillation (originale 2015).

3.1.1. Principe

Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Sachant que la température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeur de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation, elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures. Ainsi le mélange azéotropique « eau + huile essentielle » distillé à une température égale 100°C à pression atmosphérique alors que les températures d'ébullition des composés aromatiques sont pour la plupart très élevées. Il est ensuite refroidi et condensé. Une fois condensées, eau et molécules aromatiques du fait de leurs différences de densité, se séparent en une phase aqueuse (présenté par l'hydrolat) et une phase organique (dénudé par l'huile essentielle).

3.1.2. Technique

La méthode d'extraction est décrite ci-dessous :

On place la matière végétale sèche: 100 g dans 1 litres d'eau distillée en utilisant un appareil de type Clevenger selon la méthode préconisée dans la Pharmacopée européenne [173], l'extraction est effectuée durant trois heures, durée nécessaire à l'épuisement de la matière première (environ 90%) en huile essentielle, après on récupère les vapeurs refroidies. Enfin, les huiles essentielles sont récupérées dans

des flacons en verre scellées puis conservées au réfrigérateur à 4°C. Le montage de l'hydrodistillation est représenté ci-dessus (figure 2.4).

Le calcul du rendement de chaque essence s'est effectué selon la relation suivante :

$$R = 100 \times (m/M)$$

Où m et M représentent respectivement la masse de l'huile essentielle et la masse de la charge végétale.

3.2. Caractérisation chimique (Analyse qualitative et approximative) des huiles essentielles par Couplage chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (CPG/SM)

Une fois les différentes huiles essentielles obtenues, l'analyse chimique permet d'identifier et de quantifier les produits qui les composent. L'analyse de la partie volatile est réalisée par les techniques chromatographiques (CPG/SM) (figure 3.9).

3.2.1. Principe

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG/SM) permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse des différents constituants d'un mélange complexe. Ce couplage est la technique la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles et réunit le meilleur de ces deux techniques et permet de connaître, dans la grande majorité des cas, la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation.

3.2.2. Technique

L'analyse chromatographique est réalisée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (GC-2014 Shimadzu Gas Chromatograph), équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire DB5 peu polaire de longueur 30 m, de diamètre interne 25 µm et ayant un film d'épaisseur 0,25 µm. L'injecteur fonctionne en mode split avec un ratio de 1/50, le chromatographe est alimenté par trois gaz : l'azote, l'hydrogène et l'air, le gaz vecteur inerte est l'hydrogène ayant un flux total de 5,61 ml/min, un débit de 1 ml/min et une pression de 80,1 kPa, la température de l'injecteur est de 250 °C et celle du détecteur est de 270 °C, et la température de la colonne suit le programme suivant: la colonne a une température initiale de 50 °C qui est maintenue pendant une minute; puis de 50 à 175 °C, elle suit un palier à raison de 5 °C par minute. La température de 175 °C est maintenue pendant dix minutes. Ensuite, la température passe de 175 à 250 °C selon un palier, à raison de 15 °C par minute, ces conditions ont été utilisées pour les HE's de *Teucrium polium* [162].

Pour celles des HE's de *Cytisus triflorus* L'Her, la température de l'injecteur était à 280 ° C et la température des détecteurs à ionisation de flamme était de 280 et 300 ° C, respectivement. La température de la source d'ions et du quadripôle MS était de 230 ° C et 180 ° C, respectivement. Le spectromètre de masse fonctionnant à 70 eV et le multiplicateur d'électrons a été fixé à 2200 V (figure 2.5).



Figure 2.5: Équipement d'analyse CG-SM (originale 2015).

3.2.3. Identification des composés

L'identification des composants individuels est fondée sur la comparaison des indices de rétention (I_r) calculés, avec ceux de composés authentiques ou des données de la littérature (National Institute of Standards and Technology, 2008), et des bibliothèques commerciales [174 et 175], et par l'analyse de chaque spectre de masse des composés constitutifs.

4. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des différentes fractions des plantes modèles

4.1. Préparation des milieux de culture (voir annexes)

4.2. Micro-organismes et conditions de culture

Les souches pathogènes choisies pour l'étude de l'activité antimicrobienne in vitro de différentes fractions des plantes impétrantes sous la dépendance de la variation phénologique. Ces dernières comprennent; *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (*B. sub*), *Escherichia coli* ATCC 8739 (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (*P. aer*), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (*S. aur*), *Salmonella enterica* ATCC 14028 (*S. ent*), *Candida albicans* ATCC 10231 (*C. alb*) et *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 (*A. bra*). Ces microorganismes nous ont été fournis gracieusement par Microbiologics®. À l'exception des champignons phytopathogènes: *Alternaria alternata* (*A. alt*), *Fusarium solani* (*F. sol*) et *Fusarium oxysporum* (*F. oxy*) qui ont été

gracieusement fournis par le laboratoire de phytopathologie (Université des Sciences, Jordanie), ces souches fongiques sont des isolats d'agrumes variété Thomson (Tableau 1.1.).

Tableau 1.1. Déterminisme des caractéristiques pathogènes des souches microbiennes testées [138].

Souches microbienne	Caractéristiques pathogéniques
<i>Fusarium solani</i>	Mycélium filamenteux phytopathogène, provoque des lésions oculaires après traumatisme végétal ou après introduction de corps étrangers : métal, pierre, sable, etc...
<i>Fusarium oxysporum</i>	Attaque principalement la plante au début de la floraison. la plante attaquée présente des symptômes de flétrissement et de jaunissement partiel, puis total du feuillage.
<i>Alternaria alternata</i>	Peut provoquer chez l'homme des affections épidermiques, des allergies respiratoires, de l'asthme. Chez les végétaux, il se présente comme un champignon phytopathogène provoquant divers symptômes; tâches noires, pourriture, rouille, etc.... sur les différents organes de la plante.
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Champignons filamenteux, peut être toxique et pathogène car il est responsable de mycoses pulmonaires chez l'homme et les oiseaux, Chez certaines plantes il représente un sujet à la pourriture du collet.
<i>Candida albicans</i>	Levure, provoque des infections fongiques essentiellement au niveau des muqueuses digestive et gynécologique.
<i>Escherichia coli</i>	Bacille aérobic et Gram négatif que l'on trouve couramment dans le tube digestif de l'être humain et des animaux à sang chaud. Sont à l'origine des infections intestinales.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacille aérobic, Gram négatif et très mobile grâce à un flagelle polaire. Il est de plus en plus souvent responsable d'infections nosocomiales. C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocci à Gram positif, responsable d'infections

	nosocomiales, d'intoxications alimentaires et sa résistance aux antibiotiques est parfois un grand problème pour le traitement des patients.
<i>Salmonella enterica</i>	Bacille à Gram négatif qui provoquent chez l'espèce humaine des maladies telles que la fièvre typhoïde, la fièvre paratyphoïde et la salmonellose, une des principales causes de toxi-infection alimentaire collective.
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacille à Gram positif qui n'est pas considérée comme pathogène pour l'homme, mais elle peut contaminer des aliments et peut exceptionnellement provoquer une intoxication alimentaire.

4.3. Préparation des dilutions des extraits à tester

Les extraits à tester sont les décoctés aqueux concentrés et les macérats organiques (méthanoliques) des deux plantes modèles durant les trois stades phénologiques.

Les extraits aqueux ont été dissous dans de l'eau distillée alors que les extraits méthanoliques dans du diméthyl sulfoxide (DMSO). Les tests ont été effectués à différentes concentrations des extraits dont on a sélectionné l'efficace parmi; présumé de 1g / ml pour les extraits aqueux et de 0.5g/ml pour les extraits méthanoliques.

En effet, pour les huiles essentielles toutes les dilutions ont été faites avec du diméthyl sulfoxide (DMSO) où les concentrations testés étaient de 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 et 6,25 µg / mL.

4.4. Détermination de l'activité antimicrobienne par méthode de diffusion (test de sensibilité)

4.4.1. Milieu

Les milieux de culture utilisés sont: le MH (Mueller Hinton) pour les bactéries, SAB (Sabouraud) pour levure et le PDA (gélose à la pomme de terre et au dextrose) pour les champignons; coulées en boîtes de Pétri et séchée avant l'emploi [176].

4.4.2. Préparation des inoculums

- Toutes les souches microbiennes ont été pré-cultivées avant leur utilisation.

- Dans la zone aseptique du bec bunsen et à partir d'une culture pure sur milieu d'isolement gélose nutritive, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches microbiennes à tester dans 3 ml de bouillon (Muller Hinton pour les souches bactériennes et le milieu PDA pour les souches fongiques) et les incubées à 37°C pendant 18-24 h pour les bactéries et 48 h pour les champignons d'une culture jeune.

- Décharger l'anse dans 10 ml d'eau distillée stérile.

- Bien homogénéiser les suspensions microbiennes. Leurs turbidités correspondant à une densité optique de 0,5 étalon de Mc Ferland à 620 nm pour atteindre une concentration de $1,5 \times 10^8$ UFC / ml (unités formatrices de colonie) pour les bactéries et à 530 nm 5×10^5 CFU / ml pour les champignons.

- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau distillée stérile s'il est trop fort.

- L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum.

La méthode de diffusion sur disque à base d'agar a été adoptée pour déterminer les diamètres des zones d'inhibition dans les tests d'activité antimicrobienne [177]. La solution mère des différentes huiles essentielles et des différents extraits méthanoliques ont été préparée dans du dimethyl sulfoxyde (DMSO), qui n'a eu aucun effet sur les microorganismes aux concentrations étudiées (figure 3.9).

4.4.3. Ensemencement et dépôt des disques

- Vingt millilitres d'agar nutritif liquide stérile ont été chauffés et versés dans chaque boîte de Pétri. Après refroidissement de l'agar liquide et solidification, un écouvillon a été trempé (100 µl) dans la suspension microbienne standardisé a été étalée sur la surface des plaques d'agar stérile.

- L'essorer en le pressant fermement(en le tournant) sur la paroi interne du tube.

- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas, en stries serrées (ensemencement par écouvillonnage), on répète l'opération deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

- Recharger l'écouvillon à chaque fois dans le cas où on ensemence plusieurs boites de Pétri avec la même souche.

- Des disques de papier Whatman N ° 1 de 6 mm de diamètre sont imprégnés ensuite d'une petite quantité des extraits et des huiles essentielles (20 µl / disque pour les extraits aqueux et méthanoliques et par 15 µl / disque pour les HE'S) et déposés sur la surface de la gélose inoculée (figure 3.9).

- Des disques de papier Whatman imprégnés de DMSO et dans de l'eau servant de témoins négatifs, sont aussi déposés sur la surface de la gélose inoculée. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37 ° C pendant 24 h pour les bactéries, 27°C pendant 4 à 6 jours pour les champignons et 30° C 48 h pour les levures (figure 2.6).

4.4.4. Lecture

Après incubation, les diamètres des zones d'inhibition autour de chaque disque (diamètre de la zone d'inhibition plus diamètre des disques) ont été mesurés en utilisant la version 3.0 de l'application Image Tool et enregistrés en tant que valeurs moyennes \pm erreur type. Pour chaque extrait, trois essais répétés ont été menés contre chaque souche (figure 2.6).

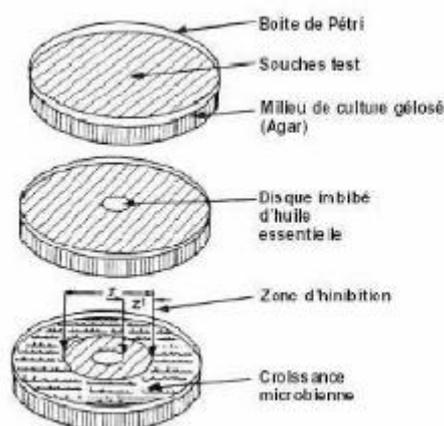


Figure 2.6: Schéma illustrant la méthode de sensibilité (activité antimicrobienne) par méthode de diffusion.

Les résultats ont été appréciés comme suit:

Zone d'inhibition <6mm: pas d'activité antimicrobienne (-);

Zone d'inhibition 6-7.5mm: présence d'une activité antimicrobienne (+);

Zone d'inhibition > 7.5mm: activité antimicrobienne élevée (++) [178].

4.4.5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

La concentration minimale d'inhibition (CMI) est la concentration la plus faible d'un agent antimicrobien à laquelle on n'a pas observé de croissance de micro-organismes.

La CMI a été déterminée par une méthode de microdilution en bouillon utilisant des plaques à 96 puits [179] (figure 3.6).

10 µl des huiles essentielles à tester ont été ajoutés à une microplaque à 96 puits contenant 100 µl de suspension de bactéries / champignons ou levure avec approximativement 10^7 UFC / ml ont été mélangés soigneusement et pipetés dans chaque puits. Les microplaques ont ensuite été recouvertes de couvercles stériles et incubées à 37° C pendant 24 h pour les bactéries ou à 30° C pendant 48 h pour les champignons [180]. Le DMSO a déjà été testé pour l'activité antimicrobienne et aucun effet néfaste sur la croissance bactérienne / fongique n'a été observé aux concentrations utilisées.

Après incubation, les CMI des échantillons ont ensuite été détectés après l'addition de 50µL d'un indicateur de croissance microbienne INT (chlorure d'iodonitrotétrazolium, Sigma Aldrich) (0,2 mg / mL) dans chaque puits. Les bactéries / champignons viables ont réduit la couleur jaune en rose [160] (figure 3.9).

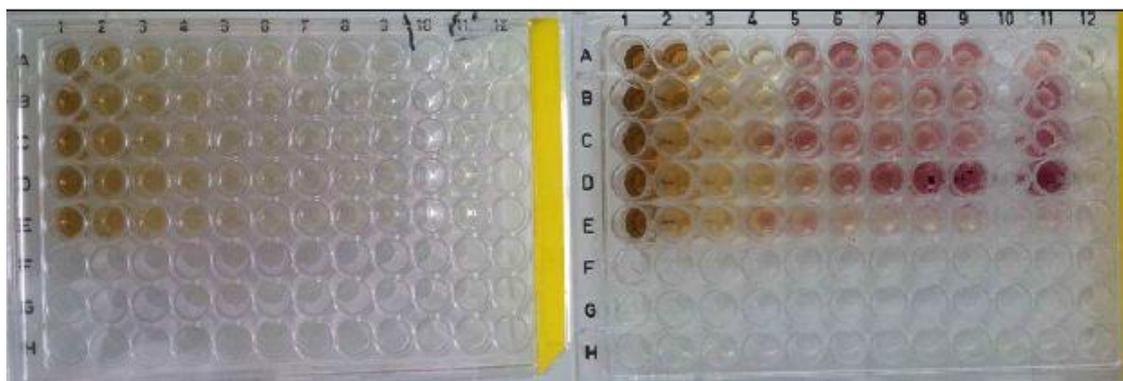


Figure 2.7: Microplaque utilisées avec les suspensions microbiennes-extraits-milieu de culture avant et après incubation, et détection de la croissance par l'essai colorimétrique (INT) (originale 2015).

Les résultats des valeurs de CMI des huiles essentielles ont été appréciés comme suit:

Aucune bioactivité n'a été définie comme la CMI > 1000 µg / ml;

Faible bioactivité comme la CMI varie de 501-1000 µg / ml;

Bioactivité modérée avec une CMI de 126 à 500 µg / ml;

Bonne bioactivité CMI entre 26-125 µg / ml;

Forte bioactivité avec une CMI entre 10 et 25 µg / ml;

Et une très forte bioactivité avec une CMI <10 µg / ml [181].

4.4.6. Détermination des concentrations bactéricides / fongicides minimales (CMB / CMF)

Les paramètres CMB / CMF ont été déterminées comme étant les concentrations les plus faibles auxquelles 99,9% ou plus des bactéries / champignons testés ont été tués d'espèces bactériennes ou fongiques.

Les CMB / CMF ont été déterminées en prélevant 20 µl des cultures en utilisant pour la détermination MIC de chaque puits et en les marquant sur plaques agar, puis les bactéries ont été incubées à 37° C pendant 24 h et les champignons incubés à 30 ° C pendant 48h, séparément.

Habituellement, la concentration la plus faible de l'agent antimicrobien à la concentration minimale bactéricide (CMB) et la concentration minimale fongicide (CMF) a été déterminée par la concentration la plus faible qui ne montre aucune croissance visible sur le milieu solide. Toutes les expériences ont été réalisées en triple [182] (figure 3.9).

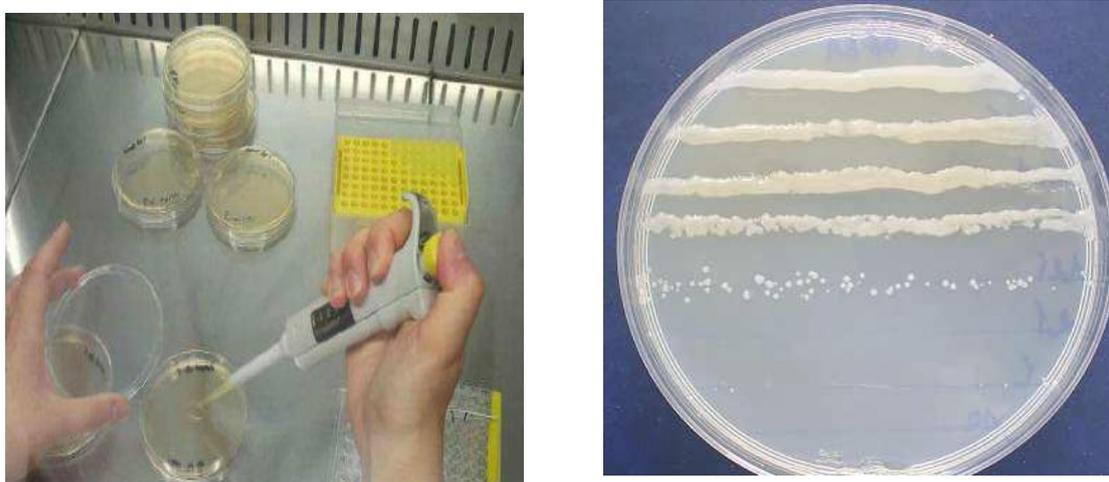


Figure 2.8: Prélèvement des puits et ajout sur le milieu pour déterminer les CMB et les CMF (originale 2015).

4.4. Détermination de l'indice MIC

Les valeurs d'indice MIC ont été déterminées pour les échantillons en utilisant leurs valeurs CMM (CMB, CMF) et CMI calculées par rapport aux souches testées (bactéries et de champignons) [183 et 184].

Indice CMI pour les bactéries = CMB / CMI

Indice CMI pour les champignons = CMF / CMI [136].

Les huiles essentielles exercent un effet microbicide lorsque $MMC / MIC \leq 4$ [185].

5. Exploitations des données

Pour l'analyse des extraits de *Teucrium polium* et de *Cytisus triflorus* L'Her, Les résultats sont rapportés comme valeurs de trois répétitions (moyennes \pm erreur standard) sur la base d'un C.V. $<20\%$. Les données ont été soumises à une analyse statistique par le logiciel SYSTAT Ver. 12 [186]. L'analyse de la variance (ANOVA) suivie du test de NEWMEN-KEULS a été utilisée pour établir l'effet des stades phénologiques, du contenu phytochimique et du type du solvant sur l'activité antibactérienne des extraits, les différences ont été considérés comme significatives à $p < 0,05$. L'analyse en composantes principales (A.C.P.) a été réalisée à l'aide du logiciel XLSTAT Ver. 9, afin d'apercevoir l'assemblage dans les relations entre les variables et permettant de classer les effets interactifs des stades phénologiques et le contenu phytochimique des extraits de plantes sur l'activité antibactérienne.

Les équations prédictives des fluctuations des diamètres des zones d'inhibition présumant la sensibilité des microorganismes envers les métabolites discerner dans les extraits des plantes des différents stades phénologiques ont été développés par le test de régression multiple après vérification de la signification des probabilités associées à chaque variable explicative ($p < 0,05$) par le logiciel PAST ver. 1.37 [187].

Pour l'analyse statistique de la fraction volatile de *Teucrium polium*, l'analyse de la variance (GLM) a été effectuée pour déterminer les différences significatives à $p < 0,05$ et les différences marginales significatives à $p < 0,08$. Les stades phénologiques, les doses et les souches comme facteurs d'effet et suivis par le test comparatif multiple post hoc de Tukey appliqué entre les moyennes. L'analyse statistique des données a été réalisée à l'aide du logiciel SYSTAT Ver. 12. De plus, les activités antimicrobiennes ont été réalisées à l'aide de l'analyse en composantes principales (ACP) et ont été créées par le logiciel PAST [188]. Cependant, celle de la fraction volatile de *Cytisus triflorus* L'Her, les tests ont été réalisés en trois réplicats et les données ont été analysées statistiquement par le test ANOVA-Tukey HSD (différence honnêtement significative) comparant l'impact de trois stades phénologiques (stade végétatif, floraison et fructification) d'un an sur le rendement en huiles essentielles et les propriétés antimicrobiennes de *Cytisus triflorus* L'Her en utilisant les tests de DUNCAN MULTIPLE RANGE et de KRUSKAL-WALLIS au niveau $p \leq 0,01$.

Dans une tentative de tester les similitudes sur la distribution des constituants d'huile essentielle à trois étapes phénologiques cruciales, et d'établir la relation entre l'activité antimicrobienne et les composés volatils de *Cytisus triflorus* L'Her; La distance euclidienne et la méthode hiérarchique agglomérée ont été réalisées en utilisant le logiciel PAST [188].

Toutes les étapes de la caractérisation des métabolites secondaires des deux plantes étudiées est résumé dans le diagramme suivant:

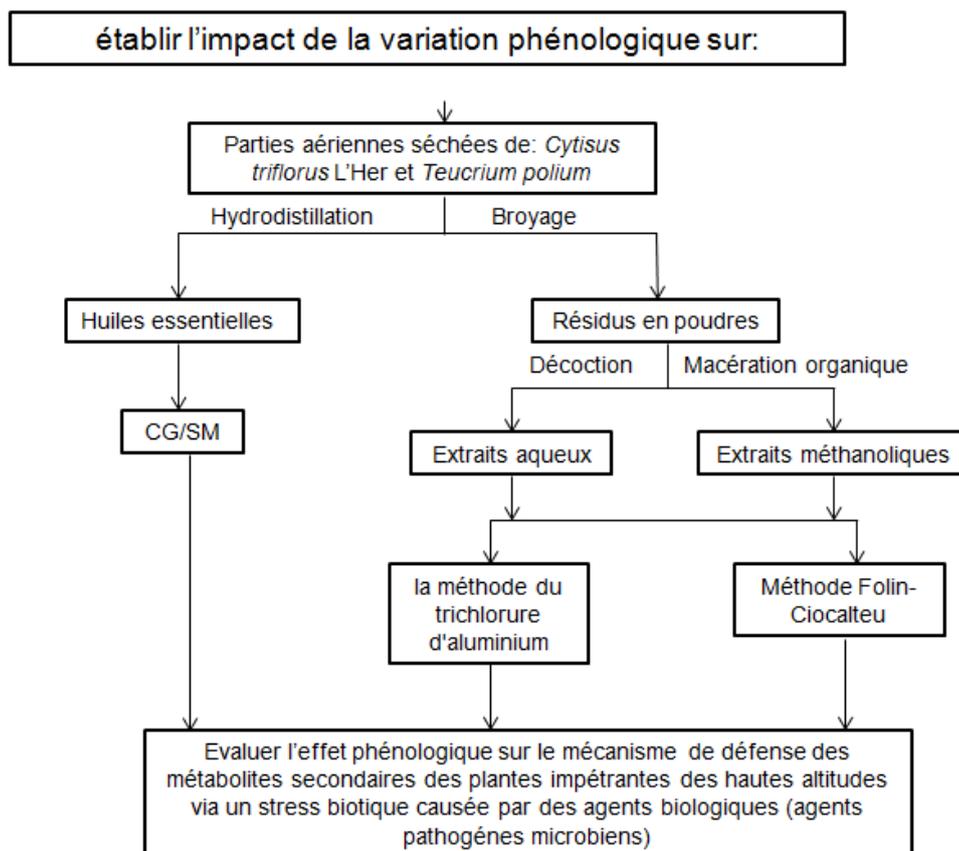


Figure 3.9: Schéma représentatif des extractions, des préparations, des analyses et des estimations chimiques et des bioactivités reconquises chez la lamiacée *Teucrium polium* et la fabacée *Cytisus triflorus* L'Her.

CHAPITRE 3: RÉSULTATS

Les résultats sont présentés en 2 parties:

- i) **Profil saisonnier de quelques proportions de métabolites secondaires récupérés dans les extraits aqueux et méthanoliques de la balais *Cytisus triflorus* L'Her et de la germandrée *Teucrium polium*; plantes de hautes altitudes:** Nous nous sommes intéressés à la mise en évidence de l'impact de l'indice phénologique à savoir les stades; végétatif, floraison et fructification sur la cinétique d'accumulation des principes actifs des extraits et sur leur pouvoirs antimicrobiens (agents pathogènes microbiens).
- ii) **Caractérisation et comportement saisonnier de la fraction volatile des métabolites secondaires; les huiles essentielles de la balais *Cytisus triflorus* L'Her et de la germandrée *Teucrium polium*; plantes de hautes altitudes:** Cette partie s'est focalisée sur à l'étude de l'impact des phases critiques du cycle végétatif (stade végétatif, stade floraison et stade fructification); sur le rendement en huiles essentielles, sur leurs compositions chimique et sur leurs pouvoirs antimicrobiens (agents pathogènes microbiens).

1. Profil saisonnier semi-quantitative du contenu phytochimique et pouvoirs antibactérien des extraits aqueux et méthanoliques chez la Lamiacée *Teucrium polium*

1.1. Rendement d'extraction des extraits aqueux et méthanoliques de *Teucrium polium*

Le pourcentage des rendements des extraits de la partie aérienne de *Teucrium polium* durant les trois stades phénologiques est représenté dans la Figure 3.1. L'analyse de la variance exprime un écart en rendement très significatif au profit des extraits aqueux au niveau des trois stades phénologiques. La comparaison par paires nous a permis de signaler une graduation négative en rendement selon un gradient saisonnier; végétatif, floraison et fructification.

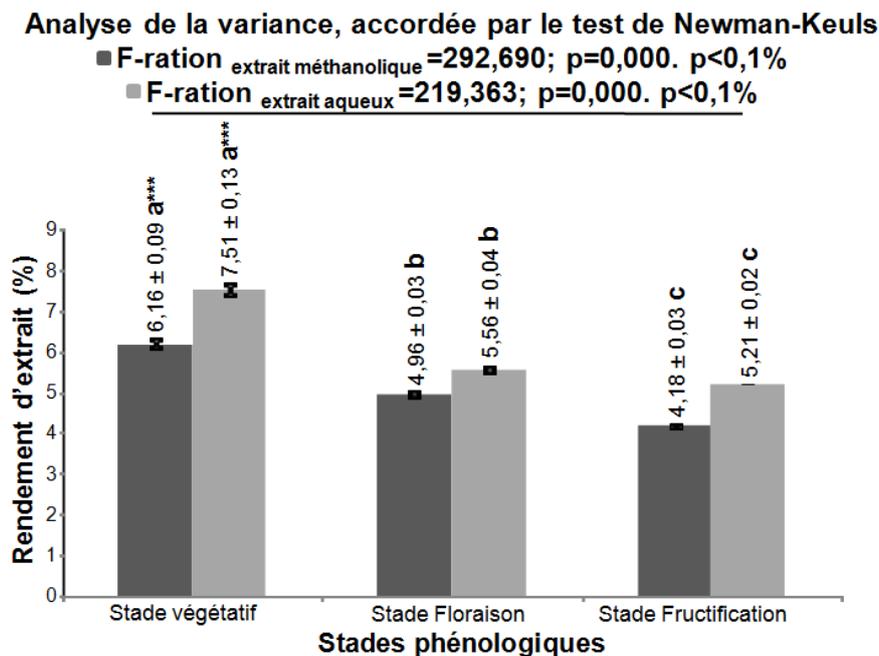


Figure 3.1: Variation saisonnière du pourcentage des rendements des extraits aqueux et méthanoliques des parties aériennes de *Teucrium polium* (moy ± SE, n=3).

1.2. Etude phytochimique des extraits de *Teucrium polium*

1.2.1. Tendence du contenu phytochimique des extraits de *Teucrium polium* sous l'effet saisonnier

Dans l'esprit de visualiser les caractéristiques phytochimiques des extraits de *Teucrium polium* sous la dépendance des différents stades phénologiques, nous avons opté pour une analyse multivariée. L'analyse en composantes principales A.C.P. est satisfaisante dans la mesure où un fort pourcentage de contribution a été signalé sur les axes F1xF2 (100%). Les projections des valeurs de contenu des extraits en métabolisme secondaire sur le premier axe (76,32%), ont permis de constater la présence d'une corrélation positive entre les phénols totaux et les flavonoïdes, par rapport au stade végétatif. Cette tendance a été confirmée par la valeur du coefficient de corrélation de Pearson ($r=0,973$) (Figure 3.2).

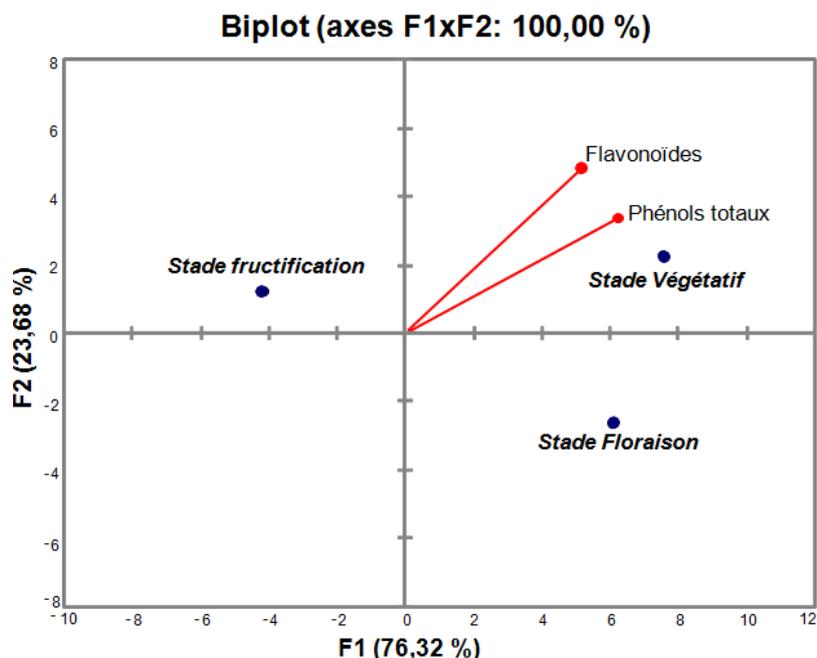
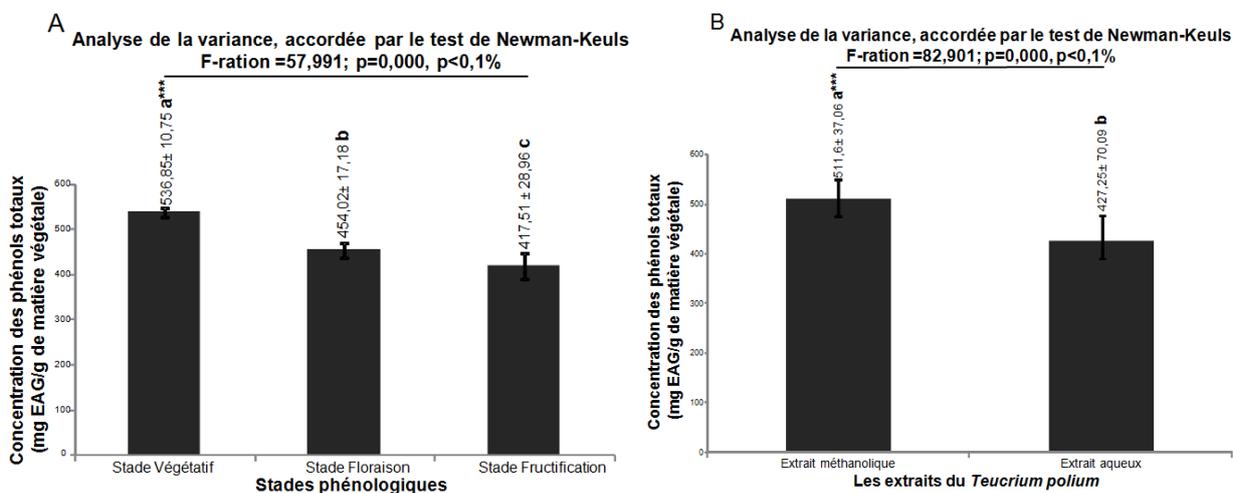


Figure 3.2: Analyse en Composantes Principales (A.C.P.) du contenu phytochimique des extraits de *Teucrium polium*: distribution des variables correspondant à la répartition selon l'indice saisonnier.

1.2.2. Variation quantitative du contenu phytochimique accumulée dans les extraits de *Teucrium polium* sous les fluctuations saisonnières

Les résultats du screening phytochimique du contenu en phénols totaux et en flavonoïdes des extraits aqueux et méthanolique de *Teucrium polium* ont affichés une fluctuation significative, très marquée au niveau du stade végétatif est qui s'estampaient progressivement avec le développement de la plante (Figure 3.3A et 3.3C). Cependant, l'analyse de la variance a estimé que l'extrait méthanolique concentre significativement les phénols totaux et les flavonoïdes par comparaison aux extraits aqueux (Figure 3.3B et 3.3D).



