

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

Université « Dr. Moulay Tahar » de Saida

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire de Biotoxicologie, Pharmacognosie et Valorisation Biologiques des
Plantes (LBPVBP)



Mémoire présenté en vue de l'obtention

Dudiplôme de Master en : Biologie

Option: Biochimie

Présenté Par :

M^{elle} : BENRAHO KHADIDJA

M^{elle} : AISSAOUI IMANE

Contribution à l'étude des mécanismes d'action
antimicrobiens de l'extrait aqueux de *Juniperus phoenicea*
(genévrier)

Soutenu devant le jury composé de :

Président : M. Hachem Kadda MCB Université de Saida

Examineur : Mme. Benabdesslem Yasmina MCB Université de Saida

Promoteur : M. Halla Nouredine MCB Université de Saida

2018-2019

Remerciement

Remerciement En tout premier lieu, nous remercions le Dieu, tout puissant, de nous avoir donné la force et la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

Nous avons l'honneur d'exprimer nos reconnaissances et profondes gratitude à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail et plus particulièrement: À notre encadreur pour sa disponibilité et sa confiance. Pour ses précieux conseils, ses explications, pour la pertinence de ses remarques qui nous ont été d'une grande utilité. Nous tenons à remercier **M. Halla Nourddine**. Maître de conférences au Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Saida, pour nous avoir fait l'honneur de présider ce jury. Merci également aux membres du jury : **M. Hachem Kadda** le président du jury qui nous a fait l'honneur de présider notre jury de mémoire. et **Mme. Benabdaesslem Yasmîna** d'avoir accepté d'examiner notre travail. Nous remercions Pr GUEFIFA, professeur de botanique à la faculté de biologie à l'université de Saïda Pour le savoir sur l'espèce de la plante. Nous tenons remercîments Mr. hmadia hmade responsable de laboratoire du département biologie pour les efforts qu'il nous a donnés et ainsi laaraj. Nous remercions aussi Zeragui ben kaddour Pour ses précieux conseils et ses explications.

Nous remercions nos chers parents qui nous ont aidés à être ce que nous sommes et Qui nous ont entourés avec tant d'amour et d'affection. On remercions leur dévouement, leur consacre de temps et leur présence constante au cours de toutes ces années d' « études ». On ne saurait jamais les remercions assez pour leur bien. « Merci, ce travail est la vôtre ». On vous aime... On remercions tendrement notre famille pour leur soutien et leur encouragement, et un merci du fond du nos cœur à nos sœur qui ont été toujours à notre cotés, qui nous ont soutenue et sur tout nous ont supportées au moment difficiles.

En fin, nous exprimons nos remercîments les plus profonds à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.



DÉDICACE

Je dédie ce modeste travail :

*A Dieu, tout puissant, qui m'a donné la force la santé de
réaliser ce précieux travail.*

*Je dédie ce modeste travail aux deux êtres qui me sont
très chers dans cette vie ; mon père et ma mère.*

Aussi je dédie ce travail

A mes très chères sœurs sara, bouchra et hiba

Ma grand-mère fouzia et mon grand-père mustapha

Ma tante karima et sa fille ines et mon oncle amine

*Qui ont toujours été présentes dans les moments les plus
difficiles.*

Spéciale dédicace à mon binôme Benraho khadidja

A mes chères copines : Alia, Imene, Sara, Ikram, Zahra

*A tous personnes que n'aurions nommées ici et tous que
connue moi.*

A toute la famille Aissaoui et Bennihi

IMANE



DÉDICACE

Je dédie cet humble travail :

À Dieu Tout-Puissant, qui m'a donné la force de faire ce travail précieux.

Je dédie cet humble travail à deux êtres chers dans cette vie : mon père et ma mère. Surtout pour ma mère perle de mon cœur d'être à mes côtés, d'attention et d'amour.

