



République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La
Recherche Scientifique

UNIVERSITE ABBES LAGHROUR KHENCHELA

Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie

Département De Biologie Moléculaire et Cellulaire

MÉMOIRE

Soutenu en vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Filière : Sciences Biologiques.

Option: Microbiologie.

Thème

Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cytisus Villosus*

Présenté par :

- BREIKA Fatou
- SELLAOUI Hadjer

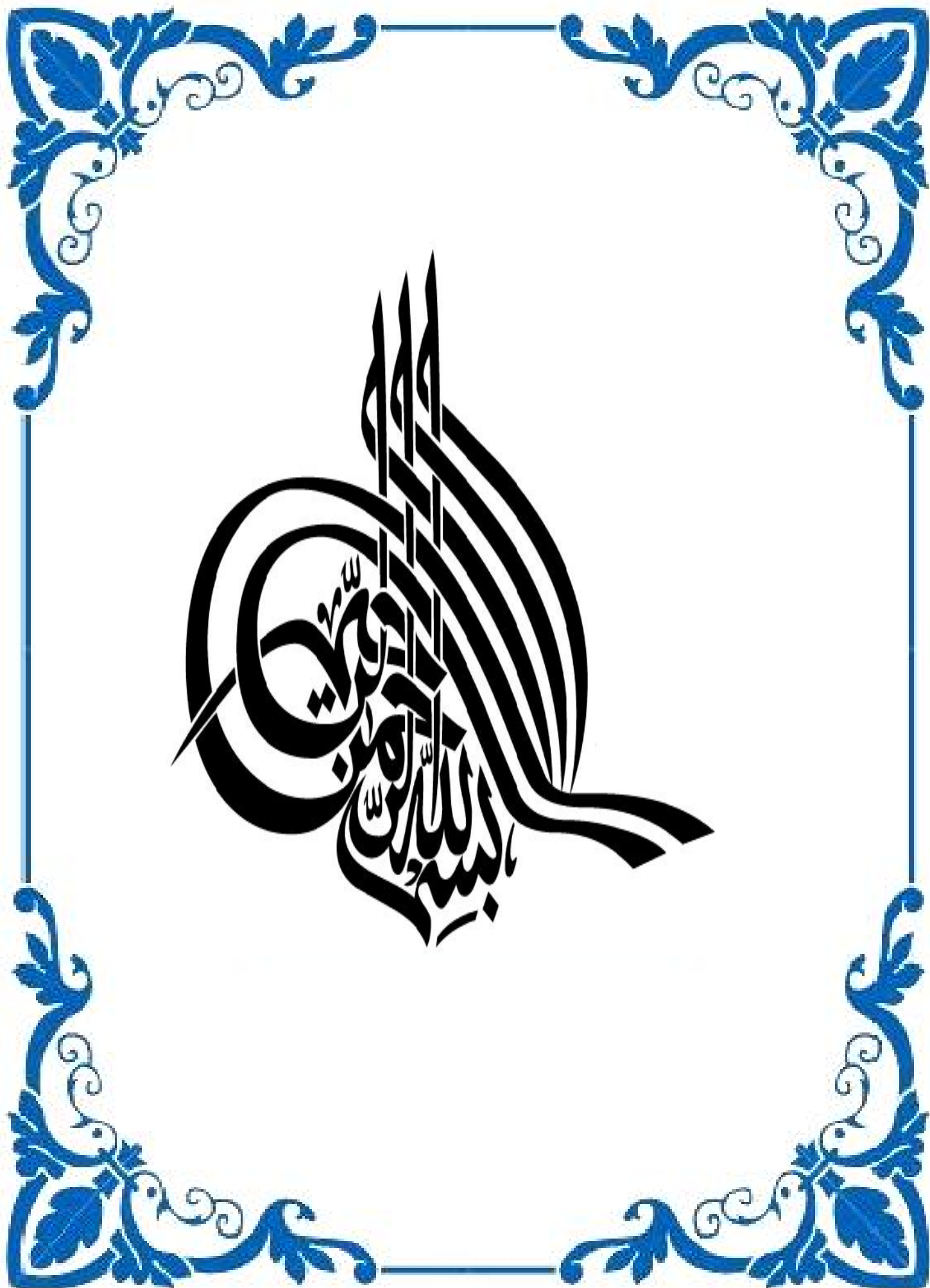
Soutenu Le : 06-06-2016

Devant le Jury :

Président : Mr BOUSSAA Abdelhalim	MAA	Univ.Abbes Laghrou-Khenchela
Encadreur: M ^{elle} YAKHLEF Wahiba	MAA	Univ.Abbes Laghrou-Khenchela
Examinatrice: M ^{elle} MESSAI Alima	MAB	Univ.Abbes Laghrou-Khenchela

Promotion: Juin 2016

Ce travail a été réalisé dans les laboratoires pédagogiques de l'université Abbes Laghrou Khenchela



DEDICACE

حمد لله الذي هداني لهذا وما كنت
لأهتدي لولا أن هداني الله

*Je remercie Dieu le tout puissant qui m'a aidé
à faire ce travail.*

Je dédie ce mémoire à :

*A mon très cher père la miséricorde de Dieu
Tes conseils m'ont suivi et m'ont permis d'atteindre le bout du chemin. Sois
fier de moi aujourd'hui et vois à travers ce travail mon amour sincère et ma gratitude
profonde.*

*A ma très chère mère
Ma douce et tendre mère. Quoique je fasse, je ne pourrais te rendre ce que tu as fait
pour moi. Si je suis arrivée là, c'est bien grâce à toi.
Que dieu te donne longue vie et te protège pour moi.*

*Mon encadreur Mr. Boussaa Abdelhalim et Je le remercie pour
ses Conseils et sa humilité*

*Mes sœurs Mariam, Nasra, Fatima, Rabab, Lamina,
mon frère Ayub, et mon chér frère Elhafedh*

Tous mes chères amies, et a ma meilleure amis Hadjer

A TOUTE MA FAMILLE.

Fatou .



DÉDICACE

Avec l'aide De DIEU, J'ai Pu Réaliser Ce Modeste Travail Que Je Dédie A :

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

*Mon cher père qui ma appris le sens de la persévérance tout au
long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements.*

*Mon professeur BOUSSAA Abdelhalim et je le remercie pour ses conseils et
se humilité*

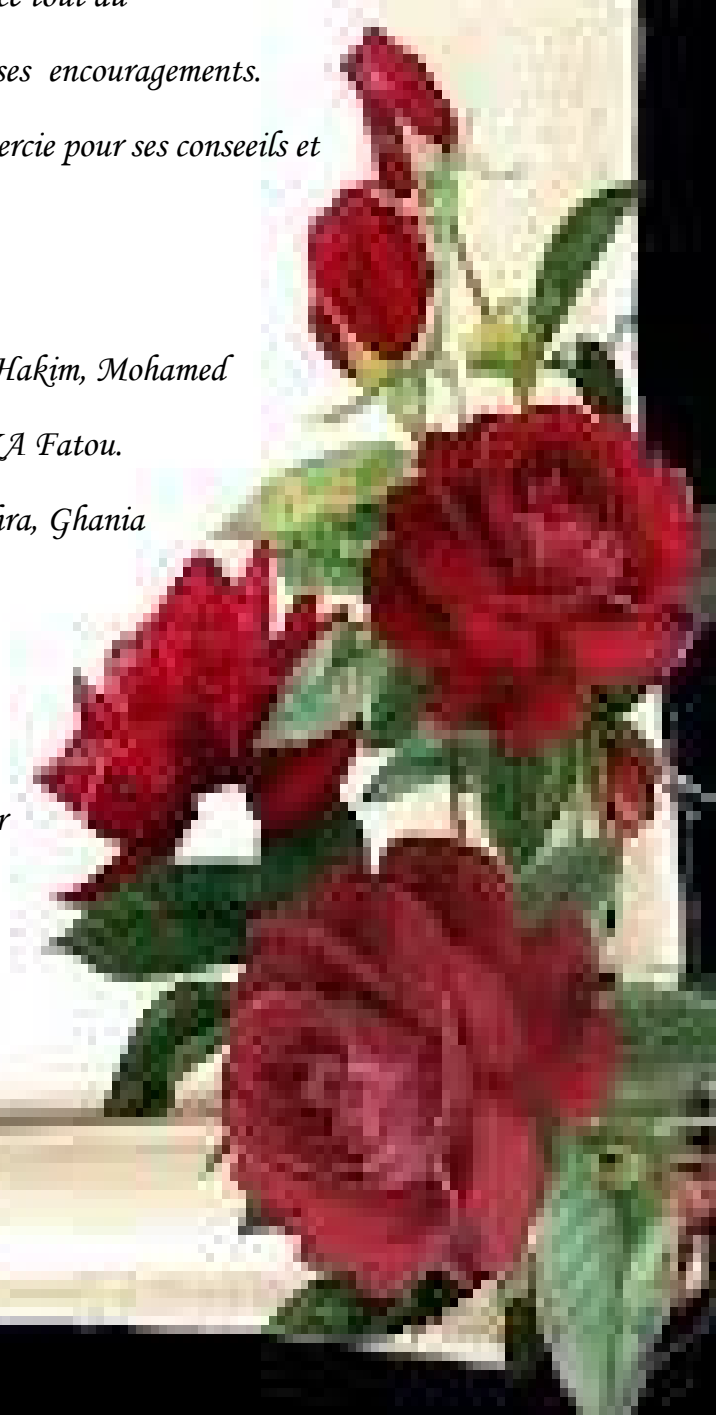
Ma meilleure amis BRIEKA Fatou .

*Mes frères et ma sœur : Amel, Housseem, Lakhider, Hakim, Mohamed
et mon cher frère Wassim. ma meilleure amis BRIEKA Fatou.*

Tous mes amis : Nadjet, Fouzia, Amel, Raouia, Chahra, Ghania

Toute ma famille

Hadjer



Remerciement

«La connaissance est la seule chose qui s'accroît lorsqu'on la partage.»

Avant toute chose, on remercie Dieu, le tout puissant, pour nous avoir donné la force et la patience.

On tient à remercier fortement M^r BOUSSAA Abdelhalim qui nous avons honoré en acceptant le président du jury de nos présent mémoire

On n'oublie pas d'exprimer nos sincères remerciements M^{elle} Mesai.

d'avoir accepté de juger ce travail en qualité d'examinatrice.

On tient à exprimer notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à notre promotrice de ce travail, M^{elle} YEKHLEF Wahiba pour son assistance et ses conseils pour assurer le succès de ce travail.

On remercie également tous nos amis et collègues de la promotion de biologie

2015/2016

Que toute personne ayant participé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail

Enfin, on tient à exprimer nos gratitudes éternelles à nos familles, parents, frères, tous par leur nom, pour leur patience et leur soutien illimité au cours de nos années scolaires dans les moments difficiles.

Hadjer & Fatou



Liste des abréviations

- **%** : Pourcentage
- **AFNOR** : la norme de l'Association Française de Normalisation
- **ATCC** : l'American Type Culture Collection
- **C⁰** : Degré celsius
- **Cm** : centimètre
- **CMBc** : concentration minimale bactéricide
- **CMF** : concentration minimale fongicide
- **CMI** : concentration minimale inhibitrice
- **DMSO** : diméthyle sulfoxyde
- **G** : Gramme
- **GN** : Gélose nutritive
- **H** : heure
- **HE** : Huile essentielle
- **M** : masse d'huile essentielle en gramme
- **m₀** : masse de la matière végétale
- **Mm** : Millimètre
- **ml** : Millilitre
- **R_{dt}** : Rendement en Huile Essentielle
- **µl** : Microlitre

Liste des figures

Figure 01 : Shéma présente l'arbre de la famille fabaceae	04
Figure 02 : <i>Cytisus villosus</i>	09
Figure 03 : les feuilles pétiolées	09
Figure 04 : Glande simple entièrement chargée	13
Figure 05 : poiles épidermique sur le calice d'une fleur d'un origan	13
Figure 06 : Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation	16
Figure 07 : Dispositif d'extraction Clevenger	26
Figure 08 : Aromatogramme sur boîte de Pétri à diffusion linéaire à partir d'un disque imprégné d'huile essentielle	27
Figure 09 : La technique de préparation des disques	28
Figure 10 : dilution des huiles.	29
Figure 11 : préparation de la suspension bactérienne	29
Figure 12 : préparation de la suspension sporale	30
Figure 13 : Préparation de l'inoculum bactérienne.	31
Figure 14 : La méthode de microdilution	32
Figure 15 : La méthode de remplis des puits de microplaque	33
Figure 16 : la sensibilité des bacterie testées contre les huiles essentielles	36
Figure 17 : la comparaison entre les trois souches	37
Figure 18 : Concentration minimale inhibitrice (CMI)	38
Figure 19 : Résultat de CMBC pour <i>Escherichia coli</i> et <i>p.aeruginosa</i>	40
Figure 20 : Résultat de CMB pour <i>Klebsiella oxytoca</i> et <i>Acinetobacter baumannii</i>	41
Figure 21 : L'effet des huiles essentielles sur les champignons	42
Figure 22 : L'action fongicide et fongistatique de l'HE sur <i>penicilium</i> et <i>Flavus</i>	44
Figure 23 : L'action fongistatique des HES sur <i>Aspergillus niger</i> et <i>fusarium</i>	44

Liste des tableaux

Tableau N°01-	Position systématique des Fabaceae selon différentes approches phylogénétique	07
Tableau N°02-	Détermination des zones d'inhibition de l'HE de <i>C. villosus</i> sur les bactéries	34
Tableau N°03-	Valeurs des CMI de l'huile infusée de <i>Cytisus villosus</i> pour les bactéries	39
Tableau N°04-	Concentrations minimales bactéricide ou bactériostatique (CMB) de l'huile essentielle de <i>Cytisus villosus</i>	40
Tableau N°05-	les resultats de l'aromatogrammes sur les champignons	41
Tableau N°06-	concentration minimale inhibitrice(CMI) des champignons	43
Tableau N°07-	Activité fongistatique (CFS) et fongicide (CMF)	43

Sommaire

Liste des abréviations..... IV
Liste des tableaux..... V
Liste des figures..... VI
Introduction.....01

Etude bibliographique

Chapitre I : Généralité sur *Cytisus villosus*

I.1. L'ordre des Fabales03
I.2. Les Fabaceae.....03
I.2.1. Description botanique03
I.2.2. Répartition géographique des Fabaceae.....05
I.2.3. Position systématique de la famille des Fabaceae.....05
I.2.4. La sous-famille des Papilionoideae.....08
I.3. présentation de genre *Cytisus*08
I.4. l'espèce *cytissus villosus*.....08
I.4.1. Description de la plante et la Répartition géographique08
I.4.1.1. Les feuilles09
I.4.1.2. Les fruits.....10
I.4.1.3. Les fleurs10
I.5. Utilisation traditionnelle.....10

Chapitre II : Les huiles essentielles

II.1. Historique11
II.2. Définition.....11
II.3. Localisation, répartition et origine des huiles essentielles dans la plante.....12
II.4. Propriétés physico-chimiques14
II.4.1. Propriétés physiques.....14
II.4.2. Propriétés chimiques14

II.4.2. 1. Les terpènes.....	14
II.4.2.1.1. Monoterpènes.....	15
II.4.2.1.2. Sesquiterpènes.....	15
II.4.2.2. Composés aromatiques	15
II.4.2.3. Composés d'origines diverses	15
II.5. Utilisation des huiles essentielles	15
II.6. Procédés d'extraction des huiles essentielles.....	16
II.6.1.1. La distillation.....	16
II.6.1.2. Hydrodistillation	16
II.6.1.3. Distillation par entraînement à la vapeur d'eau.....	17
II.6.2. Hydrodiffusion.....	17
II.6.3. Extraction à froid.....	17
II.6.4. Extraction assistée par micro-ondes.....	17
II.6.5. Extraction par les solvants et les graisses.....	17
II.6.6. Extraction par fluides supercritique.....	18
II.7. Rendement des huiles essentielles.....	18
II.8. Conservation des huiles essentielles.....	18
II.9. Rôle physiologique.....	18
II.10. Critères déterminants la qualité des huiles essentielles.....	19
II.11. Toxicité des huiles essentielles.....	19

Chapitre III : Activité antimicrobienne

III. Activité antimicrobienne des l'huiles essentielles.....	21
III.1.1. Définition d'un antimicrobien.....	21
III.1.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	21
III.1.2.1. Méthode de l'aromatogramme.....	22
III.1.2. Méthod de dilution.....	22
III.2. Activité antibactérienne.....	22
III.2.1. Les bactéries.....	22
III.2.2. Mode d'action contre les bactéries.....	22
III.3. L'activité antifongique.....	23
III.3.1. Les moisissures	23

Etude expérimental

Matériels et Matériels

I. Matériels.....	25
I.1 Matériel végétal.....	25
I.2. Matériel du test de l'activité antibactérienne.....	25
I.2.1. Souches microbiennes testées.....	25
II. Méthodes.....	25
II.1. L'extraction des huiles essentielles.....	25
II.2.Détermination du rendement d'extraction	26
II.3. Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle.....	27
II.3.1.Méthode de diffusion sur disques (aromatogrammes).....	27
II.3.2.Préparation des disques	28
II.3.3. Dilution de l'huile essentielle V/V.....	28
II.3.4. Préparation de l'inoculum	29
II.3.5.L'ensemencement et dépôt des disques.....	31
II.3.6. Détermination des Concentrations minimales inhibitrices (CMI)	31

Résultats et Discussion

I. Résultats	34
I.1. Rendements.....	34
I. 2. Les résultats d'aromatogramme.....	34
I.2.1. Résultats de l'activité antibactérienne	34
I. 2. Détermination de la CMI par la méthode de microdilution.....	38
I.3. Détermination des CMB.....	39
I.4.Résultats de l'activité antifongique.....	41
I.4.1. Sensibilité des souches fongiques à l'huile essentielle.....	41
I.4.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices.....	42
I.4.3. Résultats de détermination des concentrations minimales fongicides (CMF).....	43
II. Discussion générale.....	45
Conclusion et perspectives.....	47
Références bibliographique	48

Résumé

Annexes

« Le don d'une plante utile me paraît plus précieux que la découverte d'une mine d'or, et un monument plus durable qu'une pyramide ».

