

N° d'ordre :

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de L'enseignement Supérieur et de La Recherche Scientifique

جامعة عين تموشنت بلحاج بوشعيب

Universite Ain Témouchent-Belhadj Bouchaib



Faculté : Sciences et de la Technologie.  
Departement : Biologie.  
Laboratoire : Hydrologie appliquée et  
environnement.



## THESE

Présentée pour l'obtention du **diplôme de DOCTORAT**

**Domaine** : Sciences de la Nature et de la Vie.

**Filière** : Sciences biologiques.

**Spécialité** : Microbiologie.

**Par** : MISSOUM Mansour.

### Intitulé

Etude de la composition chimique et l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de deux plantes dans la zone aride de l'Ouest Algérien.

Soutenue publiquement, le 16/03/2023, devant le jury composé de :

Nom & Prénom(s)	Grade	Qualité	Etablissement de rattachement
Pr. BELLAHCENE Miloud	Professeur	Président	U. Ain Témouchent
Pr. GHERIB Mohammed	Professeur	Rapporteur	C. U. Nâama
Pr. ZIANE Mohammed	Professeur	Co rapporteur	U. Ain Témouchent
Dr. DERRAG Zainab	MCA	Examinatrice	U. Ain Témouchent
Pr. SEDDIKI Sidi Mohammed Lahbib	Professeur	Examineur	C. U. Nâama
Pr. AZZI Rachid	Professeur	Examineur	U. Tlemcen

## *i. Remerciement*

*Avant tout, louange à Allah l'éternel est un secours qui ne manque jamais dans la détresse, de toutes ces bontés, puis de nous avoir donné tout le courage pour terminer ce travail de doctorat qu'effectué au sein des laboratoires de biologie département de biologie à l'université de Béchar.*

*Je tiens à exprimer mes profonds remerciements et mes très vives reconnaissances à mon directeur de thèse Pr **Gherib Mohammed** professeur à l'institut des sciences, centre universitaire de Naâma, d'avoir consacré leur temps et ses expériences, je le remercie sincèrement de ses collaborations, de ses remarques et de ses intentions constructives pour éclairer ce travail.*

*Ils me sont particulièrement agréable d'adresser mes remerciements à Pr **Ziane Mohammed**, mon co-directeur de thèse et le président de la CFD, pour sa patience, son aide, ses encouragements, ses précieux conseils, la rigueur et l'orientation dont j'ai pu bénéficier, vous méritez Professeur ma profonde gratitude et toute ma reconnaissance.*

*Je remercie très sincèrement le Professeur **BELLAHCENE Miloud** pour avoir présidé mon Jury de thèse, Ainsi que : Professeur **AZZI Rachid**, Professeur **SEDDIKI Sidi Mohammed lahbib** et Docteur **DERRAG Zainab** pour l'intérêt qu'il a bien voulu apporter à ce travail en acceptant de participer à la Commission d'Examen.*

*J'adresse mes remerciements à Pr. **Youcefi M**, Pr **Gourine A**, et tout le staff technique de laboratoire de recherche en chimie à l'Université Ammar Tlidi de Laghouat pour leur bien le plus inestimable, le temps pour contribuer à ce travail ; à Mr **Snouci L**, Dr **Ben Arfa A**, et le staff de PTAPC-CRAPC Laghouat, pour leurs soutiens fournis.*

*Je tien également à remercier les enseignants de la faculté des sciences de la nature et de la vie, Pr **Moussaoui A**, Pr **Makhloufi A**, Dr **Mebarkj L**, Dr **Khaldi A**, Dr **Belloufa A**, et tous les enseignants, qu'ils me aidés et encouragés dans la réalisation de ce travail, et aussi pour leurs conseils et leurs temps pour répondre à mes questions. A mes collègues des laboratoires pédagogiques de biologie et surtout Mlle **Fekhar N** et Mme **Mezouari A**, pour l'opportunité de faire de la partie moléculaire de ce travail.*

*Je remercie vivement Pr **Amrouche A** et Pr **Maarouf A**, des professeurs à l'institut des sciences, centre universitaire de Nâama, pour ses aides et ses orientations pointues.*

*Je remercie toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## ii. Dédicace

Grâce à la volenté divine d'ALLAH notre dédilé tous puissant et bien veillant qui ma trace le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce modeste travail, que je dédie :

- ✓ *A ma defente mère : Que dieu l'accueil dans son paradis*
- ✓ *A mon très cher père : Tu es la lumière de mes yeux, le bonheur de ma vie, en guise de ma profonde reconnaissance pour leur amour, leur soutien moral ainsi qu'à leurs encouragements afin d'aller toujours vers un avenir meilleur*
- ✓ *A ma chère sœur et mes frères : Vous etes mes bras et le soutien après ALLAH*
- ✓ *A ma petite famille : Ma femme, Merci pour votre patience et endurance avec moi pendant toute la durée de réalisation ce travail difficile et fatigant. Mes enfants : Allaa, Diaa et Israa, Nous espérons que Dieu vous protégera de tout mal et vous procurera vos santés et bien-être*
- ✓ *A mes tantes, mes oncles, mes cousines et cousins, mes nièces et mes neveux*
- ✓ *A toute la famille Mokhtari, la famille Choubane spécialement Karima et son marie Djamel*
- ✓ *A mes collègues de travaux : Qui ont partagé avec moi les moments difficiles en cours de réalisation de ce travail*
- ✓ *A tous mes enseignants de l'université de Béchar*
- ✓ *A toute ma promotion de doctorat, microbiologie et biochimie de l'Université d'Ain temouchent*
- ✓ *A toute personne ayant contribué de près ou loin à la réalisation de ce travail*

*A tous les biologistes du monde*

## vi. Liste des abréviations

**ADN:** Désoxyribonucléique.

**ATCC:** American Type Culture Collection.

**CG-FID :** Chromatographie à phase gazeuse, avec un détecteur d'ionisation à flamme.

**CG-SM :** Chromatographie à phase gazeuse couplée avec une spectroscopie de masse.

**CI 50 :** Concentration à 50%.

**CMI :** Concentration minimale inhibitrice.

**CRAPC :** Centre de recherche en analyse physico-chimique.

**DMSO :** Diméthyl sulfoxyde.

**DPPH :** Le 2,2-DiPhenyl-1-PicrylHydrazyl.

**GN :** Gélose nutritif.

**HE :** Huile essentielle.

**ISO :** Organisation internationale de normalisation.

**Lab :** Laboratoire.

**LRI :** Les indices de rétention linéaire.

**MgCl<sub>2</sub> :** Chlorure de magnésium.

**NaCl :** Chlorure de sodium.

**NB:** Nota bene.

**OMS :** L'organisation mondiale de la santé.

**PBS:** Phosphate-buffered saline.

**PCR:** Polymerase Chain Reaction.

**PDAa:** Potato dextrose agar acidifié.

**PDB:** Potato dextrose broth.

**PH:** Potentiel hydrogène.

**PTAPC:** Plateau technique en analyse physico-chimique.

***Spp:*** Forma spéciale.

**SPSS:** Statistical Package for the Social Sciences.

**Syn :** Synonyme.

**UFC :** Unité formante colonie.

**UV/Vis :** Ultra-violet/ visible.

## vii. Liste des photos

N°	Titre	Page
1	<i>Rhetinolepis lonadioides</i> . planche extraite	6
2	<i>Pulicaria crispa</i> . Spécimen.	9
3	Palmier dattier infecté par le bayoud.	26
4	Lieu de récolte de la plante <i>Rhetinolepis lonadioides</i> coss à Beni abbes.	40
5	Lieu de récolte de la plante <i>Pulicaria crispa</i> à route de Kenadsa.	40
6	Principe de l'antibiogramme.	50
7	Les symptômes du bayoud apparaissent sur une ou plusieurs feuilles de la couronne médiane.	53
8	La méthode de micro-culture.	55
9	Résultats de piégeage du radical libre DPPH par les HEs et l'acide ascorbique (le standard) après l'incubation.	67
10	Résultat de l'activité hémolytique.	71
11	L'activité antibactérienne des HEs contre <i>Bacillus cereus</i> .	76
12	L'activité antibactérienne des HEs contre <i>Bacillus subtilis</i>	76
13	L'activité antibactérienne des HEs contre <i>S. aureus</i> 2.	76
14	L'activité antibactérienne des HEs contre <i>S. aureus</i> .	77
15	L'activité antibactérienne des HEs contre <i>E. faecalis</i> .	77
16	L'activité antibactérienne des HEs contre <i>E. coli</i> .	77
17	L'activité antibactérienne des HEs contre <i>P. aerogenusa</i> .	78
18	Isolement de <i>FOA</i> à partir des rachis sur milieu PDA.	84
19	Isolat de <i>F. oxysporum</i> purifié sur milieu PDA.	84
20	Observation microscopique après la microculture de l'isolat <i>F. oxysporum</i> ;	84
21	Amplification PCR- avec amorces BIO3-FOA1 et TL3 FOA28.	86
22	<i>Foa</i> aspect ras muqueux de couleur rose orange.	87
23	<i>Foa</i> aspect ras muqueux de couleur blanche.	88
24	<i>Foa</i> aspect ras muqueux de couleur saumon.	88

25	<i>Arthrinium sp.</i>	88
26	<i>Byssochlamys spectabilis.</i>	89
27	<i>Aspergillus oryzae.</i>	89
28	<i>Penicillium expansum.</i>	89
29	<i>Aspergillus niger.</i>	90
30	<i>Aspergillus flavus.</i>	90
31	<i>Fusarium sp.</i>	91
32	<i>Bipolaris sorokiniana.</i>	91
33	<i>Talaromyces funiculosus.</i>	91
34	L'activité antifongique par la méthode d'inhibition de la croissance radiale sur PDA.	97

### ix. Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Lieux de prélèvements des plantes, situation géographique et bioclimat des différentes stations d'étude.	39
2	La pathogénicité des souches bactériennes testées.	47
3	Le mode d'action et le spectre d'activité des antibiotiques utilisés.	49
4	Les composés identifiés dans l'huile essentielle de <i>Rhadinolobos</i> <i>Coss.</i> Avec leur temps de rétention correspondant par CG-SM.	59
5	Les composés identifiés dans l'huile essentielle de <i>Pulicaria crispa</i> avec leur temps de rétention correspondant par CG-SM.	63
6	Les résultats de l'activité antioxydante des échantillons des HEs des plantes et l'acide ascorbique.	67
7	La représentation des résultats de confirmation des souches bactériennes de références.	73
8	La représentation des diamètres des zones d'inhibition (mm).	74
9	Les résultats de l'activité antibactérienne des HEs : les zones d'inhibitions et CMI.	75
10	Les zones d'inhibitions en (mm) de l'effet de la synergie des ATBs avec les HEs.	81
11	L'identification des espèces testées (single spore).	87
12	Les résultats de l'activité des HEs de l'Inhibition de la croissance radiale des souches fongiques.	92

## iix. Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Alambic à l'hydrodistillation.	13
2	Schéma de la distillation par entraînement à la vapeur.	13
3	Le mode d'action des antibiotiques	27
4	La structure chimique des terpènes.	33
5	Les structures chimiques composées aromatiques.	34
6	Les mécanismes de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles	35
7	Les zones d'échantillonnage des deux espèces étudiées	38
8	Le principe de l'activité antiradicalaire	44
9	La méthode de diffusion par disque	51
10	Caractéristiques du <i>Fusarium oxysporum</i>	53
11	Le spectre de l'huile essentielle de <i>R. lonadioides</i> .	60
12	Le spectre de l'huile essentielle de <i>P. crispa</i> .	66
13	Les pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l'acide ascorbique.	69
14	Les pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l'HE de la plante <i>Rhetinolepis lonadioides</i> Coss.	69
15	Les pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l'HE de la plante <i>Pulicaria crispa</i> .	70
16	Les valeurs d'IC50 (en µg/ml) de l'acide ascorbique et les HEs des plantes étudiés.	70
17	L'effet des différentes concentrations de l'HE de la plante <i>Rhetinolepis lonadioides</i> Coss sur la fuite d'hémoglobine.	72
18	L'effet des différentes concentrations de l'HE de la plante <i>Pulicaria crispa</i> sur la fuite d'hémoglobine.	72

## Table des matières

Remerciements	i
Dédicace	ii
المخلص	iii
Résumé	iv
Abstract	v
Liste des abréviations	vi
Liste des photos	vii
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	ix

### Introduction

Introduction	1
--------------	---

### Synthèse bibliographique

#### Chapitre I : Synthèse bibliographique des plantes étudiées

I. Famille des Astéracées	4
I.1. Généralités	4
I.2. Description botanique	4
II. L'espèce <i>Rhinolepis lonadioides</i> Coss	5
II.1. Description botanique	5
II.2. Systématique de l'espèce <i>Rhinolepis lonadioides</i>	5
II.3. Propriétés thérapeutiques	6
II.4. Etude bibliographique	7
III. L'espèce <i>Pulicaria crispa</i>	8
III.1. Description botanique	8
III.2. Systématique de l'espèce <i>Pulicaria crispa</i>	9
III.3. Propriétés thérapeutiques	10
III.4. Etude bibliographique	10

#### Chapitre II : les différentes techniques d'extraction et d'analyse des constituants dans un mélange naturel

I. Techniques d'extraction des constituants dans un mélange naturel	12
I.1. Hydrodistillation	12
I.2. Distillation par entraînement à la vapeur d'eau	13
I.3. Extraction de pression à froid	13
I.4. Extraction par un solvant	14
I.5. Extraction par le CO <sub>2</sub> supercritique	14
I.6. Technique d'extraction assistée par micro-ondes	14
II. Identification des constituants dans un mélange complexe	15
II.1. Les différentes techniques d'analyse d'un mélange complexe	16

#### Chapitre III : Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles

I. Les infections microbiennes	23
I.1. les infections bactériennes	23
I.2. Les maladies fongiques et la phytopathologie	24
I.2.1. La maladie du Bayoud du palmier dattier	24
I.2.2. L'infection des plantes par des champignons mycotoxinogènes	26
II. Les antibiotiques	26
II.1. Mode d'action	27
II.2. La résistance aux antibiotiques	28
II.2.1. La résistance naturelle	28
II.2.2. La résistance acquise	28
II.3. Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques	28

II.4. Les mécanismes de résistance.....	29
III. Stratégies moléculaires de lutte contre la résistance bactérienne.....	30
IV. Les huiles essentielles.....	30
IV.1. Définition.....	30
IV.2. Les activités biologiques des huiles essentielles.....	31
IV.3. Les activités antibactériennes des huiles essentielles.....	32
IV.4. Les activités antifongiques des huiles essentielles.....	32
IV.5. Les constituants des huiles essentielles.....	32
IV.6. Mode d'action des huiles essentielles sur les microorganismes.....	34

## Partie expérimentale

### Matériel et méthodes

1. Etude phytochimique.....	38
1.1. Description de la région d'étude.....	38
1.2. Choix et prélèvement de matière végétale ... ..	39
1.3. Préparation des plantes.....	40
1.4. Extraction des huiles essentielles .....	41
1.5. Détermination du rendement.....	41
1.6. Les analyses chimiques des huiles essentielles.....	42
1.7. Identification des composants des huiles essentielles.....	43
2. Evaluation des activités biologiques des huiles essentielles.....	44
2.1. Etude des activités antiradicalaires .....	44
2.2. Evaluation de l'effet hémolytique des huiles essentielles vis-à-vis des globules rouges.....	45
2.3. Activité antimicrobienne <i>in vitro</i> des huiles essentielles.....	46
2.3.1. Etude de l'activité antibactérienne.....	46
- Les souches bactériennes testées.....	47
- Les tests de confirmation des souches .....	48
- Les milieux de cultures utilisés.....	48
- Préparation des suspensions bactériennes.....	48
- Profil d'antibiorésistance.....	49
- La méthode de diffusion sur disque.....	50
- Evaluation de l'effet synergique entre l'huile essentielle et les antibiotiques.....	51
- Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	51
2.3.2. Etude de l'activité antifongique.....	52
- Provenance des souches étudiées.....	52
- Isolement du <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i> à partir des rachis infectés.....	52
- Purification des souches.....	53
- Identification de culture pure par des méthodes moléculaires.....	54
- Confirmation des autres souches fongiques a évalué.....	54
- Évaluation de la croissance radiale sur milieu solide.....	56
- Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	56
3. Analyse statistique.....	57

### Résultats et discussion

Résultats et discussion.....	58
------------------------------	----

## Conclusion et perspective

Conclusion et perspective.....	98
--------------------------------	----

## References bibliographiques

## Annexes

# **INTRODUCTION**

Les plantes ont formé la base de systèmes de médecine traditionnelle parmi lesquels des populations rurales des pays en développement entre autres. La recherche de nouvelles molécules, de nos jours, a pris une nette croissance où la science de l'ethnobotanique et de l'ethno pharmacognosie est utilisée comme guide pour conduire les chercheurs vers différentes sources et classes de composés.

Les métabolites secondaires de ces plantes telle que les huiles essentielles, les tanins, les flavonoïdes et les alcaloïdes aient constituent une ressource inestimable qui a été utilisée pour trouver de nouvelles molécules bioactifs.

Les huiles essentielles sont des liquides huileux, aromatiques, très concentrés renfermant des mélanges complexes des substances volatils constitués de plusieurs dizaines de composés, obtenus à partir d'un type d'aromates et plantes aromatiques et dans toutes les régions climatiques du globe. Les facteurs environnementaux comme la température, l'irradiante et la photopériode peuvent jouer un rôle primordial sur la qualité et la quantité de l'huile essentielle. Cette huile essentielle se compose de plus d'une centaine de composés, principalement des terpènes. Les huiles essentielles présentent un grand intérêt comme matière première destinée à différents secteurs d'activité tels que : la parfumerie, la cosmétique, l'aromathérapie et l'agroalimentaire.

L'utilisation de ces huiles essentielles comme agent biologique ne peut se faire qu'en caractériser et identifier ses composants, ce qui nécessite de s'appuyer sur les méthodes utilisées à cet effet, devenues disponibles et accessibles aux chercheurs. Ces méthodes dite chromatographique, mais restent limites sauf s'ils sont couplées avec des outils spectrales tel que la spectroscopie de masse.

D'autre part, les infections posent un vrai problème de santés publiques et même provoqué des maladies aux plantes, en raison de leur fréquence, leur gravité et leur coût socioéconomique. L'antibiothérapie reste le moyen de choix, mais l'émergence de microbesrésistants pose un problème de l'inefficacité de ces molécules antimicrobiennes. Sur cette base, les recherches sont menées sur des alternatives naturelles ayant un effet efficace contre ces microbes infectieuses, parmi les quelles figurent les huiles essentielles, dont plusieurs études antérieures ont montré que leurs composants ont une activité biologique dans ce contexte.

L'Algérie, soit l'un des pays les plus riches en plantes, bien qu'il n'y ait pas d'estimation précise sur le chiffre actuelle, mais des études antérieures ont prouvé cette

diversité. (Quézel et santa, 1963) ont donné qu'il existe 3139 espèces, tandis que (Quézel et medail, 1995) ont cité qu'il existe 3150 espèces végétale. Dans le sud de l'Algérie, le Sahara, l'un des plus grands déserts du monde, couvre 84% de la superficie totale algérienne (2.381.741 km<sup>2</sup>). Les populations locales s'appuient encore sur les guérisseurs traditionnels pour leurs soins de santé. Le Sahara de Saoura couvrant une superficie de 161 400 km<sup>2</sup>, elle est le sixième plus grand département du pays. Le climat est chaud et sec en été et très froid en hiver avec 100 mm de pluie par an (Djellouli et *al.*, 2013).

Les travaux qui font l'objet de cette thèse de doctorat s'inscrivent dans le thème de « caractérisation, identification et valorisation des ressources végétales dans les zones arides et semi arides de l'Ouest Algérien ». Nous avons contribué à la caractérisation chimique et l'évaluation biologique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques appartiennent à la famille des astéracées et poussent à l'état spontané dans la région de Saoura, situé au sud-ouest Algérien, qui sont la *Rhadinolobos lonadioides* Coss et le *Pulicaria crispa*.

Pour atteindre nos objectifs, nous avons divisé ce travail en trois parties. La première partie est une revue bibliographique et comporte trois chapitres, dont le premier chapitre a été consacré à dresser une revue de littérature sur la famille des astéracées et ces deux espèces. Nous avons pointue à cette étude, sur l'utilisation ethnobotanique de ces deux espèces et les travaux précédents sur les activités biologiques de ses extraits.

Dans le deuxième chapitre, nous avons précisé les procédés approuvées d'extraction des huiles essentielles ainsi que les méthodes chromatographiques et spectrales pour séparer et étudier les composants de leurs mélanges, indiquant leurs avantages et leurs inconvénients.

Le dernier chapitre de l'étude théorique, nous avons discuté les effets biologiques des huiles essentielles, en particulier de leurs applications dans la lutte contre les infections bactériennes et fongiques.

La deuxième partie repose sur une démarche expérimentale mené au laboratoire et qui s'intègre dans le cadre de l'étude chimique et biologique des deux espèces végétales qui comprend de :

L'échantillonnage, l'extraction et l'identification chromatographiques et spectrales de composants chimiques des huiles essentielles de ces deux plantes.

L'évaluation des effets antiradicalaires et hémolytiques de ces huiles essentielles.

L'évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique contre des souches de références, et des champignons phytopathogènes respectivement, par des méthodes de références adaptées aux huiles essentielles.

Enfin, la troisième partie est consacrée aux résultats obtenus concernant la caractérisation chimique des huiles essentielles des deux plantes et leurs pouvoirs antimicrobiens. La discussion de nos résultats se fait au fur et à mesure que nous les donnons.

# **Synthèse bibliographique**

## **Chapitre 1. Synthèse bibliographique des plantes étudiées**

## Chapitre I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE DES PLANTES ETUDIEES

### I. Famille des Astéracées

#### I.1. Généralités

La famille des astéracées ou les composées (connues sous le nom de la famille des asters, des marguerites ou des tournesols) est la plus grande famille de plantes vasculaires, en termes de nombre d'espèces. Botaniquement très spécialisée de plantes herbacées principalement, bien qu'environ 2% soient des arbres ou des arbustes. Ils sont largement distribués dans les régions tropicales et tempérées chaudes d'Asie du Sud, du Sud-Est et de l'Est d'Afrique y compris Madagascar et centre de l'Amérique du Sud. Selon « the Royal Botanical Gardens of Kew » la famille comprend plus de 1600 genres et 23 000 espèces (Judd et *al.*, 1999 ; Sharma, 2017).

Les astéracées constituent la plus grande famille en Algérie. Il comprend 557 espèces dans 136 genres (Dobignard et Chatelain, 2011).

#### I.2. Description botanique

La morphologie des plantes d'astéracées est également diversifiée. Certaines espèces sont des arbres atteignant plus de 30 m, comme *Dasyphyllum excelsum* au Chili ou *Vernonia arborea* au Malaisie ; Cependant, beaucoup d'autres sont des arbustes, comme des broussailles ou des rosettes, et la plupart sont des herbes vivaces ou moins annuelles, allant de tournesols de 1 à 3 m de haut et à presque formes sessiles. Les plus petits exemples sont ceux du genre *Minioides* trouvés dans le Pérou Andes (Bohm et Stuessy, 2001).

Cette famille est définie par les deux caractères suivants : groupement de fleurs en capitules et soudure des étamines par leurs anthères. Le capitule est entouré par des pièces appelées bractées dont l'ensemble forme l'involucre, à l'intérieur de l'involucre les fleurs sont insérées côte à côte sur un réceptacle généralement plan ou un peu bombé, parfois convexe ; chez une partie des genres, elles sont séparées par des paillettes membraneuses ou dures.

Les fleurs sont généralement dissemblables dans un même capitule, celles du centre ayant à la fois étamines et pistil tandis que celles de la périphérie sont ordinairement et uniquement femelle. Les fruits sont des achaines, c'est-à-dire des fruits secs, indéhiscent et contenant chacun une seule graine (Ozenda, 2004).

La forme des feuilles est très variable : si la plupart sont grandes, d'autres sont petites et épineuses, et certaines sont inexistantes, leur fonction étant prise en charge par une tige

verte. Plus les feuilles sont couvertes d'un indument et de poils de toutes longueurs et couleurs (Bohm et Stuessy, 2001). La plupart ont une grappe plate de petites fleurs de différentes couleurs. Un bon exemple est le topinambour, avec de fines fleurs jaunes sur une tige haute (Achika et *al.*, 2014 ; Munim et *al.*, 2017).

## II. *Rhedinolepis lonadioides* Coss

### II.1. Description botanique

L'espèce *Rhedinolepis lonadioides* (*R. lonadioides*), également connue sous le nom d'*Ormenis lonadioides* (Coss.) Maire, ou *Anthemis lonadioides* (Coss.) Hochr., est endémique en Algérie et le Maroc, Communément appelé Kamonate elaachar. En effet, *R. lonadioides* est une plante annuelle (photo 1), finement acescente, de 10-20 cm de haut, ramifié à partir de la base avec tiges raides, dressées ou couchées à feuilles velues ascendantes à limbe progressivement aminci en un pétiole et 3-5 lobé au apex, avec de courts segments subobtus, et les bractées sont entières et supérieur. Elle se caractérise par une synflorescence en vrac corymbes, têtes discoïdes, obconiques (diamètre 5-8 mm), homogame, sur un pédoncule court (3-12 mm), involucre à bractées en 1-2 rangées, réceptacle convexe à paléas étroit, acuminé et poilu. Ses fleurs sont tubulaires ( $\leq 3$  mm) et jaune, avec un tube subailé agrandi et une corolle à 5 lobes. Son les akènes mesurent moins de 2 mm, sont triangulaires, comprimés, glabres, chauve, avec de nombreuses stries longitudinales fines et un centre veine plus ou moins marquée sur la face ventrale (photo 1) (Battandier, 1888 ; African Plant Database, 2021).

### II.2. Systématique de l'espèce *Rhedinolepis lonadioides*

D'après Quézel et Santa (1963), la classification qu'occupe *Rhedinolepis lonadioides* est la suivante :

Règne : plantes.

Embranchement : Angiospermes

Classe : Magnoliopsides

Ordre : Astérales

Famille : Astéracées

Genre : *Rhedinolepis*

Espèce : *Rhedinolepis lonadioides* Coss.



**Photo 1 :** *Rhetinolepis lonadioides*. planche extraite (à gauche) ; Inflorescence (à droite) (Ozenda, 2004).

### II.3. Propriétés thérapeutiques

Les espèces d'*Anthemis* ont plusieurs activités biologiques et sont largement utilisés en médecine populaire pour le traitement des troubles gastro-intestinaux, hémorroïdes, toux, estomac courbatures et insuffisance hépatique (Korkmaz et Karakus, 2015). L'activité antimicrobienne des huiles essentielles et différents extraits de plusieurs espèces *Anthemis* a été montrée par (Holla et al., 2000 ; Grace, 2002).

En Europe, les espèces d'*Anthemis* sont largement utilisées dans la médecine populaire, pour le traitement des troubles gastro-intestinaux, des hémorroïdes, toux, maux d'estomac et calculs rénaux (Baytop, 1999 ; Kultur, 2007 ; Ugurlu et Secmen, 2008 ; Gonenc et al., 2011). Ces espèces sont utilisées comme tisane et pour aromatiser les aliments, ainsi que pour la cosmétique et dans l'industrie pharmaceutique (Kivcak et al., 2007).

L'espèce *Rhetinolepis lonadioides* est utilisée par la population locale pour traiter les maladies intestinales, expulsant des gaz et soulageant des flatulences, pour réduire l'hypertension artérielle et même utilisé par les diabétiques (Hasnat et Abdelouahid, 2013).

Hasnat et Abdelouahid (2013) ont montré que les huiles essentielles de l'espèce *Rhetinolepis lonadioides* possède une activité antimicrobienne vis-à-vis les souches suivantes : *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* (bactéries à Gram négatif) ; les moisissures (*Aspergillus flavus*, *Penicillium sp*, *Penicillium escpansum*) et la levure (*Candida albicans*).

L'huile essentielle de *Rhedinolepis lonadioides* Coss a une activité très importante contre l'espèce *Listeria monocytogenes* (une zone d'inhibition jusqu'à 18 mm) (Makhloufi et al., 2014).

Kendour et al. (2016) ont constaté que les extraits aqueux et méthanoliques de la partie aérienne de la plante *Rhedinolepis lonadioides* Coss ont montré une importante activité antibactérienne contre les souches *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella Pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*.

### II.4. Etude bibliographique

Le genre *Anthemis* se caractérise principalement par la présence de lactones sesquiterpéniques, appartenant aux germacranolides, des manolides, guaianolides et aux types linéaires, acétylènes et des flavonoïdes (Pavlovic' et al., 2006 ; Vuc'kovic' et al., 2006 ; Gonenc et al., 2011).

Les études phytochimiques du genre *Anthemis* ont fait l'objet de plusieurs travaux qui sont rapportés par (Sevil et Ahmet, 2012). Ils ont évalué les propriétés antioxydantes et les activités antimicrobiennes des extraits méthanoliques d'*Anthemis fumariifolia* et d'*Anthemis cretica* subsp. *argaea*, qui sont couramment utilisés dans la médecine populaire en Turquie. Les extraits d'*A. fumariifolia* et d'*A. cretica* subsp. *argaea* sont comportés comme des radicaux libres puissants charognards avec IC50 = 22,65 et 21,43 mg/mL, respectivement. Dans le système de l'acide b-caroténélinoléique, les extraits des espèces *A. fumariifolia* et *A. cretica* subsp. *argaea* exposés 55, 41 et 59,10 % d'inhibition contre l'oxydation de l'acide linoléique, respectivement. L'activité antimicrobienne a été évaluée contre 13 bactéries et deux levures, les résultats ont montré que les extraits avaient un grand potentiel d'activité antibactérienne contre de nombreuses bactéries de genre d'*Anthemis* testées. Cependant, ils n'ont eu aucun effet inhibiteur sur *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*.

La caractérisation des huiles essentielles du genre *Anthemis* a fait l'objet de plusieurs travaux, permettant d'avancer l'existence d'une variabilité chimique de leurs huiles essentielles. La composition chimique de huit espèces d'*Anthemis* pousse au Grèce, a été étudiée par (Vasiliki et al., 2005), ayant indiqué qu'au total, 284 composés différents ont été identifiés et des différences qualitatives et quantitatives significatives et des similitudes ont été observées parmi les échantillons.

Les principaux constituants des populations étudiées de chaque taxon ont été révélés comme suit :

- ✓ *A. altissima*: (-)-linalool, trans-caryophyllène, acétate de cis-chrysanthényle ;
- ✓ *A. auriculata*: spathulénol, trans-caryophyllène, -eudesmol ;
- ✓ *A. Chia*: acétate de cis-chrysanthényle, trans-caryophyllène, germacrene-d ; *A. cotula* : germacrène-d, spathulénol ;
- ✓ *A. tinctoria*: spathulénol, (-)-caryophyllène oxyde, T-cadinol;
- ✓ *A. melanolepis*: p-cymène, chrysanthénone, trans-verbénol, oxyde de (-)-caryophyllène ;
- ✓ *A. tomentosa*: (-)-linalool, 1,8-cinéole ; UN. *wernerii* subsp. *wernerii* : nopol, terpinéol-4, trans-caryophyllène.

Les hydrocarbures sesquiterpéniques sont révélés comme le principal groupe de constituants de tous les taxons.

Pour le meilleur de notre connaissance, aucune étude ne rapporte la composition chimique de l'huile essentielle de la partie aérienne de *Rhadinolepis lonadioides*.

### III. L'espèce *Pulicaria crispa*

#### III.1. Description botanique

Le genre *Pulicaria*, appartenant à la tribu *Inuleae* de la famille des astéracées, se compose d'environ 100 espèces avec une distribution de l'Europe vers l'Afrique du Nord et l'Asie, en particulier autour du méditerranéen (Lei-Lei et *al.*, 2010).

Les individus du genre *Pulicaria* comportent des capitules hétérogames et multiflores. Les fleurs du rayon ligulées sont à ligules soit, bien marquées et étalées, soit dressées et dépassant à peine l'involucre (parfois de 1-2 mm seulement). Les fleurs du disque sont tubuleuses et hermaphrodites. Les fleurs du genre *Pulicaria* sont jaunes et l'involucre présente des bractées, qui sont généralement étroites, les extérieures sont courtes ou foliacées et les intérieures sont parfois scarieuses. Le réceptacle plan est nu et à épine alvéolé. Les fleurs sont jaunes. Les akènes sont cylindriques ou comprimés, sans côtes ou à 4 côtes (Quézel et Santa, 1963).

L'espèce *Pulicaria crispa* (Forssk.), également nommée, *Aster crispus* Forssk; *Inula crispa* (Forssk.); *Francoeuria crispa* (Forssk.) ; *Inula undulata* L. ; *Pulicaria undulata* (L.) et

*Francoeuria undulata* (L.) (Boulos, 1995). Cette espèce est distribuée en Égypte, en Arabie saoudite, au Koweït, en Irak, en Iran, au Pakistan, en Inde, en Afghanistan et dans certaines parties du nord et de l'ouest Afrique (Bohlmann et al., 1979 ; Al-Yahya et al., 1984).

*Pulicaria crispa* (Photo 2) est une herbe annuelle ou parfois un arbuste vivace; ascendant et souvent avec aspect hémisphérique, 12-75 cm de haut, complexe et densément ramifiée de la base à tiges étroitement laineuses blanches tomenteuse. Les feuilles sont sessiles, un peu amplexicaule, étroitement linéaire, aigu à obtus, ondulé à rarement denté, laineux tomenteux des deux côtés ou glabrescent, 0,5– 3 × 0,15 – 0,3 cm et beaucoup plus petit sur les tiges supérieures. Les têtes sont terminales solitaires, hémisphérique, hétérogame, radié et jaune d'or à orange, 0,5-1 cm de diamètre. Les bractées sont nombreuses, imbriquées, linéaires lancéolées, acuminées et glabres à cilié. Fleurons ligulés ; dans une seule rangée marginale, petits, aussi longs que les fleurons du disque. Les akènes sont 0,5-0,9 mm, brune et glabre. Aigrette contient 7 à 10 poils ; il mesure 2 à 4 mm de long, fusionné à la base (James, 1990 ; Shaukat, 2001).



**Photo 2:** *Pulicaria crispa*. Spécimen (Mohamed et al, 2020).

### III.2. Systématique de l'espèce *Pulicaria crispa*.

Selon la taxonomie de Quézel et Santa (1963), la plante *Pulicaria crispa* est classée comme suit :

Règne : plantes.

Embranchement : Spermatophytes.

Sous-embranchement : Angiospermes.

Classe : Eudicots.

Sous classe : Astéridées

Ordre : Astérales

Famille : Astéracées

Genre : *Pulicaria*

Espèce : *Pulicaria crispa*.

### III.3. Propriétés thérapeutiques

Certaines plantes dans le genre *Pulicaria* sont utilisées comme des plantes médicinales traditionnelles. Par exemple, *P. crispa*, est utilisé par les habitants du sud de l'Égypte et de l'Arabie saoudite pour traiter les ecchymoses, les infections cutanées et les troubles gastro-intestinaux en raison de ses propriétés de teneur en huile essentielles ainsi pour l'inflammation et comme insectifuge et tisane (Stavri et al., 2008). *P. odora* L., est une plante médicinale marocaine largement utilisée dans les médicaments pour traiter l'inflammation, les maux de dos, les troubles intestinaux et les crampes menstruelles, et cette plante est également un constituant du remède traditionnel appelé Mssakhen, qui est donné aux femmes après l'accouchement. *P. dysenterica* est réputé pour son efficacité pour le traitement de la dysenterie au Royaume-Uni (Williams et al., 2000) ; De plus, la décoction de cette plante est également utilisé comme antidiarrhéique en Iran (Nickavar et Mojab, 2003).

Il est scientifiquement rapporté que les membres du genre *Pulicaria* en général possèdent d'autres propriétés thérapeutiques très importantes, spécialement l'espèce *Pulicaria crispa*, parmi elles, les études présentées par (Mothana et al., 2009) qui sont manifesté l'activité antioxydante, activité antimicrobienne, activité anti leucémique, activité anti spasmodique et activité anti cancéreuse.

Chhetri et al. (2015) ont constaté que les plantes de ce genre donnent des propriétés galactagogues et anti épileptique.

### III.4. Etude bibliographique

Les recherches phytochimiques sur les espèces de *Pulicaria* remontent par (Schulte et al., 1968) ont donné que divers types de constituants chimiques au sein du genre *Pulicaria*, y compris dérivés phénoliques, dérivés monoterpéniques, sesquiterpènes, diterpènes, flavonoïdes, triterpènes, stéroïdes, huiles essentielles et quelques autres. Jusqu'en 2008, environ 230 composés sont été trouvés dans 21 espèces de *Pulicaria*, dont les flavonoïdes et les sesquiterpénoïdes sont les constituants les plus dominants (Lei-Lei et al., 2010).

De nombreuses études ont été menées sur l'huile essentielle de *P. crispa* dans de nombreux pays du Moyen-Orient. L'huile essentielle de *P. crispa* s'est avérée caractérisée par des modifications du chémotype dues à divers facteurs dont par exemple : la part de la plante utilisée, stade de développement de la plante, facteurs génétiques, conditions environnementales, période de récolte et la nature du sol.

Par ailleurs, Ali et *al.* (2012) avaient étudié l'huile essentielle de *Pulicaria crispa* collectée dans la périphérie de Zingibar, province d'Abyan, Yémen. Les résultats d'analyse de l'HE montrent que le Carvotanacétone est le composé majoritaire avec un pourcentage de 91%.

En 2006, (Nematollahi et *al.*) avaient étudié l'huile essentielle de *Pulicaria crispa* collecté à Darabad, province de Téhéran à Iran, où l'HE est composée d'environ 88,5% de monoterpènes, dont  $\alpha$ -pinène (45,7%), 1,8-cinéole (27,1%), et environ 3,1% de sesquiterpènes, avec aromadendrène (0,5%) et  $\gamma$ -cadinène (0,5 %) comme composants principaux.

D'autre part, EL-Kamali et *al.* (2009) avaient étudié l'huile essentielle de *P. undulata* où les parties aériennes ont été recueillies en Novembre, dans la région d'EL-Fiteehab, Campus de la ville universitaire d'Omdurman, université islamique d'Omdurman au Sud Soudan. Le chromatogramme GC-MS de l'huile a révélé la présence de 70,97 % de monoterpènes et 10,0% sesquiterpènes. Les principaux composants de l'huile essentielle étaient la carvotanacétone (55,87%), bêta-linalool (4,55 %), thymol (3,01 %), bêta-caryophyllène (2,99 %), éthylcinnamate (2,78 %), formiate d'isobornyle (2,7%) et cyclododécyl-1-éthane (2,0 %).

En Algérie, Boumaraf et *al.* (2016) ont étudié l'huile essentielle de *pulicaria crispa* où les parties aériennes ont été récoltées en avril dans la région de Djanet (Tassili) wilaya d'Illizi en Sahara Algérienne. Les analyses ont révélé que 31 composants représentant environ 68,4% ont été identifiés de l'huile essentielle extraite de la plante, dont 74,3 % des composés oxygénés. Les principaux constituants étaient : la carvotanacétone (14,8 %) suivi du  $\delta$ -cadinène (8,2%),  $\alpha$ -cadinol (4,7%), thujanol (4,7%), épi- $\alpha$ -cadinène (3,4%), carvacrol (3,14%) et 14-hydroxy $\alpha$ -murolène (3,1 %).

# **Chapitre 2. Les différentes techniques d'extraction et d'analyse des constituants dans un mélange naturel**

## **Chapitre II : LES DIFFERENTES TECHNIQUES D'EXTRACTION ET D'ANALYSE DES CONSTITUANTS DANS UN MELANGE NATUREL**

### **I. Techniques d'extraction des constituants dans un mélange naturel**

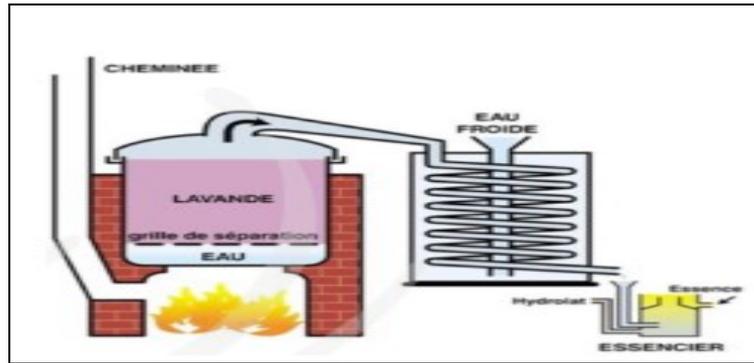
Les mélanges naturels ont été une source de divers produits qui peuvent être appliqués dans les domaines de l'alimentaire, la pharmaceutique, la cosmétique, le textile et l'énergétique. Une grande importance a été accordée aux métabolites secondaires de différentes espèces végétales.

De nombreuses techniques sont utilisées pour l'extraction des substances aromatiques. Cette opération a pour but de capter les produits élaborés par le végétal ; et cela, tout en veillant à éviter d'en altérer la qualité. Pour percevoir les difficultés rencontrées durant l'opération d'extraction, il suffit de garder présent à l'esprit la rapidité avec laquelle se dégage, puis disparaît, ou se dénature, le parfum d'une fleur, même la plus odorante, dont on a froissé les pétales. Les techniques d'extraction doivent donc, tout en tenant compte des coûts d'obtention liés au rendement, au temps passé et au matériel utilisé, viser à résoudre au mieux les difficultés dans le but d'obtenir des extraits de haute qualité, c'est-à-dire, les plus proche possible de l'huile brute.

Les techniques sont différentes selon la matière première, la qualité souhaitée et l'emploi destiné. Les produits obtenus après extraction ont une appellation et composition dépendante du procédé utilisé.

#### **I.1. L'hydrodistillation**

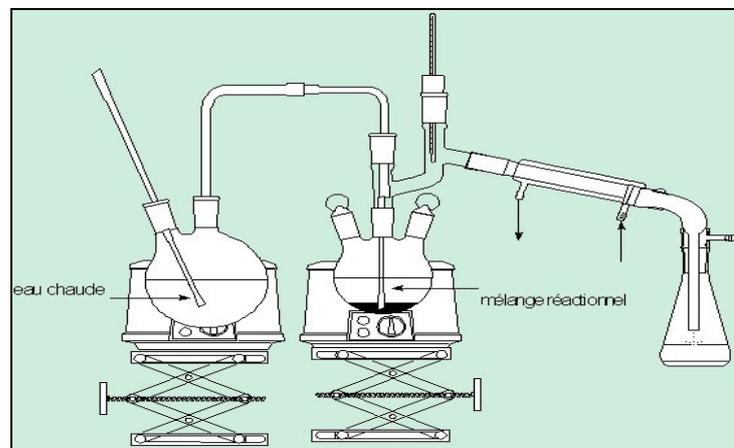
C'est la méthode la plus ancienne d'AFNOR (1992). Afin d'extraire les huiles essentielles par l'hydrodistillation, la matière végétale aromatique est soumise dans un alambic et une quantité suffisante d'eau est ajoutée et portée à l'ébullition ; alternativement, de la vapeur vive est injectée dans la charge végétale. En raison de l'influence de l'eau chaude et la vapeur, les glandes sébacées du tissu végétal vont libérer l'huile essentielle. Le mélange de vapeur d'eau et d'huile est condensé par refroidissement indirect à l'eau. Du condenseur, le distillat s'écoule dans un séparateur, où l'huile se sépare automatiquement de l'eau distillée.



**Figure 1 :** Alambic à l'hydrodistillation.

## I.2. Distillation par entraînement à la vapeur d'eau

La méthode la plus récente de la distillation par entraînement à la vapeur d'eau, la distillation à la vapeur d'eau a été effectuée en faisant passer de la vapeur sèche à travers la matière végétale, les composés volatils de la vapeur étant volatilisés, condensés et collectés dans des récepteurs (figure 2) (Meyer-Warnod, 1984). Cela permet d'éviter les altérations hydrolytiques (particulièrement des esters) liées à l'ancien procédé de distillation ; ce qui constitue une nette amélioration quant à la qualité des huiles essentielles obtenues.



**Figure 2:** Schéma de la distillation par entraînement à la vapeur.

## I.3.Extraction par pression à froid

L'expression à froid, également connue sous le nom d'extraction par pression à froid, est l'une des méthodes d'extraction mécanique les moins énergivores et les plus respectueuses de l'environnement parmi les différentes techniques d'extraction d'huile (Dugo et Di Giacomo, 2002). Elle est utilisée pour extraire l'huile de diverses matières premières, notamment dans la production d'huiles essentielles à partir de plantes oléagineuses. Des huiles

de haute qualité peuvent être obtenues en réalisant une production à basse température à l'aide de cette méthode de pressage à froid.

#### **I.4. Extraction par un solvant**

L'extraction par des solvants volatils consiste à dissoudre la matière odorante de la plante dans un solvant que l'on fait ensuite évaporer (Hubert, 1992). Cette méthode moderne utilise des solvants de qualité alimentaire tels que l'éthanol, le benzène, le diméthyle ou l'hexane pour isoler les huiles. Il est souvent utilisé pour extraire les huiles essentielles d'aromates délicats, tels que le jasmin ou la rose, qui sont généralement incapables de résister à la pression de la distillation à la vapeur. De plus, l'extraction par solvant produit généralement un parfum plus fin que la plupart des autres méthodes d'extraction, ce qui ajoute encore à son attrait pour certaines applications.