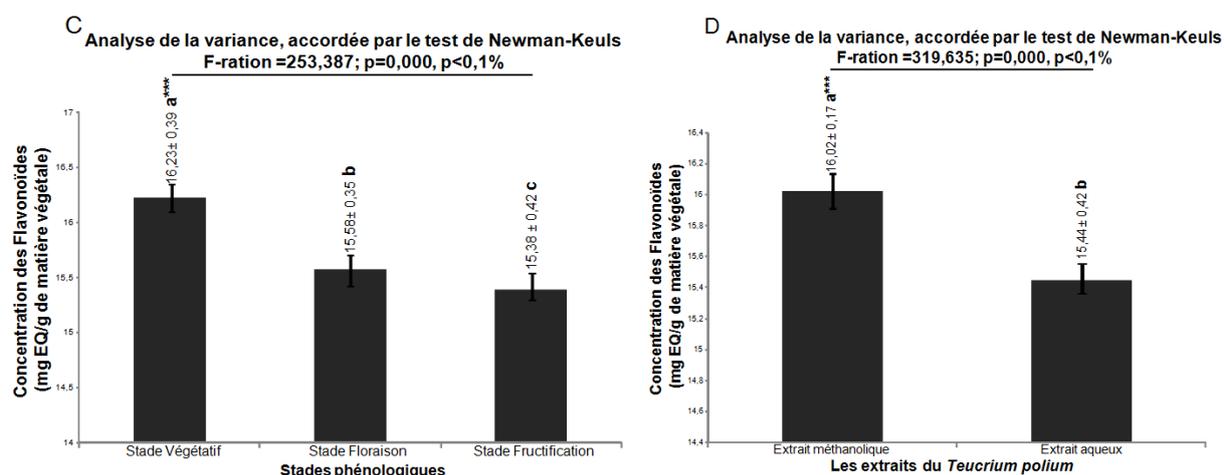


Figure 3.3: Fluctuations du contenu des extraits de *Teucrium polium* en terme de: phénols totaux et de flavonoïdes en fonction des solvants d'extraction et des stades phénologiques (moy ± SE, n=3).

1.3. Variation saisonnière des activités antibactériennes des extraits de *Teucrium polium*

Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits de *Teucrium polium* obtenus par la méthode de diffusion, ont exposé trois paliers de sensibilité à l'égard de la gamme de bactéries pathogènes testées durant les trois stades phénologiques, générant des différences très significatives. Le premier palier, s'intéressait à la détermination de la sensibilité des souches en contrôlant le changement des diamètres des zones d'inhibition face aux variations phénologiques de *Teucrium polium*. Les résultats ont montré une gradation descendante très hautement significative entre l'activité des extraits du stade végétatif, du stade floraison et ceux du stade fructification (Figure 3.4A). Concernant le deuxième palier, ce dernier a affiché la dominance des extraits méthanoliques par comparaison aux extraits aqueux en termes d'aptitude d'affectation des diamètres des zones d'inhibitions des pathogènes (Figure 3.4B). En revanche, le troisième palier a montré la forte sensibilité des bactéries à Gram positifs (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) envers les extraits de *Teucrium polium* et même pour *Salmonella enterica*, qui désormais appartient aux Gram négatifs. Néanmoins, l'effet antibactérien sur le reste de pathogènes notamment *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* apparaît moins important (Figure 3.4C).

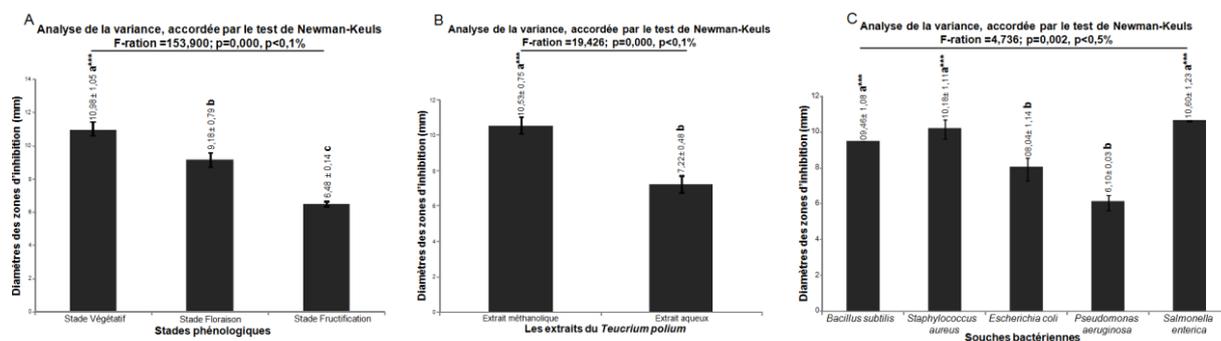


Figure 3.4: Fluctuations des diamètres des zones d'inhibition sous l'effet des extraits de *Teucrium polium*, des stades phénologiques et des souches bactériennes (moy ± SE, n=3).

La projection mutuelle des quantités du contenu des extraits et des valeurs des zones d'inhibition sur les deux axes F1xF2 (100%) de l'ACP, nous a permis de constater que la sensibilité des pathogènes durant le stade végétatif présentait une corrélation positive avec les phénols totaux ($r = 0,974$), et de même avec les flavonoïdes ($r = 0,896$) (Figure 3.5).

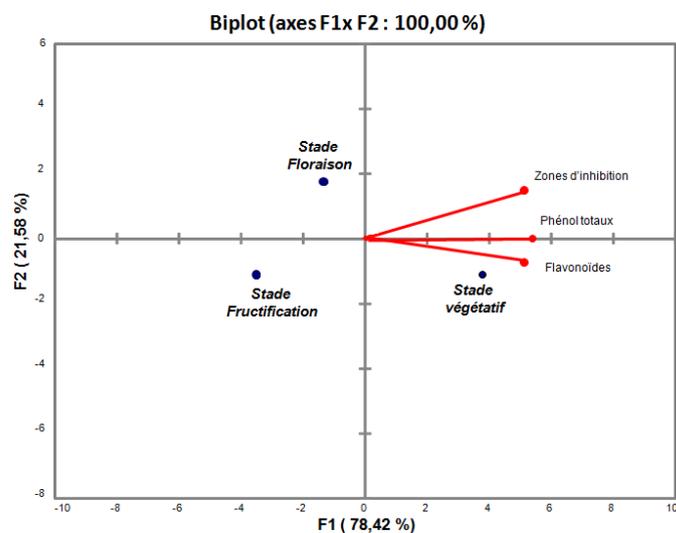


Figure 3.5: Analyse en Composantes Principales (A.C.P.) performed sur la variation saisonnière de la composition phytochimique des extraits de *Teucrium polium* et de l'activité antibactérienne:

Indication des corrélations positives et négatives des variables avec les axes.

1.4. Modèle d'ajustement et d'optimisation de la bioactivité des extraits de *Teucrium polium*

La réflexion sur la modélisation de l'optimisation des activités des extraits dans le cadre d'une rationalisation d'utilisation des ressources phytogénétiques, nous ont permis de contribuer à une meilleure compréhension de la qualité phytochimique des

plantes médicinales dans les activités antibactériennes. Ainsi, l'intégration des teneurs en phénols totaux (TP) et en flavonoïdes (FLV) des différents stades phénologiques (variables explicatives), et les zones d'inhibitions des souches (variable expliquée), nous permettras de prédire les grandes propriétés fonctionnelles des extraits de *Teucrium polium*. Les résultats des régressions multiples, nous ont permis d'obtenir plusieurs modèles prédictifs relatifs aux souches selon la variation phénologiques des extraits. Les équations polynomiales ont été arrêtées après vérification de la signification des probabilités associées à chaque variable explicative. Les valeurs de coefficients de détermination ont également affirmé le degré élevé de corrélation entre les valeurs observées et prédites. En revanche, le coefficient de corrélation a indiqué un haut degré de lien entre les variables explicatives (contenu phytochimique des extraits), et la variable expliquée (zone d'inhibition)(Tableau 3.1).

Bacillus subtilis paraît très sensible à l'effet synergique des phénols totaux (TP), et des flavonoïdes (FLV) concentrés dans les extraits des stades végétatif et floraison, alors que sa sensibilité serait accrue aux flavonoïdes (FLV) dans les extraits du stade fructification. Pour *Staphylococcus aureus* sa sensibilité paraît réagir différemment aux contenus des extraits. Le stade végétatif intègre un maximum de composés (TP et FLV), secondé par le stade fructification (FLV) et enfin le stade floraison qui a montré l'effet individualisé des phénols totaux (TP). Concernant *Salmonella enterica*, elle présentait une sensibilité aux extraits durant le stade végétatif (TP et FLV) et réagissait pareillement aux contenus des extraits des stades phénologiques floraison et fructification(FLV). La synergie des constituants métaboliques des extraits a exprimé un effet antibactérien diversifié sur *Pseudomonas aeruginosa* durant le stade végétatif et le stade fructification avec (TP et FLV), et durant le stade floraison avec (TP). *Escherichia coli* pourrait être contrôlé efficacement par l'utilisation des extraits du stade végétatif et du stade floraison avec (TP et FLV).

Tableau 3.1: Présentation des équations prédictives de l'activité antibactérienne des composés des extraits de *Teucrium polium* vis à vis les microorganismes testés en fonction des stades phénologiques.

Souche bactérienne	Stade phénologique	Variables explicatives	R ²	r	Prédiction de l'activité des composés des extraits au stade phénologique
<i>Bacillus subtilis</i>	Stade végétatif	PT et FLV	1	1	$Y_{IZ}=6,95PT+27,83FLV-269,99$
	Stade floraison	PT et FLV	0,996	0,998	$Y_{IZ}=39,24PT+159,59FLV-688,32$
	Stade fructification	FLV	0,999	0,999	$Y_{IZ}=2,77FLV+14,76$
<i>Staphylococcus aureus</i>	Stade végétatif	PT et FLV	0,999	0,999	$Y_{IZ}=189,47PT+30,81FLV-166,06$
	Stade floraison	PT	0,978	0,989	$Y_{IZ}=2,82PT+56,73$
	Stade fructification	FLV	0,927	0,962	$Y_{IZ}=20,83FLV+33,38$
<i>Salmonella enterica</i>	Stade végétatif	PT et FLV	0,997	0,999	$Y_{IZ}=643,58PT+224,10FLV+625,02$
	Stade floraison	FLV	0,995	0,997	$Y_{IZ}=54,20FLV+63,60$
	Stade fructification	FLV	0,990	0,995	$Y_{IZ}=19,93FLV+32,18$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Stade végétatif	PT et FLV	0,939	0,969	$Y_{IZ}=50,53PT+9,31FLV-180,59$
	Stade floraison	PT	0,895	0,946	$Y_{IZ}= 4,37PT+22,47$
	Stade fructification	PT et FLV	0,965	0,982	$Y_{IZ}=6,95PT+4,74FLV+1,426$
<i>Escherichia coli</i>	Stade végétatif	PT et FLV	0,999	0,999	$Y_{IZ}=322,74PT+142,58FLV+62,34$
	Stade floraison	PT et FLV	0,992	0,981	$Y_{IZ}=0,97PT+3,21FLV-14,87$
	Stade fructification	PT et FLV,	0,519	0,199	$Y_{IZ}=4,23PT+9,37FLV+17,61$

2. Profil saisonnier semi-quantitative du contenu phytochimique et pouvoir antibactérien des extraits aqueux et méthanoliques chez la Fabacée *Cytisus triflorus* L'Her

2.1. Rendement d'extraction des extraits aqueux et méthanoliques de *Cytisus triflorus* L'Her

Le pourcentage des rendements des extraits de *Cytisus triflorus* L'Her durant les trois stades phénologiques est représenté dans la figure 3.6. L'analyse de la variance exprime un écart en rendement très significatif au privilège de l'extrait aqueux durant les trois stades phénologiques. La comparaison par paires nous permet d'annoncer une graduation négative en rendement selon un gradient phénologique; végétatif, floraison et fructification.

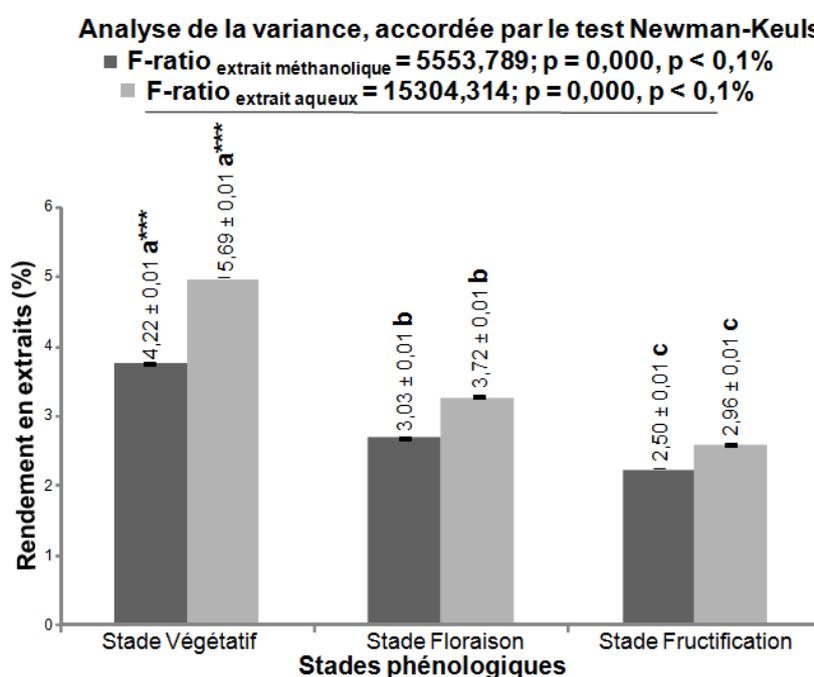


Figure 3.6: Variation saisonnière du pourcentage des rendements des extraits aqueux et méthanoliques des parties aériennes de *Cytisus triflorus* L'Her (moy ± SE, n=3).

2.2. Etude phytochimique des extraits de *Cytisus triflorus* L'Her

2.2.1. Tendance du contenu phytochimique des extraits de *Cytisus triflorus* L'Her sous l'effet saisonnier

L'analyse en composantes principales A.C.P. est avancée dans l'esprit de visualiser les caractéristiques phytochimiques des extraits de *Cytisus triflorus* L'Her sous la dépendance des différents stades phénologiques. L'analyse est satisfaisante dans la mesure où un fort pourcentage de contribution a été signalé sur les axes

F1xF2 (100%). Les projections des valeurs du contenu des extraits en métabolites secondaires sur le premier axe (65,41%), ont permis de constater la présence d'une corrélation positive entre les phénols totaux et les flavonoïdes avec le stade végétatif. Cette tendance a été confirmée par la valeur du coefficient de corrélation de Pearson ($r=0,982$) (Figure 3.7).

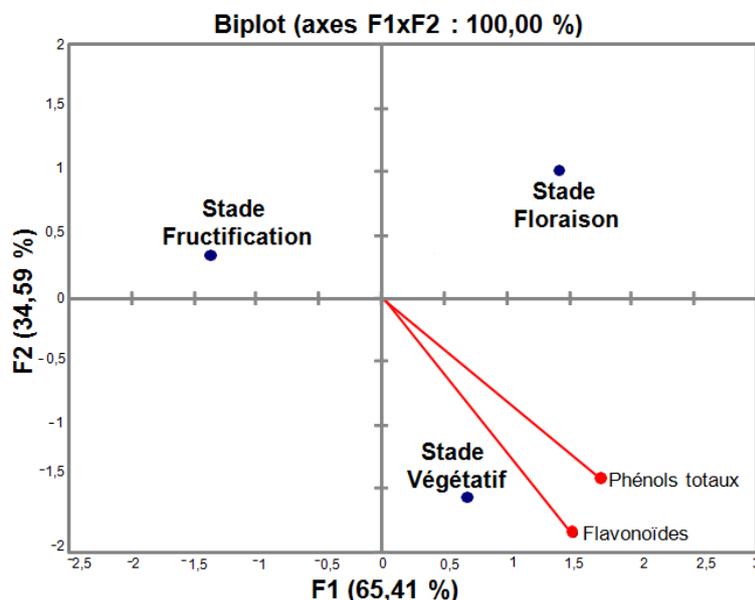


Figure 3.7: Analyse en Composantes Principales (A.C.P.) de la composition phytochimique des extraits de *Cytisus triflorus* L'Her: distribution des variables correspondant à la répartition selon l'indice saisonnier

2.2.2. Variation quantitative du contenu phytochimique accumulée dans les extraits de *Cytisus triflorus* L'Her sous les fluctuations saisonnières

Les résultats du screening phytochimique du contenu de *Cytisus triflorus* L'Her en phénols totaux et en flavonoïdes des extraits aqueux et méthanolique ont annoncé une fluctuation significative très marquée, qui paraît la plus performante en stade végétatif est qui s'accroissent progressivement avec le développement de la plante (Figure 3.8A et 3.8C). Néanmoins, l'analyse de la variance a estimé que les phénols totaux et les flavonoïdes se concentrent significativement dans l'extrait méthanolique que dans l'extrait aqueux (Figure 3.8E et 3.8D).

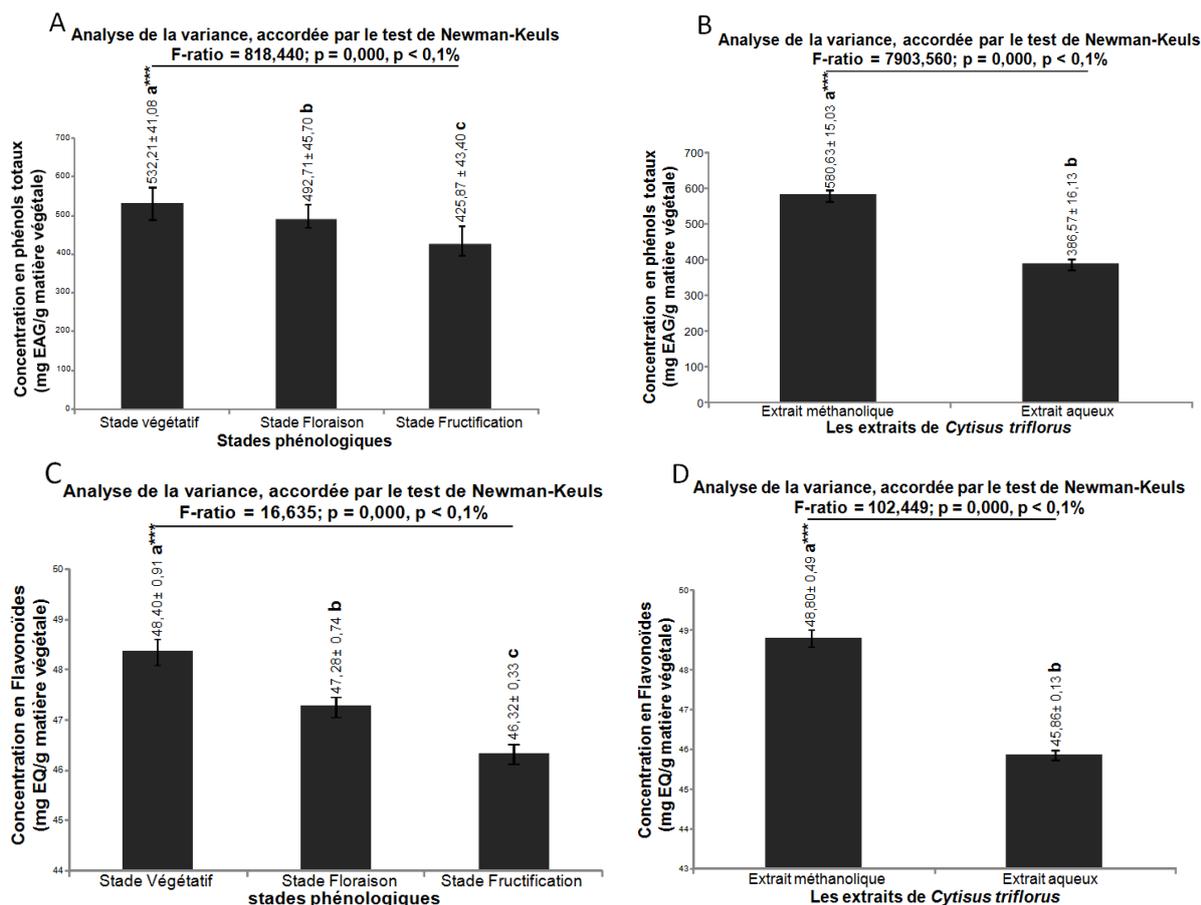


Figure 3.8: Fluctuations du contenu phytochimique des extraits de *Cytisus triflorus* L'Her en terme de phénols totaux et des flavonoïdes en fonction des solvants d'extraction et des stades phénologiques (moy ± SE, n=3).

2.3. Variation saisonnière des activités antibactériennes des extraits de *Cytisus triflorus* L'Her

Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits de *Cytisus triflorus* L'Her obtenus par la méthode de diffusion ont relaté trois paliers de sensibilité à l'égard de la gamme de bactéries pathogènes durant les trois stades phénologiques, générant des différences très significatives. Le premier palier, s'intéressait à la détermination de la sensibilité des souches en contrôlant le changement des diamètres des zones d'inhibition face aux variations saisonnières de *Cytisus triflorus*. Les résultats ont montrés un décroissement très significatif entre l'activité des extraits du stade végétatif, du stade floraison et du stade fructification (Figure 3.9A). Concernant le deuxième palier, ce dernier a annoncé la dominance des extraits méthanoliques par comparaison aux extraits aqueux en termes d'aptitude d'affectation des diamètres des zones d'inhibitions des pathogènes (Figure 3.9B). En revanche, le troisième palier a montré une forte sensibilité qui bascule entre bactéries à Gram positif et Gram négatif (*Salmonella enterica* et *Staphylococcus aureus*) en première position, suivie par un effet quasiment analogue des extraits sur *Bacillus subtilis* et

Escherichia coli. Néanmoins, l'effet sur *Pseudomonas aeruginosa* apparaît moins important, exhibant une résistance aux extraits de *Cytisus triflorus* L'Her (Figure 3.9C).

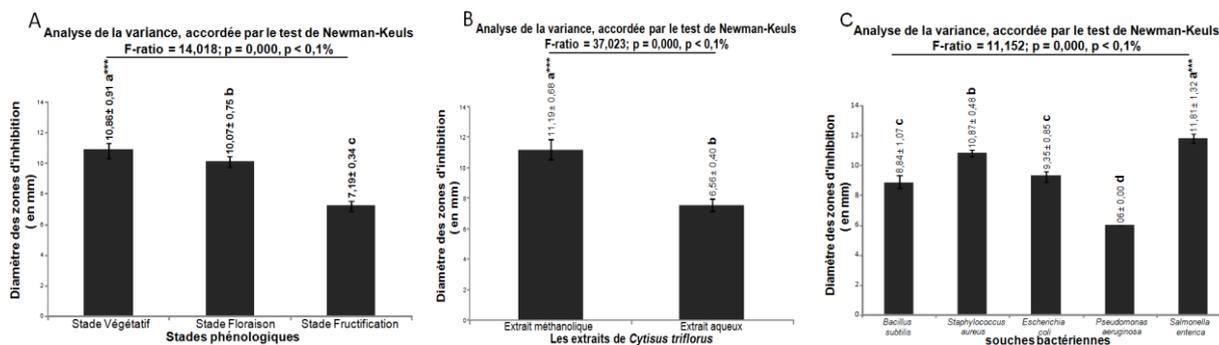


Figure 3.9: Fluctuations des diamètres des zones d'inhibition sous l'effet des extraits de *Cytisus triflorus* L'Her, des stades phénologiques et des souches bactériennes (moy ± SE, n=3).

La projection mutuelle des concentrations des composés des extraits et des valeurs des zones d'inhibition sur les deux axes F1x F2 (100%) de l'ACP nous a permis de constater que la sensibilité des bactéries exposait une corrélation positive avec les phénols totaux ($r = 0,985$) et avec les flavonoïdes ($r = 0,934$) durant le stade végétatif, alors que le contenu des extraits des stades floraison et fructification réagissait négativement avec la sensibilité des bactéries (Figure 3.10).

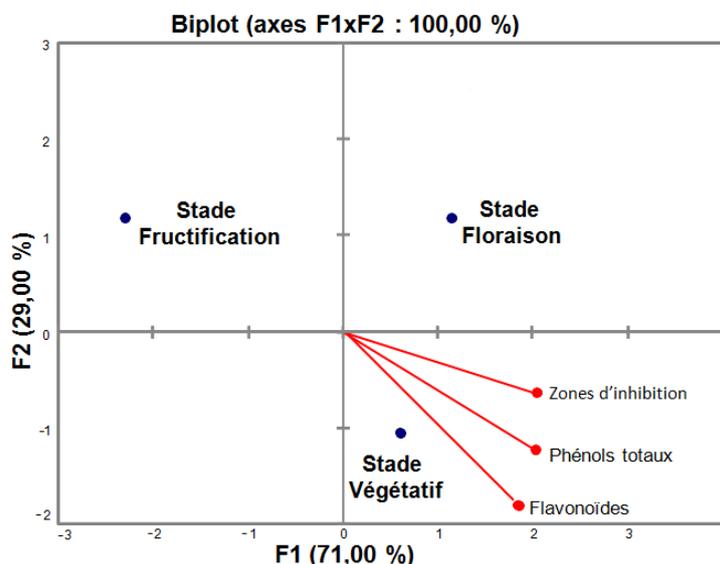


Figure 3.10: Analyse en Composantes Principales (A.C.P.) performée sur la variation saisonnière de la composition phytochimique des extraits de *Cytisus triflorus* L'Her et de l'activité antibactérienne:

indication des corrélations positives et négatives des variables avec les axes

2.4. Modèle d'ajustement et d'optimisation de la bioactivité des extraits de *Cytisus triflorus* L'Her

Pareillement, dans le but de prédire les grandes propriétés fonctionnelles des extraits de *Cytisus triflorus*, nous avons intégré les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes des différents stades phénologiques (variables explicatives), et les zones d'inhibitions des souches testées (variable expliquée) afin d'obtenir les modèles prédictifs relatifs aux souches selon la variation phénologique des extraits. Les résultats des équations polynomiales (Tableau 3.2), nous ont permis de constater que *Salmonella enterica*, paraît très sensible aux flavonoïdes (FLV) des extraits du stade floraison. Cependant *Staphylococcus aureus*, sa sensibilité paraît réagir approximativement aux contenus des extraits en flavonoïdes (FLV) pendant le stade floraison.

Il est possible que, selon les stades phénologiques de l'année, le contenu et la présence des composés bioactifs puissent varier en parallèle avec la présence ou l'absence des stimuli externes, ce qui entraîne une modification des propriétés antibactériennes et qui a été enregistré par les extraits de *Cytisus triflorus* L'Her qui peuvent être présentés comme des alternatives afin de diminuer certaines résistances chez certains microorganismes.

Tableau 3.2: Présentation des équations prédictives de l'activité antibactérienne des composés des extraits de *Cytisus triflorus* L'Her vis à vis les microorganismes testés en fonction des stades phénologiques.

Souche bactérienne	Stade phénologique	Variables explicatives	R ²	r	Prédiction de l'activité des composés des extraits au stade phénologique
<i>Salmonella enterica</i>	stade floraison	FLV	0,986	0,993	$Y_{IZ}=1,50 \text{ FLV}-2,42$
<i>Staphylococcus aureus</i>	stade floraison	FLV	0,997	0,998	$Y_{IZ} =31,92\text{FLV}-96,59$

3. Contribution à la caractérisation des huiles essentielles de la Lamiacée *Teucrium polium* et au comportement saisonnier de leur rendement, de leur composition chimique et de leur activité antimicrobienne

3.1. Optimisation et comportement saisonnier du rendement en huiles essentielles de *Teucrium polium*

Dans le but de parfaire l'extraction des HE's et atteindre un rendement optimal, nous avons procédé à des hydrodistillations à partir d'échantillons de 100 g du matériel végétal séché. Les huiles essentielles obtenues selon les stades phénologiques, présentaient un aspect physique variable accompagné par une forte odeur, dont l'huile essentielle de stade végétatif apparaît jaunâtre, celle du stade

floraison vire vers le marron, tandis que l'huile essentielle du stade fructification était de couleur marron foncé. Le rendement en huiles essentielles de la partie aérienne de *Teucrium polium* était sous la dépendance des stades phénologiques; où le stade végétatif dominait très significativement les stades floraison et fructification (Figure 3.11).

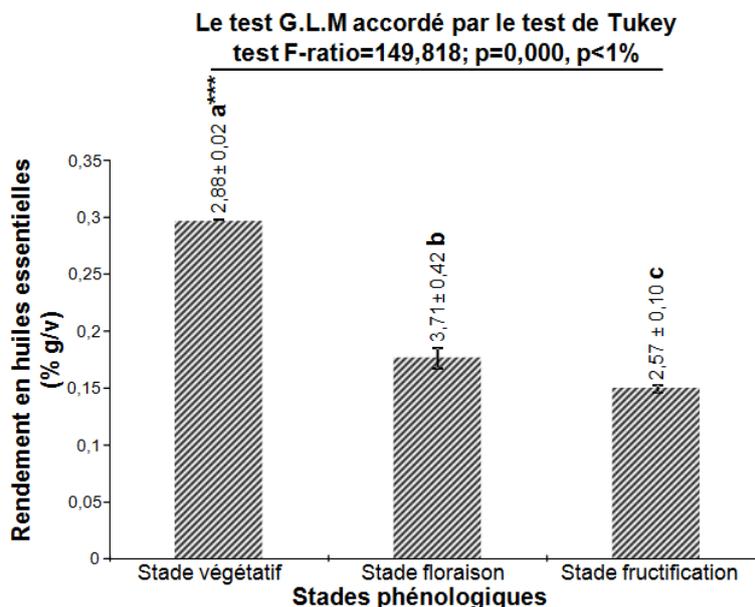


Figure 3.11: Effet saisonnier sur le rendement des huiles essentielles (%) des parties aériennes de *Teucrium polium*;

***: suivis par les différentes lettres (a, b et c) sont significativement différent à $P < 0,1\%$ accordés par le test de Tukey post-hoc-multi-comparaison

Afin de mettre en évidence l'influence des conditions climatiques sur l'expression en métabolites secondaires des parties aériennes de *Teucrium polium*. Nous exposant les données de la synthèse climatique de la période 1995-2015 [186]. Nous signalons que le stade végétatif coïncidait avec une période hivernale caractérisait par des hivers frais avec des températures variaient du 11,4-12°C, tandis que le stade floraison et fructification ont coïncidés avec une période estivale précocement installait couvrait les mois mai, juin, juillet et aout avec des températures maximales moyennes oscillantaient entre 25 et 34,8°C (Figure 3.12).

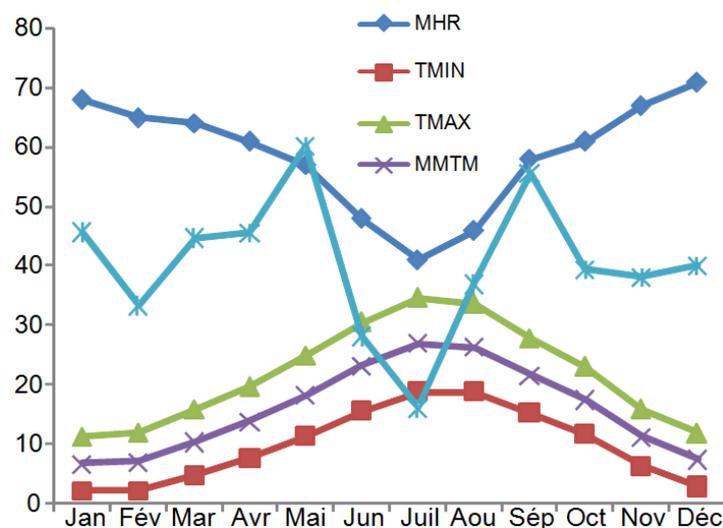


Figure 3.12: Conditions climatiques dans la région d'étude (monts des Aurès-Chéla - wilaya de Khenchela) durant la période 1995-2015;

MMTM; la moyenne des températures moyennes en C°. TMIN; moyenne des températures minimales en C°. TMAX; moyenne des températures maximales en C°. MPM; moyenne des précipitations mensuelles en mm. MHR ; moyenne du taux d'humidité relative en %

3.2. Comportement saisonnier de la composition chimique des huiles essentielles de *Teucrium polium*

Les résultats de la composition chimique des trois huiles essentielles de *Teucrium polium* des différents stades phénologiques, révélaient une richesse qui correspond à 107 composés identifiés (Tableau 3.3). Les stades phénologiques affichaient différemment les taux des composés majoritaires dont nous citons; L' α -pinène durant le stade végétatif (35,97%), le stade floraison (24,96%) et le stade fructification (20,05%). Le β -pinène durant le stade végétatif (14,47%), durant le stade floraison (11,58%) et durant le stade fructification (30,23%). Le D-limonène durant le stade végétatif avec 8,15%. Le stade floraison avec 5,47% et le stade fructification avec 5,63%. Le β -myrcène durant le stade végétatif (4,03%), le stade floraison (6,47%) et le stade fructification (5,79%) et le Guaia-1(10).11-diène durant le stade végétatif (3,14%), le stade floraison (3,56%) et le stade fructification (3,60%).