Je dédie aussi ce travail

*À mes chères sœurs Hanan et Naima et soumia
À mon frère Abdul Hamid pour l'attention et l'assistance qu'il m'a données.*

Et aux filles de ma sœur Refiada, Ikhlas et Marwa

Une dédicace spéciale à mon partenaire Aissaoui Iman

À mes chers amis : Imene, Alia, Zahra, Ikram, Sara

Nous remercions mon amie de famille Maissa pour le soutien moral qu'elle m'a apporté

A toutes les personnes qui ont été nommées ici et à tout ce qu'elles me connaissent.

Pour toute la famille Arrar et Benraho

Khadîdja

Résumé :

Les extraits naturels issus des plantes médicinales et aromatiques possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent leur application dans divers domaines à savoir la médecine, alimentation et la cosmétologie. Ce travail est consacré à l'étude phytochimique l'activité antimicrobienne, et les mécanismes d'action de l'extrait aqueux de *Juniperus phoenicea* L., récoltée de la wilaya d'El Bayadh. L'extraction a été réalisée sur les feuilles par la macération. Ensuite, un screening phytochimique est effectué pour détecter les différentes familles de composés chimiques existantes dans les feuilles de cette plante. L'activité antimicrobienne a été évaluée par deux méthodes en milieu solide et liquide pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices CMI, Bactéricide CMB et Fongicide CMF vis-à-vis six souches bactérienne et trois souches fongiques. Une étude de mécanisme d'action antibactérien de l'extrait (la viabilité cellulaire, la tolérance au sel, l'activité lipase) vis-à-vis une seule souche bactérienne *S.aureus* a été aussi étudiée.

L'extrait a marqué un rendement de 11,9%. Les tests phytochimiques ont révélés la présence des alcaloïdes, flavonoïdes, tanins, stérols et terpènes, saponosides et des composés réducteurs avec l'absence des anthocyanes. Les résultats obtenus de l'activité antimicrobienne en milieu solide ont montré une certaine sensibilité de la bactérie à gram négatif, il s'agit de *P. aeruginosa* par une zone d'inhibition de 18 mm. D'autre part, la plus faible CMI obtenue était enregistrée vis-à-vis de *S. aureus* par une valeur de 1,95 mg/ml. En effet, cette souche était l'objet de l'étude des mécanismes d'action où l'extrait aqueux de *Juniperus phoenicea* a montré un effet inhibiteur intéressant, entraîné une perte importante de la tolérance au sel et a inhibe l'activité de la lipase de la souche *S. aureus*.

Mots clé : *Juniperus phoenicea* , extrait aqueux, phytochimie , activité antimicrobienne, mécanisme d'action.

الملخص:

المستخلصات الطبيعية من النباتات الطبية و العطرية تمتلك خواص بيولوجية مثيرة للاهتمام للغاية، والتي تجد تطبيقاتها في مجالات مختلفة مثل الطب و الغذاء و التجميل . هذا العمل مكرس للدراسة الكيميائية النباتية، النشاط المضاد للميكروبات، وآليات عمل المستخلص المائيل *Juniperus phoenicea* L. ضد البكتيريا، و الذي تم حصادها من ولاية البيض. تمت عملية الإستخلاص من الأوراق باستعمال التقطير المائي. بعد ذلك، تم إجراء فحص كيميائي نباتي للكشف عن العائلات المختلفة للمركبات الكيميائية الموجودة في أوراق هذا النبات. تم تقييم النشاط المضاد للميكروبات بطريقتين في وسط صلب وآخر سائل لتحديد الحد الأدنى للتركيزات المثبطة لنمو الميكروبات CMI، القاتلة للبكتيريا CMB وكذا القاتلة للفطريات CMF ضد ستة سلالات بكتيرية وثلاث سلالات فطرية. كما تمت دراسة آلية عمل المستخلص (قابلية الخلية للتسامح والملح ونشاط الليياز) ضد سلالة بكتيرية واحدة من المكورات العنقودية الذهبية.