Bernardin de Saint-Pierre

Voyage à l'Ile de France, p.58,

Introduction

Introduction

Depuis longtemps, Les plantes médicinales ont été employées en phytothérapie comme remèdes aux maladies humaines vue leur richesse en centaines, voire en milliers de composants de valeur thérapeutique, à travers les siècles les traditions humaines ont surdéveloppé la connaissance et l'utilisation de ces plantes dont leur savoir a été transmise d'une génération en génération (**Larousse, 2001 ; Verdrager, 1978**).

Un grand nombre de plantes, aromatiques, médicinales et autres, possèdent des propriétés biologiques très intéressantes qui trouvent leur application dans divers domaines à savoir la médecine, la pharmacie, la cosmétologie et l'agriculture. Cependant, l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques comme antimicrobiennes, demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes rarement utilisées.

Ces plantes représentent une nouvelle source des composés actifs ; en effet, les métabolites secondaires font et restent l'objet de nombreuses recherches in-vivo comme in vitro, notamment la recherche des nouveaux constituants naturels tels les composés phénoliques, les saponosides et les huiles essentielles.

Une huile essentielle est un produit odorant, de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique sans chauffage (**Bruneton, 2009**). Les végétaux riches en essences se trouvent surtout chez les Conifères, Myrtacées, Labiées, Umbellifères et Rutacées au niveau de différents organes de la plante (**Mautrait et Raoult, 2009**).

L'Algérie, avec sa grande superficie et la présence de fortes altitudes, abrite une flore médicinale et aromatique importante. Sur les 2150 espèces inventoriées ; 350 d'entre-elles sont reconnues comme étant à vertu aromatique et médicinale (**Le Floch, 1983**). Les espèces les plus exploitées (pour leur popularité, leur abondance et leur large utilisation en médecine traditionnelle et en aromathérapie) sont le romarin, le myrte, le pistachier lentisque, l'églantier, le genévrier de phoenicie, le caroubier, le thym, la globulaire et la menthe. (**Pistelli, 2001 et Kirch, 1995**).

L'Algérie, par sa situation géographique, offre une végétation riche et diverse. Un grand nombre de plantes aromatiques y pousse spontanément. L'intérêt porté à ces plantes n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années. .

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cytisus villosus*, une espèce de la famille des *Fabaceae*. Une plante très utilisée dans la médecine traditionnelle comme anti-inflammatoire et antibactérienne dans la région nord-est de l'Algérie qui représente une région où les plantes médicinales suscitent un intérêt aussi bien par les habitants que par les scientifiques. Mais elle semble avoir été peu étudiée chimiquement contrairement à d'autres sous espèces du même genre.

Ce manuscrit s'articule autour de trois chapitres :

Le premier chapitre et dans la première partie est consacré à une étude bibliographique sur les plantes médicinales et les huiles essentielles, les principes actifs des plantes (métabolites secondaires) plus particulièrement l'huile essentielle, et leurs propriétés biologiques (antibactérienne, antifongique). Et enfin, une monographie de l'espèce étudiée (*Cytisus villosus*).

Dans le deuxième chapitre nous nous sommes intéressés à illustrer le matériel et les méthodes utilisés dans les différentes manipulations. Enfin, le troisième chapitre est consacré aux résultats obtenus accompagnés d'une discussion et ponctués d'une conclusion générale.

A decorative blue border with intricate floral and scrollwork patterns, framing the central text. The border consists of four ornate corner pieces connected by thin lines.

Etude bibliographique



Chapitre I

Généralité sur *Cytusis villosus*

I.1. L'ordre des Fabales

L'ordre des Fabales renferme 4 familles et environ 19 000 espèces. Les familles principales sont les Fabaceae, les Polygalaceae, les Surianaceae. Nous traiterons ici la famille des Fabaceae qui renferme l'espèce végétale *Genista ulicina* que nous avons étudiée (**Boutaghan, 2013**).

I.2. Les Fabaceae

I.2.1. Description botanique

La famille est cosmopolite. Elle est particulièrement concentrée dans les régions subtropicales et tempérées chaudes, comme en Afrique du sud ou sur le pourtour méditerranéen. Les régions tropicales abritent essentiellement des espèces ligneuses, tandis que les régions tempérées regorgent d'espèces herbacées (**Anonyme 01**).

La famille des Fabaceae (aussi appelée famille des Légumineuses) constitue la troisième famille de plantes à fleurs en nombre d'espèces, après les Orchidaceae et les Asteraceae.

Le nom fabacées est adapté en classification phylogénétique APG(2003) Elle est constituée d'environ 18000 espèces et 650 genres regroupant arbres tropicaux, arbustes de toute taille, lianes et petites herbacées annuelles (**Wojciechowski et al., 2004**).

moteurs à la base de la feuille et des folioles bien développées, produisant généralement des mouvements de veille et de sommeil.

Les fleurs sont généralement hermaphrodites, actinomorphes à zygomorphes, à hypanthium court, généralement cupuliforme (Spichiger et al., 2002).

En termes d'importance économique et agricole, Les graines de ces espèces constituent une source protéique végétale pour l'alimentation animale et humaine ; leur culture ne nécessite pas d'engrais azotés les *Fabaceae* occupent la seconde place après les *Poaceae* et incluent diverses plantes à vocations alimentaire, ornementale, médicinale ou pharmaceutique telles que les pois, les haricots ou la luzerne (Gaëlle, 2011 ; Kaviriri, 2009) ,étant une source de protéines végétales pour l'alimentation animale ou humaine qui ne nécessite pas d'engrais azotés. Ainsi pour beaucoup de Fabacées, leur culture tient une place particulière dans la rotation culturale du fait de leur capacité à fixer l'azote atmosphérique grâce à *Rhizobium*. C'est aussi une source de matières grasses et de bois (Kaviriri, 2009).

I.2.2. Répartition géographique des *Fabaceae*

Les *Fabaceae* constituent la troisième famille des angiospermes de par le nombre de ses représentants. Elles ont une distribution quasi cosmopolite et se trouvent dans les zones tropicales, subtropicales ou tempérées. Cette famille s'accommode d'une très large gamme d'habitats, et inclut autant de plantes herbacées, aquatiques ou xérophytes, que des arbustes, des arbres ou des plantes grimpantes à lianes volubiles ou à vrilles (Boutaghan, 2013).

I.2.3. Position systématique de la famille des *Fabaceae*

La famille des *Fabaceae* appartient au:

- **Règne :** Végétal.
- **Embranchement:** *Magnoliophyta*.
- **Sous-embranchement:** *Rosophytina*.
- **Classe :** *Rosopsida*.
- **Sous-classe:** *Rosidaeae*.
- **Ordre:** *Fabales*. (APG, 2003).

Trois sous-groupes sont généralement reconnus à l'intérieur des *Fabaceae* :

- Les *Caesalpinioideae* avec une fleur pseudo-papilionacée.
- les *Mimosoideae* avec une fleur régulière.
- les *Faboideae* (*Papilionoideae*) avec une fleur typique en papillon.

Plusieurs analyses moléculaires ont montré que les *Faboideae* et les *Mimosoideae* étaient monophylétiques alors que les *Caesalpinioideae* seraient *paraphylétiques* (Gaëlle, 2011). Dans la plupart des classifications, ces groupes sont considérés comme des sous familles, mais ils sont parfois traités en familles indépendantes, comme par exemple dans la classification de Cronquist. Le concept « *Leguminosae* » est lui utilisé soit à un niveau familial (chez Engler), soit à un niveau ordinal (chez Cronquist). Bien que le terme *Fabacée* soit actuellement préféré dans la nouvelle classification systématique de l'Angiosperm Phylogeny Group (APG), le terme *Leguminosae* est encore couramment utilisé par certaines catégories de scientifiques (spécialistes des légumineuses). Ces deux termes sont considérés comme des synonymes par l'International Code of Botanical Nomenclature (ICBN) (Judd et al., 2002 ; Spichiger et al., 2004).

Tableau 1: Position systématique des *Fabaceae* selon différentes approches phylogénétique ou morphologique (Boutaghan, 2013).

	Engler (1887-1915)	Cronquist (1988)	Thorne (1992)	APGIII (2009)
Règne	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Embryophyta</i>	<i>Magnoliophyta</i>	<i>Spermatophytae</i>	<i>Spermatophytae</i>
Sous embranchement	<i>Angiospermae</i>	<i>Angiospermae</i>	<i>Angiospermae</i>	<i>Angiospermae</i>
Classe	<i>Dicotyledonae</i>	<i>Magnoliopsida</i>	<i>Magnoliopsida</i>	<i>Eudicotyledonae</i>
Sous-classe	<i>Archichlamydeae</i>	<i>Rosidae</i>	<i>Rutanae</i>	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Rosales</i>	<i>Fabales</i>	<i>Rutales</i>	<i>Eurosidae I</i> (= <i>Fabidées</i>)
Sous-ordre	<i>Leguminosineae</i>		<i>Fabineae</i>	<i>Fabales</i>
Famille	<i>Leguminosae</i>	<i>Fabaceae</i> (= <i>Papilionaceae</i>) <i>Mimosaceae</i> <i>Caesalpinaceae</i>	<i>Fabaceae</i>	<i>Fabaceae</i> (= <i>Leguminosae</i>)
Sous-famille	<i>Faboideae</i> <i>Mimosoideae</i> <i>Caesalpinioideae</i>		<i>Faboideae</i> <i>Mimosoideae</i> <i>Caesalpinioideae</i> <i>Swartzioideae</i>	<i>Faboideae</i> <i>Mimosoideae</i> <i>Caesalpinioideae</i> <i>Swartzioideae</i>

I.2.4. La sous-famille des *Papilionoideae*

Les Fabaceae étant une famille extrêmement vaste, pour la suite de cette discussion nous allons nous intéresser plus particulièrement à la sous-famille des *Papilionoideae* qui comprend 440 à 500 genres, dont *Cytisus*, et plus de 12000 espèces.

On retrouve dans cette sous-famille des arbres, en général exotiques, des lianes, mais aussi beaucoup de plantes herbacées vivaces ou annuelles. Il s'agit d'une sous-famille exceptionnellement homogène, très reconnaissable à l'aspect de ses feuilles alternes, stipulées et composées pennées, à celui de ses fleurs, à corolles dites « en papillon » et par ses fruits appelés gousses (Dupont et Guignard, 2012).

I.3. présentation de genre *Cytisus*

Le genre *Cytisus*, de la famille des *Légumineuses-Papilionacées*, rangé par Bentham et Hooker dans la tribu des Génistées, comprend un grand nombre d'espèces (Guerin, 1895). Sont des arbustes, des arbrisseaux ou des sous-arbrisseaux non épineux, à feuilles alternes, toutes composées de 3folioles entières sauf chez *Cytisus decumbens* et *Cytisus oromediterraneus*. Les fleurs ont une corolle papilionacée, jaune, à pétale supérieur (étendard) dressé, parfois strié de rougeâtre (Robert, 1969).

Un calice à 2 lèvres, la supérieure à 2 dents ou tronquée, l'inférieure à 3 dents. Le calice se termine par des dents courtes presque égales. L'étendard redresse, les étamines sont toutes soudées par leur filet, les genêts sont des plantes voisines dont la lèvre supérieure du calice est profondément divisée en deux lobes [Anonyme 03].

Les fruits sont une gousse allongée, plus ou moins aplatie (Robert, 1969).

I.4. l'espèce *Cytisus villosus*

I.4.1. Description de la plante et la Répartition géographique

En générale se trouve dans Région méditerranéenne de l'Europe et de l'Afrique (Julve, 2015).

Afrique : Algérie, Maroc, Tunisie

Europe : Albanie, Corse, France, Grèce, Italie, Sardaigne, Sicile, Espagne, Ancien, Yougoslavie

Moyen-Orient : la Turquie d'Asie (Frank, 1992).

C'est un arbrisseau de 1 à 2 m sans épines, vivace très envahissante, Il peut être reconnu par ses fleurs de couleur brillant jaunes qui épanouit (ses fleurs) depuis le mois de février et mai dans les bois, parmi les buissons ou sur les coteaux de la Région méditerranéenne.



Figure 02 : *Cytisus villosus* (Massif, 2013).

I.4.1.1. Les feuilles

Les feuilles sont pétiolées et à trois folioles dont la foliole médiane est plus grande que les autres. Vers la base de la partie fleurie, ces folioles sont plus longues que les fleurs [Anonyme 04].



Figure 03 : les feuilles pétiolées [Anonyme 04].

Le calice est relativement court, et poilu; l'étendard se replie sur le dos et est alors plus court que la carène; il est sans poils, tacheté et strié de brun rougeâtre vers la base; la carène est presque en forme de bec au sommet.

C'est un arbrisseau dont les jeunes rameaux et les feuilles sont revêtus de longs poils roussâtres, parfois blancs sur les jeunes feuilles; ces poils tombent facilement; les jeunes rameaux sont à 5 angles bien marqués (**Massif, 2013**).

I.4.1.2. Les fruit

Le fruit a environ 3 centimètres de longueur, et est couvert de poils roux appliqués, il contient 6 à 8 graines jaunâtres.

I.4.1.3. Les fleurs

Les fleurs sont en général disposées par trois à l'aisselle des feuilles supérieures, de façon que l'ensemble de la partie fleurie d'un rameau forme une sorte de grappe feuillée (**Massif, 2013**). Ses fleurs jaune vif (12 à 14 mm) sont formées de 5 pétales : le pétale supérieur, nettement dressé est l'étendard, les 2 latéraux sont les ailes et les 2 inférieurs sont la carène, Elles noircissent en fin de floraison [**Anonyme 04**].

I.5. Utilisation traditionnelle

Les feuilles, en décoction, agissent contre le maux des intestins (**Kahouadji, 1995**). *C. villosus* connu dans au Nord de l'Algérie pour ses propriétés médicinales, il est utilisé pour traiter la douleur abdominale, des cicatrisations de plaies et comme hémostatique, antifongique and hypotenseur. de plus, les feuilles (congés) sont utilisées comme « le henné » pour traiter et teindre les cheveux (le poil) (**DJAHRA, 2013**).



Chapitre II
Les huiles essentielles

II. Les huiles essentielles

II.1. Historique

Les premières preuves de fabrication et d'utilisation des huiles essentielles datent de l'an 3000 avant J.C. Les huiles essentielles semblent donc avoir accompagné la civilisation humaine depuis ses premières genèses (**Baser et Buchbauer, 2010**).

Les égyptiens puis les grecs et les romains ont employé diverses matières premières végétales ainsi que les produits qui en découlent, notamment les huiles essentielles. Ces utilisations concernaient différents domaines : parfumerie, médecine, rites religieux, coutumes païennes, alimentation, etc. (**Besombes, 2008**).