Tableau 3.3: Comportement saisonnier de la composition volatile convenue dans les huiles essentielles des parties aérienne de *Teucrium polium*.

Composés identifiés	IR	Concentration approximative (l'air de pic %)		
		(st'V)	(st'FL)	(st'FR)
<i>Monoterpènes hydrocarbonés</i>				
α -pinène	932	35,97	24,96	20,05
β -pinène	977	14,47	11,58	30,23

2-Norpinene,3,6,6-trimethyl-	949	ND	00,17	00,36
Camphène	950	00,44	00,03	00,49
β -myrcène	991	04,03	06,47	05,79
p-cymène	1187	ND	00,28	00,03
D-limonène	1018	08,15	05,47	05,63
α -Terpinène	1059	ND	ND	00,50
(+)-Epi-bicyclosesquiphellandrène	1435	ND	04,51	ND
m-Cymene	1042	00,19	00,01	ND
Ocimene	958	ND	00,84	00,01
m-Mentha-6,8-diene, (R)-(+)-	1018	ND	ND	00,05
Norpinane,6,6-dimethyl-3-methylene-	943	ND	00,03	00,02

Monoterpènes oxygenés

β -linalool	1082	02,28	01,13	01,03
Pulegone	1212	00,01	ND	ND
Bornéol	1138	01,01	00,16	00,08

Sesquiterpènes hydrocarbonés

α -elemene	1430	00,07	01,10	ND
Copaene	1221	00,13	00,24	00,34
Eudesma-3,7(11)-diene	1507	ND	ND	00,77
Guaia-1(10),11-diene	1490	03,14	03,56	03,60
β -farnesene	1440	00,55	00,33	00,21
Eudesma-4(14),11-diene	1469	00,34	00,86	ND
Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethenyl)-, [1S-(1 α ,2 β ,4 β)]-	1398	00,30	00,28	00,21
Eremophila-1 (10),11-diene	1474	00,13	00,14	00,79
1,4,7,-Cycloundecatriene, 1,5,9,9-tetramethyl-,Z,Z,Z-	1579	00,55	00,77	00,63
Calarene epoxide	1293	00,05	00,03	00,19
\pm -trans-Nerolidol	1564	01,16	00,72	00,58
Caryophyllène	1494	ND	01,24	01,13
β -cubebene	1384	02,82	ND	ND
β -bourbonene	1407	00,19	00,26	ND
α -gurjunene	1375	00,04	00,25	00,60
Ledene oxide -(II)	1293	00,14	00,10	00,09
Isoaromadendrene epoxide	1281	00,89	01,38	01,22

Aromadendrene oxide-(1)	1462	00,01	00,12	00,40
β -guaïene	1523	00,12	00,08	ND
Cadina-1(10),4-diene	1469	01,11	00,69	ND

sesquiterpènes oxygenés

Spathulenol	1536	00,29	00,05	00,99
Caryophyllène oxide	1507	00,77	00,42	ND
Cubenol	1580	01,35	00,35	00,19
α -cadinol	1583	00,82	01,27	01,91
α -bisabolol	1625	ND	07,51	05,83
β -eudesmol	1619	00,18	00,14	00,05
Tau,-muurolol	1580	00,50	ND	ND

Hydrocarbons

Heneicosane	2109	00,02	00,08	ND
ρ -Mentha-1,4(8)-diène	1052	00,12	00,42	00,48
Tricosane	2300	00,05	00,43	00,03
Triacotane	3003	ND	00,31	00,08
Octacosane	2800	ND	00,79	00,06
Pentacosane	2500	ND	00,95	00,07
Heptacosane	2705	00,05	00,90	00,10
Tetracosane	2407	ND	00,74	00,08
Hexacosane	2606	ND	00,98	00,77
Tropilidene	786	ND	ND	00,03
2-Nonen-4-yne,(E)-	941	ND	00,04	00,04
n-docosane	2208	ND	00,18	00,02

Alcools

p-cymen-8-ol	1197	ND	00,37	00,05
Terpineol, cis- β -	1158	00,04	00,03	00,01
1-Hexanol	860	ND	00,02	ND
1, 7,7-Trimethylbicyclo (2, 2,1) hept-5-en-2-ol	1120	ND	00,02	00,89
2(10)-Pinen-3-ol, (1S,3R,5S)-(-)-	1131	00,60	00,93	00,94
(S)-cis-Verbenol	1136	01,36	01,64	1,60
trans-Pinocarveol	1138	00,11	ND	ND
p-menth-1-en-8-ol	1143	ND	00,58	00,64
Iridodiol	1403	ND	00,01	00,01

p-mentha-6,8-dien-2-ol	1206	00,12	00,37	00,38
Epiglobulol	1530	ND	00,07	00,26
Ledol	1530	ND	ND	01,12
Eudesma-4,11-dien-2-ol	1878	00,13	ND	ND
Phytol	2045	ND	00,05	00,04
1-Octen-3-ol	969	00,10	00,23	00,17
3-Octanol	979	00,06	00,05	00,04
p-menth-4(8)-en-9-ol	1284	ND	ND	00,41
2-pine-10-ol	1191	00,15	00,57	00,40
p-mentha-6,8-dien-2-ol, trans	1206	00,13	00,33	00,74
Cedr-8-en-13-ol	1646	ND	00,06	00,03

Aldéhydes

Myrtanal	1126	ND	00,02	00,01
2-Norpinene-2-carboxaldehyde,6,6-dimethyl-	1136	00,63	01,32	00,99
Nonanal	1157	00,08	00,23	00,24
Benzaldehyde, p-isopropyl-	1230	ND	ND	00,04
(E,E)-2,4-Decadienal	1220	ND	00,05	00,02
α -campholenal	1155	ND	00,07	00,60
Hexanal	806	00,22	00,03	00,15

Cétones

D-verbenone	1119	00,02	00,02	00,01
2-Pinen-4-one	1119	00,18	01,32	00,99
2 (10)-pinen-3-ones, (\pm)-	1114	00,12	ND	ND
Thujone	1062	ND	ND	00,01
3-Benzoylbicyclo(3,3,1) non-6-ene	1834	00,07	00,23	00,23
p- mentha-6,8-dien-2-one	1190	00,13	ND	ND
Eucarvone	1199	00,32	ND	00,01
Hexahydrofarnesylacetone	1754	00,04	ND	00,03
3-Octanone	952	ND	ND	00,02
3-Thujen-2-one	1073	ND	00,05	00,03
Carvoneoxide,cis-	1202	ND	00,07	00,64

Estérs

Limonen-6-ol, pivalate	1560	ND	00,01	00,09
Octen-1-ol, acetate	1191	00,12	00,14	00,02

(-)-Myrtenylacetate	1262	00,33	00,21	00,04
Nerolidylacetate	1754	00,67	00,20	ND
Geranylisovalerate	1586	00,05	00,01	ND
p-Menth-1-en-8-ol,acetate	1333	00,16	00,52	ND
β-Santanol acetate	1791	ND	00,02	ND
1-Methylbutyl palmitate	2212	ND	ND	00,02

Acides gras

Acide butanoïque,2-methylbutylester	1019	00,02	00,02	ND
AcidePropanoïque,2-methyl-,2-methylbutylester	955	ND	00,06	00,05
Acide Héxadecanoïque	1968	ND	ND	00,03
Acide pentadecanoïque, 14-methyl-, methylester	1814	ND	ND	00,01

Composés phénoliques

Carvacrol	1314	00,04	ND	ND
o-Allylguaiacol	1392	00,02	ND	ND

Total des substances identifiées (%)

		94,73	92,64	94,68
Monoterpènes oxygenés		03,09	01,29	01,11
Monoterpènes hydrocarbonés		63,46	53,47	67,21
sesquiterpènes hydrocarbonés		11,75	12,15	10,76
sesquiterpènes oxygenés		03,91	09,74	08,97
Composés phénoliques		03,90	06,27	03,78
Acides gras		00,02	00,08	00,09
Aldéhydes		00,93	01,72	02,05
Estérs		01,33	01,11	00,17
Alcools		02,80	05,33	07,73
Cétone		00,88	01,48	01,60
hydrocarbons		00,24	05,82	01,76

IR: l'indice de rétention

Méthode d'identification: par comparaison des IRs avec ceux cités dans les librairies, rapportés dans la littérature, par SM, par comparaison des spectres de masses avec les spectres de masse de la librairie **NIST02**

ND: Composés non détectés

(st'V): l'huile essentielle du stade végétatif. **(st'FL):** l'huile essentielle du stade floraison et **(st'FR):** l'huile essentielle du stade fructification

La proportion des différents groupes de composés varie d'une huile à l'autre (Tableau 3.2). Ces huiles essentielles comportent une large proportion des terpénoïdes hydrocarbonés durant le stade végétatif (75,21%), le stade floraison (65,62%) et le stade fructification (77,97%). Elles sont représentées, d'une part par les monoterpènes hydrocarbonés qui affichaient des taux de l'ordre 63,46%, 53,47% et 67,21% respectivement pour les stades phénologiques végétatif, floraison et

fructification et d'autre part, par les sesquiterpènes hydrocarbonés avec des taux respectifs de 11,75%, 12,15% et 10,76% durant les stades végétatif, floraison et fructification. Les terpénoïdes oxygénés viennent en seconde position avec des proportions moins élevées durant le stade phénologique végétatif (7%), le stade floraison (11,03%) et le stade fructification (10,08%). Ils sont représentés par des taux variables en monoterpènes oxygénés durant les stades phénologiques; végétatif (3,09%), le stade floraison (1,29%) et le stade fructification (1,11%), et par les sesquiterpènes hydrocarbonés durant le stade végétatif (3,91%), le stade floraison (9,74%) et le stade fructification (8,97%). Suivi par les alcools, qui affichaient des taux de 2,80% durant le stade végétatif, 5,33% durant le stade floraison et 7,73% durant le stade fructification. Les aldéhydes enregistraient des taux respectifs de 0,93% en stade végétatif, de 1,72 % en stade floraison et 2,05 % en stade fructification. Les stades phénologiques; végétatif, floraison et fructification signalaient des taux respectifs en cétones de 0,88 %, de 1,48 % et de 1,60%. Les taux en hydrocarbures étaient de l'ordre de 0,24% durant le stade végétatif, de 5,82% durant le stade floraison et de 1,76% durant le stade fructification. Enfin, les esters montraient des taux de 1,33% durant le stade végétatif, de 1,11% durant le stade floraison et de 0,17% durant le stade fructification. Cependant, le reste de composés volatiles ne représentait que 1% de chaque stade phénologique.

3.3. Comportement saisonnier des activités antimicrobiennes des huiles essentielles de *Teucrium polium*

3.3.1. Détermination par méthode de diffusion

Le pouvoir inhibiteur des huiles essentielles des différents stades phénologiques de *Teucrium polium* sur un panel de dix microorganismes associée aux aptitudes des pathogènes a été estimé par la réaction des diamètres d'inhibition aux gradations des doses.

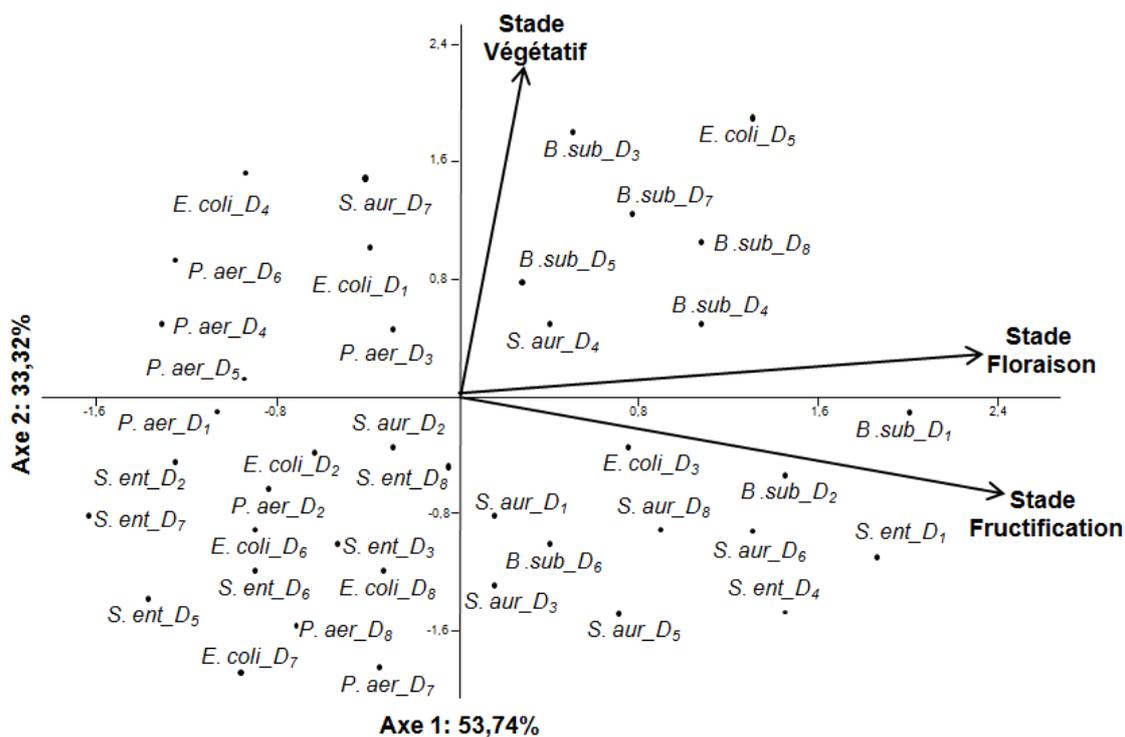


Figure 3.13: Analyse en Composantes Principales (A.C.P.) de l'activité antibactérienne des huiles essentielles sous l'effet des trois stades phénologiques (stade végétatif, floraison et fructification) de *Teucrium polium*: distribution des variables correspondant aux différentes souches bactériennes, aux différentes doses sur les deux principaux axes.

L'analyse multivariée des composantes principales (A.C.P.) peut fournir un aperçu important du facteur saisonnalité qui peut discriminer l'effet des composés bioactifs et la diversité phytochimique des huiles essentielles par rapport aux activités antimicrobiennes. Les résultats de l'activité antibactérienne des huiles essentielles des différents stades phénologiques ont été projetés sur les deux premiers axes de l'analyse multivariée ACP, en se basant sur la plus forte contribution des axes. Il en ressort que les huiles essentielles réagissent indépendamment du stade phénologique (de l'effet saisonnier) et que les bactéries à Gram positif semblent être les plus sensibles spécifiquement aux fortes concentrations (Tableau 3.4; Figure 3.13).

Tableau 3.4: Activité antibactérienne des huiles essentielles des trois stades phénologiques (stade végétatif, floraison et fructification) de *Teucrium polium* estimée par les diamètres des zones d'inhibition (incluant le diamètre de disque, 6mm) (moy ± SE).

Huiles essentielles (10µl/disc)			
Souches bactériennes testés	Dose	Diamètres des zones d'inhibition (mm)	
	(µg/ml)		
Bactéries à Gram négatif		HE'V	HE'FL HE'FR

<i>Escherichia coli</i>	Dose1	08,91±01,08	06,00±00,00	06,00±00,00
	Dose2	06,66±00,66	08,21±00,52	06,00±00,00
	Dose3	07,40±00,85	09,12±01,58	09,31±01,29
	Dose4	13,75±02,71	06,00±00,00	06,00±00,00
	Dose5	17,82±01,12	07,83±01,83	11,05±01,52
	Dose6	06,00±00,00	06,00±00,00	07,58±00,24
	Dose7	06,00±00,00	06,00±00,00	06,00±00,00
	Dose8	06,00±00,00	06,00±00,00	07,83±00,92
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Dose1	06,00±00,00	06,00±00,00	06,00±00,00
	Dose2	06,00±00,00	06,00±00,00	06,00±00,00
	Dose3	06,00±00,00	06,00±00,00	06,00±00,00
	Dose4	06,00±00,00	06,00±00,00	06,00±00,00
	Dose5	06,00±00,00	06,00±00,00	06,00±00,00
	Dose6	06,00±00,00	06,00±00,00	06,00±00,00
	Dose7	06,00±00,00	06,00±00,00	06,00±00,00
	Dose8	06,00±00,00	06,00±00,00	06,00±00,00
<i>Salmonella enterica</i>	Dose1	06,00±00,00	20,95±02,51	21,46±01,50
	Dose2	06,46±00,47	06,00±00,00	06,00±00,00
	Dose3	06,00±00,00	06,00±00,00	09,68±00,96
	Dose4	06,00±00,00	06,00±00,00	13,07±02,00
	Dose5	06,00±00,00	06,00±00,00	06,00±00,00
	Dose6	06,00±00,00	06,00±00,00	06,00±00,00
	Dose7	06,00±00,00	06,00±00,00	06,00±00,00
	Dose8	06,00±00,00	06,86±00,45	06,00±00,00
Bactéries à Gram positif				
<i>Bacillus subtilis</i>	Dose1	07,54±00,52	24,55±01,41	08,46±00,91
	Dose2	07,84±01,52	18,39±03,96	15,29±03,17
	Dose3	12,38±00,80	12,08±02,02	06,00±00,00
	Dose4	09,17±01,32	13,98±03,81	08,25±01,15
	Dose5	08,98±00,70	11,92±02,47	08,37±00,32
	Dose6	07,34±00,53	08,36±01,92	10,30±00,68
	Dose7	09,56±00,82	10,10±01,06	11,37±01,52
	Dose8	09,29±00,37	14,85±00,82	10,56±01,87
<i>Staphylococcus aureus</i>	Dose1	07,67±00,84	07,83±00,48	09,11±01,18
	Dose2	06,75±00,75	07,89±00,68	08,05±01,42
	Dose3	06,00±00,00	10,01±02,06	08,30±02,30

Dose4	08,79±00,50	09,56±02,16	11,13±00,22
Dose5	06,59±00,59	08,30±01,15	11,65±00,93
Dose6	06,57±00,57	08,63±00,29	08,90±01,53
Dose7	09,64±00,68	09,64±00,68	09,64±00,68
Dose8	07,55±00,78	09,18±01,92	11,75±00,20

Diamètres des zones d'inhibition incluant le diamètre de disque de 6mm. Les valeurs des zones d'inhibition ont été présentées par moyenne ± standard erreur de trois répétitions; (**HE'V**): huile essentielle du stade végétatif, (**HE'FL**): huile essentielle du stade floraison et (**HE'FR**): huile essentielle du stade fructification; le **DMSO** n'a pas dévoilé une activité antibactérienne comme control négatif; (*): zone d'inhibition < 6mm; absence d'activité antibactérienne (-), zone d'inhibition 6–7,5mm: présence d'activité antibactérienne (+), zone d'inhibition >7,5mm: activité antibactérienne élevée (++)

Les résultats de l'activité antibactérienne testée in vitro par la méthode de diffusion, ont montrés des écarts très divers concernant la croissance bactérienne. L'analyse de la variance appliquée aux stades phénologiques a montrée l'absence d'un effet significatif des différentes huiles essentielles sur l'activité inhibitrice (Tableau 3.4; Figure 3.14A). Tandis que les huiles essentielles ont montrées un effet inhibiteur très significatif sur la base de la gradation des doses testées. L'analyse de la variance conjuguée au test de Tukey a montré la suprématie de l'effet pathogène par les plus fortes concentrations (Dose1 au Dose5) par rapport aux plus faibles concentrations (Dose6 au Dose8) (Tableau 3.4; Figure 3.14B). Les mêmes résultats stipulaient une sensibilité très marquée des bactéries a Gram positif par rapport aux bactéries a Gram négatif (*). Ainsi *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* se montraient très affectées par les différentes huiles essentielles à forte concentration alors qu'*Escherichia coli* et *Salmonella enterica* présentaient une inhibition légèrement modérés (*). Cependant, la souche *Pseudomonas aeruginosa* présentait une résistance envers les huiles de *Teucrium polium* (*) (Tableau 3.4; Figure 3.14C).

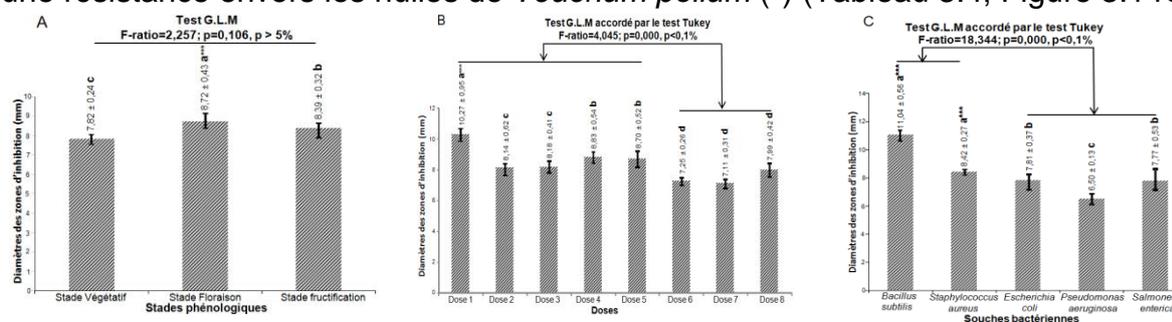


Figure 3.14: Effet des stades phénologiques, des doses et de souches testées sur l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium polium*;

***: effet significatif à $p < 0,1\%$; a, b, c, d: accordés par le test Tukey post-hoc-multi comparaison.

La figure 3.15 montre la carte statistique de l'activité antifongique des huiles essentielles de *Teucrium polium* suivant les stades phénologiques. La projection des variables a exprimé une forte contribution sur le premier axe de l'ACP. Par conséquent, il semble que les huiles essentielles exprimaient les mêmes pouvoirs inhibiteurs sans distinction des stades phénologiques et que les souches *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus brasiliensis* ont montré les sensibilités les plus importantes (Tableau 3.5; Figure 3.15).

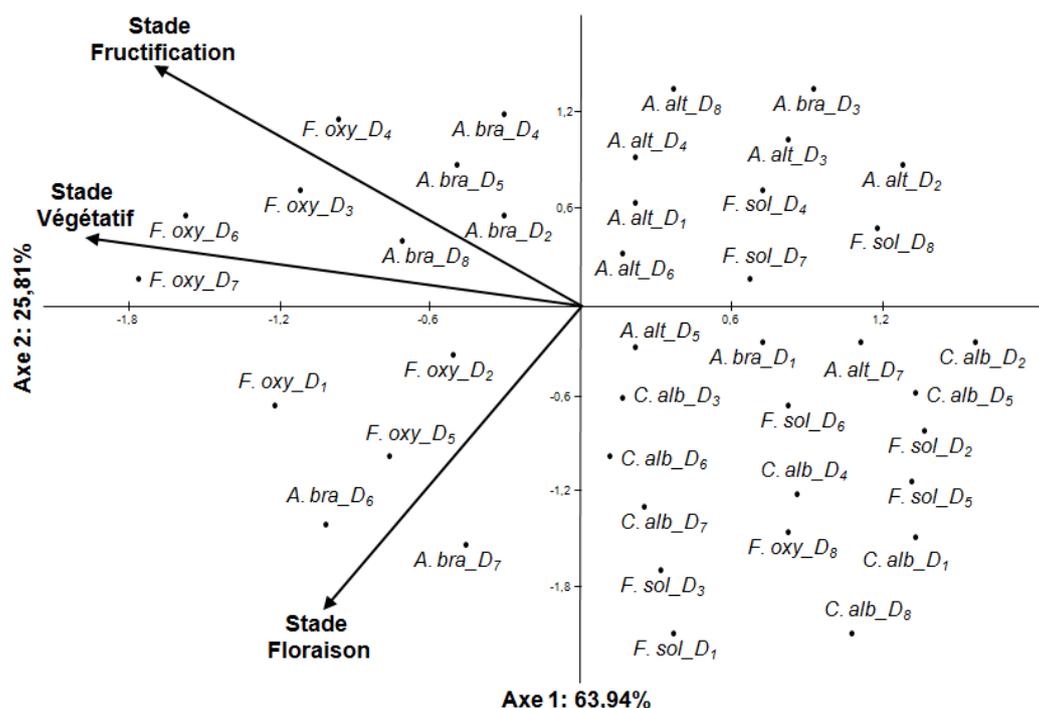


Figure 3.15: Analyse en Composantes Principales (A.C.P.) de l'activité antifongique des huiles essentielles des trois stades phénologiques (stade végétatif, floraison et fructification) de *Teucrium polium*:

distribution des variables correspondant aux différentes souches fongiques, aux différentes doses sur les deux principaux axes.

Les résultats de l'analyse de la variance du pouvoir antifongique des huiles essentielles de *Teucrium polium* vis à vis de la gamme testés montraient une activité hautement significative au profit des huiles du stade fructification par rapport aux huiles des autres stades phénologiques (Tableau 3.5; Figure 3.16A). L'effet concentration des huiles essentielles se montre très contraignant au développement mycélien, ainsi les fortes concentrations (Dose1 au Dose5) étaient les plus efficaces (Tableau 3.5; Figure 3.16B). En revanche, *Fusarium oxysporum* a été le plus sensible dont le développement des mycéliums a été significativement réduit par les huiles essentielles (*). Alors qu'*Aspergillus brasiliensis* présentait une sensibilité légèrement modéré suivi par *Alternaria alternata* qui a montré une faible sensibilité (*). Cependant, *Fusarium solani* et *Candida albicans* généraient une résistance marqués face aux différentes huiles (*) (Tableau 3.5; Figure 3.16C).

Tableau 3.5: Activité antifongique des huiles essentielles des trois stades phénologiques (stade végétatif, floraison et fructification) de *Teucrium polium* estimé par les diamètres des zones d'inhibition (incluant le diamètre de disque; 6mm) (moy ± SE).

Souches fongiques testées	Dose	Huiles essentielles (10µl/disc)
	(µg/ml)	Diamètres des zones d'inhibition (mm)

champignons		HE'V	HE'FL	HE'FR
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Dose1	06,00±00,00	06,00±00,00	06,00±00,00
	Dose2	07,99±00,35	08,21±00,52	09,95±00,64
	Dose3	06,00±00,00	09,12±01,58	09,88±00,59
	Dose4	06,00±00,00	06,00±00,00	10,41±00,34
	Dose5	06,00±00,00	07,83±01,83	10,34±00,41
	Dose6	06,00±00,00	14,42±00,47	06,00±00,00
	Dose7	06,00±00,00	13,38±00,92	06,00±00,00
	Dose8	06,00±00,00	08,31±00,98	11,35±01,66
<i>Fusarium oxysporum</i>	Dose1	11,72±00,67	10,45±01,86	10,89±01,12
	Dose2	11,41±00,22	09,97±00,52	10,47±00,83
	Dose3	16,53±02,27	08,89±00,73	11,88±00,46
	Dose4	14,75±01,07	08,89±01,48	10,55±00,50
	Dose5	06,00±00,00	08,58±00,66	08,77±00,21
	Dose6	14,79±01,59	10,73±00,65	13,05±01,20
	Dose7	10,17±00,48	09,27±00,25	12,57±01,93
	Dose8	06,00±00,00	07,85±00,62	06,00±00,00
<i>Fusarium solani</i>	Dose1	06,00±00,00	06,00±00,00	06,00±00,00
	Dose2	06,00±00,00	06,00±00,00	06,00±00,00
	Dose3	06,00±00,00	06,00±00,00	06,00±00,00
	Dose4	06,00±00,00	06,00±00,00	06,00±00,00
	Dose5	06,00±00,00	06,00±00,00	06,00±00,00
	Dose6	06,00±00,00	06,00±00,00	06,00±00,00
	Dose7	06,00±00,00	06,00±00,00	06,00±00,00
	Dose8	06,00±00,00	06,00±00,00	06,00±00,00
<i>Alternaria alternata</i>	Dose1	06,00±00,00	06,00±00,00	08,70±00,34
	Dose2	06,00±00,00	06,00±00,00	09,17±00,36
	Dose3	06,00±00,00	06,00±00,00	09,03±00,27
	Dose4	06,00±00,00	06,00±00,00	09,54±00,75
	Dose5	06,00±00,00	06,00±00,00	06,00±00,00
	Dose6	06,00±00,00	06,00±00,00	07,23±00,61
	Dose7	06,00±00,00	06,00±00,00	06,00±00,00
	Dose8	06,00±00,00	06,00±00,00	09,37±01,33
Levure				

<i>Candida albicans</i>	Dose1	06,00±00,00	07,17±01,17	06,00±00,00
	Dose2	06,00±00,00	06,00±00,00	06,00±00,00
	Dose3	06,00±00,00	06,17±00,17	06,00±00,00
	Dose4	06,00±00,00	06,96±00,96	06,00±00,00
	Dose5	06,00±00,00	06,00±00,00	06,00±00,00
	Dose6	06,00±00,00	06,00±00,00	06,00±00,00
	Dose7	06,00±00,00	06,00±00,00	06,00±00,00
	Dose8	06,00±00,00	06,00±00,00	06,00±00,00

Diamètres des zones d'inhibition incluant le diamètre de disque de 6mm, les valeurs des zones d'inhibition ont été présentés par moyenne ± standard erreur de trois répétitions; (**HE'V**): Stade Végétatif, (**HE'FL**): Stade Floraison et (**HE'FR**): Stade Fructification; le **DMSO** n'a pas dévoiler une activité antifongique comme control négatif; (*): Zone d'inhibition < 6mm: absence d'activité antifongique (-), zone d'inhibition 6–7,5mm: présence d'activité antifongique (+), zone d'inhibition >7,5mm: activité antifongique élevée (++)

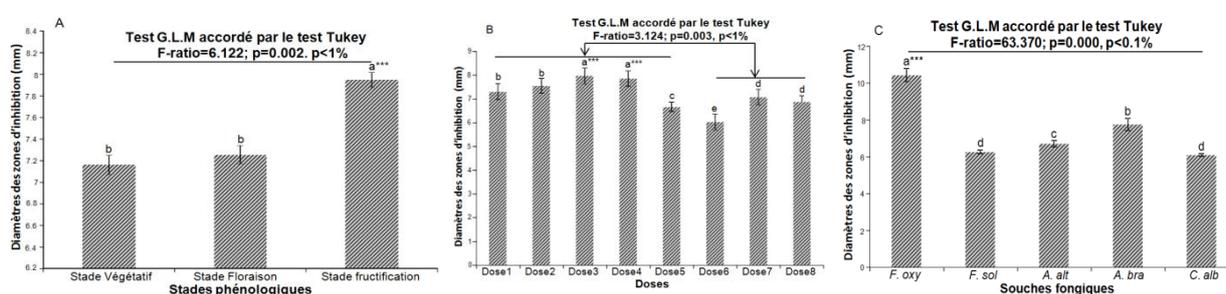


Figure 3.16: Effet des stades phénologiques, des doses et de souches testées sur l'activité antifongiques des huiles essentielles de *Teucrium polium*; ***: effet significatif à $p < 1\%$; a, b, c, d: accordés par le test Tukey post-hoc-multi comparaison.

3.3.2. Détermination par les paramètres CMI, CMM et par l'indice CMM/CMI

Les concentrations des huiles essentielles des différents stades phénologiques de *Teucrium polium* ont affichées des valeurs variables des CMI et des CMM par rapport aux bactéries testés, même pour celle qui a présenté une résistance par la méthode de diffusion. Ainsi, les différentes souches a Gram positif et négatif réagissaient d'une manière significative aux différentes doses, dont la bioactivité s'avérait aussi importante aux fortes et aux faibles concentrations. Les huiles essentielles des stades; végétatifs et fructification dévoilaient un fort potentiel bioactif à l'égard de l'ensemble souches bactériennes, alors que celle du stade floraison a exprimé des bioactivités variant du bonne au forte (Tableau 3.6).

Tableau 3.6: Concentration minimal inhibitrice (CMI) ($\mu\text{g/ml}$), concentration minimal microbicide (CMM) ($\mu\text{g/ml}$) et l'indice (CMM/CMI) des huiles essentielles de *Teucrium polium* durant les différents stades phénologiques.

	CMI			valeurs p	CMM			valeurs p	CMM/CMI		
	Stade Végétatif	Stade Floraison	Stade Fructification		Stade Végétatif	Stade Floraison	Stade Fructification		Stade Végétatif	Stade Floraison	Stade Fructification
Gram-positif											
<i>B. subtilis</i>	50 ^{***}	100 ^{***}	6.25 ^{*****}	<5%	50	200	12,5	<5%	1*	2*	2*
<i>S. aureus</i>	12,5 ^{*****}	12,5 ^{*****}	100 ^{***}	<8%	12,5	50	800	<5%	1*	4*	8

Gram-négatif											
<i>E. coli</i>	12,5 ^{****}	50 ^{***}	6,25 ^{****}	<5%	6,25	800	50	<5%	0,5*	16	8
<i>P. aeruginosa</i>	100 ^{***}	50 ^{***}	25 ^{****}	<5%	800	400	200	<5%	8**	8**	8**
<i>S. enterica</i>	6,25 ^{****}	12,5 ^{****}	12,5 ^{****}	<8%	12,5	50	200	<5%	2*	4*	16

Du test Kruskal-wallis, les astérisques indiquent les différences significatives entre les huiles essentielles des différents stades phénologiques

Les valeurs écrites en gras sont considérées bactéricides ($\leq 4 \mu\text{g/ml}$)

B. subtilis: *Bacillus subtilis*; **S. aureus:** *Staphylococcus aureus*; **E. coli:** *Escherichia coli*; **P. aeruginosa:** *Pseudomonas aeruginosa*; **S. enterica:** *Salmonella enterica*

(DMSO) dimethylsulfoxyde: n'a pas montré d'effet antimicrobien sur les souches testées

Les HE's sont accommodées à avoir: une bonne bioactivité (⁺⁺⁺), une forte bioactivité (^{****}) et une très forte bioactivité (^{*****}).