سجل مردود الإستخلاص قيمة 11.9%. وكشفت الاختبارات الكيميائية النباتية عن وجود قلويدات، فلافونويدات، عفص، ستيرولوتيربين، سابونوزيدات و المركبات المرجعة مع غياب الانثوسيانين. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها من النشاط المضاد للميكروبات في الوسط الصلب حساسية معينة للبكتيريا سالبة الغرام، وهي *P. Aeruginosa* بواسطة منطقة تثبيط قدرت بـ 18 ملم. من ناحية أخرى، تم تسجيل أقل CMI تم الحصول عليها - *S. aureus* بقيمة 1.95 ملغ/مل. في الواقع، كانت هذه السلالة موضوع الدراسة آليات العمل حيث أظهر المستخلص المائي للنبات المدروس تأثيرًا مثبطًا مثيرًا للاهتمام، وتسبب في فقد كبير لتحمل الملح، كما منع نشاط الليياز من سلالة المكورات العنقودية الذهبية.

الكلمات المفتاحية: العرعر الفينيقي، المستخلص المائي، الكيمياء النباتية، النشاط المضاد للميكروبات، آلية الحركة.

Abstract:

The natural extracts from medicinal and aromatic plants have very interesting biological properties, which find their application in various fields namely medicine, food and cosmetology. This work is devoted to the phytochemical study, the antimicrobial activity, and the mechanisms of action of the aqueous extract of *Juniperus phoenicea* L., harvested from the El Bayadh. The extraction was carried out on the leaves by maceration. Then, a phytochemical screening is carried out to detect the different families of chemical compounds existing in the leaves of this plant. The antimicrobial activity was evaluated by two methods in a solid and liquid medium to determine the minimum inhibitory concentrations (MIC), Bactericidal (MBC) and Fungicide (MFC) against six bacterial and three fungal strains. A study of the antibacterial mechanism of action of the extract (cell viability, salt tolerance, lipase activity) against a single *S. aureus* bacterial strain was also studied.

The extract scored a yield of 11.9%. Phytochemical tests revealed the presence of alkaloids, flavonoids, tannins, sterols and terpenes, saponosides and reducing compounds with the absence of anthocyanins. The results obtained from the antimicrobial activity in solid medium showed a certain sensitivity of the bacteria to gram negative, it is *P. aeruginosa* by an inhibition zone of 18 mm. On the other hand, the lowest MIC obtained was recorded for *S. Aureus* at a value of 1.95 mg/ml. Indeed, this strain was the object of the study of mechanisms of action where the aqueous extract of *Juniperus phoenicea* showed an interesting inhibitory effect, caused a significant loss of salt tolerance and inhibited the activity of the lipase of *S. aureus* strain.

Key words: *Juniperus phoenicea*, aqueous extract, phytochemistry, antimicrobial activity, mechanism of action.

Table des Matières:

Titre : N° de page	
Remerciement	
Dédicace	
الملخص	
Résumé	
Abstract	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction générale	02
Synthèse bibliographie	04
Chapitre I : Généralité sur la plante étudiée <i>Juniperus Phoenicea</i>	05
I. Les plantes médicinales.....	06
I. 1. Généralités sur le genre <i>Juniperus</i> (genévrier).....	07
I. 2. Description du <i>Juniperus phoenicea</i>	07
I. 3.Noms vernaculaires.....	09
I. 4. Taxonomie.....	09
I. 5. Régénération.....	09
I. 6. Phénologie.....	10
I. 7. Distribution géographique.....	10
I. 8. Composition chimique.....	11
I. 9. Phytothérapie.....	11
Chapitre II : Métabolites secondaires	12
II. 1. Définition.....	13
II. 2. Classification.....	14
II. 2.1. Les composés phénoliques.....	14
II. 2.1.1. Les acides phénoliques.....	14
II. 2.1.2. Les flavonoïdes.....	15
II.2.1.3. Les coumarines.....	16
II.2.1.4. Les tanins.....	16
II.2.2. Les alcaloïdes.....	18
II.2.3. Les terpénoïdes.....	19
II.3. Le rôle des métabolites secondaire.....	20
II.4. Technique d'extraction des métabolites secondaires.....	20
II.4.1. Décoction.....	20
II.4.2. Infusion.....	21
II.4.3. Extracteur de Soxhlet.....	21
II.4.4. Macération.....	22
II.4.5. Hydrodistillation.....	22
Chapitre III: Mécanisme d'action antimicrobien	23
III. 1. L'activité antimicrobienne.....	25