#### **I.5. L'extraction par le CO<sub>2</sub> supercritique**

C'est l'une des méthodes les plus récentes (Leszczynska, 2007). L'extraction par CO<sub>2</sub> supercritique consiste à envoyer dans une enceinte fermée contenant les plantes un courant de CO<sub>2</sub>, qui par l'augmentation de pression, fait éclater les « poches à huile » et entraîne les substances aromatiques. Cependant, Cette méthode d'extraction reste coûteuse.

Pour de nombreuses applications, le CO<sub>2</sub> possède des propriétés de solvant bien adaptées qui peuvent être facilement contrôlées en faisant varier la pression et la température. De plus, le dioxyde de carbone à l'état supercritique a une très faible viscosité et aucune tension interfaciale. Par conséquent, il peut bien pénétrer dans des structures et des matériaux complexes. Ces propriétés le rendant adapté à de nombreux processus différents. Cette technique est aujourd'hui considérée comme la plus prometteuse car elle fournit des extraits volatils de très haute qualité et qui respecte intégralement l'essence originelle de la plante.

#### **I.6. Technique d'extraction assistée par micro-ondes**

Depuis 1986 avec les travaux de (Ganzler et *al.*), l'extraction assistée par micro-onde connu de profonds changements. A l'heure où « la rapidité », « l'efficacité » et « la sélectivité » sont devenus les caractéristiques principales d'une bonne technique d'extraction, les travaux sur l'extraction assistée par micro-ondes ne cessent de croître et les nouvelles techniques de fleurir. L'application des micro-ondes dans les processus de séparation et d'extraction a montré réduire à la fois le temps d'extraction et le volume de solvant requis, en minimisant l'environnement impact en émettant moins de CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère et ne consommant

qu'une fraction de l'énergie utilisée dans les méthodes d'extraction conventionnelles telles que distillation à la vapeur.

## II. Identification des constituants dans un mélange complexe

Les techniques analytiques pouvant être mises en œuvre pour l'identification des constituants d'un mélange complexe sont nombreuses et variées. Cependant, l'identification et la quantification des constituants d'un mélange naturel demeurent toujours des opérations délicates qui nécessitent souvent l'utilisation de plusieurs techniques complémentaires.

En effet, les huiles essentielles constituent une matière première destinée à des secteurs d'activités aussi divers que ceux de la parfumerie, des cosmétiques, des industries pharmaceutiques et de l'agroalimentaire. Quel que soit le secteur concerné, l'analyse des huiles essentielles reste une étape importante qui nécessite la mise en œuvre de diverses techniques (Joulain, 1994).

Pendant de nombreuses années, les analystes ont cherché à améliorer leur compréhension qualitative et quantitative de la composition de ces mélanges, pour diverses raisons. En effet, une meilleure connaissance de la composition des mélanges peut aider à comprendre leurs propriétés physiques et chimiques, à prédire leur comportement et leur interaction avec d'autres substances, et à concevoir des processus plus efficaces pour leur production ou leur utilisation.

Deux types de méthodes analytiques peuvent être utilisés (Joulain, 1994), selon si l'objectif final est la séparation d'une substance inconnue ou de mémorisation d'une substance connue.

- **Séparation d'une substance inconnue :**

Les méthodes analytiques de ce type visent à séparer une substance non encore décrite d'un mélange afin de l'identifier complètement. Ce type est le moins fréquent en pratique et n'est utilisé relativement que par un petit nombre de chimistes analytiques. Cela a besoin des techniques de séparation chromatographiques, ainsi qu'une quantité parfois importante d'échantillon. La méthode consiste essentiellement d'enrichir une fraction de l'échantillon avec la quantité désirée substance, pour finalement l'isoler au moyen d'un produit préparatif ou micro-préparatoire technique.

- **Reconnaissance de substances connues :**

Les méthodes analytiques de ce type sont aujourd'hui les plus répandues dans l'industrie des arômes et des parfums. La possibilité de direct couplage d'un spectromètre de masse quadripolaire à balayage rapide avec une chromatographie en phase gazeuse capillaire (GC-MS) a, au cours des années 1970, été une étape déterminante vers la rapide identification des constituants volatils dans les mélanges naturels.

Au cours des années 1980, cette technique s'est propagée à travers près des laboratoires, avec la commercialisation de produits performants et peu coûteux systèmes GC/MS. Les techniques discutées dans le reste de cet article sont principalement utilisées pour « la reconnaissance de substances autrefois connues.

## **II.1. Les différentes techniques d'analyse d'un mélange complexe**

### **1.1. La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)**

La CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition (Arpino et *al.*, 1995). C'est la technique de séparation la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles, car elle permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme. Les progrès technologiques réalisés dans le domaine des colonnes capillaires, des phases stationnaires et des détecteurs (FID) ont contribué à rendre la CPG incontournable pour l'analyse des huiles essentielles.

Chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts) (Kováts, 1965) ou en programmation de température (indices de rétention) (Van Den Dool et Kratz, 1963). Les temps de rétention, bien que spécifiques d'un composé, ont tendance à varier d'une analyse à l'autre, notamment du fait du vieillissement des colonnes.

Les indices de rétention polaire ( $I_{rp}$ ) et apolaire ( $I_{ra}$ ) sont comparés à ceux d'échantillons authentiques contenus dans des bibliothèques de référence élaborées au laboratoire, dans des bibliothèques commerciales (Joulain et König, 1998 ; Adams, 1995) ou répertoriés dans la littérature.

De plus, les nombreux cas de coélution montrent que la comparaison des indices de rétention et même la méthode des surcharges ne suffisent pas à identifier formellement un composé. Le développement des phases stationnaires chirales (colonne de cyclodextrines) et

de la CPG multidimensionnelle a permis de surmonter certaines difficultés rencontrées dans la séparation et l'identification des composés dans les huiles essentielles (Marriott et *al.*, 2000 ; Marriott et *al.*, 2001). Ainsi, la CPG bidimensionnelle (CPG-CPG), mettant en ligne deux colonnes capillaires, permet la séparation, l'identification et la quantification de composés minoritaires pouvant coéluer avec des composés plus abondants. L'échantillon est injecté dans une pré-colonne, puis les composés qui coéluent sont transférés dans une deuxième colonne pour être séparés. L'efficacité de cette méthode est illustrée par (Marriott et *al.*, 2000) qui ont appliqué la CPG bidimensionnelle à l'étude d'une huile essentielle de vétiver (*Vetiveria zizanioides*).

Les techniques de couplage de la CPG avec des techniques spectroscopiques (SM, IRTF) ont permis une approche beaucoup plus précise de l'identification.

## **1.2. Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (CPG/SM)**

Les premiers appareils de routine CPG/SM à colonnes capillaires datent de 1975. Depuis, cette méthode de couplage n'a cessé d'évoluer et a trouvé de nombreuses applications dans les domaines de l'agroalimentaire (aliments, eau), des produits pétroliers (carburants, matières synthétiques), des produits naturels (parfumerie, cosmétique, médecine), etc. (Mc Lafferty et Michnowicz, 1992). Dans le secteur particulier des huiles essentielles, le couplage CPG/SM est, aujourd'hui, la technique de référence (Longevialle, 1981 ; Constantin, 1996).

Il existe plusieurs analyseurs de masse mais les plus fréquents pour l'analyse des huiles essentielles sont le « quadripôle » et le piège à ions ou « ion trap ». Tous deux utilisent la stabilité des trajectoires pour séparer les ions selon le rapport masse sur charge  $m/z$  (De Hoffmann et *al.*, 1999; Mc Lafferty et Tureček, 1993). Les analyseurs quadripolaires sont constitués de quatre barres cylindriques. Un cation pénétrant entre les barres sera attiré vers une barre négative. Les détecteurs les plus courants sont les châlons (multiplicateurs d'électrons) et les photomultiplicateurs ; ils convertissent les impacts ioniques en signaux. L'ordinateur enregistre les signaux visualisés sous forme de pics d'intensités variables, rangés sur une échelle de masses. Le multiplicateur de photons permet la détection des ions positifs et dans certains cas des ions négatifs.

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG/SM) permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse des différents constituants d'un mélange complexe. Il existe deux modes d'ionisation : l'ionisation par

impact électronique (IE) et l'ionisation chimique (IC). Dans ce dernier cas, on distingue l'ionisation chimique positive (ICP) et l'ionisation chimique négative (ICN).

### 1.2.1. CPG/SM en mode « Impact Electronique » (CPG/SM-IE)

En mode impact électronique, le bombardement de substances par un faisceau d'électrons d'énergie de l'ordre de 70 eV provoque leur ionisation et leur fragmentation. Les fragments ioniques positifs forment alors le spectre de masse caractéristique du composé. Les spectres de masse ainsi obtenus sont comparés avec ceux des produits de référence contenus dans des bibliothèques informatisées commerciales Mass Spectral Library (National Institute of Standards and Technology, 1999) et Wiley Registry of Mass Spectral Data (Mc Lafferty et al, 1994) contenant plusieurs milliers de spectres. En général, la concordance entre les spectres d'un même composé obtenu à partir d'une huile essentielle et présent dans les bibliothèques est bien meilleure avec des références de la bibliothèque « laboratoire » car ils sont enregistrés dans des conditions expérimentales identiques. Les spectres de masse expérimentaux sont aussi, en tant que de besoin, comparés à des spectres contenus dans des bibliothèques non informatisées (Joulain et König, 1998 ; Adams, 1989 ; Mc Lafferty et Stauffer, 1989).

### 1.2.2. CPG/SM en mode « Ionisation Chimique » (CPG/SM-IC)

Par définition, l'ionisation chimique est des réactions ions-molécules entre des molécules de l'échantillon en phase gazeuse et les ions d'un plasma obtenus à partir d'un gaz réactif. Cette technique, de mise en œuvre aisée avec un appareil équipé d'une source à ionisation chimique (en série sur la plupart des appareils récents), a trouvé de nombreuses applications chimiques et biochimiques dans les domaines de l'environnement et du médical.

La littérature concernant la spectrométrie de masse en ionisation chimique est très importante. En effet, plus de 1100 articles utilisant le mot-clé « ionisation chimique » ont été publiés. Notre étude porte essentiellement sur la littérature relative à l'étude des composés terpéniques par ionisation chimique.

L'ionisation chimique résulte des travaux de Munson et Field (1966) sur le comportement du méthane et de l'isobutane en spectrométrie de masse sous une pression voisine de 1 Torr dans la source. Le spectre de masse enregistré dans ces conditions était invariablement contaminé par des pics correspondant à des masses élevées dus aux impuretés présentes dans le gaz. Ils portèrent leur attention non plus sur le gaz méthane ou isobutane,

mais sur ces impuretés, ils en déduisirent les principes d'une nouvelle méthode générale d'analyse en spectrométrie de masse. Bien qu'elle permette l'étude de certaines substances minérales, c'est en chimie organique que les applications ont été les plus nombreuses.

### 1.2.3. Les autres techniques de couplage

Les nombreuses difficultés rencontrées lors de l'analyse de mélanges complexes selon les différentes techniques et méthodes connues ont conduit, récemment, à la mise au point de la spectrométrie de masse multidimensionnelle à double analyseur (SM/SM) (Cambon, 1989) ou à triple analyseur (Yost et Enke, 1979). Cette technique, souvent couplée à la CPG, a connu un développement rapide ces dernières années. Le principe consiste à sélectionner un ion issu de la première fragmentation afin de le fragmenter de nouveau. Les fragments de l'ion secondaire constituent, alors le deuxième spectre de masse qui diffère selon l'origine de l'ion primaire. Souvent, Cazaussus et *al.* (1988) ont été appliqués le premier spectromètre de masse du couplage à l'étude des fragmentations de la khusimone constituant de l'huile essentielle de vétiver bourbon qui fonctionne en mode ionisation chimique et les suivants en mode impact électronique.

Le couplage de la CPG avec un spectromètre infrarouge par transformée de Fourier (CPG/IRFT) est une technique particulièrement intéressante lorsqu'il s'agit d'analyser des composés fonctionnalisés en permettant d'identifier des molécules dont les spectres de masse ne sont pas suffisamment différenciés. A titre d'exemple, les quatre isomères du farnésol, ceux du menthol (Coleman et *al.*, 1989), les esters linéaires portant les groupements méthacrylate/crotonate et angélate/tiglate (Bicchi et *al.*, 1987) ou encore le nérol et le géraniol sont distingués sur la base de leur spectre infrarouge (Coleman et Gordon, 1991). L'IRFT a aussi montré son efficacité dans l'identification de composés susceptibles de subir des transpositions sous l'effet de l'impact électronique. Le développement d'appareils permettant d'atteindre des seuils de sensibilité comparables à ceux de la CPG-SM (Winkler et *al.*, 1983) font du couplage CPG-IRFT une technique de plus en plus intéressante dans l'analyse des arômes.

Les couplages CPG-IRFT et CPG-SM sont donc deux techniques complémentaires adaptées à l'analyse des huiles essentielles. Il est aussi possible de coupler à la fois la CPG à un spectromètre de masse et à un détecteur infrarouge (CPG-IRFT-SM). Ainsi, Tomlinson et *al.* (1996) ont été associés les potentialités offertes par les deux techniques. Ce double couplage a permis à Hedges et Wilkins (1991) d'identifier rapidement à côté du 1,8-cinéole

majoritaire, plusieurs autres constituants présents à de faibles concentrations dans l'huile essentielle d'*Eucalyptus Australiana*.

De plus, les améliorations apportées au niveau des interfaces d'ionisation à pression atmosphérique (API) permettent d'atteindre des sensibilités plus importantes (Hirabayashi *et al.*, 1997). Cette technique a notamment été utilisée par (Cremin *et al.*, 1995) pour identifier plusieurs esters aromatiques d'alcools sesquiterpéniques présents dans un basidiomycète pathogène. De même, Carini *et al.* (2001) ont utilisé le couplage CLHP-SM en mode ionisation chimique positive et négative pour reconnaître des antioxydants polyphénoliques dans des extraits d'*Helichrys umstoechas*. Enfin, Morin *et al.* (1986) ont été identifiés de nombreux composés dans une huile essentielle de verveine en la fractionnant préalablement par HPLC semi-préparative, puis en analysant les fractions obtenues par CPG-SM.

Le développement des techniques chromatographiques multidimensionnelles tels le couplage d'une chromatographie en phase liquide (CPL) avec une CPG (CPL-CPG) ou encore le couplage CPG-CPG, a permis de réaliser des progrès notables dans le domaine de la séparation des mélanges complexes (Philips et Xu, 1995). Ainsi, les performances du couplage CPG-IRFT-SM ont été améliorées par l'utilisation de la CPG multidimensionnelle (CPGMD) à trois colonnes : une pré-colonne de polarité intermédiaire, une colonne polaire et une colonne apolaire (CPGMD-IRFT-SM) ; cela confère au système, en plus d'un double détection, une séparation optimale. D'autre part, le couplage en ligne CPL-CPG associe la sélectivité de la chromatographie en phase liquide avec la grande efficacité des colonnes capillaires (Careri et Mangia, 1996). Cette méthode est particulièrement bien adaptée à l'analyse des huiles essentielles du genre *Citrus* (Munari *et al.*, 1990) pour les quelles les constituants ont été identifiés en comparant leurs temps de rétention avec ceux de standards. Des études récentes portant sur ces huiles essentielles ont aussi été réalisées à l'aide d'un couplage HPLC-CPG/SM qui a permis une identification encore plus performante (Mondello *et al.*, 1996).

D'une manière générale, l'utilisation de tels couplages, bien que donnant d'excellents résultats quand ils sont utilisés à bon escient, doit faire l'objet de la plus grande vigilance si l'on veut éviter les erreurs, liées essentiellement à une informatisation poussée ou à un excès de confiance. Joulain (1994) a parfaitement décrit les avantages et les inconvénients des techniques les plus utilisées et a dénoncé les abus résultant d'une utilisation trop mécanique de certaines d'entre-elles. Il dresse un large éventail des erreurs fréquemment commises et énonce les recommandations à observer permettant de ne donner que des résultats fiables.

### 1.3. La Résonance Magnétique Nucléaire du carbone-13 (RMN-C<sup>13</sup>)

Une alternative aux méthodes d'analyse décrites précédemment est la RMN du carbone-13 des mélanges, sans séparation préalable des constituants. Cette technique, initiée par Formáček et Kubezka (1982), développée par Bradesi et *al.* (1996) offre des potentialités fortement intéressantes. Le principe consiste à attribuer les raies de résonance de chacun des carbones de chaque composé à partir du spectre unique du mélange et de les comparer à des produits de référence répertoriés dans des bibliothèques (Bradesi et *al.*, 1996). Contrairement aux techniques chromatographiques, les constituants ne font pas l'objet d'une individualisation en RMN. Différents aspects sont à considérer, à savoir l'observation et l'individualisation des différentes raies de résonance dans le spectre du mélange et l'attribution de chacune de ces raies de résonance à un produit donné permettant son identification.

En regard de la technique de Formáček et Kubezka (1982), l'originalité de la méthode développée par l'équipe « Chimie et Biomasse » réside dans l'informatisation de la recherche qui est réalisée par un logiciel permettant de comparer le déplacement chimique de chaque carbone dans n'importe quel spectre expérimental avec ceux des atomes de carbone de composés purs répertoriés dans la bibliothèque de spectres élaborée au laboratoire de l'équipe à partir d'échantillons authentiques et/ou dans la bibliothèque construite à partir des données décrites dans la littérature.

L'apport de la RMN du carbone-13 à l'analyse d'un mélange complexe est intéressant en ce sens qu'elle permet, dès lors que leur teneur est supérieure à 0,5% et qu'ils sont présents dans les bibliothèques de référence, d'identifier rapidement et sans ambiguïté, certains composés dont l'analyse par les techniques conventionnelles est problématique. D'une manière générale : - tous les carbones sont observés à l'exception des carbones quaternaires de ceux des composés minoritaires ;

- les variations des déplacements chimiques sont inférieures ou égales à 0,05 ppm pour la grande majorité des carbones ;

- le nombre de superpositions est limité et n'empêche aucunement l'identification d'un composé par l'observation d'au moins 50% des carbones qui lui appartiennent en propre.

La RMN du carbone-13 des mélanges est efficace particulièrement pour la différenciation et l'identification de molécules structurellement très proches (ie :

stéréoisomères) comme le montrent les travaux réalisés sur les isomères du menthol, du dihydrocarvéol et sur leurs acétates par Bradesi (1995) ou ceux portant sur les cédrènes et les funébrènes qui ne diffèrent que par la jonction des cycles (Tomi et *al.*, 1993). De même, les énantiomères du camphre et de la fenchone ont été différenciés dans l'huile essentielle de *Lavandulastoechas* (Ristorcelli et *al.*, 1998). L' $\alpha$ -bisabolol et l'épi- $\alpha$ -bisabolol, deux alcools sesquiterpéniques, ont des spectres de masse identiques et des indices de rétention très proches ; seuls leurs spectres de RMN du carbone-13, très différents, permettent leur identification même si l'un seulement des isomères est présent dans l'huile essentielle (Tomi et Casanova, 2000).

Enfin, la RMN du carbone-13 a été utilisée comme un outil dans l'identification de molécules thermosensibles ; l'identification de deux sesquiterpènes furaniques dans l'huile essentielle de *Smyrnia olusatrum* a été rendue possible par cette technique (Baldovini et *al.*, 2001).

L'utilisation conjointe de la RMN du carbone-13, des indices de rétention et du couplage CPG-SM a montré son efficacité pour l'analyse d'un grand nombre d'huiles essentielles de plantes aromatiques de Corse (Pintore et *al.*, 1997).

**Chapitre 3. Pouvoir  
antimicrobien des huiles  
essentielles**

---

## Chapitre III : POUVOIR ANTIMICROBIEN DES HUILES ESSENTIELLES

### I. Les infections microbiennes

Plusieurs maladies de l'homme et des végétaux sont causées par des micro-organismes pathogènes qui sont diverses. Elles sont divisées en quatre grands groupes à savoir les bactéries, les virus, les parasites et les champignons. La capacité d'un microbe à provoquer une maladie est connue sous le nom de pathogénicité et le degré ou l'étendue de la pathogénicité est appelé virulence. La virulence variait de léger à sévère avec des facteurs virulents variables qui jouent directement ou indirectement un rôle dans pathogénicité et virulence (Thomas et Elkinton, 2004).

Pour qu'un microbe provoque une maladie, les agents pathogènes doivent se fixer et/ou pénétrer dans le corps de l'hôte à l'aide de facteurs virulents et coloniser. Certains microbes s'attachent et pénètrent parfois les surfaces du corps de l'hôte telles que les cellules en utilisant des adhésines (protéines) situées à la surface de l'agent pathogène (Zachary, 2017).

#### I.1. Les infections bactériennes

Ainsi, quelques centaines d'espèces de bactéries pathogènes ne constituent qu'une très faible minorité de l'immense monde bactérien. Toutefois, du fait des maladies parfois graves dont elles sont responsables, c'est vers ces bactéries pathogènes que les microbiologistes ont porté leur plus grand intérêt. Les épidémies historiques de peste ou de choléra - par exemple - ont progressivement reculé dans les pays riches, principalement grâce aux progrès du diagnostic et de l'hygiène mais aussi à la découverte des antibiotiques. Elles ressurgissent toutefois régulièrement, notamment dans les pays en développement. Avec l'accroissement des phénomènes de résistances aux antibiotiques, de nouveaux types d'épidémies, impliquant l'expansion de clones de bactéries multi-résistantes, commencent à voir le jour et font craindre que les antibiotiques ne puissent pas constituer une solution éternelle. Parmi les bactéries pathogènes, quelques espèces sont strictement inféodées à l'homme et aucun autre mode de vie ne leur est connu (par exemple, *Neisseria gonorrhoeae* l'agent étiologique de la blennorragie). Enfin, une même bactérie pathogène pourra, chez certains individus d'une population d'hôtes, provoquer une maladie sévère voire mortelle mais une infection bénigne voire inapparente chez d'autres. Le nombre (dose infectante), la virulence propre ou la voie par laquelle ce pathogène est parvenu à infecter son hôte font souvent partie des éléments expliquant ce polymorphisme clinique (Waldvogel, 2004).

## I.2. Les maladies fongiques et la phytopathologie

Les champignons phytopathogènes sont des espèces de champignons parasites qui provoquent des maladies cryptogamiques chez les plantes. Ces champignons appartiennent aux différents groupes du règne des Eumycota ou « vrais » champignons qui sont : ascomycota, basidiomycota, chytridiomycota, zygomycota et deutéromycota (champignons imparfaits).

Les champignons sont la principale cause de maladies chez les plantes et ils sont responsables d'environ 70 % des maladies des plantes cultivées (Jim Deacon, 2005). On estime entre dix mille et quinze mille espèces le nombre d'organismes du type champignons ou pseudo-champignons susceptibles d'infecter les plantes (contre une cinquantaine susceptibles d'infecter l'homme) (Francisco et *al.*, 2014). Les pertes économiques annuelles dues aux maladies fongiques dans l'agriculture mondiale, avant et après la récolte, étaient estimées en 2003 à plus de 200 milliards d'euros, et le coût annuel des traitements fongicides s'élève pour les seuls États-Unis à plus de 600 millions de dollars (Dilip K., 2003).

L'infection des plantes par un champignon phytopathogène se déroule selon un processus, appelé « cycle de la maladie », dont la complexité varie selon les espèces, mais qui comprend toujours un certain nombre d'étapes obligatoires (inoculation, adhérence, germination, pénétration et invasion) (Francisco et *al.*, 2014).

Les champignons phytopathogènes sont capables d'infecter n'importe quel tissu à n'importe quel stade de croissance de plante, en suivant un cycle biologique complexe qui peut comporter des stades de reproduction sexuée ou asexuée (Carlos et *al.*, 2012).

### I.2.1. La maladie du Bayoud du palmier dattier

Le nom Bayoud vient du mot arabe, "abiadh", signifiant blanc qui fait référence au blanchiment des frondes de palmiers malades. Cette maladie a été signalée pour la première fois en 1870 à Zagora-Maroc. L'organisme responsable est un champignon microscopique qui appartient à la mycoflore du sol et est nommé *Fusarium oxysporum* forma specialis *albedinis* (Killian et Maire, 1930 ; Malencon, 1934).

En 1940, il avait déjà affecté plusieurs palmier de dattes et après un siècle, la maladie a pratiquement touché tous les palmiers marocains bosquets, ainsi que ceux de l'ouest et du centre Sahara algérien (Killian et Maire, 1930 ; Toutain 1972). La maladie de Bayoud cause des dégâts considérables qui peuvent prennent parfois des proportions spectaculaires lorsque

la maladie présente son aspect épidémique violent. Bayoud a détruit en un siècle plus de dix millions de palmiers Maroc et trois millions en Algérie.

✓ **Symptômes de la maladie**

La maladie du bayoud attaque les palmiers matures et jeunes semblables, ainsi que des ramifications à leur base (Saaidi, 1979). Le premier symptôme de la maladie apparaît sur une feuille de palmier de la couronne médiane (photo 3). Cette feuille prend une teinte plombée (couleur gris cendré) puis se fane, de bas en haut, de façon très particulière : quelques pennes ou épines situées d'un côté de la fronde se fanent progressivement de la base vers le sommet. Après un côté a été affecté, le blanchiment commence sur l'autre côté, progressant cette fois en sens inverse du haut de la fronde à la base. Une tache brune apparaît longitudinalement sur la face dorsale du rachis et s'étend de la base à l'extrémité de la fronde, correspondant au passage du mycélium dans faisceaux vasculaires du rachis.

Ensuite, la fronde présente un arc caractéristique, ressemblant à une plume mouillée et pend le long du tronc. Ce blanchiment et le processus de mort des pennes peuvent prendre de quelques jours à plusieurs semaines. La même succession de symptômes alors commence à apparaître sur les feuilles adjacentes. La maladie avance inéluctablement et le palmier meurt quand le bourgeon terminal est atteint. Le palmier peut mourir à tout moment de plusieurs semaines à plusieurs mois après l'apparition des premiers symptômes. Le rapide l'évolution des symptômes dépend principalement de la plantation conditions et sur le cultivar palmier dattier. Un petit nombre des racines infectées par la maladie, de couleur rougeâtre, se révèlent lorsqu'un palmier atteint est déraciné. Les taches sont grandes et nombreux vers la base du stipe. Comme ils avancer vers les parties supérieures de la paume, les faisceaux conducteurs colorés se séparent et leurs chemin compliqué à l'intérieur des tissus sains peut être suivi. Feuille de palmier manifestant des symptômes externes présenté une couleur brun rougeâtre lorsqu'il est coupé, montrant fortement fascicules conducteurs colorés. Il existe donc une continuité des symptômes vasculaires qui existent à partir des racines du palmier jusqu'aux pointes des palmes (Benzohra et *al.*, 2013).



**Photo 3 :** Palmier dattier infecté par le bayoud (Benzohra et *al.*, 2013).

### **I.2.2. La phytopathogénicité due aux champignons mycotoxinogènes**

Parmi les agents pathogènes qui peuvent infecter les plantes figurent les champignons mycotoxinogènes. Elles constituent un danger réel pour la santé humaine et l'animal lorsqu'elles contaminent les différents produits alimentaires. La prolifération fongique et la contamination par les mycotoxines altèrent la qualité marchande des produits alimentaires impliquant d'énormes pertes économiques (Bhat et Vasanthi, 2003). La FAO (Food and Agriculture Organisation) estime qu'environ 25% des récoltes mondiales sont susceptibles d'être contaminées par les mycotoxines (Yiannikouris et Jouany, 2002). L'impact économique des mycotoxines sur l'industrie alimentaire et l'élevage représente un coût annuel d'environ 5 milliards de dollars aux Etats unis et le Canada. En Europe, une potentielle perte économique estimée entre 800 et 1000 millions d'euros est due à la contamination des céréales par l'ochratoxine A (Olsen et *al.*, 2003). Le nombre de mycotoxines responsables d'effets secondaires sur la santé humaine et animale est en perpétuelle augmentation.

## **II. Les antibiotiques**

On appelle « Antibiotique » toute substance naturelle d'origine biologique élaborée par un organisme vivant, substance chimique produite par synthèse ou substance semi

synthétique obtenue par modification chimique d'une molécule de base naturelle ayant les propriétés suivantes :

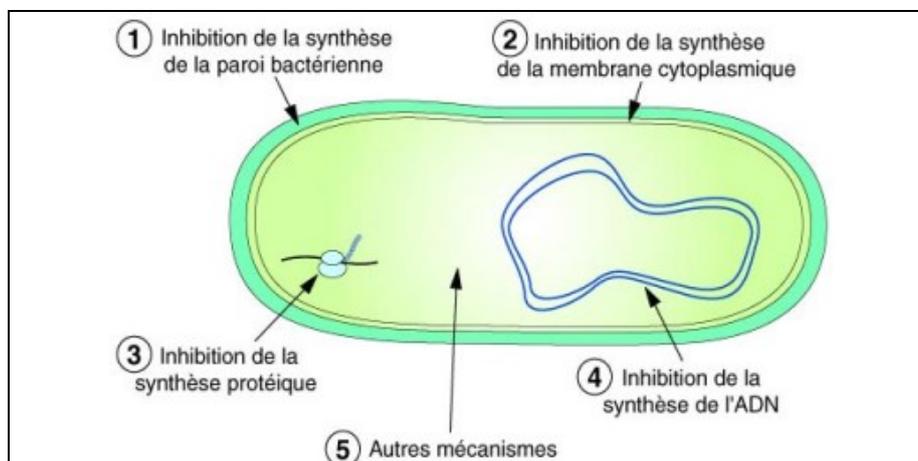
- Activité antibactérienne.
- Activité en milieu organique.
- Une bonne absorption et bonne diffusion dans l'organisme.

Les antibiotiques ont la propriété d'interférer directement avec la prolifération des micro-organismes à des concentrations tolérées par l'hôte (Newman et *al.*, 2003; Singh et Barrett, 2006).

### II.1.Mode d'action

Les antibiotiques agissent à l'échelon moléculaire au niveau d'une ou de plusieurs étapes métaboliques indispensables à la vie de la bactérie (figure 3) (Singh et Barrett, 2006). Ils agissent par :

- Toxicité sélective au niveau de la :
  - Synthèse de la paroi bactérienne
  - Membrane cytoplasmique
  - Synthèse des protéines
  - Synthèse des acides nucléiques.
- Inhibition compétitive : dans ce cas l'antibiotique est un analogue structural, il interfère avec une fonction essentielle à la bactérie.



**Figure 3** : Mode d'action des antibiotiques (Singh et Barrett, 2006).

## **II.2. La résistance aux antibiotiques**

### **II.2.1. La résistance naturelle**

On parle de résistance naturelle lorsque toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique. L'expression d'un caractère inné, partagé par l'ensemble de la communauté bactérienne, rend inappropriée l'utilisation de certains antibiotiques. Des particularités structurales de la paroi cellulaire, empêchant les antibiotiques d'accéder à leur cible, ou l'absence de cible sont autant de facteurs, qui conditionnent la résistance naturelle (Normak et Normak, 2002).

### **II.2.2. La résistance acquise**

La résistance acquise survient lorsque, seules, quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique, deviennent résistantes. Cette résistance peut être acquise par mutation ou par transfert de gènes.

La résistance acquise par mutation est aussi qualifiée de résistance chromosomique. Le phénomène de mutation est conditionné par l'utilisation des antibiotiques. Ces derniers ne sont pas des agents mutagènes mais ils contribuent à sélectionner, de manière spontanée, des mutants résistants au sein d'une population bactérienne. En éliminant les bactéries sensibles, les antibiotiques permettent aux mutants résistants de se multiplier plus facilement. La cause principale de l'évolution et de l'extension des résistances aux antibiotiques est leur prescription à grande échelle en thérapeutique humaine (Goossens et *al.*, 2006). Ces prescriptions sont souvent mal ciblées, comme dans les cas d'infections virales, ou incorrectement dosées (Yagupsky, 2006).

L'utilisation d'antibiotiques, nécessitant de longues périodes de traitement ou à large spectre d'action, est aussi un facteur de risque pour la propagation des résistances (Yagupsky, 2006). La transmission d'éléments génétiques mobiles, comme les plasmides et les transposons, favorise également l'acquisition des résistances par les bactéries. Elle peut s'effectuer par transduction, conjugaison ou transformation (Alekhshun et Levy, 2007).

## **II.3. Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques**

Les résistances aux antibiotiques dans le monde cachent complexité de cette grave situation. Les microbes multi résistants semblent vraiment être s'accéléralant, sans doute alimentée par des programmes intensifs à large spectre d'utilisation d'antibiotiques, mauvais contrôle des infections, immunodépression élevée chez les patients, et des voyages aériens

rapides et fréquents. Plus généralement, peut-être, cela signifie la résistance à au moins trois des cinq principaux groupes d'agents normalement utilisés pour le traitement, c'est-à-dire les pénicillines à large spectre, les céphalosporines à large spectre, carbapénèmes, aminoglycosides et 4-fluoroquinolones. Ce qui est de plus en plus clair, c'est que de tels les microbes, sont associés à une augmentation mortalité et durée de séjour, probablement dues à des traitements. (Gould, 2008).

En particulier, compte tenu de l'absence de stratégies thérapeutiques alternatives, nous avons un besoin urgent d'améliorer le dépistage et la compréhension des mécanismes de multirésistance et de panrésistance chez les bactéries. Comprendre l'épidémiologie moléculaire de de tels organismes (Doi et Arakawa, 2007).

Ensuite, les systèmes d'alerte précoce appropriés doivent être mis en place pour activer les mesures de contrôle appropriées dans le monde entier. Les leçons de la passé récent sur les microbes multi résistantes et sa propagation rapide, à la fois dans les hôpitaux et communautés, doivent être apprises rapidement afin que les mêmes erreurs ne sont pas répétés encore et encore. Malheureusement, en ce moment le scénario le plus probable semble être que ces nouvelles résistances, et d'autres jusqu'ici non détectés, se propagent rapidement (Gould, 2008).

#### **II.4. Les mécanismes de résistance**

La résistance aux antibiotiques est un phénomène naturel et les bactéries ont été évoluées pour résister à l'action des produits antibactériens naturels pendant des milliards d'années (Jessica et *al.*, 2015). Les progrès de génomique, de biologie des systèmes et de biologie structurale ont disséqué de nombreux événements précis soutenir la résistance et continuera de fournir meilleur compréhension, dont les bactéries ont élaboré plusieurs stratégies qui sont :

- La réduction de la perméabilité.
- L'accru de l'efflux : Les pompes à efflux bactériennes transportent activement de nombreux antibiotiques hors de la cellule et sont des contributeurs majeurs à la résistance intrinsèque des Gram-négatifs bactéries à de nombreux médicaments qui peuvent être utilisés pour traiter les infections bactériennes à Gram positif.
- La modification des cibles antibiotiques par mutation.

- La protection par modification de la cible peut aussi être un moyen efficace de résistance aux antibiotiques qui ne nécessitent un changement mutationnel dans les gènes codant pour les molécules cibles.
- La modification directe des antibiotiques. En plus d'empêcher les antibiotiques de pénétrer dans la cellule ou en modifiant leurs cibles, les bactéries peuvent détruire ou modifier antibiotiques, résistant ainsi à leur action.

### **III. Stratégies moléculaires de lutte contre la résistance bactérienne**

L'utilisation excessive des antibiotiques chez l'homme et les animaux a conduit à l'évolution rapide de bactéries résistantes à de multiples médicaments, dont le médicament de dernier recours, n'est plus efficace contre certaines souches.

Par conséquent, la découverte et l'exploitation des agents antimicrobiens peptidiques naturels qui forment faisant partie du système immunitaire inné des plantes et des animaux, peu de nouveaux antibiotiques ont été développés au cours des dernières années. Nous passons ici en revue les stratégies conçues pour exploiter les progrès récents de la biologie moléculaire, y compris la technologie de l'ADN recombinant, la modélisation moléculaire et la génomique pour développer de nouveaux agents antimicrobiennes qui surmontent la résistance aux antibiotiques (Tan et Darren, 2000).

En outre, le développement de nouvelles stratégies pour surmonter la résistance microbienne aux médicaments devient obligatoire, comme l'identification de nouveaux agents antimicrobiens à partir de sources naturelles, augmentant l'efficacité des antibiotiques existants, ou la combinaison des deux (Veras et *al.*, 2012; Perron et *al.*, 2015). En particulier, l'évaluation de la synergie possible entre les produits naturels et les antibiotiques existants est considérée comme un domaine émergent dans la recherche en phytothérapie (Wagner et Ulrich-Merzenich, 2009).

## **IV. Les huiles essentielles**

### **IV.1. Définition**

Les huiles essentielles (HEs), également appelées huiles volatiles, sont des produits concentrés naturels des végétaux qui contiennent des composés aromatiques volatils. Ces composés mélanges de volatils (principalement des mono- et sesquiterpénoïdes, des benzoïdes, des phénylpropanoïdes, etc...). Les HEs sont des extraits par distillation et expression, et sont populaires comme ingrédients de parfums, cosmétiques et produits

d'entretien ménager, en plus d'être utilisé pour aromatiser les aliments et les boissons (Buchbauer, 2010).

#### IV.2. Les activités biologiques des huiles essentielles

Les produits naturels et leurs dérivés sont des sources importantes de nouvelles molécules thérapeutiques (Clardy et Walsh, 2004). Les huiles essentielles des plantes possèdent diverses applications principalement dans les industries de la santé, l'agriculture, la cosmétique et l'alimentation. L'utilisation des HEs dans les systèmes de médecine est précédée depuis l'antiquité dans l'histoire humaine. Des chercheurs du monde entier tentent de caractériser une gamme de propriétés biologiques des HEs qui comprend antimicrobien, antiviral, antimutagène, anticancéreux, antioxydant, activités anti-inflammatoires, immunomodulatrices et antiprotozoaires (Bakkali et *al.*, 2008).

Les antioxydants des plantes sont suggérés comme une alternative intéressante. Les huiles essentielles et les extraits de diverses plantes médicinales et aromatiques des plantes sont connues pour leur capacité à prévenir les acides gras de la décomposition oxydative (Zygodlo et *al.*, 1995). Les composés phénoliques sont les principaux agents qui peuvent donner de l'hydrogène aux radicaux libres et ainsi rompre la réaction en chaîne de l'oxydation des lipides à la première étape initiatique. Ce haut potentiel de composés phénoliques piéger les radicaux peut s'expliquer par leur composition phénolique groupes hydroxyle (Saad et *al.*, 2010).

Des activités antimutagènes importantes ont été observées pour certaines HEs et leurs composants (Varona et *al.*, 2013).

Les états hyper glycémiques ou hypoglycémiques caractéristiques du diabète résultent de l'incapacité de produire de l'insuline ou de l'utiliser pour réguler les niveaux normaux de glucose dans le sang. Des HEs sélectionnées auraient des effets préventifs sur les risques pour la santé associés au diabète (Misra et Dey, 2013).

Un effet anti-inflammatoire a été décrit pour les huiles essentielles d'*Ocimum sanctum* est connue depuis longtemps (Singh et Majumdar, 1997).

Ainsi, il existe d'autres effets biologiques, notamment : l'activité anti-cancer, activité antiphlogistique, activité insecticide, agents anti protozoaires (Jayant et Sankunny, 2014).

### IV.3. Les activités antibactériennes des huiles essentielles

Les métabolites secondaires des plantes sont bien connus pour leurs propriétés antimicrobiennes. Il a été démontré que les HES végétales en particulier, présentent des activités inhibitrices à large spectre contre divers bactéries pathogènes Gram positive et Gram négative (Edris, 2007 ; Lang et Buchbauer, 2012 ; Teixeira et *al.*, 2013). L'efficacité antibactérienne peut varier avec les huiles essentielles ainsi qu'avec différentes bactéries. Par exemple, les huiles de bois de santal (*Santalum album*), l'huile de manuka (*Leptospermum scoparium*) et de vétiver (*C. zizanioides*) sont très actives contre des bactéries Gram positif, mais n'ont pas le cas contre des bactéries Gram négatif (Hammer et *al.*, 1999 ; Hammer et Carson, 2011). Au contraire pour des souches de *Pseudomonas aeruginosa*, elle présente une tolérance à l'inhibition vis-à-vis des huiles essentielles. En général, les huiles de thym, d'origan, d'arbre à thé, cannelle, citronnelle, laurier, myrte citronnée, clou de girofle et bois de rose sont présentés des activités antimicrobiens les plus actifs (Hammer et *al.*, 1999 ; Oussalah et *al.*, 2006). Les huilles de baie, clou de girofle, citronnelle, origan et le thym inhibent la croissance d'*E. coli* à des faibles concentrations. Les huiles de thym, romarin, menthe poivrée, de citronnelle, de clou de girofle et de laurier ont le potentiel de prévenir *Staphylococcus aureus* à des concentrations inférieure à 0,05 %, tandis que les huiles de basilic et d'eucalyptus inhibent à une concentration d'environ 1 % (SmithPalmer et *al.*, 1998 ; Hammer et *al.*, 1999 ; Hammer et Carson, 2011).

### IV.4. Les activités antifongiques des huiles essentielles

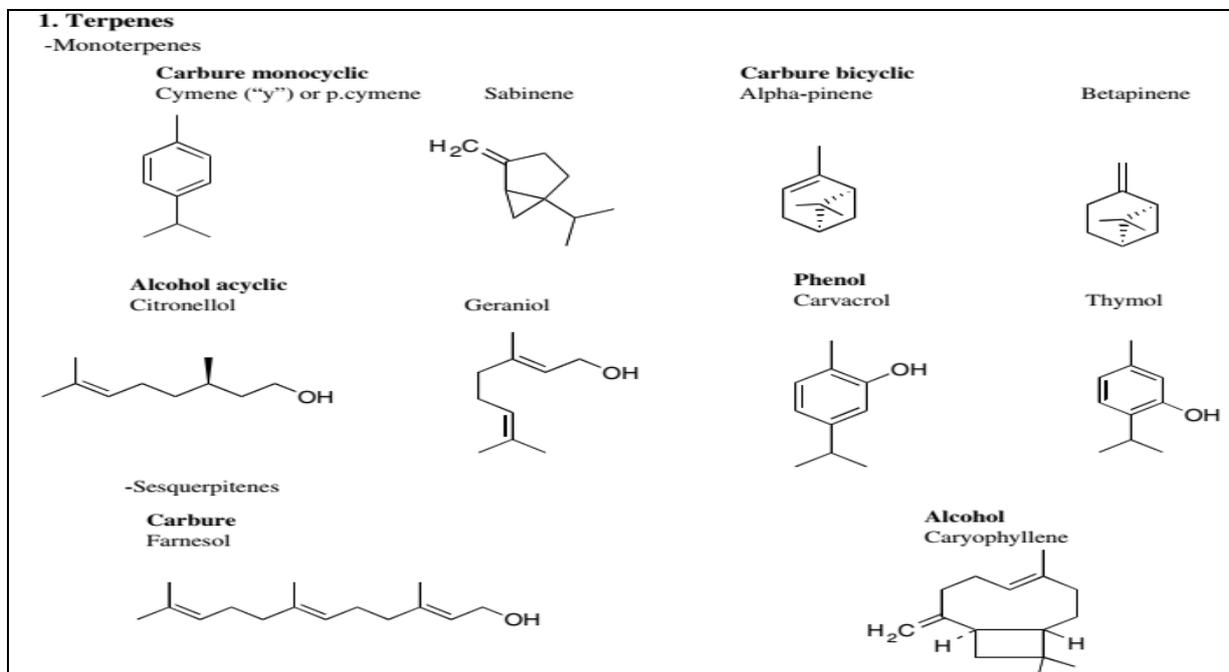
Les infections fongiques invasives sont associées à des taux très élevés de morbidité et de mortalité (Sardi et *al.*, 2013). Divers, des champignons pathogènes de l'homme et des végétaux, y compris des levures, sont trouvés sensibles aux HES. L'efficacité de l'inhibition varie selon les organismes cibles et l'HE testée. Par exemple, trois membres de la famille des apiacées montrent des activités anti *Candida albicans* variables à tendance coriandre, anis et fenouil avec des CMI de 0,25 %, 0,5 % et 1 % respectivement (Hammer et *al.*, 1999).

### IV.5. Les constituants des huiles essentielles

Les constituants des huiles essentielles peuvent être répartis en deux groupes principaux des composés, qui sont les terpènes et terpénoïdes et les aromatiques et constituants aliphatiques, tous caractérisés par un faible poids (figures 4 et 5).

➤ **Les terpènes (Figure 4)**

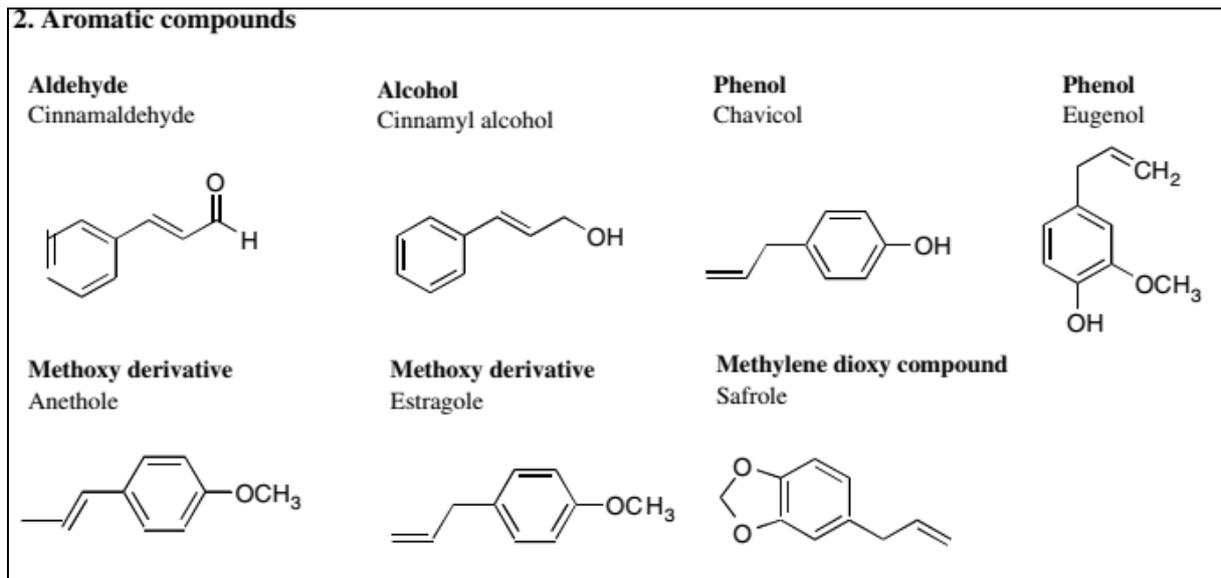
Les terpènes se forment structurellement et fonctionnellement par différents classes. Ils sont formés à partir de combinaisons de plusieurs unités à base de 5 carbones (C5) appelées isoprène. Les principaux terpènes sont les monoterpènes (C10) et les sesquiterpènes (C15), mais les hémiterpènes (C5), diterpènes (C20), triterpènes (C30) et existent également tétraterpènes (C40). Un terpène contenant de l'oxygène est appelé un terpénoïde. Les monoterpènes sont formés du couplage de deux unités isoprène (C5). Ce sont les molécules les plus représentatives constituant 90% des huiles essentielles et permettent une grande variété de structures. Ils se composent de plusieurs fonctions : les carbures, alcools, aldéhydes, cétones, esters,...etc.