L'étape byzantine de la civilisation a permis l'instauration des bases de la distillation et, avec la civilisation arabe, l'huile essentielle devient un des principaux produits de commercialisation internationale. Ainsi, vers l'an mille, Avicenne, médecin et scientifique persan, a défini précisément le procédé d'entraînement à la vapeur. L'Iran et la Syrie deviennent les principaux centres de production de divers types d'extraits aromatiques (**Baser et Buchbauer, 2010**).

Par la suite, les huiles essentielles ont bénéficié des avancées scientifiques, au niveau des techniques d'obtention et de l'analyse de leur composition chimique. Parallèlement, leur utilisation a aussi tiré profit de l'avènement de l'aromathérapie. René-Maurice ATTEFOSSE a créé, en 1928, le terme de l'aromathérapie et il a mené de nombreux travaux concernant les huiles essentielles, notamment leurs propriétés ; ces résultats seront à l'origine de nombreuses autres recherches (**Besombes, 2008**).

II.2. Définition

Il s'agit d'un mélange de composés lipophiles, volatils et souvent liquides, synthétisés et stockés dans certains tissus végétaux spécialisés. Extraites de la plante grâce à des procédés physiques tels l'hydro distillation, l'entraînement à la vapeur ou par expression à froid Les huiles essentielles sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante (**Bruneton, 1993**).

Il s'agit d'un extrait pur et naturel provenant de plantes aromatiques (**Roulier, 1990 ; Wegrzyn et Lamendinh, 2005**). Elle concentre l'essence de la plante, autrement dit son parfum. Il s'agit de substances odorantes, volatiles, de consistance huileuse, très concentrées, offrant une forte concentration en principes actifs (**Lardry et Haberkorn, 2007**). Il faut ainsi une très

grande quantité de plantes fraîches pour obtenir quelques millilitres d'huiles essentielles (**Nogar et Ehrhart, 2008**).

On ne peut définir une essence sans définir sa méthode d'extraction. Selon la pharmacopée européenne (**Afssaps, Edition 2008**) : « Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement par la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition».

D'après l'Association Française de Normalisation (**AFNOR, Edition 2000**), a défini les huiles essentielles comme étant : *des produits obtenus soit à partir de matières premières Naturelles par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau, soit à partir des fruits de Citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques*

L'odeur et la volatilité des essences contribuent dans les interactions entre les végétaux également entre végétal et l'animal ou elles constituent un moyen de défense avec sont action répulsive contre les prédateurs (micro-organismes, champignons, bactéries, animaux herbivores). Elles peuvent également participée à l'attraction des insectes pollinisateurs.

Le terme « huile » s'explique par la propriété que présentent ces composés de se solubiliser dans les graisses et par leur caractère hydrophobe. Le terme « essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante (**Bruneton, 1993**).

II.3. Localisation, répartition et origine des huiles essentielles dans la plante

Les huiles volatiles peuvent être considérées comme des résidus du métabolisme végétal. Suite à la photosynthèse au niveau des chloroplastes, l'énergie produite (sous forme de glucides, NADPH et d'ATP) contribue au développement de la plante et indirectement à la biosynthèse de multiples composés secondaires parmi elles les huiles essentielles (**Narishetty et Panchagnula, 2004**).

Parmi les espèces végétales (800 000 à 1 500 000 selon les botanistes) 10% seulement sont dites «aromatiques». Les genres capables d'élaborer les huiles essentielles sont répartis dans un nombre limité de familles; *Myrtaceae, Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Cupressaceae, Poaceae. Zingiberaceae, Piperaceae* (**Fernandez, 2003**).

Les huiles essentielles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, souvent situées sur ou à proximité de la surface des tissus de plantes et recouvertes d'une cuticule (**Francois, 2002**).

Ensuite, elles sont stockées dans des cellules dites cellules à huiles essentielles (*Lauraceae* ou *Zingiberaceae*), dans des poils sécréteurs (*Lamiaceae*), dans des poches sécrétrices (*Rutaceae*) ou dans des canaux sécréteurs (*Apiaceae* ou *Asteraceae*). Elles peuvent être stockées dans divers organes végétaux : Les fleurs (ylang-ylang, bergamotier, rose,...), les sommités fleuries (tagète lavande,...), les feuilles (citronnelle, eucalyptus, laurier,...), les racines (vetiver), les rhizomes (gingembre, curcuma...), les fruits (ainsi, badiane,...), le bois (bois de rose, santal,...) ou les grains (ambrette, muscade, ...) (**Francois, 2002 ; Horvath et al., 2002**).

Sur le site de stockage, les gouttelettes d'huile essentielle sont entourées de membranes spéciales constituées d'esters d'acides gras hydroxylés hautement polymérisés, associés à des groupements peroxydes. En raison de leur caractère lipophile et donc de leur perméabilité extrêmement réduite vis-à-vis des gaz, ces membranes limitent fortement l'évaporation des huiles essentielles ainsi que leur oxydation à l'air (**Bruneton, 1993 ; Anton et Lobstein, 2005**). Il existe trois types de structure sécrétrice dans la plante:

- les poils sécréteurs des *Lamiaceae*
- les poches sécrétrices des *Myrtaceae* ou des *Rutaceae*
- et les canaux sécréteurs des *Apiaceae* ou des *Astéraceae* (**Bruneton, 1999 ; Hurtel, 2006**).



Figure 4: Glande sécrétrice avec cuticule dans la face inférieure de la feuille d'*Origanum vulgare* (**Svoboda et al., 2000**).

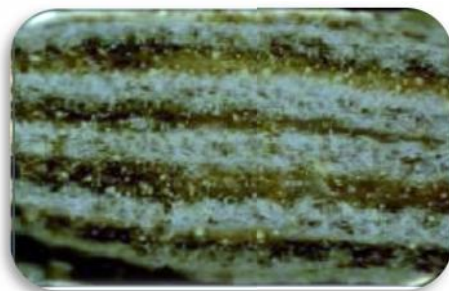


Figure 5: poils épidermiques sur le calice d'une fleur d'un origan (**Porter, 2001**).

II.4. Propriétés physico-chimiques

II.4.1. Propriétés physiques

Les propriétés physiques des huiles essentielles se résument en leurs indices, pouvoir rotatoire, viscosité, densité, solubilité dans l'alcool, point d'ébullition et congélation. Généralement incolores ou jaune pâle, les essences sont liquides à température ambiante. La nature huileuse des HEs, la rend liposoluble ainsi elles sont peu solubles dans l'eau mais le sont dans les solvants organiques apolaires, les huiles grasses, et dans les alcools.

Les huiles essentielles sont extrêmement volatiles et sensibles à l'oxydation. Elles ont tendance à se polymériser en donnant lieu à la formation de produits résineux ce qui induit à la perte de ses propriétés.

Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau (à l'exception des huiles essentielles de saffran, de girofle ou de cannelle constituent des exceptions). Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée (**Baser et Buchbauer, 2010**).

II.4.2. Propriétés chimiques

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels très complexes dont la composition dépend de l'espèce végétale, la saison de récolte et les méthodes d'extraction d'huile (**Paibon et al., 2011**). Ces composants chimiques appartiennent de façon exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents, d'autre part. Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils (**Bruneton, 1999**).

II.4.2. 1. Les terpènes

Les huiles essentielles sont constituées d'un certain nombre de composés terpéniques, généralement les plus volatils dont la masse moléculaire n'est pas élevée. Ces constituants proviennent de l'isoprène répondant à la formule générale $(C_5H_8)_n$, ils sont également nommés isoprénoïdes ou terpénoïdes. Le terme « terpénoïde » définit l'ensemble des terpènes oxygénés et non oxygénés, alors que le terme « terpène » ne tient pas compte de la présence d'oxygène (**Baser et Buchbauer, 2010**).

II.4.2.1.1. Monoterpènes

On y rencontre des monoterpènes acycliques (myrcène, ocimène), monocycliques ou bicycliques (pinènes, 3-carène, camphène, sabinène). Grace à la réactivité des cations intermédiaires de ces terpènes, elles peuvent se rattache à un certain nombre de molécules **(Bruneton, 2008)**.

II.4.2.1.2. Sesquiterpènes

L'allongement de la chaîne des sesquiterpènes amplifie le nombre des cyclisations possible, plus d'une centaine de squelettes différents ont été décrits. On trouvera également des sesquiterpènes avec des fonctions chimiques caractéristiques : alcool (farnésol, carotol), carbures (-caryophyllène), cétones, ester **(Chacou et Bassou, 2007)**.

II.4.2.2. Composés aromatiques

Les composés de cette série, beaucoup moins fréquents que les monoterpènes et les Sesquiterpènes, sont en majorité des dérivés du phenylpropane (C6-C3). Ils représentent un mélange de différents aldéhydes, cétones, alcools, ester et autres, leurs conférant un gout et une odeur caractéristique **(Chacou et Bassou, 2007)**.

II.4.2.3. Composés d'origines diverses

Il s'agit des produits résultant de la transformation de molécules non volatiles généralement de faible masse moléculaire. Il en est de même pour les huiles essentielles lorsqu'ils sont entraînés par la vapeur d'eau. De chaîne linéaire ou ramifiée; saturés ou non et portant différentes fonctions **(Chacou et Bassou, 2007)**.

II.5. Utilisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles peuvent être utilisées comme:

- l'aromatisation des médicaments destinés à la voie orale.
- pour leurs actions physiologiques.
- De nombreux parfums sont toujours d'origine naturelle et certaines HE constituent des bases des parfums.
- Les HE (huile de *citron*, de *menthe*, de *girofle*) sont très utilisées dans l'aromatisation des aliments (jus de fruits, pâtisserie) **(Francois, 2002)**.

II.6. Procédés d'extraction des huiles essentielles

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. En général le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ramilles), de la nature des composés (par exemple, les flavonoïdes, les HEs, les tanins), le rendement en l'huile et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées.

II.6.1.1. La distillation

Il existe trois différents procédés utilisant le principe de la distillation : l'hydrodistillation, l'hydro diffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau (Piochon, 2008).

II.6.1.2. Hydrodistillation

Il s'agit de la méthode la plus simple et, de ce fait la plus anciennement utilisée. La matière végétale est immergée directement dans un alambic rempli d'eau, placé sur une source de chaleur, le tout est ensuite porté à l'ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et l'H.E se sépare de l'hydrolysât par simple différence de densité. L'H.E étant plus légère que l'eau, elle surnage au-dessus de l'hydrolysât (figure 5). Cependant, l'hydrodistillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques (Lucchesi, 2005).



1- Chauffe ballon

5 - Entrée et sortie d'eau

2- Ballon

6 - Erlenmeyer

3- Thermomètre

7 - Matière à extraire l'essence

4- Réfrigérant

8 - La couche d'H.E

Figure 06 : Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation (Lucchesi, 2005).

II.6.1.3. Distillation par entraînement à la vapeur d'eau

Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau. La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'HE en minimisant les altérations hydrolytiques (**Lucchesi, 2005**).

II.6.2. Hydrodiffusion

Cette technique est relativement récente. Elle consiste à faire passer du haut vers le bas, et à pression réduite la vapeur d'eau au travers la matière végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc, moins dommageable pour les composés volatils (**Lucchesi, 2005**).

II.6.3. Extraction à froid

Elle constitue le plus simple des procédés, mais ne s'applique qu'aux agrumes dont l'écorce des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences. Ce procédé consiste à broyer, à l'aide de presses, les zestes frais pour détruire les poches afin de libérer l'essence. Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence, car il n'a subi aucune modification chimique (**Roux, 2008**).

II.6.4. Extraction assistée par micro-ondes

Extraction assistée par micro-ondes est une nouvelle technique qui combine l'utilisation des micro-ondes et d'autres méthodes traditionnelles. Dans ce procédé, la matière végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques condensation, refroidissement, et décantation. Des études démontrent que cette technique possède plusieurs avantages tels que le gain de temps d'extraction, utilisation de petites quantités de solvant, et un rendement d'extraction élevé (**Hemwimon et al., 2007**).

II.6.5. Extraction par les solvants et les graisses

Il s'agit d'extrait de plantes obtenu au moyen de solvants non aqueux (hexane, éther de pétrole etc.), mais aussi de graisses, des huiles (absorption des composés volatils lipophiles par les corps gras). Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau, si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également un bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras. Un lavage à l'éthanol

permet l'élimination de ces composés non désirables. Après distillation de l'alcool, le produit obtenu est appelé « absolu », et sa composition se rapproche de celle d'une H.E. L'extraction à l'aide de solvants organiques pose de problème de toxicité et de solvants Résiduels (**Hernandez, 2005**).

II.6.6. Extraction par fluides supercritiques

Extraction par fluides supercritiques a pris ces dernières années, beaucoup d'essor concernant l'extraction des extraits végétaux. Le principal avantage de cette technique est celui de combiner les caractéristiques des gaz et des liquides pendant le processus d'extraction. En outre tous les processus de dégradation possibles tels que l'oxydation ou isomérisation sont réduits au minimum du fait que le temps d'extraction y'est réduit. Toutefois, cette technique d'extraction présente un inconvénient la basse polarité du dioxyde de carbone supercritique qui le solvant d'extraction le plus employé. Au-delà du point critique ($P= 73,8$ bars, $T^{\circ}= 31,1^{\circ}\text{C}$), le CO_2 possède les propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz, ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction (**Piochon, 2008**).

II.7. Rendement des huiles essentielles

Les quantités des huiles essentielles produites par les plantes sont minimales, entraînant des rendements d'extraction extrêmement faibles, généralement inférieurs à 2 %, mais pouvant atteindre 50% dans le cas de l'huile essentielle de baume (**Metchat, 2012**).

II.8. Conservation des huiles essentielles

Les possibilités de dégradation des huiles essentielles sont nombreuses. Et certains facteurs majeurs doivent être pris en compte :

Il s'agit principalement de la lumière, de la température, de l'humidité et de récipients de stockage. C'est pourquoi elles sont livrées dans des flacons de verre teintes et doivent être conservées dans un endroit frais et qu'elles se conservent entre 12 et 18 mois après leur fabrication, car, avec le temps, leur propriété tendent à décroître (**Besombes, 2008**).

II.9. Rôle physiologique

Beaucoup de plantes produisent les huiles essentielles en tant que métabolites secondaires mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante est inconnu (**Rai et al., 2003**). Il y a beaucoup de spéculation au sujet du rôle des huiles essentielles certainement plusieurs effets utiles ont été décrits tels que:

- la réduction de la compétition des autres espèces des plantes (Allelopathie) par l'inhibition chimique de la germination des graines.
- la protection contre la flore microbienne infectieuse par les propriétés fongicides et bactéricides et contre les herbivores par le goût et effet défavorables sur le système nerveux.
- Certains auteurs pensent que la plante utilise les huiles essentielles pour repousser ou attirer les insectes dans ce dernier cas pour favoriser la pollinisation (**Porter, 2001 ; Hurtel, 2006**).

II.10. Critères déterminants la qualité des huiles essentielles

Jouault (2012), à rapporté que les critères définissant la qualité des huiles dépendent de plusieurs facteurs pouvant être résumés comme suit :

- La sélection de la plante qui est tributaire du genre et de l'espèce botanique.
- Le chémotype (chimiotype) représentant les différents panels de molécules chimiques que des plantes de la même espèce peuvent produire si elles sont placées dans des conditions de cultures différentes. Le chémotype dépend de l'ensoleillement, de la température, de l'humidité, de la nature du sol, de la pression atmosphérique, de la photopériode ...
- La partie de la plante considérée pour l'extraction est déterminante pour la qualité de l'huile. En effet, les différentes parties d'une plante ne possèdent pas un équipement enzymatique uniforme, ce qui entraîne une différence de composition dans les constituants produits, Il est donc impératif de préciser la partie considérée lors de l'extraction de l'HE.
- La période de récolte : la récolte doit se faire au moment où les principes actifs les plus intéressants produits par la plante sont à leur concentration maximale.
- La conservation des huiles essentielles : elle doit se faire dans des flacons verre opaque hermétique, dans un endroit frais, à l'abri de la lumière et de la chaleur pour éviter leur oxydation et la polymérisation de leur composants.

II.11. Toxicité des huiles essentielles

La majorité des intoxications par les plantes connues est la cause d'un surdosage car leur accumulation dans l'organisme crée des affections dégénératives et même des effets secondaires plus banales (vomissements, vertiges, syncopes) (**Valnet, 1984**). L'abus d'essences concentrées

peut aussi provoquer l'engorgement du foie et la rétention d'urine (**Schauemberg et Paris, 2010**).