La potentialité des valeurs des CMI des souches fongiques, estimait que seulement trois souches sur la totalité testée ont exprimées des sensibilités significatives face aux huiles essentielles de *Teucrium polium*, récoltés durant les trois stades phénologiques. Les huiles essentielles des trois stades exerceraient une forte bioactivité sur *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* et *Aspergillus brasiliensis* pendant le stade floraison, l'huile du stade végétatif présentait des bioactivités allant du modérément au très forte bioactivité, tandis que celle du stade fructification montrait des bioactivités allant du bioactivité modérée au bonne bioactivité. *Candida albicans* et *Alternaria alternata* présentaient une résistance face à toutes les huiles essentielles de *Teucrium polium* (Tableau 3.7).

Tableau 3.7: Effet saisonnier sur la concentration minimal inhibitrice (CMI) ($\mu\text{g/ml}$), la concentration minimal microbicide (CMM) ($\mu\text{g/ml}$) et l'indice (CMM/CMI) des huiles essentielles de *Teucrium polium*.

	CMI				CMM				CMM/CMI		
	Stade Végétatif	Stade Floraison	Stade Fructification	valeurs p	Stade Végétatif	Stade Floraison	Stade Fructification	valeurs p	Stade Végétatif	Stade Floraison	Stade Fructification
Champignons											
<i>F. oxysporum</i>	12,5 ^{****}	25 ^{****}	100 ^{***}	<5%	12,5	50	400	<5%	1*	2*	4*
<i>A. brasiliensis</i>	200 ^{**}	12,5 ^{****}	50 ^{***}	<5%	400	25	100	<5%	2*	2*	2*
<i>F. solani</i>	6,25 ^{****}	12,5 ^{****}	200 ^{**}	<5%	50	200	800	<5%	8**	16**	4*
<i>A. alternata</i>	R	R	R	-	R	R	R	-	R	R	R
Levure											
<i>C. albicans</i>	R	R	R	-	R	R	R	-	R	R	R

Du test Kruskal-wallis, les astérisques indiquent les différences significatives entre les huiles essentielles des différents stades phénologiques

Les valeurs écrites en gras sont considérées fongicides ($\leq 4 \mu\text{g/ml}$)

F. oxysporum: *Fusarium oxysporum*; **A. brasiliensis:** *Aspergillus brasiliensis*; **F. solani:** *Fusarium solani*; **A. alternata:**

Alternaria alternata; **C. albicans:** *Candida albicans*

R: résistance

(DMSO) dimethylsulfoxyde: n'a pas montré d'effet antimicrobien sur les souches testées

Les HE's sont accommodées à avoir: une bioactivité modérée (⁺⁺), une bonne bioactivité (⁺⁺⁺), une forte bioactivité (^{****}) et une très forte bioactivité (^{*****})

L'indice de CMI a été adopté pour déterminer l'effet des huiles essentielles sur les microorganismes testés.

L'huile essentielle est considérée:

Bactéricide lorsque: CMB / CMI ≤ 4 ;

Fongicide lorsque: CMF / CMI ≤ 4 ;

Bactériostatique lorsque: CMB / CMI ≥ 4 ;

Fongistatique lorsque: CMF / CMI ≥ 4 .

Les huiles essentielles des différents stades phénologiques exerçaient une certaine variabilité d'effet antimicrobicide selon la susceptibilité microbienne (Tableau 3.6 et 3.7). Les mêmes tableaux ont montrés que les huiles essentielles des stades végétatif et floraison présentaient des effets bactéricides sur les Gram positif alors que les huiles essentielles des stades floraison et fructification affichaient des effets bactériostatiques, mise à part des souches fongiques qui ont présentait des résistances face aux huiles essentielles des différents stades phénologiques en l'occurrence *Candida albicans* et *Alternaria alternata*, les indices de CMI ont signalés chez *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus brasiliensis* leurs effets fongicides. En revanche, les huiles essentielles des trois stades phénologiques ont exprimées un effet fongistatique à l'égard de *Fusarium solani*.

4. Contribution à la caractérisation des huiles essentielles de la Fabacée *Cytisus triflorus* L'Her de la Mitidja et au comportement saisonnier de leur rendement, de leur composition chimique et de leur activité antimicrobienne

4.1. Optimisation et comportement saisonnier du rendement en huiles essentielles de *Cytisus triflorus* L'Her

Selon les résultats présentés sur la Figure 3.17, l'indice saisonnier de *Cytisus triflorus* L'Her a eu des impacts significatifs ($p < 0,01$) sur le rendement en huiles essentielles. Ces impacts ont été dévoilé par le plus grand rendement exprimé au stade floraison, suivi par les stades fructification et végétatif.

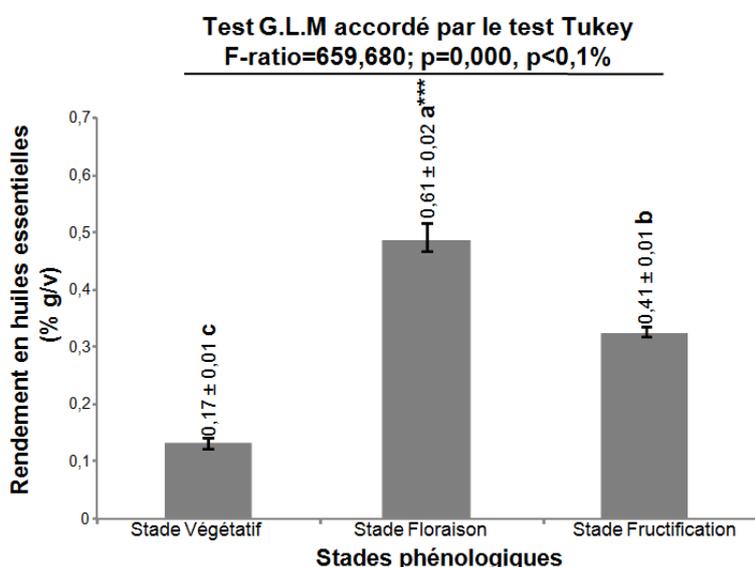


Figure 3.17: Effet saisonnier sur le rendement des huiles essentielles (%) des parties aériennes de *Cytisus triflorus* L'Her;

***: suivis par les différentes lettres (a, b et c) sont significativement différent à $p < 0,1\%$ accordés par le test de Tukey post-hoc-multi-comparaison.

Afin de mettre en évidence l'influence des conditions climatiques sur l'expression en métabolites secondaires des parties aériennes de *Cytisus triflorus* L'Her. Nous énonçons les données climatiques durant la période entre 1995 et 2015 [186]. Le stade floraison synchronisé avec des températures moyennes comprises entre 16,2 et 19,1°C en mois d'Avril et Mai, bien qu'une période hivernale dépeignée par des températures variaient du 11,5-13,6°C caractérise le stade végétatif. Le stade fructification coïncidés avec une période estivale précocement installait couvrait les mois; juin, juillet et août avec des températures moyennes oscillant entre 22,6 et 26,5°C (Figure 3.18).

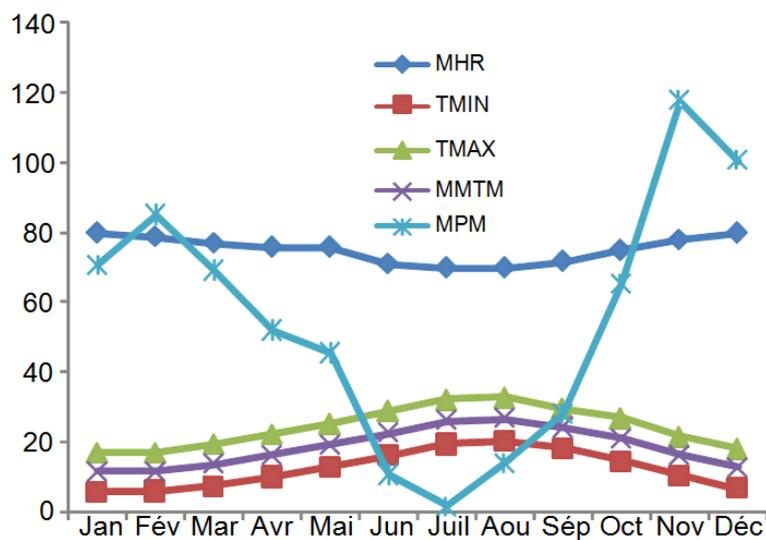


Figure 3.18: Conditions climatiques dans la région d'étude (la Mitidja -monts de l'Atlas Blidéen) durant la période 1995-2015

MMTM; la moyenne des températures moyennes en C°. TMIN; moyenne des températures minimales en C°. TMAX; moyenne des températures maximales en C°. MPM; moyenne des précipitations mensuelles en mm. MHR ; moyenne du taux d'humidité relative en %.

4.2. Comportement saisonnier de la composition chimique des huiles essentielles de *Cytisus triflorus* L'Her

Les résultats qualitatifs et quantitatifs de trois échantillons d'huiles essentielles de *Cytisus triflorus* L'Her collectées durant les trois stades phénologiques (végétatif, floraison et fructification) sont présentés dans le Tableau 3.8. 40 composés ont été déterminés et identifiés dont environ 93,21% sont représentées dans l'huile obtenue au stade végétatif, 94,96% au stade floraison et 95,77% au stade fructification. Il a été constaté que les huiles essentielles contiennent un mélange complexe constitué principalement en monoterpènes oxygénés (56,27 à 61,04%) et en monoterpènes hydrocarbonés (12,95 à 26,20%). Des aldéhydes (5,83 à 11,17%) et des hydrocarbures (4,83 à 7,30%). Il est possible de noter la prédominance des monoterpènes oxygénés. Les principaux composés d'huiles essentielles rencontrés dans toutes les huiles analysées au sein des trois stades phénologiques étaient le β -linalool (28,28 à 38,04%), le Géraniol (19,82 à 27,73%), l' α -Terpinène (1,27 à 4,86%), le Rétinal (4,33 à 9,26%) et l'Eugénol (2,07 à 2,28%).

Tableau 3.8: Comportement saisonnier de la composition volatile concédée chez les huiles essentielles des parties aérienne de *Cytisus triflorus* L'Her.

Composés volatiles identifiés	IR	Concentration approximative (l'air de pic %)		
		st'V	st'FL	st'FR
Monoterpènes oxygenés	-			
β-linalool	1082	38,04	28,28	37,91
Eucalyptol	1059	00,33	00,26	00,09
Géranol	1252	22,67	27,73	19,82
Monoterpènes hydrocarbonés	-			
τ -Terpinène	998	03,53	04,86	01,27
o-Cymène	1128	00,30	00,84	00,13
sesquiterpènes oxygenés	-			
Isolongifolene epoxide	1305	00,29	00,50	00,76
Aldéhydes	-			
Nonanal	1104	00,20	00,26	00,18
Benzaldéhyde	982	00,12	00,13	00,05
Undecanal	1303	00,08	00,94	00,66
Rétinal	2184	04,33	05,30	09,26
p-Menth-1-en-9-al	1217	01,10	01,20	01,02
Estérs	-			
4-Methyl-2-pentyl acetate	856	00,32	00,52	00,17
Benzyl Benzoate	1738	00,60	00,55	00,84
Oleic acid, methyl ester	2080	00,07	00,84	00,32
Alcools	-			
E-9-tetradecenol	1664	00,28	00,49	00,03
1-Hexanol	860	00,10	00,60	00,02
4-Terpineol	1160	00,46	00,87	ND
Z-9-hexadecen-1-ol	1863	00,07	01,20	01,60
1-Octen-3-ol	979	01,69	01,24	01,09
Oleyl Alcohol	2061	01,41	02,30	02,94
Rétinol	2453	00,84	00,07	00,12
Cétones	-			
p-Benzoquinone, 2,6-di-tert-butyl-	1462	01,00	01,01	01,58
2-Heptanone	853	00,73	00,17	00,20
Hydrocarbons	-			
p-Mentha-1,4(8)-diene	1083	04,08	02,09	02,86
Heneicosane	2109	00,07	01,12	00,02
Heptadecane	1700	00,50	00,23	00,13
Hexacosane	26000	01,02	01,03	01,44
Octacosane	2804	01,62	00,31	01,39
Styrène	883	00,01	00,05	00,31
Acides gras	-			
Acide myristique	1754	01,00	00,53	02,10
Acid hexadecanoïque	1973	00,82	01,35	02,75
Acid ricinoléique	1991	01,15	01,42	00,27
Acid nonanoïque	1277	00,48	00,40	00,36
Composés phénoliques	-			
Crésol	1014	00,10	00,04	ND
Carvacrol	1304	00,50	03,15	00,88
Thymol	1283	ND	00,19	ND
Eugénol	1364	02,28	02,09	02,07
Acide gibbérellique	A	01,02	00,80	00,83
Total des substances identifiées (%)		93,21	94,96	95,77
Monoterpènes oxygenés		59,66	56,27	57,82
Monoterpènes hydrocarbonés		15,73	26,20	12,95
Sesquiterpènes oxygenés		00,29	00,50	00,76
Composés phénoliques		03,90	06,27	03,78
Acides gras		03,45	03,70	05,48
Aldéhydes		07,21	07,83	11,17
Estérs		00,99	01,91	01,33
Alcools		04,85	06,77	06,10
Cétone		01,73	01,18	01,78
Hydrocarbons		07,30	04,83	06,15

IR: l'indice de rétention

Méthode d'identification: par comparaison des IRs avec ceux cités dans les librairies, rapportés dans la littérature, par SM, par comparaison des spectres de masses avec les spectres de masse de la librairie **NIST02**

ND: Composés non détectés

(st'V): l'huile essentielle du stade végétatif, **(st'FL):** l'huile essentielle du stade floraison et **(st'FR):** l'huile essentielle du stade fructification

Pour ordonner les différents composés volatiles selon leur réponse à l'indice saisonnier de *Cytisus triflorus* L'Her, une analyse typologique (analyse hiérarchique) selon la méthode de Ward a été conduite au moyen du logiciel Past 3.1. L'analyse a été effectuée sur l'ensemble des valeurs standardisées des taux des composés chimiques des huiles essentielles (Figure 3.19). De cette dernière, il en ressort qu'à une similarité de -6,4, la CHA a montré deux clusters. Le cluster I, désigne une hétérogénéité entre les composés volatiles du stade floraison et celles des stades végétatif et fructification. Alors que le cluster II, désigne une cohérence entre la composition chimique des huiles essentielles des stades; végétatif et fructification. En revanche, le cluster II a été caractérisé par la présence de similitude en terme de certains composés volatiles; le β -linalool et de géraniol a titre d'exemple, tandis que le cluster I se caractérise par une divergence qualitative et quantitative du cluster II en terme de composés volatiles.

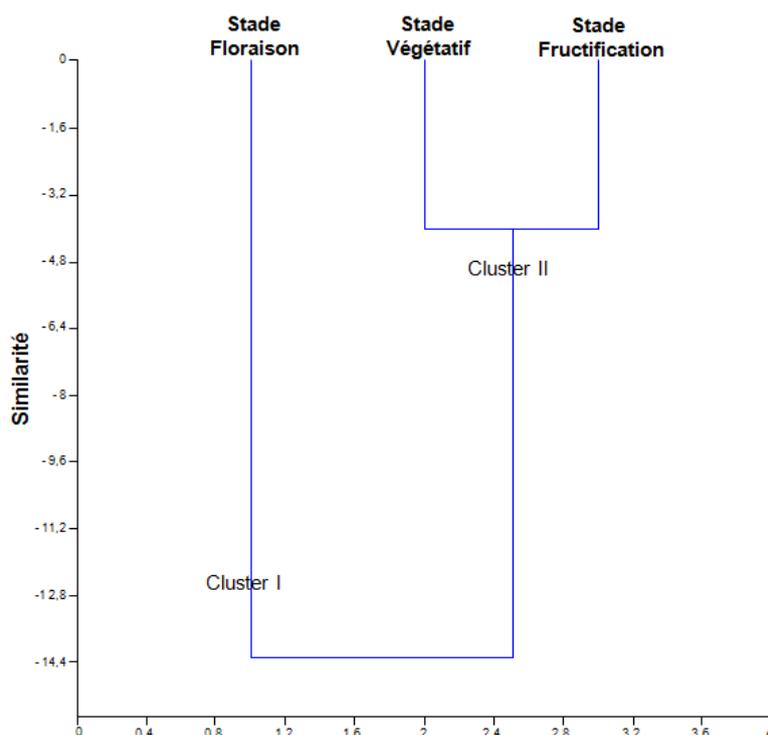


Figure 3.19: Analyse en composantes hiérarchiques (A.C.H.) du comportement saisonnier de la composition chimique des huiles essentielles de *Cytisus triflorus* L'Her.

4.3. Comportement saisonnier des activités antimicrobiennes des huiles essentielles de *Cytisus triflorus* L'Her

4.3.1. Détermination par méthode de diffusion

Les mesures des diamètres des zones d'inhibition engendrées par les différentes doses des huiles essentielles de *Cytisus triflorus* L'Her des différents stades phénologiques effectué sur les dix microorganismes pathogènes testées sont exposées dans le tableau 3.9.

Tableau 3.9: Activité antibactérienne des huiles essentielles des trois stades phénologiques (stade végétatif, floraison et fructification) de *Cytisus triflorus* L'Her estimé par les diamètres des zones d'inhibition (incluant le diamètre de disque; 6mm) (moy ± SE).

Souches bactériennes testées	Dose (µg/ml)	Huiles essentielles (10µl/disc)		
		Diamètres des zones d'inhibition (mm)		
Bactéries à Gram négatif		HE'V	HE'FL	HE'FR
<i>Escherichia coli</i>	Dose1	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose2	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose3	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose4	06,00±0,00	07,13±0,06	07,01±0,01
	Dose5	06,00±0,00	10,14±0,01	08,05±0,02
	Dose6	06,00±0,00	10,19±0,01	07,98±0,02
	Dose7	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose8	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Dose1	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose2	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose3	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose4	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose5	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose6	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose7	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose8	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
<i>Salmonella enterica</i>	Dose1	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose2	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose3	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose4	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose5	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose6	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose7	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose8	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
Bactéries à Gram positif				
<i>Bacillus subtilis</i>	Dose1	07,01±0,01	06,00±0,00	06,94±0,04
	Dose2	06,00±0,00	06,00±0,00	15,29±3,17
	Dose3	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose4	06,00±0,00	06,00±0,00	08,25±1,15
	Dose5	06,00±0,00	06,00±0,00	08,37±0,32
	Dose6	06,00±0,00	06,00±0,00	10,30±0,68
	Dose7	06,00±0,00	06,00±0,00	11,37±1,52
	Dose8	06,00±0,00	06,00±0,00	10,56±1,87
<i>Staphylococcus aureus</i>	Dose1	11,35±0,04	18,49±0,03	11,13±0,02
	Dose2	12,54±0,03	18,89±0,01	12,07±0,03
	Dose3	13,03±0,05	19,16±0,01	12,99±0,01
	Dose4	07,84±0,04	07,71±0,17	07,24±0,04
	Dose5	07,41±0,01	07,37±0,02	07,01±0,01
	Dose6	07,20±0,01	07,11±0,01	06,35±0,01
	Dose7	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose8	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00

Diamètres des zones d'inhibition incluant le diamètre de disque de 6mm, les valeurs des zones d'inhibition ont été présentés par moyenne ± standard erreur de trois répétitions; (HE'V): Stade Végétatif, (HE'FL): Stade Floraison et (HE'FR): Stade Fructification; le DMSO n'a pas dévoiler une activité antibactérienne comme control négatif; (*): Zone d'inhibition < 6mm: absence d'activité antibactérienne (-), zone d'inhibition 6–7,5mm: présence d'activité antibactérienne (+), zone d'inhibition >7,5mm: activité antibactérienne élevée (++)

Les résultats de l'activité antibactérienne in vitro par la méthode de diffusion ont montrés divers écarts concernant les résistances bactériennes. L'analyse de la variance appliquée aux stades phénologiques a montrée l'existence d'un effet inhibiteur significatif des différentes huiles essentielles spécifiquement celles du

stade floraison (Tableau 3.9; Figure 3.20A). De même, l'analyse de la variance appliquée aux différentes doses testées montrait un effet inhibiteur significatif des fortes doses (Dose1 au Dose 3) par rapport aux plus faibles (Dose 4 au Dose 8). Le test de Tukey soutenait nos conclusions (Tableau 3.9; Figure 3.20B). Les mêmes résultats relataient une sensibilité très marquée de la Gram positif *Staphylococcus aureus* par rapport aux restes des souches face aux différentes huiles essentielles de *Cytisus triflorus* L'Her (*), ainsi la Gram négatif *Escherichia coli* présentait une inhibition légèrement modérés (*) suivi par *Bacillus subtilis*. Cependant, les souches *Salmonella enterica* et *Pseudomonas aeruginosa* présentaient des résistances envers les huiles essentielles de *Cytisus triflorus* L'Her (*) (Tableau 3.9; Figure 3.20C).

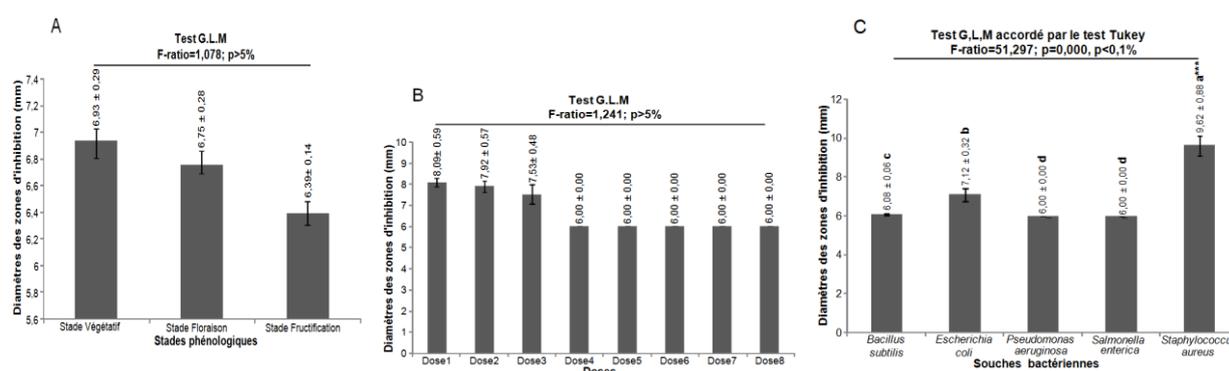


Figure 3.20: Effet des stades phénologiques, des doses et des souches sur l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Cytisus triflorus* L'Her;

***: effet significatif à $p < 8\%$; a, b, c, d: accordés par le test Tukey post-hoc-multi comparaison.

L'analyse en composantes principales appliquée aux valeurs des zones d'inhibition développées par les souches fongiques testées face aux huiles essentielles des différents stades phénologiques de *Cytisus triflorus* L'Her, est satisfaisante dans la mesure où plus de 97% de la variance est exprimé sur les deux premiers axes. La projection des vecteurs relatifs aux différentes huiles essentielles de *Cytisus triflorus* L'Her récoltés durant les trois stades phénologiques à travers les deux axes, montre une certaine disparité de l'effet phénologique face à l'activité antifongique, bien que l'ensemble des trois fortes doses soient les plus efficaces (Dose 1 au Dose 3) envers les souches les plus touchés; *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* et *Candida albicans* (Tableau 3.10; Figure 3.21).

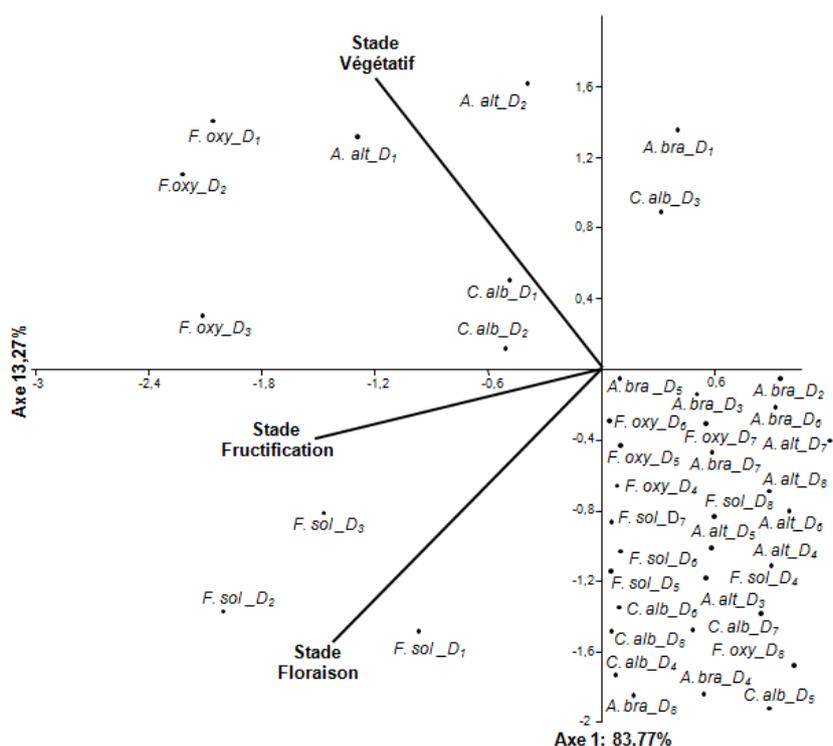


Figure 3.21: Analyse en Composantes Principales (A.C.P.) de l'activité antifongique des huiles essentielles des trois stades phénologiques (Stade végétatif, floraison et fructification) de *Cytisus triflorus* L'Her:

distribution des variables correspondant aux différentes souches fongiques et aux différentes doses sur les deux principaux axes.

Les résultats de l'analyse de la variance des huiles essentielles de *Cytisus triflorus* L'Her exprimaient une absence absolue de l'impact des stades phénologiques, des doses testées et de type des souches sur le pouvoir antifongique apprécié par la méthode de diffusion (Tableau 3.11; Figure 3.22A, B et C).

Tableau 3.10: Activité antifongique des huiles essentielles des trois stades phénologiques (stade Végétatif, floraison et fructification) de *Cytisus triflorus* L'Her estimée par les diamètres des zones d'inhibition (incluant le diamètre de disque, 6mm) (moy ± SE).

Souches fongiques testés	Dose (µg/ml)	Huiles essentielles (10µl/disc)		
		Diamètres des zones d'inhibition (mm)		
champignons		HE'V	HE'FL	HE'FR
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Dose1	07,42±0,01	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose2	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose3	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose4	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose5	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose6	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose7	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose8	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
<i>Fusarium oxysporum</i>	Dose1	10,73±0,05	07,12±0,01	06,00±0,00
	Dose2	10,02±0,03	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose3	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose4	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose5	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose6	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose7	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose8	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00

<i>Fusarium solani</i>	Dose1	07,11±0,01	12,12±0,01	07,27±0,02
	Dose2	06,00±0,00	12,62±0,02	06,00±0,00
	Dose3	06,00±0,00	10,80±0,01	06,00±0,00
	Dose4	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose5	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose6	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose7	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose8	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
<i>Alternaria alternata</i>	Dose1	13,01±0,01	09,87±0,02	08,62±0,01
	Dose2	12,10±0,01	08,97±0,01	08,72±0,01
	Dose3	10,66±0,14	09,66±0,01	08,19±0,01
	Dose4	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose5	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose6	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose7	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose8	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
Levure				
<i>Candida albicans</i>	Dose1	07,03±0,03	06,00±0,00	06,68±0,01
	Dose2	06,00±0,00	06,00±0,00	06,48±0,01
	Dose3	06,00±0,00	06,00±0,00	06,25±0,02
	Dose4	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose5	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose6	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose7	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00
	Dose8	06,00±0,00	06,00±0,00	06,00±0,00

Diamètres des zones d'inhibition incluant le diamètre de disque de 6mm, les valeurs des zones d'inhibition ont été présentées par moyenne \pm standard erreur de trois répétitions; (**HE'V**): Stade Végétatif, (**HE'FL**): Stade Floraison et (**HE'FR**): Stade Fructification; le **DMSO** n'a pas dévoilé une activité antifongique comme control négatif; (*): Zone d'inhibition < 6mm: absence d'activité antifongique (-), zone d'inhibition 6–7,5mm: présence d'activité antifongique (+), zone d'inhibition >7,5mm: activité antifongique élevée (++)

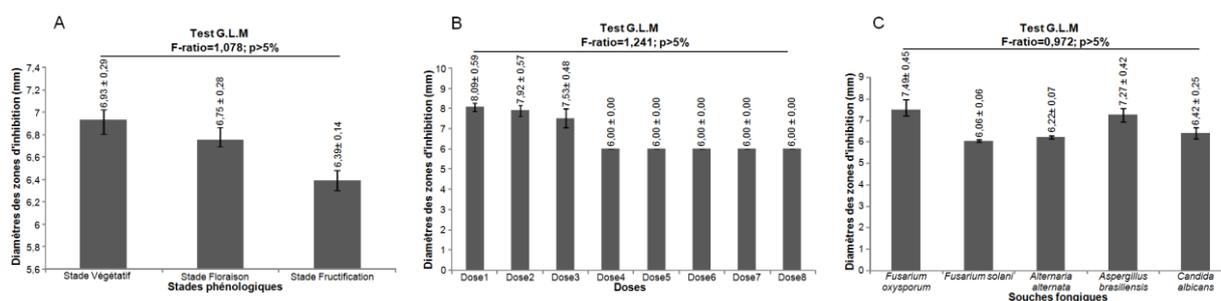


Figure 3.22: Absence des effets significatifs des stades phénologiques, des doses et des souches sur l'activité antifongique des huiles essentielles de *Cytisus triflorus* L'Her.

4.3.2. Détermination par les paramètres CMI, CMM et par l'indice CMM/CMI

Les résultats des bioessais de l'activité antimicrobienne ont montré que les huiles essentielles de *Cytisus triflorus* L'Her ont exercés une action significativement prometteuse à l'égard: (i) des bactéries à Gram positif (*Bacillus subtilis* suivie par *Staphylococcus aureus*), (ii) de la bactérie à Gram négatif *Escherichia coli*, (iii) et des champignons *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* et *Alternaria alternata* et même contre la levure *Candida albicans*. Cependant, ces huiles semblaient être inactifs à effet non significatif contre les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella enterica* et même face aux champignons *Aspergillus brasiliensis*. En revanche, l'indice phénologique a montré une action significative sur l'activité antimicrobienne dévoilait par les deux paramètres (CMI et CMM) (Tableaux 3.12 et 3.13), l'HE du stade végétatif annonçait l'activité la plus importante, suivie par les huiles essentielles des stades floraison et fructification.

Tableau 3.11: Effet saisonnier sur la concentration minimal inhibitrice (CMI) ($\mu\text{g/ml}$), sur la concentration minimal microbicide (CMM) ($\mu\text{g/ml}$) et sur l'indice (CMM/CMI) des huiles essentielles de *Cytisus triflorus* L'Her.

	CMI				CMM				CMM/CMI		
	Stade Végétatif	Stade Floraison	Stade Fructification	valeurs p	Stade Végétatif	Stade Floraison	Stade Fructification	valeurs p	Stade Végétatif	Stade Floraison	Stade Fructification
Bactéries à Gram positif											
<i>B. subtilis</i>	25 ⁺⁺⁺⁺	100 ⁺⁺⁺	50 ⁺⁺⁺⁺	<5%	50	800	400	<5%	2*	8	8
<i>S. aureus</i>	6,25 ⁺⁺⁺⁺	50 ⁺⁺⁺⁺	100 ⁺⁺⁺	<5%	6,25	50	200	<5%	1*	1*	2*
Gram-négatif											
<i>E. coli</i>	400 ⁺	800 ⁺	800 ⁺	<5%	100	200	100	<8%	<0,5**	<0,5**	<0,5**
<i>P. aeruginosa</i>	NP	NP	NP	-	NP	NP	NP	-	NP	NP	NP
<i>S. enterica</i>	NP	NP	NP	-	NP	NP	NP	-	NP	NP	NP

Du test Kruskal-wallis, du test Wilcoxon et du test Monte Carlo, les astérisques indiquent les différences significatives entre les huiles essentielles des différents stades phénologiques

Les valeurs écrites en gras sont considérées bactéricides ($\leq 4 \mu\text{g/ml}$)

B. subtilis: *Bacillus subtilis*; *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*; *E. coli*: *Escherichia coli*; *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*; *S. enterica*: *Salmonella enterica*
(NP): Non Performer

(DMSO) dimethylsulfoxyde: n'a pas montré d'effet antimicrobien sur les souches testées

Les HE's sont accommodées à avoir: une faible bioactivité (⁺), une bioactivité modérée (⁺⁺), une bonne bioactivité (⁺⁺⁺), une forte bioactivité (⁺⁺⁺⁺) et une très forte bioactivité (⁺⁺⁺⁺⁺)

La potentialité des HE's exprimés en valeurs des CMI et des CMM estimaient que seulement trois souches sur la totalité testés ont exprimées des sensibilités significatives face aux HE's de *Cytisus triflorus* L'Her récoltés durant les trois stades phénologiques, cependant celles des souches fongiques présentaient quatre microorganismes pathogènes qui révélées des sensibilités face a ces dernières.