**Figure 4 :** structure chimique des terpènes.

➤ **Les composés aromatiques (Figure 5)**

Sont des dérivés du phénylpropane, les composés aromatiques sont moins fréquents que les terpènes. Les composés aromatiques comprennent : aldéhyde, alcool, phénols, dérivés méthoxy et des composés méthylènes. Les composants azotés ou soufrés tels que les glucosinolates ou les dérivés isothiocyanates (huiles d'ail et de moutarde) sont également caractéristiques en tant que métabolites secondaires de divers végétaux ou de produits torréfiés, grillés ou rôtis.



**Figure 5 :** structure chimique composés aromatiques.

## IV.6. Mode d'action des huiles essentielles sur les microorganismes

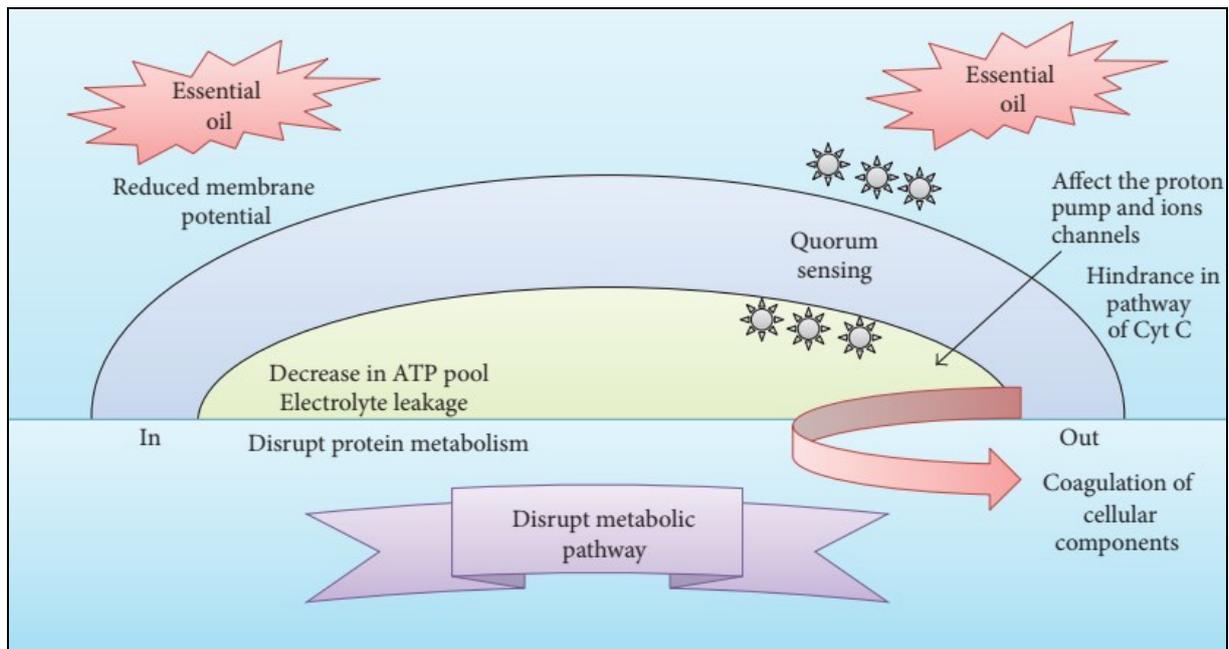
### IV.6.1. Mode d'action antibactérien

Divers mécanismes de l'activité antibactérienne des huiles essentielles ont été proposés (figure 6). Les huiles essentielles déstabilisent principalement l'architecture cellulaire, entraînant la rupture de l'intégrité de la membrane et une perméabilité accrue, qui perturbe de nombreuses activités cellulaires, dont la production d'énergie (couplée à la membrane), le transport membranaire et d'autres fonctions de régulation métabolique. La perturbation de la membrane cellulaire par les huiles essentielles peut aider divers processus vitaux tels que les processus de conversion d'énergie, le traitement des nutriments, la synthèse de macromolécules et la sécrétion de régulateurs de croissance (Oussalah et *al.*, 2006).

En raison de leur nature lipophile, les huiles essentielles sont facilement pénétrables à travers les membranes cellulaires bactériennes. Diverses travaux précédentes ont été signalés que les huiles essentielles provoquer une augmentation de la perméabilité du membrane cellulaire bactérienne qui peuvent conduire à la fuite des composants cellulaires et la perte des ions (Oussalah et *al.*, 2006 ; Saad et *al.*, 2013 ; Raut et Karuppaiyl, 2014). L'effet antibactérien des huiles essentielles sont également liées à des potentiels membranaires réduits, la perturbation des pompes à protons et l'épuisement de l'ATP (Turina et *al.*, 2006). Cette altération de l'organisation cellulaire peut entraîner un effet de cascade, entraînant l'affectation d'autres organites cellulaires (Carson et *al.*, 2002). De même, (Cox et *al.*, 1998) ont démontré que l'huile d'arbre de thé inhibe la croissance de *S. aureus* et *E. coli* en

modifiant leurs perméabilité cellulaire, augmentant la fuite des ions  $K^+$  intracellulaire et perturbent la respiration cellulaire. Les huiles essentielles passent à travers la paroi cellulaire et la membrane cytoplasmique, ce qui peut perturber l'arrangement des acides gras dissemblables, des bicouches phospholipidiques et des molécules de polysaccharides (Longbottom et *al.*, 2004 ; Saad et *al.*, 2013 ; Raut et Karuppaiyl, 2014).

Tous ces événements peuvent être responsables de la coagulation des composants cellulaires internes dans le cytoplasme et se décomposent des liaisons entre les couches lipidiques et protéiques (Burt, 2004).



**Figure 6 :** Mécanismes de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles (Mallappa et *al.*, 2016).

Dans certains cas, les composés purs des huiles essentielles présentent une activité antibactérienne plus élevée par rapport à l'huile brute. L'effet antibactérien des constituants des huiles essentielles tels que le thymol, le menthol et l'acétate de linalyle est dû à une perturbation des fractions lipidiques des membranes plasmiques bactériennes (Trombetta et *al.*, 2005). Cela peut affecter la perméabilité de la membrane et induit une fuite de matériaux intracellulaires. Le carvacrol est un composé hydrophobe qui influence les membranes cellulaires en altérant la composition des acides gras, ce qui affecte alors la fluidité et la perméabilité de la membrane (Rudramurthy et *al.*, 2016). Cependant, son mécanisme d'action exacte n'est pas encore clair. Il a été rapporté que le carvacrol a considérablement appauvri le pool interne d'ATP des cellules bactériennes (Ultee et *al.*,

1999 ; Rudramurthy et *al.*, 2016). Dans une autre étude, le carvacrol a induit la fuite et la perte d'ATP des cellules bactériennes (Ultee et *al.*, 2002). De même, les composés méthyle carvacrol, menthol, citronellol, et le thymol provoquent également un élargissement de la membrane cellulaire qui conduit à une diffusion passive des ions entre les phospholipides expansés (Ultee et *al.*, 2002 ; Trombetta et *al.*, 2005 ; Saad et *al.*, 2013 ; Rudramurthy et *al.*, 2016). Un autre effet des huiles essentielles sur les membranes cellulaires est l'inhibition de la sécrétion de toxine, (Ultee et Smid, 2001) ont rapporté que l'exposition de *B. cereus* au carvacrol a entraîné l'inhibition de la production de toxines et l'application d'huile essentielle d'origan a complètement aboli la production de l'entérotoxine par *S. aureus*. Ainsi, la sécrétion de toxines peut être empêchée par des modifications de la membrane bactérienne dues à l'influence des composés des huiles essentielles sur le processus de transport transmembranaire dans la membrane plasmique, qui limite le rejet de toxines dans le milieu extérieur (Souza et *al.*, 2010).

D'autre mécanisme d'action est le trans-cinnamaldéhyde, qui pénètre dans le périplasma de la cellule et perturbe les fonctions des cellules. De plus, le p-cymène a une plus grande affinité vers les membranes cellulaires bactériennes et peut ainsi perturber l'intégrité membranaire. Les protéines de la membrane externe sont également affectées par les composants des huiles essentielles. Par exemple, le carvacrol peut perturber l'insertion et le repliement des protéines tels que DnaK et GroEL. Le carvacrol peut également inhiber la synthèse de la flagelline, qui est une protéine microbienne nécessaire à motilité bactérienne (Rudramurthy et *al.*, 2016). Le phénylpropène et l'eugénol, également présente une activité en modifiant le contour des acides gras pour altérer la membrane cytoplasmique de différentes bactéries. En outre, HE peut détruire diverses enzymes bactériennes telles que l'ATPase, l'amylase, l'histidine carboxylase et les protéases (Thoroski, 1989). De même, il a été rapporté que le cinnamaldéhyde inhibe les enzymes ATPase et perturbent la membrane cellulaire externe (Wendakoon et Sakaguchi, 1995). Autres études ont découvert que la vanilline présentait une activité antimicrobienne en obstruant les voies de la respiration bactérienne et perturbant le flux d'ions  $K^+$  et le gradient de pH (Fitzgerald et *al.*, 2004). De la même manière, les huiles essentielles de carvéol, de citronellal et de carvone ont été montrées de modifier l'hydrophobicité et perturber l'intégrité de la membrane, conduisant à la fuite des ions  $K^+$  (Lopez-Romero et *al.*, 2015). Certaines huiles essentielles peuvent inhiber le réseau de détection de quorum sensing médiée par diverses molécules de signal bactériennes (Szabo et *al.*, 2010). L'efficacité de l'effet antibactérien des huiles essentielles ou de leurs composés

individuels peut différer d'un microbe à l'autre. Par conséquent, l'élucidation des mécanismes d'action exacts de chaque huile essentielle et leurs composants est nécessaire, y compris une étude approfondie des nombreuses souches/espèces microbiennes. Par ailleurs, une étude détaillée sur les composantes de l'essentiel les huiles seraient utiles pour améliorer notre compréhension de leur mécanisme de l'activité antimicrobienne.

#### **IV.6.2. Mode d'action antifongique**

L'activité antifongique des huiles essentielles sont similaires à celles expliqué pour les mécanismes antibactériens. Généralement, l'exposition des huiles essentielles entraînent la coagulation des composants cellulaires en raison de dommages irréversibles à la membrane cellulaire. Dans les cellules de levures, les huiles essentielles établissent un potentiel membranaire à travers la membrane cellulaire et perturbent la production d'ATP, qui conduit à des lésions de la membrane cellulaire (Aleksic et Knezevic, 2014). Les huiles essentielles ont la capacité de pénétrer et de perturber la paroi cellulaire fongique et membranes cytoplasmiques par un processus de perméabilisation, qui conduit à la désintégration des membranes mitochondriales. Cela est dû à des modifications du flux d'électrons à l'intérieur de la voie du système de transport d'électrons (ETS).

Cela peut également endommager les lipides, les protéines et l'acide nucléique contenu des cellules infectées par les champignons pathogènes (Arnal-Schnebel et *al.*, 2004). Les huiles essentielles pourraient également perturber la dépolarisation des membranes mitochondriales en agissant sur les canaux ioniques, en particulier les ions  $Ca^{2+}$ , les pompes à protons et les pools d'ATP, et donc diminuer le potentiel de membrane. Ce changement dans la fluidité des membranes peut provoquer une fuite d'électrolyte et entraver les voies du cytochrome C, le métabolisme des protéines et concentrations en ions de calcium. Ainsi, la perméabilisation des membranes mitochondriales internes et externes peut entraîner l'apoptose cellulaire ou la nécrose conduisant à la mort cellulaire (Yoon et *al.*, 2000).

**PARTIE**  
**EXPÉRIMENTALE**

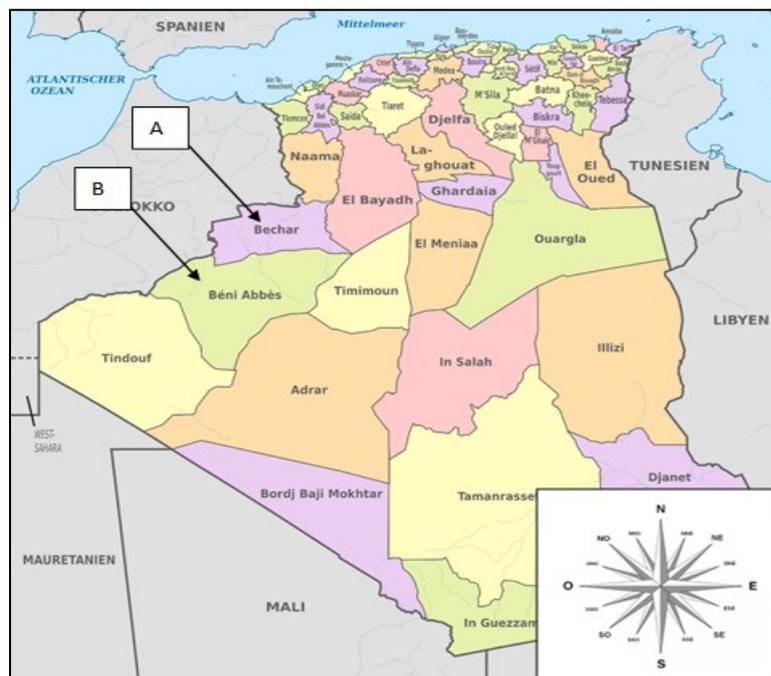
Ce travail a été réalisé durant la période de Décembre 2019 et Juillet 2022. Les plantes étudiées ont été collectées de la région de Saoura (Bechar et Beni abbes), quant à la partie pratique ont été effectuée aux différents laboratoires selon les besoins. Les laboratoires collaborés pour réaliser cette thèse sont :

- Le laboratoire de valorisation des ressources végétales et sécurité alimentaire dans des zones semi-arides de sud-ouest Algérien (VERVSA) à l'université de Béchar ;
- Les laboratoires pédagogiques de biologie à l'université de Béchar ;
- Le Laboratoire de Gestion durable des ressources naturelles dans des zones arides et semi-arides, Centre Universitaire Salhi Ahmed de Nâama ;
- Le plateau technique en analyse physico-chimique (PTAPC-CRAPC) à Laghouat ;
- Le laboratoire de recherche en chimie analytique à l'université de Laghouat.

## 1. Etude phytochimique des plantes étudiées

### 1.1. Description de la région d'étude

Comme montre la figure 7, la région de Saoura constitue un point de liaison entre les hauts plateaux et la grande Sahara qui se caractérise par un climat Saharien, dont les températures pendant l'hiver varient de 0 à 25°C et dépassent les 40°C pendant l'été (Schnack, 1999).



**Figure 7** : Les zones d'échantillonnage des deux espèces étudiées (A et B se comporte la zone de Saoura). ; **A** : *Pulicaria crispera* (Béchar). **B** : *Rhynchospora lonadioides* Coss (Beni abbes).

## 1.2. Choix et prélèvement de matière végétale

Les espèces choisies pour notre étude, appartiennent à la famille des Astéracées qui sont *Rhadinolobos lonadioides* Coss (photo 2) et *Pulicaria crispa* (photo 3). Le choix de ces deux plantes est basé sur :

- Ces utilisations dans la pharmacopée traditionnelle algérienne.
- Contribuer à l'étude et l'analyse de composition chimique de leurs huiles essentielles en raison du manque de recherche dans ce contexte.
- L'évaluation de l'effet biologique de ces huiles essentielles contre divers souches microbiennes pathogènes.

En plus, chacun de deux plantes se croit dans deux endroits différents de la même niche écologique. La figure 7 montre les points précis de prélèvement et de développement de chaque plantes. En effet, *Rhadinolobos lonadioides* coss a été prélevée de la zone de Beni Abbes, tandis que *Pulicaria crispa* a été collectée à partir de la zone de route de Kenadsa au sud-ouest (tableau 1).

**Tableau 1:** Lieux des prélèvements des plantes, situation géographique et bioclimat des différentes stations d'étude.

Plantes	Stations	Etages bioclimatiques	Altitude (m)	Latitude (Nord)	Longitude (Ouest)
<i>Rhadinolobos lonadioides</i> Coss	Beni Abbes	Aride, chaud	483	30° 05'	2° 06'
<i>Pulicaria crispa</i>	Kenadsa	Aride, chaud	747	31° 33'	2° 25'

Elles étaient récoltées en période de floraison à des endroits précis sous le contrôle des botanistes de la région de Saoura, qui assurent leur identification sur le terrain. La période de floraison est dépend de la plante. En effet, *Rhadinolobos lonadioides* Coss est mise en fleure en mois d'avril, tandis que *Pulicaria crispa* en mois de Mars. Pour assurer un bon déroulement de la partie pratique, les deux plantes ont été prélevées à différents temps : *Rhadinolobos lonadioides* Coss était prélevé en 2020 et *Pulicaria crispa* en 2021.

Les plantes étudiées doivent être saines et collectées durant une journée ensoleillée à partir des endroits indemne d'utilisation des engrais chimiques. Ensuite, les échantillons

prélevés étaient mis dans des boîtes aérées pour éviter de les écraser et la transpiration qui aboutit au noircissement durant le séchage des plantes.

### 1.3. Préparation des plantes

Dans cette étude seulement les parties aériennes (tiges, feuilles et fleurs) ont été étudiées car les racines sont coupées durant la collecte.

Les parties récoltées ont été nettoyées, ensuite étalées sur du papier, pour qu'il sèche à l'air libre et à l'abri de la lumière, pendant 7 à 10 jours avant leur utilisation. Cette partie a été réalisée au niveau de laboratoire pédagogique de biologie à l'Université de Béchar.



**Photo 4 :** Lieu de récolte de la plante *Rhetinolepis lonadioides* Coss à Beni abbes (Photo originale).



**Photo 5 :** Lieu de récolte de la plante *Pulicaria crispa* à Kenadsa (Photo originale).

#### 1.4. Extraction des huiles essentielles

La distillation est un procédé de séparation basé sur un équilibre L (liquide) – V (vapeur). Par chauffage, le liquide entre en ébullition et la vapeur en équilibre avec le liquide sera plus riche en constituant les plus volatils. La technique implique la condensation de la vapeur et la récupération des fractions liquides résultantes. Nous avons utilisé la technique d'extraction de référence : l'hydrodistillation en utilisant l'appareil de Clevenger (Cocking et Middleton, 1935).

L'extraction des huiles essentielles des espèces *Rhadinolabis lonadioides* Coss et *Pulicaria crispa* consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) dans un ballon de 2 L surmonté qui est ensuite portée à l'ébullition. Une distillation a été réalisée par ébullition pendant 3 h de 100 g de matériel végétal préalablement séché avec 1 L d'eau. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité. On récupère le surnageant nommé huile essentielle. La distillation s'effectue avec recyclage d'eau (cohobation). L'huile essentielle a été conservée à 4°C à l'obscurité pour éviter leur dégradation (Amarti et al., 2006).

#### 1.5. Détermination du rendement

Selon la norme d'AFNOR (1986), Le rendement en huile essentielle a été déterminé par rapport à la matière sèche, évaluée à partir de 3 échantillons de 100 g préalablement séchés. Il est défini comme étant le rapport de la quantité de l'huile essentielle extraite sur la quantité du matériel végétal utilisé, il est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$R = (Pb/Pa) \times 100$$

Où :

R : Rendement en %.

Pa : la masse de la plante en gramme

Pb : la masse de l'huile essentielle en gramme

## 1.6. Les analyses chimiques des huiles essentielles

L'analyse chimique des huiles essentielles a été réalisée dans le plateau de recherche des analyses physico-chimique à Laghouat (PTAPC-CRAPC) et laboratoire de recherche en chimie analytique à l'université de Laghouat.

Une fois l'extrait en huile essentielle est obtenu, l'analyse permet d'identifier et de quantifier les composants. Les progrès des méthodes analytiques permettent d'identifier rapidement un très grand nombre de constituants. La méthode la plus adéquate à nos jours est la chromatographie en phase gazeuse (CPG).

### ➤ Analyse chromatographique des huiles essentielle par GC-FID

La chromatographie en phase gazeuse (CPG), est comme toutes les techniques de chromatographie, permet de séparer des molécules d'un mélange éventuellement très complexe de nature très diverses. Elle s'applique principalement aux composés volatiles ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Elle est de plus en plus utilisée dans les principaux domaines de la chimie.

Les analyses des huiles essentielles ont été réalisées à l'aide de un chromatographe Hewlett Packard 6890 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et un pressostat électronique injecteur de contrôle. Un polyéthylène glycol polaire HP Innowax et un 5% diphenyl, 95% diméthyl poly siloxane colonnes capillaires apolaires HP-5 (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm épaisseur du film ; Hewlett-Packard, CA, USA) ont été utilisés. Le débit du gaz vecteur (N<sub>2</sub>) était de 1,6 mL/min. La scission rapport était de 60:1. La température de la colonne a été programmée à 35°C pendant 10 min, puis chauffée à 205°C à une vitesse de 2°C/min, puis maintenue constante à 205°C pendant 10 minutes. Les températures de l'injecteur et du détecteur ont été maintenues à 250°C et 300°C, respectivement. L'huile essentielle était diluée à 1:100 (v/v) avec le n-hexane et 1 µl de l'huile essentielle diluée a été injectée manuellement.

### ➤ Méthode d'analyses spectrales par CG-SM

L'analyse des échantillons a été réalisée, à l'aide d'un Instrument SHIMADZU GCMSQP 2020, équipé d'une colonne capillaire fusionnée Rxi®-5ms (Phase : Crossbond® 5% diphenyl/ 95% diméthyl polysiloxane).

Ses dimensions sont : 30 m × 0,25 mm et 0,25 µm d'épaisseur de film, cette colonne a une phase similaire aux suivantes colonnes : HP-1ms, HP-1msUI, DB-1ms, DB-5ms, DB-1msUI, Ultra-1, VF-1ms, ZB-1, ZB-1ms, et également considéré comme équivalent aux

phases USP G1, G2, G38. Un volume de 0,5 µL de solution préparée à 10% volume de la dilution de l'échantillon dans n-hexane, a été injecté dans mode fractionné (30:1).

Les températures de l'injecteur et du détecteur ont été maintenues à 250°C et 310°C, respectivement la température de la colonne a été programmée à : 60°C fixe pendant 3min puis portée à 310°C avec un incrément de 2°C/min, puis maintenue à 310°C pendant 10 min. Le gaz vecteur utilisé était de l'hélium (pur à 99,995 %) avec un débit de 1mL/min. Les conditions du spectromètre de masse étaient les suivantes : tension d'ionisation 70 eV, température de la source d'ions 200 °C et spectres de masse d'ionisation électronique ont été acquis sur la plage de masse de 45 à 600 m/z.

### 1.7. Identification des composants des huiles essentielles

Les indices de rétention linéaire (LRI) ont été calculés pour des composés séparés par rapport à un n-alcanes homologues en série (n-C7-C20). Les composants ont été identifiés, en comparant leur (LRI) calculé avec ceux de la littérature (Babushok et *al.*, 2011; Adams, 2017) ainsi que leurs spectres de masse avec ceux enregistrés par le NIST (National Institute of Standards and Technology) et bibliothèques Wiley "NIST17.lib, W11N17MAI et FFNSC1.2.lib».

Les RI linéaires programmés en température de tous les constituants ont été calculés sur la base du GC par l'interpolation entre les n-alcanes entre parenthèses comme suit :

$$RI = 100 \times \left[ \frac{t_{R(i)} + t_{R(Z)}}{t_{R(Z+1)} + t_{R(Z)}} Z \right]$$

Où, Z : le nombre d'atome de carbone dans le plus petit n-alcane.

$t_{R(i)}$ ,  $t_{R(Z)}$  et  $t_{R(Z+1)}$ : le temps de rétention du composé souhaité, le plus petit n-alcane et le plus grand n-alcane, respectivement (Jalali-Heravi et *al.*, 2015).

## 2. Evaluation des activités biologiques des huiles essentielles

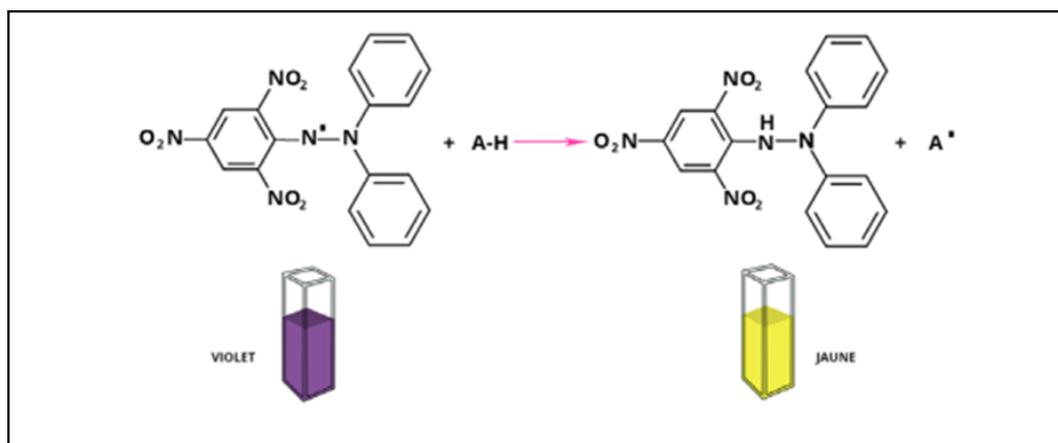
### 2.1. Etude de l'activité antiradicalaire

Afin d'évaluer l'activité antiradicalaire des huiles essentielles des plantes *Rhynchospora* *lonadioides* Coss et *Pulicaria crispa*, une méthode a été employée *in vitro* est le pouvoir de piégeage du radical libre de DPPH (Gachkar et al., 2007).

#### ➤ Principe

Le test a utilisé la réduction du 1,1-diphényl-2- radical picrylhydrazyle (DPPH) en présence de composés volatiles des huiles essentielles (figure 8).

Il est basé sur la diminution de l'absorbance de la solution radicalaire selon la réaction  $\text{DPPH}\cdot + \text{HA} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{A}\cdot$ . Ce radical a été utilisé pendant de nombreuses décennies pour étudier le mécanisme du don d'atomes d'hydrogène à les radicaux libres de certains substrats ou l'activité antioxydante de composés portant des groupes –SH, –OH et –NH. Où (AH) <sub>n</sub> représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en molécule DPPH-H.



**Figure 8 :** Principe de l'activité antiradicalaire.

#### ➤ Mode opératoire

En premier temps, on a préparé la solution méthanolique de DPPH à 0.004 %, où nous avons dissoudre 1 mg de DPPH poudre en 25 ml de méthanol. Afin de préparer les solutions mères de chaque HE, on ajoute 80 µl de l'HE à 4 ml de méthanol, pour l'obtention d'une concentration finale de la solution mère à 20 µl/ml. Le témoin utilisé est l'acide ascorbique qui est préparé de la même concentration que les huiles essentielles.

A partir des solutions mères, différentes concentrations des huiles essentielle ont été préparés : 10 µl/ml ; 5 µl/ml ; 2.5 µl/ml ; 1.25 µl/ml ; 0.625 µl/ml ; 0.312 µl/ml et 0.156

µl/ml. Un volume de 40 µl de chaque concentration a été ajouté à 960 µl de la solution de DPPH. Après l'homogénéisation par un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité à une température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm par un spectrophotomètre UV-Visible où le méthanol est utilisé comme blanc. Les résultats ont été exprimés par la moyenne de trois mesures séparés (Archana *et al.*, 2005 ; Dung *et al.*, 2008).

➤ **L'expression des résultats**

L'activité antiradicalaire est exprimée par le pouvoir réducteur de la solution méthanolique de DPPH. Les valeurs d'absorbances les plus faibles indiquent une activité de piégeage des radicaux libres importante que celles les plus grandes. Le pouvoir de réduction est déterminé en appliquant la formule suivante :

$$AX(\%) = \left[ \frac{Ac - Ae}{Ac} \right] * 100$$

**AX(%)** : Pouvoir de la réduction en % ;

**Ae**: Absorbance de la solution de DPPH en présence de l'huile essentielle ou de la vitamine C ;

**Ac**: Absorbance de la solution de DPPH en absence de l'huile essentielle et de la vitamine C ;

L'activité d'un antioxydant peut être caractérisée par une grandeur appelée CI50. Ce paramètre est défini comme étant la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration de DPPH initiale à 50%. La CI50 permet de comparer l'activité de différents composés antioxydants. Plus la CI50 est faible, plus l'antioxydant a une activité plus importante (Sanchez-Moreno *et al.*, 1998).

## 2.2. Evaluation de l'effet hémolytique des huiles essentielles vis-à-vis des globules rouges

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Comme tous les produits naturels : "ce n'est pas parce que c'est naturel que c'est sans danger pour l'organisme". Cet aspect des huiles essentielles est d'autant plus important que leur utilisation, de plus en plus populaire, tend à se généraliser avec l'émergence de nouvelles pratiques thérapeutiques telle que l'aromathérapie.

La mesure de la fuite d'hémoglobine des hématies humaines provoquée par les huiles essentielles a été réalisée par la méthode décrite selon (Lee, 2002).

➤ **Préparation de la suspension érythrocytaire**

Du sang fraîchement prélevé et traité, a été centrifugé à 4000 tours/minute pendant 5 minutes à l'aide d'une centrifugeuse. Après l'élimination du surnageant, le culot a été lavé dans un PBS isotonique à pH 7,4 jusqu'à ce que le tampon est devenu clair puis remis en suspension dans du PBS dans le volume du sang initiale à raison de 2%.

➤ **Mesure de la fuite d'hémoglobine**

Un volume de 2970 µL de la suspension érythrocytaire à 2% a été incubé avec 30 µL d'huile essentielle à des concentrations différentes pendant 2h dans un incubateur de paillasse à 37°C. Des prélèvements de 100 µL ont été réalisés chaque 15 minute pour être resuspendus dans 1900µL d'une solution de lavage PBS. Les réactions mélanges ont été centrifugés pendant 3 minutes à 3000 rpm et la fuite de l'hémoglobine intracellulaire a été mesurée par la lecture de la densité optique du surnageant à une longueur d'onde de 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Vis. Le Triton X-100 à 0,2 % (hémolyse à 100 %) ont été inclus comme références et le PBS comme étant hémolyse spontanée (Martino et *al.*, 2001).

Pour chaque échantillon le pourcentage d'hémolyse a été déterminé par l'équation suivante :

$$\text{Taux d'hémolyse} = \frac{A \text{ échantillon} - A \text{ hémolyse spontanée}}{A \text{ hémolyse totale} - A \text{ hémolyse spontanée}} * 100$$

## 2.3. L'activité antimicrobienne *in vitro* des huiles essentielles

### 2.3.1. Etude de l'activité antibactérienne

On a utilisé qu'une seule méthode pour la détermination de l'activité antibactérienne qui est la méthode de diffusion par disque (analyse qualitative), ensuite on a déterminé la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour les bactéries sensibles (analyse quantitative).

Les CMI des huiles essentielles contre les microorganismes testés ont été déterminées par la méthode de microdilution en bouillon selon le protocole de NCCLS (2002) décrit par (Celiktas et *al.*, 2007). Tous les tests ont été effectués en triple.

➤ **Les souches bactériennes testées**

Les souches utilisés sont des souches de référence selon le référentiel international, l'American Type Culture Collection (ATCC). Ces souches ont été fournies par le laboratoire de Gestion durable des ressources naturelles dans des zones arides et semi-arides, Département de SNV, Institut des sciences et technologies, Centre Universitaire Salhi Ahmed Nâama. Elles sont impliquées fréquemment dans la pathogénicité et l'altération des denrées alimentaires (tableau 2).

**Tableau 2:** Pathogénicité des souches bactériennes testées.

La souche	Le code ATCC	Gram	La pathogénicité
<i>Bacillus cereus</i>	10876	+	Des toxi-infections alimentaires chez l'homme et rarement des infections opportunistes (Patrick et <i>al.</i> , 1988).
<i>Bacillus subtilis</i>	21332	+	N'est pas reconnu comme pathogène pour l'Homme, mais elle peut contaminer des aliments et peut exceptionnellement provoquer une intoxication alimentaire.
<i>Staphylococcus aureus</i> 1	25923	+	La production d'entérotoxines : coagulase + dits « pathogènes ». elle peut causer des lésions suppurées, des septicémies et endocardites et des manifestations d'origine toxique (Nauciel et Vildé, 2005).
<i>Staphylococcus aureus</i> 2	6538	+	/
<i>Enterococcus faecalis</i>	49452	+	Des infections nosocomiales (Koneman Elmer, 2006), et des intoxications alimentaires (Ait abdelouahab , 2007).
<i>E. coli</i>	25922	-	Des infections extra-intestinales (des infections urinaires, des méningites et septicémies néonatales et des septicémies hospitalières), parfois d'infections intestinales (gastro-entérites et diarrhées) (Hélène et <i>al.</i> , 2001).

<i>Pseudomonas aerogenusa</i>	27853	+	des infections multiples : des infections cutanées (Patrick et <i>al.</i> , 1988), les surinfections des plaies et les bronchopneumonies (Leminor et Véron, 1989), des infections urinaires (Berche et <i>al.</i> , 1988).
-------------------------------	-------	---	--

### ➤ Confirmation du pureté et de l'authentification des souches bactériennes testées

La confirmation de la pureté des souches retenus pour ce test était basée sur l'observation macroscopique de l'aspect des colonies, l'observation microscopique des cellules après coloration du Gram, puis des tests biochimiques. Après l'ensemencement des bactéries sur leurs milieux sélectifs, la coloration de Gram a été réalisée après 24h d'incubation à 37<sup>0</sup> C, ce qui a permis ainsi observation de la forme des cellules bactériennes et leurs modes de regroupement. Egalement, les deux testes biochimiques recherche de catalase et l'oxydase ont été réalisées.

### ➤ Milieu de culture

Afin d'évaluer l'activité antibactérienne, nous avons utilisé la gélose Mueller Hinton. En effet, il s'agit d'un milieu non sélectif, qui comporte des ions favorisant une bonne diffusion des molécules bioactives. La gélose de Muller Hinton stérile a été coulée dans des boites de Pétri de 90 mm de diamètre, l'épaisseur de la gélose doit être de 2 mm, répartie puis séchées pendant 30 min à une température ambiante avant leur emploi. Avant solidification de la gélose, les boites ont été disposées sur une surface plane afin d'assurer une bonne uniformisation de la surface de la gélose (Hussain et *al.*, 2010).

### ➤ Préparation des suspensions bactériennes

Les bactéries ont été ensemencées sur la gélose nutritive (GN) et incubées pendant 24 heures, afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées. A partir de cette dernière, et à l'aide d'une pipette pasteur quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées puis émulsionnées dans un tube contient 9 ml d'eau physiologique stérile à 0.9 % de sel (NaCl). Le mélange est ensuite agitée vigoureusement à l'aide d'un vortex afin de mettre en suspension le contenu, et la densité optique a été lu à 625 nm et ajusté à 0.08 jusqu'à 0.10 nm pour donner une suspension bactérienne homogène équivalente à 10<sup>8</sup> UFC/ml (Kenoufi, 2018).

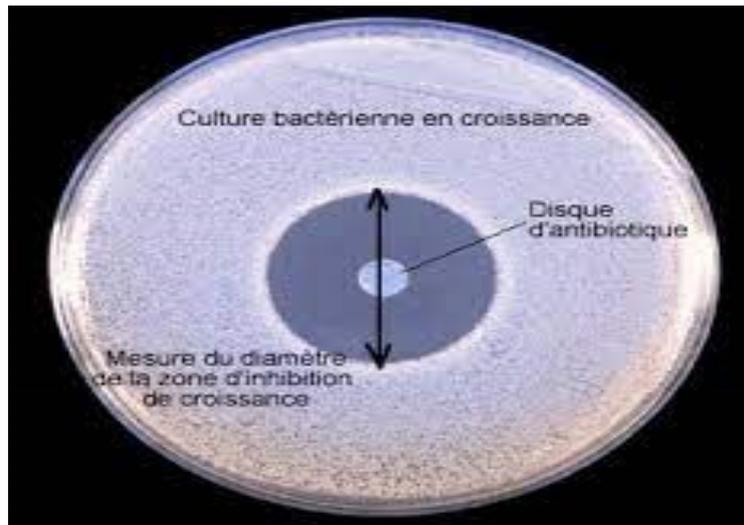
➤ **Profile d'antibiorésistance**

Afin d'évaluer la résistance des souches bactériennes testés, un antibiogramme a été effectué en utilisant les antibiotiques d'origine (Liofilchem®.Italie) illustrés dans le tableau 3.

**Tableau 3** : le mode d'action et le spectre d'activité des antibiotiques utilisés.

L'antibiotique	Mode d'action	Spectre d'activité
Colistine (25 µg)	La colistine est polycationique et à la fois hydrophile et lipophile.	<i>E.coli</i> et <i>P.aerogenusa</i> .
Ciprofloxacine (5 µg)	Inhibition sélective de la synthèse de l'ADN bactérien en agissant sur deux enzymes impliqués dans cette synthèse : l'ADN gyrase et l'ADN topo- isomérase IV.	Entérobactéries et Staphylocoques
Erythromycine (15 µg)	Sont des inhibiteurs de la synthèse des protéines, ils agissent au niveau de la s/unité 50S du ribosome. Ils inhibent la croissance de la chaîne polypeptidique en formation.	Staphylocoque, Bacillus, Streptocoque
Tétracycline (30 µg)	agit en bloquant la synthèse protéique en se liant au ribosome (site A) et empêche l'aminocyl-ARNt de s'y fixer.	contre nombre d'infections bactériennes à Gram positif, Gram négatif et anaérobies.
Azithromycine (15 µg)	Sont des inhibiteurs de la synthèse des protéines, ils agissent au niveau de la s/unité 50S du ribosome. Ils inhibent la croissance de la chaîne polypeptidique en formation.	Staphylocoque, Bacillus, Streptocoque.
Oxacilline (1 µg)	Paroi bactérienne, par toxicité sélective.	Staphylocoque.
Fusidic acid (10 µg)	C'est un inhibiteur de la synthèse Protéique interférant avec le facteur d'élongation G (EF-G).	Bactéries à Gram+, surtout utilisé comme anti staphylococcique.
Colistine sulfate (30 µg)	La liaison aux lipopolysaccharides bactériens provoque une perméabilisation de la membrane cellulaire.	Efficace contre les bactéries Gram négatif, même non proliférantes.
Streptomycine (300 µg)	est un inhibiteur de la synthèse des protéines.	pouvant agir sur certains bacilles Gram négatifs, sur certaines cocci Gram positifs ou sur certaines mycobactéries.
Tobramycine (10 µg)	l'inhibition de la synthèse des protéines, altérant ainsi la perméabilité de la membrane cellulaire, entraînant la rupture progressive de l'enveloppe cellulaire puis éventuellement la mort de la cellule.	bacteries Gram négatif
Spiramycine (100 µg)	La spiramycine inhibe la synthèse protéique bactérienne par fixation au ribosome bactérien.	Les infections causées par des bactéries.

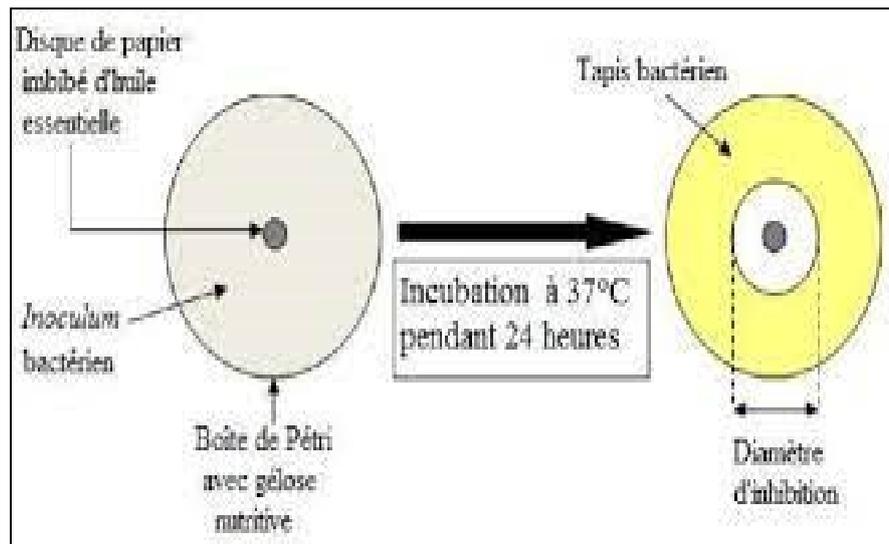
L'antibiogramme a été réalisé selon les recommandations de CLSI (2006) sur des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre coulées par la gélose Muller–Hinton (Liofilchim®, Italie). Les boîtes sontensemencés par écouvillonnage à partir de suspensions préparées, puis les disques d'antibiotiques sont déposés sur la surface de la gélose et mise en incubation à 37 °C pendant 24h. L'interprétation des résultats est effectuée par la mesure des zones d'inhibitions après l'incubation (photo 6).



**Photo 6 :** Principe de l'antibiogramme

➤ **La méthode de diffusion par disque**

La méthode de diffusion par disque a été utilisée pour tester l'activité antibactérienne de l'HE telles que décrites précédemment par CLSI (1997) avec des légères modifications. Brièvement, les disques de papiers buvards stériles (6 mm) ont été imbibés par 15 µL d'HE (brute) et déposés à la surface de milieu Muller hinton préalablementensemencés par les suspensions bactériennes préparées. Les boîtes de Pétri étaient incubé pendant 2 h à 40°C pour favoriser la diffusion, puis conservé à 37°C pendant 24h. Après incubation, les zones d'inhibition observées ont été mesurées (mm). Les antibiotiques spiramycine 100 µg et Oflatoxine 5µg (Liofilchem®.Italie) ont été utilisés comme temoins positives. Chaque essai a été réalisé en triple (figure 9).



**Figure 9 :** La méthode de diffusion par disque.

➤ **Evaluation de l'effet synergique entre l'huile essentielle et les antibiotiques**

Après l'inondation des boîtes de Petri par les suspensions bactériennes qui sont testés à l'activité antibactérienne ; des disques de huit antibiotiques conventionnels (deux de chaque) sont déposés à la surface des géloses Muller Hinton. Ensuite, nous avons ajouté à chaque disque d'antibiotique, 5  $\mu\text{L}$  d'huiles essentielles préalablement brute. Les boîtes de Pétriensemencées ont été laissées 1 heure à température ambiante puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures. Après l'incubation, le diamètre d'inhibition a été mesuré en millimètres où le diamètre de disque est inclus. La combinaison a été considérée comme synergique lorsque le diamètre d'inhibition est supérieur à celle trouvée par l'antibiotique seul (Ahmad et *al.*, 2007 ; Fadli, 2014).

➤ **Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)**

La CMI a été déterminée par la méthode de micro-dilution dans des microplaques 96 puits (CLSI, 2015). La solution mère de l'huile essentielle a été diluée dans le DMSO à 10 %, suivie par une série de dilutions sur puits qui sont préalablement remplis par 100  $\mu\text{L}$  de bouillon Mueller-Hinton pour atteindre à des concentrations finales d'HE de 1 à 6  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Ensuite, 10  $\mu\text{L}$  de la suspension bactérienne préparée ont été ajoutés.

Les plaques ont été incubées à 37°C pendant 24 heures. La CMI a été définie comme étant la plus faible concentration de l'huile essentielle entraînant une inhibition complète de croissance visible après incubation. Les tests ont été effectués en triple.

### 2.3.2. Etude de l'activité antifongique

#### ➤ Provenance des souches étudiées

L'activité antifongique des huiles essentielles de plantes étudiées a été évaluée contre des champignons filamenteux. Cinq morphotypes différentes de l'espèce *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* responsable de la fusariose vasculaire du palmier dattier (le bayoud) (Djerbi et al., 1985), d'où nous avons isolé une souche à partir des rachis d'un palmier dattier infectée de la zone de Mazer de la Wilaya de Beni abbes, puis elle est purifiée et identifiée moléculairement par le PCR. Les autres souches FOA ont été fournies par le laboratoire VERVSA de l'université de Béchar, collectées par (Mezouari, 2020).