III.2.1. Méthode de diffusion en disque dans un milieu gélosé.....	25
III. 2.2. Méthode de dilution.....	26
III. 3. Mécanisme d'action antimicrobien.....	27
III.3.1. Mesure de l'efficacité des métabolites secondaires.....	27
III.3.2. La concentration minimale inhibitrice (CMI).....	27
III.3.3. La concentration minimale bactéricide (CMB).....	27
III.3.4. Mode d'action des métabolites secondaires sur les bactéries.....	27
Partie expérimentale.....	28
Chapitre IV : Matériel et méthodes.....	29
IV.1. Matériel.....	31
IV.1.1. Matériel végétale.....	31
IV.1.2. Microorganismes.....	31
IV.2. Méthodes.....	32
IV.2.1. Préparation des extraits.....	32
IV.2.2. Calcul des rendements en extrait sec.....	34
IV.2.3. Screening phytochimique.....	34
IV.2.4. Evaluation de l'Activité antimicrobienne par la méthode de diffusion des disques.....	36
IV.2.4.1. Principe.....	36
IV.2.4.2. Préparation de la culture bactérienne.....	36
IV.2.4.3. Procédure.....	37
IV.2.5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide.....	40
IV.2.5.1. Activité antibactérienne.....	40
IV.2.5.2. Activité antifongique.....	42
IV.2.6. Détermination des concentrations minimales bactéricide (CMB) ou fongicide (CMF).....	43
IV.2.6.1. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).....	43
IV.2.6.2. Détermination de la concentration minimale fongicide (CMF).....	43
IV.2.7. Mécanisme d'action antibactérien de l'extrait.....	44
IV.2.7.1. Conditions expérimentales générales.....	44
IV.2.7.2. Préparation des cellules.....	44
IV.2.7.3. Tests de la viabilité cellulaire.....	45

IV.2.7.4. Tolérance au sel.....	45
IV.2.7.5. Activité des lipases.....	46
Chapitre V :Résultats et discussion.....	47
V.1. Calcul du rendement.....	48
V.2. Tests phytochimiques.....	49
V.3. Activités antimicrobienne.....	50
V.3.1. Méthode de diffusion sur disque.....	50
V.3.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB).....	54
V.3.3. Activité antifongique : détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales fongicides (CMF).....	56
V.4. Etude de mécanisme d'action antibactérien.....	57
V.4.1. Viabilité cellulaire.....	58
V.4.2.Tolérance au sel.....	60
V.4.3. Activité des lipases.....	61
Conclusion.....	63
Références bibliographiques.....	64
Annexes	

Liste des figures :

Figure 01 : La partie aérienne de la plante <i>Juniperus phoenicea</i>	8
Figure 02 : Tige de <i>J .phoenicea</i>	8
Figure 03 : Feuilles en écailles de <i>J.phoenicea</i> (loupe x20).....	8
Figure 04 : Localisation de <i>Juniperus phoenicea</i> dans la région méditerranéenne.....	10
Figure05 : Acides hydroxycinnamiques (C6-C3).....	15
Figure 06 : Acides hydroxy benzoïques (C6-C1).....	15
Figure 07: Structure de base des flavonoïdes.....	15
Figure 08 : Structure des coumarines.....	16
Figure09 : La structure de tanins hydrolysables.....	17
Figure 10 : La structure de tanins condensés.....	17
Figure 11 : Quelques exemples d'alcaloïdes.....	18
Figure 12 : Molécule isoprène. E.....	19
Figure 13: Montage de l'extraction par la décoction.....	21
Figure 14 : Montage de L'extraction au Soxhlet.....	22
Figure 15: Appareil d'extraction des huiles essentielles type Clevenger.....	23
Figure 16 : Aromatogramme sur boîte de pétri à diffusion linéaire à partir d'un disque imprégné de l'extrait	26
Figure17 : Mode d'action des MS sur les bactéries.....	28
Figure 18 : Les feuilles de <i>Juniperus phoenicea</i> L	31
Figure 19 : Les feuilles broyées en poudre de <i>Juniperus phoenicea</i> L.....	31