Les données présentées dans ce travail sont pertinentes, innovantes et prometteuses par rapport aux huiles essentielles en particulier contre les champignons. Toutefois, la sensibilité microbienne s'avérait aussi importante face aux différentes doses. Les stades phénologiques présentaient un effet significatif sur la sensibilité des microorganismes testés aux différentes huiles essentielles de *Cytisus triflorus* L'Her. Les mêmes tableaux affichaient que les bactéries; *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, les deux *Fusarium oxysporum* et *solani* annonçaient un effet microbicide pendant les trois stades cruciales. Tandis que cet effet microbicide a été notamment dévoilé par l'huile du stade végétatif face à *Bacillus subtilis*. Pareillement par celles des stades végétatif et floraison contre l'*Alternaria alternata* et par celles des stades végétatif et fructification vise à vis la levure *Candida albicans*. Toutefois, les bioactivités présentaient par les HE's de *Cytisus triflorus* L'Her pour *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*, variaient entre une bioactivité modéré à une très forte pour celles du stade végétatif, celles des stades floraison et fructification se caractérisaient à avoir une très faible bioactivité qui va jusqu'à une forte bioactivité. Subséquemment, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata* et *Candida albicans* annonçaient une bioactivité modéré à forte pour les HE's du stade végétatif, tandis que la bioactivité allait d'une faible bioactivité à une bonne bioactivité pour les HE's du stade floraison, et enfin la cinétique de la bioactivité allait d'une bioactivité modéré jusqu'au forte bioactivité pour celles du stade fructification (Tableaux 3.12 et 3.13).

Tableau 3.12: Effet saisonnier sur la concentration minimal inhibitrice (CMI) ($\mu\text{g/ml}$), sur la concentration minimal microbicide (CMM) ($\mu\text{g/ml}$) et sur l'indice (CMM/CMI) des huiles essentielles de *Cytisus triflorus* L'Her.

	CMI			valeurs p-	CMM			valeurs p	CMM/CMI		
	Stade Végétatif	Stade Floraison	Stade Fructification		Stade Végétatif	Stade Floraison	Stade Fructification		Stade Végétatif	Stade Floraison	Stade Fructification
Champignons											
<i>F. oxysporum</i>	25 ⁺⁺⁺⁺	100 ⁺⁺⁺	50 ⁺⁺⁺	<5%	6,25	100	25	<5%	<0,5*	1*	0,5*
<i>A. brasiliensis</i>	NP	NP	NP	-	NP	NP	NP	-	NP	NP	NP
<i>F. solani</i>	200 ^{**}	800 [*]	400 ^{**}	<5%	400	200	100	<5%	2*	<0,5*	<0,5*
<i>A. alternata</i>	12,5 ⁺⁺⁺⁺	400 ^{**}	100 ⁺⁺⁺	<5%	12,5	50	800	<8%	1*	<0,5*	8
Levures											
<i>C. albicans</i>	400 ^{**}	100 ⁺⁺⁺	200 ^{**}	<5%	400	800	800	<5%	1*	8	4*

Du test Kruskal-wallis, du test Wilcoxon et du test Monte Carlo, les astérisques indiquent les différences significatives entre les huiles essentielles des différents stades phénologiques

Les valeurs écrites en gras sont considérés fongicides ($\leq 4 \mu\text{g/ml}$)

F. oxysporum: *Fusarium oxysporum*; **A. brasiliensis**: *Aspergillus brasiliensis*; **F. solani**: *Fusarium solani*; **A. alternata**:

Alternaria alternata; **C. albicans**: *Candida albicans*

(NP): Non Performer

(DMSO) dimethylsulfoxyde: n'a pas montré d'effet antimicrobien sur les souches testées

Les HE's sont accommodées a avoir: une faible bioactivité (⁺), une bioactivité modérée (⁺⁺), une bonne bioactivité (⁺⁺⁺), une forte bioactivité (⁺⁺⁺⁺) et une très forte bioactivité (⁺⁺⁺⁺⁺)

Les données de l'activité antimicrobienne des huiles de *Cytisus triflorus* L'Her énumérées dans les tableaux 3.12 et 3.13, ont été soumises à une analyse hiérarchique (A.C.H.) afin d'avoir une conception de l'influence de l'indice phénologique sur les deux paramètres CMI et CMM illustrant l'activité antimicrobienne. L'analyse a permis l'installation de deux clusters principaux pour chaque paramètre (Figure 3. 23). Par conséquent la figure 3. 23A exposait le paramètre CMI et présentait 2 clusters. Le cluster I, se caractérise par une similarité d'effet entre les huiles essentielles des deux stades végétatif et fructification, qui peut être revendiqué par les taux proximaux de certains composés majoritaires (le β -linalool et le Géraniol) ce qui conduisait a des activités semblables. La même figure annonçait une divergence du cluster I par rapport au cluster II, dont le potentiel de l'huile essentielle du stade floraison montrait une activité moins importante, ce qui est probablement lié aux écarts des taux de composés volatiles de stade floraison par comparaison aux deux autres stades. Contrairement, le paramètre MMC dans la figure 3. 23B, révélait la présence de deux clusters. Le cluster I, renferme les huiles essentielles des stades floraison et fructification exhibant des similitudes en termes d'effets par rapport au cluster II, qui est représenté par l'huile du stade végétative, ce qui est vraisemblablement due aux taux rapprochées pour certains composés antimicrobiens (l'acide hexadecanoïque et l'Eugénol).

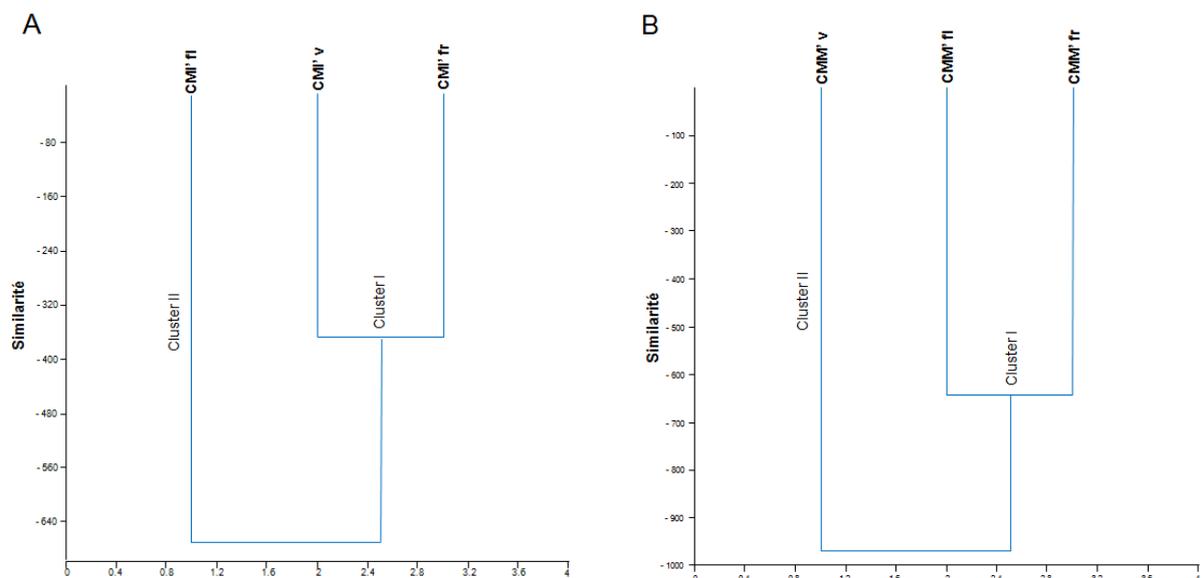


Figure 3.23: Analyse en composantes hiérarchiques (A.C.H.) de l'effet saisonnier sur l'activité antimicrobienne (A: présenté par les valeurs du paramètre CMI; B: présenté par les valeurs du paramètre CMM) des huiles essentielles de *Cytisus triflorus* L'Her.

CHAPITRE 4: DISCUSSION GÉNÉRALE

1. Profil saisonnier semi-quantitative du contenu phytochimique et pouvoir antibactérien des extraits aqueux et méthanoliques chez la Lamiacée *Teucrium polium*

Nous supposons que la distinction dans les rendements des extraits de *Teucrium polium* peut être attribuée à la polarité des composés extraits et aux solvants utilisés, ce qui rejoint les propos de HSU et *al.* [187], qui ont également signalés une forte solubilité des pigments, des enzymes et des composés bioactives dans l'eau, d'où son utilisation universelle dans les préparations des décoctions à base de plantes comme remèdes thérapeutiques. Les mêmes conclusions ont été rapportées par BAKARI et *al.* [188], on traitant la même espèce en Tunisie.

En dépit des facteurs intrinsèques à la plante, les écarts enregistrés en termes d'accumulation en phénols totaux et en flavonoïdes au niveau des différents stades phénologiques de *Teucrium polium*, seraient dû aux fluctuations des facteurs climatiques caractérisant les périodes d'échantillonnages qui coïncidaient avec les phases cruciales de développement phénologique. L'hypothèse avancée corrobore avec plusieurs travaux, notamment celle d'AMMAR et *al.* [189], dont ils avançaient que la biosynthèse et l'accumulation de composés phénoliques dépendent de facteurs exogènes, de facteurs endogènes, des stades de développement et de la différenciation tissulaire. Les mêmes travaux suggèreraient que les composés phénoliques ont été considérés comme une interface chimique entre les plantes et l'environnement. En revanche, leur biosynthèse et leur accumulation seraient induite par les conditions environnementales entre autres la saisonnalité. Dans le même contexte, ASTARITA et *al.* [190], ont conclu que les basses températures peuvent affecter les niveaux de métabolites secondaires, y compris les composés phénoliques et les flavonoïdes par l'induction des voies phénylpropanoïdes. Les travaux d'ABAD et *al.* [191], ont montré l'existence d'une variation marquée pendant le stade de floraison, bien que les quantités phénoliques maximales ont été aperçues au cours du stade végétatif. Les mêmes auteurs ont signalés que les niveaux les plus bas en flavonoïdes ont été observés durant le stade de floraison, qui constituait le lieu de pré-élection d'accumulation des composés phénoliques, en préparation au processus de lignification.

Les résultats ont montrés que l'extrait méthanolique concentre les composés phénoliques d'une manière significative par rapport à l'extrait aqueux. Nous supposons que le rendement d'extraction est fortement lié à la solubilité et au degré

de polymérisation des composés phénoliques. L'hypothèse avancée rejoignait les résultats obtenus par KSOURI et *al.* [192], dont ils font allusion à la nature du solvant et à la polarité des composés phénoliques lors de leurs extractions, et que le méthanol donne le rendement d'extraction le plus élevé pour l'extraction de substances phénoliques chez les lamiacées, spécialement pour *Teucrium*.

Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits du stade végétatif de *Teucrium polium* indiquaient une forte sensibilité envers les Gram positif et envers certains Gram négatif, avec la dominance de l'efficacité de l'extrait méthanolique. Nous suggérons que l'activité biologique des extraits dépend largement de la nature du solvant d'extraction et du contenu en principes actifs du stade phénologique. Cette information est soutenue par le travail de KHODJA et *al.* [193], qui ont signalé que l'activité antibactérienne de tous les extraits dépend largement de la concentration des extraits, des souches bactériennes et du type d'extrait végétal. De plus, MCGAW et *al.* [194], ont signalé que les extraits de la même plante recueillie à différents stades phénologiques présentaient des activités biologiques différentes. Certaines études ont également démontrées une variation saisonnière de l'activité antibactérienne des extraits de la Cystoseiraceae *Bifurcaria bifurcata* [195].

L'efficacité des extraits de *Teucrium polium* vis-à-vis des bactéries à Gram positif et à Gram négatif a été soutenue par les travaux de DARABPOUR et *al.* [196], dont ils confirmaient que les souches *Escherichia coli* (Gram négatif) et *Staphylococcus aureus* (Gram positif) présentaient une sensibilité accrue aux extraits de *Teucrium polium*. La moindre sensibilité des souches à Gram négatif; *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* seraient due à l'imperméabilité membranaire. D'après CARLOS SILVA et *al.* [197], la plupart des molécules seraient imperméables à travers des membranes cellulaires en référence à la couche extérieure supplémentaire riche en phospholipides, en protéines et en lipopolysaccharides.

Les corrélations positives signalées entre les composés phénoliques des extraits du stade végétatif et la sensibilité des souches pathogènes seraient dus à l'effet individuel et / ou synergique des composés quantifiés. Notre argument rejoint les travaux de POPOV et *al.* [198], qui ont signalés que les changements dans l'activité antibactérienne des extraits alcooliques de l'Asteracée «*Rhanterium adpressum*», en ce qui concerne les variations saisonnières, pourraient être attribués à une variation dans les quantités et / ou les qualités des composés actifs. LIM et *al.* [199] ont signalés que l'activité antibactérienne présente une bonne corrélation avec la teneur en phénols totaux pour les espèces de la Macaranga. Aussi, il a été indiqué que les activités antibactériennes des extraits de plantes, dépendent de la nature et de la structure des composés phénoliques. Par leur groupe hydroxyle, les composés phénoliques ont une capacité de se lier aux protéines des membranes bactériennes pour former des complexes qui peuvent agir comme une barrière chimique contre les pathogènes potentiels [200 et 201]. Toutefois, la littérature a signalé que les protéines présentaient une activité antibactérienne contre les souches bactériennes

pathogènes *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* [202]. Concernant l'effet synergique, le travail de WINK et *al.* [203] a approuvé la potentialisation synergique des activités biologiques des composés de défense utilisés en combinaison.

2. Profil saisonnier semi-quantitative du contenu phytochimique et pouvoir antibactérien des extraits aqueux et méthanoliques chez la Fabacée *Cytisus triflorus* L'Her

Nous considérons que les différents stades de développement durant le cycle de vie de la plante, simulent le contenu des métabolites secondaires et engendrent des écarts d'accumulations. Néanmoins, les fluctuations peuvent être en étroite relation avec les conditions environnementales et en fonction des besoins de la plante, ce qui réaffirme les écarts enregistrés en termes d'accumulation en phénols totaux et en flavonoïdes sous l'effet de l'indice phénologique de *Cytisus triflorus*. L'hypothèse avancée corrobore avec plusieurs travaux, qui avançaient que la biosynthèse et l'accumulation de métabolites secondaires responsables de la bioactivité dans les plantes, dépendent de facteurs exogènes et endogènes entre autres, le stade de développement, la concurrence, l'état nutritionnel, l'attaque microbienne et la différenciation tissulaire, dont les conditions climatiques sont considérées comme étant le principal facteur [204, 205, 206 et 207]. Dans la même concordance, il a été affirmé que la concentration la plus élevée des phénols totaux a été acquise dans les plantes récoltées en hiver, suivies par celles d'automne et d'été [208], ce qui suggère que l'accumulation de composés phénoliques y compris les phénols totaux peut être liée à l'activation des voies phénylpropanoïdes par les basses températures [209]. Tandis que, les plus basses concentrations de flavonoïdes ont été signalées en plein automne, ce qui coïncide avec la phase floraison, qui constituait l'intervalle de la pré-élection d'accumulation de ces composés afin de s'accommoder au processus de lignification [162 et 210]. Nos résultats ont dévoilés que les composés phénoliques se concentrent d'une manière significative dans l'extrait méthanolique que dans l'extrait aqueux. Nous présumons que la concentration de ces métabolites dans les solvants d'extraction est fortement liée à la solubilité et au degré de polymérisation. Cette hypothèse est retenue par HASHEM et *al.* [211], où ils prétendent que la nature du solvant et à la polarité des composés phénolique sont fortement sollicités lors de leurs extractions.

Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits du stade végétatif de *Cytisus triflorus* L'Her présentaient une forte sensibilité de la majorité des souches bactériennes y compris les Gram positif et les Gram négatif envers les extraits testés, avec la dominance de l'efficacité de l'extrait méthanolique. Nous suggérons que l'activité biologique des extraits dépend largement de la nature du solvant d'extraction et du contenu en principes actifs du stade phénologique. Cela est soutenu par certains travaux, où il à été évoqué que le stade de développement ou bien l'indice saisonnier serait qualifié probablement comme l'un des facteurs les plus importants incriminés dans la variation des composés dotés de meilleures activités

biologiques, visant à accroître les propriétés fonctionnelles [189], et que le solvant joue un rôle important dans le comportement antibactérien des extraits de *Cytisus scoparius* [212]. De plus, la meilleure activité antibactérienne en hiver, suggère que les plantes pourraient minimiser le coût métabolique en récupérant les métabolites des tissus foliaires et le transport des composés vers les parties souterraines [213]. Les différents résultats observés dans l'activité antibactérienne s'expliquent aussi par les distinctions structurelles de la paroi cellulaire bactérienne des bactéries à Gram positif et Gram négatif. Les bactéries Gram négatif, à l'exception de la membrane cellulaire, possèdent une membrane externe supplémentaire, composée de phospholipides, de protéines et de lipopolysaccharides, qui serait imperméable à la plupart des molécules [197].

Les corrélations positives signalées entre les phénols totaux, les flavonoïdes des extraits du stade végétatif et la sensibilité des souches pathogènes seraient dus à l'effet individuel et/ou synergique des composés quantifiés. Il a été démontré que les extraits de *Cytisus scoparius* exerçaient une action antibactérienne positive envers les souches *Staphylococcus aureus* et *Bacillus spp.* Néanmoins, ces extraits peuvent aussi conférer un effet protecteur à certaines espèces bactériennes [212], comme c'était le cas chez *Pseudomonas aeruginosa* qui a présenté une résistance à nos extraits testés. Il a été également affirmé que la variation saisonnière de l'activité antibactérienne des extraits de *Bifurcaria bifurcata* dépendait à la fois des espèces végétales et du microorganisme testé [195]. Toutefois, la disposition des composés individuels et leurs concentrations n'est pas statique, mais diffère d'un organe à l'autre, dans un cycle de développement d'une plante, et même à l'intérieur et entre les populations. Cette variation, qui conduit à des mélanges complexes de métabolites, est probablement une stratégie de défense contre les herbivores ou les agents pathogènes spécialisés [203 et 214]. Il existe des preuves expérimentales selon lesquelles, une potentialisation synergique des activités biologiques est réalisée par des combinaisons de composés de défense individuels dans un mélange [203]. Cependant l'effet antibactérien des composés phénoliques peut être dû à leur capacité à modifier la perméabilité des cellules microbiennes, ce qui conduit ainsi à la perte de macromolécules à l'intérieur [215].

3. Contribution à la caractérisation des huiles essentielles de la Lamiacée *Teucrium polium* et au comportement saisonnier de leur rendement, de leur composition chimique et de leur activité antimicrobienne

Le rendement en huiles essentielles de la partie aérienne de *Teucrium polium* était sous la dépendance des stades phénologiques; où le stade végétatif dominait très significativement les stades floraison et fructification. De ce fait, nous parlerons d'huile d'hiver et d'huile d'été, l'hypothèse rejoignant le travail de MCCASKILL et *al.* [216], qui ont signalé que la distillation des feuilles d'hiver et d'été de *Teucrium polium* du nord de la Grèce a donné un rendement en huile essentielle remarquablement plus élevé par rapport aux feuilles d'été. Ceci est étroitement lié au

nombre élevé de poils glandulaires peltés dans les feuilles d'hiver, puisque ils ont été considérés comme des sites spécifiques de biosynthèse des huiles essentielles. NIK et *al.* [217], rapportaient aussi que les différences dans le rendement en HE's entre les feuilles d'hiver et d'été de *Teucrium polium* sont liées à des facteurs de stress environnemental fédérateurs de la production de composés bioactifs qui interviennent dans les voies de biosynthèse spécifiques de terpène. Le fort rendement du stade végétatif a été associé aussi à l'adaptation des feuilles aux basses températures. Par conséquent, les feuilles subissaient une réduction de la surface de la lame foliaire, une augmentation de l'épaisseur de la cuticule et un accroissement du nombre de chloroplastes avec de plus grande taille et de nombreuses grana. Le nombre plus élevé de cellules de chlorenchyme par unité de volume de mésophile dans les feuilles d'hiver, reflétait une plus grande surface de la paroi cellulaire totale face aux espaces, et donc un taux plus élevé de photosynthèse. Le taux photosynthétique accru des feuilles d'hiver entraîne la production de quantités plus élevées de carbone photosynthétique qui sont largement investies dans la biosynthèse des métabolites secondaires entre autres les huiles essentielles [218 et 219].

Des résultats semblables ont été rapportés par JAMALI et YOSR [220], montrant une diminution subséquente de la teneur en huile essentielle pendant la fructification, en réponse à l'activation des voies cataboliques et la sénescence des feuilles. Les faibles précipitations et les températures élevées en août pouvaient contribuer à la diminution de la biosynthèse des HE's durant le stade de fructification [222 et 223].

La caractérisation chimique des huiles essentielles du genre *Teucrium* a fait l'objet de plusieurs investigations dont nous citons celles du: ABURJAI et *al.* [223], AL-QUDAH et *al.* [224], ANTUNES et *al.* [225], KABOUCHE et *al.* [226], KOVACEVIC et *al.* [227], MENICHINI et *al.* [24], PEREZ-ALONSO et *al.* [228], VAHDANI et *al.* [229] et DJABOU et *al.* [160]. Toutefois l'influence du stade végétatif sur les caractéristiques chimiques des huiles essentielles de *Teucrium* constituait une nouvelle approche, par conséquent le screening chimique des composés des huiles essentielles des différents stades phénologiques de *Teucrium polium* a été comparée exclusivement aux caractéristiques chimiques d'une huile essentielle d'une population proche de *Teucrium* du nord est algérien notamment celle rapporté par le travail de BAKARI et *al.* [188]. La confrontation des screening chimiques des HE's des stades phénologiques avec le screening chimique de l'huile essentielle de *Teucrium polium* récolté en Tunisie (tous stades étaient confondus) fait ressortir une similarité en termes de composés majoritaires. La comparaison a exprimée des variations d'ordre quantitatif chez les composés majoritaires à savoir l' α -pinène (17,04%), le β -pinène (12,68%), le β -Myrcène (6,07%), le D-limonène (6,65%) et d'ordre qualitatif par la signalisation du Germacrène D (5,89%) qui caractérise la population de Tunisie et du Guaia-1(10),11-diene qui caractérise celle du Nord Est Algérien (Khenchela). Les différences dans les compositions chimiques des huiles essentielles étaient probablement liées aux conditions environnementales influençant

l'activation des voies d'anabolisme et du catabolisme au niveau des parties aériennes de *Teucrium polium*. SCHWOB et al. [230] rapportaient que de nombreuses voies métaboliques ont été induites par le métabolisme secondaire générant une complexité élevée, qui a révélé un grand nombre de composés des huiles essentielles. BAKARI et al. [188] suggèrent que les différences dans la composition volatile sont liées à différents facteurs y-compris l'âge de la plante, le stade de développement et l'origine géographique, ainsi qu'aux facteurs climatiques et génotypiques. Alors que SIMMONS et PARSONS [231], ont indiqué que le vieillissement foliaire semble être le facteur le plus susceptible d'expliquer les profils de variation des huiles volatiles. SADEGHI et al. [232] ont signalé que la composition chimique des huiles essentielles de huit populations de *Teucrium polium* étaient qualitativement très similaires et seules des différences quantitatives relatives se produisent dans les composés identifiés.

La variation phénologique annuelle de *Teucrium polium* a montrée clairement des fluctuations qualitatives et quantitatives contrastés sur le profil des huiles essentielles en termes de familles chimiques. Ces changements tendaient à confirmer l'impact environnemental sur le processus adaptatif du cycle phénologique de la plante. SCHWOB et al. [230], soupçonnaient qu'au cours du processus physiologique d'ontogénèse, les modifications morphologiques qui se produisent pendant le cycle phénologique sont concomitantes avec les modifications en métabolisme secondaire et qui seraient à la base de modifications de la composition des huiles essentielles. Il à été rapporté que les quantités de constituants principaux en monoterpènes hydrocarbonés et en sesquiterpènes hydrocarbonés différaient notablement et que la variabilité chimique de l'huile de *Teucrium* pourrait être liée à la présence des ions métalliques tels que Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} et Co^{2+} qui améliorent la production spécifique de sesquiterpènes hydrocarbonés dans les plantes [233]. D'après ZHANG et al. [234], la diminution du nombre et de la concentration des terpènes durant la fructification suggérait qu'un certain nombre de leurs voies de biosynthèse pourraient être inactivé alternativement. Les terpènes produits au cours du développement précoce, peuvent être dégradés en d'autres composés ou transformés en des formes non volatiles. L'augmentation notable de la teneur en alcools, en aldéhydes et en cétones dans les différentes huiles essentielles serait due à l'accroissement de la température ce qui rejoint les conclusions de THOLL et al. [235], de KAKARAPARTHI et al. [236], et de DHOUIOUI et al. [237] qui signalaient que l'ensoleillement et les températures les plus élevées caractérisant les mois d'août 2009 et septembre 2011 ont été à la base d'une forte fluctuation des composés sus cités entraînant ainsi une forte tolérance des plantes aux températures élevées.

Les résultats de l'activité antimicrobienne des HE's de *Teucrium polium* constituent une approche préliminaire qui mériterait d'être approfondie par d'autres tests plus performants dépassant l'aspect qualitatif et dévoilant l'effet réel de l'efficacité des huiles essentielles. Ainsi, l'ensemble des activités antimicrobiennes des huiles essentielles sont supposés être lié à leur composition chimique et conditionné par

l'activité individuelle et/ou synergique de leurs composées. Nos propos rejoignent les travaux de KABOUCHE et *al.* [226], dont ils signalaient que la présence des composés tels que l' α -pinène, le β -myrcène, le cadinol et le limonène joueraient un rôle important dans l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium polium*. Ils relataient aussi que l' α -pinène aurait un fort pouvoir antibactérien.

L'activité antibactérienne indépendante des HE's des différents stades phénologiques serait dû à leur pareille contenance en monoterpènes hydrocarbonés, en monoterpènes oxygénés, en sesquiterpènes hydrocarbonés et en sesquiterpènes oxygénés, le même résultat a été relaté par DORMAN et DEANS [118], KOTAN et *al.* [238], où ils estimaient que les forts taux en monoterpènes oxygénés et en sesquiterpènes montraient des degrés variables d'activités antibactériennes. En référence à leurs richesses en caryophyllène oxide, mais également à leur teneur élevée en composés antibactériens comme le linalool et l' α -pinène.

Le potentiel antibactérien élevé de l'huile essentielle de la Lamiaceae tunisienne *Thymus algeriensis* a été expliqué par la présence d'une quantité élevée de monoterpènes hydrocarbonés (33,9-38,4%). Il a été montré que la présence des monoterpènes dans les huiles essentielles est capable d'affecter l'intégrité cellulaire, ce qui entraîne une inhibition de la respiration et une altération de la perméabilité COX et *al.* [124].

De copieuses études ont montrés que l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle est souvent le résultat de l'activité des acides gras [239] et des monoterpènes plutôt que des sesquiterpènes [240]. Il a été prouvé que la même activité est apparemment liée à sa teneur élevée en alcools et en esters et d'autres composés mineurs entre autres le linalool, le terpinène-4-ol, le camphre, le trans-pinocarveol, le t- Cadinol, l' α -cadinol et le β -caryophyllène oxide qui agissant de manière synergique ou additive. [241 et 237]. Dans le même contexte, DJABOU et *al.* [160] signalaient que les huiles essentielles contiennent des hydrocarbures, dont le p-cymene et le limonène, peuvent agir dans la synergie avec les composés oxygénés et ainsi renforcent leur activité biologique.

L'effet synergique des constituants d'huiles essentielles de *Teucrium polium subsp. capitatum* a été souvent observé. Toutefois ils avançaient que l'activité individuel du p-cymene serait pourvu d'une moindre efficacité mais son activité se trouvait améliorer une fois combiné avec le composé oxygénique (carvacrol). Par contre le p-cymene et le limonène contenus dans les huiles essentielles de *Teucrium flavum subsp. glaucum* et *Teucrium flavum subsp. glaucum*, peuvent exercer une activité antibactérienne une fois utilisé seul [118], et peuvent aussi renforcer l'effet antibactérien selon leurs concentrations dans l'huile essentielle [242].

Nos résultats rejoignent le labeur de DJABOU et *al.* [160], qui ont spécifiés que l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Teucrium polium* été très marquée

contre les bactéries à Gram positif et même pour certains Gram négatif. Les espèces de *Teucrium* présentaient des activités contre des bactéries d'une part à Gram positif en occurrence *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* et d'autre part à Gram négatif notamment; *salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae* et *Klebsiella pneumoniae* [160]. Les différents niveaux de l'activité antibactérienne seraient liés à la membrane externe des bactéries à Gram négatif qui est constituée par des lipoprotéines et des lipopolysaccharides à perméabilité sélective qui interviendraient dans la régulation et à l'accès aux structures sous-jacentes ce qui rend les bactéries à Gram négatif, généralement moins susceptibles aux composés des plantes que les bactéries à Gram positif [243]. CHAN et al. [244] ont cités que l'espace periplasmique des bactéries à Gram négatif serait pourvus d'enzymes qui auraient la capacité de détruire les molécules exogènes. En revanche, *Pseudomonas aeruginosa* est connu pour avoir un haut niveau de résistance intrinsèque à tous les agents antimicrobiens et les antibiotiques connus, en raison de la présence d'une membrane externe qui joue le rôle d'une barrière très restrictive, qui la rend résistante à la fois aux antibiotiques synthétiques et aux huiles essentielles [245].

Les écarts enregistrés dans l'activité antifongique chez les huiles essentielles de *Teucrium polium* des différents stades phénologiques, peuvent être dues aux différences des périodes de récolte de la plante qui peut mener aux changements des constituants volatiles. Par conséquent les huiles essentielles du stade fructification se trouvaient abondamment riche en monoterpènes. Le travail de HARREWIJN et al. [246], ont démontraient que les monoterpènes sont connue par leur activité antimicrobienne. KREMER et al. [247], signalaient que l'huile essentielle de *Teucrium arduini* a montré une activité antifongique contre *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*. Cependant MENDOZA et al. [248], stipulaient que la composition chimique des huiles dominée par les terpénoïdes extériorise une forte action contre les souches fongiques, tributaire à leur pouvoir de rompre leurs membranes par les composés lipophiliques. De plus, DAFERERA et al. [249], ont indiqué que l'activité fongitoxique des huiles essentielles peut être due à la formation de liaisons hydrogène entre le groupe hydroxyle des phénols et les sites actifs des enzymes cibles. D'autres rapports ont montrés que les huiles essentielles agissent sur les hyphes du mycélium, provoquant la sortie des composants du cytoplasme, la perte de rigidité et l'intégrité de la paroi cellulaire des hyphes, ce qui entraîne son effondrement et la mort du mycélium [250].

La gradation positive de l'effet antimicrobien des différentes concentrations des huiles essentielles de *Teucrium polium* peut être liée aux composés majoritaires, notamment l' α et le β pinène et à certains composés spécifiques en l'occurrence le carvacrol et le limonène qui même a de faibles concentrations maintiendraient leur pouvoir inhibiteur. Nos propos rejoignent les travaux d'AMRI et al. [251], de VIUDA-MARTOS et al. [252], et de BEN GHNAYA et al. [253], qui ont montrés que les huiles essentielles relativement riche en monoterpènes hydrocarbonés (α -pinène en

particulier) seraient responsable de l'activité antifongique observée contre *Fusarium avenaceum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium culmorum* et *Botrytis cinerea*. De plus, l'activité fongique signalée à l'encontre de *Verticillium fungicola*, et de *Trichoderma harzianum* serait en rapport avec la teneur en limonène, en α et en β -pinène. Les investigations de DJABOU et al. [160] ont signalées que les huiles essentielles de *Teucrium polium* subsp. *capitatum* et *Teucrium flavum* subsp. *glaucum* ont été considérés comme actifs tandis que leur contenu en composés oxygénés était faible.

La détermination de l'activité antimicrobienne par recours au paramètre CMI a été adoptée dans le but d'estimer quantitativement la bioactivité des HE's des différents stades phénologiques de *Teucrium polium*. Cet aspect d'étude est très documenté, dont nous citons les conclusions de CIMANGA et al. [255] et de HERNANDEZ et al. [255], qui avançaient que les microorganismes qui ont montré de grandes zones d'inhibition observées par la méthode de diffusion sur milieu gélosé ne sont pas toujours ceux qui présentaient les plus faibles valeurs des CMI et CMM. En effet, le diamètre de la zone d'inhibition peut être affecté par la solubilité et l'évaporation de l'extrait.