D'autre support fongique retenu pour cette étude est constitué par des souches mycotoxinogènes isolées des aliments de bétail (en cours de publication). Ces souches ont été fournies par le VERVSA de l'université de Béchar : *Byssochlamys spectabilis*, *Penicillium expansum*, *Arthrimum sp.*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium sp.*, *Talaromyces funiculosus*, *Aspergillus niger*, *Bipolaris sorokiniana*.

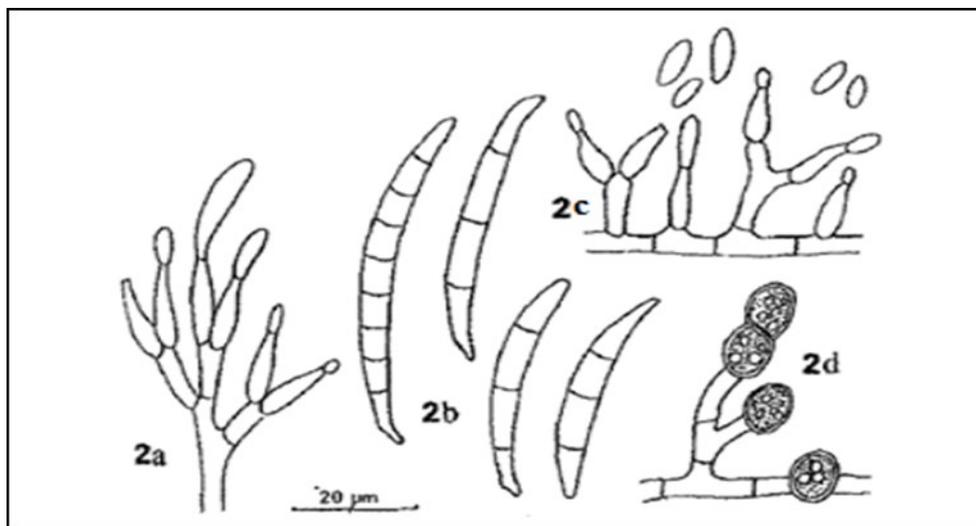
#### ➤ Isolement du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* à partir des rachis infectés

L'isolement, la caractérisation et la maintenance de la culture de *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* ont été l'objet de nombreuses études (Snyder et Hansen, 1972). Bien qu'il soit facile d'obtenir des souches cultivables à partir des fragments de rachis des feuilles de palmier qui présentent des symptômes vasculaires, il est très difficile de préserver le type originel de la colonie (ce qu'on appelle encore le type sauvage). En effet, la forme sauvage montre beaucoup des caractéristiques culturelles instables dans des conditions normales et produit rapidement des mutants. En culture, *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* forme un mycélium fin, clair et bouclé qui produisent de petites sporodochies rose orangé (figure 8). Des sclérotes bleus à noirs naissent parfois dans le moyen. Ils sont soit dispersés dans le mycélium, soit forment parfois des groupes.

Le protocole d'isolement a été inspiré de celui utilisé par Djerbi (1990). Après la collecte des rachis, la procédure consiste à stériliser en surface des morceaux infectés de 3 cm longitudinalement de tissu vasculaire décoloré provenant des feuilles dans l'éthanol à 50 % pendant 1 min, rincer à l'eau et incuber à 25 °C sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA) acidifié.



**Photo 7 :** Les symptômes du bayoud apparaissent sur une ou plusieurs feuilles de la couronne médiane.



**Figure 10 :** Caractéristiques du *Fusarium oxysporum* : 2a -macrophialides ; 2b macroconidies ; 2c -microphialides et microconidies 2d- chlamydospores (Botton et *al.*, 1985).

#### ➤ Purification des souches

Après 07 jours d'incubation, des hyphes mycéliens apparaissent au tour de chaque petit fragment de rachis infecté. Des explants de la zone périphérique du mycélium ne présentant aucune contamination, ainsi que ces taches blanches, sont prélevés et transférés (d'une manière aseptique) sur d'autres boites de Pétri contenant le milieu PDAA. Ces repiquages sont renouvelés plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'une culture pure. On a tenu en compte dans notre choix tous les aspects macroscopiques que la souche peut présenter à savoir, la couleur des pigmentations, la forme et l'aspect général du mycélium dans un souci d'avoir le maximum de souches variées (Henni et *al.*, 1998).

➤ **Conservation des isolats**

Les souches purifiées ont été conservées en double sur le milieu PDA inclinés pour l'utilisation en routine en court durée ou sur le glycérol à -80°C pour un stockage à long terme (Mezouari, 2020).

➤ **Identification moléculaire de la culture de *F. oxysporum* isolée**

Une paire d'amorces (TL3-FOA28) et (BIO3-FOA1) ont été mise au point par Fernández et al. (1998) pour le diagnostic de cultures pures de FOA par PCR. Ce test permet de différencier la forme pathogène du palmier-dattier avec les autres formats spéciaux de *F. oxysporum*, ainsi que des souches saprophytes.

Les séquences d'amorces sont : 3' GGTCGTCCGCAGAGTATACCGGC-5' (TL3) et 3'-ATCCCCGTAAAGCCCTGAAGC-5' (FOA28) pour la première amorces et (3'CAGTTTATTAGAAATGCCGCC5') (FOA1) et (5'GGCGATCTTGATTGTATTGTGGTG3') (BIO3) pour la deuxième. L'ADN fongique doit être extrait d'une culture de *F. oxysporum* selon (Fernández et al., 1998) ou par une méthode standard d'extraction de l'ADN des champignons. Le mélange de réaction doit contenir 25µl partagé en : 1,5 µl MgCl<sub>2</sub> de 1.5 mM ; 0.25 µl dNTP de 0.2 mM; 2 µl (de chaque) des deux amorces de 0.5 mM; 1 µl d'ADN génomique; 2.5 µL de tampon de réaction concentré 10 fois; 0,2 µl unités de Taq polymérase de 0.5 mM et 15.55 µl de l'eau bidistillé. Un témoin négatif (sans ADN cible) doit être inclus dans chaque expérimentation pour tester la contamination, ainsi qu'un témoin positif (ADN d'une souche de référence du pathogène). L'amplification doit être conduite dans un thermocycleur programmé comme suit: 1 cycle de 4 min à 95 °C suivi de 30 cycles de 30 s à 92 °C, 30 s à 62 °C, 45 s à 72 °C. Après ces 30 cycles, conduire un cycle de 15 min à 72 °C. Après l'amplification, 8 µL du mélange de réaction sont chargés sur un gel d'agarose à 1,4%, séparés par électrophorèse, colorés au bromure d'éthidium, et observés et photographiés en lumière UV. L'ADN de la souche de référence du champignon (témoin positif), mais pas le témoin négatif, doivent produire un amplicon de 400 pb et d'autre de 200 pb. Les isolats de *F. oxysporum* produisant un amplicon de cette taille doivent être identifiés comme étant f. sp. *Albedinis*.

➤ **Confirmation des souches testées**

**A- Etude des caractères macroscopiques**

Les caractères culturaux sont observées sur un milieu PDA, car les milieux très riche en sucre et en peptone entraînent des phénomènes de polymorphisme, les colonies peuvent

perdre leur aspect caractéristique et ne pas sporuler (Guiraud, 1998). Les caractères culturaux ainsi remarquées sont : Vitesse de croissance, Couleur des colonies et variation des couleurs en fonction du temps, Structure du thalle, Couleur de l'envers des colonies, Couleur et changement de couleur du milieu, Présence de gouttes de transpiration sur le mycélium aérien (exsudat), Odeurs.

### B- Etude des caractères microscopiques (technique de microculture)

Décrite par (Harris, 1989), La méthode de microculture sur lame est une méthode rapide de préparation des colonies fongiques pour l'examen et l'identification avec le moins de perturbation possible.

Les champignons sont inoculés dans les périphéries des petits carrés de milieu PDA<sub>a</sub>, dont recouverts d'une lamelle, l'ensemble est conditionnée dans une chambre stérile et humide puis incubée à  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 5 à 7 jours. Après incubation, la lamelle est retirée du carré de gélose et placée sur une autre lame à laquelle on ajoute un colorant, tel que le lactophénol bleu coton, puis elle est mise à l'observation microscopique aux grossissements 10,  $\times 40$ ,  $\times 100$ . L'identification des champignons dépend en grande partie de leurs caractéristiques microscopiques (arrangement des spores et corps sporulants), La disposition des conidiophores et la manière dont les spores sont produites (ontogénie des conidies) aident à l'identification précise des champignons filamenteux (photo 12).

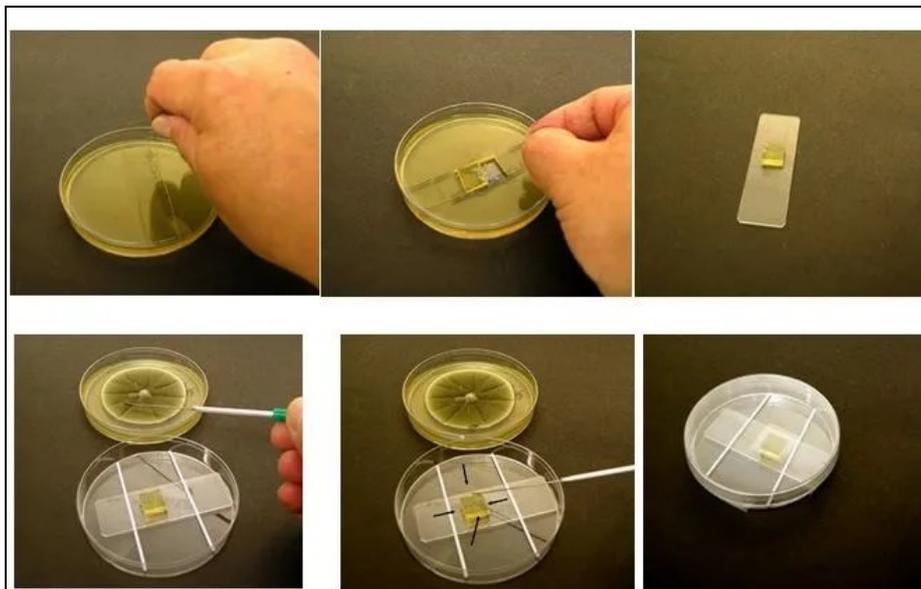


Photo 8 : la méthode de micro-culture

## ➤ Evaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle

### A- Évaluation de la croissance radiale sur milieu solide

Les souches fongiques ont été cultivées à 28 °C pendant 5 à 7 jours. À l'aide d'une pipette pasteur et à partir d'une culture jeune de 7 jours, les spores de la souche testée ont été mises en suspension à base de l'eau physiologie ajouté de 0,5 ml de Tween 80. Le mélange est ensuite agité vigoureusement à l'aide d'un vortex afin de mettre en suspension le contenu sporal. Les HEs ont été dissous dans le DMSO à 10 % pour obtenir différentes concentrations (100, 10 et 1 µl/mL). L'effet des HEs des deux plantes étudiés sur la croissance mycélienne radiales ont été évalués selon le protocole inspiré par (Bomfim et *al.*, 2015). 1.5 ml de chaque concentration des HEs ont été dispersés sous forme d'émulsion dans du DMSO à 10 % et ajouté immédiatement au 13.5 ml milieu PDA maintenue en surfusion.

Les mélanges PDA mixtes ont été coulés dans les boîtes de Pétri pour obtenir des concentrations finales d'HE à 10, 1 et 0.1 µl/mL. Un mélange de PDA mixte avec du DMSO à 10 % a été utilisé comme témoin négatif. Ensuite, on a inoculé au centre de ces boîtes l'inoculum. Les boites sont incubées à 28 °C pendant 5 à 7 jours. Le diamètre en (mm) de la croissance du mycélium fongique a été mesuré à partir du centre vers le bord de la colonie, et chaque une a été mesurée en triple. L'effet antifongique des HEs sur la croissance mycélienne a été présenté comme pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne (%) et calculé selon la formule suivante (Farzaneh et *al.*, 2015) :

$$Inhibition \% = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Où : **C** est la moyenne (mm) du diamètre de la colonie pour le groupe témoin, et **T** est la moyenne du diamètre de la colonie pour le groupe traité (mm).

Lorsque pour une concentration donnée, il n'y a aucune croissance mycélienne observée, le germe est repiqué sur un milieu gélosé dépourvu d'HE. Une reprise de la croissance traduit un effet fongistatique et l'absence de croissance un effet fongicide.

### B- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par méthode M38-A de micro dilution du bouillon

La méthode de microdilution en milieu liquide dans des plaques 96 puits est décrite selon les normes de Standardisation Américaine de la Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI (Espinell-Ingroff et *al.*, 2007). Brièvement, des suspensions sporales ont été

préparées à partir de cultures jeunes, et des solutions mères des huiles essentielles ont été préparées à 100 µl/mL dans DMSO à 10 %. Des dilutions en série au double des solutions mères dans un bouillon PDB sont ajoutées sur les puits de la plaque. Puis 20 µl de la suspension fongique préparée a été ajouté à chaque puit à l'aide d'une micropipette. Pour chaque souche, les conditions de croissance et la stérilité du milieu ont été contrôlées dans les colonnes 10 et 11 (puits témoins) et un témoin positif par l'antifongique fluconazole. Les plaques sont incubées pendant 3 jours à 28° C. Les CMI ont été déterminées comme étant les concentrations les plus faibles où on n'a pas une croissance visible. Toutes les expériences ont été réalisées en double.

La lecture des résultats ce fait comme suite :

Après l'incubation, on a ajouté 30 µl de paraïodonitrotétrazolium (TTC) dans chaque puit, suivi d'une incubation à 30°C pendant 2 heures. La lecture a été effectuée à l'œil nu et la CMI a été définie comme étant la plus petite concentration d'huile pour laquelle il n'ya pas eu apparition d'une coloration rose.

### **3. Analyses statistiques**

Tous les résultats expérimentaux ont été soumis à une analyse de la variance (ANOVA) à l'aide du logiciel SPSS (version 11.5). Les moyennes et l'erreur standard a été calculées et un niveau de probabilité de  $P < 0,05$  a été utilisé pour tester la signification statistique de toutes les données. Le test post hoc de Tukey a été utilisé pour déterminer la signification des valeurs moyennes pour la comparaison multiple à  $P < 0,05$ .

# **RESULTATS & DISCUSSION**

## I. *Rhetinolepis lonadioides* Coss.

*Rhetinolepis lonadioides* Coss est une plante endémique pousse à l'état spontané dans la région de Saoura (Algérie). Pour le meilleur de notre connaissance, aucune étude n'est réalisée sur la composition chimique de l'huile essentielle de cette espèce. Pour cela, la récolte de cette plante a été réalisée en Avril (période de floraison) dans deux stations de la région de Saoura : Taghit (5 échantillons) et Beni Abbes (5 échantillons).

### I.1 Rendements en huiles essentielles de *Rhetinolepis lonadioides* coss.

Les échantillons d'huiles essentielles ont été obtenus par l'hydrodistillation des parties aériennes sèches de *R. lonadioides* Coss. Le rendement en huile essentielle, calculés par rapport à la matière sèche (p/p), varie entre 0,90 % et 1,40 %. Ces rendements sont nettement plus importants que celle trouvés par d'autres espèces du même genre, telque *Anthemis nobilis* L. qui a été donne un rendement de 0,67% (Sadiki et Idrissi, 2019), *Anthemis maritimade* Corse (0,015%) (Collu et al., 2008) et *Anthemis cretica sub sp. carpatica* (0,22%) (Kürkçüoğluand et Tosun, 2020). En effet, le rendement d'une HE dépend de plusieurs facteurs (stade de croissance, conditions pédoclimatiques, techniques d'extraction, etc.) (Masotti et al., 2003 ; Angioni et al., 2006).

### I.2. Analyse des huiles essentielles *Rhetinolepis lonadioides* Coss.

L'analyse détaillée d'un échantillon brute a été réalisée par une combinaison de (CPG-Ir) et la spectrométrie de masse (SM). Des spectres des huiles essentielles sont enregistrés, et les valeurs des déplacements chimiques sont comparées à celles des composés de référence présents dans une bibliothèque de spectre grâce a un logiciel d'aide à l'identification. Elle nous a permis d'identifier trente-six composés (25 monoterpènes, 4 sesquiterpènes et 2 polyterpènes) représentant 80,00% de l'ensemble de la composition chimique globale (tableau 4). Cette huile essentielle est riche en monoterpènes avec un pourcentage de 68,33 %.

La fraction de monoterpènes hydrocarbonés (53,94%) était principalement représentée par le  $\beta$ -Pinène (41,85 %). D-Limonène (6,79%),  $\alpha$ -Fenchene (3,64 %) et  $\alpha$ -Pinène (1,01 %). les sesquiterpènes hydrocarbonés (7,99%) étaient représentés par (E)-.beta.-Famesène (3,19%) et. L' $\alpha$ -Curcumène (1,63 %), tandis que le m Camphorène (5,43 %) était le seul hydrocarbure diterpénique présent en quantité significative ( $P < 0,05$ ). De plus, cette huile essentielle se caractérise par la présence d'acides oxygénés sesquiterpène de, Eudesm-7(11)-en-4-ol (0.47%) et Nérolidol (0,17%). Le spectre de l'huile essentielle de *R. lonadioides* de cet échantillon est reproduit sur la figure 11.

**Tableau 4 :** Composés identifiés dans l'huile essentielle de *Rhetinolepis lonadioides* Coss. Avec leur temps de rétention correspondant par CG-SM.

	<b>Composés</b>	<b>RI</b>	<b>RI<sup>c</sup></b>	<b>T.R<sup>d</sup></b>	<b>Area%</b>
		<b>lit<sup>b</sup></b>			
1	styrene	870	890.94	6.09	0.11
2	$\alpha$ -Pinene	930	931.67	7.61	1.01
3	$\alpha$ -Fenchene	959	977.81	9.50	3.64
4	$\beta$ -Pinene	972	980.00	10.93	<b>41.85</b>
5	$\alpha$ -Terpinene	1017	1020.18	11.52	0.03
6	D-Limonene	1018	1031.44	12.13	<b>6.79</b>
7	beta.-Ocimene	1041	1048.07	13.04	0.12
8	$\gamma$ -Terpinene	1047	1057.99	13.58	0.07
9	Terpinolene	1080	1087.93	15.22	0.32
10	Hotrienol	1115	1116.63	16.91	0.12
11	.D-Camphor	1141	1140.76	18.42	0.22
12	Borneol	1148	1149.66	19.78	0.10
13	$\alpha$ -Terpineol	1172	1188.40	21.39	0.25
14	Bornyl acetate	1285	1284.58	27.57	2.04
15	Guaiacol <4-vinyl->	1293	1310.99	29.26	0.13
16	Myrtenyl acetate	1314	1324.01	30.08	0.32
17	$\delta$ -Elemene	1334	1335.83	30.83	0.05
18	Methyleugenol	1402	1400.65	35.15	0.82
19	Caryophyllene	1421	1416.21	35.87	1.07
20	$\alpha$ -Humulene	1454	1449.75	37.90	0.06
21	(E)- $\beta$ -Famesene	1448	1458.38	38.42	3.19
22	$\beta$ -Selinene	1469	1467.02	38.95	1.61
23	$\alpha$ -Curcumene	1472	1478.90	39.67	1.63
24	$\alpha$ -Farnesene	1499	1508.29	41.43	0.24
25	$\delta$ -Cadinene	1514	1511.44	41.61	0.14
26	Nerolidol	1605	1564.00	47.20	0.17
27	$\alpha$ -Bisabolol	1683	1681.11	51.19	0.14
28	Eudesm-7(11)-en-4-ol	1681	1686.59	51.49	0.47
29	Ethanone, 1-[1,1'-biphenyl]-4-y	1716	1739.56		2.66

30	NI	-----	1793.37	57.12	5.26
31	NI	-----	1817.50	58.34	<b>6.93</b>
32	Phenanthroquinone	1880	1867.70	60.85	<b>10.39</b>
33	NI	-----	1890.70	62.00	0.52
34	Farnesylacetone	1895	1897.07	62.32	0.24
35	m-Camphorene	1944	1954.24	65.05	<b>5.43</b>
36	$\alpha$ -Springene	1969	1969.42	66.59	1.85
Hydrocarbon monoterpenes					53.94%
Oxygenated monoterpenes					14.39%
Hydrocarbon sesquiterpenes					7.99%
Oxygenated sesquiterpenes					3.68%
Hydrocarbon diterpenes					7.28%
Total identified (%)					80.00%

Notes:

<sup>a</sup>L'ordre d'éluion et les pourcentages des composants individuels sont donnés sur une colonne apolaire (DB-5).

<sup>b</sup>RI lit, indices de rétention repris dans la littérature, (Adams, 2017), <sup>c</sup>RI : Indice de rétention calculé à partir des temps de rétention relatifs, <sup>d</sup>RT : temps de rétention.

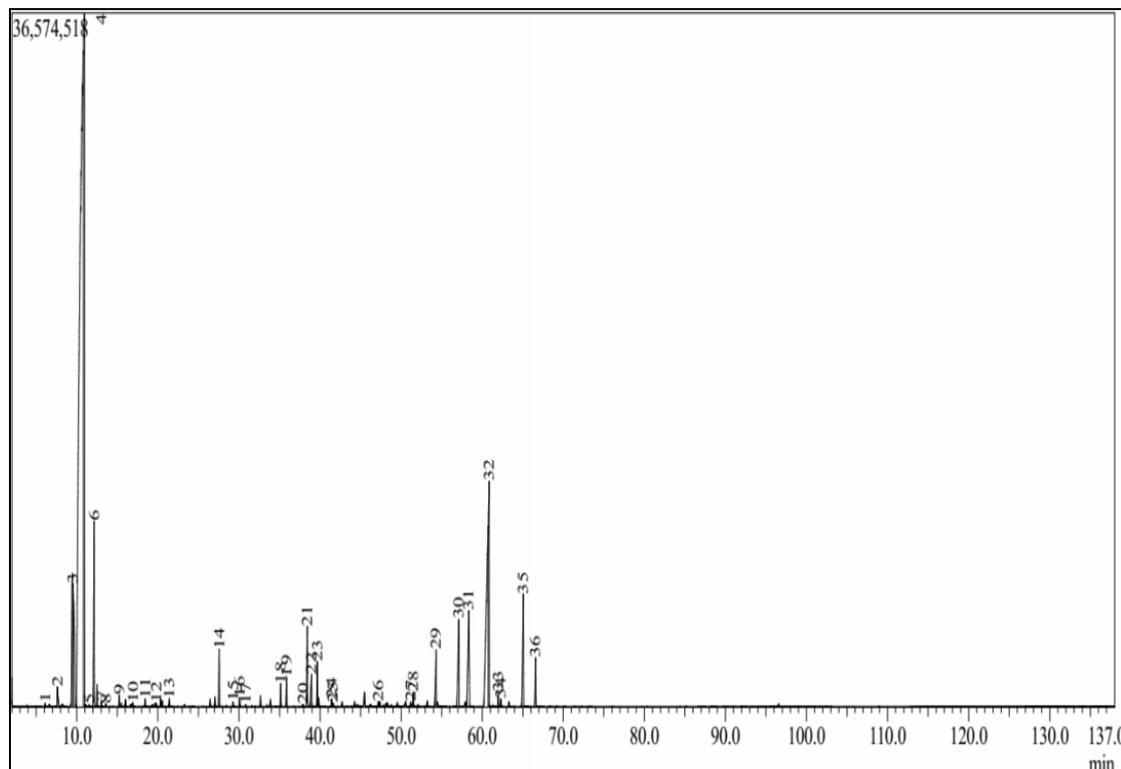


Figure 11 : Spectre de l'huile essentielle de *R. lonadioides*.

D'après nos résultats, la composition de l'huile essentielle isolée de *R. lonadioides* algérien diffère ( $P < 0,05$ ) de celles des autres espèces d'*Anthemis* dominées par les composés

oxygénés, *A. montana* ( $\alpha$ -Thujone 46,9%,  $\beta$ -Thujone 16%, Trans chrysanthemyl 11,3 %) (Bulatovic et al., 1998) ; *A. tinctoria* L. (1,8 cinéole 7,9 %,  $\beta$ -Pinène 7,3 %,  $\alpha$ -Pinène 4,4 %) (Holla et al., 2002) et *A. talyshensis* A. ( $\alpha$ -Eudesmol 18,2 %, Bornéol 13,3 %, Acide hexadécanoïque 9,5 %) (Aghajani et al., 2005). En revanche, elle présente quelques analogies avec les huiles essentielles d'*Anthemis* qui contenaient des teneurs appréciables en hydrocarbures monoterpéniques : 2,4-Thujadiène,  $\beta$ -Pinène ou Paracymène. Par exemple, *A. melampodina* (Grace, 2002) contenait du  $\beta$ -Pinène (6,4 %) et du para Cymène (11 %), *A. altissima* (Javidnia et al., 2004) (2,4-Thujadiène à 27 % et  $\alpha$ -Pinène à 4 %) et *A. melanolepis* (Saroglou et al., 2005) ( $\beta$ -Pinène 11,7%).

Généralement, la différence de composition chimique de l'huile essentielle extraire de l'espèce étudié par rapport à d'autres provenant de différentes plantes d'*Arthemis* pourrait être attribuée à de nombreux facteurs tels que l'espèce végétale, la partie de la plante, les facteurs génétiques ainsi que les variations physiologiques, environnementales et géographiques (Dridi et al., 2020).

## II. *Pulicaria crispa*

Parmi les espèces de *Pulicaria* poussant à l'état spontané en Algérie, *Pulicaria crispa* qui pousse d'une manière abondante dans la région de Béchar.

L'huile essentielle des parties aériennes de cette plante est d'odeur agréable, de couleur jaunâtre et d'aspect liquide. Elle a fait l'objet de plusieurs études en Egypte, Saudi Arabia, Kuwait, Iraq, Iran, Pakistan, Inde, Afghanistan et des parties de nord et sud d'Afrique. Ces auteurs rapportent qu'une différence de composition chimique d'une zone à autre avec des pourcentages variable de ces composés majoritaires.

Boumaraf et al. (2016) ont été étudié l'huile essentielle de *pulicaria crispa* collecté dans la région de Djanet (Tassili) wilaya d'Ilizi en Algérie. 31 composants ont été identifiés représentant d'environ 68,4% de l'huile essentielle de la plante, dont 74,3 % des composés oxygénés. Le principal les constituants étaient la carvotanacétone (14,8 %) suivi par  $\delta$ -cadinène (8,2%) et  $\alpha$ -cadinol (4,7%).

### II.1 Rendements en huile essentielles de *P. crispa*

L'huile essentielle obtenue par hydrodistillation de *P. crispa* est de couleur jaune pale avec une odeur forte, d'un rendement variant de 0 ,1% à 0,3%. Ces rendements est proche de

ceux cités dans plusieurs travaux dans des autres régions de récolte, avec 0.32% par (Nematollahi et *al.*, 2006), 0.23% (S. S. Ahmed et Ibrahim, 2018), 0.1% (Ebtihal Alsadig et *al.*, 2020) ; (Sahar et Waad, 2022). Certaines études ont montré un rendement supérieur par rapport à notre résultat trouvés atteint jusqu'à 0.50 % (Ravandeh et *al.*, 2011), 0.7 % (Javadinamin et *al.*, 2014) ,0.8% (Ross et *al.*, 1997), 1.2 % (Boumaraf et *al.*, 2016), 2.5 % (EL-Kamali et *al.*, 2009).

Le rendement en huile essentielle de cette espèce est relativement faible par rapport aux d'autres espèces du même genre. Gherib et *al.* (2016) ont cité que l'HE de *Pulicaria mauritanica* a donné un rendement de (0.35-1.44%). D'autre, Ezoubeiri (2005) ont trouvé 0.6–0.8% de la plante *Pulicaria odora*, et un rendement proche à *Pulicaria gnaphalodes* avec 0,1 % par (Davoud et *al.*, 2013).

## II.2. Analyse des huiles essentielles *P. crisper*

Cinquante-quatre composés ont été identifiés représentant la majorité de l'huile essentielle de *Pulicaria crisper* (tableau 5). Les principaux constituants de l'huile de *P. crisper* sont le Caryophyllene E (40.5 %), Caryophyllene oxide (11.12 %), Neryl isobutanoate (4.94 %), Humulene <alpha-> (3.26 %), et Nerolidyl acetate (3.11 %). L'huile essentielle de *P. crisper* regroupés en six groupes qui sont le groupe des hydrocarbures monoterpéniques (HMT) %, le groupe des monoterpènes oxygénés (MTO) %, le groupe des hydrocarbures sesquiterpéniques % (HST) et le groupe des sesquiterpènes oxygénés (STO%), le groupe des hydrocarbures diterpénique (HDT) % et le groupe des diterpènes oxygénés (DTO) %. Les données dans le même tableau (tableau 5) indiquent que le HST a donné les concentrations les plus élevées (45,96%), suivi par STO (32.96%), MTO (15.57%), DTO (4.45%), HDT (0.85%) et HMT (0.21%). Le groupe (HST) inclus en plus le composé majoritaire Caryophyllene E, des autres constituants en faible proportion : Humulene <alpha->, Alloaromadendrene, Caryophyllene Z et Santalene<beta-, epi. Les constituants majeurs des autres groupes sont : Caryophyllene oxide pour le (STO), Neryl isobutanoate pour le (MTO), Phytol pour le (DTO), Hexacosane le seul composé du groupe (HDT) et le Limonene comme le composé unique du groupe (HMT) avec une proportion de 0.21%.

**Tableau 5 :** Composés identifiés dans l'huile essentielle de *Pulicaria crispata* avec leur temps de rétention correspondant par CG-SM.

	Composés	RI litb	RIc	T.Rd	Area%
1	Hexanal		800	4.646	0.06
2	Hex-2(E)-enal		848	6.029	0.09
3	1-Octen-3-ol		978	10.623	0.18
4	Limonene		1028	12.749	0.21
5	Linalool		1099	15.994	<b>2.41</b>
6	Nonanal		1104	16.190	0.34
7	Terpineol <alpha->		1190	20.201	0.63
8	Decanal		1205	20.920	0.15
9	Nerol		1228	21.955	0.57
10	Geraniol		1254	23.155	0.45
11	2H-1-Benzopyran, 3,4,4a,5,6,8a-hexahydro- 2,5,5,8a-tetramethyl-, (2.alpha.,4a.alpha.,8a.alpha.)-		1288	24.694	0.5
12	Theaspirane		1316	25.897	0.28
13	Jasmone <(Z)>		1398	29.493	0.33
14	Caryophyllene Z		1408	29.899	0.21
15	Caryophyllene E		1425	30.569	<b>40.05</b>
16	Santalene <beta-, epi->		1449	31.575	0.14
17	Geranylacetone		1453	31.751	1.53
18	$\alpha$ -Humulene		1455	31.839	<b>3.26</b>
19	Alloaromadendrene		1485	33.062	<b>2.3</b>
20	Neryl isobutanoate		1491	33.318	<b>4.94</b>
21	Lavandulyl isobutyrate		1511	34.090	0.87
22	Geranyl isobutyrate		1514	34.225	0.41
23	Caryophyllene oxide		1554	35.790	1.43
24	5-Oxatricyclo[8.2.0.04,6]dodecane, 4,12,12- trimethyl-9-methylene-, (1R,4R,6R,10S)-		1560	36.033	1.02
25	Nerolidol		1565	36.212	<b>2.46</b>
26	Nerolidyl acetate		1578	36.707	<b>3.11</b>
27	Caryophyllene oxide		1586	37.033	<b>11.12</b>

28	Humulene epoxide II	1611	37.993	0.36
29	2-(1-Cyclohexen-1-yl) cyclohexyl acetate	1620	38.322	0.86
30	Geranyl tiglate	1628	38.602	0.49
31	Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5.alpha.-ol	1635	38.863	0.58
32	Alloaromadendrene oxide-(1)	1638	39.003	1.84
33	Muurolol <alpha-, epi->	1643	39.167	<b>2.49</b>
34	α.-Cadinol	1656	39.669	0.43
35	Isoaromadendrene epoxide	1660	39.783	0.41
36	Alloaromadendrene oxide-(2)	1673	40.285	1.46
37	Geranyl tiglate	1682	40.619	0.52
38	6-Isopropenyl-4,8a-dimethyl-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-naphthalen-2-ol	1712	41.688	0.73
39	Benzyl Benzoate	1764	43.548	0.28
40	Pentacyclo [8.4.0.0(3,7).0(4,14).0(6,11)] tetradecane	1862	46.891	0.29
41	Phthalic acid, 2,7-dimethyloct-7-en-5-yn-4-yl isobutyl ester	1867	47.066	0.58
42	Bicyclo [4.4.0] dec-6-en-9.beta.-ol, 1,7-dimethyl-4.alpha.-isopropenyl-	1888	47.761	0.27
43	5,9,13-Pentadecatrien-2-one, 6,10,14-trimethyl-, (E,E)-	1919	48.769	0.31
44	n-Hexadecanoic acid	1963	50.183	1.28
45	1H-Imidazole, 1-[(4-methylphenyl) sulfonyl]-	1986	50.932	0.4
46	(-)-Spathulenol	1990	51.039	0.84
47	Propanoic acid, 2-methyl-, 2-[3-[(acetyloxy)methyl]oxiranyl]-5-methylphenyl ester	2031	52.325	0.45
48	2(3H)-Furanone, 5-dodecyldihydro-	2101	54.474	0.39
49	Phytol	2113	54.824	<b>2.43</b>
50	(7-Methylcyclopenta[c]pyran-4-yl)methyl 3-methylbutanoate	2120	55.027	0.66
51	Linolenic acid	2138	55.557	0.31
52	(12Z)-abienol	2179	56.743	0.3

53	Hexacosane	2700	70.408	0.85
54	Nonacosane	2900	74.999	1.14
	Hydrocarbon monoterpenes			0.21%
	Oxygenated monoterpenes			15.57%
	Hydrocarbon sesquiterpenes			45.96%
	Oxygenated sesquiterpenes			32.96%
	Hydrocarbon diterpenes			0.85%
	oxygenated diterpenes			4.45%
	Total identified (%)			100%

Notes:

<sup>a</sup>L'ordre d'éluion et les pourcentages des composants individuels sont donnés sur une colonne apolaire (DB-5).

<sup>b</sup>RI lit : indices de rétention repris dans la littérature, (Adams, 2017), <sup>c</sup>RI: Indice de rétention calculé à partir des temps de rétention relatifs, <sup>d</sup>RT : temps de rétention.

Il a été observé qu'il existe des différences significatives dans la composition de l'huile essentielle de *P. crispera* collecté dans la zone de Béchar en Algérie à celle trouvés par la même espèce dans d'autres zones du monde. Ross et al. (1997), ont montré que le composé majorde *P. crispera* est S-Carvotanacetone avec un pourcentage de 93%, suivi de Linalool (3.5%). Il existe quelque analogies de composés mais avec des proportions différentes comme : Hexenal<2->, Limonene, Terpeneol <alpha->, Cis-Jasmone,  $\beta$ -Caryophyllene. Tandis que, (Ali et al., 2012) ont trouvé que le constituants majeure est le Carvotanacetone avec un taux de 91.4% suivi par 2,5-Dimethoxy-p-Cymene (2.6%). Les travaux de (Nematollahi et al., 2006) de *P. crispera* collecté à Téhéran de Iran, résultent d'environ 88,5% de monoterpènes, dont  $\alpha$ -Pinène (45,7%), 1,8-Cinéole (27,1%), et environ 3,1% de sesquiterpènes, avec Aromadendrone (0,5%) et  $\gamma$  Cadinène (0,5 %) comme composants principaux. (Ravandeh et al., 2011) ont cité que l'analyse GC/MS de l'huile a révélé la présence d'hydrocarbures monoterpènes (14,51%), monoterpènes oxygénés (54,41%), hydrocarbures sesquiterpènes (29,20%), sesquiterpènes oxygénés (1,14%) et (1,41 %) que d'autres composés. Le principal composant monoterpène était le 4-terpinéole (20,12%). En Algérie, et plus précisément dans la région d'Illizi, (Boumaraf et al., 2016) ont été identifiées 31 composés représentant environ 68,4% de l'huile essentielle totale de la plante, dont 74,3 % des composés oxygénés. Le principal constituant était la carvotanacétone (14,8 %) suivi du  $\delta$ -cadinène (8,2%),  $\alpha$ -cadinol (4,7%), thujanol (4,7%), épi- $\alpha$ -cadinène (3,4%), carvacrol (3,14%) et 14-hydroxy $\alpha$ -murolène (3,1 %).

D'autres études sur des espèces du genre *Pulicaria* ont révélé que la carvotanacétone s'accumule également comme composant majeur dans des espèces telles que *P. inuloides* et *P. jaubertii* du Yémen (respectivement 47,3 et 63,9%), *P. mauritanica* du Maroc (87,3%) et *P. jaubertii* d'Arabie Saoudite (98,6%) (Manel et al., 2016).

Ces différences résultantes de la composition chimique sont cohérents avec les études de Galambosi et al (1992) qui ont été proposé des chimiotypes de certaines plantes aromatiques basés sur les voies de biosynthèse dissemblables reflétant le contenu chimique des huiles essentielles formées sous différentes conditions (différentes régions). Par conséquent, les terpénoïdes en tant que produits naturels diffèrent constitutivement selon les régions avec des conditions différentes.

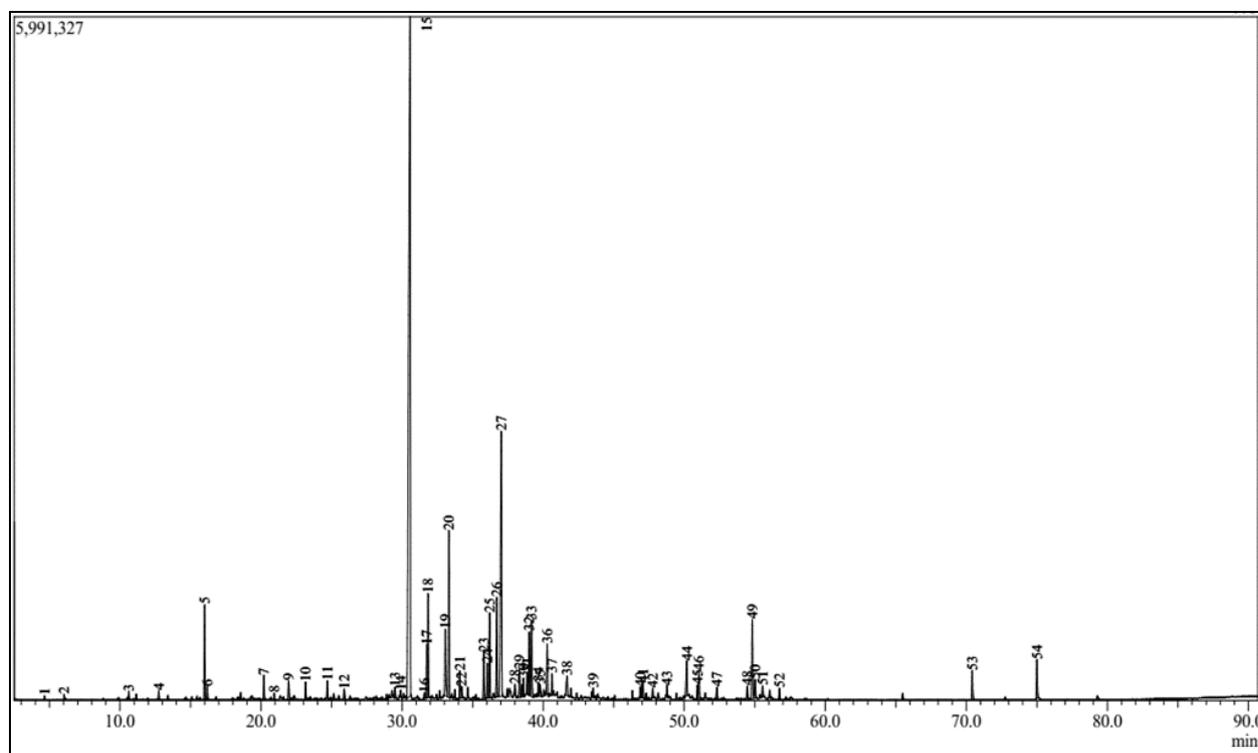
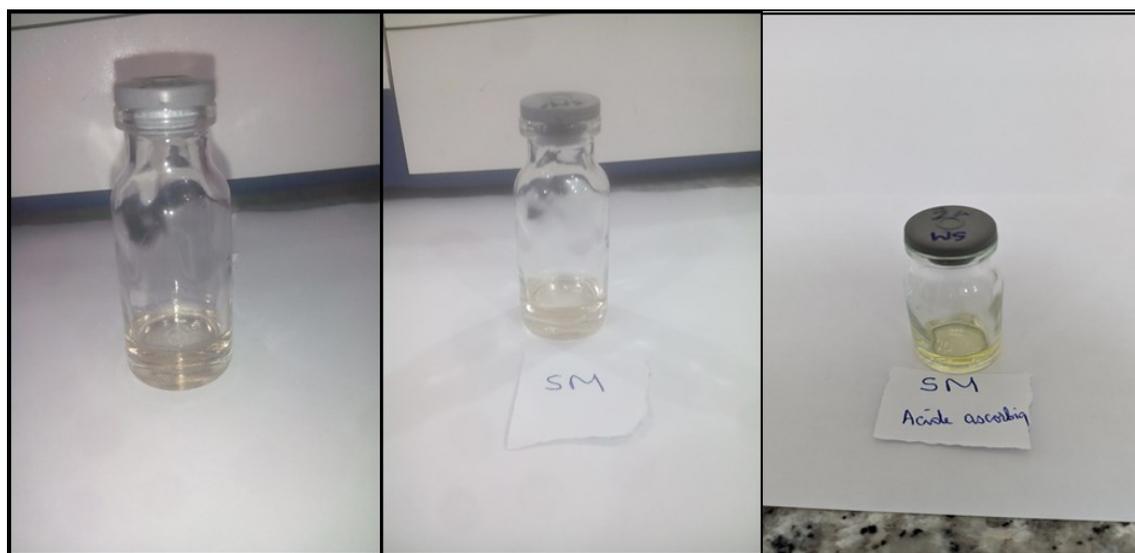


Figure 12: Spectre de l'huile essentielle de *P. crispa*.

## 2. Evaluation de l'activité antiradicalaire

L'activité antiradicalaire des HEs de la partie aérienne des plantes *Rhedinolepis lonadioides* Coss et *Pulicaria crispa* ont été évaluées par la méthode de piégeage du radical libre DPPH (photo 9), où la molécule bioactive a la capacité d'agir comme donneur d'atomes d'hydrogène dans la transformation du radical de DPPH dans sa forme réduite DPPH.-H. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de chaque huile essentielle et l'acide ascorbique (le standard). Les valeurs des absorbances obtenues nous ont permis de calculer les pourcentages d'inhibition.



**Photo 9 :** Résultats de piégeage du radical libre DPPH par les HEs et l'acide ascorbique (le standard) après l'incubation.

L'IC<sub>50</sub> se définit comme étant la concentration d'antioxydant requise pour diminuer 50% de concentration de DPPH initiale. Elle a été déterminée à partir des équations de régressions logarithmiques de courbes tracées illustrées dans les figures 13, 14 et 15 pour l'acide ascorbique et les huiles essentielles de *R. lonadioides* et *P. crispa* respectivement. Les résultats de CI<sub>50</sub> sont représentés dans le tableau 6.

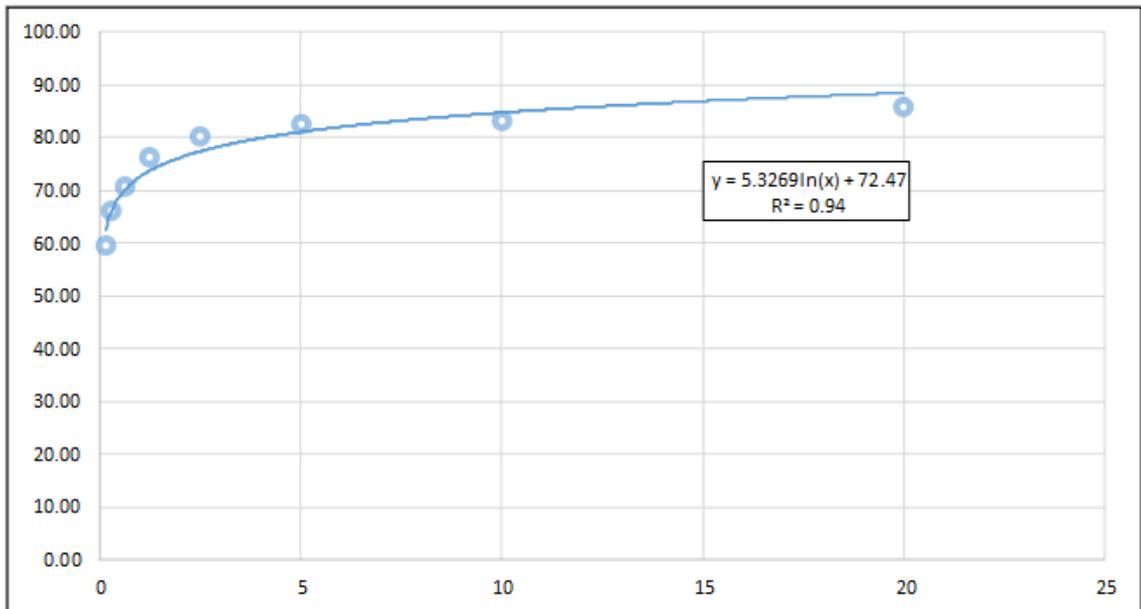
**Tableau 6 :** Les résultats de l'activité antioxydante des échantillons des HEs des plantes et l'acide ascorbique.