Il existe également des huiles essentielles qui peuvent provoquer des irritations cutanées lorsqu'on les utilise de façon externe (**Kothe, 2007**). Les effets toxiques se manifestent par des réactions allergiques (eczémas, abcès). Ce sont surtout les huiles essentielles et purifiées qui provoquent ces inflammations (**Schauemberg et Paris, 2010**).

Les huiles essentielles sont des médicaments et une dose peut entraîner des troubles très graves, seul un praticien averti et apte à vous prescrire par contre les baumes, les huiles de corps, les huiles de bains vendus dans le commerce, sont sans danger, si bien sûr en respectent la posologie (**Salle, 1987**).



Chapitre III

L'activité antimicrobienne

III. Activité antimicrobienne des l'huiles essentielles

Lorsque l'on parle d'activité antimicrobienne, on distingue deux sortes d'effets : une activité létale ou bactéricide et une inhibition de la croissance ou activité bactériostatique (**Abdesselam, 2006**).

Les huiles essentielles sont reconnues par leurs composants naturels, comme les monoterpènes, diterpènes et les hydrocarbures avec des groupes fonctionnels divers. Dans les années 1990, Muanza et ses collaborateurs ont recherché des extraits de plantes potentiellement bioactifs contre les bactéries et les moisissures. Depuis, beaucoup d'autres chercheurs ont rapporté l'effet antimicrobien et antifongique des huiles essentielles dans l'application agroalimentaire, la recherche pharmaceutique et dans d'autres domaines (**Hassania *et al.*, 2012**).

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

III.1.1. Définition d'un antimicrobien

L'essor de la chimie a permis l'apparition de nouvelles substances antimicrobiennes. Ces dernières sont définies comme étant des substances utilisées pour détruire les microorganismes ou empêcher leur croissance, y compris les antibiotiques et autres agents antibactériens et antifongiques. Ces substances synthétiques ont été employées couramment. Cependant, en raison du souci croissant des consommateurs aux denrées contenant de tels additifs chimiques, la recherche des additifs naturels, particulièrement d'origine végétale, a notamment augmenté ces dernières années. Par conséquent, le développement des produits naturels possédant une activité antibactérienne s'avère nécessaire et utile (**Rožman & Jeršek, 2009**).

III.1.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Les différents protocoles peuvent être classés selon le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'huile essentielle et selon la nature du contact de l'huile essentielle avec le germe. La majorité de chercheurs ont employé une des trois analyses suivantes : diffusion sur disque, dilution d'agar et dilution de bouillon (**Burt S., 2004**).

III.1.2.1. Méthode de l'aromatogramme

La méthode de l'aromatogramme consiste à utiliser des boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé convenable (10-25mL), déjà solidifié et inoculé de la souche microbienne testée.

Des disques en papier filtrent, papier buvard ou Wattman (6-8mm), préalablement imprégnés de quantités connues d'HE (5-30 μ L), sont alors placés en surface de la gélose.

Généralement, les micro-organismes seront classés sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistantes, selon le diamètre de la zone d'inhibition.

III.1.2. Méthode de dilution

La méthode par dilution a pour but d'évaluer des concentrations minimales inhibitrice. Elle consiste à déterminer la plus faible concentration d'un agent antimicrobien, nécessaire pour inhiber la croissance d'un microorganisme. L'efficacité de l'huile essentielle testée est évaluée par la mesure de 2 concentrations :

La concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB). (**Bendjebelleh, 2015**).

III.2. Activité antibactérienne

III.2.1. Les bactéries

Une bactérie est un microbe formé d'une seule cellule, visible au microscope, appartenant à une zone de transition entre le règne animal et le règne végétal. Comme toute cellule, les bactéries sont constituées d'un noyau, isolé ou diffus, un protoplasme contenant des granulations et des vacuoles, une paroi parfois d'une capsule (**Bendjebelleh, 2015**).

L'activité biologique d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et à leurs effets synergiques (**Abdesselam, 2006**).

III.2.2. Mode d'action contre les bactéries

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des HEs, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire. Le mode d'action des HEs dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui

leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne (**Jalila et al., 2014**).

Les huiles essentielles possèdent plusieurs modes d'action sur les différentes souches de bactéries, mais d'une manière générale leur action se déroule en trois phases :

- attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires (fuite d'électron et la coagulation du contenu protéique des cellules).
- acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie (**Davidson, 1997; Stéphane et Monique, 1997**).

Elles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celles des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs. Elles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Pour les levures, elles agissent sur la biomasse et la production des pseudomycelium alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures. (**Stéphane et Monique, 1997**).

L'action des HES dépend aussi de la nature des microorganismes ciblés. Les bactéries à Gram positif sont plus sensibles à l'action des HES, par rapport aux bactéries à Gram négatif. Cela peut être expliqué par la présence de la membrane externe chez les bactéries à Gram négatif, elle représente en effet une barrière capable de diminuer la perméabilité des composés hydrophobes (**Calsamiglia et al., 2007**). Cependant, les molécules à faible poids moléculaire comme le thymol et le carvacrol peuvent traverser cette barrière (**Ultee et al., 1999 ; Dorman et al., 2000**).

III.3. L'activité antifongique

III.3.1. Les moisissures

Sont des champignons microscopiques. Ce sont des organismes pluricellulaires dont l'appareil végétatif, le thalle, est formé de longs filaments ramifiés et souvent cloisonnés que

l'on appelle des hyphes. Lorsque la croissance est suffisamment avancée, l'ensemble des hyphes constitue un mycélium visible à l'oeil nu qui se présente comme une sorte de feutrage à la surface colonisée (**Nicklin *et al.*, 2000**).

Les groupes moléculaires avec les plus puissantes actions antibactériennes sont également des antifongiques efficaces mais ils doivent être utilisés sur de plus longues périodes. Des études fondamentales ont également montré que les alcools et les lactones sesquiterpénique avaient une activité antifongique (**Abdesselam, 2006**).

Cette activité est estimée selon la durée d'inhibition de la croissance déterminée par simple observation macroscopique. L'activité antifongique décroît selon le type de fonction chimique Phénols, Alcools, Aldéhydes, Cétones, Ethers, Hydrocarbures (**Utree *et al.*, 2002**).

Le thymol et l'eugénol sont responsables des activités fongicides et bactéricides des huiles essentielles qui en contiennent, L'activité des terpènes des huiles essentielles est en corrélation avec leur fonction chimique. Avec leurs travaux ils ont montré l'importance de la spécification du genre et de l'espèce, ainsi que de la variété de la plante d'où provient l'extrait. (**Utree *et al.*, 2002; Abdesselam, 2006**).

A decorative blue border with intricate floral and scrollwork patterns, framing the central text. The border consists of four ornate corner pieces connected by thin horizontal and vertical lines.

Etude expérimentale



Matériel et Méthodes

Le travail expérimental, ayant pour objet l'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Cytisus villosus*. La partie expérimentale a été réalisée au laboratoire de biologie, **Université Abbés Laghrour - Khenchela-**.

I. Matériel

I.1 Matériel végétal

Notre étude a été menée sur les feuilles de la plante *Cytisus villosus*. La récolte a été en Mars 2016, dans la région d'El-Milia, Wilaya de Jijel, pendant la période de floraison. Les feuilles ont été ensuite séchées à l'aire libre à l'abri de la lumière.

I.2. Matériel du test de l'activité antibactérienne

I.2.1. Souches microbiennes testées

L'activité antimicrobienne de l'HE de *C. villosus*, a été évaluée sur huit souches bactériennes provenant de l'American Type Culture Collection (ATCC), et sur quatre souches fongiques.

➤ **Les souches bactériennes :**

- Gram positif : - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 - *Bacillus subtilis* ATCC 21332-
Listeria monocytogenese
- Gram négatif : - *Acinetobacter boumanii* ATCC 19606 - *Kliebsciella oxytoca* ATCC
25922 - *Selmonella* sp - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 - *Escherichia coli*
ATCC 25922

- Les souches fongiques : - *Penicillium* sp - *Aspergillus niger* – *Fusarium* sp –
Aspergillus flavus

II. Méthodes

II.1. L'extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger (**Clevenger, 1928**). Elle consiste à couper le matériel végétal en parties très fines et soumises à l'hydrodistillation en se servant du dispositif d'extraction. L'hydrodistillation se base sur le pouvoir que possède la vapeur d'eau à transporter les HE. L'opération consiste à immerger une quantité de la masse végétale dans un grand ballon (1) en verre pyrex de 1 litre contenant une quantité suffisante d'eau distillée sans remplir complètement le ballon (le contenu du ballon ne doit pas dépasser les deux tiers). Le mélange

est porté à ébullition à l'aide d'une plaque chauffante (2). Les vapeurs chargées de l'huile essentielle passent à travers le réfrigérant (3) où aura lieu la condensation.

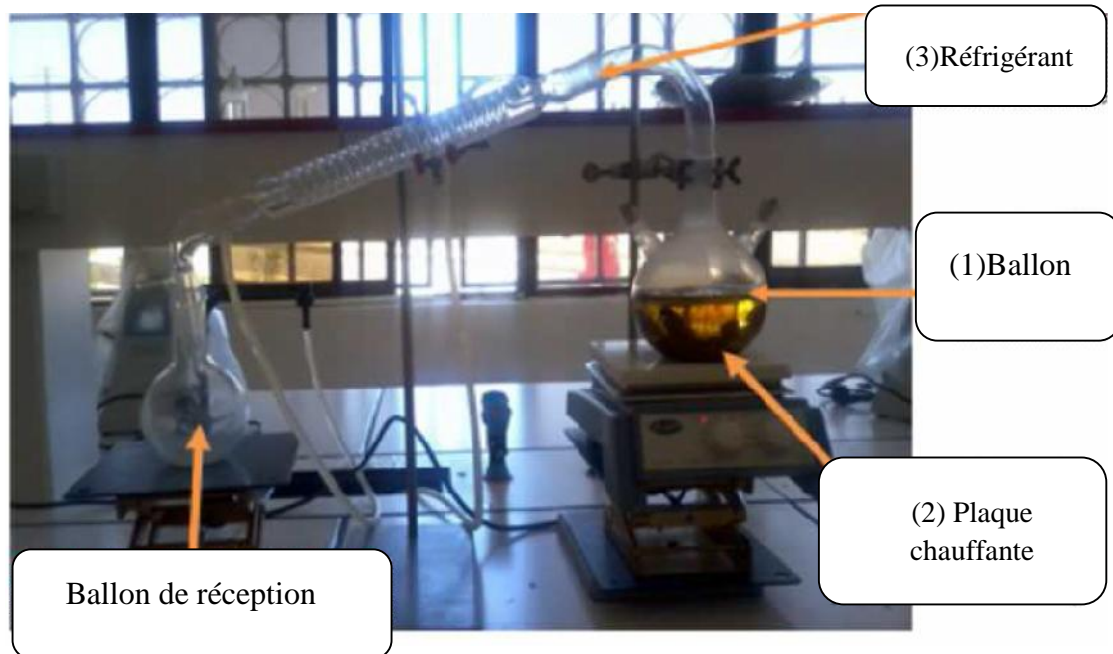


Figure 07 : Dispositif d'extraction Clevenger

Les gouttelettes ainsi récupérées dans une fiole, sont ensuite mises dans une ampoule à décantation, et récupérées en ajoutant du chloroforme (HE se dissout dans le chloroforme). Cette opération est répétée trois fois (séparation liquide-liquide). Ensuite on passe le mélange dans le rota-vapeur pour l'obtention des huiles essentielles. L'hydrodistillation dure 5 heures. Les huiles essentielles obtenues sont conservées dans des flacons opaques bien scellés à l'abri de la lumière et à une température de 4 à 6 °C.

II.2. Détermination du rendement d'extraction

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse de matière végétale utilisée. Après récupération de l'huile essentielle, le rendement est calculé par la relation suivante :

$$R_{dt} (\%) = m/m_0 \times 100$$

R_{dt} : rendement d'huile essentielle (en pourcentage).

m : masse d'huile essentielle récupéré (g).

m_0 : prise d'essai de matériel végétale (g) (Afnor, 2000).

II.3. Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle

Ce test est réalisé in- vitro, la technique utilisée est la technique de contact direct qui compte deux méthodes, la méthode des puits et la méthode de diffusion, nous avons adopté la dernière, dite l'aromatogramme.

II.3.1.Méthode de diffusion sur disques (aromatogrammes)

L'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles (SM) et de séries de dilutions (1/2 et 1/4 et 1/8 etc.), par la méthode de diffusion en milieu solide (la méthode des disques).

Cette méthode est décrite par **Jacob et Tonei, 1979**, Elle est appelée aromatogramme par référence à l'antibiogramme, la seule différence est que l'antibiotique est remplacé par les huiles essentielles, et aussi l'aromatogramme est à la phytothérapie ce que l'antibiogramme décrit par la pharmacopée française des antibiotiques est à la médecine.

Cette méthode consiste à déposer les disques de papier Wattman N°01 imprégnés d'HE (10 μ l) à la surface du milieu gélosé, Mueller-Hinton, en boîte de pétri préalablement ensemencées par écouvillon en série stries (4 disques par boîte); Celles-ci sont ensuite fermées et laissées diffuser pendant 20 mn puis incubées à 37 °C pendant 24 h.

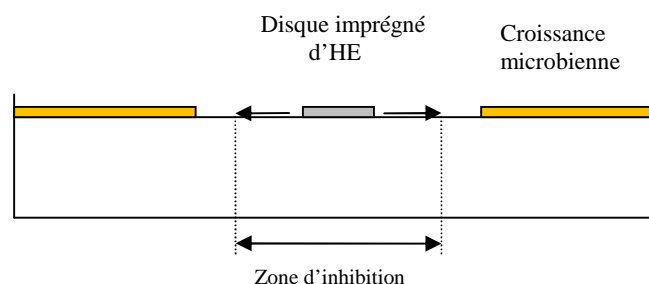


Figure 08 : Aromatogramme sur boîte de Pétri à diffusion linéaire à partir d'un disque imprégné d'huile essentielle.

Les résultats sont exprimés par la mesure du diamètre des halos d'inhibition à l'aide d'une règle en mm. La sensibilité des différentes souches vis-à-vis des H.E. étudiées est classée selon le diamètre d'inhibition selon les critères suivants:

- ❖ **Non sensible (-)** ou résistante : diamètre < 8 mm.
- ❖ **Sensible (+)** : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- ❖ **Très sensible (++)** : diamètre compris entre 15 à 19 mm.
- ❖ **Extrêmement sensible (+++)** diamètre > 20 mm (**PONCE *et al.*, 2003**).

NB: Un disque imprégné par 5 µl de DMSO a été utilisé comme témoin négatif.

II.3.2. Préparation des disques

Cette préparation se fait à partir du papier Wattman n°01, qui est découpé en disques de 06 mm de diamètre, Ces disques seront placés dans un tube à vis pour la stérilisation à l'autoclave pendant 30 mn à 130°C.



Figure 09 : La technique de préparation des disques.

II.3.3. Dilution de l'huile essentielle V/V

A l'aide d'une micropipette, on procède à une dilution successive en prélevant 500 µl de solution brute (huile essentielle) et la mélanger avec 500 µl de DMSO et le mettre dans un tube à eppendorff pour l'obtention d'une dilution de (1/2), de même on prélève 500 µl de la dilution 1/2 et l'homogénéiser avec 500 µl de DMSO pour l'obtention d'une nouvelle concentration (1/4), et ainsi de suite jusqu'à la réalisation d'une série des dilutions (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256).



Figure 10 : Dilution des huiles.

II.3.4. Préparation de l'inoculum

➤ Préparation des pré-cultures

Les tests antibactériens doivent être réalisés à partir des cultures jeunes. Les souches sont étéensemencées sur gélose nutritive, et incubées à 37°C pendant 18h.

➤ Préparation des suspensions bactériennes

A partir des cultures jeunes sur (GN), des colonies bien isolées et parfaitement identiques ont été raclées à l'aide d'une anse de platine stérile. L'anse est en suite déchargée dans un tube contient 9ml d'eau physiologique stérile. L'opacité de la suspension bactérienne doit être équivalente à 0.5 Mack Farland.