L'effet antimicrobien est corrélé positivement à la composition chimique des huiles essentielles des différents stades phénologiques. Ce qui rejoint les propos de plusieurs auteurs entre autres ceux de HISHAM et al. [256], qui ont signalés que l'huile essentielle de *Teucrium stocksianum* subsp. *stocksianum* a inhibé la croissance de dix-sept souches bactériennes et six souches fongiques, y compris les espèces *Staphylococcus*. Les résultats des tests CMI d'huiles essentielles des deux espèces de *Teucrium* (*Teucrium orientale* var. *orientale* et *Teucrium orientale* var. *puberulens*) ont indiqués que *Staphylococcus aureus* a été modérément inhibé par ces huiles avec des valeurs de CMI de 100 et 50 $\mu\text{g/mL}$ [257]. D'autre part, FORMISANO et al. [258], ont montrés que *Staphylococcus aureus* était légèrement sensible à l'action de l'huile essentielle de *Teucrium divaricatum* sieb. ssp. *villosum* avec une valeur de CMI 100 mg/mL, alors qu'elle a exercé une activité appréciable contre le *Bacillus subtilis* avec une valeur de CMI 50 mg/mL. Les mêmes auteurs supposaient que l'activité biologique des HE's pourrait être expliquée en partie par la présence de sesquiterpènes, comme le (E)-caryophyllène, l' α -humulène, ou le caryophyllène oxide, mais également par la teneur élevée des composés antibactériens comme le linalool, l' α -pinène, et l'Eugenol. En revanche, RICCI et al. [167], ont signalaient que l'huile essentielle de *Teucrium marum* a inhibée totalement (effet fongicide) *Rhizoctonia solani* à 400 ppm, *Fusarium oxysporum* à 800 ppm, *Botrytis cinerea* à 1600 ppm et *Alternaria solani* à 6400 ppm. Les mesures de CMIs, ont indiquées que les valeurs sont respectivement de 250 ppm, 450 ppm, 1000 ppm et 3800 ppm. Alors que les mesures de CMMs sont respectivement de 300 ppm, 600 ppm, 1200 ppm et 5000 ppm. Les valeurs des CMI les plus basses ont été obtenues pour *Rhizoctonia solani* et *Fusarium oxysporum* alors qu'*Alternaria solani* et *Botrytis cinerea* s'avéraient moins sensibles. Les mêmes auteurs suggéraient que le β -

bisabolène et le β -sesquiphellandrène composés principaux de l'HE de *Teucrium marum* réputées par leurs activités antimicrobiennes ne soient pas principalement responsables des effets antifongiques observés.

4. Contribution à la caractérisation des huiles essentielles de la Fabacée *Cytisus triflorus* L'Her de la Mitidja et au comportement saisonnier de leur rendement, de leur composition chimique et de leur activité antimicrobienne

La variation du rendement en huile essentielle peut être due à des facteurs génétiques, des stades de développement, de l'origine végétale, des méthodes de récolte, de séchage et de stockage, des méthodes d'extraction et d'analyse [240 et 259]. Les stades physiologiques pourraient affecter de façon significative les rendements en huile essentielle des plantes médicinales et aromatiques, et par conséquent, les accumulations préférentielles en stade de floraison [260, 261 et 262], alors que d'autres rapports, restituent que le plus faible rendement en huile essentielles été marqué en stade végétative. Le faible taux de biosynthèse des composés volatils au cours du stade végétative peut être dû à une inactivation partielle des enzymes nécessaires à la biosynthèse de certains composés [263], tandis que le plus haut niveau en stade floraison, est fortement lié à la production élevée de biomasse et de teneur en huiles à ce stade [264]. Le contenu en huile essentielle se réduit au cours des périodes de développement en raison de l'accumulation de produits photosynthétiques dans l'endosperme.

Les variations phénologique de la composition chimique des huiles essentielles de *Cytisus triflorus* L'Her ont été rénovées de façon spectaculaire, dont on peut concevoir que ces variations étaient accompagnées aux modifications du métabolisme secondaire. L'hypothèse avancée corroborait avec une étude où il a été signalé que l'effet de différents stades phénologiques sur l'huile essentielle et sa composition peut être dû à son influence sur l'activité enzymatique et le métabolisme de la production d'huile essentielle [263]. Toutefois l'ontogenèse végétal à une relation très étroite avec l'accumulation de métabolites secondaires chez les plantes, ce qui induit une influence significative sur la composition des HE's [265].

Il semblerait que les aptitudes accumulatrices des molécules bioactives chez les plantes apportent une marginalité du fait que la synchronisation du stade phénologique à un autre, incrimine certains organes par rapport aux autres. En effet, chaque stade phénologique accumule des quantités différentes en molécules bioactives en relation avec les capacités intrinsèques des organes. L'hypothèse de la migration des molécules bioactives a été fortement documentée, elle relate que l'âge de la plante est un facteur déterminant dans la composition des molécules bioactives en terme qualitative et quantitative [266 et 267]. Néanmoins, les facteurs environnementaux tels que la fertilité des sols [268 et 266], le défi des bioagresseurs [269], les blessures ou les régulateurs de croissance végétale [270] ont aussi des effets significatifs sur les taux d'accumulations et peuvent affecter leur distribution

entre les différents organes de la plante. De même, ces variations peuvent aussi être attribuées aux différentes actions agronomiques, y compris (les facteurs génétiques et le chémotype), les techniques de culture, le climat, la saison, les conditions géographiques, et le métabolisme adaptatif des plantes [271].

L'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Cytisus triflorus* L'Her vis-à-vis des souches sensibles déterminées par la méthode de diffusion, est due aux constituants terpéniques qu'elles contiennent. Le β -linalool, le Géraniol, L'Eugénol sont les composés majoritaires des essences de *Cytisus triflorus* L'Her des trois stades cruciaux. En effet, les terpénoïdes et leurs dérivés sont les composants principaux des HE's. Ces composés ont un fort potentiel inhibiteur sur les souches microbiennes pathogènes GUDZIC et *al.* [272]. Les propriétés antibactériennes de ces composés sont en partie liées à leurs caractères lipophiles menant à l'accumulation au niveau des parois bactériennes, perturbant ainsi le fonctionnement et la perméabilité des membranes cellulaires, la dégradation de la paroi cellulaire, l'altération de la membrane cytoplasmique, et l'épuisement de la force motrice des protons [273].

La grande résistance de la Gram (-); *Pseudomonas aeruginosa* face à la bioactivité des huiles essentielles de *Cytisus triflorus* L'Her est liée à la complexité de la paroi cellulaire de ce microorganisme qui contient une double membrane, contrairement à la structure membranaire simple des bactéries à Gram (+).

En revanche, la méthode de disques et par référence aux zones d'inhibition, les résultats ont montrés la présence d'un effet bioactif significatif de l'huile essentielle du stade floraison dominant ainsi l'effet des huiles essentielles des deux autres phases cruciaux. Cet état de fait, peut être dû à la synergie entre les composés sans exclusion aucune pour les composés mineurs, ce qui renforcerait l'activité de ces essences [274]. L'indifférence dans l'activité antifongique des essences des trois stades phénologiques de *Cytisus triflorus* L'Her est peut être due à l'évaporation de certains composés, générant un effet phénologique non significatif [68]. Cependant, les travaux de BOUKHATHEM et *al.* [275] confirment que les plus fortes concentrations sont les plus actives.

Il a été suggéré que l'activité antimicrobienne peut être liée à la présence de substances présentes dans les huiles essentielles et pas nécessairement à un ou plusieurs ensembles majoritaires, car les substances présentes à de faibles concentrations peuvent contribuer à l'activité pharmacologique, éventuellement par la synergie des composés [276]. L'activité antimicrobienne des huiles essentielles peut être attribuée à la présence des composés chimiques; en l'occurrence le β -linalool et le Géraniol qui ont présentait une forte activité inhibitrice vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* [277]. Pareillement, les composés; 1-Octen-3-ol [278] et l'acide hétéroterpénique ont été déclaré très prometteurs pour leurs activités antimicrobiennes chez certaines espèces de Genisteae [279]. De même, le

Carvacrol, L'Eugénol et le thymol présentait une forte activité antibactérienne [280]. En outre, les acides gras sont connus pour leurs propriétés antimicrobiennes [239 et 281], alors que les monoterpènes et les sesquiterpènes oxygénés ont dévoilé des degrés variables d'activités antibactériennes [118 et 238].

CONCLUSIONS

L'Algérie dispose d'une grande biodiversité floristique à laquelle s'ajoute une tradition séculaire de pharmacopée traditionnelle. Les biomolécules d'origine végétale représentent un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles sources de substances qui peuvent avoir une utilisation thérapeutique comme alternatives les antibiotiques de synthèse.

Au cours de ce travail, nous avons investigué deux plantes à la recherche de molécules ou de consortium de molécules utilisables dans divers secteurs de la biotechnologie. Dans cette bio-prospection deux candidates ont été sélectionnées pour l'investigation des substances naturelles qu'elles synthétisent à savoir: *Teucrium polium*, connue sous le nom de germandrée et *Cytisus triflorus* L'Her, connue sous le nom du balai.

Au terme de cette thèse, les résultats obtenus font ressortir un certain nombre de réponses aux objectifs déclarés.

L'objectif principal de ce travail était d'estimer les impacts de la saisonnalité sur le métabolisme des plantes modèles et d'identifier les variations des composés aux niveaux des stades phénologiques afin de localiser les meilleurs composés et les bioactivités liés visant des propriétés fonctionnelles accrues. Dans le but de valider les deux plantes autant qu'agent antibactérien.

L'étude de variabilité du screening phytochimique des extraits méthanoliques et aqueux de *Cytisus triflorus* L'Her et de *Teucrium polium* en l'occurrence les phénols totaux et les flavonoïdes, ainsi que leur pouvoir antibactérien. Chez *Cytisus triflorus* L'Her les résultats ont montré que le stade végétatif annonce un important rendement en extraits. Les extraits méthanoliques des stades végétatif et floraison ont concentrés un maximum de phénols totaux et de flavonoïdes. Les extraits méthanoliques de *Cytisus triflorus* du stade végétatif balançaient leurs activités antibactériennes entre certaines bactéries à Gram positif ainsi que pour d'autres à Gram négatif; où ont fournis les meilleurs potentiels antibactériens contre *Staphylococcus aureus* et *Salmonella enterica* par rapport aux extraits des stades floraison et fructification.

Cependant, le stade végétatif de *Teucrium polium* affiche le rendement le plus important en extraits méthanoliques et aqueux. L'extrait méthanolique du stade végétatif renferme un maximum de métabolites secondaires (phénols totaux et de flavonoïdes). L'activité antibactérienne des extraits de *T. polium* du stade végétatif a été très marquée sur les Gram positif (vis-à-vis *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus*

aureus et *Salmonella enterica*). Les modèles obtenus par intégration de teneurs des extraits de *T. polium* en phénols totaux et en flavonoïdes des différents stades phénologiques et les valeurs des potentiels antibactériens optimisé par méthode de diffusion, nous ont permis de prédire les grandes propriétés fonctionnelles de ces extraits par recours aux équations prédictives.

L'extraction, la caractérisation, et les propriétés bioactives des huiles essentielles de la partie aériennes de *C. triflorus* récoltées durant les trois stades cruciaux du cycle végétatif a été réalisé. Le plus important rendement en huiles essentielles a marqué le stade floraison. L'analyse de ces HE's par CG-SM a révélé la présence d'un mélange complexe de familles chimiques représentées par des variations qualitatives et quantitatives selon l'indice phénologique. Des composés volatiles majoritaires sont détectés selon une gradation descendante à savoir: le β -linalool > le Géraniol > l' τ -Terpinène > le Rétinal > l'Eugénol. Bien que la composition volatile de ces fractions a démontré l'existence d'une similarité en composition dans les HE's des stades végétatif et fructification et d'une divergence très imposante par rapport à celles du stade floraison. Toutefois, le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles des parties aériennes de *Cytisus triflorus* L'Her des différents stades phénologiques procédés par les paramètres MIC et MMC a démontré que l'indice phénologique a influencé l'activité inhibitrice des HE's en particulier les HE's du stade végétatif. Les mêmes résultats font apparaître que les HE's exerçaient des activités à impact significatif envers les bactéries à Gram positif à savoir; *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*, ainsi qu'à la bactérie à Gram négatif; *Escherichia coli*. De même, une activité antifongique significative a été signalé envers les champignons *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* et *Alternaria alternata* et même envers la levure *Candida albicans*.

Concernant, *Teucrium polium*, le plus important rendement en huiles essentielles de a été signalé au stade végétatif, tandis que l'analyse par CG/SM a montré que les huiles essentielles présentaient des variations qualitatives et quantitatives selon l'indice phénologique. Les stades phénologiques affichaient une variation de composés majoritaires selon un gradient négatif; α -pinène > β -pinène > D-limonène > β -myrcène > Guaia-1(10),11-diene. De même, les essais antimicrobiens effectués par les méthodes qualitative et quantitative (par méthode de diffusion et par les paramètres CMI et CMM) ont montrés que l'activité des huiles essentielles était liée à la composition chimique. Les résultats font apparaître que les bactéries *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* (Gram positif) étaient plus sensible par rapport aux bactéries; *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* et *Pseudomonas aeruginosa* (Gram négatif). En revanche, *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus brasiliensis* ont été les plus sensible par comparaison aux *Fusarium solani*, *Candida albicans* et *Alternaria alternata*. L'ensemble des propriétés antibactériennes et antifongiques à large spectre des huiles essentielles de *Teucrium polium* permettent de les considérées comme des agents antimicrobiens efficace pour traiter certaines infections, et de contrôler certains bioagresseurs végétaux.

Le présent travail est une valorisation des biomolécules des Fabacées Algériennes dont le genre *Cytisus* ainsi que des Lamiacées Algériennes dont le genre *Teucrium*. Les aspects traités ont pour but de recueillir les connaissances et les propriétés chimiques et fonctionnelles nécessaires pour sélectionner la période d'accumulation optimale des composés actifs à haute valeur ajoutée. Malgré la complexité de la chimie, de la nature inorganique et organique des molécules bioactives investis dans les deux plantes étudiées, il est possible de trouver des tendances générales entre les facteurs environnementales et la variation qualitative et quantitative en activités antimicrobiennes. Ces propriétés antimicrobiennes et structurales de ces composés obtenus durant les stades cruciaux de la plante, peuvent être significatives pour le secteur pharmaceutique et agricole, compte tenu de la disponibilité du matériel végétale.

En perspectives, nous envisageons: (i) De valoriser d'autres composés bioactives dans d'autres compartiments des plantes investiguées; (ii) d'achever la purification des métabolites secondaires présents dans les différentes fractions; (iii) d'élargir le criblage biologique par les molécules purifiées des deux plantes retenues au cours de cette étude sur d'autres activités; (iv) d'appliquer ces fractions dans des applications biotechnologiques *in-vivo* pour la protection des plantes; (v) d'essayer de déterminer le mode d'action des extraits agissant comme fongicide ou comme bactéricide.

RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE

1. **Meier U., 2001** - Growth stages of mono- and dicotyledonous plants. BBCH Monograph, 2ème ed. Paris. 186P.
2. **Boussoussaa H., Khacheba I., Djeridane A., Mellah N., Yousfi M., 2016** - Antibacterial activity from *Rhanterium adpressum* flowers extracts, depending on seasonal variations. *Industrial Crops and Products*. 83, pp: 44-47.
3. **Fillipini R., Piovan A., Borsarini A., Caniato R., 2010** - Study of dynamic accumulation of secondary metabolites in three subspecies of *Hypericum perforatum*. *Fitoterapia*. 81, pp: 115-119.
4. **Núñez-Regueira L., Proupín-Castiñeiras J., Rodríguez-Añón J.A., 2004** - Energy evaluation of forest residues originated from shrub species in Galicia. *Bioresource Technology*. 91, pp: 215-221.
5. **Quezel P., Santa S., 1962** - Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, ed, C.N.R.S. Vol. 1, Paris. 1170P.
6. **Bossard C., Rejmanek M., 1992** - Why Have Green Stems? *Functional Ecology*. 6(2), pp: 197-205.
7. **González N., Ribeiro D., Fernandes E., Nogueira DR., Conde E., Moure A., Vinardell MP., Mitjans M., Dominguez H., 2013** - Potential use of *Cytisus scoparius* extracts in topical applications for skin protection against oxidative damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 125, pp: 83-89.
8. **Sundararajan R., Haja NA., Kumar V., Mukherjee K., Saha BP., Bandyopadhyay A., Mukherjee PK., 2006** - *Cytisus scoparius* link-a natural antioxidant. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 6(8), pp: 1-7.
9. **Quezel P., Santa S., 1963** - Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, ed, C.N.R.S. Tome I, Paris. 484P.
10. **Sundararajan R., Koduru R., 2014** - *Cytisus scoparius*: a review of ethnomedical: phytochemical and pharmacological information. *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*. 4(4), pp: 2151-2169.
11. **Aourahoun K., Aissaoui M., Fazouan F., Larit F., Chalard P., Chalchat J.C., Figueredo G., Benayache F., Benayache S., 2013** - Essential oil of *Cytisus triflorus* L'Her. *Der Pharmacia Lettre* 5(5), 276-279.
12. **Lianopoulou V., Bosabalidis A M., Patakas A., Lazari D., Panteris E., 2014** - Effects of chilling stress on leaf morphology, anatomy, ultrastructure, gas exchange, and essential oils in the seasonally dimorphic plant *Teucrium polium* (Lamiaceae). *Acta Physiology Plant*. 36, pp: 2271–2281.
13. **Cunningham C.J., Weathington B.L., Pittenger D.J., 2013** - Understanding and Conducting Research in the Health Sciences, John Wiley & Sons, London, pp: 45-60.

14. **Ozenda P., 1958** - Fleurs du Sahara, C.N.R.S, Paris. 420P.
15. **Karamanoli K., Vokou D., Menkissoglu U., Constantinidou H-I., 2000** - Bacterial colonization of phyllosphere of Mediterranean aromatic plants. *J Chem Ecol.* 26, pp: 2035–2048.
16. **Wassel G., Ahmed S.S., 1974** - Chemical composition of the wild Egyptian plant *Teucrium polium*. *Pharmazie.* 29, pp: 351-352.
17. **Kamel A., Sandra P., 1994** - Gas chromatography–mass spectrometry analysis of volatile oils of two *Teucrium polium* varieties. *Biochem. Syst. Ecol.* 22, pp: 529-532.
18. **Harborne J., Tomas B., Williams G., Gil M., 1986** - Chemotaxonomic study of flavonoids from European *Teucrium* species. *Phytochemistry* 25, pp: 2811–2816.
19. **Cozzani S., Muselli A., Desjobert J.M., Bernardini A.F., Tom F., 2005** - Chemical composition of essential oil of *Teucrium polium* subsp. capitatum (L.) from Corsica. *J. Essent. Oil Res.* 10, pp: 113–115.
20. **Van Wyk B.E., Wink M., 2004** - Medicinal Plants of the World. Briza Publications, Pretoria, South Africa. 189P.
21. **Bukhari NA., Al-Otaibi R A., Mohammed M.I., 2015** - Biodiversity characteristics of *Teucrium polium* species in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences.* 22, pp: 181–185.
22. **Djabou N., Muselli A., Allali H., Dib MEA., B Tabti., Varesi L., Costa J., 2012** - Chemical and genetic diversity of two Mediterranean subspecies of *Teucrium polium* L. *Phytochemistry.* 83, pp: 51–62.
23. **Bencao Z., 1999** - State Administration of Traditional Chinese Medicine. Shanghai Science and Technology Publishing Company, Shanghai, China. pp: 6239–6240.
24. **Menichini F., Conforti F., Rigano D., Formisano C., Piozzi F., Senatore F., 2009** - Phytochemical composition, anti-inflammatory and antitumour activities of four *Teucrium* essential oils from Greece. *Food Chemistry.* 115, pp: 679-686.
25. **Wink M., 2013** - Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). *South African Journal of Botany.* 89, pp: 164-175.
26. **Celiktas O.Y., Kocabas E.E.H., Bedir E., Sukan F.V., Ozek T. & Baser K.H.C., 2007** - Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis* depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry.* 100, pp: 553-559.

27. **Fattahi M., Bonfill M., Fattahi B., Torras-Claveria L., Sefidkon F., Cusido R.M., Palazon J., 2016** - Secondary metabolites profiling of *Dracocephalum kotschy* Boiss at three phenological stages using uni and multivariate methods. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 3(4), pp: 177-185.
28. **Gobbo-Neto L., Lopes NP., 2007** – Medicinal plants: factors influence on the content of secondary metabolites. *Quim. Nova*. 30, pp: 374–381.
29. **Bartwal A., Mall R., Lohani P., Guru S. K., Arora S., 2013** - Role of Secondary Metabolites and Brassinosteroides in Plant Defense Against Environmental Stresses. *J Plant Growth Regul.* 1 (32), pp: 216-232.
30. **Seigler DS., 1998** – Cyanogenic Glycosides and Cyanolipids. *Plant Secondary Metabolism*. Boston MA: Chapman and Hall (Kluwer Academic Publishers), pp: 273-299.
31. **Fang X., Yang C., Yang L., Chen X., 2011** - Genomics grand for diversified plant secondary metabolites. *Plant Divers. Resour.* 33, pp: 53–64.
32. **Pateraki I., Kanellis AK., 2010** - Stress and developmental response of terpenoid biosynthetic genes in *Cistus creticus* subsp. *creticus*. *Plant Cell Rep.* 29, pp: 629–641.
33. **Taiz L., Zeiger E., 2006** - Secondary metabolites and plants defence. *Plant Physiology*. 4, pp: 316–344.
34. **Verma N., Shukla S., 2015** – Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2(4), pp: 105-113.
35. **Guignard J.L., 1996** - *Biochimie végétale*. Eds, Masson, Paris. pp: 124-234.
36. **Cosentino S., Tuberoso C.I., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E., Palmas F., 1999** - In vitro antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*. 29(2), pp: 130-135.
37. **Goehler I., Medizinalpflanzen DV., Untersuchungen zur U., von I., lucida Cav T., 2006** - Dissertation an der Universität für Bodenkultur Wien.
38. **Baser K.H.C., Buchbauer G., 2010** - Handbook of essential oils: Science, Technology and Applications, CRC Press NW, 48P.
39. **Bruneton J., 1987** - *Éléments de phytochimie et de Pharmacognosie, Technique & Documentation* Lavoisier, paris. 230P.
40. **Charles D.J., Simon J.E., 1992** - A new geraniol chemotype of *Ocimum gratissimum*. *Journal of Essential Oil Research*. 4(3), pp: 231-234.
41. **Jacques G., Paltz S.A., 1997**- Le fascinant pouvoir des huiles essentielles. Fascicule du laboratoire “Jacque Paltz”, 57P.

42. **Richard H., Peyron F., 1992** - Epices et aromates. (Ed), Tec & Doc – Lavoisier, Paris. 339P.
43. **Bruneton J., 1999** – Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales. 3^{ème} ed, Lavoisier, Paris. 1120P.
44. **Laverdière F., Holstein A., Thiebaut L., Mallee R., Gravejat G., 1999** – Dossier Couplage, Saint-Etienne: Ecole des Mines, 21P.
45. **Fernandez X., Cabrol-bass D., 2007** - Analyse des arômes, Techniques-Ingénieur. Sept, pp: 323-510.
46. **Barboni T., 2006** - Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie. Thèse de doctorat, Université de Corse. 21p.
47. **Achakzai AKK, Achakzai P, Masood A, Kayani SA, Tareen RB, 2009** - Response of plant parts and age on the distribution of secondary metabolites on plants found in Quetta. *Pak. J. Bot.* 41, pp: 2129–2135.
48. **Naczki M., Shahidi F., 2004** - Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A.* 10(54), pp: 95-111.
49. **Hong YJ., Tomas-Barberan FA., Kader A.A., Mitchell AE., 2006** - The Flavonoid glycosides and procyanidin composition of Deglet Noor dates (*Phoenix dactylifera*). *Agric food chem.* 54, pp: 2405-2411.
50. **Perret C., 2001** - Analyse de tanins inhibiteurs de la stilbène oxydase produite par *Botrytis cinerea*. Thèse de doctorat .Université de Neuchâtel. 184p.
51. **Hurst W J., 2008** - Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals. 2^{ème} ed, CRC presse. Taylor et Francis. London. 548p.
52. **Naczki M., Shahidi F., 2004** - Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A.* 1054, pp: 95-111.
53. **Porter L.J., Hirstich L. N., Chang B.G. 1986** - The conversion of procyanidins and pro-delphinidins to cyanidins and delphinidins. *Phytochemistry.* 25 (1), pp: 223-230.
54. **Hagerman A.E., 2002** - Tannin Handbook. 2^{ème} ed. Miami University. Oxford, USA. 116p.
55. **Facchini PJ., 2001** - Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation and metabolic engineering applications. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, pp: 29–66.
56. **Sachray L., Weiss D., Reuveni M., Nissim-Levi A., Shamir MO., 2002** - Increased anthocyanin accumulation in aster flowers at elevated temperatures due to magnesium treatment. *Physiol Plant.* 114, pp: 559–565.

57. **Shibata M., Amano M., Kawata J., Uda M., 1988** - Breeding process and characteristics of 'Summer Queen', a spray-type chrysanthemum. *Bull Natl Inst Veg Ornament Plants Tea Ser.* 2, pp: 245–255.
58. **Bahorun T., 1997** - Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food Agric. Res. S.*, pp: 83-95.
59. **Marfak. A., 2003** - Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. Thèse de doctorat. Université de Limoges. 220 p.
60. **Aron P.M., 2007** - Composition of Flavonoïd Phenolic Polymers Isolated from red wine during maceration and significance of flavan-3-ols in foods pertaining to biological activity. Thèse de doctorat. Oregon State University. 194 p.
61. **Daayf F., El Bellaj M., El Hassni M., J'Aiti F., El Hadrami I., 2003** - Elicitation of soluble phenolics in date palm (*Phoenix dactylifera*) callus by *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis* culture medium. *Environ. Experiment. Botany.* 49, pp: 41- 47.
62. **Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., 1956** – Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Biochemistry.* 28, pp: 350-356.
63. **Edreva AM., Velikova V., Tsonev T., 2000** - Phenylamides in plants. *Russ J Plant Physiol* 54, 287-301.
64. **Hadacek F., 2002** - Secondary metabolites as plant traits: current assessment and future perspectives. *Crit Rev Plant Sci.* 21, pp: 273–322.
65. **Demmig-Adams B., 2003** - Linking the xanthophyll cycle with thermal energy dissipation. *Photosynth Res.* 76, pp: 73-80.
66. **Gould KS., McKelvie J., Markham KR., 2002** - Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury. *Plant Cell Environ.* 25, pp: 1261–1269.
67. **Sharma N., Tripathi A., 2006** - Effects of *citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiol. Res.* 163, pp: 337–343.
68. **Obst JR., 1998** - Special (secondary) metabolites from wood. In: Bruce A., Palferyman JW, Eds, *Forest products biotechnology.* Taylor & Francis, London. pp: 151–165.
69. **Khan MM., Mohammad TA., 2011** - Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biol Med.* 3, pp: 232–249.

70. **Dixon RA., Paiva N., 1995** – Stressed induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*. 7(7), pp: 1085–1097.
71. **Bryant JP., Chapin FSI., Klein DR., 1983** - Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos*. 40, pp: 357-68.
72. **Winkel-Shirley B., 2001** - Flavonoïd biosynthesis, A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiol*. 26, pp: 485-493.
73. **Gouvea DR., Gobbo-Neto L., Sakamoto HT., Lopes JLC., 2012** - Seasonal variation of the major secondary metabolites present in the extract of *Eremanthus mattogrossensis* less (Asteraceae: Vernoniaceae) leaves. *Quim. Nova*. 35, pp: 2139–2145.
74. **Naghiloo S., Movafeghi A., Delazar A., Nazemiyeh H., Asnaashari S., Dadpour MR., 2012a** - Ontogenetic variation of total phenolics and antioxidant activity in roots: leaves and flowers of *Astragalus compactus* Lam. (Fabaceae). *BiolImpacts*. 2, pp: 105–109.
75. **Verma N., Shukla S., 2015** - Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2(4), pp: 105-113.
76. **Broun P., Liu Y., Queen E., Schwarz Y., Abenes ML., Leibman M., 2006** - Importance of transcription factors in the regulation of plant secondary metabolism and their relevance to the control of terpenoid accumulation. *Phytochem. Rev*. 5, pp: 27–38.
77. **Woldemariam MG., Dinh ST., Oh Y., Gaquerel E., Baldwin IT., Galis I., 2013** - NaMYC2 transcription factor regulates a subset of plant defense responses in *Nicotiana attenuata*. *BMC Plant Biol*. 13, pp: 73-82.
78. **Elger AD., Lemoine DG., Fenner M., Hanley ME., 2009** – Plant ontogeny and chemical defence: older seedlings are better defended. *Oikos*. 118, pp: 767–773.
79. **Barton KE., 2007** - Early ontogenetic patterns in chemical defense in *Plantago* (Plantaginaceae): genetic variation and trade-offs. *Am. J. Bot.* 94, pp: 56–66.
80. **Morariu A., Caulet PR., 2011** - Morphine content variation in *Papaver somniferum* L. during phenological development. *Seria Agron*. 54, pp40–43.
81. **Naghiloo S., Movafeghi A., Delazar A., Nazemiyeh H., Asnaashari S., Dadpour MR., 2012b** - Ontogenic variation of volatiles and antioxidant activity in leaves of *Astragalus compactus* Lam. (Fabaceae). *EXCLI J*. 11, pp: 436–443.
82. **Fahn A., 1988** - Secretory tissues in vascular plants. *New Phytol*. 108, pp: 229–257.

83. **Dey M., Kalia S., Ghosh S., Guha-Mukherjee S., 1998** - Biochemical and molecular basis of differentiation in plant tissue culture. *Curr. Sci.* 74, pp: 591–596.
84. **Zhi-lin Y., Chuan-chao D., Lian-qing C., 2007** - Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. *Afr. J. Biotechnol.* 6, pp: 1266–1271.
85. **Radusiene J., Karpaviciene B., Stanius Z., 2012** - Effect of external and internal factors on secondary metabolites accumulation in St. John's wort. *Bot. Lithuanica.* 18, pp: 101–108.
86. **Wojakowska A., Muth D., Narozna D., Madrzak C., Stobiecki M., Kachlicki P., 2013** - Changes of phenolic secondary metabolite profile in the reaction of narrow leaf lupin (*Lupinus angustifolius*) plants to infections with *Colletotrichum lupini* fungus or treatment with its toxin. *Metabolomics* 9, 575–589.
87. **Ramakrishna A., Ravishankar GA., 2011** - Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal Behav.* 6, pp: 1720–1731.
88. **Said-Al Ahi HAH., Omer EA., 2011** - Medicinal and aromatic plants production under salt stress. *A review. Herba Pol:* 57, pp: 72–87.
89. **Yadav SK., 2010** - Cold stress tolerance mechanism in plants: *a review.* *Agron. Sustain. Dev.* 30, pp: 515–527.
90. **Jochum GM., Mudge KW., Thomas RB., 2007** - Elevated temperatures increase leaf senescence and root secondary metabolite concentrations in the understory herb *Panax quinquefolius* (Araliaceae). *Am. J. Bot.* 94, pp: 819–826.
91. **Koc E., Islek C., Ustun AS., 2010** - Effect of cold on protein, proline, phenolic compounds and chlorophyll content of two pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties. *Gazi J. Sci.* 23, pp: 1–6.
92. **Castro EM., Pinto JEBP., Bertolucci SKV., Malta MR., Cardoso MDG., Silva FAM., 2006** - Coumarin contents in young *Mikania glomerata* plants (Guaco) under different radiation levels and photoperiod. *Acta Farm. Bonaerense.* 25, pp: 387–392.
93. **Shitole SM., Dhumal KN., 2012** - Influence of foliar applications of micronutrients on photosynthetic pigments and organic constituents of medicinal plant *Cassia angustifolia*. *Vahl. Ann. Biol. Res.* 3, pp: 520–526.
94. **Azizi M., Dias A., 2004** - Nitrogen and phosphorous fertilizers affect flavonoids content of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). Proceedings of the Fourth International Iran and Russia Conference, pp: 458–462.