Les échantillons	Concentration (µg/mL)	Effet de piégeage sur le DPPH(%)	Concentration de l'IC 50 (µg/mL)
L'acide ascorbique	20	86.76	0.014
	10	80.93	
	5	73.36	
	2.5	61.94	
	1.25	56.74	

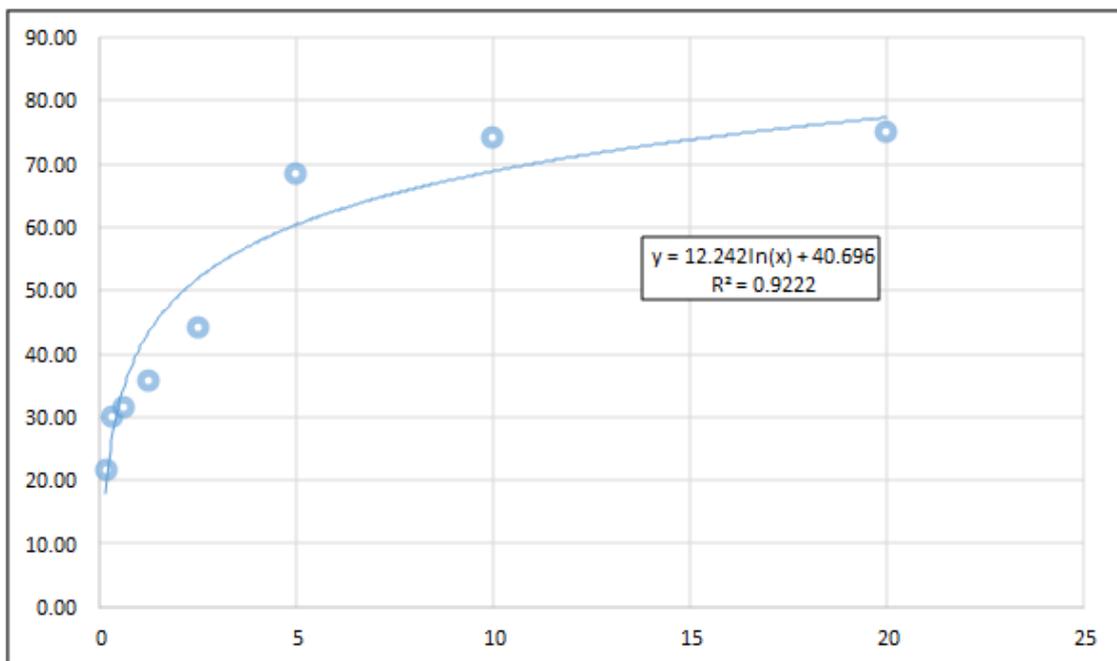
	0.625	48.94	
	0.312	45.94	
HE de <i>Rhetinolepis lonadioides</i> Coss.	20	75.18	2.13
	10	74.15	
	5	68.48	
	2.5	35.70	
	1.25	31.60	
	0.625	30.18	
	0.312	21.75	
HE de <i>Pulicaria crispa</i>	20	52.01	9.11
	10	50.35	
	5	48.23	
	2.5	33.96	
	1.25	29.94	
	0.625	22.85	
	0.312	8.04	

La capacité de piégeage de radicale libre de DPPH par les huiles essentielles des deux plantes a également augmenté avec l'augmentation de concentration. Les deux huiles essentielles ont montré un effet de piégeage important, avec des teneurs différents. L'effet le plus faible est de (8.04%) a été présenté par l'huile essentielle de *Pulicaria crispa*, à une concentration de 0.312 µg/mL, tandis que l'activité la plus forte (86.76%) a été présentée par l'acide ascorbique à une concentration de 20 µg/mL. Dans les mêmes concentrations testés auparavant, le taux d'inhibition ont été estimé à 75.18 % et 52.01 % pour les huiles essentielles de *Rhetinolepis lonadioides* Coss et *Pulicaria crispa* respectivement. Par conséquent, il était conclu que l'effet antioxydant de *Rhetinolepis lonadioides* Coss était supérieur à celle donné par *Pulicaria crispa*.

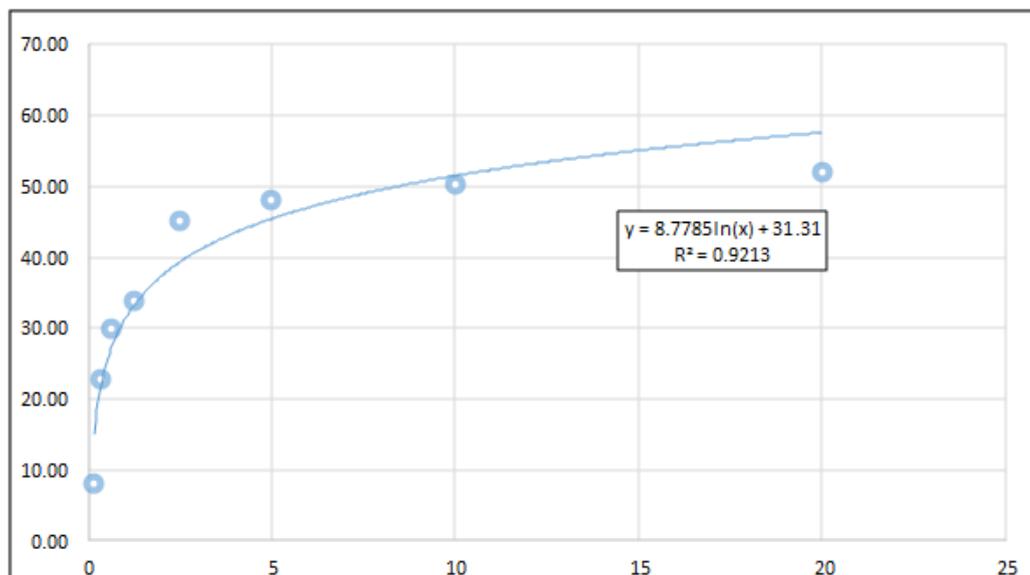
A titre de comparaison entre l'activité de piégeage du DPPH des huiles essentielles des échantillons testés et celles exprimées par l'acide ascorbique a montré que l'huile essentielle a été présenté un faible effet par rapport la vitamine C, cela est expliqué par la grande différence entre l'IC 50 de l'acide ascorbique à 0.014 µg/mL et celle donné par les HEs de *Rhetinolepis lonadioides* Coss et *Pulicaria crispa* avec des concentrations de 2.13 µg/mL et 9.11 µg/mL respectivement (figure 16).



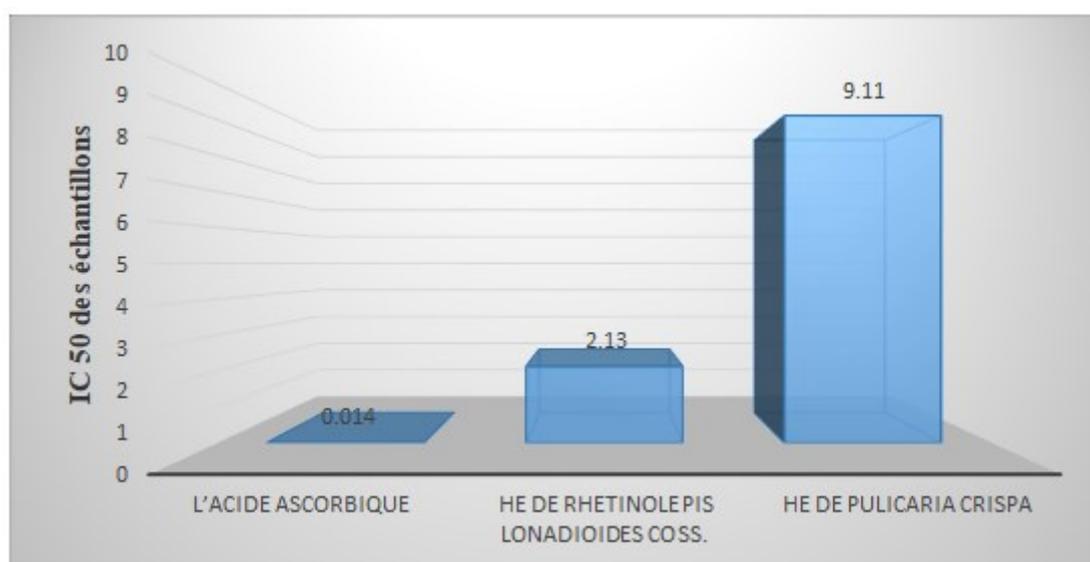
**Figure 13 :** Pourcentages d’inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l’acide ascorbique.



**Figure 14 :** Pourcentages d’inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l’HE de la plante *Rhinolepis lonadioides* Coss.



**Figure 15 :** Pourcentages d’inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l’HE de la plante *Pulicaria crispa*.



**Figure 16 :** Les valeurs d’IC50 (en µg/ml) de l’acide ascorbique et les HEs des plantes étudiés.

L’effet antiradicalaire pourrait être attribuée aux principaux constituants des HEs, tels que le  $\beta$ -Pinene, D-Limonene et Phenanthroquinone pour *Rhetinolepis lonadioides* Coss., et le Caryophyllene E, Neryl isobutanoate et Linalool pour *Pulicaria crispa*. En plus, les sesquiterpènes oxygénés pourraient agir individuellement ou en synergie comme antioxydants. L’activité des composés oxygénés pourraient être attribués aux électrons libres en raison de la forte oxygénation (El Shamy et al., 2019; Abd-Elgawad et al., 2020).

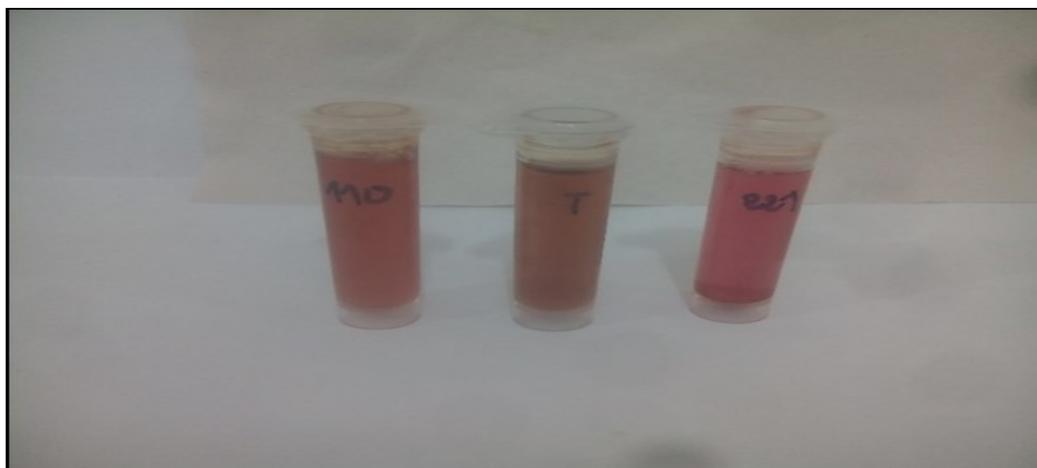
De plus, l'activité antiradicalaire résultante peut être expliquée par la forte teneur en mono- et sesquiterpènes hydrocarbures et sesquiterpènes oxygénés pour les huiles des plantes étudiées. Il est rapporté dans la littérature que les sesquiterpènes présentent une activité antiradicalaire. La structure et la concentration de sesquiterpènes déterminent leur mode d'action comme antioxydant (Bartikova et *al.*, 2014).

### 3. Evaluation de l'effet hémolytique des huiles essentielles sur des globules rouges

L'hémolyse des hématies doit être considérée comme un problème des biomolécules. La force hémolytique d'un produit naturel ou un médicament, peut avoir la lyse complète par l'effet de différents mécanismes, tels que la dissolution ou l'augmentation de la perméabilité des membranes cellulaires à la cellule (Sobrinho et *al.*, 2016).

Les résultats du test d'hémolyse sont présentés sous forme d'évolution du pourcentage de taux d'hémolyse en fonction du temps d'incubation à 37°C pour quatre concentrations (50 ; 25 ; 12.5 et 6.25 µl/mL) des huiles essentielles des plantes *Rhetinolepis lonadioides* Coss et *Pulicaria crispa* (figures 17 et 18).

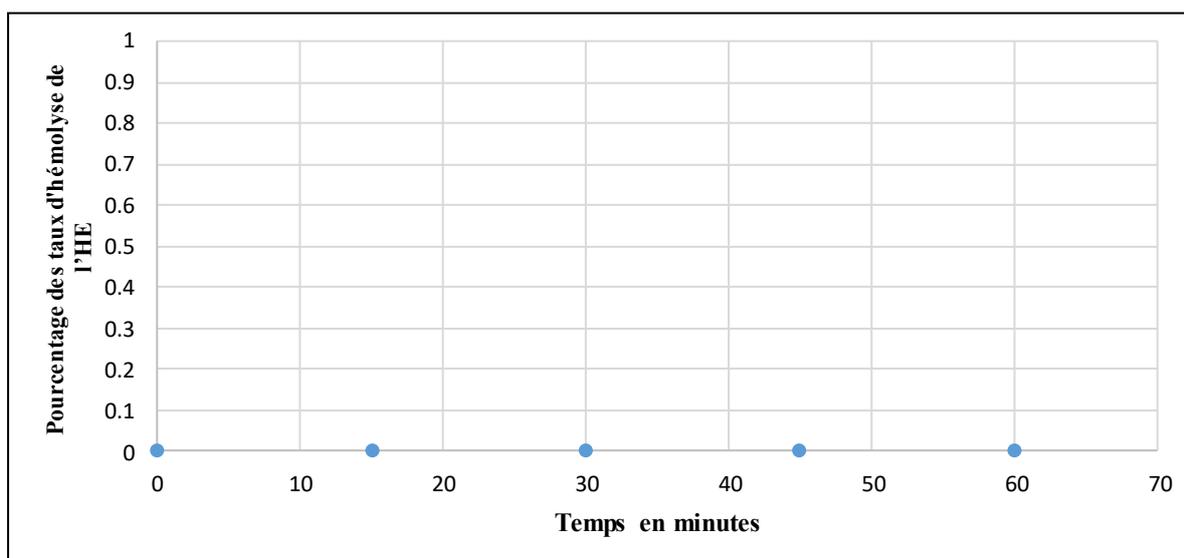
D'après les résultats obtenus, aucune forme d'hémolyse n'a été enregistrée par les concentrations des HEs utilisés en fonction du temps (Photo 10).



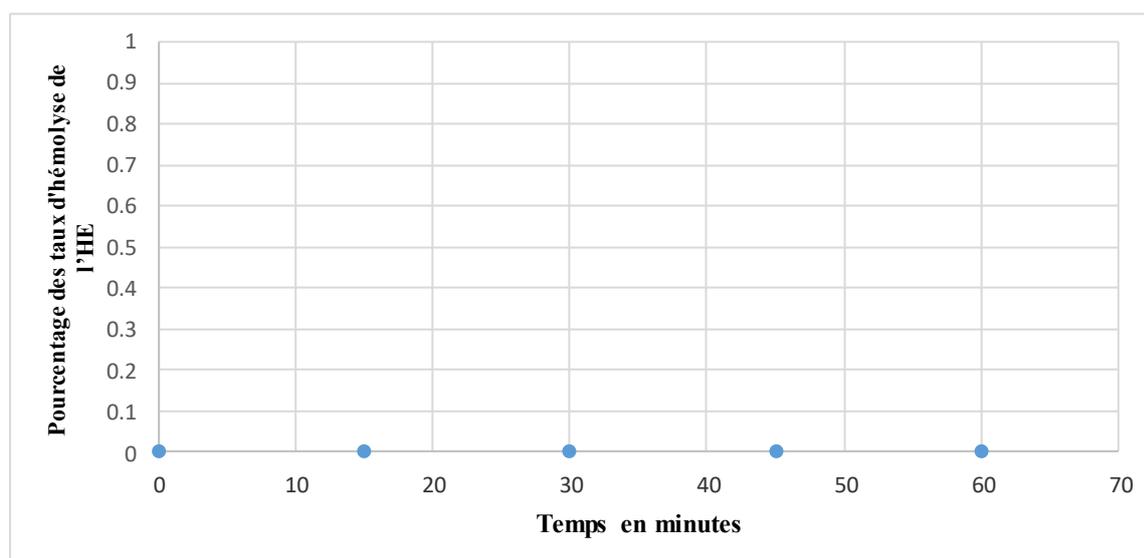
**Photo 10** : Résultat de l'activité hémolytique (le triton X100 T au centre des échantillons des HEs ; 110: est l'HE de *R.L.* ; 221 : est l'HE de *P.C.*).

Les résultats obtenus sont dû probablement, à l'absence des composés toxiques agissant sur les cellules érythrocytaires. Ce qui confirme que les espèces étudiées sont des plantes réputées pour ces vertus ethno pharmacologique très utilisées dans la médecine traditionnelle pour son potentiel de prévention et de traitement des maladies et sans effet toxique.

Sur la base des résultats obtenus (figures 16 et 17), les HEs ont présenté un taux d'hémolyse imperceptible sur les hématies, avec des pourcentages d'hémolyse nuls. Ces résultats ont été prouvés la sécurité d'utilisation de ces HEs par l'homme. Il encourage son application potentielle en tant que conservateur alimentaire ou autre utilisation dans l'alimentation. Selon les rapports précédents, une hémolyse jusqu'à 5 % est acceptable pour les matériaux (Munjal et *al.*, 2016 ; Lazazzara et *al.*, 2017).



**Figure 17 :** Effet des différentes concentrations de l'HE de la plante *Rhetinolepis lonadioides* Coss sur la fuite d'hémoglobine.



**Figure 18 :** Effet des différentes concentrations de l'HE de la plante *Pulicaria crispa* sur la fuite d'hémoglobine.

#### 4. Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle

##### 4.1. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des huiles essentielles des parties aériennes des plantes *Rhynchospora lonadioides* Coss et *Pulicaria crispa* ont été évalué contre cinq souches Gram-positives : *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Bacillus subtilis* ATCC 21332, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus 2* ATCC 15313 et *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, et deux souches Gram-négatives (*Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

##### 4.1.1. Confirmation de l'autenticité et la pureté des souches de références

La confirmation était basée sur l'observation macroscopique de l'aspect des colonies sur les milieux sélectifs, et même par l'observation microscopique des cellules après coloration du Gram. Ensuite, des tests biochimiques de l'identification tel que ; test de catalase et l'oxydase ont été réalisés. Les caractéristiques des souches testées étaient illustrés dans le tableau 7.

**Tableau 7 :** Représentation des résultats de confirmation des souches bactériennes de références.

Les souches	Milieu sélective	coloration de gram	test catalase	test oxydase
<i>Bacillus cereus</i>	Gélose nutritive	Bacille +	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	Gélose nutritive	Bacille +	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	Des colonies dorées dans Chapman	Cocci +	+	-
<i>Staphylococcus aureus 2</i>	Des colonies dorées dans Chapman	Cocci +	+	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	Bile esculine azide	Cocci +	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Des colonies vert métalliques dans Gélose EMB (Eosin Methylene Blue Agar)	Bacille -	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gélose au cétrimide	Bacille -	+	+

##### 4.1.2. Profile d'antibiorésistance

Les souches bactériennes de référence ont été soumises à un test de sensibilité de l'antibiogramme par 12 disques des antibiotiques conventionnels. Des diamètres des zones d'inhibition sont illustrés dans le tableau 8.

**Tableau 8 :** Représentation des diamètres des zones d'inhibition (mm).

Les souches	CIP 5	TE3 0	AZM1 5	CL25	E15	OX1	FC10	CS10	S300	TOB10	OF5	SP100
<i>Bacillus subtilis</i>	40	52	26	24	40	06	36	22	34	24	42	32
<i>Bacillus cereus</i>	23	21	17	06	21	06	14	06	22	18	23	18
<i>Staphylococcus aureus</i>	28	31	19	10	18	06	18	06	34	24	26	20
<i>Staphylococcus aureus 2</i>	25	30	20	06	23	14	34	06	23	20	27	20
<i>Enterococcus faecalis</i>	32	46	28	11	32	08	34	09	30	28	29	33
<i>Escherichia coli</i>	34	20	10	12	06	06	06	10	18	14	35	07
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40	22	31	22	06	06	06	10	20	19	28	18

**N.B :** les résultats sont exprimés par la moyenne (la valeur présentée dans le tableau)  $\pm$  00.

D'après les zones d'inhibition, générées par les disques antibiotiques, les bactéries sont classées comme sensibles à des ATB et résistantes pour les autres avec des zones d'inhibitions différentes entre eux. D'après les résultats, les bactéries à Gram + sont plus sensible que les bactéries à Gram -, dont *Bacillus subtilis* a donné la zone d'inhibition maximale de 52 mm contre l'antibiotique TE 30, avec une résistance contre l'OX1. Les autres bactéries à Gram + ont révélé une faible sensibilité que le *Bacillus subtilis*, cela expliqué par les zones d'inhibition minimales que celle donné par le *Bacillus subtilis*.

Les deux bactéries à Gram – ont présenté une résistance significative vis-à-vis trois antibiotiques: E15, OX1, FC10 ; et une légère sensibilité contre les autres antibiotiques par rapport aux bactéries à Gram + sauf pour les deux antibiotiques CIP 5 et OF5 qui résulte des zones d'inhibition dépassent les diamètres de 30 mm.

#### 4.1.3. La méthode de diffusion par disque

L'activité antibactérienne a été évaluée par la méthode de diffusion de disque. Le DMSO à 10 % a été utilisé pour la solubilité des huiles essentielles, il était sans effet sur la croissance des souches bactériennes testées. La spiramycine (100 $\mu$ g) et l'oflatoxine (5  $\mu$ g) sont utilisées comme témoins positifs. Les résultats des diamètres d'inhibition obtenus sont illustrés dans tableau 9.

**Tableau 9** : Résultats de l'activité antibactérienne des HEs : les zones d'inhibitions et CMI.

Les souches	Zone d'inhibition (mm)				CMI (µl/ml)	
	SP100	OF5	15 µl HE de <i>R. lonadioides</i> Coss	15 µl HE de <i>P. crispa</i>	HE <i>R.L.</i>	HE <i>P.C.</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	16.67±1.53	20.67±1.15	11.00±2.00	15.00± 3.60	10	5.43
<i>Bacillus cereus</i>	17.67±2.08	22.00±1.73	17.00±2.65	11.33±0.57	4	2.71
<i>Staphylococcus aureus</i>	17.33±1.15	24.00±1.00	12.33±1.13	10.00±1.00	8	2.71
<i>Staphylococcus aureus 2</i>	20.00±0.00	27.50±0.7	22.50±3.53	8.00±1.73	5.43	10.86
<i>Enterococcus faecalis</i>	22.67±2.08	26.67±1.53	14.83±6.71	12.66±0.57	10.86	1.35
<i>Escherichia coli</i>	6.00±0.00	41.00±5.57	6.00±0.00	6.00±0.00	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20.67±5.03	26.67±3.06	13.67±7.37	6.00±0.00	6	-

Effectivement, l'huile essentielle de la plante *Rhadinolobos lonadioides* Coss était efficace contre *B. cereus* et *P. aeruginosa* avec des zones d'inhibitions variées entre 13,67±7,37 et 17,00±2,65 mm et des CMI comprises entre 4 et 6µL/mL. Les souches *B. subtilis* et *S. aureus* étaient moins sensibles (diamètres de la zone d'inhibition : 11.00±2.00 et 12,33 ± 1,13 mm respectivement), dont les valeurs de CMI sont : 8-10 µL/mL. D'autre part, l'HE de *R. lonadioides* a montré une faible activité contre *S. aureus 2*, *E. faecalis* et *E. coli* avec des zones d'inhibition variées entre 6,00±0,00 et 8,00 ± 0,00 mm. D'après ces résultats, il pourrait être observé que la sensibilité des souches bactériennes à l'huile essentielle de *R. lonadioides* n'était pas corrélée au type de bactérie (Gram positive ou Gram négative). Par conséquent, l'étude de l'huile essentielle pourrait agir sur les deux membranes bactériennes.

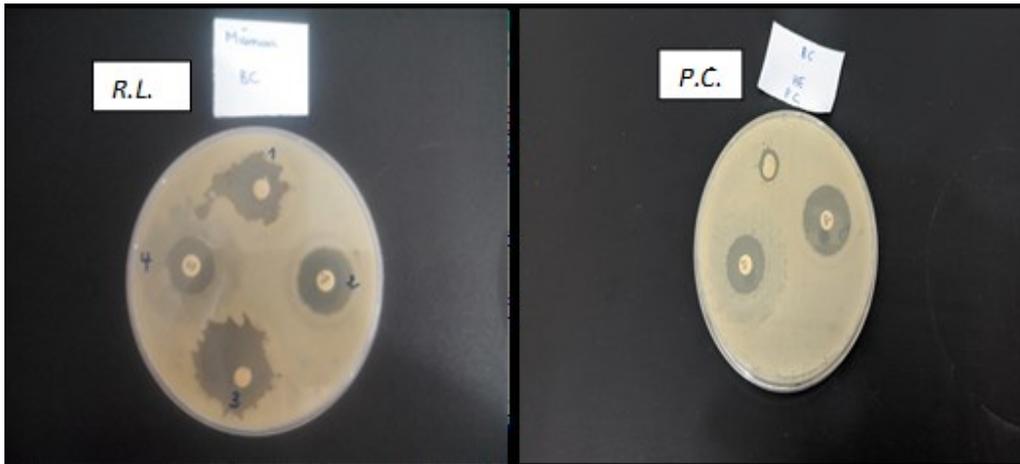


Photo 11 : l'activité antibactérienne des HEs contre *Bacillus cereus*.

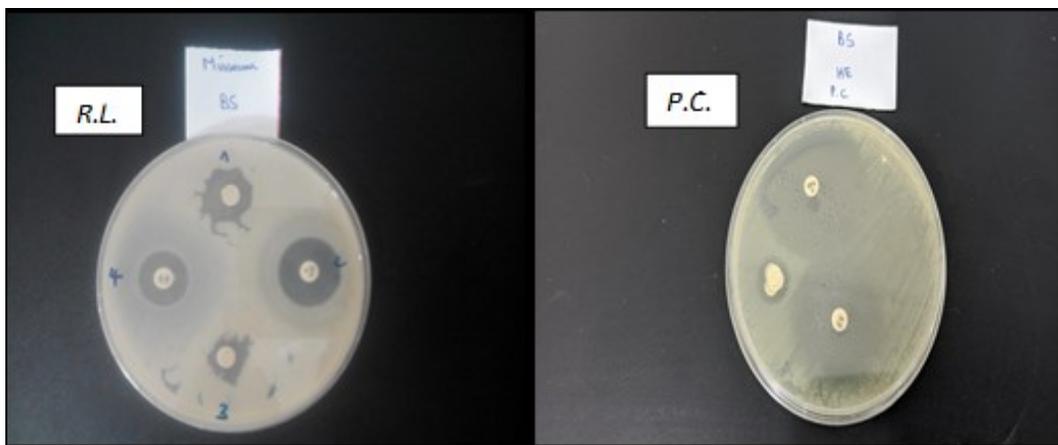


Photo 12 : l'activité antibactérienne des HEs contre *Bacillus subtilis*

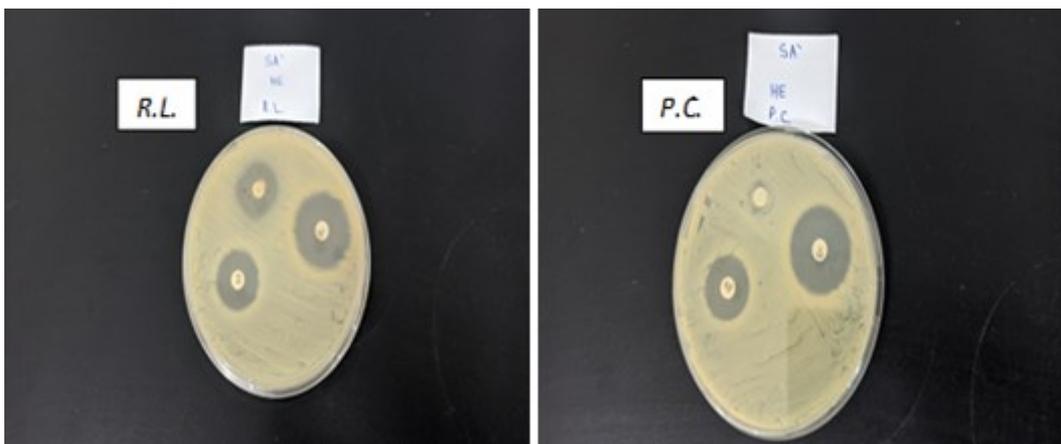


Photo 13 : l'activité antibactérienne des HEs contre *Staphylococcus aureus 2*

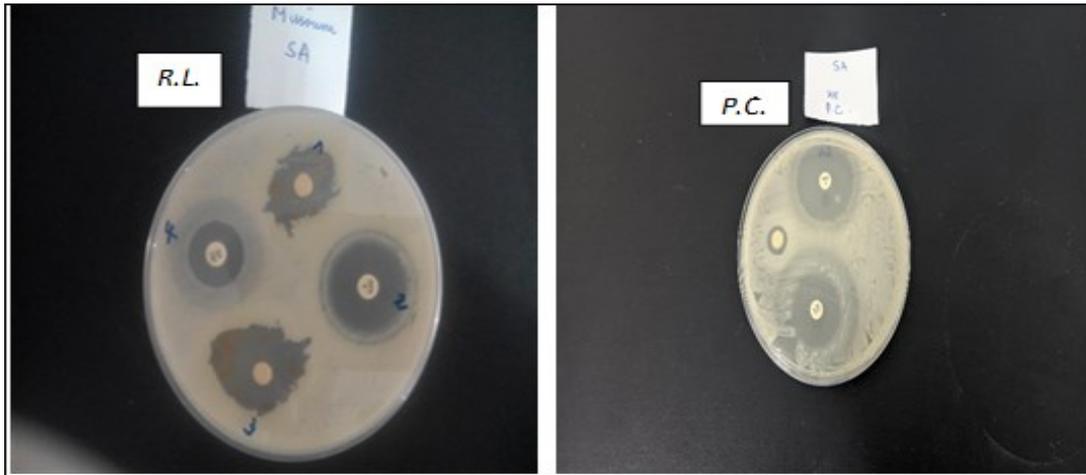


Photo 14 : l'activité antibactérienne des HEs contre *Staphylococcus aureus*

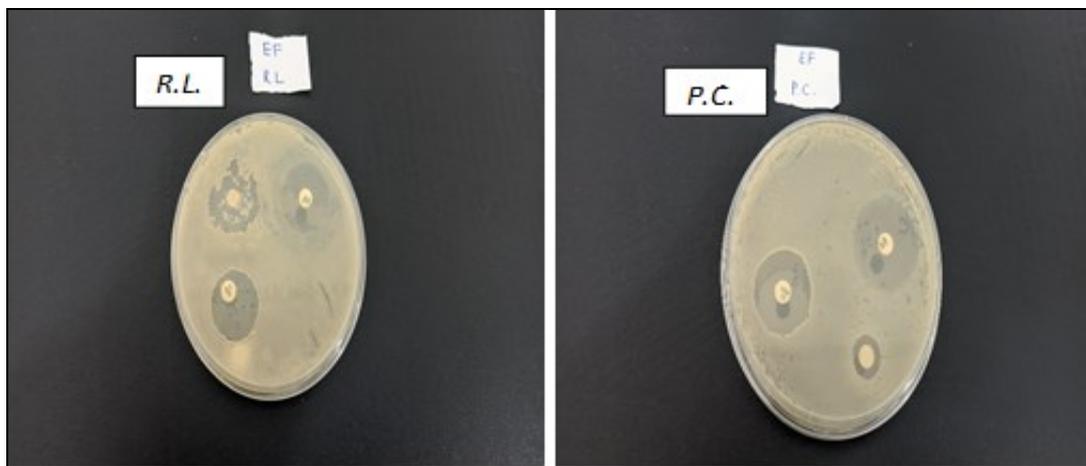


Photo 15 : l'activité antibactérienne des HEs contre *Enterococcus faecalis*.

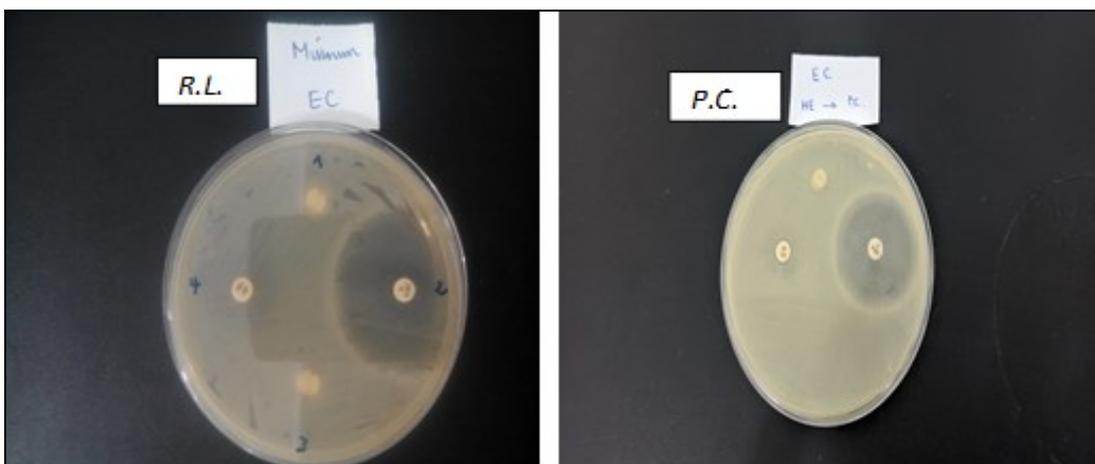
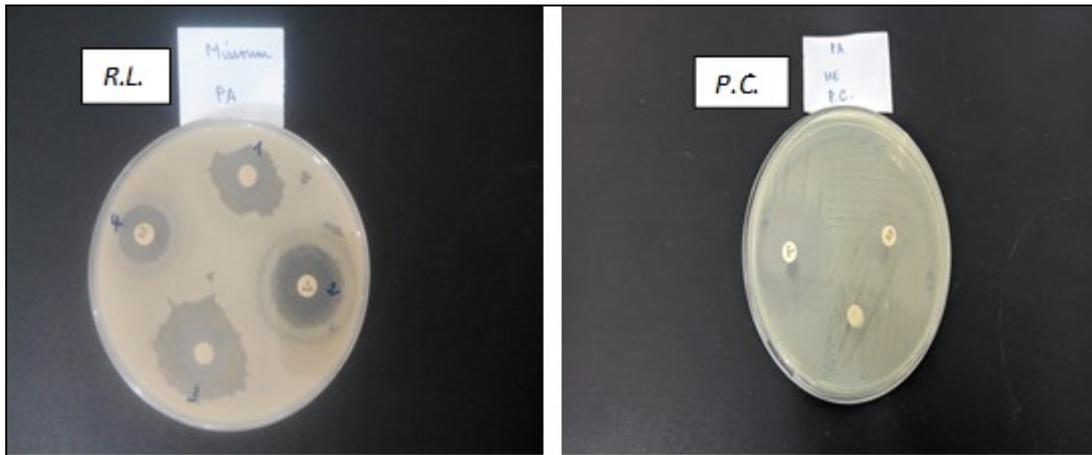


Photo 16 : l'activité antibactérienne des HEs contre *E. coli*.



**Photo 17** : l'activité antibactérienne des HEs contre *P. aerogenusa*.

De manière générale, les mécanismes d'action des HEs et ces sélectivités vis-à-vis de certaines bactéries sont restées mal compris (Hammer et *al.*, 1999 ; Bagamboula et *al.*, 2004). En conséquence, cette sélectivité est le résultat des variations de composition des fractions actives des HEs, qui souvent présentent des actions synergiques. Il semble que leurs mécanismes d'action sont essentiellement liés à la structure de la paroi et à la perméabilité membranaire des bactéries à Gram-positifs et à Gram-négatifs. Dans ce contexte, les travaux de Burt (2004) ont montré que l'HE active exerce son effet antimicrobien par son interférence avec la bicouche lipidique de la cellule cible grâce à sa propriété hydrophobe, qui conduit à une perturbation de la perméabilité et la perte des constituants de la cellule. De plus, cette réaction varie en fonction de la nature de la bicouche lipidique, ce qui explique la résistance des bactéries à Gram négatifs (Mahmoud et *al.*, 2004). En outre, (Debbah et *al.*, 1970) ont démontré la grande sensibilité de bactéries Gram + par rapport aux bactéries Gram -. Dans la même approche d'étude, Gordon et *al.* (1973) et Mahmoud et *al.* (2004) ont suggéré que l'effet antimicrobien exercé par les HE pourrait s'expliquer par la destruction de certains systèmes enzymatiques, y compris ceux qui participent à la production d'énergie cellulaire et la production de composés. Par ailleurs, (Mahmoud et *al.*, 2004), et (Caillet et *al.*, 2007) rapportent que les HEs empêchent la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines.

Dans l'ensemble, comme il a déjà été rapporté par de nombreux chercheurs que l'activité antibactérienne des HEs dépend de leur composition chimique, l'activité antibactérienne obtenu de l'huile essentielle de *R. lonadioides* vis-à-vis les bactéries pourrait être attribuée à un ou plusieurs de ses composants chimiques majeurs :  $\beta$ -pinène (41,85 %), Phénanthroquinone (10,39 %), D-Limonène (6,79 %). Cependant, il a été rapporté que  $\alpha$  et  $\beta$ -

pinène présentent une légère activité contre une gamme de micro-organismes avec des valeurs de CMI variant de 7,5 à 20,0 mg/mL contre *E. coli*, *S. aureus* et *E. faecalis* (Dorman et Deans, 2000 ; Sonboli et al., 2006 ; Leite et al., 2007 ; Jung, 2009 ; Runyoro et al., 2010).

En effet, il est important de noter que des interactions synergiques pourraient se produire entre les composants majeurs ou mineurs de l'HE ainsi jouant un effet clé sur son activité antimicrobienne (Dridi et al., 2020).

En comprenant l'activité antibactérienne des HEs extraites de certaines plantes du genre *Anthemis*, l'*Anthemis xylopoda* (Borneol, 31,80 % ;  $\beta$ -pinène, 12,67%) a montré un faible effet antibactérien contre *B. subtilis*, *E. coli* et *P. aeruginosa* avec des diamètres de zone d'inhibition allant de 7,6 à 10 mm, tandis que l'activité antibactérienne contre *S. aureus* était remarquablement plus haut (23,2 mm) (Dridi et al., 2020).

Parallèlement, l'HE d'*Anthemis stiparum subsp. Sabulicola* avec le germacrène D (11,13%) et le t-cadinol (11,01%) comme des composés majeurs, ont également montré une faible activité antimicrobienne contre les mêmes souches bactériennes avec des valeurs de CMI entre 50 et 100  $\mu$ L/mL (Šarac et al., 2014). En bref, on pourrait résumer que les terpènes oxygénés, les alcools, les aldéhydes et les cétones sont actifs mais avec des niveaux différents de spécificité et d'activité, qui pourraient être liés d'abord au groupe fonctionnel mais aussi à des paramètres de liaison de l'hydrogène (Panizzi et al., 1993 ; Adam et al., 1998).

Les résultats obtenus avec l'HE de la plante *Pulicaria crispa* ont révélé des zones d'inhibition moins importantes par rapport à celles obtenues avec l'HE de la plante *Rhadinolobos lonadioides* Coss, ce qui indique que le premier échantillon est moins efficace que le second. Les données sur l'activité antibactérienne présentées dans le tableau 6 indiquent que les bactéries Gram négatif testées ont été plus résistantes à l'HE, avec des valeurs de zone d'inhibition de 6 mm. En revanche, une activité a été observée avec des différences de sensibilité entre les bactéries Gram positive, avec des zones d'inhibition de  $15,00 \pm 3,60$  ;  $12,66 \pm 0,57$  ; et  $11,33 \pm 0,57$  pour les souches *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* et *Bacillus cereus* respectivement, et des valeurs de CMI observées allant de 2,71  $\mu$ l/ml à 5,43  $\mu$ l/ml.

Par ailleurs, l'HE de *P. crispa* a montré une légère activité contre les deux espèces de *Staphylococcus aureus*, avec des diamètres de zones d'inhibition de  $8,00 \pm 1,73$  pour la souche 2 et  $10,00 \pm 1,00$  pour la souche 1, et des CMI différents de 10,86  $\mu$ l/ml et 2,71  $\mu$ l/ml respectivement.

Les résultats obtenus sont proches à celle trouvés par Ali et *al.* (2012), où sont constatés que l'huile essentielle a montré une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* avec une valeur de CMI de 3,12 µl/ml pour *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus aureus* 2 résistant à la méticilline. La CMI active contre *Bacillus subtilis* était de 6,25 µL/mL, et une résistance complète de *Pseudomonas aeruginosa*. Une activité différente était observée contre *E. coli* où elle a donné une zone d'inhibition de  $16 \pm 1.2$  mm avec une CMI de 12,5 µl/ml.

Les études effectuées sur les mêmes plantes par Ebtihal Alsadig et *al.* (2020) ont montré une forte activité par rapport à celle trouvés contre *S. aureus* (18 mm), et une activité similaire a celle reporté contre *B. subtilis* (17 mm). Pour les bactéries à Gram négatif, nous avons montré une sensibilité observée contre *P. aeruginosa* (17 mm) et *E. coli* (16 mm). L'huile essentielle de *P. crispera* a donné une activité élevée contre *S. aureus* (18 mm). Concernant l'huile essentielle de *P. undulata*, elle a montré une forte activité contre *B. subtilis* (25 mm), *P. aeruginosa* (24 mm), et s'est avéré modérément actif contre *E. coli* (17 mm) et *S. aureus* (17 mm), même si son activité est supérieure à celle de la tétracycline (16 mm). Généralement l'huile essentielle de *P. undulata* a montré activité élevée contre *B. subtilis* et *P. aeruginosa* par rapport aux témoins positifs.

Gherib et *al.* (2016) ont trouvé que l'HE de *Pulicaria mauritanica* a été efficace contre quelque bactéries à Gram positive et d'autre bactéries à Gram négative, dont les zones d'inhibition de *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* sont  $18.0 \pm 0.5$  et  $11.0 \pm 0.4$  mm respectivement, avec des zones contre *Pseudomonas aeruginosa* ( $11.0 \pm 0.4$  mm) et *E. coli* ( $10.0 \pm 0.6$  mm).

D'après Ebtihal Alsadig et *al.* (2020), l'huile essentielle de *P. undulata* a été donné une forte activité contre *B. subtilis* (25 mm), *P. aeruginosa* (24 mm), et s'est avéré modérément actif contre *E. coli* (17 mm) et *S. aureus* (17 mm), même si son activité est supérieure à celle de la tétracycline (16 mm).

Les travaux d'Ali et *al.* (2017) ont donné qu'une forte activité antibactérienne de l'HE peut se justifier par des concentrations élevés de ses principaux constituants, puisqu'ils ont déjà eu leur potentiel antibactérien décrit par la littérature. Par exemple :  $\beta$ -caryophyllène et caryophyllène oxyde ont déjà été identifiés comme constituants majeurs de l'huile essentielle de *Pulicaria crispera*, dont la satisfaction de l'activité antibactérienne a été démontrée par le test de diffusion du disque et le test de microdilution en bouillon.

La même proposition illustrée par Dahham *et al.* (2015) et Francomano *et al.* (2019), où sont trouvés que l'activité antimicrobienne pourrait être liée à la présence d'autres composants de l'HE, tels que le caryophyllène et le caryophyllène oxyde qui présente également des propriétés antimicrobiennes.

#### 4.1.4. Evaluation de l'effet synergique entre l'huile essentielle et les antibiotiques conventionnels

Les résultats obtenus de l'effet synergique des HEs des plantes étudiées en association avec les disques d'antibiotique, sont présentés dans le tableau 10.

Cette étude vise à donner un aperçu des recherches sur l'utilisation des huiles essentielles pour améliorer l'efficacité des antibiotiques. Les connaissances actuelles sur les modes d'action des constituants de l'HE et leur synergie avec les antibiotiques sont présentées, ainsi que les mécanismes possibles par lesquels ils interagissent.

D'après les résultats présentés dans le tableau 10, les huiles essentielles des deux plantes ont montré des effets variables, allant de la synergie à l'antagonisme, avec les antibiotiques utilisés contre les souches testées. Les huiles essentielles ont eu un effet d'antagonisme avec la majorité des antibiotiques testés contre *Bacillus subtilus*, à l'exception de TOB 10, où leur activité a été renforcée.

En revanche, les huiles essentielles ont montré des effets synergiques avec les antibiotiques contre *Bacillus cereus*, ce qui pourrait offrir des possibilités pour trouver une solution au problème de la résistance bactérienne de cette souche.