Figure 20 : Macération du matériel végétal.....	33
Figure 21 : Protocole de préparation l'extrait.....	33
Figure22 : Figure représente des différentes dilutions d'extrait.....	38
Figure 23 : Schéma descriptif de la préparation des disques et l'ensemencement des souches microbiennes.....	39
Figure 24 : Montre les différentes dilutions d'extrait.....	41
Figure 25 : Montre la procédure de préparation micro-dilution	41
Figure 26 : Montre une microplaque après le remplissage.....	41
Figure 28 : Résultats obtenus par la méthode de diffusion des disques de l'extrait aqueux de <i>J. phoenicea</i> vis-à-vis des bactéries à gram positif	50
Figure 29 : Résultats obtenus par la méthode de diffusion des disques de l'extrait aqueux de <i>J. phoenicea</i> vis-à-vis des bactéries à gram négatif.....	51
Figure 30 : Résultats obtenus par la méthode de diffusion des disques de l'extrait aqueux de <i>J. phoenicea</i> vis-à-vis des <i>Candida albicans</i>	52
Figure 31 : Résultat des CMI et des CMB de l'extrait de <i>Juniperus phoenicea</i> L. vis-à-vis des souches bactériennes.....	56
La figure 32 : Résultats des CMI et des CMF d'extrait <i>J.phoenicea</i> vis-à-vis de trois souches fongique testées.....	57
Figure 33 : Effet d'extrait sur la viabilité cellulaire de 0 – 60 min chez <i>S.aureus</i>	59
Figure 34 : Effet d'extrait sur la viabilité cellulaire chez <i>S.aureus</i>	60
Figure 35 : Proportion de cellule de <i>S. aureus</i> présentant des colonies d'activité lipase positive sur l'Agar Salty Tween (AST) ajoutée à des concentrations différentes de l'extrait de <i>Juniperus phoenicea</i>	62

Liste de tableau

Tableau 01 : Classification botanique de <i>Juniperus phoenicea</i> L.....	9
Tableau02 : Les différents microorganismes utilisés.....	32
Tableau 03 : Préparation des dilutions.....	37
Tableau 04 : Détermination du rapport CMB/CMI ou CMF/CMI (mg/ml).....	44
Tableau 05 : Concentrations utilisées (mg/ml) d'extrait pour les tests de la viabilité cellulaire, la tolérance au sel et l'activité des lipases	44
Tableau 06 : Rendement massique d'extrait	48
Tableau 07 : Résultat du screening phytochimique	49
Tableau 08 : Diamètre d'inhibition de l'extrait aqueux de <i>J. phoenicea</i> vis-à-vis des bactéries et des levures testés (en mm).....	52
Tableau 09 : Degrés de sensibilité de l'extrait aqueux de <i>J. phoenicea</i> vis-à-vis des bactéries et des levures testés	53
Tableau10 : Les différentes concentrations minimales inhibitrices et bactéricides de l'extrait aqueux de <i>J. phoenicea</i> (mg/ml).....	54
Tableau 11 : Détermination du rapport CMB/CMI	58
Tableau 12 : Concentrations utilisées (mg/ml) d'extrait pour les tests de la viabilité cellulaire, la tolérance au sel et l'activité des lipases.....	58
Tableau 13 : Proportion des cellules de <i>S.aureus</i> capables de former des colonies sur GN-NaCl après exposition à des concentrations sub- inhibitrices de l'extrait aqueux de <i>Juniperus phoenicea</i>	61

Liste des abréviations

J : Juniperus

DMSO : Diméthylesulfoxyde

E. coli : Escherichia coli

S.aureus : Staphylococcus aureus

P.aenuginosa : Pseudomonas aenuginosa

S. typhimurium : Salmonella typhimurium

B. subtilis : Bacillus subtilis

L. monocytogenes : Listeria monocytogenes

SM : Métabolite secondaire

MH : Gélose Mueller Hinton

BN : Nutrient broth

GN : Gélose Nutritive

Rdt : Rendements

UFC : Unité Formant Colonie

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CMB : Concentration minimale bactéricide