95. **Save R., de Herralde F., Codina C., Sanchez X., Biel C., 2007** - Effects of atmospheric carbon dioxide fertilization on biomass and secondary metabolites of some plant species with pharmacological interest under greenhouse conditions. *Afinidad*. 64 (528), pp: 237–241.
96. **Shukla S., Singh SP., Yadav HK., Chatterjee A., 2006** - Alkaloid spectrum of different germplasm lines of opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *Genet. Resour. Crop Evol.* 53, pp: 533–540.
97. **Badoni R., Semwal DK., Rawat U., 2009** - Altitudinal variation in the volatile constituents of *Artemisia nilagirica*. *Int. J. Essent. Oil Ther.* 3, pp: 66–68.
98. **Namdeo AG., Sharma A., Fulzele DP., Mahadik KR., 2010** - Influence of geographical and climatic conditions on camptothecin content of *Nothapodytes nimmoniana*. *Rec. Natl. Prod.* 4, pp: 64–71.
99. **Ullah N., Khurram M., Amin MU., Khan TA., Khayyam SU., Khan FA., Najeeba U., Ullah S., 2012** - Impact of geographical locations on *Mentha spicata* antibacterial activities. *J. Med. Plants Res.* 6, pp: 1201–1206.
100. **Kumar A., Singhal KC., Sharma RA., Vyas GK., Kumar V., 2013** - Total phenolic and antioxidant activity of *Catharanthus roseus* in different geographical locations of Rajasthan. *Asian J. Exp. Biol. Sci.* 4, pp: 155–158.
101. **Dobias P., Pavlíkova P., Adam M., Eisner A., Benova B., Ventura K., 2010** - Comparison of pressurised fluid and ultrasonic extraction methods for analysis of plant antioxidants and their antioxidant capacity. *Central European Journal of Chemistry.* 8, pp: 87-95.
102. **Sefidkon F., Bakhshi K., 2006** – Influence of drying and extraction methods on yield and chemical composition of the essential oil of *Satureja hortensis*. *Food chemistry.* 99(1), pp: 19-23.
103. **Roby M.H.H., Sarhan M. A., Selim K.A.H., Khalel K.I. 2013** - Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products.* 43, pp: 827-831.
104. **Bandoniene D., Murkovic M., Venskutonis P.R., 2005** - Determination of rosmarinic acid in sage and borage leaves by high-performance liquid chromatography with different detection methods. *Journal of Chromatographic Science.* 43, pp: 372-376.
105. **Scalbert A., 1991** - Antibacterial properties of tannins. *Phytochemistry.* 30, pp: 3875-3883.
106. **Riffel A., Medina L-F., Stefani V., Santos R-C., Bizani S., Brandelle N., 2002** - In vitro antibacterial Activity of a new series of 1,4- napthaquinones. *Brazillian journal of medical and biological research.* 35(7),pp: 811-818

107. **Benidicte F., Hooper D.C., 1998** - Effect of mutation in GrlA of topoisomerase IV from *staphylococcus aureus* on Quinolone and Coumarine activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 42(8), pp: 2109- 2112.
108. **Benkiki N., 2006** – Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes: *Ruta montana*, *Matricaria pubscens* et *Hypericum peroliatum*. Thèse doctorat. Université El Hadj Lakhdar de Batna 1. 203p.
109. **Alan L., Miller N.D., 1996** - antioxydant flavonoides, function and clinical usage. *Alternative Medecine, Review*. 1(2), pp: 4-10.
110. **Jones G.A.T.A., McAllister I.A.D., Cheng K-J., 1994** - Effect of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia Scop*) Condensed Tannins on Growth And Proteolysis by four Satains of Rumminal Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 60 (4), pp: 1374-1378.
111. **Nguz K., 1996** - Evaluation de la dégradation des tannins. *Phytochimiques*. 9, pp: 225-230.
112. **Murphy Cowan M., 1999** - Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 12, pp: 564–582.
113. **De Billerbeck V.-G., Roques C., Vanrière P., Marquier P., 2002** - Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles *Hygiènes*. 3, pp: 248- 251.
114. **De Billerbeck V.G., 2007** - HE et bacteria résistantes aux Antibiotique Phytothérapie 5, 249-253.
115. **Mebarki N., 2010** – Extraction de l'huile essentielle de *thymus fontanesii* dt application à la formulation d'une forme médicamenteuse- antimicrobienne. Thèse magister. Université de Boumerdès. 124p.
116. **Iserin P., 2001** - Encyclopédie des plantes médicinales. Ed, Larousse Bourdasse, Paris. 335p.
117. **Garreta R., 2007** - Des simples à l'essentiel: De l'herboriste à l'aromathérapie. Ed, les Anthropologiques, Toulouse. 367p.
118. **Dorman HJD., Deans SG., 2000** - Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 88, 308–316.
119. **Bekhechi C., Attk- Bekkara F., Abdelouhib D.E., 2008** - Composition et activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*origanum glandulosum* d'Algérie. *phytothérapie*. 6, pp: 153-159.
120. **Sokmen A., Gulluce M., Akpulat A., 2004** – The in vitro antibacterial and antioxidant activity of the essential oils and methanol extracts of endemic *thymus spathulifolius*. *Food control*. 15, pp: 627-634.

121. **Lahlou M., 2004** - Methods to study the phytochemistry and bioactivity of the essential oils. *Phytotherapy research*. 18, pp: 435-448.
122. **Rota MC., Herrea A., Martinez C., 2008** - Antibacterial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*. *T. zygis* and *T. lymolis* essential oils. *Food control*. 19, pp: 681- 687.
123. **Marzouk Z., Neffati A., Marzouk B., 2006** - Chemical composition and antibacterial and antimutagenic activity of Tunisian *Rosmarinus officinalis* L. oil from Kasrine. *Journal of food Agriculture Environment*. 4, pp: 61-65.
124. **Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R., Wyllie S.G., 2000** - The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol*. 88, pp: 170–175.
125. **Harkenthal M., Reichling J., Geiss H.K., Saller R., 1999** - Comparative study on the in vitro antibacterial activity of Australian tea tree oil, cajuput, oil, niaouli oil, manuka oil, Kanuka oil, and eucalyptus oil. *Pharmazie*. 54(6), pp: 460-463.
126. **Benhamou N., Rey P., 2012** - Stimulateurs des défenses naturelles des plantes: une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable. *Phytoprotection*. 92, pp: 1-23.
127. **Jeffree C.E., 1996** - Structure and ontogeny of plant cuticles. pp: 33-82.
128. **Iwasaki T., Y Hioki., 1988** - Enhancement of biocide. U.S. Pat. 4, pp: 762,547.
129. **Nicholson R.L., Hammerschmidt R., 1992** - Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol*. 30, pp: 369-389.
130. **King A., Young G., 1999** - Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J. Am. Diet. Assoc*. 99, pp: 213- 218.
131. **Evans WC., 1989** - Trease and Evans' Textbook of Pharmacognosy, 13eme ed, Bailliere, Tindall, London. 28p.
132. **Kuc J., 1990** - Compounds from plants that regulate or participate in disease resistance, bioactive compounds from plants, Wiley, Chichester (Ciba). *Foundation Symposium*. 154, pp: 213-228.
133. **Kuc J., 1985** - Increasing crop productivity and value by increasing disease resistance through non-genetic techniques, In: Forest potentials: productivity and value, Ballard R. Ed, Weyerhaeuser Company Press, Centralia. pp: 147-190.
134. **Garcia-Rodriguez R.V., Gutierrez-Rebolledo G.A., Mendez-Bolaina E., Sanchez-Medina A., Maldonado-Saavedra M.A., Dominguez-Ortiz A., 2014** - *Cnidocolus chayamansa* Mc Vaugh an important antioxidant, anti-inflammatory and cardioprotective plant used in Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*. 151, pp: 937-943.

135. **Jürgen R., Paul S., Ulrike S., Reinhard S., 2009** - Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties— an Overview. *Forsch Komplementmed.* 16, pp: 79–90.
136. **Prasad G., Jamkhande T, Vikas A., Suryawanshi N., Tukaram M., Kaylankar A., Shailesh L., Patwekar R., 2016** - Biological activities of leaves of ethnomedicinal plant, *Borassusfla bellifer* Linn. (Palmyra palm): An antibacterial, antifungal and antioxidant evaluation. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University.* 54(1), pp: 59-66.
137. **Milane H., 2004** - La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques, thèse de doctorat. Strasbourg.
138. **Louise H., Taylor., Latham M., Mark E. J., 2001** - Woolhouse, «Risk factors for human disease emergence», *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 356, pp: 983–989
139. **Gangoué J., 2007** - Caractérisation des beta-lactamases et leur inhibition par les extraits de plantes médicinales. Thèse de doctorat, Liège.
140. **Haddouchi F., Lazouni H., Ahammer KA., Carson CF., Riley TV., 1999** - Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 86, pp: 985-990.
141. **Muanda FN., 2010** - Identification de polyphénols, Evaluation de leur Activité Antioxydante et Etude de leurs Propriétés Biologiques. Thèse de Doctorat. Université Paul Verlaine-Metz. 239p.
142. **Wojciechowski MF., Lavin M., Sanderson MJ., 2004** – A phylogeny of legums (Leguminosae) based on analysis of the plastid *matk* gene resolves many well-supported subclades within the family. *American journal of Botany.* 91(11), pp: 37-41.
143. **Battandier J.A., Trabut L.C., 1902** - Flore synoptique de l'Algérie et de la Tunisie. Adolphe Jourdan éditeur, Alger. 460p.
144. **Liu K.Y., Zhan T.J., Gao W.Y., Chen H.X., Zheng Y.N., 2006** - Phytochemical and pharmacological research progress in *Tussilago farfara* L. *China Journal of Chinese Materia Medica.* 31, pp: 1837-1841.
145. **Kurihara T., Kikuchi M., 1980** - Studies of the constituents of flowers. XIII. The flower components of *Cytisus scoparius*. *Yakugaku Zasshi.* 100, pp: 1054-1057.
146. **Tominaga T., Dubourdieu D., 1997** - Identification of 4-Mercapto-4-methylpentan-2-one from the Box Tree (*Buxus sempervirens* L.) and Broom (*Sarothamnus scoparius* (L.) Koch.). *Flavour and Fragrance Journal.* 12, pp: 373-376.

147. **Aourahoum K., Aissaoui M., Fazouane F., Larit F., Chalard P., Chalchat J.C., Figueredo G., Benayache F., Benayache S., 2013** - Essential oil of *Cytisus triflorus* L' Her. *Der Pharmacia Lettre*. 5 (5), pp: 276-279.
148. **Wink M., Witte L., Hartmann T., 1981** - Quinolizidine alkaloid composition of plants and of photomixotrophic cell suspension cultures of *Sarothamnus scoparius* and *Orobanche rapum-genistae*. *Planta Medica*. 43, pp: 342-352.
149. **Brum-Bousquet M., Paris R.R., 1974** - Flavonoids of common broom (*Sarothamnus scoparius*). *Bull Liais Group Polyphen*. 5, pp: 34-37.
150. **Ammar H., López S., González J.S., Ranilla M.J., 2004** - Seasonal variations in the chemical composition and in vitro digestibility of some Spanish leguminous shrub species. *Animal Feed Science and Technology*. 115, pp: 327-340.
151. **McClintock E., 1985** - Brooms. *Fremontia*. 19, pp: 17-18.
152. **Anon J.R., Anon M.G., Fraga F., Palacios J., Regueira L.N. 1994** - Forest waste as a potential alternative energy source. *Journal of Thermal Analysis*. 41, pp: 1393-1398.
153. **Gowthamarajan K., Kulkarni T.G., Mahadevan N., Santhi K., Suresh B., 2002** - Antimicrobial activity of selected herbal extracts. *Ancient Science of Life*. 21, pp: 188-190.
154. **Guignard B., Coste C., Menigaux C., Chauvin M., 2001** - Reduced isoflurane consumption with the bispectral index monitoring. *Acta Anaesthesiol Scand*. 45, pp: 308-140.
155. **Sticher O., Bedir E., Tasdemir D., Calis I. et Zerbe O., 1999** - Neoclerodane diterpenoids from *Teucrium polium*. *Phytochemistry*. 51, pp: 921-925.
156. **Beghami Y., 2003** - Contribution à l'étude de la flore et de quelques paramètres de l'environnement de la cédraie du massif de Chélia (Aurès). Thèse de magistère, INS d'Agronomie, université de Batna. 88p.
157. **Fourment R., 1942** - Répertoire des plantes Médicinales et Aromatiques d'Algérie. 159p.
158. **Caddick L.R., Rudall P.J., Wilkin P., Hedderson T.A.J., Chase M.W., 2002** - Phylogenetics of dioscoreales based on combined analyses of morphological and molecular data. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 138, pp:123-144.
159. **Wassel G., Ahmed SS., 1974** - Chemical composition of the wild Egyptian plant *Teucrium polium*. *Pharmazie*. 29, pp: 351-352.
160. **Djabou N., Lorenzi V., Guinoiseau E., Andreani S., Giuliani M.C., Desjobert J.M., 2013** - Phytochemical composition of Corsican *Teucrium* essential oils and antibacterial activity against food borne or toxi-infectious pathogens. *Food Control*. 3, pp: 354-363.

161. **Moghtader M., 2009** - Chemical composition of the essential oil of *Teucrium polium* L. from Iran. *Am-Euras. J. Agric. Environ. Sci.* 5, pp: 843–846.
162. **Proestos C., Sereli D., Komaitis M., 2006** - Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chemistry.* 95, pp: 44-52.
163. **Marino S.D., Festa C., Zollo F., Incollingo F., Raimo G., Evangelista G., Iorizzi M. 2012** - Antioxidant activity of phenolic and phenylethanoid glycosides from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry.* 133(1), pp: 21-28.
164. **Bedir E., Tasdemir D., Çalis I., Zerbe O., Sticher O. 1999** - Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium polium*. *Phytochemistry.* 51, pp: 921-925.
165. **Panovska TK., Kulevanova S., Gjorgoski I., Bogdanova M., Petrushevska G. 2007** - Hepatoprotective effect of the ethyl acetate extract of *Teucrium polium* L. against carbontetrachloride-induced hepatic injury in rats. *Acta Pharmacy.* 57, pp: 241.248.
166. **Kawashty S.A., Gamal El-din E.M., Saleh N.A.M., 1997** - The favonoid chemosystematics of two *Teucrium* species from Southern Sinai, Egypt. *Biochemical Systematics and Ecology.* 27, pp: 657-660.
167. **Ricci D., Fraternali D., Giamperi L., Bucchini A., Epifano F., Burini G., Curini M., 2005** - Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (Lamiaceae). *Journal of Ethnopharmacology.* 98, pp: 195–200.
168. **Midorikawa K., Banskota A.H., Tezuka Y., Nagaoka T., Matsushige K., Message D., Huertas A.A.G., Kadota S., 2001** - Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of propolis. *Phytochemical Analysis.* 12, pp: 366-373.
169. **Šamec D., Durgo K., Gruz J., Kremer D., Kosalec I., Piljac-Zegarac J., Salopek-Sondi B., 2015** - Genetic and phytochemical variability of six *Teucrium arduini* L. populations and their antioxidant/prooxidant behaviour examined by biochemical, macromolecule- and cell-based approaches. *Food Chemistry.* 186, pp: 298–305.
170. **Singleton V.L., Rossi J.A., 1965** - Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungsti acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture.* 16, pp: 144-158.
171. **Lagnika L., 2005** - Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur. Strasbourg. 249p.
172. **Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W., 1999** - The determination of Flavonoïds contents in mulberry and their scanenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry.* 64, pp: 555-559.

173. **European Pharmacopoeia., 2004** – 5eme ed, Council of Europe: Strasbourg Cedex. France. pp: 217–218.
174. **NIST/EPA/NIH., 2002** - Mass Spectral Library Gaithersburg. National Institute of Standard and Technology.
175. **Adams R.P., 2007** - Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/mass Spectrometry. Allured publishing corporation.
176. **Zhang H., Kong B., Xiong YL., Sun X., 2009** - Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4 °C. *Meat Science*. 81, pp: 686-692.
177. **Bagamboula M., Uyttendaele J., Debevere M., 2003** - Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*. 21, pp: 33-42.
178. **Deng Y., Zhao Y., Padilla-Zakour O., Yang G., 2015** - Polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of leaf and bark extracts of *Solidago canadensis* L. *Industrial Crops and Products*. 74, pp: 803–809.
179. **Şahin F., Karaman I., Güllüce M., Ögütçü H., Sengül M., Adigüzel A., Öztürk S., Kotan R., 2003** – Evaluation of antimicrobial activities of *Satureja hortensis* L. *Journal of Ethnopharmacology* 87, 61–65.
180. **Jing-En L., Song-Tao F., Zeng-Hui Q., Chang Li., Shao-Ping Nie., 2015** - Total flavonoids content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from *Moslachinensis* Maxim. cv. Jiangxiangru. *LWT-Food Science and Technology*. 64, pp: 1022-1027.
181. **O'Donnell F., Smyth T.J., Ramachandran V.N., Smyth W.F., 2010** - A study of the antimicrobial activity of selected synthetic and naturally occurring quinolines. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 35, pp: 30–38.
182. **Szewczyk K., Zidorn C., Biernasiuk A., ŁukaszKomsta T., Granica S., 2016** - Polyphenols from *Impatiens* (Balsaminaceae) and their antioxidant and antimicrobial activities. *Industrial Crops and Products*. 86, pp: 262–272.
183. **Pavithra PS., Janani VS., Charumathi KH., Indumathy R., Potala S., Verma RS., 2010** - Antibacterial activity of plants used in Indian herbal medicine. *Int J Green Pharm*. 3, pp: 23-8.
184. **Humeera N., Kamili AN., Bandh SA., Amin S., Lone BA., Gousia N., 2010** – Antimicrobial and antioxidant activities of alcoholic extracts of *Rumex dentatus* L. *Microb Pathog*. 57, pp: 17-20.

185. **Adrar N., Oukil N., Bedjou F., 2015** - Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. *Industrial Crops and Products*. 88(15), pp: 112-119.
186. **Office national de la météorologie (ONM), 2011** - Données climatiques 1995-2015.
187. **Hsu B., Coupar IM., 2006** - Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the Doum palm, *Hyphaene thebaica*. *Food Chemistry*. 98, pp: 317-328.
188. **Bakari S., Ncir M., Felhi S., Hajlaoui H., Saoudi M., Gharsallah N., Kadri A., 2015** - Chemical Composition and in vitro Evaluation of Total Phenolic, Flavonoid, and Antioxidant Properties of Essential Oil and Solvent Extract from the Aerial Parts of *Teucrium polium* Grown in Tunisia. *Food Sci. Biotechnol.* 24 (6), pp: 1943-1949.
189. **Ammar I., Ennouri M., Khemakhem B., Yangui T., Attia H., 2012** - Variation in chemical composition and biological activities of two species of *Opuntia* flowers at four stages of flowering. *Industrial Crops and Products*. 37, pp: 34-40.
190. **Astarita L.V., Santarém E.R., 2008** - Plant secondary metabolism in response to the environment. *Adv. Plant Physiol.* 10, pp: 31-89.
191. **Abad M.J., Bessa A.L., Ballarin B., Aragon O., Gonzales E., Bermejo P., 2006** - Anti-inflammatory activity of four *Bolivian Baccharis* species (Compositae). *Journal of Ethnopharmacology*. 103, pp: 338-344.
192. **Ksouri R., Megdiche W., Falleh H., Trabelsi N., Boulaaba M., Smaoui A., Abdelly C., 2008** - Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *C. R. Biol.* 331, pp: 865–873.
193. **Khaled-Khodja N., Boulekbache-Makhlouf L., Madani K., 2014** - Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. *Industrial Crops and Products*. 61, pp: 41-48.
194. **McGaw L.J., Jäger A.K., Van Staden J., 2002** - Variation in antibacterial activity of *Schotia* species. *South African Journal of Botany*. 68, pp: 41–46.
195. **Kamatou G.P.P., Van Zyl R.L., Van Vuuren S.F., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G., Viljoen A.M., 2008** - Seasonal variation in essential oil composition, oil toxicity and the biological activity of solvent extracts of three South African *Salvia* species. *South African Journal of Botany*. 74, pp: 230-237.
196. **Darabpour E., Motamedi H., Seyyed Nejad S.M., 2010** - Antimicrobial properties of *Teucrium polium* against some clinical pathogens. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 20(10), pp: 124-127.

197. **Carlos Silva J., Rodrigues S., Feás X., Estevinho L.M., 2012** - Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. *Food Chem. Toxicol.* 50, pp: 1790-1795.
198. **Popov S.S., Marekov N.L., Konaklieva M.I., Panayotova M.I., Dimitrova-Konaklieva S., 1985** - Sterols from some black sea Ulvaceae. *Phytochemistry.* 24, pp: 1987-1990.
199. **Lim T.Y., Lim Y.Y., Yule C.M., 2009** – Evaluation of antioxidant, antibacterial and anti-tyrosinase activities of four *Macaranga* species. *Food Chemistry.* 114, pp: 594–599.
200. **Osbourn A.E., 2003** - Molecules of interest: saponins in cereals. *Phytochemistry.* 62, pp: 1-4.
201. **Zongo C., Savadogo A., Somda K.M., Koudou J., Traore A.S., 2011** - In vitro evaluation of the antimicrobial and antioxidant properties of extracts from whole plant of *Alternanthera pungens* H.B. & K. and leaves of *Combretum sericeum* G. Don. *International Journal of Phytomedecine.* 3, pp: 182-191.
202. **Park S-C., Moon J.C., Shin S.Y., Son H., Jung Y.J., Kim N-H., Kim Y-M., Jang M-K., Lee J.R., 2016** - Functional characterization of alpha-synuclein protein with antimicrobial activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 478, pp: 924-928.
203. **Wink M., 2008b** - Evolutionary advantage and molecular modes of action of multi-component mixtures used in phytomedicine. *Current Drug Metabolism.* 9, pp: 996-1009.
204. **Nabavi B., Talebi-Jahromi Kh., Goldansaz S.H., 2010** - Investigation of repellent effect of poly-Germander *Teucrium polium* essential oil against cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* and confused flour beetle *Tribolium confusum*. Processings of the 19th Iranian Plant Protection Congress. Tehran. Iran. pp: 305.
205. **Pavela R., 2008** - Larvicidal effects of various Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res.* 102, pp: 555-559.
206. **Bradley D. J., Kjellbom P., Lamb C.J., 1992** - Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein. *a novel, rapid defense response, Cell.* 70, pp: 21-30.
207. **Hammond-Kosack K.E., Jones J.D.G., 1997** - Plant disease resistance genes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 48, pp: 575-607.
208. **Showalter A.M., Bell J.N., Cramer C.L., Bailey J.A., Varner J.E., Lamb C.J., 1985** - Accumulation of hydroxyproline-rich glycoprotein mRNAs in response to fungal elicitor and infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, pp: 6551-6555.

209. **Klarzynski O., Fritig B., 2001** - Stimulation des défenses naturelles des plantes. *C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie / Life Sciences*. 324, pp: 953-963.
210. **Özkan G., SafdÂç O., Özcan M., 2003** - Inhibition on pathogenic bacteria by essential oils at different concentrations. *Food Science and Technology International*. 9(2), pp: 85-88.
211. **Hashem M., 2011** - Antifungal properties of crude extracts of five Egyptian medicinal plants against dermatophytes and emerging fungi. *Mycopath*. 172, pp: 37-46.
212. **Lores M., Pájaro M., Á-Casas M., Domínguez J., García-Jares C., 2015** - Use of ethyl lactate to extract bioactive compounds from *Cytisus scoparius*: Comparison of pressurized liquid extraction and medium scale ambient temperature systems. *Talanta* 140, 134–142.
213. **Mckey D., 1979** - The distribution of secondary compounds within plants. In: **Rosenthal G.A., Janzen D.H.** Ed, *Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites*. Academic Press, San Diego.
214. **Wink M., Mohamed G.I.A., 2003** - Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the *rbcl* gene. *Biochemical Systematics and Ecology*. 31, pp: 897-917.
215. **Tiwari B.K., Valdramidis V.P., O'Donnell C.P., Muthukumarappan K., Bourke P., Cullen P.J., 2009** - Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57, pp: 5987-6000.
216. **McCaskill D., Gerschnzon J, Croteau R., 1992** - Morphology and monoterpene biosynthetic capability of secretory cell clusters isolated from glandular trichomes of peppermint (*Mentha piperita L.*). *Planta*. 187, pp: 445–454.
217. **Nik ZB, Mirza M, Ghaffari M., 2008** - Effect of drought stress on growth and essential oil contents in *Parthenium argentatum* Gray. *J Essent Oil Bear Plants*. 11, pp: 423-429.
218. **Monroy AF., Dhindsa RS., 1995** - Low-temperature signal transduction: induction of cold acclimatization-specific genes of alfalfa by calcium at 25 °C. *Plant Cell*. 7, pp: 321-331.
219. **Padda MS., Picha DH., 2008** - Effect of low temperature storage on phenolic composition and antioxidant activity of sweet potatoes. *Post harvest Biol Technol*. 47, pp: 176-180.
220. **Jamali CA., Kasrati A., Bekkouche K., Hassani L., Wohlmuth H., Leach D., Abbad A., 2013** - Phenological changes to the chemical composition and biological activity of the essential oil from Moroccan endemic thyme (*Thymus maroccanus* Ball). *Industrial Crops and Products*. 49, pp: 366-372.

221. **Palá-Paúl J., Pérez-Alonso MJ., Velasco-Negueruela A., Palá-Paúl R., Sanz J., Conejero F., 2001** - Seasonal variation in chemical constituents of *Santolina rosmarinifolia* L.ssp. *rosmarinifolia*. *Biochem. Syst. Ecol.* 29 (7), 663–672.
222. **Hosni K., Msaada K., Ben Taârit M., Marzouk B., 2011** - Phenological variations of secondary metabolites from *Hypericum triquetrifolium* Turra. *Biochem. Syst. Ecol.* 39 (1), pp: 43-50.
223. **Aburjai T., Hudaib M., Cavrini V., 2006** - Composition of the Essential Oil from Jordanian Germander (*Teucrium polium* L.). *J. Essent. Oil Res.* 18, pp: 97-99.
224. **Al-Qudah T.S., Shibi R.A., Alali F.Q., 2011** - In vitro propagation and secondary metabolites production in wild germander (*Teucrium polium* L.). *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 47, pp: 496-505.
225. **Antunes T., Sevinate-Pinto I., Barroso J.G., Cavaleiro C., Salgueiro L.R., 2004** - Micromorphology of trichomes and composition of essential oil of *Teucrium capitatum*. *Flav. Fragr. J.* 19, pp: 336–340.
226. **Kabouche A., Kabouche Z., Ghannadi A., Sajjadi S.E., 2007** - Analysis of the Essential Oil of *Teucrium polium* ssp. *aurasiacum* from Algeria. *J. Essent. Oil Res.* 19, pp: 44-46.
227. **Kovacevic N.N., Lakusic B.S., Ristic M., 2001** - Composition of essential oils of seven *Teucrium* species from Serbia and Montenegro. *J. Essent. Oil Res.* 13, pp: 163-165.
228. **Perez-Alonso M.J., Velasco-Negueruela A., Lopez-Saez J.M., 1993** - The essential oils of two Iberian *Teucrium* species. *J. Essent. Oil Res.* 5, pp: 397-402.
229. **Vahdani M., Faridi P., Zarshenas M.M., Javadpour S., Abolhassanzadeh Z., Moradi N., Bakzadeh Z., Karmostaji A., Mohagheghzadeh A., Ghasemi Y., 2011** - Major compounds and antimicrobial activity of essential oils from five Iranian endemic medicinal plants. *Pharmacog. J.* 3, pp: 48–53.
230. **Schwob I., Bessiere J-M, Masotti J., Viano J., 2004** - Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. *Biochemical Systematics and Ecology.* 32, pp: 735–745.
231. **Simmons D., Parsons R.F., 1987** - Seasonal variation in the volatile leaf oils of two *Eucalyptus* species. *Biochemical Systematics and Ecology.* 2, pp: 204-215.
232. **Sadeghi H., Jamalpoor S., Mohammad Hassan Shirzadi MH., 2014** - Variability in essential oil of *Teucrium polium* L. of different latitudinal populations. *Industrial Crops and Products.* 54, pp: 130–134.

233. **Saracoglu V., Arfan M., Shabir A., Hadjipavlou-Litina D., Skaltsa H., 2007** - Composition and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium royleanum* Wall. Ex Benth growing in Pakistan. *Flav. Fragr. J.* 22, pp: 154–157.
234. **Zhang P., Fuentes S., Siebert T., Krstic M., Herderich M., Barlow E.W.R., Howell K., 2016** - Terpene evolution during the development of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz grapes, *Food Chemistry.* 204(1), pp: 463-474.
235. **Tholl D., 2006** - Terpene synthases and the regulation: diversity and biological roles of terpene metabolism. *Curr.Opin. Plant Biol.* 9, pp: 297–304.
236. **Kakaraparthi P.S., Srinivas K.V.N.S., Kotesk K.J., Kumar A.N., Rajput D.K., Anubala S., 2015** - Changes in the essential oil content and composition of palmarosa (*Cymbopogon martini*) harvested at different stages and short intervals in two different seasons. *Industrial Crops and Products.* 69, pp: 348–354.
237. **Dhouioui M., Boulila A., Chaabane A., Zina MS., Casabianca H., 2016** - Seasonal changes in essential oil composition of *Aristolochia longa* L.ssp. *paucinervis* Batt. (Aristolochiaceae) roots and its antimicrobial activity. *Industrial Crops and Products.* 83, pp: 301–306.
238. **Kotan R., Kordali S., Cakir A., 2007** - Screening of antibacterial activities of twenty-one oxygenated monoterpenes, *Zeitschrift fur Naturforschung – Section C. Journal of Biosciences.* 62 (7-8), pp: 507-513.
239. **Agoramoorthy G., Chandrasekaran M., Venkatesalu V., Hsu M.J., 2007** - Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your-eye mangrove from India. *Braz. J. Microbiol.* 38, pp: 739–742.
240. **Burt S., 2004** - Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94 (3), pp: 223–253.
241. **Bassolé I. H. N., Juliani H. R., 2012** - Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules.* 17, pp: 3989-4006.
242. **Van Vuuren S. F., Viljoen A. M., 2007** - Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. *Flavour and Fragrance Journal.* 22, pp: 540-544.
243. **Chopra I., Greenwood D., 2001** - Antibacterial agents: basis of action. In: Battista, J. Ed, *Encyclopedia of Life Sciences.* Wiley www.els.net.
244. **Chan E.W.C., Lim Y.Y., Omar M., 2007** - Antioxidant and antibacterial activity of leaves of *Etingera* species (*Zingiberaceae*) in Peninsular Malaysia. *Food Chemistry.* 104, pp: 1586–1593.

245. Longbottom C.J., Carson C.F., Hammer K.A., Mee B.J., Riley T.V., 2004 - Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to Melaleuca alternifolia (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energy-dependent cellular processes. *J. Antimicrob. Chemother.* 54 (2), pp: 386–392.
246. Harrewijn P., Minks A.K., Mollema C., 1994/1995 - Evolution of plant volatile production in insect–plant relationships. *Chemoecology.* 5(6), pp: 55–73.
247. Kremer D., Müller ID., Dunkić V., Vitali D., Stabentheiner E., Oberländer A., Bezić A., Kosalec I., 2012 - Chemical traits and antimicrobial activity of endemic *Teucrium arduini* L. from Mt Biokovo (Croatia). *Cent. Eur. J. Biol.* 7(5), pp: 941-947.
248. Mendoza L., Wilkens M., Urzua A., 1997 - Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology.* 58, pp: 85–88.
249. Daferera D.J., Ziogas B.N., Polissiou M.G., 2000 - GC–MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their gungitoxicity on *Penicilium digitatum*. *J. Agric. Food Chem.* 48, pp: 2576–2580.
250. Sharma AK., Gangwar M., Chtaurvedi AP., Sinha ASK., Tripathi YB., 2012 - Comparative analysis of phenolic and flavonoid content of *Jatropha curcas* L. *Plant Arch.* 12, pp: 823–826.
251. Amri I., Hamrouni L., Gargouri S., Hanana M., Mahfoudhi M., Fezzani T., Ferjani E., Jamoussi B., 2011a - Chemical composition and biological activities of essential oils of *Pinus patula*. *Nat. Prod. Commun.* 6, pp: 1531–1536.
252. Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernandez-Lopez J., Perez-Avarez J., 2008 - Antifungal activity of Lemon (*Citrus Lemon* L.) mandarin (*Citrus reticulata* L.), grape fruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control.* 19, pp: 1130–1138.
253. Ben Ghnaya A., Amri I., Hanana M., Gargouri B., Jamoussi B., Romane A., Hamrouni L., 2016 – *Tetraclinis articulata* (Vahl.) Masters essential oil from Tunisia: Chemical characterization and herbicidal and antifungal activities assessment. *Industrial Crops and Products.* 83, pp: 113–117.
254. Cimanga K., Kambu K., Tona L., Apers S., De Bruyne T., Hermans N., Totte J., Pieters L., Vlietinck A.J., 2002 - Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology.* 79, pp: 213–220.

255. **Hernandez T., Canales M., Avila J.G., García A.M., Martínez A., Caballero J., Romo de Vivar A., Lira R., 2005** - Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lantanaa chyran thifolia* Desf. (Verbenaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 96, pp: 551-554.
256. **Hisham A., Pathare N., Al-Saidi S., 2006** - The composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Teucrium stocksianum subsp. stocksianum* leaf from Oman. *NaT. Prod. Commun.* 1, pp: 195–199.
257. **Zehra Kucukbay F., Yildiz B., Kuyumcu E., Gunal S., 2011** - Chemical Composition and Antimicrobial Activities of the Essential Oils of *Teucrium orientale* var. *orientale* and *Teucrium orientale* var. *puberulens*. *Chemistry of Natural Compounds* 47(5), pp: 833-836.
258. **Formisano C., Napolitano F., Rigano D., Apostolides N., Franco Piozzi A., Senatore F., 2010** - Essential Oil Composition of *Teucrium divaricatum* Sieb.ssp. *villosum* (Celak.) Rech.fil. Growing Wild in Lebanon. *J Med Food*. 13 (5), pp: 1281–1285.
259. **Moghaddam M., Ghasemi Pirbalouti A., Mehdizadeh L., Pirmoradi M.R., 2015** - Changes in composition and essential oil yield of *Ocimum ciliatum* at different phenological stages. *Eur. Food Res. Technol.* 240, pp: 199–204.
260. **Nemeth E., 2005** - Essential Oil Composition of Species in the Genus *Achillea*. *J Essent Oil Res.* 17, pp: 501–512.
261. **Bahl JR., Garg SN., Bansal RP., Naqui AA., Singh V., Kumar S., 2000** - Yield and quality of shoot essential oil from the vegetative, flowering and fruiting stage crops of *Ocimum basilicum* cv Kusumohak. *J Med Aroma Plant Sci.* 22, pp: 743–746.
262. **Sangwan N.S., Farooqi A.H.A., Shabih F., Sangwan R.S., 2001** - Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation.* 34, pp: 21-29.
263. **Sellami I.H., Maamouri E., Chahed T.H., Wannas W., Kchouk M., Marzouk B., 2009** - Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.). *Ind. Crops Prod.* 30, pp: 395–402.
264. **Tonçer O., Kzi S., 2005** - Determination of yield and yield components in wild thyme (*Thymbra spicata* L. var. *spicata*) as influenced by development stages. *Hortic Sci.* 32(3), pp: 100–103.
265. **Ozcan M.M., Chalchat J.C., 2006** - Effect of collection time on chemical time on chemical composition of the essential oil of *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum* growing wild in Turkey. *Eur. Food Res. Technol.* 224, pp: 279–281.
266. **Fahey J.W., Stephenson K.K., 1999** - Cancer chemoprotective effect of cruciferous vegetables. *Hort Science.* 34, pp: 4-8.