**Tableau 10 :** Les zones d'inhibitions en (mm) de l'effet de la synergie des ATBs avec les HEs.

Les souches	HE	AZM	S300	CIP5	CS10	FC10	CL25	TOB1 0	OX1
<i>Bacillus subtilus</i>	R.L.	16 (-)	34 (0)	32 (-)	09 (-)	23 (-)	15 (-)	30 (+)	06 (0)
	P.C.	18 (-)	30 (-)	27 (-)	09 (-)	24 (-)	15 (-)	25 (+)	08 (+)
<i>Bacillus cereus</i>	R.L.	18 (+)	24 (+)	30 (+)	06 (0)	15 (+)	07 (+)	19 (+)	06 (0)
	P.C.	20 (+)	28 (+)	31 (+)	09 (+)	17 (+)	09 (+)	20 (+)	10 (+)
<i>Staphylococcus aureus</i>	R.L.	16 (-)	24 (-)	30 (+)	7.5 (+)	22 (+)	10 (0)	22 (-)	10 (+)
	P.C.	15 (-)	25 (-)	30 (+)	11 (+)	25 (+)	12 (+)	24 (0)	13 (+)
<i>Staphylococcus aureus 2</i>	R.L.	20 (0)	25 (+)	30 (+)	11 (+)	29 (-)	16 (+)	27 (+)	12 (-)
	P.C.	23 (+)	29 (+)	36 (+)	08 (+)	28 (-)	12 (+)	26 (+)	08 (-)
<i>Enterococcus faecalis</i>	R.L.	18 (-)	18 (-)	25 (-)	09 (0)	25 (-)	10 (-)	14 (-)	09 (+)
	P.C.	11 (-)	27 (-)	22 (-)	08 (-)	23 (-)	08 (-)	24 (-)	08 (0)
<i>E.coli</i>	R.L.	11 (+)	20 (+)	35 (+)	12 (+)	06 (0)	14.5 (+)	15 (+)	06 (0)
	P.C.	11 (+)	18 (0)	34 (0)	12 (+)	06 (0)	15 (+)	15 (+)	06 (0)
<i>Pseudomonas aerogenusa</i>	R.L.	18 (-)	29 (+)	36 (-)	11 (+)	06 (0)	15 (-)	19 (0)	06 (0)
	P.C.	11 (-)	22 (+)	30 (-)	08 (-)	06 (0)	16 (-)	19 (0)	06 (0)

**R.L.** *Rhadinolepis lonadioides* Coss. **P.C.** *Pulicaria crispera* (+) Synergisme. (0) neutre. (-) Antagonisme. **N.B** : les résultats sont exprimés par la moyenne (la valeur présentée dans le tableau)  $\pm$  00.

Les deux souches de *S. aureus* ont montré une différence de sensibilité contre la combinaison des HEs avec les ATBs, où le *Staphylococcus aureus* a révélé un peu de résistance contre la synergie avec l'AZM et le S300 par rapport le *Staphylococcus aureus* 2, et le contraire pour le FC 10 et l'OX 1, où la dernière a résisté par rapport à la souche de *Staphylococcus aureus*.

L'effet d'antagonisme a été observé contre la bactérie *Enterococcus faecalis*, tandis qu'aucune élévation sur les zones d'inhibitions avec les ATBs, sauf qu'une légère synergie avec l'OX 1.

Par ailleurs, la combinaison huile/antibiotique est particulièrement efficace sur la souche d'*E. coli*. Cependant ce n'est pas le cas pour la bactérie *Pseudomonas aerogenusa*, dont nos HE étudiées ont été donné un effet antagonisme avec les ATBs étudiés.

La plupart des études rapportées ici ont déterminé in vitro si la synergie est existée, et n'ont pas pleinement étudié les mécanismes sous-jacents. Helander et al. (1998) et Ultee et al. (2002) ont été donnés que de nombreux composés de l'HE présentent des effets perturbateurs sur les membranes cellulaires des bactéries et la plupart des antibiotiques ont des cibles spécifiques dans la synthèse des protéines ou de l'ADN. Il semble probable que la synergie dans la plupart des cas puisse être due à des effets multi cibles. Cependant, il y a quelques indices pour la synergie entre les antibiotiques et les constituants de l'HE dans le ciblage de mécanismes de résistance bactérienne, en particulier l'inhibition de pompes à efflux (Shahverdi et al., 2007; Lorenzi et al., 2009 ; Kollanoor Johny et al., 2010).

L'eugénol, est un constituant de l'huile de girofle, a été testé en association avec des antibiotiques représentant huit groupes des antibiotiques, contre *E. coli*, *E. aerogenes*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* et *S. typhimurium*. La synergie était trouvée pour tous les groupes d'antibiotiques testés, y compris la pénicilline et le chloramphénicol, mais était plus apparent pour l'ampicilline, polymyxine B, norfloxacine, tétracycline, rifampicine et vancomycine (Hemaiswarya et Doble, 2009). L'eugénol était synergique avec l'ampicilline contre *S. criceti* et *S. gordonii* et avec la gentamicine contre *S. sanguinis* et *P. gingivalis* (Moon et al., 2011).

Dans une étude comparant plusieurs constituants de l'HE en tant que synergistes pour les antibiotiques contre les souches résistantes aux médicaments de *S. typhimurium*, *E. coli* et

*S. aureus*, le carvacrol et le thymol étaient synergiques dans plus de cas que l'eugénol (Palaniappan et Holley, 2010).

Des différences relativement faibles dans la structure chimique, entre les composants de l'HE, peut avoir des effets significatifs sur la capacité de synergie avec les antibiotiques. Par exemple, le carvacrol et le thymol sont structurellement similaires, ne différant que par l'emplacement du groupe hydroxyle. Cependant, le carvacrol était synergique en association avec l'ampicilline et la nitrofurantoïne contre *Klebsiella oxytoca* isolée de l'alimentation animale tandis que le thymol était indifférent (Zhang et al., 2011).

## 4.2. Evaluation de l'activité antifongique

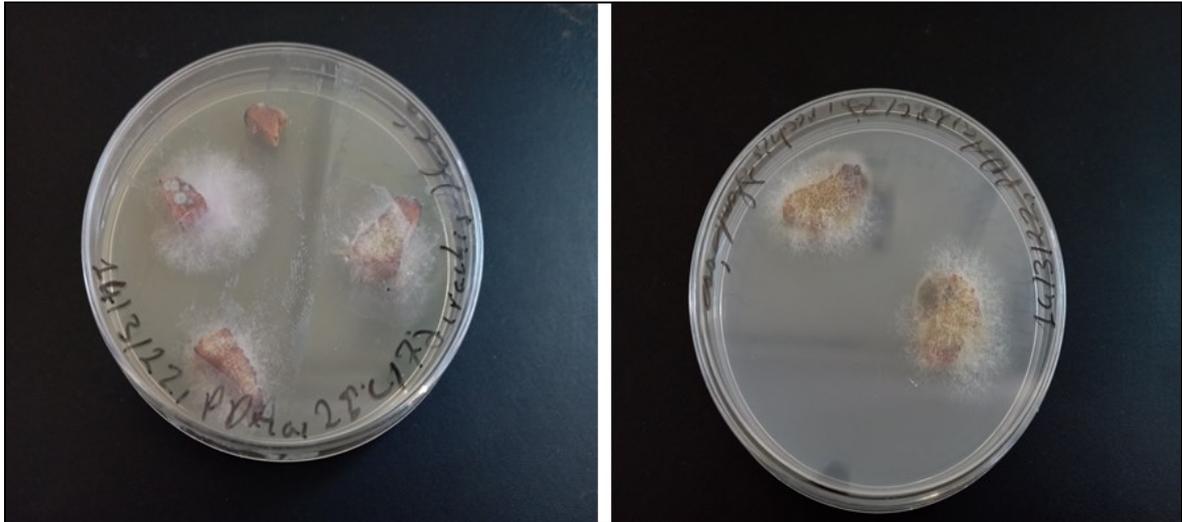
### 4.2.1. Isolement et caractérisation morphologique des souches de *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis*

L'isolement, la caractérisation et la conservation de la culture de *F. oxysporum f. sp. albedinis* a été l'objet de nombreuses études (Snyder et Hansen, 1940).

Un nombre total de 5 isolats fongiques ont été récupérés provenant de palmiers dattiers de la zone de Mazer, wilaya de Beni Abbes. Ces palmiers présentant des symptômes de maladie comme, le jaunissement des folioles et brunissement du faisceau vasculaire des rachis (photo 11). Les isolats sont très bien développés sur le milieu PDA. Après quelques jours d'incubation, on a remarqué l'apparition des secteurs mycéliens aux extrémités des fragments des rachis (photo 18). Nous avons entamé à la purification des souches, suivie de la culture de single spore, on se basant sur la morphologie de la culture et l'examen microscopique.

Le mycélium aérien sur PDA est délicatement floconneux et clairsemé. Les cultures ont une apparence visqueuse due à la production abondante de conidies, et sont blanches cotonneux sur l'envers de la boîte et à croissance lente (6,0–8,5 cm de diamètre en 7 jours à 25 °C sur milieu PDA).

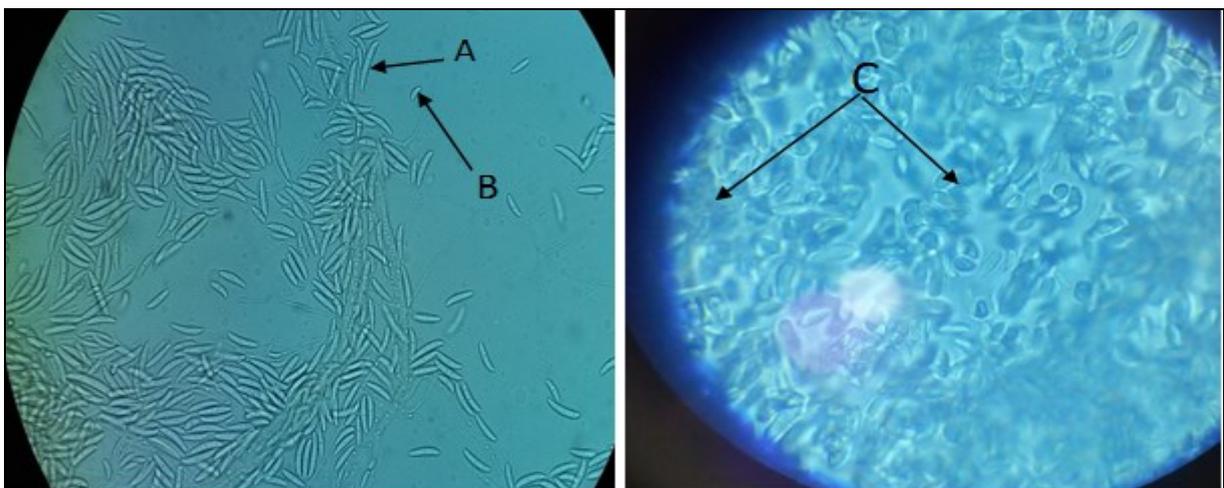
Basant sur les résultats illustrés dans les photos 19 et 20, et d'après la référence au manuel de Pitt et Hocking (2009), les isolats fongiques étaient généralement classés comme *Fusarium oxysporum*.



**Photo 18 :** Isolat de *FOA* à partir des rachis sur milieu PDA.



**Photo 19 :** Isolat de *F. oxysporum* purifié sur milieu PDA.



**Photo 20 :** Observation microscopique (grossissement x 100) après la microculture de l'isolat *F. oxysporum* ; (A) macroconidie ; (B) microconidie ; (C) les chlamydospores.

(Burgess et *al.*, 1989), ont montré que le *Fusarium oxysporum* comprend de nombreuses formes pathogènes, qui provoquent des infections opportunistes chez l'homme et d'autres animaux, et des espèces saprophytes qui se produisent couramment dans le sol et dans les racines des plantes résiduelles.

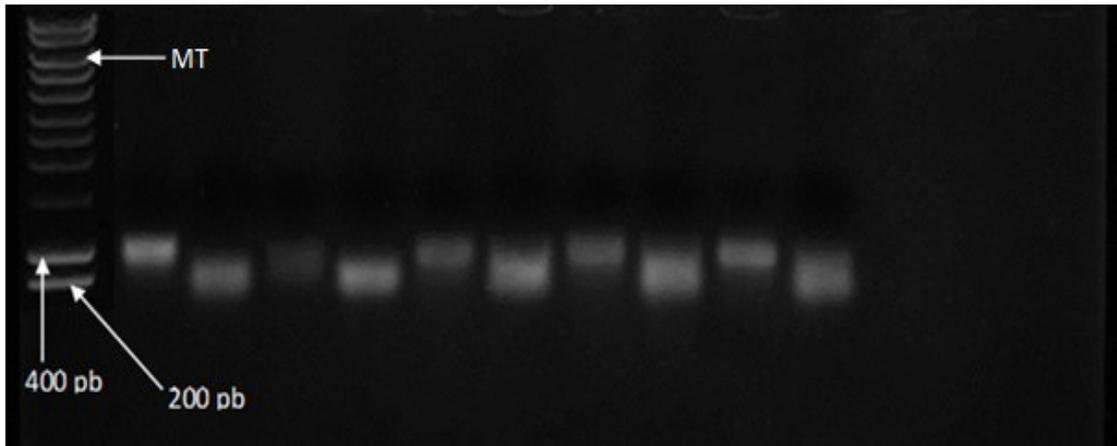
Il n'y a pas des informations sur la variabilité et la stabilité des caractères clés utilisés pour distinguer les espèces de *F. oxysporum*, malgré la nature omniprésente du champignon dans le sol et sur les plantes comme parasite et saprophyte.

En revanche, la morphologie des colonies et la pigmentation étaient extrêmement variables et ne sont donc pas considérées comme des références appropriées sur lesquelles était basée sur l'identification des formes spéciales de l'espèce *F. oxysporum*. Il est significatif qu'aucune des cultures n'ait été considérée comme intermédiaire entre ces formes de *F. oxysporum*. Pour cette raison d'autres études sont nécessaires pour identifier la forme spéciale *albedinis*. Ce qui fait appel à l'identification moléculaire par la PCR avec la paire d'amorce spécifique TL3-FOA28 et BIO3-FOA1.

#### **4.2.2. Identification moléculaire des isolats de l'espèce *Fusarium oxysporum*:**

Cinq isolats de notre collection ont fait l'objet de cette étude. La confirmation de leur identification a été réalisée par PCR. Les paires d'amorces TL3-FOA28 et BIO3-FOA1 ont été testées sur l'ADN extraire des isolats de la souche *F. oxysporum*. La paire d'amorces TL3-FOA28 pourrait être utilisée pour amplifier un fragment d'ADN de 400 pb pour les *F. oxysporum* isolés, et la paire d'amorces BIO3-FOA1 pourrait être utilisée pour amplifier un fragment d'ADN de 204 pb pour seulement 95 % des *F. oxysporum* (Photo 21).

Les amplifications réussies génèrent deux types de bandes 200 pb et 400 pb. Ce explique l'amplification du gène FOT1 porté par pFalb28 spécifique pour la forme *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*. Donc, lorsque nos isolats de *F. oxysporum* produisant un amplicon de cette taille doivent être identifiés comme étant f. sp. *albedinis*.



**Photo 21 :** Amplification PCR- avec amorces BIO3-FOA1 et TL3 FOA28 (bandes 200pb et 400pb) des cinq isolats fongiques sur gel s'Agarose a 1%, MT (Marqueur de taille) Visualisé avec UV-SCP et photographié avec un système de capture digital (Gel Doc, BioRad).

Enfin, il faut signaler que la technique PCR développée par (Fernández et *al.*, 1998), à l'aide des paires d'amorces, BIO3-FOA1 et TL3-FOA28 utilisées dans les tests PCR fournissent ainsi un outil de diagnostic utile, fiable et rapide pour détecter le *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* isolé. Le même résultat a été cité par (Mezouari, 2020).

#### 4.2.3. Confirmation de l'identité des autres souches fongiques testées :

Rappelons que les souches de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* qui ont servi pour cette étude provenant de laboratoire de valorisation des ressources végétales et sécurité alimentaire dans les zones semi arides du sud-ouest Algérien, de l'université de Béchar. Ces souches sont isolées à partir des foyers actifs du bayoud de la zone d'Igli de la wilaya de Beni Abbes, ensuite elles sont purifiées et identifiées par des outils moléculaires par (Mezouari, 2020).

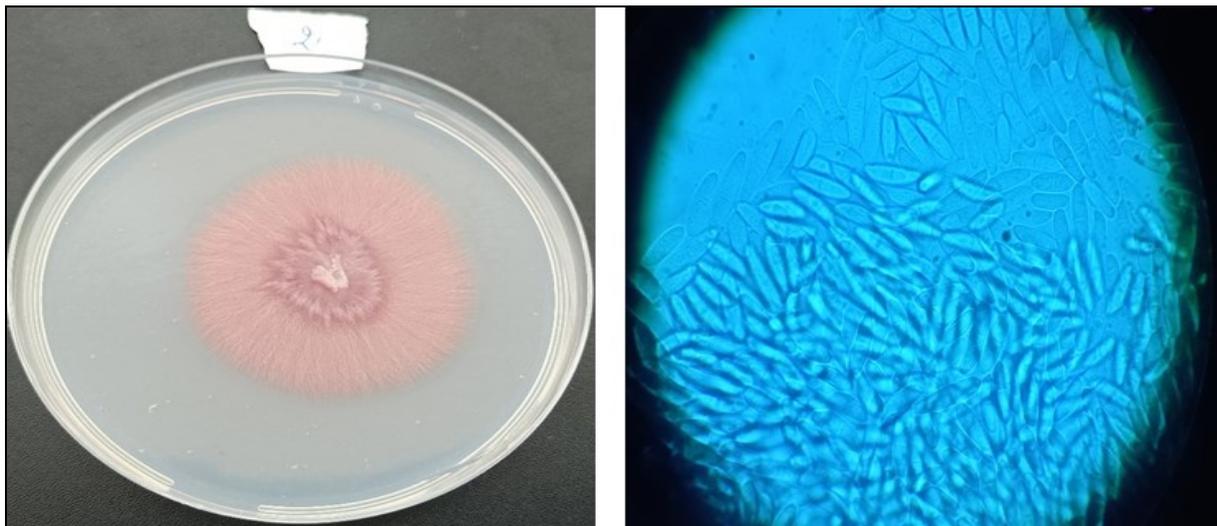
Les autres souches fongiques, sont souches mycotoxinogènes d'origine des aliments de bétail de la région de Béchar, elles sont également provenant de laboratoire VRVSA (en cours de publication).

Les résultats de confirmation des souches fongiques testées (microculture et single spore) sont résumés dans le tableau 11, confirment l'appartenance de nos souches au différent genre et espèces étudiés.

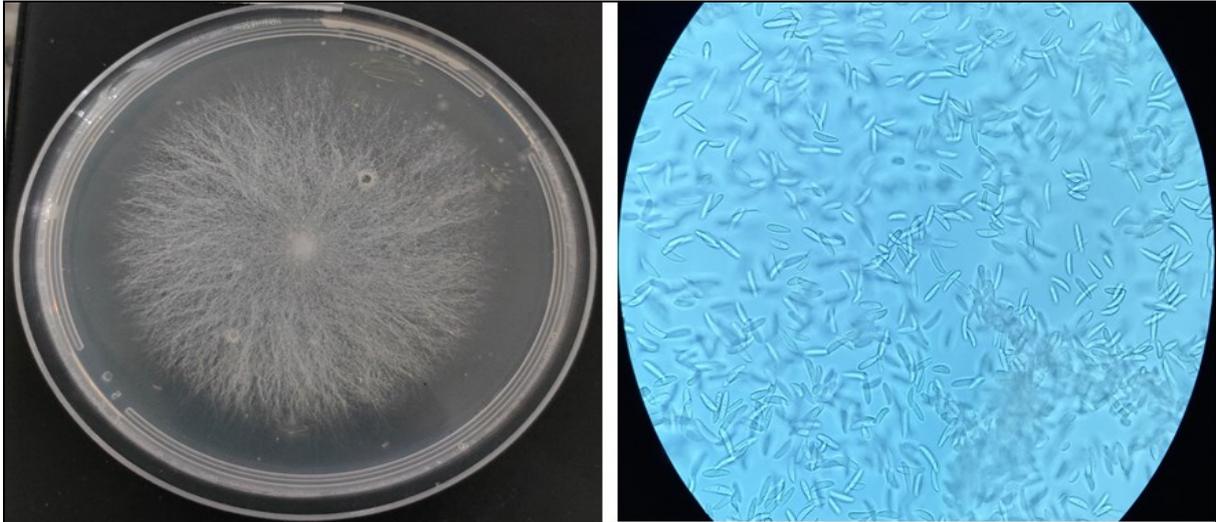
Les photos 21 à 32, ont montrés des spécimens des souches fongiques utilisées sur le milieu de culture PDA, et même sous le microscope (grossissement  $\times 100$ ).

**Tableau 11:** Identification des espèces testées (single spore).

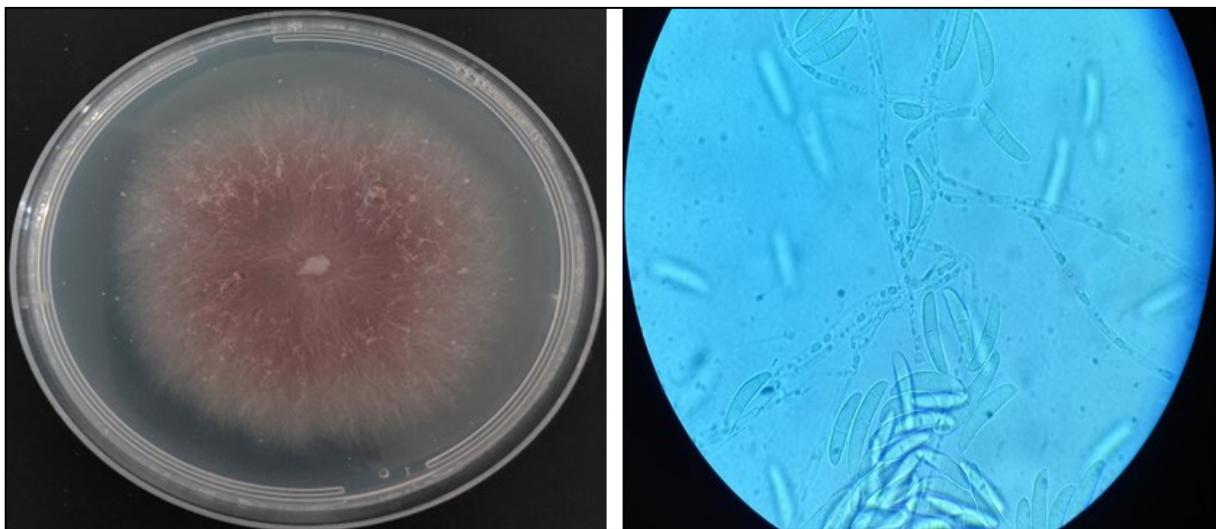
Genre et espèce	couleur	N° Photo	Diamètre en mm sur PDA
<i>Foa aspect ras muqueux</i>	Rose Orange	22	68
<i>Foa aspect ras muqueux</i>	Blanche	23	72
<i>Foa aspect ras muqueux</i>	Saumon	24	70
<i>Arthrinium sp.</i>	Vert + revers blanche	25	34
<i>Byssochlamys spectabilis</i>	Jaune de blé avec centre noirâtre	26	70
<i>Aspergillus oryzae</i>	Vert pistache+ revers jaune	27	48
<i>Penicillium expansum</i>	Vert foncé	28	45
<i>Aspergillus niger</i>	Noir	29	70
<i>Aspergillus flavus</i>	Jaune verdâtre	30	46
<i>Fusarium sp.</i>	Rose blanchâtre	31	60
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	Vert foncé + revers blanche	32	40
<i>Talaromyces funiculosus</i>	Vert noirâtre + revers blanche	33	23



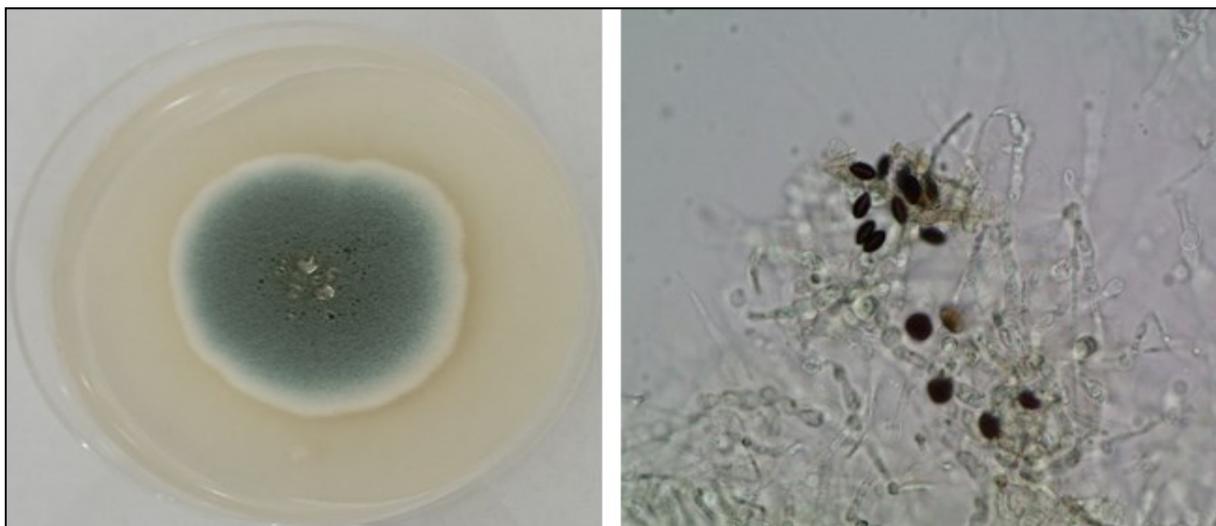
**Photo 22 :** *Foa* aspect ras muqueux de couleur rose orange.



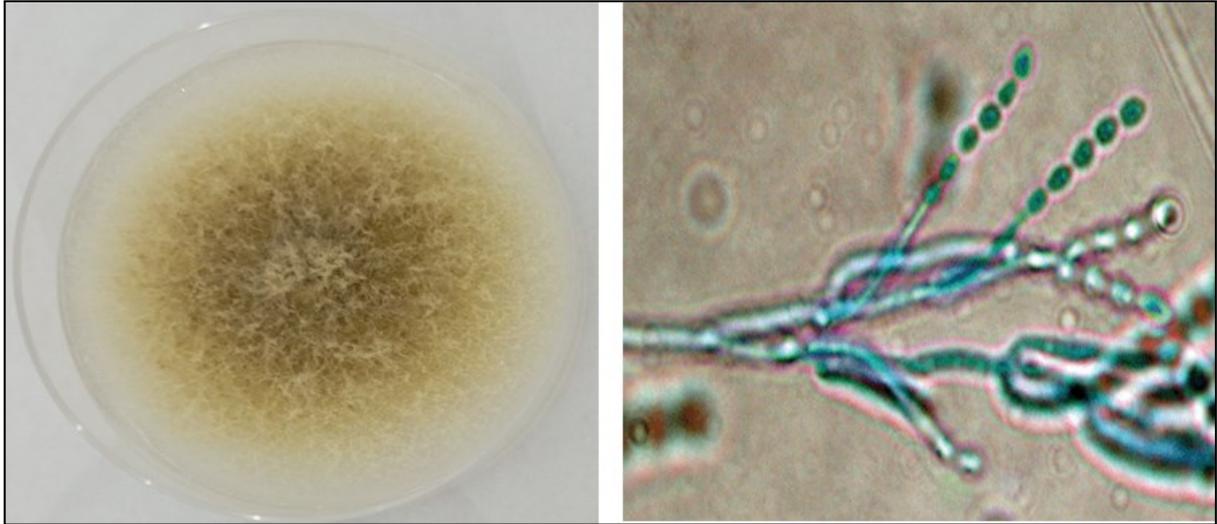
**Photo 23 :** *Foa* aspect ras muqueux de couleur blanche.



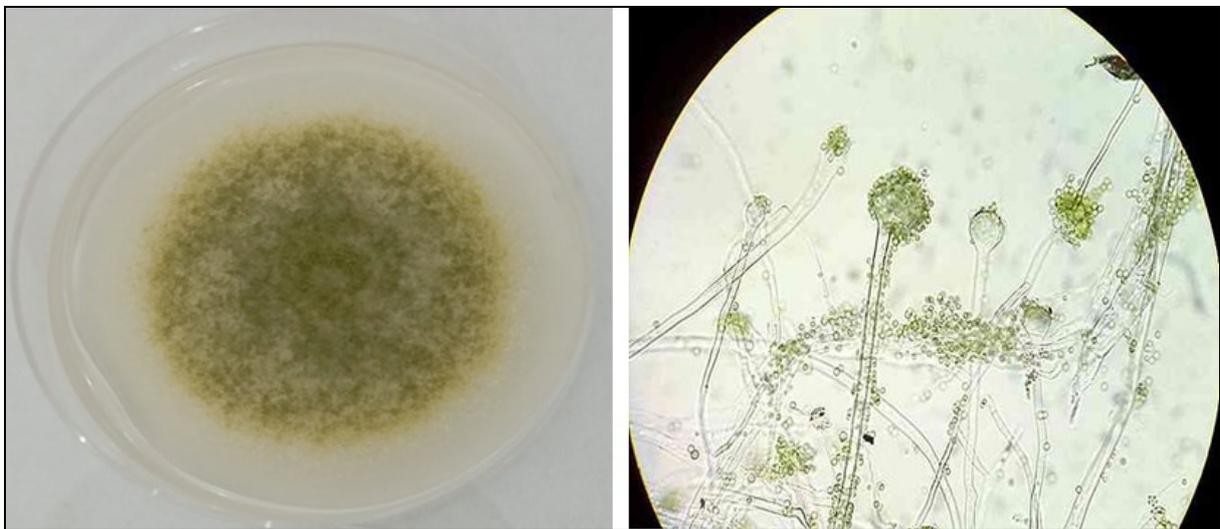
**Photo 24 :** *Foa* aspect ras muqueux de couleur saumon.



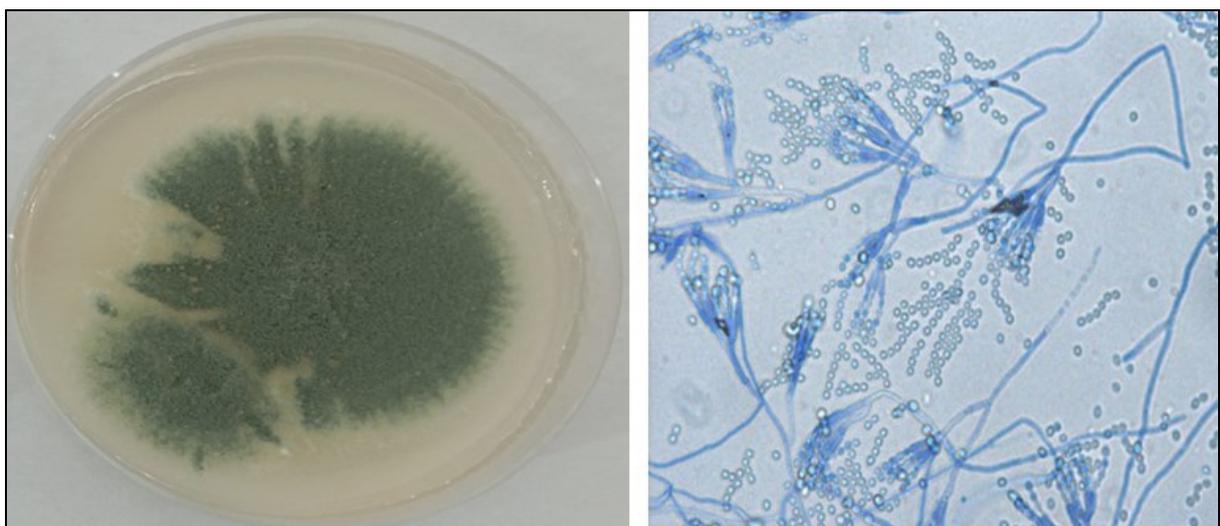
**Photo 25 :** *Arthrimum* sp.



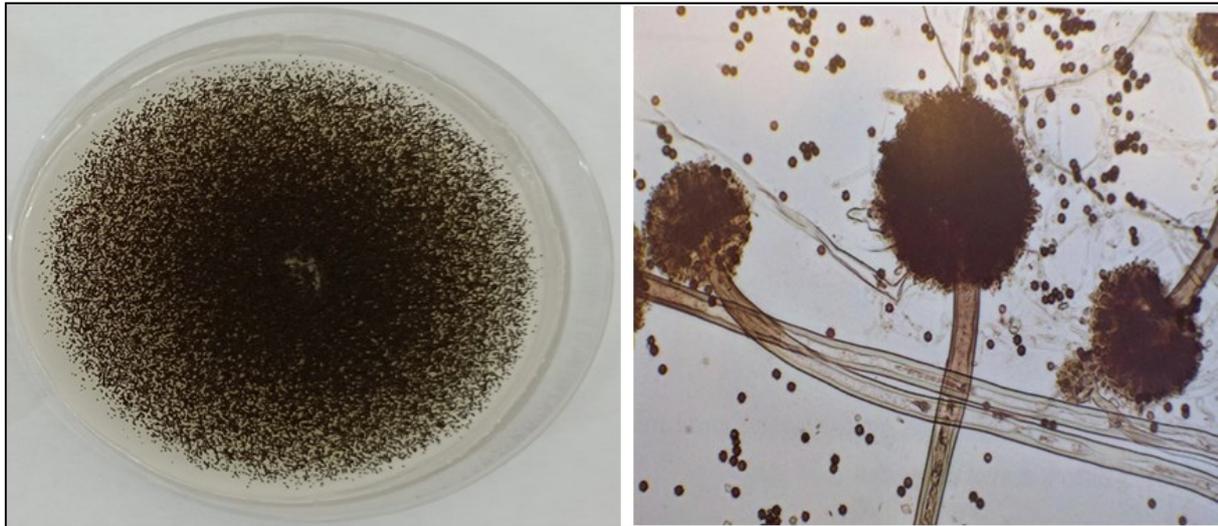
**Photo 26 :** *Byssochlamys spectabilis*.



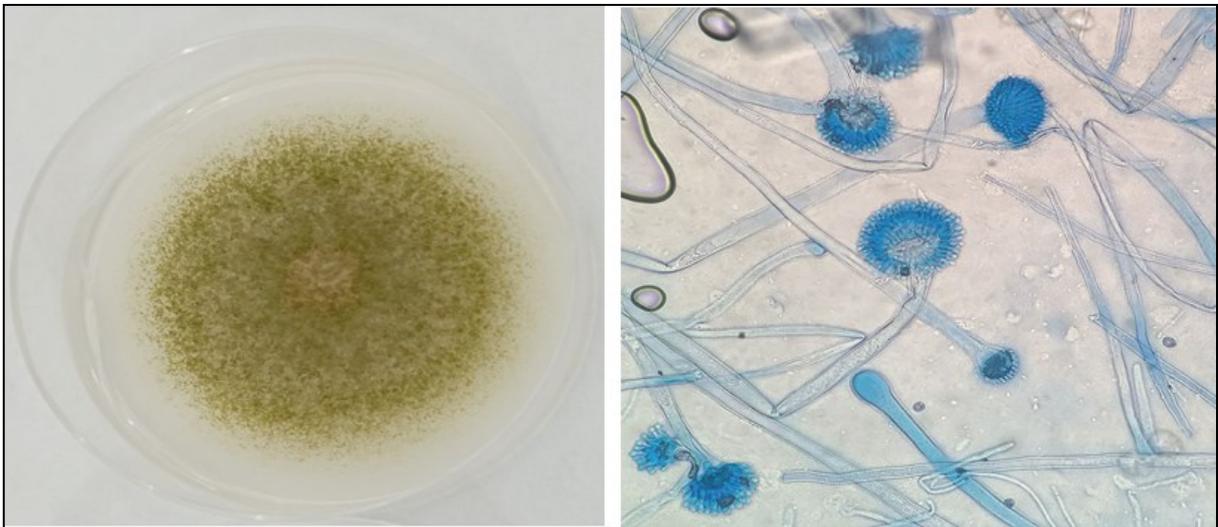
**Photo 27 :** *Aspergillus oryzae*.



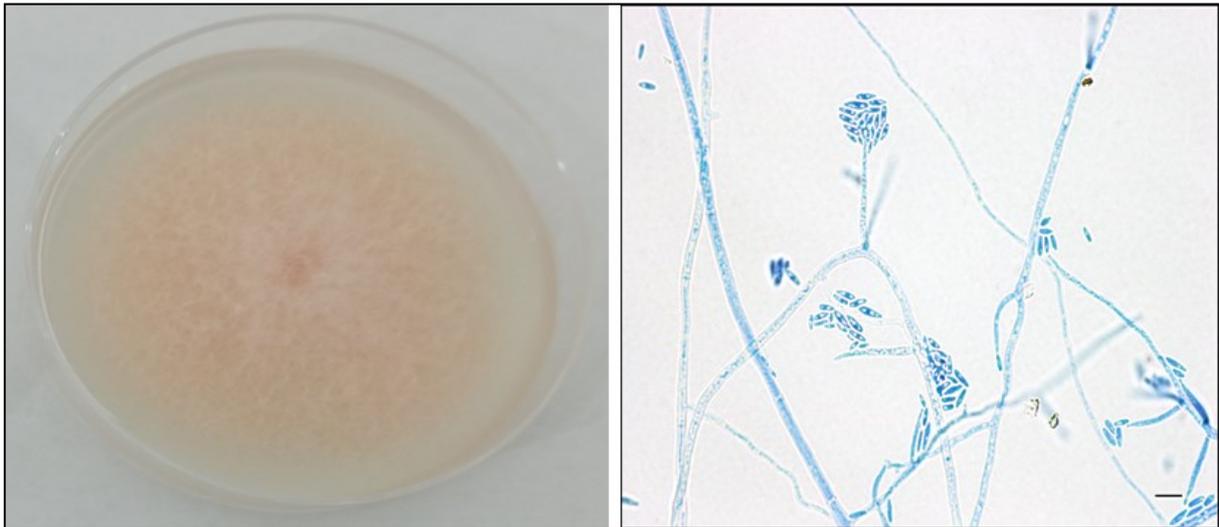
**Photo 28 :** *Penicillium expansum*



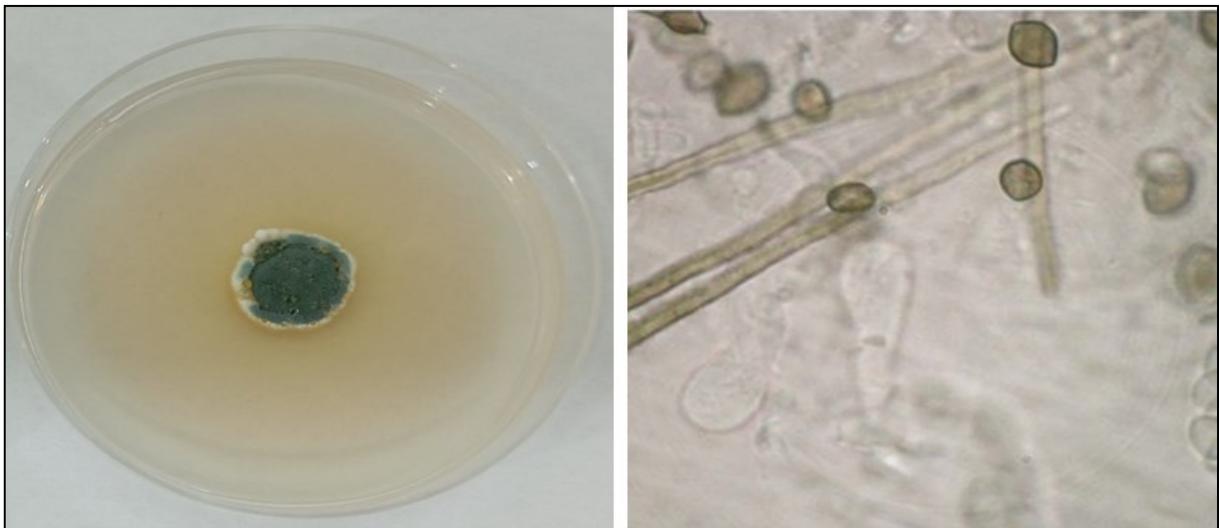
**Photo 29 :** *Aspergillus niger*



**Photo 30:** *Aspergillus flavus*.



**Photo 31:** *Fusarium* sp.



**Photo 32:** *Bipolaris sorokiniana*.



**Photo 33:** *Talaromyces funiculosus*.

#### 4.2.4. Evaluation de la croissance radiale sur milieu solide

L'effet inhibiteur de deux HEs des plantes *Rhetinolepis lonadioides* Coss et *Pulicaria crispa* contre les isolats *F. oxysporum f. sp. albedinis* d'une ferme de palmiers dattiers au Mazer de la wilaya de Beni Abbes, et de onze champignons testés dont trois morphotypes différentes de la même espèce isolés, ont été illustrés au tableau 12. Le DMSO à 10 % a été utilisé pour la solubilité des huiles essentielles est sans effet sur la croissance mycélienne des champignons.

Les huiles étudiées ont été présentées des activités antifongiques contre les souches fongiques testées. Les activités manifestées étaient selon la concentration, soit fongistatique, soit fongicide. Le tableau ci-dessous représente l'effet antifongique des HEs des deux plantes à des concentrations initiales bien définies sur les souches fongiques.

Selon les résultats des diamètres de la croissance radiale cités en (annexe 1), la croissance radiale des souches fongiques varie de 0 à 60,51 mm selon l'origine de l'HE et même son concentration étudiée.

**Tableau 12 :** Résultats de l'activité des HEs de l'inhibition de la croissance radiale des souches fongiques.

Les souches fongiques	Pourcentage d'inhibition (%) de la croissance radiale							
	HE de <i>R. lonadioides</i>				HE de <i>P. crispa</i>			
	1µl	0.5µl	0.1µl	CMI (µl/ml)	1µl	0.5µl	0.1µl	CMI (µl/ml)
<i>Foa</i> isolé	100	17.97	5.45	1	63.38	30.42	7.03	3.12
<i>Foa</i> rose orange	76.67	27.63	16.20	6.25	64.89	63.47	17.77	10
<i>Foa</i> blanche	83.81	39.36	24.08	6.25	74.31	59.42	23.54	10
<i>Foa</i> saumon	81.87	23.53	17.65	6.25	61.09	58.53	24.09	10
<i>Arthrimum sp.</i>	72.56	36.76	32.35	5	100	100	79.12	0.5
<i>Byssochlamys spectabilis</i>	75.71	32.86	28.57	5	100	96.34	87.86	0.7
<i>Aspergillus oryzae</i>	67.49	30.49	21.95	10	55.46	49.76	43.66	7
<i>Penicillium expansum</i>	68.89	26.67	13.33	10	71.11	71.11	71.11	3.12
<i>Aspergillus niger</i>	80.71	48.57	28.57	4	100	100	100	0.1
<i>Aspergillus flavus</i>	54.35	26.09	19.57	10	57.11	54.28	51.61	7
<i>Fusarium sp.</i>	77.50	27.50	16.67	5	74.90	64.45	49.78	5
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	63.13	12.50	2.50	10	70.25	67.50	62.00	5
<i>Talaromyces funiculosus</i>	95.65	32.61	26.09	3.12	100	100	100	0.1

L'activité antifusarium de l'huile essentielle de *R. lonadioides* est plus forte par la concentration de 1 µL/ml que l'autre huile étudiée. Concernant l'HE de *R. lonadioides*,

l'inhibition de la croissance de mycélium des souches *Foa* était comprise entre 5.45 % et 100 % selon la concentration. L'effet inhibiteur plus élevé contre ces souches est remarqué par la concentration de 1  $\mu\text{L}/\text{ml}$  avec une inhibition complète de la croissance mycélienne a été observée à une concentration d'huile essentielle de 1  $\mu\text{L}/\text{ml}$  pour le *Foa* isolé, cela est représenté la valeur de CMI (photo 39). Bien que l'HE de *P. crisper* à un effet faible avec la concentration de 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  contre les souches *Foa*, mais il a montré une sorte d'interaction avec les autres concentrations plus que *R. lonadioides*. Ces résultats n'excluent pas que les valeurs de CMI de ce dernier reste plus bas que l'HE de *P. crisper*. Cette conclusion reste valable même avec la souche *fusarium sp* mycotoxinogène.

L'analyse des valeurs moyennes du taux de l'activité antifongiques calculées, montre que l'huile extraite de *P. crisper* a exercé un effet inhibiteur important sur les souches mycotoxinogènes testées, presque sur toutes les concentrations étudiées. L'effet optimal a été enregistré contre les souches *Aspergillus niger*, *Talaromyces funiculosus* et *Arthrinium sp* ou on a observé une inhibition totale de 100 % avec des valeurs de CMI de 0.1, 0.1 et 0.5  $\mu\text{L}/\text{ml}$  respectivement. L'activité antifongique de cette HE a été moins important contre les espèces *Aspergillus oryzae* et *Aspergillus flavus* que celle les autres souches, dont la concentration minimale inhibitrice est 7  $\mu\text{L}/\text{ml}$ . Pour l'espèce *Penicillium expansum*, les trois concentrations évaluées ont donné le même pourcentage d'inhibition de la croissance radiale à 71.11%.

D'après les résultats mentionnés dans le tableau 12, on a constaté que l'HE de *R. lonadioides*, donne un léger pouvoir antifongique par rapport l'HE de la deuxième plante, contre ces dernières souches où l'inhibition variait de 95.65 % comme la plus forte activité à 1  $\mu\text{L}/\text{ml}$  vis-à-vis le *Talaromyces funiculosus* à 2.50 % comme la plus faible pouvoir contre le champignon *Bipolaris sorokiniana* à une concentration de 0.1  $\mu\text{L}/\text{ml}$ . On a remarqué que même les valeurs de CMI sont plus grandes à celle trouvé par l'HE de *P. crisper*, dont sont varié de 3.12  $\mu\text{L}/\text{ml}$  à 10  $\mu\text{L}/\text{ml}$  résulté par quatre espèces par rapport 9 espèces mycotoxinogènes.

Cependant, l'activité antifongique de l'huile essentielle brute varie selon les souches phyto-pathogènes testés. Les conclusions de la présente étude concordent par rapport d'études antérieures sur l'activité antifongique des huiles essentielles des plantes d'une profile variée de composition chimique contre un groupe diversifié de champignons phytopathogènes.

L'étude d'Ebtihal Alsadig et al. (2020) a montré que l'huiles essentielle de *P. crisper* inhibe la croissance de diverses espèces testées de champignons.