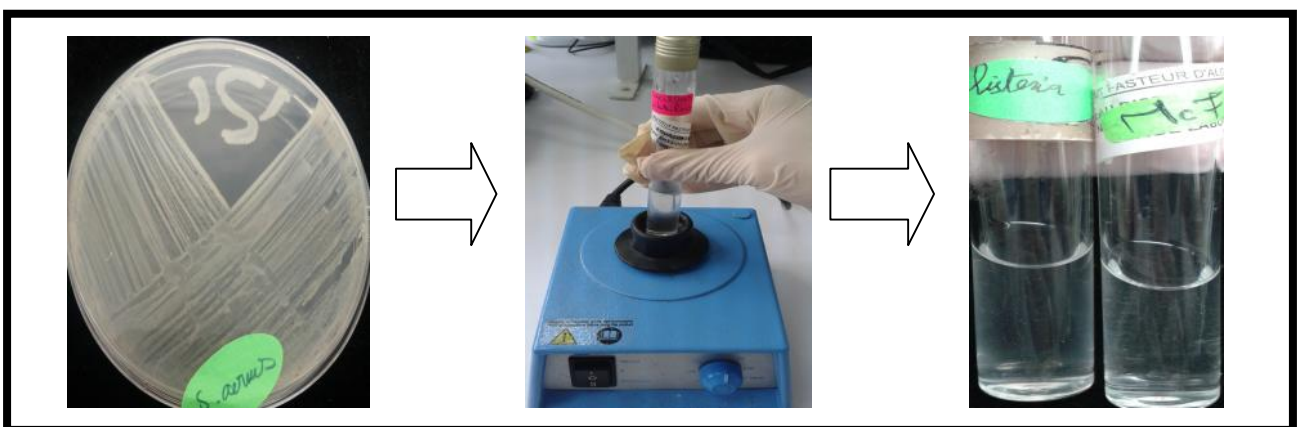


Figure 11 : préparation de la suspension bactérienne

➤ **Préparation des suspensions sporale**

Dans des boites de Pétri, contenant le milieu Sabouraud solide, on dépose un disque de 6mm de chaque souche fongique au centre de chaque boite, et on les incube jusqu'à ce que la croissance mycélienne atteigne les bords des boites de Pétri (incubation pendant 5-7 jours). A partir de ces boites, on verse 9 ml d'eau physiologique stérile à 0.9% avec 1ml de Tween 20 pour obtenir de suspensions des spores. L'inoculum est standardisé à une concentration de $1-2 \cdot 10^5$ spore /ml par un comptage en utilisant la cellule de Malassez (Guarro *et al.*, 1998).

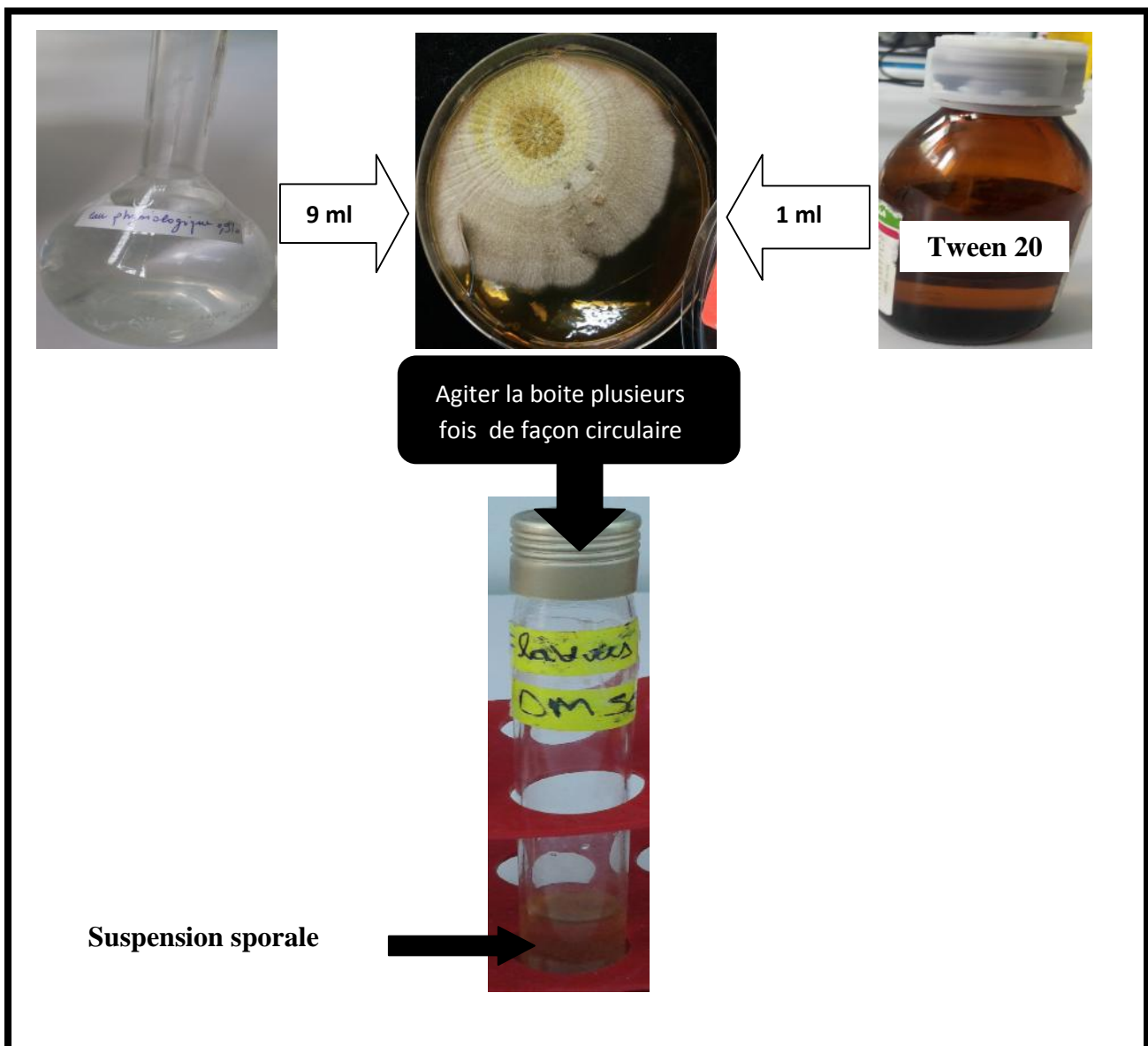


Figure 12 : préparation de la suspension sporale

II.3.5.L'ensemencement et dépôt des disques

Couler la gélose Muller-Hinton dans chaque boîte de pétri, et laisser solidifier. Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, l'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum, Ensemencer sur le milieu gélosé à trois reprises, en tournant la boîte de pétrie à environ 60°c après chaque application dont le but d'avoir une distribution égale de L'inoculum. Enfin, on a écouvillonné partout autour du bord de la surface de la gélose.

NB : Dans le cas de l'ensemencement de plusieurs boîtes de Pétri il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

II.3.6. Détermination des Concentrations minimales inhibitrices (CMI)

La concentration minimale inhibitrice est définie comme la concentration minimale d'huile essentielle dans le bouillon résultant une diminution ou changement dans la croissance de micro organisme.

➤ La dilution décimale de suspension microbienne

Les dilutions sont presque toujours des dilutions successives décimales de raison 10: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} . Les dilutions sont réalisées dans un volume de 9 mL d'eau physiologique, les prélèvements sont faits à l'aide de pipette pasteur stérile, 1ml de la suspension bactérienne ou sporale.

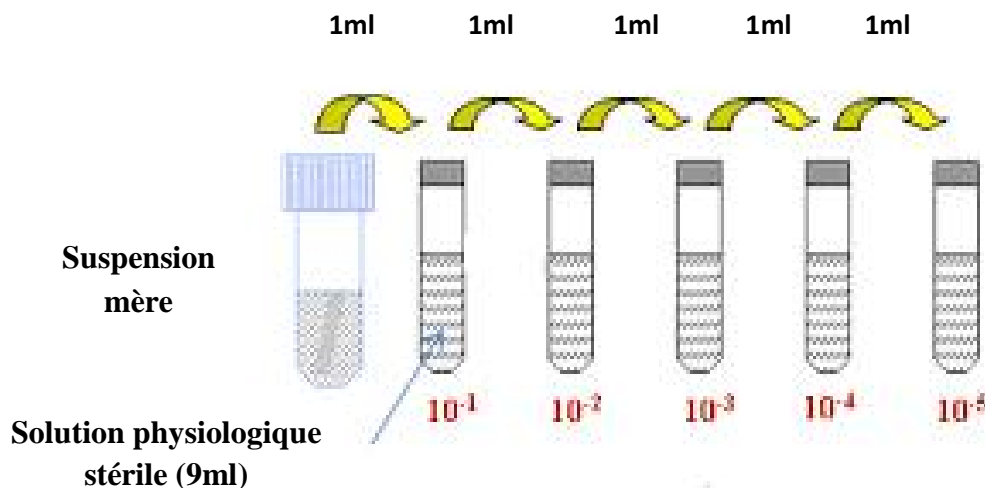


Figure 13 : Préparation de l'inoculum bactérienne.

➤ **La méthode de micro dilution**

On procède à une dilution successive par progression les dilutions suivantes 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/50, 1/64, 1/80, 1/128, 1/256.

Les souches microbiennes

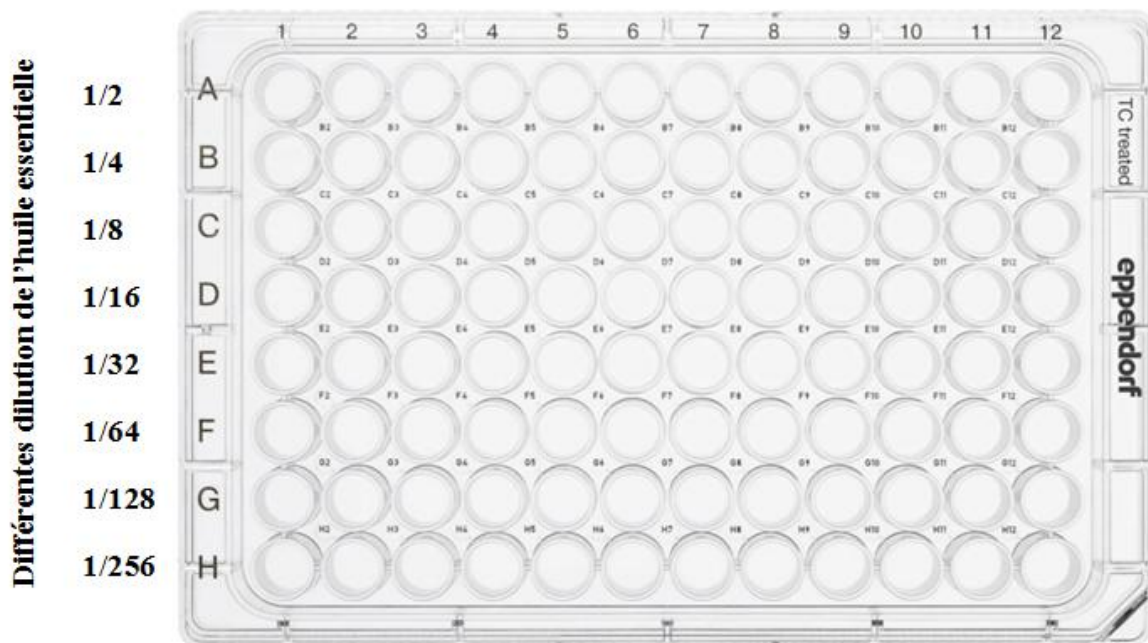


Figure 14 : La méthode de microdilution

Dans chaque puits de microplaque, nous avons introduit 95 μL de bouillon Mueller-Hinton. Ensuite 100 μL de la dilution d'HE. 5 μL de l'inoculum (10^{-3} cellules/ml) sont ensuite ajoutés dans chaque puits de la microplaque.

Les microplaques sont scellées et placées dans un incubateur à 37°C pendant 24 heures.

Après l'incubation les CMI sont déterminées à l'œil nu, en examinant la croissance microbienne, dans chaque puits, qui se traduit par une turbidité.



Figure 15 : La méthode de remplis des puits de microplaque

➤ **Détermination des concentrations minimales bactéricides et fongicides**

La CMB testé a été déterminée comme étant la plus faible concentration a laquelle aucune croissance visible du micro-organisme n'avait eu lieu.

Pour estimer l'activité létale d'huiles essentielles, les microorganismes sont transférés du bouillon liquide où aucune croissance n'a été observée (sur microplaque), et incubés dans des tubes à essai qui contient 9ml d'un nouveau milieu de bouillon MH.

La plus faible concentration d'huile essentielle entraînant l'inhibition de la croissance totale est reconnue comme la concentration minimale mortelle, CMB pour les bactéries (concentration minimale bactéricide) et CMF pour les champignons.



Résultats et Discussions

I. Résultats

I.1. Rendements

Le rendement moyen en huile essentielle a été calculé en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne de la plante. Le rendement en huile essentielle de *Cytisus villosus* a fourni un taux de 0.1%.

I. 2. Les résultats d'aromatogramme

L'activité antimicrobienne des HEs a été testée par la méthode de l'aromatogramme. La sensibilité des souches se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour des disques, d'un diamètre variable selon la souche.

I.2.1. Résultats de l'activité antibactérienne

Les résultats du test de sensibilité bactérienne à HE de *C. villosus* sont présentés dans le tableau2.

Tableau 02 : Détermination des zones d'inhibition de l'HE de *C. villosus*

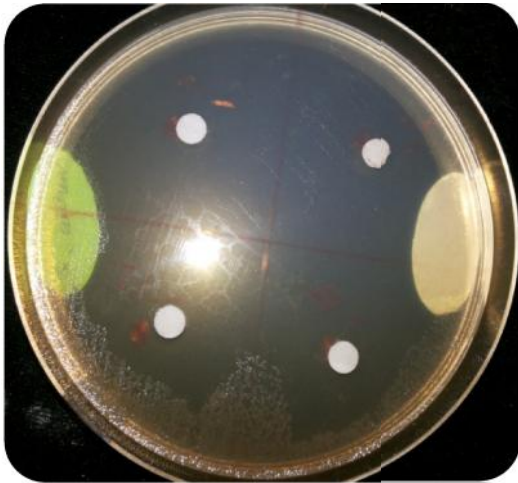
Les souches testées	Diamètres des zones d'inhibition de l'HE(mm)			
	HE	1/2	1/4	1/8
<i>Bacillus subtilis</i>	>30 +++	>30 +++	22 +++	20 ++
<i>Staphylococcus aureus</i>	>30 +++	>30 +++	>30 +++	>30 +++
<i>E. coli</i>	>30 +++	>30 +++	>30 +++	>30 +++
<i>Listeria monocytogenese</i>	>30 +++	>30 +++	24 +++	20 ++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>30 +++	25 +++	16 ++	10 +
<i>Klebsiella oxytoca</i>	>30 +++	>30 +++	>30 +++	>30 +++
<i>Acenetobacter baumannii</i>	>30 +++	>30 +++	19 ++	14 +
<i>Salmonella sp.</i>	24 +++	24 +++	20 ++	15 ++

Non sensible - ; sensible + ; très sensible ++ ; Extraiment sensible +++

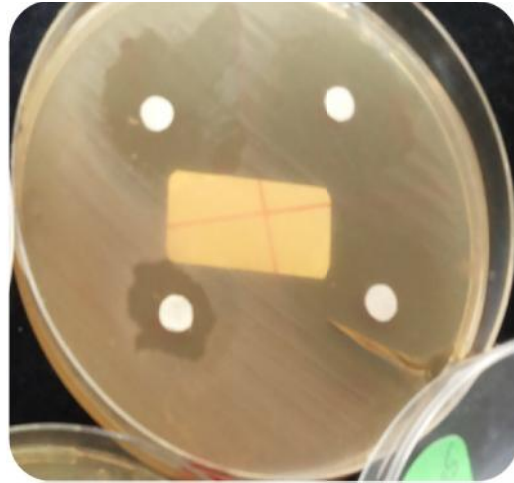
La méthode de diffusion des disques a été permise de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle vis-à-vis des bactéries testées.

D'après les résultats obtenus nous avons constatés que toutes les souches testées sont sensibles aux huiles essentielles des feuilles de *C.villosus*, notamment *Staphylococcus aureus* (bactérie Gram positif) et *Klebsiella oxytoca* (bactérie Gram négatif) et *Escherichia coli*(Gram négatif),ces trois souches sont les plus sensible envers l'huile de *C.villosus*.