267. **Farnham M.w., Stephenson K.K., Fahey J.w., 2000** – The capacity of broccoli to induce a mammalian chemoprotective enzyme varies among inbred lines journal of the American society of horticultural science.125, 482-488.
268. **Booth E.j., Walker K.C., 1992** - The effect of site and foliar sulfur on oil seed rape: comparison of sulfur responsive and non-responsive seasons. *Phyton* 32, pp: 9-13.
269. **Butcher D.N., EL-TIGANI, S., INGRAM, D.S., 1974** - The role of indole glucosinolate in the club root disease of the Cruciferae. *Physiological plant pathology*. 4(127), pp: 140-164.
270. **BODNARYK R.P., 1992** - Effect of wounding on glucosinolates in the cotyledons of oil seed rape and mustard. *Phytochemistry*. 31, pp: 2671-2677.
271. **Telci I., Toncer O.G., Sahbaz N., 2006** - Yield, essential oil content and composition of *Coriandrum sativum* cultivars (var. vulgare Alef. and var. microcarpum DC.) grown in two different locations. *J. Essent. Oil Res.* 18, pp: 189–193.
272. **Gudzic B., Djikovic D., Vajs V., Palic R., Stojanovic G., 2002** - Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hypericum maculatum* Crantz. *Flavour Frag. J.* 17(5), pp: 392-394.
273. **Helander I.M., Alakomi H-L, Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E.J. , Gorris L.G.M., Wright A.v., 1998** - Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 46 (9), pp: 3590–3595.
274. **Fontenelle R.O.S., Morais S.M., Brito E.H.S., Kerntopf M.R., Brilhante R.S.N., Cordeiro R.A., Tome A.R., Queiroz M.G.R., Nascimento N.R.F., Sidrim J.J.C., Rocha M.F.G., 2007** - Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian *Caatinga* biome. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*. 59, pp: 934-940.
275. **Boukhatem MN., Ferhat MA., Kameli A., Saidi F., Tchoketch Kebir H., 2014** – Lemon grass (*Cymbopogon citrates*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. *Libyan Journal of Medicine*. 9(1), pp: 58-69.
276. **Henriques J.A.P., Valsa J.O., Gomes R.A., 1987** - Utilização de testes com micro-organismos para detecção de atividades mutagênicas e/ ou potencialmente oncogênicas, in: Pinto, S.O.C., Ed, *Genética Molecular de Micro-organismos*. Manole, São Paulo.
277. **Moleyar V., Narasimham P., 1986** - Antifungal activity of some essential oil components. *Food Microbiology*. 3, pp: 331–336.
278. **Yu J., Lei J., Yu H., Cai X., Zou G., 2004** - Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Scutellaria barbata*. *Phytochemistry* 65(7), pp: 881-884.

- 279. Lograda T., Ramdani M., Figueredo G., Chalchat J.C., Chalard P., 2012 -** Essential oil composition and antimicrobial activity of *Genista microcephala* Coss. et Dur. *Int. J. Med. Arom. Plants.* 2, pp: 75–79.
- 280. El-Hosseiny L., El-Shenawy M., Haroun M., Abdullah F., 2014 –** Comparative evaluation of the inhibition effect of some essential oils with antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Antibiot.* ID 586252, 5 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/586252>
- 281. Bodoprost J., Rosemeyer H., 2007 -** Analysis of phenacylester derivatives of fatty acids from human skin surface sebum by reversed-phase HPTLC: chromatographic mobility as a function of physico-chemical properties. *Int. J. Mol. Sci.* 8, pp: 1111–1124.

APPENDICE A

LISTE DES SYMBOLES ET D'ABREVIATIONS

ACP	: Analyse en Composantes Principales
ACH	: Analyse en Composantes hiérarchiques
moy	: moyenne
<i>T. polium</i>	: <i>Teucrium polium</i>
<i>C. triflorus</i> L'Her	: <i>Cytisus triflorus</i> L'Her
D ₁ -D ₈	: dose 1 jusqu'au dose 8
HE'FR	: l'huile essentielle du stade fructification
HE'FL	: l'huile essentielle du stade floraison
HE'V	: l'huile essentielle du stade végétatif
HE's	: Huiles essentielles
CPG	: Chromatographie en phase gazeuse
CG/SM	: Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
DMSO	: diméthyl sulfoxyde
g	: Gramme
%	: Pourcentage
µl	: Microlitre
MH	: Mueller Hinton
SAB	: Sabouraud
PDA	: Potato Dextrose Agar
<i>B. sub</i>	: <i>Bacillus subtilis</i>
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>P. aer</i>	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>S. aur</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. ent</i>	: <i>Salmonella enterica</i>
<i>C. alb</i>	: <i>Candida albicans</i>
<i>A. bra</i>	: <i>Aspergillus brasiliensis</i>
<i>A. alt</i>	: <i>Alternaria alternata</i>
<i>F. sol</i>	: <i>Fusarium solani</i>
<i>F. oxy</i>	: <i>Fusarium oxysporum</i>
CMM	: concentration minimale microbicide
CMB	: concentration minimale bactéricide
CMF	: concentration minimale fongicide
CMI	: concentration minimale inhibitrice
HCN	: gaz cyanhydrique d'hydrogène
UV	: rayons ultra-violets
CO ₂	: dioxyde de carbone
Gram +	: bactérie à Gram positif
Gram -	: bactérie à Gram négatif
MMTM	: la moyenne des températures moyennes en C°
TMIN	: moyenne des températures minimales en C°

TMAX	: moyenne des températures maximales en C°
MPM	: moyenne des précipitations mensuelles en mm
MHR	: moyenne du taux d'humidité relative en %
IR	: l'indice de rétention
NIST 02	: National Institute of Standards and technologies
st'V	: stade végétatif
st'FL	: stade floraison
st'FR	: stade fructification
moy	: moyenne
S.E	: standard erreur

APPENDICE B (2)

Compositions et préparations des milieux de culture:

✓ Milieu de culture Mueller-Hinton:

- Dissoudre 31 g de la poudre de la gélose Mueller Hinton dans 1 litre d'eau distillée;
- Faire bouillir avec agitation continue jusqu'à dissolution complète;
- Autoclaver à 121°C pendant 15 min.

✓ Milieu de culture Sabouraud:

- Dissoudre 42 g de la poudre de la gélose Sabouraud dans 1 litre d'eau distillée;
- Faire bouillir avec agitation continue jusqu'à dissolution complète;
- Autoclaver à 121°C pendant 15 min.

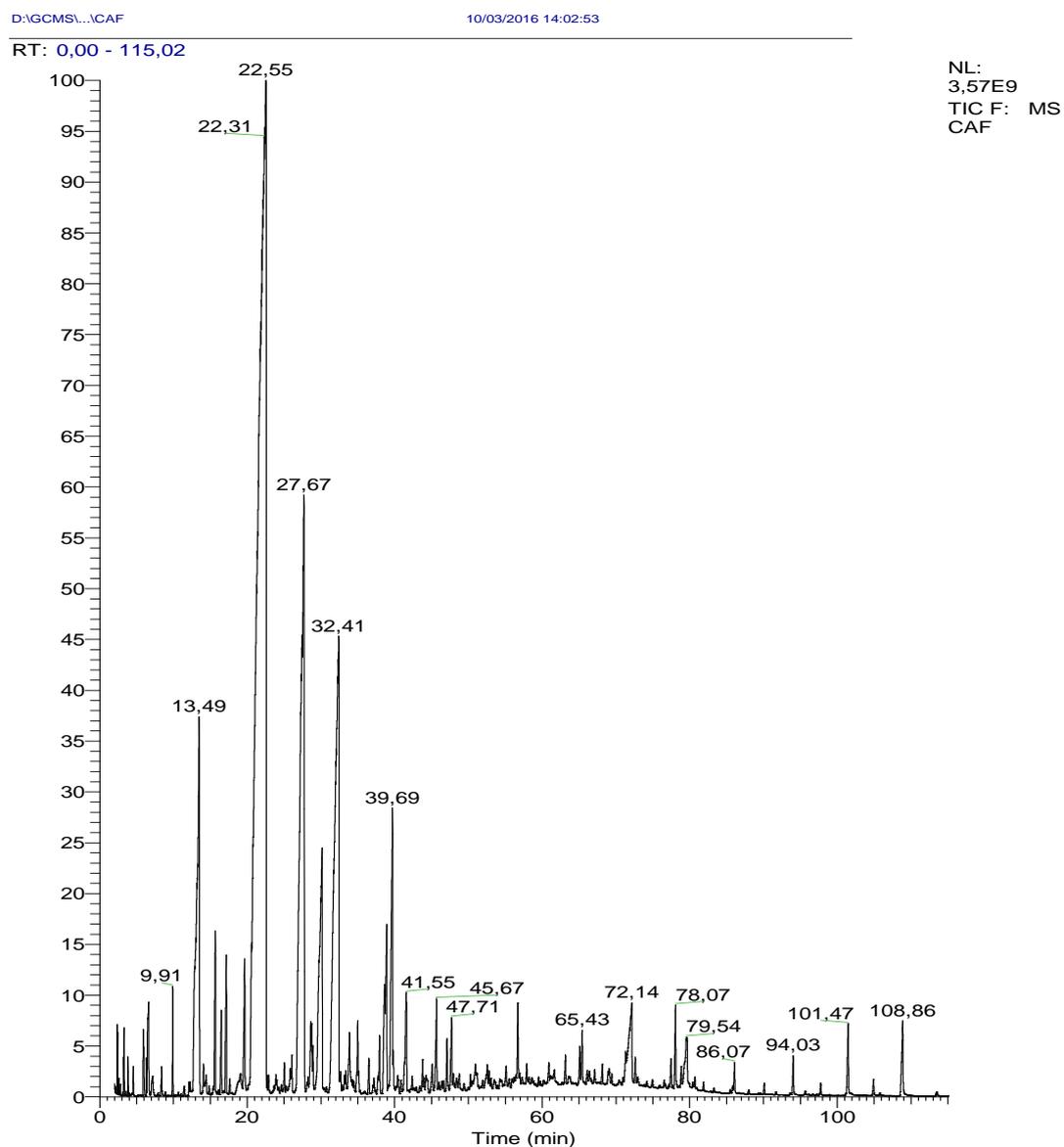
✓ Milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar):

Pour préparer 1 litre de PDA, il faut: 2Kg de pommes de terre, 20g de sucre glucose, 20g d'agar en paillette et de l'eau;

- Les pommes de terre épluchées et découpées en petits cubes sont macérées pendant environ une demi-heure dans 500ml d'eau, puis cuites pendant 30 minutes;
- La bouillie obtenue est filtrée avec du coton;
- Les paillettes d'agar sont ajoutées et la bouillie complétée à 1 litre;
- Le tout est remis à ébullition pendant 30 minutes;
- La gélose fond à une température supérieure à 45° C;
- Le liquide obtenu est filtré à chaud sur coton;
- Le glucose est ajouté et le volume ramené à 1 litre;
- Le mélange est versé dans des éprouvette bouchées par du coton et le tout est mis en autoclave. L'autoclave est maintenu à une température de 120° C (pression de 1 bare) pendant 30 minutes à 40 minutes.

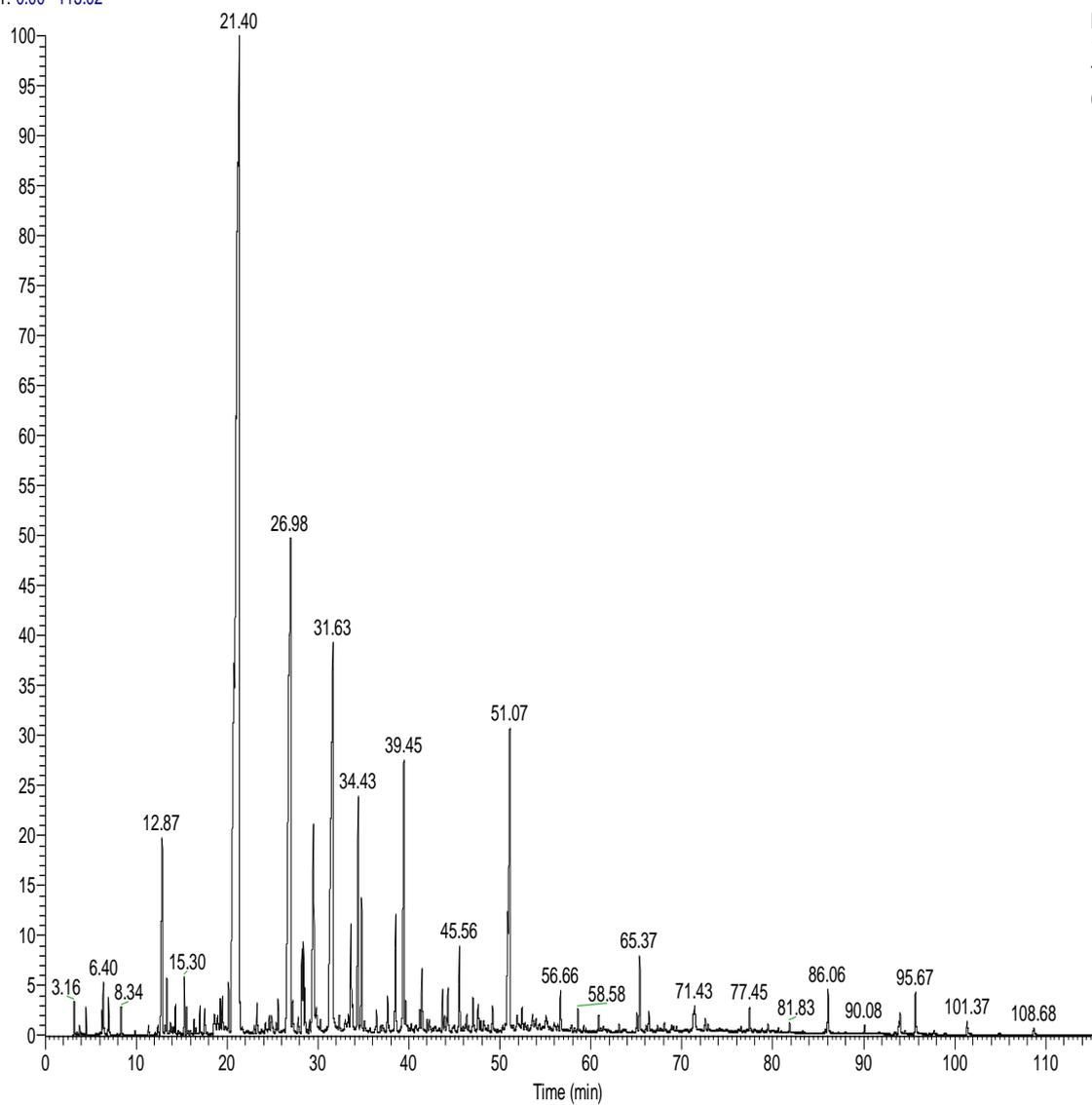
APPENDICE C (3)

Chromatogrammes des six huiles essentielles des plantes impétrantes:



Chromatogramme de l'huile essentielle de *Cytisus triflorus* L'Her (stade végétatif)

RT: 0.00 - 115.02



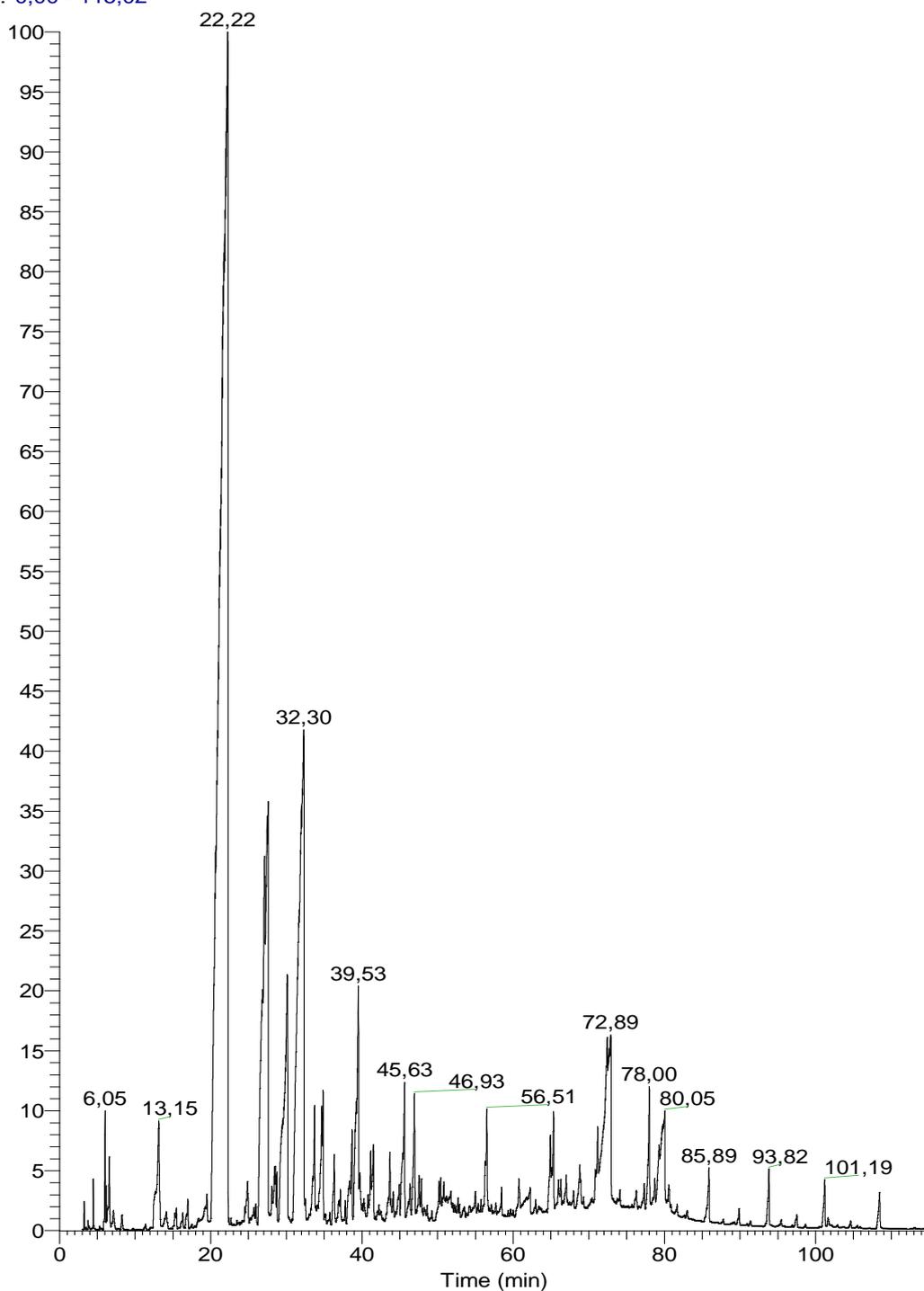
NL:
1.78E9
TIC F: MS
CF

Chromatogramme de l'huile essentielle de *Cytisus triflorus* L'Her (stade floraison)

D:\GCMS\...CN

12/06/2016 12:22:57

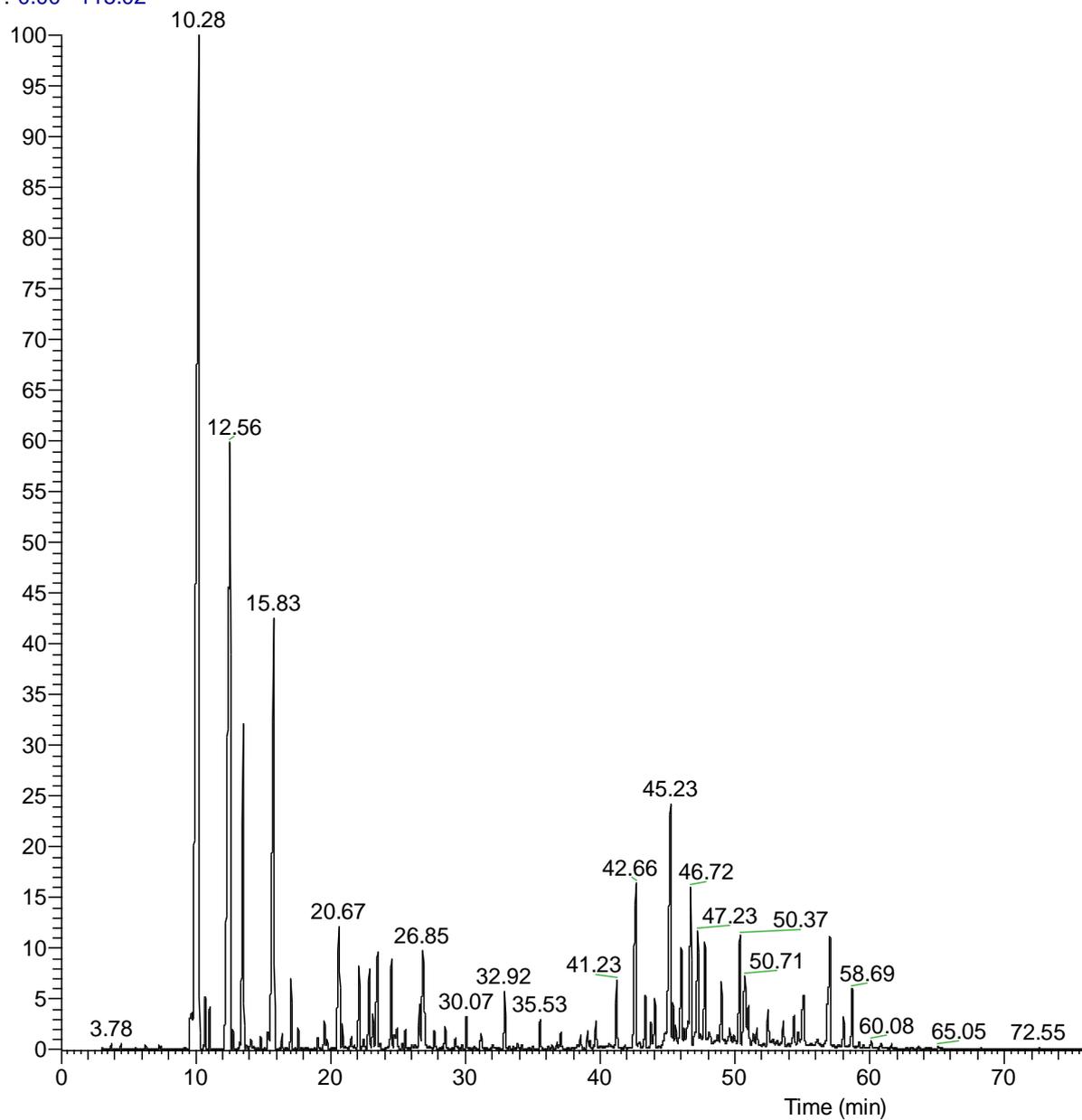
RT: 0,00 - 115,02



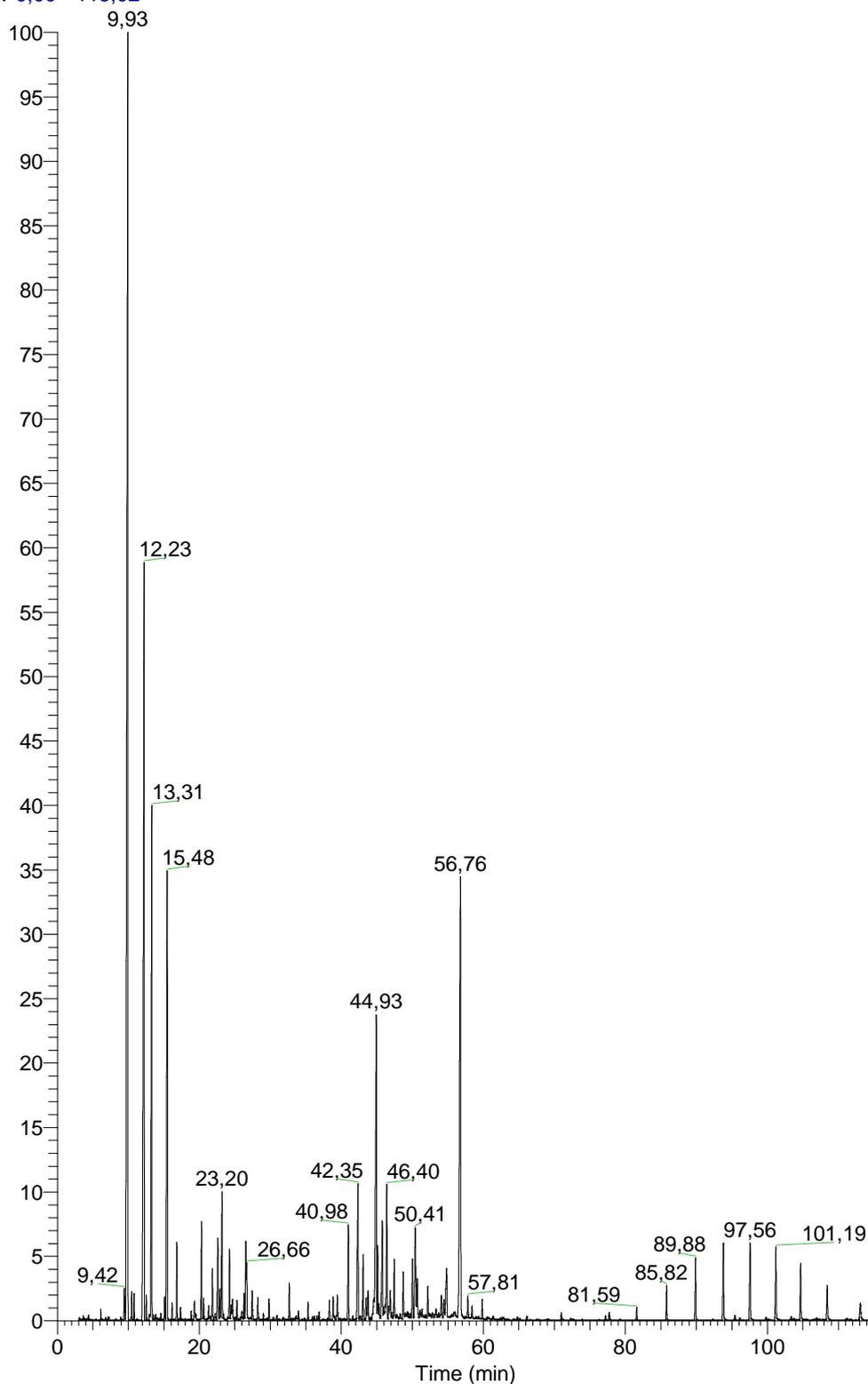
NL:
2,38E9
TIC F: MS
CN

Chromatogramme de l'huile essentielle de *Cytisus triflorus* L'Her (stade fructification)

RT: 0.00 - 115.02

Chromatogramme de l'huile essentielle de *Teucrium polium* (stade végétatif)

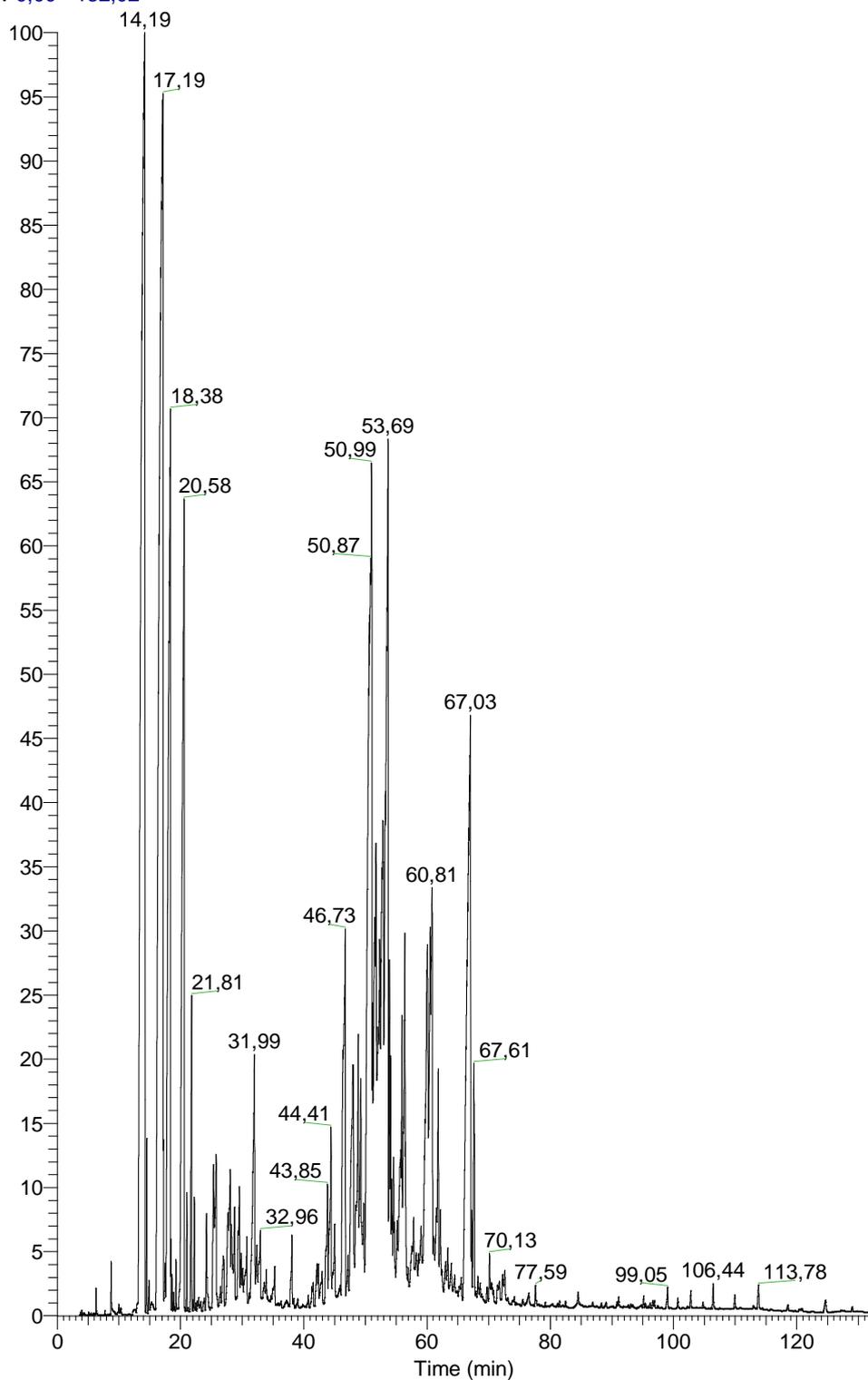
RT: 0,00 - 115,02



NL:
1,67E9
TIC F: MS
ech-TF

Chromatogramme de l'huile essentielle de *Teucrium polium* (stade floraison)

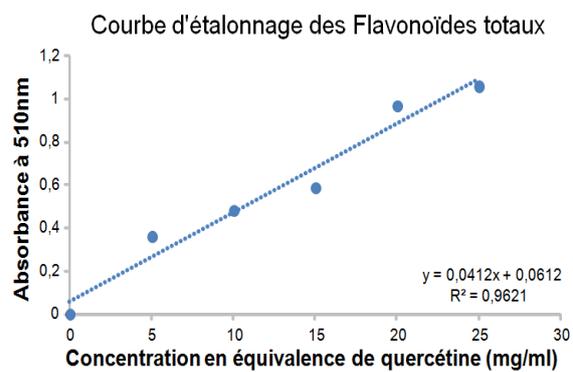
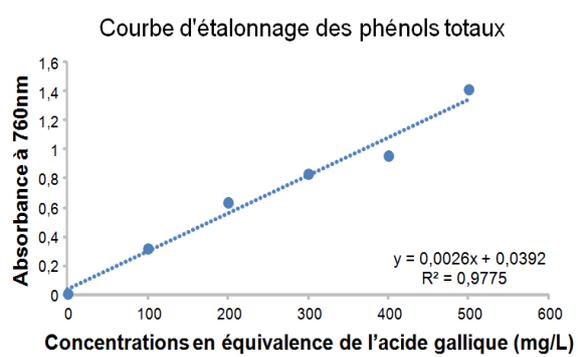
RT: 0,00 - 132,02



NL:
4,36E9
TIC F: MS
TN

Chromatogramme de l'huile essentielle de *Teucrium polium* (stade fructification)

APPENDICE III (3)



APPENDICE III (4)

QUELQUES ILLUSTRATIONS DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNES
DES DIFFERENTS EXTRAITS