Les travaux d'El-Abed et *al.* (2010) ont été montrés l'existence d'une activité antifongique des huiles essentielles extraites de différentes parties de *Pulicaria arabica* cultivée en Tunisie contre certaines souches fongiques, *Fusarium solani f.sp. cucurbitae*, *F.oxysporum f.sp. lycopersici*, *F.oxysporum f.sp.niveum*, *Phytophthora cactorum*, *Alternaria solani* et *Rhizoctonia solani*.

Dans une étude de Martin et *al.* (2016), a révélé que l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Tagetes minuta* de la famille des astéracées contre des champignons phytopathogènes à savoir : *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* et *A. niger*, ou ont montré une puissante activité antifongique contre les champignons avec l'inhibition de croissance la plus élevée observée chez *F. oxysporum* et *A. niger* avec une inhibition moyenne zones de 28,7 mm après cinq jours d'incubation.

Katooli et *al.* (2011) ont été donnés que l'HE d'*E. camaldulensis* avait une inhibition importante de la croissance mycélienne contre ces champignons pathogènes ; *Penicillium digitatum*, *Aspergillus flavus*, *Colletotrichum gloeosporioides*, et les champignons pathogènes transmis par le sol ; *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* et *Bipolaris sorokinienne*.

Ju et *al.* (2017) ont été rapportés que les HEs de cannelle et de clou de girofle présentaient une forte activité antifongique contre deux champignons (*Penicillium spp.* et *Aspergillus spp.*) provenant d'aliments cuits au four avec des zones d'inhibition nettement supérieur à 15 mm.

Il a été bien eu démontré que les différences d'activité fongicide des HE végétales peuvent être lié aux composants actifs qu'ils contiennent, tels que les phénols, aldéhydes et cétones (Oussalah et *al.*, 2007).

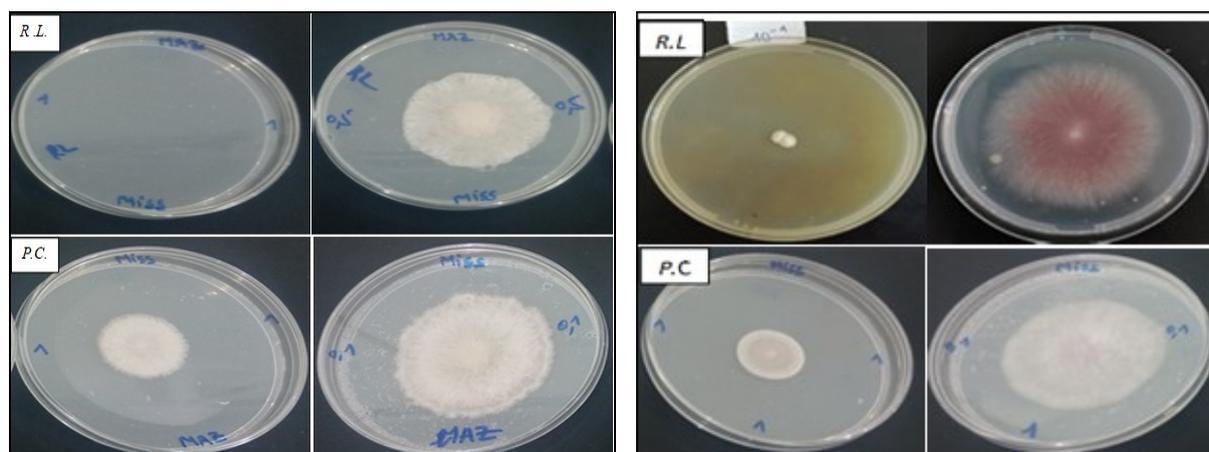
L'analyse GC-MS a révélé que le contenu actif variait selon les HEs. Par exemple, le  $\beta$ -Pinene (41,85 %) et l'E Caryophyllene (40,05%) représentaient les principaux composants de l'HE de *Rhetinolepis lonadioides Coss.* et de l'HE de *Pulicaria crispa* respectivement. On suppose que la majorité des phénols et des aldéhydes de nos échantillons des HEs peuvent entraîner des lésions secondaires de la membrane résultant respectivement en une activité antifongique plus élevée (Tu et *al.*, 2018).

Néanmoins, l'effet synergique de certains composants mineurs peut également contribuer à l'activité fongicide des HEs végétales. (Xie et *al.*, 2017), enquêté relations structure-activité du cinnam-aldéhyde de l'écorce de cannelle HE, eugénol de giroflier HE de

bourgeon et leurs dérivés contre plante champignons pathogènes, *Rhizoctonia solani* et *Fusarium oxysporum* et trouvés qu'une structure à double liaison conjuguée et la longueur de la chaîne CH à l'extérieur du cycle benzénique peut être responsable de l'activité antifongique des HE. Par conséquent, les différences de la composition chimique des différentes HEs peuvent contribuer à la diversité antifongique. La teneur élevée en phénols dans l'HE de clou de girofle et en aldéhydes dans l'HE de cannelle peut être responsable de lésions sévères de la membrane conduisant à des lésions secondaires de la membrane qui peuvent entraîner une augmentation du pouvoir fongicide activité.

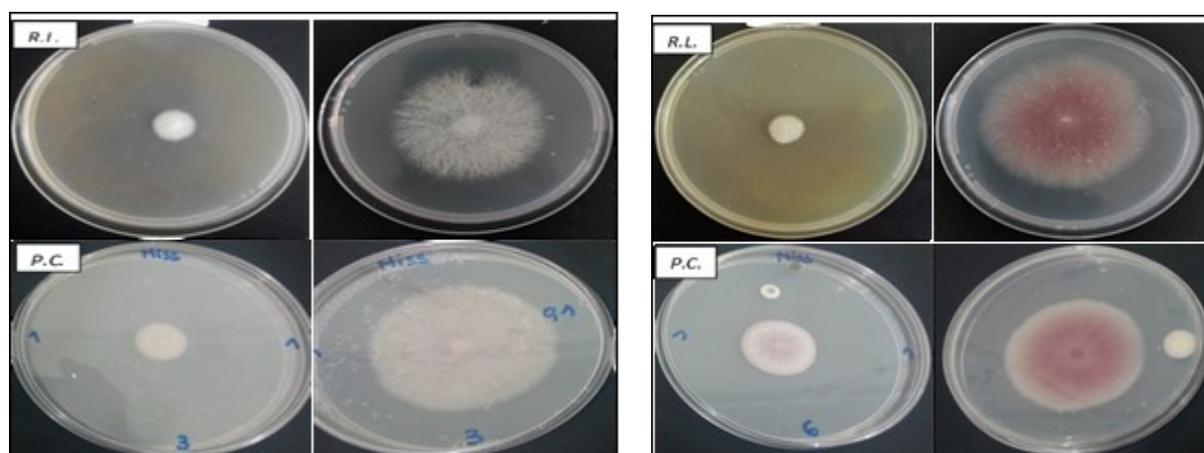
De nombreuses études ont confirmé la forte activité antifongique de l'HE des plantes à large spectre d'inhibition, ce qui met l'accent sur leur haute potentiel en tant que nouveaux conservateurs pour remplacer les fongicides synthétiques.

En outre, les agents antifongiques naturels ont une volatilité élevée, une bonne biodégradabilité, une faible génération de résidus, une faible toxicité et ils sont sans danger.

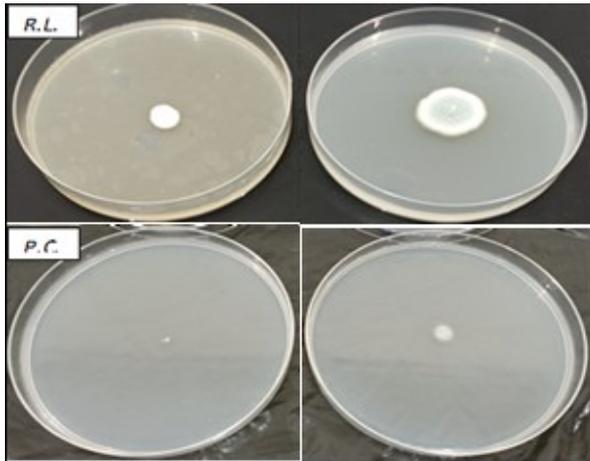


*Foa* isolé

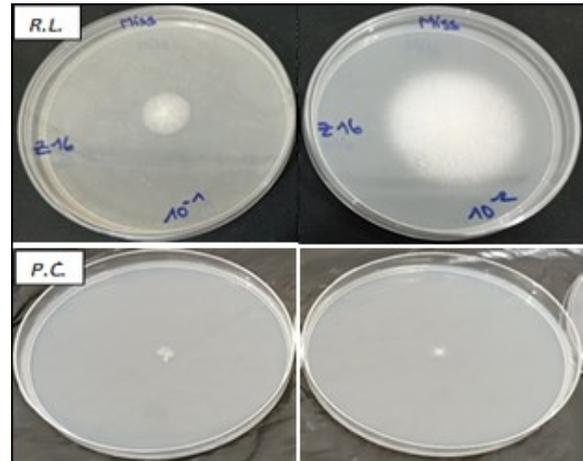
*Foa* rose orange



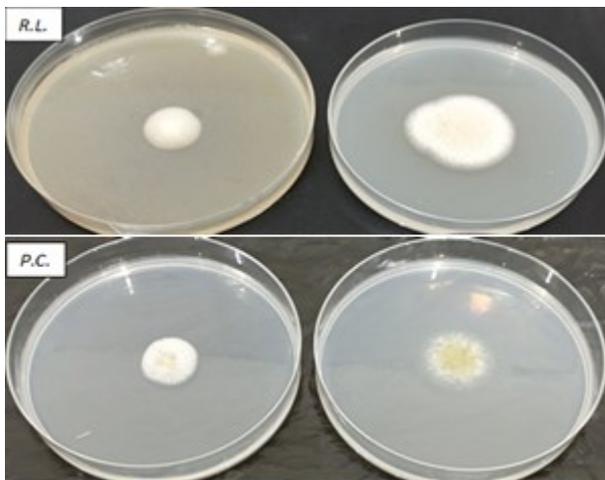
*Foa blanche*



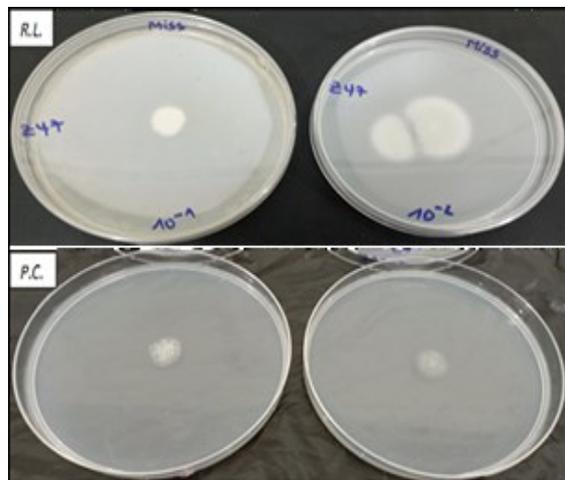
*Foa saumon*



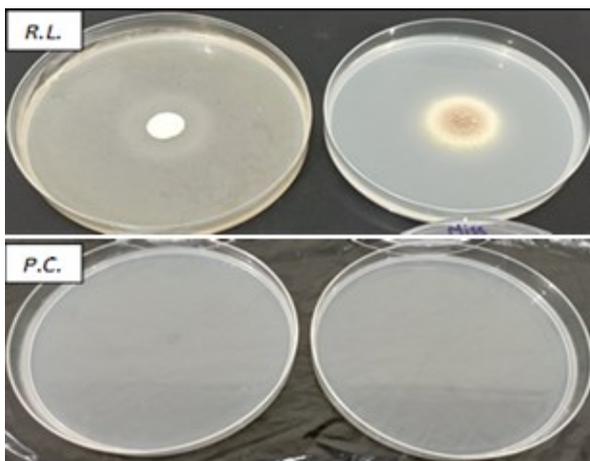
*Arthrinium sp.*



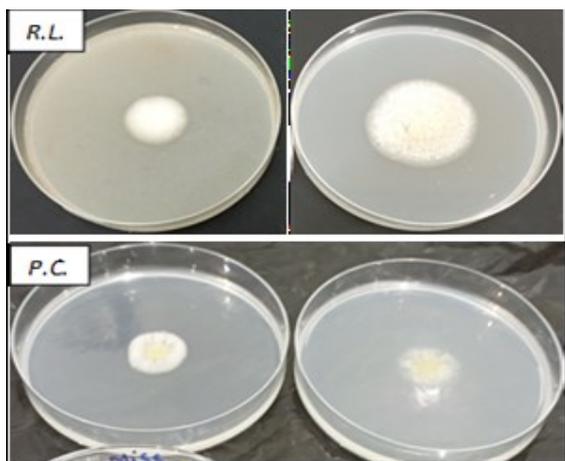
*Byssochlamys spectabilis*



*Aspergillus oryzae*

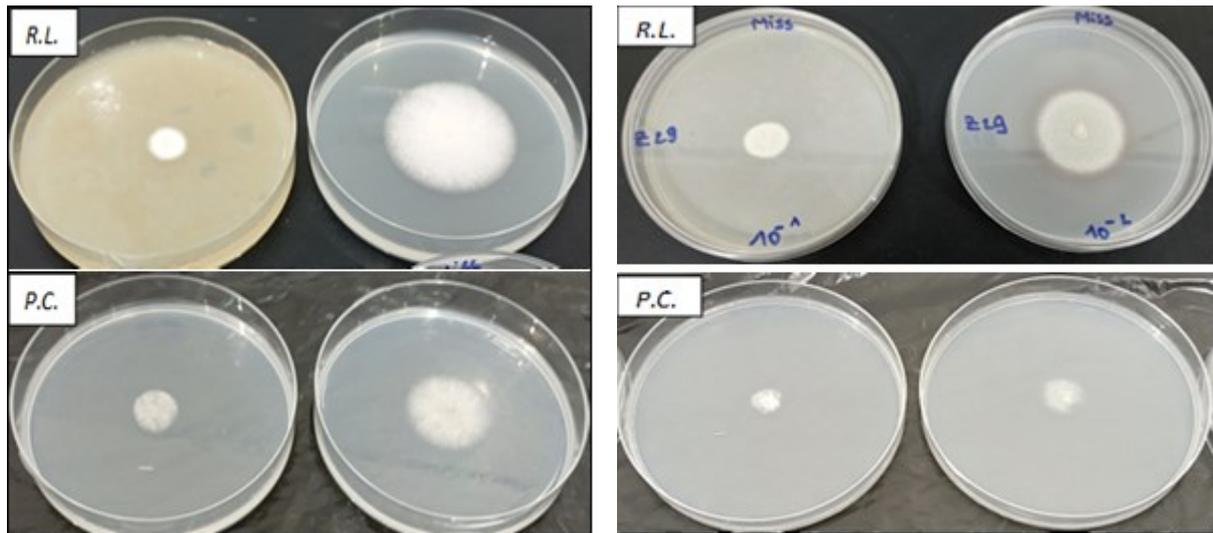


*Penicillium expansum*



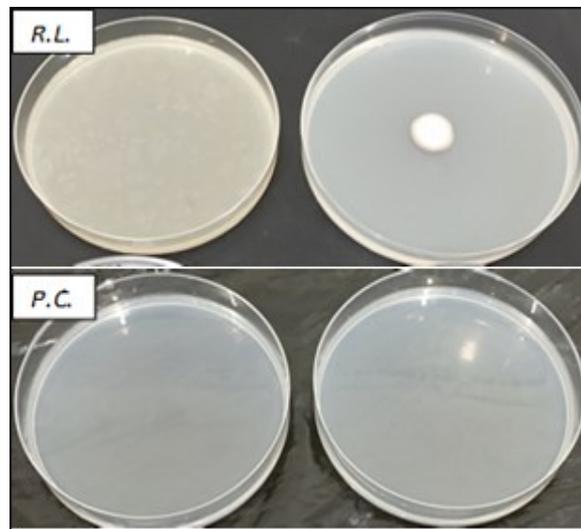
*Aspergillus niger*

*Aspergillus flavus*



*Fusarium sp.*

*Bipolaris sorokiniana*



*Talaromyces funiculosus*

**Photo 34** : l'activité antifongique par la méthode d'inhibition de la croissance radiale sur PDA. (R.L. : HE de *Rhetinolepis lonadioides* Coss. ; P.C. : HE de *Pulicaria crista* ; à gauche : [HE]=1 $\mu$ l ; à droite : [HE]=0.1 $\mu$ l).

# **CONCLUSION & PERSPECTIVE**

La présente étude apporte de nouvelles informations sur les activités biologiques des huiles essentielles des plantes qui n'ont pas été rapportés auparavant, afin de découvrir de nouveaux produits bioactifs naturels. Tout d'abord, les constituants volatils des huiles essentielles de deux plantes de la famille des astéracées, qui poussent à l'état spontané dans la région de Saoura situé au sud-ouest Algérien, ainsi que celui leurs effets biologiques diversifiés.

Cette étude suggère que les huiles essentielles de *Rhadinolobos lonadioides* Coss et *Pulicaria crispa* pourraient être considérées comme une source d'ingrédients pharmacologiques pour traiter les pathologies associées aux infections microbiennes.

De plus, aucune recherche n'a encore été effectuée pour déterminer la composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de *R. lonadioides* ou pour évaluer son activité antimicrobienne. Pour cette raison, notre étude a été entreprise d'évaluer pour la première fois la composition chimique de l'huile essentielle extraite de *R. lonadioides* endémique d'Algérie.

Les analyses chromatographiques et spectrales par le GC-FID et le GC-MS ont montré que l'huile essentielle de *R. lonadioides* est composé de trente-deux molécules, représentant 80,00% de la composition totale, dominée par les hydrocarbures monoterpéniques (53,94%), monoterpènes oxygénés (14,39%), sesquiterpènes oxygénés (3,68%) et les hydrocarbures sesquiterpéniques (7,99%). Les principaux composés sont le  $\beta$ -pinène (41,85 %), la phénanthroquinone (10,39 %) et D-limonène (6,79 %).

Une différence radicale de composition chimique a été observée par rapport à l'autre plante. L'analyse GC-MS de l'huile essentielle de *Pulicaria crispa* a révélé une faible proportion en hydrocarbures monoterpéniques (0,21%), monoterpènes oxygénés (15,57%), et une dominance par les hydrocarbures sesquiterpéniques (45,96%), suivis des sesquiterpènes oxygénés (32,96%) et d'autres composés (5,30 %). Le principal composant était le Caryophyllène E (40,05%) suivi par le Caryophyllène oxide (11,12%).

D'autre part, nous avons évalué les activités biologiques des huiles essentielles extraites des deux plantes. L'activité antibactérienne a été évaluée contre sept bactéries pathogènes pour la santé humaine. L'huile essentielle de *R. lonadioides* a montré une activité antibactérienne contre les bactéries à Gram positif par rapport les bactéries à Gram négatif, suggérant une résistance vis-à-vis des composants de cette huile. Les mêmes résultats ont été observés pour l'huile essentielle de *P. crispa* avec une légère efficacité par rapport à l'autre.

Les CMI obtenues sont importantes et restent des doses faibles variant de 2.71 à 10.86  $\mu\text{l/ml}$ . Des tests de combinaison entre nos échantillons d'huiles essentielles étudiées et des antibiotiques conventionnels ont été évalués, montrant que les deux plantes ont présenté des effets variables entre l'effet synergique et l'antagonisme avec les ATBs utilisés contre les souches bactériennes testées. Ces résultats peuvent offrir des possibilités pour trouver une solution au problème de la résistance bactérienne d'une part, et minimiser les doses des antibiotiques chimiques dans l'autre part.

Par ailleurs, d'autres études ont été menées pour évaluer les propriétés biologiques de ces huiles essentielles, notamment leur effet antifongique. Différents champignons phytopathogène ont été utilisés pour tester l'activité antifongique, notamment plusieurs morphotypes de la souche *Fusarium oxysporum* f. sp *albedinis* qui est l'agent d'un flétrissement vasculaire du palmier-dattier (*Phoenix dactylifera*), ainsi que des souches fongiques mycotoxinogènes.

Les résultats ont montré une forte corrélation entre l'augmentation de la concentration des HEs et la diminution, voire l'inhibition totale de la croissance mycélienne des champignons testés, dans les trois concentrations 1, 0.5 et 0.1  $\mu\text{l/ml}$ . Les pourcentages d'inhibition obtenus indiquent un effet fongicide plus que fongistatique contre la plus part des souches testés, avec des CMI inférieurs ou égaux à 10 $\mu\text{l/ml}$ .

En raison de leur effet inhibiteur sur les champignons phytopathogènes, ces huiles essentielles sont proposée comme alternative aux fongicides chimiques, voire comme modèle pour synthétiser de nouveaux produits bioactifs efficaces.

Ensuite, nous avons évalué l'activité antiradicalaire des deux huiles essentielles. Les résultats ont montré que l'huile de *R. lonadioides* présentait une activité antiradicalaire plus élevée que l'huile de *P. crispera*, avec des valeurs d'IC50 de 2.13  $\mu\text{l/ml}$  et 9.11  $\mu\text{l/ml}$ , respectivement. Ces résultats suggèrent que ces HEs peuvent être considérés comme des nouvelles sources potentielles en tant qu'antiradicalaires naturels. Nous avons également évalué l'effet hémolytique des huiles essentielles sur les globules rouges. Les résultats ont montré qu'aucune forme d'hémolyse n'a été observée pour les concentrations d'huiles essentielles utilisées pour les deux plantes étudiées, même après un certain temps.

En fin, les résultats obtenus ne constituent qu'une seule étape de recherche de l'activité biologique des deux huiles essentielles étudiés, dans la recherche pour un travail plus vaste et plus approfondi, il serait souhaitable de :

- Purifier et isoler les molécules contenues dans les huiles essentielles des deux plantes *Rhinolepis lonadioides* Coss et *Pulicaria crispa* et spécialement les composés majeurs.
- Élucider les mécanismes d'action, l'efficacité et les effets synergiques des composés identifiés ;
- Il est conseillé de multiplier les recherches in vivo par des études histologiques, de réaliser des études sur culture cellulaire pour mieux affiner l'effet de ces huiles essentielles et de leurs composants.

# **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. **Abd-Elgawad A, El-Shamy A, El-Amier Y, El Gendy A, Al-Barati S, Dar B, Al-Rowaily S, Assaeed A. 2020.** Chemical composition variations, allelopathic, and antioxidant activities of *Symphytotrichum squamatum* (Spreng.) Nesom essential oils growing in heterogeneous habitats. *Arabian Journal of Chemistry.*, 13: 4237–4245.
2. **Achika J, Arthur D, Gerald I, Adedayo A. 2014.** A Review on the Phytoconstituents and Related Medicinal Properties of Plants in the Asteraceae Family. IOSR. *Journal of Applied Chemistry.*, 7:1–8.
3. **Adam K, Sivropoulou A, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. 1998.** Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *Journal of Agricultural Food Chemistry.*, 46: 1739-1745.
4. **Adams R. 1989.** Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy. *Academic Press, Inc.*, San Diego.
5. **Adams R. 1995.** Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. *Allured Publishing Corporation.*, Carol Stream, Illinois.
6. **Adams R. 2017.** Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. *Texensis Publishing.*, ed. 4.1.
7. **AFNOR. 1986.** Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles », AFNOR. Paris. P 57.
8. **AFNOR. 1992.** Recueil des normes françaises. Huiles essentielles. Paris.
9. **African Plant Database 2021.** Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève and South African National Biodiversity Institute, Pretoria. Available from: <http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/> recherche.php (Retrieved June 11, 2021).
10. **Agence Nationale de développement de l'investissement. 2007.** Adrar.
11. **Aghajani Z, Masoudi S, Rustaiyan A. 2005.** Volatil oils of *Anthemis talyshensis* A. Fedor and *Sclerorhachis platyrachis* (Boiss.) Podlech ex Rech.f from Iran. *Journal of Essential Oil Research.*, 17: 355-357.
12. **Ahmad I, Aqil F. 2007.** In vitro efficacy of bioactive extracts of 15 Medicinal plants against ESBL-producing multidrug-resistant enteric bacteria. *Microbiological Research*, 162: 264-275.

13. **Ahmed S, Ibrahim M. 2018.** Chemical Investigation and Antimicrobial Activity of *Francoeuria crispa* (Forssk) Grown Wild in Egypt. *Journal of Materials and Environmental Sciences.*, 9(1): 1-6.
14. **Alekshun M, Levy S. 2007.** Molecular mechanism of antibacterial multidrug resistance. *Cell.*, 128: 1037-1050.
15. **Aleksic V, Knezevic P. 2014.** Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L., *Microbiological Research.*, 169: 240–254.
16. **Alessandro V, Claudio F, Giacomo R, Mirella D, Giampiero C, Mauro S, Armandodoriano B. 2016.** Secondary metabolites with ecologic and medicinal implications in *Anthemis cretica* subsp. *petraea* from Majella National Park. *AIMS Molecular Science.*, 3: 648-660.
17. **Ali N, Chhetri B, Dosoky N, Shari K, Al-fahad A, Wessjohann I, Setzer W. 2017.** Antimicrobial, antioxidante, and cytotoxic activities of *Ocimum forskolei* and *Teucrium yemense* (Lamiaceae) essential oils. *Medicines.*, 4:1-17.
18. **Ali N, Farukh S, Mehdi A, Gabrielle M, Andrea P, Norbert A, William N, Juergen S, Ludger W. 2012.** Chemical composition and biological activity of essential oil from *Pulicaria undulata* from Yemen, *Natural product communications.*, 7:257-260.
19. **Almagboul A, Bashir A, Farouk A, Karim A, Salih M, 1985.** *Fitoterapia.*, 56:331-337.
20. **Al-Yahya M, El-Sayed A, Mossa J et al. 1984.** *Journal of Natural Product.*, 51:621.
21. **Amarti F, Satrani B, Aafi A, Ghanmi M, Farah A, Aberchane M, El Ajjouri M, El Antry S, Chaouch A. 2008.** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus capitatus* et de *Thymus bleicherianus* du Maroc. *Journal de Phytothérapie.*, 6 :342–347.
22. **Amorim M, Gil da Costa R, Lopes C, Bastos M. 2013.** Sesquiterpene lactones: Adverse health effects and toxicity mechanisms. *Critical Reviews in Toxicology.*, 43:559–579.
23. **Angioni A, Barra A, Coroneo V, Dessi S, Cabras P. 2006.** Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *Journal of Agriculture Food Chemistry.*, 54:4364–4370.
24. **Archana B, Dasgupta N, De B. 2005.** *In vitro* study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chemistry.*, 90: 727-733.

25. **Arnal-Schnebel B, Hadji-Minaglou F, Peroteau J, Ribeyre F, de Billerbeck V. 2004.** Essential oils in infectious gynaecological disease: a statistical study of 658 cases. *International Journal of Aromatherapy.*, 14 :192–197.
26. **Arpino P, Prévôt A, Serpinet J, Tranchant J, Vergnol A, Witier P. 1995.** Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, *Masson*, Paris.
27. **Astani A, Reichling J, Schnitzler P. 2011.** Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.*, 2011: 1-8.
28. **Babushok V, Linstrom P, Zenkevich I. 2011.** Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data.*, 40(4): 1-6.
29. **Bagamboula C, Uyttendaele M, Candan F, Daferera D, Unli G, Polissiou M, Sokmen A. 2004.** Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Monbret et Aucher ex Benth and *Salvia multicaulis* (Vahl.) *Food Chemistry.*, 84: 519-525.
30. **Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008.** Biological effects of essential oils – a review. *Food Chemical and Toxicology.*, 46:446–475.
31. **Baldovini N, Tomi F, Casanova J. 2001.** Identification and quantitative determination of furanodiene, a heat-sensitive compound, in essential oil by <sup>13</sup>CNMR, *Phytochemistry Analytical.*, 12 :58-63.
32. **Bartikova H, Hanusova V, Skalova L, Ambroz M, Bousova I. 2014.** Antioxidant, pro oxidant and other biological activities of sesquiterpenes. *Current Topics in Medicinal Chemistry.*, 14: 2478–2494.
33. **Battandier J. 1888.** Flore de l'Algérie. Ancienne flore d'Alger transformée contenant la description de toutes les plantes signalées jusqu'à ce jour comme spontanées en Algérie : Dicotylédones. A. Jourdan, Alger / Paris.
34. **Baytop T. 1999.** Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi, Geçmiş ,te ve Bugün (Therapy with Medicinal Plants in Turkey, Past and Present), 2<sup>nd</sup> Ed., Nobel Tıp Kitabevleri, Istanbul.
35. **Bedi S, Tanuja V. 2010.** A Handbook of Aromatic and Essential Oil Plants: Cultivation, Chemistry, Processing and Uses. *Agrobios*, India.
36. **Benzohra I, Megateli M, Berdja R. 2013.** Progression et extension du Bayoud du palmier dattier en Algérie. Proceeding Premier Séminaire International sur : les problématiques agronomiques en régions arides et semi-arides, 28 – 30th October 2013, university of Batna, Batna, Algeria.

37. **Betts T. 2001.** Chemical characterisation of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. *Journal of chromatography A.*, 936:33–46.
38. **Bhat R, Vasanthi S. 2003.** Mycotoxin food safety risks in developing countries. Food Safety in Food Security and Food Trade. Vision 2020 for Food, *Agriculture and Environment.*, 3:1-2.
39. **Bicchi C, Frattini C, Raverdino V. 1987.** Considerations and remarks on the analysis of *Anthemis nobililis* L. essential oil by capillary gas chromatography and “hyphenated” techniques, *Journal of Chromatography A.*, 411:237-249.
40. **Bohlmann F, Knoll K, El-Emary N. 1979.** *Phytochemistry.*, 18:1231.
41. **Bohm B, Stuessy T. 2001.** Flavonoids of the Sunflower Family (Asteraceae); *Springer Science & Business Media*: Berlin/Heidelberg, Germany.
42. **Bomfim N, Nakassugi L, Oliveira J, Kohiyama C, Mossini S, Grespan R, Nerilo S, Mallmann C, Filho B, Machinski M. 2015.** Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. *Food Chemistry.*, 166:330–336.
43. **Boulos L. 1995.** Flora of Egypt. (Verbenaceae-Compositae), Cairo: *Al Hadara Publishing.- illus*, col. illus 3.
44. **Boulos L. 2002.** Flora of Egypt .*Al-Hadara publishing*. Cairo, Egypt. 3.
45. **Boumaraf M, Ratiba M, Samira B, Jean-claude C, Pierre C, Fadila B, Samir B. 2016.** Essential Oil Composition of *Pulicaria undulate* (L.) DC.(Asteraceae) Growing in Algeria, *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research.*; 8:746 749.
46. **Botton R, Breton A, Fevre M, Guy P, Larpent J, Veau P. 1985.** Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Biotechnologies. Masson, Bowles E. 2003. *Chemistry of Aromatherapeutic Oils.* Allen & Unwin. 139-145.
47. **Bradesi P, Bighelli A, Tomi F, Casanova J. 1996.** L’analyse des mélanges complexes par RMN du carbone-13 – Partie 1. *Can. Journal of Application in Spectroscopy.*, 41(1) : 15-24.
48. **Bradesi P, Bighelli A, Tomi F, Casanova J. 1996.** L’analyse des mélanges complexes par RMN du carbone-13 – Partie 2. *Can. Journal of Application in Spectroscopy.*, 41 (2) : 41-50.

49. **Bradesi P. 1995.** Apport de la RMN du carbone-13 à l'analyse des mélanges naturels dans le domaine de l'agroalimentaire : huiles essentielles et autres productions végétales, Thèse de doctorat. Université de Corse.
50. **Bruno M, Banoi M, Vassallo N, Gedris T, Herz W. 1997.** Guaianolides and other terpenoids from *Anthemis aetnensis*. *Phytochemistry.*, 45: 375-377.
51. **Buchbauer G. 2010.** In Handbook of Essential oils. Science, Technology and Applications, K. H. C. Baser, G. Buchbauer (eds). CRC Press, *Taylor and Francis*; 235–280.
52. **Burgess L, Nelson P, Summerell B. 1989.** Variability and Stability of morphological characters of *Fusarium oxysporum* isolated from soils in Australia. *Mycologia*, 81: 818-822.
53. **Burt S. 2004.** Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—a review, *International Journal of Food Microbiology*, 94 (3): 223–253.
54. **Caillet S, Lacroix M. 2007.** Les huiles essentielles: leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) INRS-Institut Armand-Frappier, Université de Laval (Québec).
55. **Cambon A. 1989.** La spectrométrie de masse multidimensionnelle et ses applications à l'analyse des mélanges complexes, Science, Technique, *Technologie.*, 11 : 4-10.
56. **Careri M, Mangia A. 1996.** Multidimensional detection methods for separations and their application in food analysis, *Trends Analytical Chemistry.*, 15(10) : 538-550.
57. **Carini M, Aldini G, Furlanetto S, Stefani R, Maffei Facino R. 2001.** LC coupled to ion trap MS for the rapid screening and detection of polyphenol antioxidants from *Helichrysum stoechas*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.*, 24:517-526.
58. **Carlos G, Francisco J, Fernández A, María C, Victoria E, González R, Eva L, Jesús M. 2012.** Molecular Microbiology Applied to the Study of Phytopathogenic Fungi, dans Sameh Magdeldin, Gel Electrophoresis - Advanced Techniques.
59. **Carson C, Mee B, Riley T. 2002.** Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*, 46(6):1914–1920.
60. **Cazaussus A, Pes R, Sellier N, Tabet J. 1988.** GC-MS and GC-MS-MS analysis of a complex essential oil, *Chromatographia.*, 25(10): 865-869.

61. **Celiktas O, Kocabas E, Bedir E, Sukan F, Ozek T, Baser K. 2007.** Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarnus officinalis*, depending on location and seasonal variations, *Food Chemistry.*, 100:553-559.
62. **Chami F, Chami N, Bennis S, Trouillas J, Remmal A. 2004.** Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.*, 54: 909–914.
63. **Chaudhary S. 2000.** In: Flora of the kingdom of Saudi Arabia (Part 3), vol. 2. Ministry of Agriculture and Water, Riyadh, Saudi Arabia, 432.
64. **Chhetri K, Awadh A, Setzer W. 2015.** A survey of chemical compositions and biological activities of Yemeni aromatic medicinal plants, *Medicines.*, 2:67-92.
65. **Clardy J, Walsh C. 2004.** Lessons from natural molecules. *Nature.*, 432 :829–837.
66. **CLSI. 1997.** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 4th ed. Approved standard. M7-A4. Wayne, PA, USA.
67. **CLSI. 2006.** "Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically." *Clinical and Laboratory Standards Institute.*, 26 :2.
68. **CLSI. 2015.** Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 10 th ed. Approved standard. M07-A10. Wayne, PA, USA.
69. **Cocking T, Middleton G. 1935.** Improved method for the estimation of the essential oil content of drugs. *Quarterly Journal of Pharmacy and Pharmacology.*, 8:435–442.
70. **Coleman II W, Gordon B, Lawrence B. 1989.** Examinations of the matrix isolation fourier transform infrared spectra of organic compounds: part XII, *Applied Spectroscopy.*, 43(2): 298-304.
71. **Coleman III W, Gordon B. 1991.** Gas chromatography-matrix isolation-Fourier transform-infrared spectrometry of natural products, *Journal of Chromatographic Science.*, 29 (9):371-376.
72. **Collu F, Bonsignore L, Casu M, Floris C, Gertsch J, Cottiglia F. 2008.** New cytotoxic saturated and unsaturated cyclohexanones from *Anthemis maritima*; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.*, 18: 1559-1562.
73. **Constantin E. 1996.** Spectrométrie de masse, *Lavoisier Tec & Doc*, Paris, 1-14.
74. **Cox S, Gustafson J, Mann C et al. 1998.** Tea tree oil causes K<sup>+</sup> leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology.*, 26 (5): 355–358.
75. **Cremin P, Donnelly D, Wolfender J, Hostettmann K. 1995.** Liquid chromatographic-thermospray mass spectrometric analysis of sesquiterpenes of

- Armillaria (Eumycota: Basidiomycotina) species. *Journal of Chromatography A.*, 710:273-285.
76. **Croteau R., Kutchan T., Lewis N., 2000.** Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists.*
77. **Dabbah R, Edwards V, Moats W. 1970.** Antimicrobial action of some citrus fruit oils on selected food-borne bacteria. *Applied in Microbiology.*, 19: 27-30.
78. **Dahham S, Tabana Y, Iqbal M, Ahamed M, Ezzat M, Majid A. 2015.** The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene  $\beta$ -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules.*, 20 (7): 11808-11829.
79. **Davoud S, Askar G, Javad A. 2013.** Essential Oil Composition of *Pulicaria gnaphalodes* (Vent.) Boiss. Growing in Iran. *Taylor & Francis.*, 16 (2): 252 – 256.
80. **De Hoffmann E, Charette J, Stroobant V. 1999.** Spectrométrie de Masse, 2e édition, Librairie Dunod, Paris.
81. **Dilip K. 2003.** Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications, *CRC Press.*, 700.
82. **Djellouli M, Moussaoui A, Benmehdi H, Ziane L, Belabbes A, Badraoui M. 2013.** Ethnopharmacological study and phytochemical screening of three plants (Asteraceae family) from the region of south West Algeria. *Asian journal of natural & applied sciences.*, 2:59-65.
83. **Djerbi et al. 1985.** Compatibilité végétative d'isolats du *Fusarium oxysporium.f.sp albedinis* et *Fusarium oxysporium* de la rhizosphère du palmier dattier et des sols de palmerais. *Phytopathologie-mediterranien.*, 1999: 30.
84. **Djerbi M. 1990.** Characterization of *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*, the causal agent of Bayoud disease on the basis of vegetative compatibility. In: Proceedings of the Eighth Congress of the Mediterranean Phytopathological Union. Agadir. Maroc. 533.
85. **Dobignard A, Chatelain C. 2011.** Index synonymique de la flore de l'Afrique du Nord, 2. – Genève.
86. **Doi Y, Arakawa Y. 2007.** 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clinical Infection Disease.*, 45:88–94.
87. **Dorman H, Deans S. 2000.** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology.*, 88: 308-316.

88. **Dridi I, Haouel-Hamdi S, Cheraief I, Mediouni Ben Jemâa J, Landoulsi A, Chaouch R. 2020.** Essential oil from flowering tops of *Lavandula dentata* (L.). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and insecticidal activities. *Journal of Essential oil Bearing Plants*.
89. **Dridi I, Haouel-Hamdi S, Cheraief I, Mediouni Ben Jemâa J, Landoulsi A, Chaouch R. 2020.** Essential oil from flowering tops of *Lavandula dentata* (L.). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and insecticidal activities. *Journal of Essential oil Bearing Plants.*, 24: 632-647.
90. **Dugo G, Di Giacomo A. 2002.** The genus *Citrus*. *Taylor & Francis Publishing*, London.
91. **Dung N, Kim J, Kang S. 2008.** Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. *Food and Chemical Toxicology.*, 46: 3632-3639.
92. **Ebtihal Alsadig A, Ali Mahmoud M, Magda Abker O. 2020.** Antimicrobial activity, phytochemical screening of crude extracts, and essential oils constituents of two *Pulicaria spp.* growing in Sudan. *Scientific Reports.*, 10:17148.
93. **Edris A. 2007.** Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research.*, 21:308–323.
94. **El Shamy A, Abd-Elgawad A, El-Amier Y, El Gendy A, Al-Rowaily S. 2019.** Interspecific variation, antioxidant and allelopathic activity of the essential oil from three *Launaea* species growing naturally in heterogeneous habitats in Egypt. *Flavour and Fragrans Journal.*, 34: 316–328.
95. **El-Abed N, Harzallah-Skhiri F, Boughalleb N. 2010.** Agricultural Segment, 1(2):1530.
96. **EL-Egami A. 1989.** Studies on volatile oils of *Pulicaria* herbs. M.Sc. thesis. Faculty of Agriculture, University of Khartoum, Sudan.
97. **EL-Kamali H, Mohammed O, Osama I, Sabir S. 2009.** Phytochemical analysis of the essential oil from aerial parts of *Pulicaria undulata* (L.) Kostel from Sudan. *Ethnobotanical Leaflets.*, 4:6-10.
98. **Ellof J. 1998.** *Journal of Ethnopharmacology.*, 60: 1-6.
99. **Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Ghannoum M, Manavathu E, Ostrosky-Zeichner L, Pfaller M, Rinaldi M, Schell W, Walsh T. 2007.** Quality control and reference guidelines for clsi broth microdilution method (m38-a document) for susceptibility

- testing of anidulafungin against molds. *Journal of clinical microbiology.*, 45(7): 2180–2182.
100. **Ezoubeiri A, Gadhi C, Fdil N, Benharref A, Jana M, Vanhaelen M. 2005.** Isolation and antimicrobial activity of two phenolic compounds from *Pulicaria odora* L. *Journal of Ethnopharmacology.*, 99(2): 287-292
101. **Fadli M, Bolla J, Mezrioui N, Pagès J, Hassani L. 2014.** First evidence of antibacterial and synergistic effects of *Thymus riatarum* essential oil with conventional antibiotics. *Industrial Crops and Products.*, 61: 370-376.
102. **Falk A, Smolenski S, Bauer L, Bell C. 2000.** Isolation and identification of three new flavones from *Achillea millefolium* L. *Journal of Pharmaceutical Sciences.*, 64: 1838-1842.
103. **Farzaneh M, Kiani H, Sharifi R, Reisi M, Hadian J. 2015.** Chemical composition and antifungal effects of three species of *Satureja* (*S. hortensis*, *S. spicigera*, and *S. khuzistanica*) essential oils on the main pathogens of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology.*, 109: 145–151.
104. **Fernández D, Ouinten M, Tantaoui A, Geiger J, Daboussi M, Langin T. 1998.** Fot1 insertions in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* genome provide diagnostic PCR targets for detection of the date palm pathogen. *Applied and Environmental Microbiology.*, 64: 633–636.
105. **Fitzgerald D, Stratford M, Gasson M. 2004.** Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *Journal of Applied Microbiology.*, 97(1): 104–113.
106. **Formáček V, Kubeczka K. 1982.** Essential oils analysis by capillary gas chromatography and carbon-13 NMR spectroscopy, Ed. *John Wiley & Sons*, Chichester.
107. **Francisco J, Fernandez A, Maria C, Carlos G, Inmaculada V, Jesus M. 2014.** Proteomic Advances in Phytopathogenic Fungi. *Current Proteomics.*, 4(2): 79-88.
108. **Francomano F, Caruso A, Barbarossa A, Fazio A, La Torre C, Ceramella J. 2019.** B-caryophyllene: A sesquiterpene with countless biological properties. *Applied Scientific.*, 9(24): 5420.
109. **Gachkar L, Yadegari D, Rezaei M, Taghizadeh M, Astaneh S, Rasooli I. 2007.** Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry.*, 102: 898-904.

110. **Galambosi S, Galambosi B. 1992.** Holm. *Finland Journal of Essential Oil Research.*, 4 :375.
111. **Galvao L, Furletti V, Bersan S, DaCunha M, Ruiz A, Carvalho J, Sartoratto A, Rehder V, Figueira G, Teixeira Duarte M, Ikegaki M, De Alencar S, Rosalen P. 2012.** Antimicrobial activity of essential oils against *Streptococcus mutans* and their antiproliferative effects. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.*, 2012: 1-12.
112. **Ganzler K, Salgo A, Valko K. 1986.** A novel sample preparation method for chromatography. *Journal of Chromatography A*, 371: 299-306.
113. **Gherib M, Bekhechi C, Bekkara F, Bighelli A, Casanova J, Tomi F. 2016.** Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from Aerial Parts of Algerian *Pulicaria mauritanica*. *Natural Product Communications.*, 11 : 1 – 4.
114. **Gonenc T, Argyropoulou C, Erdogan T, Gousiadou C, Juergenliemk G, Kivçak B, Skaltsa H. 2011.** Chemical constituents from *Anthemis wiedemanniana* Fisch. & Mey. *Biochemical Systematics and Ecology.*, 39: 51–55.
115. **Goossens H, Guillemot D, Ferech M, Schlemmer B, Costers M, van Breda M, Baker L, Cars O, Davey P. 2006.** National campaigns to improve antibiotic use. *European Journal of Clinical Pharmacology.*, 62: 373-379.
116. **Gordon R, Haynes W, Pang C. 1973.** The genus *Bacillus*. *Agriculture Handbook*. N° 427, ARS-USDA, Washington (USA).
117. **Gould I. 2008.** The epidemiology of antibiotic resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents.*, 32 : 2-9.
118. **Grace M. 2002.** Chemical composition and biological activity of the volatiles of *Anthemis melampodina* and *Pluchea dioscoridis*. *Phytotherapy Research.*, 16: 183-185.
119. **Guiraud. 1998.** Microbiologie alimentaire. *Ed Dunod*, Paris.
120. **Guo Y, Li Y, Xu J, Watanabe R, Oshima Y, Yamakuni T, Ohizumi Y. 2006.** Preliminary Phytochemical and Antimicrobial screening of *Bucharris gaudichaudiana*. *Journal of Natural Product.*, 69: 274.
121. **Guragaç Dereli F, Ilhan M, EsraKüpeliAkkol E. 2018.** Discovery of new antidepressant agents: In vivo study on *Anthemis wiedemanniana* Fisch. & Mey. *Journal of Ethnopharmacology.*, 226: 11–16.
122. **Hall-Stoodley L, Costerton J, Stoodley P. 2004.** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology.*, 2: 95–108.