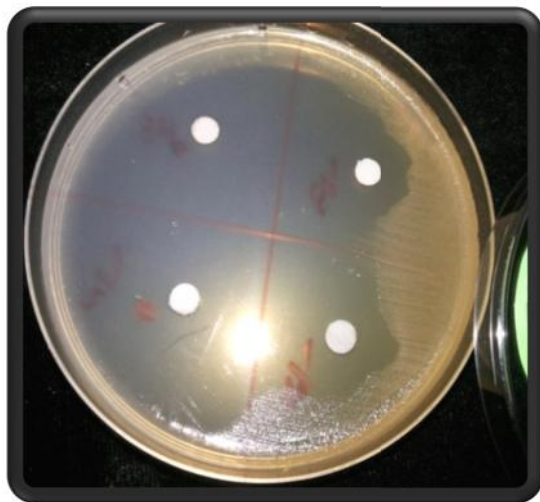
Il sort des résultats obtenus que, à partir de la solution brute (HE), la croissance des souches bactériennes est totalement inhibée avec de diamètre d'inhibition supérieure de 30 mm chez tous les germes,sauf *Salmonella sp.* qui montre un halo d'inhibition de 24mm (**Figure 17**).



Staphylococcus aureus



Salmonella sp



Klebsiella oxycota



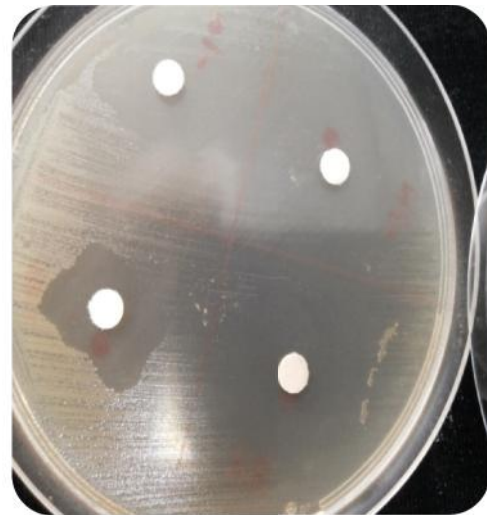
Bacillus subtilis

Figure 16: la sensibilité des bacterie testées contre les huiles essentielles de *C.villosus*

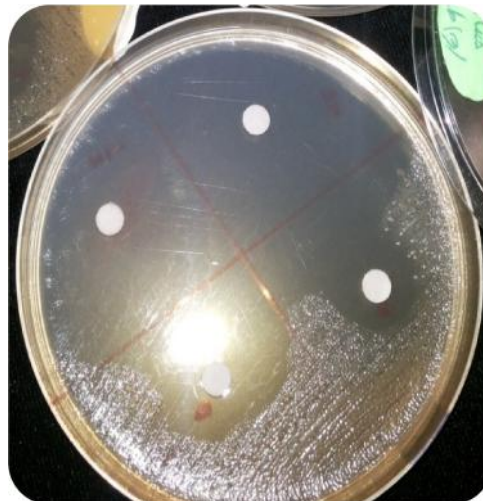
Pseudomonas aeruginosa et *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenese* et *Acenetobacter baumannii* sont des souches sensibles à cette huile mais la sensibilité diminue avec l'augmentation des dilutions des HE.



Pseudomonas aeruginosa



Acinetobacter baumannii



Bacillus subtilis

Figure 17: la comparaison entre les trois souches

L'activité antibactérienne d'HE de *C. villosus* sur *salmonella sp.* est faible, elle présente une certaine résistance par rapport aux autres souches gram négative testées.

L'analyse statistique des résultats en utilisant le test ANOVA, n'a montré aucune différence significative dans la sensibilité des souches Gram positif et Gram négatif à l'huile essentielle, avec la concentration $p > 0.05$. De plus la régression linéaire à montre une forte corrélation entre la sensibilité des souches *Salmonella sp.*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Bacillus subtilis* (R^2 compris entre 0.98-0.99).

I. 2. Détermination de la CMI par la méthode de microdilution

L'essai des dilutions en série dans les microplaques de 96 puits a révélé des valeurs de CMI (Concentration Minimale Inhibitrice). Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des différentes huiles sur les huit souches bactériennes étudiées ont été alors déterminées et regroupées dans le **Tableau 3**.



Figure 18 : Concentration minimale inhibitrice (CMI)

Tableau 03: Valeurs des CMI de l'huile infusée de *Cytisus villosus*

Les bactéries	Concentrations de l'huile infusée de CV							
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/254
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	- CMI	+	+	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	- CMI	+	+	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	- CMI	+	+	-	-
<i>Listeria monocytogenese</i>	-	-	-	- CMI	+	+	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	- CMI	+	+	+	+	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-	- CMI	+	+	+	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	- CMI	+	+	+	-	-
<i>Salmonella sp</i>	-	-	-	- CMI	+	+	+	-

(+) présence de croissance. (-) absence de croissance

L'huile essentielle a présenté une CMI de 1/16 pour les souches (*S. aureus*, *E.coli*, *Listeria monocytogenese*, *Klebsiella oxytoca*, et *Salmonella sp*).

Les souches *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* ont été inhibé à 1/8 de l'huile essentielle.

I.3. Détermination des CMB

Le bouillon MH été ensemencé à partir des puits qui n'ont montré aucune croissance (absence de trouble) afin de déterminer les concentrations minimales bactéricides. Les résultats sont résumés dans le **tableau 4**.

Tableau 04 : Concentrations minimales bactéricide (CMB) de l'huile essentielle de *Cytisus villosus*.

Les souches bactériennes	Concentrations de l'huile infusée de CV			
	1/2	1/4	1/8	1/16
<i>Bacillus subtilis</i>	-	_CMBs	+	
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	_CMBs	+	+
<i>E. coli</i>	-	-	-	_CMBc
<i>Listeria monocytogenese</i>	-	-	_CMBc	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	_CMBc	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+CMBs	+	+	+
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	_CMBc	
<i>Salmonella sp</i>	-	-	_CMBs	+

(+) présence de croissance. (-) absence de croissance.

CMBc :bactéricide, **CMBs** :bacteriostatique.

Les subcultures réalisées suite à l'obtention des CMI ont permis d'observer une activité bactéricide (CMB) sur *E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa* avec différente concentration de dilution de l'huile.

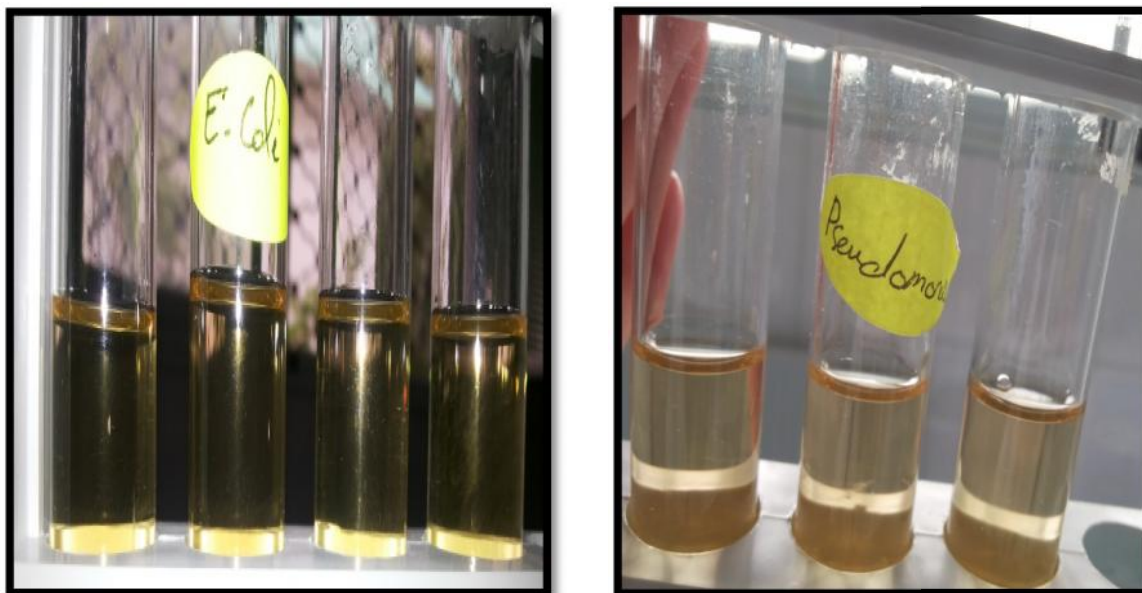


Figure 19 : Résultat de CMBc pour *Escherichia coli* et *P. aeruginosa*.

L'huile essentielle de *Cytisus vilosus* présenté, à la fois, une activité bactéricide et une activité bactériostatique pour les souches Gram⁺, à savoir *Listeria monocytogenese* (bactéricide),

Bacillus subtilis et *Staphylococcus aureus* (bactériostatique), avec des CMB de, 1/2, 1/4, et 1/8 respectivement. De même pour les souches à Gram-, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Acinetobacter baumannii* (bactéricide), *Klebsiella oxytoca*, et *salmonella sp* (bactériostatique).

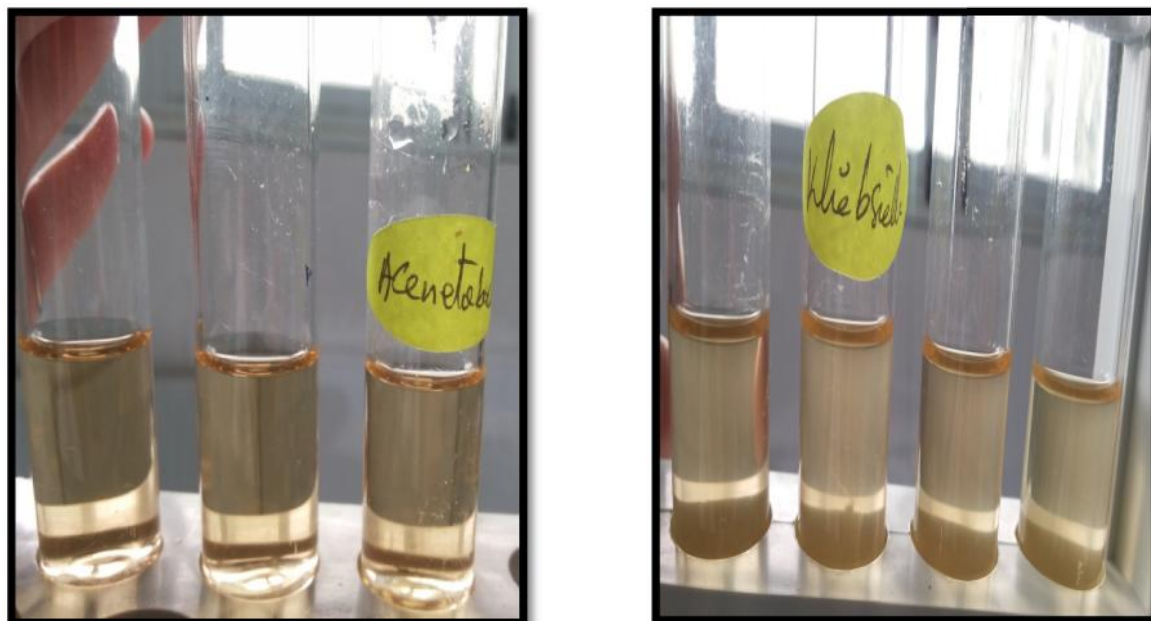


Figure 20: Résultat de CMB pour *Klebsiella oxytoca* et *Acinetobacter baumannii*

I.4. Résultats de l'activité antifongique

I.4.1. Sensibilité des souches fongiques à l'huile essentielle

Les résultats des tests de sensibilité fongiques à HE de *C. villosus* sont présentés dans le tableau 05 et les figures suivants.

Tableau 05 : Les résultats de l'aromatogrammes sur les champignons

Souche test	Concentrations de l'huile infusée de CV (mg/ml)			
	HE	1/2	1/4	1/8
<i>Penicillium sp</i>	>30mm	>30mm	>30mm	>30mm
<i>Aspergillus niger</i>	>30mm	20 mm	18mm	22mm
<i>Aspergillus flavus</i>	20mm	16mm	16mm	14mm
<i>Fusarium sp</i>	>30mm	>30mm	>30mm	>30mm

D'après le tableau, ont été montrés que *Penicillium sp* et *Fusarium sp* sont extrêmement sensibles à l'HE, par contre *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus* sont très sensibles à cette huile.

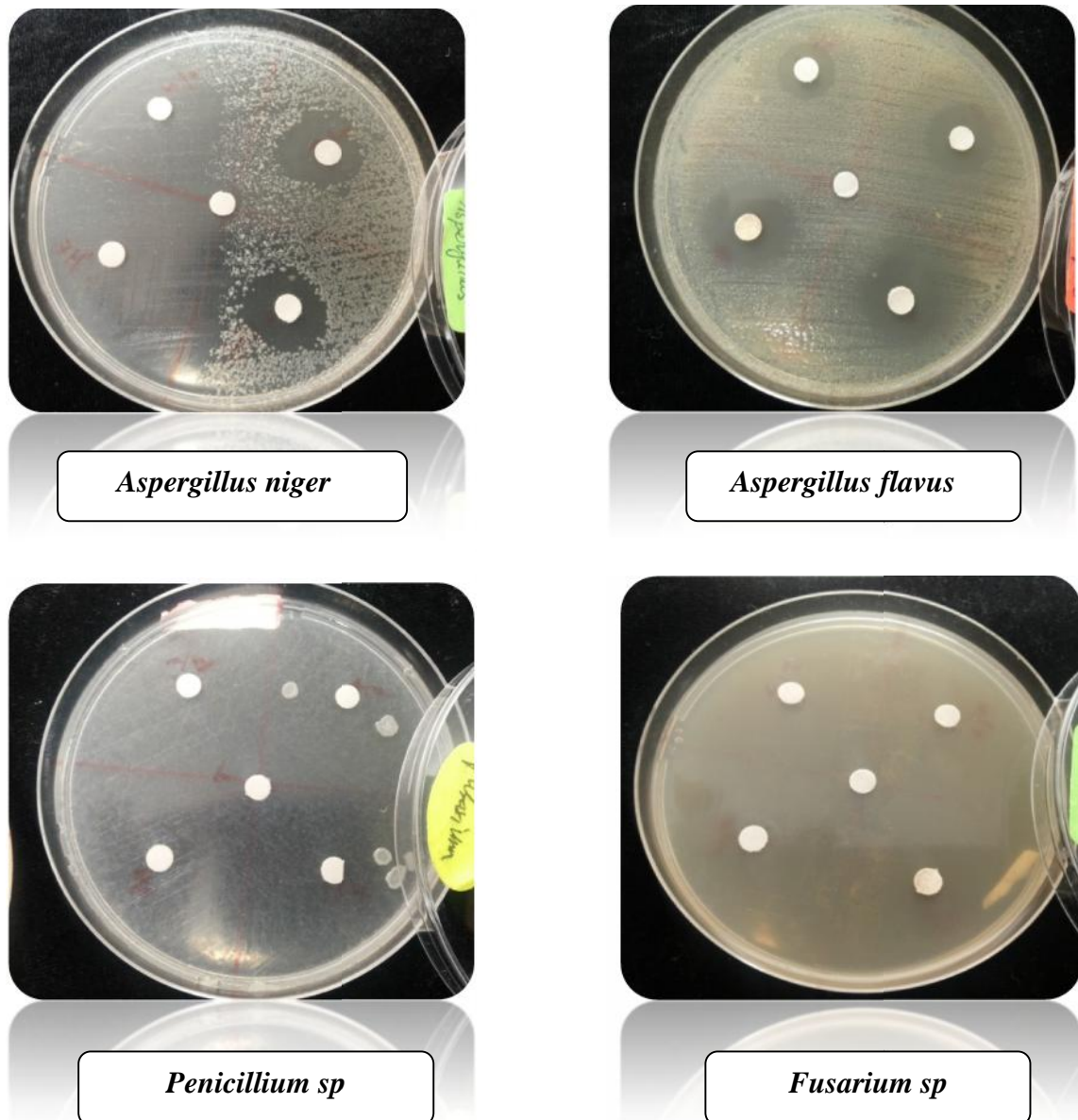


Figure 21: L'effet des huiles essentielles sur les champignons

I.4.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices

Les CMI de l'huile essentielle ont été déterminées pour les quatre souches fongiques testées par la méthode de microdilution. Les résultats sont résumés dans le **tableau 6**.