123. **Hammer K, Carson C, Riley T, Nielsen J. 2006.** A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Food and Chemical Toxicology.*, 44: 616–625.
124. **Hammer K, Carson C, Riley T. 1999.** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology.*, 86: 985–990.
125. **Hammer K, Carson C, Riley T. 1999.** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology.*, 86: 985-990.
126. **Hammer K, Carson C. 2011.** Antibacterial and antifungal activities of essential oils. In: Thormar, H. (Ed.), *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents.* John Wiley & Sons, Ltd, UK, 255–306.
127. **Hasnat N, Abdelouahid D. 2013.** Screening phytochimique et activite antimicrobiennes d'huile essentielle de *Rhazinolepis lonadioides*, poussant à l'état spontané dans la région de Bechar. *PhytoChem & BioSub Journal.*, 7(1) : 29-34.
128. **Hedges L, Wilkins C. 1991.** Component analysis of Eucalyptus oil by gas chromatography-fourier transform-infrared spectrometry-mass spectrometry, *Journal of Chromatographic Science.*, 29: 345-350.
129. **Helander I, Alakomi H, Latva-Kala K. 1998.** Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 46: 3590–5.
130. **Hemaiswarya S, Doble M. 2009.** Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against gram-negative bacteria. *Phytomedicine.*, 16: 997–1005.
131. **Henni J, Fortas Z, Geiger J. 1998.** Etude de la compatibilité végétative chez des souches de *Fusarium Oxysporum* isolées dans la région Ouest de l'Algérie. *Phytopathologia Mediterranea.*, 37 : 69-74.
132. **Hirabayashi A, Sakairi M, Takada Y, Koizumi H. 1997.** Recent progress in atmospheric pressure ionization mass spectrometry, *TrAC Trends in Analytical Chemistry.*, 16 (1): 45-52.
133. **Holla M, Svajdlenka E, Vaverkova S, Zibrunova B, Tekel J, Havranek E. 2002.** Composition of the oil from flower heads of *Anthemis tinctoria* L. cultivated in Slovak republic. *Journal of Essential Oil Research.*, 12: 714-716.
134. **Holla M, Svajdlenka E, Vaverkova S, Zibrunova B, Tekel J, Havranek E. 2000.** Composition of the oil from the flowerheads of *Anthemis tinctoria* L. cultivated in Slovak Republic. *Journal of Essential Oil Research.*, 12: 714–716.
135. **Hubert R. 1992.** Epices et aromates. *Edition Tec & Doc*, Lavoisier, France.

136. **Hussain A, Anwar F, Chatha S, Jabbar A, Mahboob S, Nigam P. 2010.** *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology.*, 41: 1070-1078.
137. **Hussain A, Anwar F, Hussain S, Przybylski R. 2008.** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry.*, 108: 986–995.
138. **Jafarinia M, Jafarinia M. 2019.** A Review of Medicinal Properties of some Asteraceae Family Plants on Immune System. *Rep. Health Care.*, 5: 1–7.
139. **Jalali-Heravi M, Moazeni-Pourasil R, Sereshti H. 2015.** Elimination of chromatographic and mass spectrometric problems in GC-MS analysis of lavender essential oil by multivariate curve resolution techniques: improving the peak purity assessment by variable size moving window evolving factor analysis. *Journal of Chromatography B.*, 83(9): 983-984.
140. **James P. 1990.** Flora of Eastern Saudi Arabia. *London: Kegan Paul Int.*
141. **Jansen A, Cheffer J., Svendsen A. 1987.** *Planta Med.*, 40: 395-398.
142. **Javadinamin A, Jinous A. 2014.** Essential Oil Composition of *Francoeuria undulata* (L.) Lack. Growing Wild in Iran, *Journal of Essential Oil Bearing Plants.* 17:875-879.
143. **Javidnia K, Miri R, Kamalinejad M, Sarkarzadeh H, Jamalnia A. 2004.** Chemical composition of the essential oils of *Anthemis altissima* L. grown in Iran. *Flavour and Fragrance Journal.*, 19: 213-216.
144. **Jayant S, Sankunny M. 2014.** A status review on the medicinal properties of essential oils. *Journal Industrial Crops and Products.*, 62 :250–264.
145. **Jessica M, Blair A, Mark A, Webber, Alison J, Baylay, David O, Ogbolu, Laura J, Piddock V. 2015.** Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Reviews.*, 15: 42-51.
146. **Jim Deacon, 2005.** « Chapter 14: Fungi as plant pathogens », *Blackwell Publishing.*
147. **Joulain D, König W, 1998.** The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons, Ed. E.B.-Verlag, Hambourg.
148. **Joulain D. 1994.** Modern methodologies applied to the analysis of essential oil and other complex natural mixture: use and abuse, *Perfumer & Flavorist.*, 19: 5-17.

149. **Ju J, Xu X, Xie Y, Guo Y, Cheng Y, Qian H, Yao W. 2017.** Inhibitory effects of cinnamon and clove essential oils on mold growth on baked foods. *Food Chemistry.*, 240 (1): 850–855.
150. **Judd W, Campbell C, Kellogg E, Stevens P, 1999.** Plant Systematics: A Phylogenetic Approach. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.) (Sharma, O.P., 2004. *Plant Taxonomy*. Tata Mc Grow Hill Publishing Co. Ltd. New Delhi, India. 312-318.
151. **Jung E. 2009.** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Chrysanthemum indicum* against oral bacteria. *Journal of Bacteriology and Virology.*, 39: 61-69.
152. **Kathiravan M, Salake A, Chothe A, Dudhe P, Watode R, Mukta M, Gadhwe, S., 2012.** The biology and chemistry of antifungal agents: a review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.*, 20: 5678–5698.
153. **Katooli N, Maghsodlo R, Razavi S. 2011.** “Evaluation of eucalyptus essential oil against some plant pathogenic fungi, *Journal of Plant Breeding and Crop Science.*, 3(2): 41–43.
154. **Kendour Z, Ouahrani M, Ghiaba Z, Dendougui H, Belguidoum M. 2016.** Antibacterial activity of some Algerian Medicinal plants. *Der Pharma Chemica*, 8(7): 200-202.
155. **Kenoufi M. 2018.** Caractérisation histologique, caryologique, phytochimique et activités biologiques de *Senecio giganteus Desf* et *S. jacobaea L.* Thèse doctorat, Université Ferhat Abbas Sétif 1, 73-74.
156. **Killian C, Maire R. 1930.** Le Bayoud, maladie du dallier. *Bull. Soc. Hist. nat. Afr.*, 21: 89-101.
157. **Kivcak B, Mert T, Saglam H, Ozturk T, Kurkcuglu M, Baser K. 2007.** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Anthemis wiedemanniana* from Turkey. *Chemistry of Natural Compounds.*, 43: 47-51.
158. **Kizil S, Çakmak S, Kirici M, Inan A. 2008.** Comprehensive study on safflower (*carthamustinctoriusL.*) In semi-arid conditions. *Journal of biotechnology.*, 12: 23.
159. **Koc S, Isgor B, Isgor Y, Shomali Moghaddam N, Yildirim O. 2015.** The potential medicinal value of plants from Asteraceae family with antioxidant defense enzymes as biological targets. *Pharmaceutical Biology.*, 53: 746–751.
160. **Kollanoor A, Hoagland T, Venkitanarayanan K. 2010.** Effect of subinhibitory concentrations of plant-derived molecules in increasing the sensitivity of multidrug-

- resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 to antibiotics. *Foodborne Pathogens Disease.*, 7:1165–70.
161. **Korkmaz M, Karakus S. 2015.** Traditional uses of medicinal plants of Üzümlü district, Erzincan, Turkey. *Pak. J. Bot.*, 47: 125-134.
162. **Kováts E. 1965.** Gas Chromatographic characterization of organic substances in the retention index system, in *Advances in Chromatography.*, 7: 229-247.
163. **Kultur S. 2007.** Medicinal plants used in Kırklareli Province (Turkey). *Journal of Ethnopharmacology.*, 111: 341–364.
164. **Kürkçüoğlu M, Tosun F. 2020.** Determination of the volatile compounds of *Anthemis cretica* sub sp. *anatolica* (Boiss.) Grierson Nat. Nat. *Volatiles Essential Oils.*, 7(2): 10-16.
165. **Lang G, Buchbauer G. 2012.** A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals: a review. *Flavour and Fragrance Journal.*, 27: 13–39.
166. **Lazazzara V, Perazzolli M, Pertot I, Biasioli F, Puopolo G, Cappellin L. 2017.** Growth media affect the volatilome and antimicrobial activity against *Phytophthora infestans* in four *Lysobacter* type strains, *Microbiol Research.*, 201: 52-62.
167. **Lei Lei L, Jun Li Y, Yan Ping S. 2010.** Phytochemicals and biological activities of *Pulicaria* species, *Chemistry & biodiversity.*, 7: 327-349.
168. **Leite A, Lima O, Souza E, Diniz F, Trajano V, Medeiros I. 2007.** Inhibitory effect of  $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.*, 43: 121-126.
169. **Leszczynska D. 2007.** Management de l'innovation dans l'industrie aromatique: Cas des PME de la région de Grasse. *Editions le Harmattan*; Paris, France.
170. **Li H, Wong C, Cheng K, Chen F. 2008.** Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT-Food Science Technol.* 41: 385-390.
171. **Lis B, Olas B. 2019.** Pro-health activity of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) and its food products—history and present. *Journal of Functional Foods.*, 59: 40–48.
172. **Longbottom C, Carson C, Hammer K, Mee B, Riley T. 2004.** Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energy-dependent cellular processes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.*, 54(2): 386–392.

173. **Longevialle P. 1981.** Spectrométrie de masse des substances organiques, *Masson*, Paris.
174. **Lopez-Romero J, Gonzalez-Rios H, Borges A, Simoes M. 2015.** Antibacterial effects and mode of action of selected ~ essential oils components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.*, 9.
175. **Lorenzi V, Muselli A, Bernardini A. 2009.** Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from gramnegative species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*, 53:2209–11.
176. **Mahmoud B, Yamazaki K, Miyashita K, IL-Shik S, Dong-Suk C, Suzuki T. 2004.** Bacterial microflora of carp (*Cyprius carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds. *Food Microbiology.*, 21: 657-666.
177. **Makhloufi A, Bouyahyaoui A, Seddiki N, Benlarbi L, Mebarki L, Boulanouar A. 2014.** Phytochemical screening and anti-listerial activity of essential oil and crude extracts from some medicinal plants growing wild in bechar (south west of algeria). *International Journal of Phytotherapy.*, 4(2): 95-100.
178. **Malençon G . 1934.** Nouvelles observations concernant l'etiologie du Bayoud. In *C.R. Hebd. Seanc. Acad. Sci. Paris*, 196: 1259-1262.
179. **Mallappa K, Mohd S, Uma R. 2016.** Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: *An Updated Review*.
180. **Manel B, Ratiba M, Samira B, Jean-claude C, Pierre C, Fadila B, Samir B. 2016.** Essential Oil Composition of *Pulicaria undulate* (L.) DC. (Asteraceae) Growing in Algeria. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research.*, 8:746-749.
181. **Maria J, Paulina B. 2007.** Baccharis (Compositae): a review update. Marigold petals. *Journal of Food Science.*, 41: 163-164.
182. **Marriott P, Shellie R, Cornwell C. 2001.** Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils, *Journal of Chromatography A.*, 936: 1-22.
183. **Marriott P, Shellie R, Fergeus J, Ong R, Morrison P. 2000.** High resolution essential oil analysis by using comprehensive gas chromatographic methodology, *Flavour and Fragrance Journal.*, 15: 225-239.
184. **Martin M, John M, Saifuddin F, Wycliffe W. 2016.** Chemical composition and antifungal activity of essential oils of *Tagetes minuta* (Asteraceae) against selected

- phytopathogenic fungi. *American Journal of Essential Oils and Natural Products.*, 4(3): 16-26.
185. **Martin Muthee G, Angeline W, John M. 2017.** Antifungal Activity of Essential Oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. against *Selected Fusarium spp.* *Hindawi International Journal of Microbiology.*, 2017: 1-7.
186. **Martino M, Stabler R, Zhang Z, Farthing M, Wren N, Dorrell N. 2001.** *Helicobacter pylori* pore-forming cytolysin orthologue TlyA possesses in vitro hemolytic activity and has a role in colonization of the gastric mucosa, *Infection and Immunity.*, 69: 1697–1703.
187. **Masotti V, Juteau F, Bessie`re J, Viano J. 2003.** Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *Journal of Agriculture Food Chemistry.*, 51: 7115–7121.
188. **Mazari K, Bendinerad N, Benkhechi C, Fernandez X. 2010.** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil isolated from Algerian *Juniperus phoenicea* L and *cupressus sempervirens*. *Journal of Medicinal Plants Research.*, 4 (10): 959– 964.
189. **Mc Lafferty F, Michnowicz J. 1992.** State-of-the-art GC-MS, *Chemtech.*, 182-189.
190. **Mc Lafferty F, Stauffer D. 1989.** The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data, 1-7, A Wiley-Interscience Publication, *John Wiley & Sons*, New York.
191. **Mc Lafferty F, Stauffer D. 1994.** Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th ed. Mass spectrometry library search system BenchTop/PBM, version 3.10d. Palisade Co., *Newfield.*
192. **Mc Lafferty F, Tureček F. 1993.** Interpretation of mass spectra, Fourth edition, University Science Books, Sausalito, California.
193. **Médail F, Quézel P. 1995.** Conséquences écologiques possibles des changements climatiques sur la flore et la végétation du bassin méditerranéen. *Bocconea.*, 16(1): 397-422.
194. **Meyer-Warnod B. 1984.** Natural essential oils: extraction processes and applications to some major oils. *Perfumer & Flavorist.*, 9: 93-103.
195. **Mezouari A. 2020.** Etude de l'activité anti *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* d'*Acacia raddiana* de la région de Bechar. Thèse de doctorat. Université de Béchar. 62-67.
196. **Misra B, Dey S. 2013.** Evaluation of in vivo anti-hyperglycemic and antioxidant potentials of -santalol and sandalwood oil. *Phytomedicine.*, 20: 409–416.

197. **Mohamed M, Wadah j, Elrashied A, Mona S, Osama H. 2020.** *Pulicaria crispa* (Forssk) Oliv: A Review of Ethnopharmacology, Phytochemistry and Biological Activities. *Khartoum Journal of Pharmaceutical Sciences.*, 1(1): 13-25.
198. **Mondello L, Dugo G, Dugo P, Bartle K. 1996.** On line HPLC-HRGC in the analytical chemistry of Citrus essential oils. *Perfumer & Flavorist.*, 21: 25- 49.
199. **Moon S, Kim H, Cha J. 2011.** Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. *Archives of Oral Biology.*, 56: 907–16.
200. **Morin P, Caude M, Richard H, Rosset R. 1986.** Semipreparative separation of terpenoids from essential oils by high-performance liquid chromatography and their subsequent identification by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography.*, 363: 57-69.
201. **Mothana R, Gruenert R, Bednarski P, Lindequist U. 2009.** Evaluation of the in vitro anticancer, antimicrobial and antioxidant activities of some Yemeni plants used in folk medicine. *Pharmazie.*, 64: 260–268.
202. **Munari F, Dugo P, Cotroneo A. 1990.** Automated on-line HPLC-HRGC with gradient of elution and multiple GC transfert applied to the characterization of Citrus essential oils. *Journal of High Resolution Chromatography.*, 13: 56-61.
203. **Munim A, Rod M, Tavakoli H, Hosseinian F. 2017.** An Analysis of the Composition, Health Benefits, and Future Market Potential of the Jerusalem artichoke in Canada. *Journal of Food Research.*, 6: 69.
204. **Munjal V, Nadakkakath A, Sheoran N, Kundu A, Venugopal V, Subaharan K, Rajamma S, Eapen S, Kumar A. 2016.** Genotyping and identification of broad-spectrum antimicrobial volatiles in black pepper root endophytic biocontrol agent, *Bacillus megaterium* BP17, *Biological Control.*, 92: 66-76.
205. **Munson B, Field F. 1966.** Chemical ionization mass spectrometry. I. General introduction. *Journal of the American Chemical society.*, 88: 2621-2630.
206. **National Institute of Standards and Technology. 1999.** PC Version 1.7 of The NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, *The Perkin Elmer Corporation.*
207. **Nawal C, Barnes J, Anderson L, Phillipson J. 1996.** Herbal Medicines. A guide for health-care professionals. Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, London 2: 296.
208. **NCCLS. 2006** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, NCCLS document M7-A7, Wayne, USA.

209. **Negre R. 1962.** Petite flore des régions arides du Maroc occidental. *Centre national de la recherche scientifique*. 2: 1961 – 1982.
210. **Nematollahi F, Abdolhossein R, Kambiz L, Marjan N, Shiva M. 2006.** Essential Oil Composition of *Artemisia biennisz* Willd. And *Pulicaria undulata* (L.) CA Mey., Two Compositae Herbs Growing Wild in Iran. *Journal of Essential Oil Research.*, 18:339-341.
211. **Newman D, Cragg G, Snader K. 2003.** Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products.*, 66: 1022-1037.
212. **Nickavar B, Mojab F. 2003.** *Fitoterapia.*, 74: 390.
213. **Nikolić M, Stevović S. 2015.** Family Asteraceae as a sustainable planning tool in phytoremediation and its relevance in urban areas. *Urban For. Urban Green.*, 14:782–789.
214. **Normak H, Normak S. 2002.** Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of internal medicine.*, 252: 91-106.
215. **Oberprieler C. 1998.** The systematics of *Anthemis* L. (Compositae, Anthemideae) in W and C North Africa. *Boccone.*, 9: 1-328.
216. **Olsen M, Jonsson N, Magan N, Banks J, Fanelli C, Rizzo A, Haikar A, Dobson A, Frisvad J, Holmes S, Olkku J, Persson S, Börjesson T. 2003.** Prevention of Ochratoxin A in Cereals. OTA PREV. Final report. *Quality of Life and Management of Living Resources.*
217. **Orlando G, Zengin G, Ferrante C, Ronci M, Recinella L, Senkardes I, Gevrenova R, Zheleva-Dimitrova D, Chiavaroli A, Leone S, Di Simone S, Brunetti L, Picot-Allain C, Mahomoodally M, Sinan K, Menghini L. 2019.** Comprehensive chemical profiling and multidirectional biological investigation of two wild *Anthemis* species (*Anthemis tinctoria* var. *pallida* and *A. cretica* subsp. *tenuiloba*): focus on neuroprotective Effects. *Molecules.*, 24: 25-82.
218. **Oussalah M, Caillet S, Lacroix M. 2006.** Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*, *Journal of Food Protection.*, 69(5): 1046–1055.
219. **Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. 2007.** Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control.*, 18: 414–420.

220. **Ozenda P. 2004.** Flore et végétation du Sahara. *CNRS*, 662.
221. **Palaniappan K, Holley R. 2010.** Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *International journal of food microbiology.*, 140:164–8.
222. **Panizzi L, Flamini G, Cioni P, Morelli I. 1993.** Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean *Lamiaceae*. *Journal of Ethnopharmacology.*, 39: 167–170.
223. **Pavlovic M, Lakusic D, Kovacevic N, Tzakou O, Couladis M. 2010.** Comparative analysis of essential oils of six *Anthemis* taxa from Serbia and Montenegro. *Chemical Biodiversity.*, 7: 1231-1244.
224. **Pavlović M, Kovac̆ević N, Couladis M, Tzakou O. 2006.** Phenolic constituents of *Anthemis triumfetti* (L.) DC. *Biochemical Systematics and Ecology.*, 34: 449–452.
225. **Perović J, Tumbas Šaponjac V, Kojić J, Krulj J, Moreno D, García-Viguera C, Bodroža-Solarov M, Ilić N. 2021.** Chicory (*Cichorium intybus* L.) as a food ingredient—Nutritional composition, bioactivity, safety, and health claims: A review. *Food Chemistry.*, 336: 1276.
226. **Perron G, Inglis R, Pennings P, Cobey S. 2015.** Fighting microbial drug resistance: A primer on the role of evolutionary biology in public health. *Evolutionary Application.*, 8(3): 211-222.
227. **Petropoulos S, Fernandes Â, Tzortzakis N, Sokovic M, Ciric A, Barros L, Ferreira. 2019.** Bioactive compounds content and antimicrobial activities of wild edible Asteraceae species of the Mediterranean flora under commercial cultivation conditions. *Food Research International.*, 119:859–868.
228. **Philip T, Berry W. 2000.** Process for the purification of lutein-fatty acid esters from tegeteserecta. *Phytotherapy Research.*, 9:145.
229. **Philips J, Xu J. 1995.** Comprehensive multi-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography.*, 703: 327-334.
230. **Pichersky E, Noel J, Dudareva N. 2006.** Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science.*, 311: 808–811.
231. **Pintore G, Usai M, Bradesi P, Juliano C, Boatto G, Tomi F, Chessa M, Cerri R, Casanova J. 1997.** Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica, *Flavour and Fragrance Journal.*, 12 : 205-209.
232. **Pitt J, Hocking A. 2009.** Fungi and food spoilage. 3: 503.

233. **Qaid M, Al-Hajj N, Wang H, Ma C, Lou Z, Bashari M, Thabit R. 2014.** Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of some aromatic medicinal plants (*Pulicaria inuloides*-Asteraceae and *Ocimum forskolei*Lamiaceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.*, 13 (8): 1287-1293.
234. **Quezel P, Santa S. 1963.** Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. *CNRS*, Paris. 2: 600.
235. **Raut J, Karuppayil S. 2014.** A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products.*, 62: 250–264.
236. **Ravandeh M, Jafar V, Meissam N, Mozghan K. 2011.** Screening of chemical composition of essential oil, mineral elements and antioxidant activity in *Pulicaria undulata* (L.) CA Mey from Iran. *Journal of Medicinal Plants Research.*, 5:2035-2040.
237. **Reichling J, Koch C, Stahl-Biskup E, Sojka C, Schnitzler P. 2005.** Virucidal activity of a beta-triketone-rich essential oil of *Leptospermum scoparium* (manuka oil) against HSV-1 and HSV-2 in cell culture. *Planta Medica.*, 71: 1123–1127.
238. **Ristorcelli D, Tomi F, Casanova J. 1998.** <sup>13</sup>C-NMR as a tool for identification and enantiomeric differentiation of major terpenes exemplified by the essential oil of *Lavandula stoechas* L. ssp. *Stoechas*. *Flavour and Fragrance Journal.*, 13: 154-158.
239. **Ross S, Khalid A, Mahmoud A, Mark T, Osama B, Atallah F, Mamdouh M. 1997.** Phytochemical analysis of *Geigeria alata* and *Francoeuria crispa* essential oils. *Planta medica.*, 63:479-482.
240. **Routh M, Raut J, Karuppayil S. 2011.** Dual properties of anticancer agents: an exploratory study on the in vitro anti-Candida properties of thirty drugs. *Chemotherapy.*, 57: 372–380.
241. **Rudramurthy G, Swamy M, Sinniah U, Ghasemzadeh A. 2016.** Nanoparticles: alternatives against drug-resistant pathogenic microbes. *Molecules.*, 21: 7-836.
242. **Runyoro D, Ngassapa O, Vagionas K, Aliannis N, Graikou K, Chinou I. 2010.** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of four *Ocimum* species growing in Tanzania. *Food Chemistry.*, 119: 311-316.
243. **Saad A, Fadli M, Bouaziz M, Benharref A, Mezrioui N, Hassani L. 2010.** Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. *Phytomedicine.*, 17(13) : 1057-1060.

244. **Saad N, Muller C, Lobstein A. 2013.** Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components, *Flavour and Fragrance Journal.*, 28(5): 269–279.
245. **Saaidi M. 1979.** Contribution à la lutte contre le bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier. Ph.D. Thesis, University of Dijon, France.
246. **Sadiki F, El-Idrissi M. 2019.** Chemical composition of essential oil of *Anthemis nobilis* L. flowers from Morocco. *Applied Journal of Environmental Engineering Science.*, 5(4): 342-348.
247. **Sahar M, Waad A. 2022.** Determination of the chemical composition and antioxidant, anticancer, and antibacterial properties of essential oil of *Pulicaria crispa* from Saudi Arabia. *Society.*
248. **Sanchez-Moreno C, Larrauri Jose A, Saura-Calixto F. 1998.** *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, 76(2): 270-276.
249. **Šarac Z, Matejić J, Stojanović-Radić Z, Veselinović J, Džamić A, Bojović S, Marin P. 2014.** Biological activity of *Pinus nigra* terpenes-evaluation of Fts Z inhibition by selected compounds as contribution to their antimicrobial activity. *Computers in Biology and Medicine.*, 54: 72-78.
250. **Sardi J, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida A, Giannini M. 2013.** Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medicine and Microbiology.*, 62: 10–24.
251. **Saroglou V, Dorizas N, Kyriotakis Z, Skaltsa H. 2005.** Analysis of the essential oil composition of eight *Anthemis* species from Greece. *Journal of Chromatography A.*, 11(4): 313-322.
252. **Sawicka B, Skiba D, Pszczółkowski P, Aslan I, Sharifi-Rad J, Krochmal-Marczak B., 2020.** Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) as a medicinal plant and its natural products. *Cellular an molecular Biology.*, 66, 1–10.
253. **Schnack A. 1999.** Identification spectrométrique des composés organiques. 5<sup>eme</sup> édition traduit par Larue.E. 5: 165.
254. **Schulte K, Rocker G, Moller F. 1968.** *Arch. Pharm.*, 301: 115.
255. **Sevil A, Ahmet A. 2012.** Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of two endemic anthemis species in turkey. *Journal of Food Biochemistry.*, 1-7.
256. **Shahverdi A, Monsef-Esfahani H, Tavasoli F. 2007.** Transcinnamaldehyde from *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil reduces the clindamycin resistance of *Clostridium difficile* in vitro. *Journal of Food Science.*, 72(S): 55–8.

257. **Sharma A, Flores-Vallejo R, Cardoso-Taketa A, Villarreal M. 2017.** Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology.*, 208: 264-329.
258. **Shaukat A. 2001.** Flora of the Kingdom of Saudi Arabia. *National Agriculture research center–Riyadh.*, 2: 2.
259. **Singh S, Barrett J. 2006.** Empirical antibacterial drug discovery-foundation in natural products. *Biochemical Pharmacology.*, 71: 1006-1015.
260. **Singh S, Majumdar D. 1997.** Evaluation of anti-inflammatory activity of fatty acids of *Ocimum sanctum* fixed oil. *Indian Journal of Experimental Biology.*, 35: 380.
261. **Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. 1998.** Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology.*, 26: 118–122.
262. **Snyder C, Hansen H. 1940.** The species concept in fusarium. *American Journal of Botany.*, 27(2): 64-67.
263. **Sobrinho A, de Souza E, Rocha M, Albuquerque M, Bandeira P, Dos Santos H, de Paula C, Carolina S, Oliveira S, Aragão P, de Moraes S. 2016.** Chemical composition, antioxidant, antifungal and hemolytic activities of essential oil from *Baccharis trinervis* (Lam.) Pers. (Asteraceae). *Industrial Crops and Products.*, 84: 108-115.
264. **Sonboli A, Babakhani B, Mehrabian A. 2006.** Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. *Zeit schrift für Natur for schung.*, 61: 160-164.
265. **Sousa M, Pinheiro C, Matos M, Matos F, Lacerda M, Craveiro A. 1991.** Constituintes Químicos de Plantas Medicinais Brasileiras. Universidade Federal do Ceará, *Fortaleza.*, 385-388.
266. **Souza E, Barros J, Oliveira C, Conceicao M. 2010.** Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*, *International Journal of Food Microbiology.*, 137(2-3): 308–311.
267. **Stavri M, Mathew K, Gordon A, Shnyder S, Falconer R, Gibbons S. 2008.** *Phytochemistry.*, 69: 1915.
268. **Szabo M, Varga G, Hohmann J. 2010.** Inhibition of quorum-sensing signals by essential oils, *Phytotherapy Research.*, 24(5): 782–786.
269. **Tan Y, Darren J. 2000.** Molecular strategies for overcoming antibiotic resistance in bacteria. *Molecular medicine today.*, 6: 309-314.

270. **Tapia A, Rodríguez J, Theoduloz C, Lopez S, Feresin G, Schmeda-Hirschmann G. 2004.** Preliminary phytochemical activity of the *pluchea* species. *Journal of Ethnopharmacology.*, 95: 155.
271. **Teixeira B, Marques A, Ramos C, Neng N, Nogueira J, Saraiva J, Nunes M, 2013.** Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products.*, 43: 587–595.
272. **Thomas S, Elkinton J. 2004.** Pathogenicity and virulence. *Journal of invertebrate pathology.*, 85(3): 146-151.
273. **Thoroski J. 1989.** Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection.*, 52: 399–403.
274. **Tomi F, Bighelli A, Casanova J. 1993.** Carbon-13 chemical shift assignment of bcedrene and some derivatives. *Spectroscopy Letters.*, 26: 1661-1671.
275. **Tomi F, Casanova J. 2000.** Contribution de la RMN du carbone-13 à l'analyse des huiles essentielles. *Annales Fals. Expertise Chemical.*, 93 : 313-330.
276. **Tomlinson M, Sasaki T, Wilkins C. 1996.** Applications of multidimensional gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-fourier transform infrared-mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews.*, 16: 1-14.
277. **Toutain G. 1972.** Progression du Bayoud en palmeraies établies sur terrain sales. *AI-Awamia.*, 42: 65-75.
278. **Trombetta D, Castelli F, Sarpietro M, et al. 2005.** Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*, 49(6): 2474–2478.
279. **Tu X, Hu F, Thakur K, Li X, Zhang Y, Wei Z. 2018.** Comparison of antibacterial effects and fumigant toxicity of essential oils extracted from different plants. *Industrial Crops and Products.*, 124: 192–200.
280. **Turina A, Nolan M, Zygodlo J, Perillo M. 2006.** Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophysical Chemistry.*, 122(2): 101–113.
281. **Ugurlu E, Secmen O. 2008.** Medicinal plants popularly used in the villages of Yunt Mountain (Manisa-Turkey). *Fitoterapia.*, 79: 126–131.
282. **Ultee A, Bennik M, Moezelaar R. 2002.** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology.*, 68(4): 1561–1568.

283. **Ultee A, Kets E, Smid E. 1999.** Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology.*, 65(10): 4606–4610.
284. **Ultee A, Smid E. 2001.** Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology.*, 64(3): 373–378.
285. **UNESCO. 1996.** Culture and Health, Orientation Texts –World Decade for Cultural Development 1988 – 1997, Document CLT/DEC/PRO – 1996, Paris, France, 129.
286. **UNESCO. 1998.** FIT/504-RAF-48 Terminal Report: Promotion of Ethnobotany and the Sustainable Use of Plant Resources in Africa. Paris. 60.
287. **Van Den Dool H, Kratz P. 1963.** A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography.*, 11: 463-471.
288. **Varona S, Rodriguez R, Martín A, Cocero M, Serra A, Crespo T, Duarte C. 2013.** Antimicrobial activity of lavandin essential oil formulations against three pathogenic food-borne bacteria. *Industrial Crops and Products.*, 42: 243–250.
289. **Vasiliki S, Nikos D, Zacharias K, Helen D. 2005.** Analysis of the essential oil composition of eight *Anthemis* species from Greece. *Journal of Chromatography A.*, 1104: 313–322.
290. **Vasisht K, Kumar V. 2004.** Compendium of Medicinal and Aromatic Plants. 1. Africa: ICS-UNIDO, Trieste1: 23-56.
291. **Venditti A, Frezza C, Rossi G, Di Cecco M, Ciaschetti G, Serafini M, Bianco A. 2016.** Secondary metabolites with ecologic and medicinal implications in *Anthemis cretica* subsp. *Petraea* from Majella National Park. *AIMS Molecular Science.*, 3: 448-660.
292. **Veras H, Rodrigues F, Colares A, Menezes I, Coutinho H, Botelho M. 2012.** Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol. *Fitoterapia.*, 83(3): 508-512.
293. **Vigan, M. 2010.** Essential oils: renewal of interest and toxicity. *European Journal of Dermatology.*, 20: 685–692.
294. **Vuc' kovic' I, Vujisic' L, Vajs V, Teševic' V, Macura S, Janac' kovic' P, Milosavljevic' S. 2006.** Sesquiterpene lactones from the aerial parts of *Anthemis arvensis* L. *Biochemical Systematics and Ecology.*, 34: 303–309.
295. **Wagner H, Ulrich-Merzenich G. 2009.** Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine.*, 16(2-3): 97- 110.

296. **Waldvogel F. 2004.** Infectious diseases in the 21st century: old challenges and new opportunities. *International Journal of Infectious Diseases.*, 8: 5-12.
297. **Wendakoon C, Sakaguchi M. 1995.** Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of Food Protection.*, 58: 280–283.
298. **Williams C, Harborne J, Greenham J. 2000.** *Biochemical Systematics and Ecology.*, 28: 679.
299. **Winkler F, Gulaçar F, Mermoud F, Bushs A. 1983.** Temperature dependence of the isobutane chemical ionization of open-chain and cyclic alcohols; structural, stereochemical and molecular-size effects. A reevaluation of the chemical ionization of alcohols. *Helvetica Chimica Acta.*, 66: 929-941.
300. **Xie Y, Huang Q, Wang Z, Cao H, Zhang D. 2017.** Structure-activity relationships of cinnamaldehyde and eugenol derivatives against plant pathogenic fungi. *Industrial Crops and Products.*, 97: 388–394.
301. **Yagupsky P. 2006.** Selection of antibiotic-resistant pathogens in the community. *Pediatr. The Pediatric infectious disease journal.*, 25: 974-976.
302. **Yiannikouris A, Jouany J. 2002.** Mycotins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Research.*, 51: 81-99.
303. **Yoon H, Moon S, Kim N, Park B, Jeong M, Yoo Y. 2000.** Genistein induces apoptosis of RPE-J cells by opening mitochondrial PTP. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, 276(1): 151–156.
304. **Yost R, Enke C. 1979.** Triple quadrupole mass spectrometry for direct mixture analysis and structure elucidation. *Analytical chemistry.*, 51: 1251-1264.
305. **Yusufoglu H, Tabanca N, Bernier U, Li A, Salkini M, Alqasoumi S, Demirci B. 2018.** Mosquito and tick repellency of two *Anthemis* essential oils from Saudi Arabia. *Saudi Pharmaceutical Journal.*, 26: 860–864.
306. **Zachary J. 2017.** Mechanisms of microbial infections. *Pathologic basis of veterinary disease.*, 132.
307. **Zhang D, Hu H, Rao Q, Zhao Z. 2011.** Synergistic effects and physiological responses of selected bacterial isolates from animal feed to four natural antibacterials and two antibiotics. *Foodborne Pathogens Disease.*, 8: 1055–62.
308. **Zoghet M, AL-Alsheikh A. 1999.** Wild plants in the region of Riyadh. King saud university press, Riyadh, Saudi Arabia, 194-195.

309. **Zouari N, Fakhfakh N, Zouari S, Bougatef A, Karray A, Neffati M. 2011.** Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. (Lamiaceae). *Food Bioprod Process.*, 89 (4): 257-265.
310. **Zygodlo J, Lamarque A, Maestri D, Grosso N. 1995.** Use of essential oils as natural antioxidants. *Grasas y Aceites.*

## Annexes

**Annexe 1 : Milieux de culture et réactifs.**

## Gélose Nutritive

Agar .....	15g
Extrait de levure.....	2g
Extrait de viande.....	1g
Chlorure de sodium.....	5g
Eau distillée.....	qsp 1000ml

## Gélose Muller-Hinton

Infusion de viande de bœuf déshydraté .....	2 g
Amidon de maïs.....	1,5 g
Hydrolysate de caséine.....	5g
Agar.....	17g
Eau distillée.....	qsp 1000ml

## Milieu PDA (Potatoes Dextrose Agar)

Pomme de terre (macération 500ml de filtrat).....	200 g
Sucrose .....	20 g
Agar .....	20 g
Eau distillée .....	qsp 1000 ml

## Mueller Hinton Bouillon

Hydrolysate acide de caséine .....	17,5 g
Extrait de boeuf.....	3,0 g
Amidon .....	1,5 g
Eau distillée .....	qsp 1000 ml

## Milieu PDB (Potatoes Dextrose Broth)

Pomme de terre (macération 500ml de filtrat).....	200 g
Sucrose .....	10 g
Eau distillée .....	qsp 1000 ml

## Eau physiologique

NaCl .....	9 g
Eau distillée .....	qsp 1000 ml

**Annexe 2:** Résultats de l'activité des HEs de l'Inhibition de la croissance radiale des souches fongiques.

Les souches fongiques	Diamètre de la croissance radiale en (mm)						Témoin
	HE de <i>R. lonadioidis</i>			HE de <i>P. crispa</i>			
	1µl	0.5µl	0.1µl	1µl	0.5µl	0.1µl	
<i>Foa</i> isolé	00	52.5±0. 5	60.51± 0.5	23.44± 0.5	35.5±0. 5	59.5±0. 5	64
<i>Foa</i> rose orange	16.33± 1.52	50.66± 1.52	58.66± 1.52	24.58± 0.52	25.57± 0.51	57.56± 0.51	70
<i>Foa</i> blanche	11.66± 1.15	43.66± 4.16	54.66± 1.52	18.5±0. 5	29.22± 0.5	55.05± 0.36	72
<i>Foa</i> saumon	12.33± 0.57	52±1.7 3	56	26.46± 0.5	28.2±0. 26	51.62± 0.54	68
<i>Arthrinium</i> sp.	9.33±0. 57	21.5±2. 12	23±1.7 3	00	00	7.1±0.3 6	34
<i>Byssochlamys spectabilis</i>	17±2	47±2	50	00	2.56±0. 51	8.5±0.5	70
<i>Aspergillus oryzae</i>	13.33± 0.57	28.5±2. 12	32±1.4 1	18.26± 0.25	20.6±0. 36	23.1±0. 36	41
<i>Penicillium expansum</i>	14±1.4 1	33±1.4 1	39±1.4 1	13	13	13	45
<i>Aspergillus niger</i>	13.5±0. 7	36±5.6 5	50	00	00	00	70
<i>Aspergillus flavus</i>	21	34±2.8 2	37±1.4 1	19.73± 0.25	21.03± 0.15	22.26± 0.25	46
<i>Fusarium</i> sp.	13.5±2. 12	43.5±0. 7	50	15.06± 0.3	21.33± 0.5	30.13± 0.3	60
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	14.75± 0.35	35	39	11.9±0. 1	13	15.2±0. 17	40
<i>Talaromyces funiculosus</i>	1±1.41	15.5±0. 7	17±1.4 1	00	00	00	23

منطقة بشار بالجنوب الغربي بالجزائر. لهما مزايا بيولوجية مختلفة ذات اهتمامات طبية. تطرقنا في هذا البحث لدراسة التطبيق المحتمل للزيوت الأساسية لهذين النباتين كعوامل طبيعية ذات تأثير بيولوجي. تم تحليل التركيبات الكيميائية للزيوت الأساسية للأجزاء العلوية لهذين النباتين بواسطة طرق الفصل اللوني والطيفي، حيث كشفت النتائج عن وجود تنوع معتبر من المكونات المثيرة للاهتمام، أين كانت المكونات الرئيسية فيها هي  $\beta$ -pinène (41.85%) و E Caryophyllene (40.05%) على التوالي. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة باستخدام نظام محاصرة الجذور الحرة بواسطة اختبار DPPH، أين أظهرت النتائج أن زيت *R. lonadioides* أظهر نشاطاً مضاداً للأكسدة أعلى من زيت *P. crispa* (قيمة IC50 : 2.13 ميكرو لتر / مل و 9.11 ميكرو لتر / مل على التوالي). بالإضافة إلى ذلك، تم تقييم اختبارات انحلال الدم من كلا النباتين بقياس نسبة تسرب الهيموغلوبين، والتي لم تظهر أي آثار سامة تجاه خلايا الدم الحمراء البشرية. تطرقنا إلى التأثير المضاد للميكروبات في المخبر ضد 07 سلالات بكتيرية ممرضة و 13 سلالة فطرية مسببة للسموم الفطرية، أظهرت نتائج النشاط المضاد للبكتيريا فاعلية الزيت الأساسي للنبات *R. lonadioides* مقارنة بالنتائج المحققة لنبات *P. crispa* حيث تراوح قطر المناطق المثبطة من 11 إلى 22 ملم للبكتيريا موجبة الجرام، في المقابل أظهرت البكتيريا سالبة الجرام مقاومة ملحوظة من قبل العينتين. نتائج النشاط المضاد للفطريات أثبتت وجود ارتباطات قوية بين الزيادة في تركيز عينات الزيوت الأساسية ونقص أو تثبيط كلي لنمو للفطريات المختبرة في التراكيز الثلاثة 1، 0.5 و 0.1 مايكرو لتر / مل. أين أثبتت كلا الزيتين فاعلية جد معتبرة ضد نمو ونشاط هذه السلالات الفطرية، بحيث تراوحت التراكيز الدنيا للتثبيط بين 0.1 إلى 10 ميكرو لتر / مل. تدفعنا النتائج المحصلة من الدراسة إلى أنه يمكن اعتبار هذه الزيوت الأساسية المستخلصة مصدرًا للأدوية لعلاج الأمراض المرتبطة بالعدوى الجرثومية.

**الكلمات المفتاحية:** النجميات، الفصل اللوني والطيفي عالي الإستبانة، النشاط المضاد للأكسدة، التركيز الأدنى المثبط، الفعالية ضد الميكروبات.

## Résumé

*Rhétinolepis lonadioides* (Coss.) et *Pulicaria crispa* (Forssk.) sont deux plantes médicinales appartenant à la famille des *Asteraceae*, trouvées dans la région de Béchar (sud-ouest de l'Algérie), munies de divers vertus biologiques à intérêts médicinales. L'application potentielle des huiles essentielles de ces deux plantes comme des agents naturelles à effet biologique est décrit dans cette recherche. Les compositions chimiques des huiles essentielles des parties aériennes de ces deux plantes *R. lonadioides* et *P. crispa* ont été analysée via des méthodes chromatographiques et spectrales par le GC-FID et le GC-MS. Les résultats ont révélé une richesse de ces HEs par des molécules intéressantes dans lequel les constituants majoritaires sont le  $\beta$ -pinène (41,85 %) et le Caryophyllene E (40,05%) respectivement. L'activité antioxydante a également été menée à l'aide d'un système de piégeage des radicaux libres par le test DPPH. Les résultats ont montré que l'huile de *R. lonadioides* a montré une activité antioxydante plus élevée que l'huile de *P. crispa* (valeur IC50 : 2.13  $\mu$ l/ml et 9.11  $\mu$ l/ml, respectivement). En outre, des tests d'hémolyse des HEs des deux plantes ont été évalués, où ont montré aucuns effets toxiques vis-à-vis des globules rouges humains. L'effet antimicrobien *in vitro* a été évalué contre 07 souches bactériennes pathogènes et 13 souches fongiques mycotoxinogènes, dont les résultats de l'activité antibactérienne a donné l'efficacité de l'HE de *R. lonadioides* à celle de la plante *P. crispa*, avec des zones d'inhibitions variait de 11 à 22 mm pour les bactéries Gram-positives et une résistance visible par les bactéries gram négatif contre les deux HEs. Les résultats de l'activité antifongiques ont montré qu'il y avait fort corrélations entre l'augmentation de la concentration des HEs et une diminution ou l'inhibition totale de la croissance mycélienne des champignons testés dans les trois concentrations 1, 0.5 et 0.1  $\mu$ l/ml, où les deux HEs ont prouvé une efficacité très importante vis-à-vis ces souches fongiques, avec des CMI varait entre 0.1 à 10  $\mu$ l/ml. Nos résultats poussez-nous que ces HEs pourraient être considérées comme une source d'ingrédients pharmacologiques pour traiter les pathologies associées aux infections microbiennes.

**Mots clés :** *Rhétinolepis lonadioides* (Coss.), *Pulicaria crispa* (Forssk.), la composition chimique, GC-FID, GC-MS, l'activité antimicrobienne, CMI.

## Abstract

*Rhétinolepis lonadioides* (Coss.) and *Pulicaria crispa* (Forssk.) are two medicinal plants belonging to the *Asteraceae* family, found in the region of Bechar (south-west of Algeria), with different biological benefits of medicinal interest. In this research paper, we discussed the potential application of the essential oils of these two plants as natural biological agents. Chemical compositions of essential oils of the aerial parts of these two plants *R. lonadioides* and *P. crispa* were analyzed via chromatographic and spectral methods by GC-FID and GC-MS. The results revealed the presence of a significant variety of interesting components, where the main components were  $\beta$ -pinene (41.85%) and Caryophyllene E (40.05%), respectively. The antioxidant activity was also evaluated, using a free radical scavenging method by the DPPH test. The results showed that *R. lonadioides* oil showed higher antioxidant activity than *P. crispa* EO (IC50 value: 2.13  $\mu$ l/ml and 9.11  $\mu$ l/ml, respectively). In addition, hemolysis tests of EOs from both plants were evaluated, which showed no toxic effects towards human red blood cells. *In vitro*, antimicrobial effect was evaluated against 07 pathogenic bacterial strains and 13 mycotoxinogenic fungal strains. The results of antibacterial activity of which gave the effectiveness of *R. lonadioides* EO to that *P. crispa* oil, with inhibition ranging diameters from 11 to 22 mm for the Gram-positive bacteria and visible resistance by the Gram-negative bacteria against the two EOs. Antifungal activity showed that there were strong correlations between the increase in the concentration of EOs and a decrease or the total inhibition of the mycelial growth of the fungi tested in the three concentrations 1, 0.5 and 0.1  $\mu$ l

/ml, where the two EOs proved very significant efficacy against these fungal strains, with MICs ranging between 0.1 to 10  $\mu$ l/ml. Our results impel us that these EOs could be considered as a source of pharmacological ingredients to treat pathologies associated with microbial infections.

**Key words:** *Rhinolepis lonadioides* (Coss.), *Pulicaria crispa* (Forssk.), chemical composition, GC-FID, GC-MS, antimicrobial activity.