Tableau 06: Concentration minimale inhibitrice (CMI)

Souches testées	Concentrations de l'huile					
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
<i>Penicillium sp</i>	-	-	-	_CMI	+	+
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	_CMI	+	+
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	_CMI	+	+	+
<i>Fusarium sp</i>	-	_CMI	+	+	+	+

Le tableau montre également que l'huile essentielle de *Cytisus villosus* est active sur la croissance de deux souches fongiques (*Penicillium sp* et *Aspergillus niger*) avec des CMI 1/16 $\mu\text{l/ml}$. L'huile essentielle a présenté une CMI dans la concentration 1/4 pour *Fusarium sp*, et 1/16 $\mu\text{l/ml}$ pour *Aspergillus flavus*.

Le test ANOVA montré une différence significative entre les souches *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, et *Fusarium sp*. Aucune différence significative n'a été montrée entre *Penicillium sp* et *Aspergillus niger*.

I.4.3. Résultats de détermination des concentrations minimales fongicides (CMF)

Tableau 07: Activité fongistatique (CFS) et fongicide (CMF)

Les souches testées	Concentrations de l'huile infusée			
	1/2	1/4	1/8	1/16
<i>Penicillium sp</i>	-	-	-	_CMFc
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	_CMFs	+
<i>Aspergillus flavus</i>	+	+	+	
<i>Fusarium sp</i>	+	+	+	

Les subcultures réalisées suite à l'obtention des CMI ont permis d'observer seulement une activité fongicide (CMF) sur *Penicillium sp*. Par contre elle présente une activité fongistatique vis-à-vis d'autres souches. La comparaison des CMI et CMF montre que *Penicillium sp* est la souche la plus sensible à notre huile (**Figure 23**).

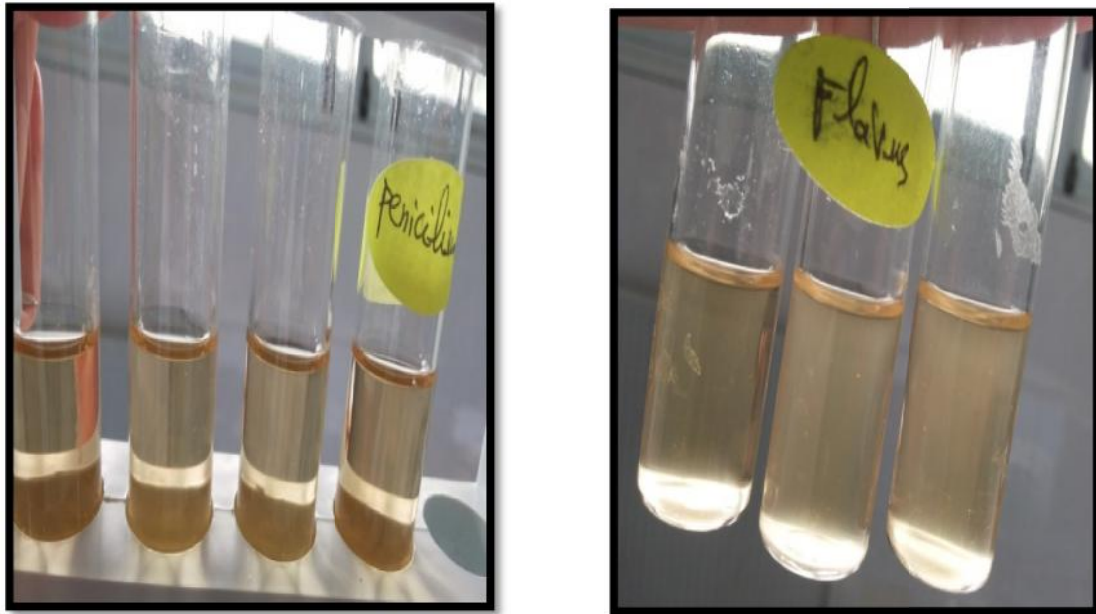


Figure 22: L'action fongicide et fongistatique des HES sur *penicilium sp* et *Aspergillus flavus*.

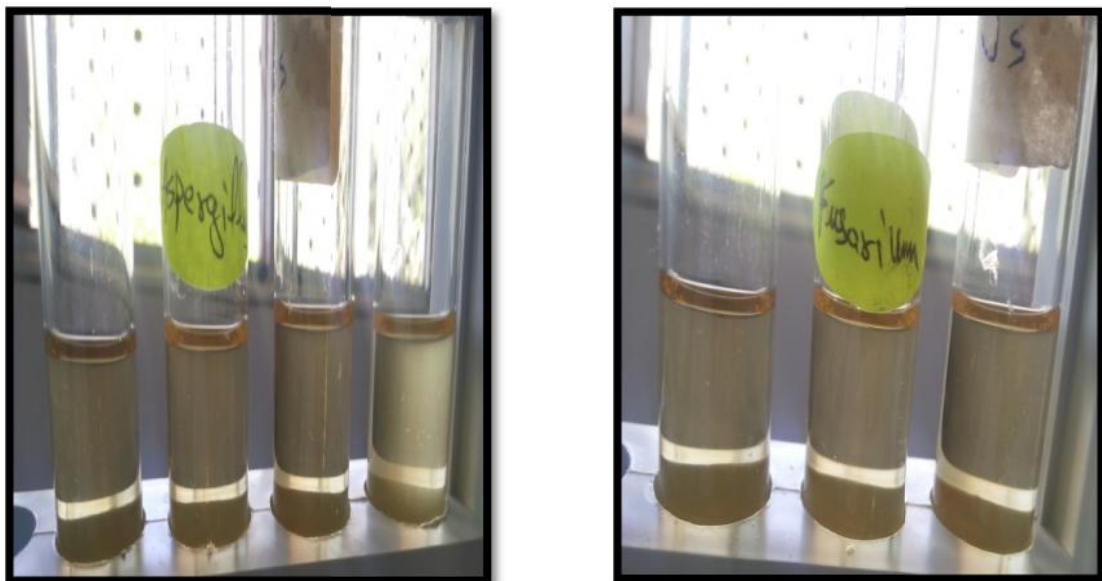


Figure 23: L'action fongistatique des HES sur *Aspergillus niger* et *Fusarium*

II. Discussion générale

Notre travail est inscrit dans la recherche de nouvelles substances à effet antimicrobien. Durant notre étude on a pu évaluer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle des feuilles de *Cytisus villosus* vis-à-vis de 12 souches microbiennes (8 bactéries et 4 champignons).

Les résultats ont montré une forte activité antibactérienne de notre huile contre les huit souches testées. L'analyse statistique a montré que cette activité est dépendante de la concentration.

La zone d'inhibition augmente considérablement avec la concentration des extraits, ce qui a été constaté aussi par **Dordevic et ses collaborateurs, (2007)**. Les auteurs ont révélé des zones d'inhibition de l'ordre de (20.5 ± 1.8 mm), (12.8 ± 0.5 mm), (16.3 ± 0.5 mm) respectivement pour les souches *Staphylococcus aureus* ATCC, *Escherichia coli* ATCC, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC pour une dilution au 2% d'huile essentielle de *Carlina acanthifolia*, ces zones sont augmentées de l'ordre de : (21.8 ± 0.9 mm), (13.5 ± 0.5 mm), (19.3 ± 0.5 mm) pour une dilution au 4%.

L'étude statistique des résultats de l'activité antibactérienne n'ont montré aucune différence significative entre les souches Gram+ et Gram- concernant la sensibilité à notre huile.

Plusieurs travaux ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram (+) par rapport aux Gram (-) (**Falleh et al., 2008 ; Hayouniet al., 2007 ; Turkmenet al., 2007 ; Shan et al., 2007 ; Koné et al., 2004**), Ceci peut s'attribuer à la différence dans les couches externes des bactéries Gram (-) et Gram (+). Les bactéries Gram (-), indépendamment de la membrane des cellules, possèdent une couche additionnelle la membrane externe, qui se compose des phospholipides, des protéines et des lipopolysaccharides, cette membrane est imperméable à la plupart des molécules. Néanmoins, la présence des porines dans cette couche permettra la diffusion libre des molécules avec une masse moléculaire en-dessous de 600 Da.

Cependant, l'inhibition de la croissance des bactéries Gram (-) a été rapportée, particulièrement en combinaison avec les facteurs qui peuvent déranger l'intégrité de la cellule et/ou la perméabilité de la membrane, telle que les basses valeurs du pH et concentrations accrues en NaCl (**Georganteliset al., 2007**).

Certaines études ne révèlent aucune activité antimicrobienne sélective vis-à-vis les bactéries Gram (+) ou Gram (-) (**Guesmi Et Boudabous, 2006**). Ce qui est en accord avec l'analyse statistique de nos résultats.

L'hypersensibilité de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC peut s'expliquer par la probabilité de sensibilité des bactéries Gram (+) aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH et les extraits naturels dus à l'absence de la membrane externe (**Balentine et al., 2006**).

La charge du disque influe l'activité antimicrobienne, **Rasooli et ses collaborateurs, (2008)** ont remarqué que l'inhibition de la croissance d'*Aspergillus parasiticus* est forte lorsque le disque est plus chargé en huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et *Trachyspermum Copticum*.

Nous avons employé une quantité élevés de 10µl d'extrait par disque, par rapport à **Gachkaret al.,(2007)** qui ont employé des fractions minimales de 5µl d'huile, tandis que **Dimitrijevic et al., 2007, Abutbulet al., 2004** ont employé des fractions plus riches : 20µl et 15 µl par disque.

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne influe aussi les résultats (**Natarajan et al.,2005** et **Fazeli et al., 2007**) ont constaté que la méthode de diffusion à partir des puits sur gélose est plus adaptée pour étudier l'activité des extraits aqueux et organiques de l'*Euphorbiafus iformis* et Hydro-éthanolique de *Rhuscoriaria* et *Zataria multifora*, que la méthode de diffusion en milieu gélosé. La dilution de notre huile a été réalisé avec le DMSO, se augmente la diffusions de notre huile dans la gélose.

Les résultats de l'activité antifongique ont montré une forte activité vis-à-vis de souches testée, ce qui donne la possibilité de l'utilisation de cette huile dans le domaine de la phytopathologie surtout (Activité forte contre *Fusarium*).La souche la plus sensible été *Penicillium*.

La détermination des CMI, CMB et CMF a montre que celles-ci varie selon l'espèce, de plus ont a montre que notre huile ayant un effet bactériostatique (fongistatique) avec certains souche et de l'autre part elle exerce un effet bactéricide (fongicide) avec d'autre espèces.

Sur la lumière des résultats obtenue on peut conclure que l'huile essentielle des feuilles de *Cytisus villosus* ayant une activité antimicrobienne élève ce qui explique son utilisation fréquente dans la médecine traditionnelle dans la région de la grand et la petite Kabylie. Ainsi l'huile essentielle de *Cytisus villosus* peut être une source non négligeable des substances antimicrobienne qui peut être exploité dans différents domaines.



conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Le présent travail s'inscrit dans le contexte de la valorisation d'une des plantes médicinales aromatiques issue de la région de Jijel, en l'occurrence l'espèce *Cytisus villosus*, qui appartient à la famille de *Fabaceae*, une des familles les plus importantes dans la flore algérienne et les plus utilisées en médecine traditionnelle. Nous avons effectué un travail permettant de contribuer à la mise en évidence des activités biologiques (l'activité antibactérienne ainsi que l'activité antifongique) de l'huile essentielle des feuilles.

L'étude bibliographique a montré que *Cytisus villosus*, a été reconnue depuis longtemps en médecine populaire dans le traitement physiopathologiques de nombreuses conditions, telles que les inflammations. Il serait donc très intéressant de l'exploiter pour la recherche de ses principes actifs, responsables de ces propriétés pharmacologiques.

L'hydrodistillation des feuilles de *Cytisus villosus* récoltées en printemps a donné un rendement de 0.1%.

Les tests biologiques effectués ont montré que l'effet antibactérien de l'HE de *Cytisus villosus*, sur différentes souches bactériennes est efficace, de même, il exerce un effet sur les différentes souches fongiques.

La comparaison entre les valeurs des CMI et CMB/CMF a montré que notre huile ayant un effet bactéricide (ou fongicide) vis-à-vis certaines souches, d'une autre part elle exerce une action bactéricide (ou fongicide) contre d'autres souche.

Les résultats de notre travail restent préliminaire et méritent d'être compléter par :

- L'étude de la composition chimique des huiles essentielles de *Cytisus villosus* par GC/MS.
- La séparation et la purification, est l'identification des composé actifs.
- L'étude de l'association avec des antibiotique notamment les bêtalactamines.
- Et en fin l'essai de l'application dans l'un des domaines : Lutte biologique en phytopathologie, et l'antibiothérapie.

Résumé

Résumé

L'objectif de notre travail est d'évaluer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'une plante médicinale très utilisée en médecine traditionnelle (*Cytisus villosus*).

L'extraction de L'HE a été réalisée par hydrodistillation en utilisant le dispositif de Clevenger. L'activité antimicrobienne vis-à-vis 12 souches (huit bactéries et quatre champignons) a été testée par la méthode de diffusion sur disque. Les CMI, CMB et CMF ont été déterminées sur milieu liquide.

Les résultats trouvés ont montré une forte activité antimicrobienne vis-à-vis de 12 souches. L'analyse statistique n'a montré aucune différence significative entre les souches à Gram+ et les Gram-, de plus la régression linéaire a montré une forte corrélation entre la concentration de l'HE et les diamètres de zones d'inhibition.

La comparaison entre les valeurs des CMI et CMB/CMF a montré que notre huile ayant un effet bactéricide (ou fongicide) vis-à-vis certaines souches, d'une autre part elle exerce une action bactéricide (ou fongicide) contre d'autres souche.

Mots clés : *Cytisus villosus*, Huile essentielle, activité antimicrobienne.

Abstract

The aim of this study is to evaluate the antimicrobial activity if essential oil of a medicinal plant very used in folk medicine (*Cytisus villosus*).

The extraction of EO was performed by hydrodistillation using Clevenger apparatus. The antimicrobial activity was tested on 12 strains (eight bacteria, and four fungi) using disc diffusion method. The MIC, MBC and MFC were determined using liquid medium.

The found results have shown a high antimicrobial activity against all tested strains. Statistical analysis has shown no significant difference between Gram- and Gram+ strains, far more the linear regression has revealed a high correlation between EO concentration and inhibition zone. The comparison between MIC, MBC and MFC values, has revealed that our EO has both bacteriostatic (fungistatic) and bactericide (fungicide) effect.

Key words: *Cytisus villosus*, Essential oil, Antimicrobial activity

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط ضد الميكروبي للزيوت الأساسية لنبته اللزان. تم استخلاص الزيت بطريقة التقطير . جرب النشاط ضد الميكروبي على اثنا عشر سلالة ميكروبية (ثمان سلالات بكتيرية فطرية) باستعمال طريقة

حددت التراكيز الدنيا المثب . أظهرت النتائج وجود نشاط ضد ميكروبي

. لم يظهر التحقق الإحصائي وجود أي اختلاف دلالي بين السلالات سالبة و موجبة الجرام.

بينت المقارنة بين التراكيز الدنيا المثبئة والقاتلة احتواء الزيت الأساسي على مفعول مثبئ ضد بعض السلالات و بينما لديها

الكلمات الدلالية: , الزيوت الأساسية, النشاط ضد الميكروبي.

Référence bibliographique

- AFNOR, (2000), Huiles essentielles, Monographies relatives aux huiles essentielles, Tome 2, 6ème édition, AFNOR, Paris.
- Anton R. & Lobstein A. (2005). Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc, Paris, 522p.
- *Aquaculture*. 238: 97-105.
- Balentine, C.W., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Duong, D.Q., Pohlman, F.W. (2006) The pre- and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Science*. 73: 413-421.
- Baser KHC. and Buchbauer G., (2010). Handbook of Essential oils : Science, Technology and Applications. CRC Press. UK.
- Bendjaballah khadidja Meriem,(2015), Screening phytochimique et étude de l'activité antibactérienne et antioxydante huiles essentielles d'*Allium sativum* L.var. la rouge locale, mémoire de master en microbiologie, département Biologie Moléculaire et Cellulaire kenchela
- Besombes C., (2008). Contribution a l'étude des phenomenes d'extraction hydrothermomecaniqued'herbes aromatiques. Applications generalisees. These Doctorat. Université de La Rochelle.p :41-45.
- Boutaghan Naima, (2013). THESEDE pou l'obtention de Doctorat «Etude phytochimique et pharmacologique de plantes médicinales Algériennes *Genista ulicina* Spach (*Fabaceae*) et *Chrysanthemum macrocarpum* (Sch. Bip.) Coss. & Kralik ex Batt (*Asteraceae*)
- Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie– Plantes médicinales –Techniques et documentations, 3ème Edition, Lavoisier.
- Bruneton J., (1993), Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales, Tec & Doc, Lavoisier, Paris, p: 915.
- Bruneton J., (2008). Pharmacognosie – Phytochimie, plantes médicinales, 2eme Ed, Paris, Tec & Doc – Edition médicales internationales. 1188p
- Burt S, (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, pp.223-253.
- Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P.W., Castillejos L., Ferret A., (2007). Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*. 90 : 2580–2595.
- Chaco.M, et Bassou.K, (2007). Efficacité antibactériennes et antifongiques des huiles essentielles obtenue par extraction de la menthe verte *Mentha Spicata* L. due de la

région de Ouargla sur quelques germes pathogènes: *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Candida albicans*. Mémoire de microbiologie. Université de KasdiMerbah Ouargla, : 1427.

- Davidson P.M., (1997). Methods for testing the efficacy of food antimicrobial. *Food Technology*.43, p:148-155.
- Dimitrijevic, S.I., Mihajlovski, K.R., Antonovic, D.G., Milanovic-Stevanovic, M.R., Mijin, D.Z. (2007) A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. *Food Chem.* 104: 774-782.
- Dordevic, S., Petrovic, S., Dobric, S., Milenkovic, M., Vucicevic, D., Zizic, S., Kukic, J. (2007) Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *J Ethnopharmacol.* 109: 458 -463 .
- Dorman H.J.D., Deans S.G., (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology.* 88 : 308–316.
- Dr Abdesselam Zhiri, (2006). Docteur en biotechnologie végétale Chercheur et enseignant en aromathérapie scientifique, Article NUTRA NEWS(science,nutrition,prévention et santé)
- Dupont F. Guignard J.L, (2012). Abrégé de Botanique 15ème édition. EditionsMasson, Paris.
- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C. ; (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Compte Rendu de Biologie*, 331, 372-379.
- Fazeli, M. R., Amin, G., Ahmadian-Attari, M. M., Ashtiani, H., Jamalifar, H., Samadi, N. (2007) Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. *Food Control* 18: 646-649.
- Federation des Agriculteurs bio(FAB),(2012). bio d'aquitaine Fiche Technique - Edition septembre
- Fernandez A, (2003). De quelque plantes dites médicinales et de leurs fonctions. *Aenigma* 9.
- François V. ,(2004) .Détermination d'indicateurs d'accélération et de stabilisation de détérioration des céréales, thèse de doctorat N° 8-2004, Université de Limoges.
- Frank Bisby,(1992). book of Phytochemical Dictionary of the Leguminosae printed on acid-free test paper ,manufactured in accordance with ANSI/NISO Z39.48 - Livres

- Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh S.A., Rasooli, I. (2007) Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem.* 102: 898-904.
- Gaëlle Auvray, (2011). ,these de doctorat,Les relations phylog_ en_ etiques au sein d'un syst_eme r_eticul_e : cas particulier de *Cytisus scoparius* L. (Genisteeae, Fabaceae) et des esp_eces, hybrides et cultivars apparent_es..Vegetal Biology. Universit_e d'Angers, 2011. French. <tel-00975350>
- Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., Georgakis, S A. (2007) Effect of rosemary extract, chitosan and -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. *Meat Science.* 76: 172-181.
- Guarro J., Jupol I., Aguilar C., Llop C., et Fernandez-Ballart J., (1998): Inoculum preparation for in vitre susceptibility testing for filametous fungi. *Journl of Antimicrobial Chemotherapy*, 42:385-387.
- Guerin M.P, (1895). Recherches Sur La Localisation De L'Anagryne et De La Cytisine, *Bulletin de la Société Botanique de France*, 42:5, 428-433, DOI: 10.1080/00378941.1895.10830617
- Guesmi, A., Boudabous, A. (2006) Activité antimicrobienne de cinq huiles essentielles associées dans les produits de thalassothérapie. *Revue des Régions Arides*. Numéro spécial : 224-230.
- Hassania K. Benchekroun., Mohamed Ghanmi., Badr Satrani ., Abderrahman Aafi . , Abdelaziz Chaouch,(2012).Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'Artemisia mesatlantica, plante endémique du Maroc. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, Vol. 81, 2012 p. 4 - 21
- Hayouni, E.A., Abedrabba. M., Bouix, M., Hamdi, M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105, 1126-1134.
- Hemwimon S., Pavasant P. & Shotiprux A. (2007). Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *MorindaCitrofolia*. *Separation andPurificationTechnology*, 54, 44-50.
- Hernandez-ochoa L.R. (2005). Subtitution de solvants et matières actives de synthèse par combiné « Solvant/ Actif ». D'origine végétale. Thèse de Doctoratde l'Institut National Polytechniques de Toulouse. France.

- Horvath G.y, Kocsis B, Botz L, Németh J, Szabo L.G.y, (2002). Antibacterial activity of Thymus phenols by direct bioautography. Proceedings the 7th Hungarian Congress on Plant Physiology, S3.P03 Acta Biologica Szegediensis; Vol. 46; N°3.4; 2002. 145-146
- Hurtel J-M. (2006). Huiles essentielles et Médecine. Aromathérapie et santé.
- Jalila El amri., Khalid Elbadaoui., Touria Zair., Hayate bouharb., Saïd chakir., Taj Imolk Alaoui, (2014). Journal of Applied Biosciences 82:7481– 7492 ISSN 1997–5902
- Joualt S., (2012). La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité. Thèse de doctorat d'état en pharmacie. Université de Lorraine. Faculté de pharmacie. France. 137p
- Judd W. S., Campbell C. S., Kellogg E. A. Stevens P, (2002). Botanique systématique. Une perspective phyllogénétique. Paris, Bruxelles, De Boeck Université, 282.
- Julve, Ph., (2015). ff. - Baseflor. Index botanique, écologique et chorologique de la flore de France. Version : 30 octobre 2015. <http://perso.wanadoo.fr/philippe.julve/catminat.htm>
- Kahouadji, (1995). Euphorbia pterococca 13rot. Holliba; euphorbe. Les feuilles en decoction, associées à l'huile d'olive, en friction sont utilisées contre Eéréthisme
- Kahouadji, M.S, (1995). Contribution à une étude ethnobotanique des plantes médicinales dans le Maroc oriental. Thèse de troisième cycle. Université Mohammed I. faculté des sciences, Oujda. 206 p.
- Kaviriri David Kombi, (2009). mémoire Inventaire et description des fabaceae arbres (mimosoidae et faboidae) de Kinshasa et ses environs Université de Kinshasa RDC - Graduat
- Khenaka Karima, (2011). Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogénèse ruminale chez l'ovin. Mémoire de Magister En Microbiologie Appliquée
- Kirch.J., Vert.M., Watzingh.H., Greinwald.R., Grygan.F-C, (1995): Alcaloïdal variation in Genista lobeliis. I (Fabaceae), Biochemical systematics and Ecology vol 23 ,N°6, 635-643 p.
- Koné, W.M., Kamanzi Atindehou, K., Terreaux, C., Hostettmann, K., Traoré, D., Dosso, M. (2004) Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol.* 93: 43-49.
- Kothe H.W., 2007, 1000 plantes aromatiques et médicinales, Terres Editions.

- Kothe H.W., 2007, 1000 plantes aromatiques et médicinales, Terres Editions.
- Lahlou M, (2004). Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, 18, p: 435-448.
- Lardry J-M, Haberkorn V. (2007). L'aromathérapie et les huiles essentielles. *KinesitherRev* 2007; 61 : 14-7.
- Larousse. (2001). Encyclopédie des plantes médicinales : Identification, préparations, soins. P 28-31.
- Le Floch., (1983) : Contribution à une Etude Ethnobotanique de la Flor Tunisienne.I.O.R.(edit.) Tunisia. 402 pp.
- Lucchesi M.E. (2005). Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat en Sciences, discipline: Chimie. Université de la Réunion, Faculté des Sciences et Technologies.
- Massif de l'Esterel. Marie PORTAS,Saint-Raphaël >Date d'observation :31 mars 2013
- Mautrait C. et Raoult R., (2009)., la préparation : mode d'emploi (officine, soustraitance et BP), 2ème édition, Porphyre France,p. 468.
- M^{elle} Laib Imène, (2011). Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* sur les moisissures des légumes secs, mémoire de Magister en Sciences Alimentaires, Département des Technologies Alimentaires, CONSTANTINE
- M^{elle}. Chemloul Feyza,(2014). Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* de la région de Tlemcen, Mémoire de Master en Agronomie ,Option: Amélioration Végétale
- Mr Djahra Ali Boutlelis,(2013). Etude phytochimique et activité antimicrobienne , antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* L,These en vue de l'obtention du diplôme de doctorat en science Biologie Végétale
- Narishetty STK., Panchagnula R., 2004.TransdermalDelivery of Zidovudine: Effects of Terpenes and TheirMechanism of Action. *Journal of Controlled Release*. 95: 367-379.
- Narishetty STK., Panchagnula R., 2004.TransdermalDelivery of Zidovudine: Effects of Terpenes and TheirMechanism of Action. *Journal of Controlled Release*. 95: 367-379.
- Natarajan D., John Britto S., Srinivasan K., Nagamurugan N., Mohanasundari C., Perumal G. (2005) Anti-bacterial activity of *Euphorbia fusiformis*-A rare medicinal herb. *J Ethnopharmacol*. 102: 123-126.

- Nicklin J., Graeme-Cook K., Praget T. & Killington R.,(2000). L'essentiel en microbiologie.Ed.Berti.p:211-217.
- Nogaret-Ehrhart A-S.2008. La phytothérapie : se soigner par les plantes. Ed. Eyrolles, Paris
- Paibon,W.,Yimnoi,C.A.,Tembab,N,Boonlue,W.,Jampachaisri,K.,&Ingkaninan,K,2011 .comparaison evaluation of volatile oilsfromthreedifferent extraction methods for someThaifragrantflowersInt.J.Cosmet.Sci, 33,p: 150–156.
- Paris M., Hurabielle M. Abrégé de matière médicale. Pharmacognosie, Tome I, édition Masson 1981.
- Pharmacopée européenne. Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Agence Française de Sécurité Sanitaire des produits de santé (Afssaps) Mai 2008.
- Piochon M. (2008). Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiaues et hémi-synthèse. Mémoire, Université du Quebec à Chicoutimi, Canada.
- Pistelli.L., Bertoli. A., Giadri. I., Morelli.I., Rubiolo.P., Bicchi.C., 2001: QuinolizidinealkaloidsfromGenistaephedroite, biochemical and systematicEcology 29.137-141p.
- Ponce, A. G ; Fritz, R., del Valle, C., & Roura, S. I. 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, 36: 679-684.
- Porter N. (2001) - Essential oils and their production. Crop& Food Research. Number 39.
- Rai M.K., Acharya D., Wadegaonkar L. (2003). Plant derived- antimycoties: Potential of Asteraceous plants, in: plant-derivedantimycotics. Current Trends and Future prospects, Haworth press, N-York, Londin, Oxford.165-185.
- Rasooli, I., Fakoor, M.H., Yadegarinia, D., Gachkar, L., Allameh, A., Rezaei, M.B.(2008) Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *International J of Food Microbiology*.122:135-139.
- Robert Morel,(1969). le livre des arbres,arbustes & arbrisseaux ACTES SUD,2004 pour la presente édition ISBN 2-7427-4778-8

- Roulier G.(1990). Les huiles essentielles pour votre santé : traité pratique d'aromathérapie. Propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes. Editions Dangles,.
- Rožman T. and Jeršek B,(2009). Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*. *Acta agriculturae Slovenica*, Vol. 93 ; N° 1, pp.51-58.
- Salle J.L., (1987), Les huiles essentielles : Synthèse d'aromathérapie et introduction à la Sympathicothérapie, Ed. Frison Roche, Paris.
- Schauenberg P.et Paris F., (2010), Guide des plantes médicinales : Analyse, description et utilisation de 400 plantes, Ed. Delachaux et Niestlé, p.396.
- Shan, B., Cai, Y.Z., Brooks, J.D., Corke, H. (2007) The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International J Food Microbiology*. 117: 112-119.
- Sharma S., Sangwan N.S., Sangwan R.S. (2003).Developmental process of essential oil glandular trichome collapsing in menthol mint. *Current science*; 84 (4-25): 544-558.
- Spichiger R. E., Savolainen V. V., Figeat M., Jeanmonod D, (2002). Botanique systématique des plantes à fleur. Presses polytechniques et Universitaires romandes, CH -Lausanne.
- Spichiger, R.E., Savolainen, V.V., Figeat, M. Jeanmonod, D, (2004). Botanique systématique des plantes à fleurs: Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales. 3ème édition, Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, pp. 202-211.
- Stéphane Caillet, Ph.D., Monique Lacroix, Ph.D. INRS-Institut Armand-Frappier 531, Boul. des Prairies,Laval (Qc) H7V 1B7, Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire
- Svoboda K. P. and Hampson J. B. (2000) – Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. <http://www.csl.gov.uv/ienica/seminars/>
- Turkmen, N., Velioglu, Y. S, Sari, F., Polat, G. (2007) Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules*. 12:484-496.
- Ultee A., Kets E.P., Smid E.J., (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 4606–4610.

- Ullree A., Slump R.A, Steging G. et Smid E.J., (2002). Antimicrobial activity of carvacrol on rice, Journal of food protection.63, p. 620-624.
- Valnet. (2003). Les huiles essentielles, une santé toute naturelle. Phytothérapie de la recherche à la pratique. Vol 1(1): P12.
- Verdrager J. (1978). Ces médicaments qui nous viennent des plantes, Ed. Maloine S.A. P12-15.
- Wegrzyn R., Lamendinh H.(2005).Huiles essentielles et aromathérapie bucco-dentaire. Chir. Dent. Fr (2005); 1225 :62-66.
- Wojciechowski M.F., Lavin M. Sanderson M.J. (2004). A phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid MATK gene resolves many well-supported subclades within the family. American Journal of Botany, 11, 1846-2004.
- Yakhlef G. (2010). Thèse présentée pour l'obtention d'un diplôme de Magister : Etude de l'activité biologique des extraits de feuilles de Thymus vulgaris L. et Laurus nobilis L.69, p5- 43.

Reference site webe :

- Anonyme1 :http://www.plantes-botanique.org/famille_fabaceae
- Anonyme2 :http://comons.wikimedia.org/fil_illustration-lupinus-luteus1.jpg?uselang
- Anonyme3 :http://canope.ac_besanc.fr
- Anonyme4 :https://www.google.com/search?q=fiche_+mai+cytise+.pdf&oq=fiche_+mai+_cytise+.pdf&aqs=chrome..69i57.1779j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8

Nom : **BREIKA**
Nom : **SELLAOUI**

Prénom : **Fatou**
Prénom : **Hadjer**

Date de soutenance : 06/06/2016

Master Académique en Biologie Option: Microbiologie

Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cytisus Villosus*

Résumé :

L'objectif de notre travail est d'évaluer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'une plante médicinale très utilisée en médecine traditionnelle (*Cytisus villosus*).

L'extraction de L'HE a été réalisée par hydrodistillation en utilisant le dispositif de Clevenger. L'activité antimicrobienne vis-à-vis 12 souches (huit bactéries et quatre champignons) a été testée par la méthode de diffusion sur disque. Les CMI, CMB et CMF ont été déterminées sur milieu liquide.

Les résultats trouvés ont montré une forte activité antimicrobienne vis-à-vis de 12 souches. L'analyse statistique n'a montré aucune différence significative entre les souches à Gram+ et les Gram-, de plus la régression linéaire a montré une forte corrélation entre la concentration de l'HE et les diamètres de zones d'inhibition.

La comparaison entre les valeurs des CMI et CMB/CMF a montré que notre huile ayant un effet bactéricide (ou fongicide) vis-à-vis certaines souches, d'une autre part elle exerce une action bactéricide (ou fongicide) contre d'autres souche.

Mots clés : *Cytisus villosus*, Huile essentielle, activité antimicrobienne.

Devant le Jury :

Président : Mr BOUSSAA Abdelhalim MAA Univ.Abbès Laghrour-Khenchela

Encadrice: M^{elle} YAKHLEF Wahiba MAA Univ.Abbès Laghrour-Khenchela

Examinatrice: M^{elle} MESSAI Alima MAB Univ.Abbès Laghrour-Khenchela

Promotion: Juin 2016

Ce travail a été réalisé dans les laboratoires pédagogiques de l'université Abbes Laghrour Khenchela