CMF : Concentration minimale fongicide

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

°C : Degré Celsius

h : Heure

g : Gramme

Km : kilomètre

L : Litre

m : Mètre

ml : Millilitre

μL: Microlitre

% : Pourcentage

DZI : Diamètres des zones d'inhibitions

ATCC : American type culture collection

Fig : Figure

PH : Potentiald'hydrogène

Introduction générale

Introduction générale

Les plantes sont depuis toujours une source essentielle de médicaments. A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales. Si certaines pratiques médicales paraissent étranges et relèvent de la magie, d'autres au contraire semblent plus fondées, plus efficaces. Pourtant, toutes ont pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des humains. Aujourd'hui, encore une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes. L'industrie pharmaceutique moderne, elle-même, s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites. Cette source semble inépuisable puisque seule une petite partie des 400000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans phytochimique et pharmacologique, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents (**Hostettmann et al., 1998**).

Malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît. Les microorganismes (bactéries, champignons,...) se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leurs résistent de plus en plus. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme (**Larousse., 2001**).

Dans ce contexte, l'objectif global de ce travail est d'étudier la phytochimie et l'activité antimicrobienne et le mécanisme d'action antimicrobien d'extrait *Juniperus phoenicea* L. Pour cela, notre étude a été réalisée en trois parties:

Dans la première partie de ce manuscrit, une étude bibliographique est menée sur :

- Généralité sur la plante étudiée *Juniperus phoenicea* L. Nous effectuerons une présentation botanique de la famille lamiacées, sa localisation géographique dans le monde, et son utilisation.
- La définition des métabolites secondaire et les grandes familles comme : les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, les saponosides, et les alcaloïdes etc...
- L'activité antimicrobienne de l'extrait *Juniperus phoenicea* L. et leur mécanisme d'action.

Introduction générale

La deuxième partie, qui est expérimentale est répartie comme suit:

- Tests phytochimiques : qui sont réalisés sur les parties aériennes de nos plantes, en utilisant milieu aqueux pour des macérations.
- Etude du pouvoir antimicrobien de l'extrait sélectif de plante vis-à-vis de six souches bactériennes et trois souches fongiques.
- Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide et les concentrations minimales bactéricide (CMB) ou fongicide (CMF) vis-à-vis six (6) souches bactériennes de références ainsi que trois souches fongiques.
- Mécanisme d'action antibactérien de l'extrait (la viabilité cellulaire, la tolérance au sel et l'activité des lipases).

Dans la troisième partie, nous discutons les résultats obtenus lors cette étude.

Synthèse Bibliographique

Chapitre 1 :

Généralité sur la plante étudiée

Juniperus phoenicea

La connaissance rationnelle des plantes médicinales date de l'Antiquité. C'est Hippocrate qui différencie l'usage interne et l'usage externe et qui définit la notion de dose qui permet de distinguer l'effet thérapeutique de l'effet toxique (**Colette-Keller, 2004**). Au cours des dernières décennies, les recherches scientifiques les plus modernes n'ont fait que confirmer le bien-fondé des vertus thérapeutiques de la plupart des plantes médicinales utilisées (**Carillon, 2000**). Ce savoir traditionnel ancestral qui se transmet de génération en génération est devenu aujourd'hui une mine d'informations extrêmement précieuses pour les chercheurs d'industrie pharmaceutique (**Fouché et al., 2000**).

Après des années de domination de la synthèse chimique, la pharmacologie, mais aussi la nutrition et l'agroalimentaire redécouvrent les vertus des plantes dites médicinales, ce qui est le cas de toutes les plantes. Elles sont de plus en plus considérées comme source de matières premières essentielles pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments (**Maurice, 1997**). Mais leurs usages traditionnels n'ont jamais disparus, bien au contraire (**Pierangeli et al., 2009**).

Aujourd'hui la pharmacologie s'oriente de plus en plus vers des traitements à base de plantes, car l'efficacité de la synthèse chimique a largement atteint ses limites et n'arrive plus à être créative. L'exemple de l'antibiorésistance microbienne, à l'origine de la recrudescence des maladies nosocomiales se passe de tout commentaire. La plupart des espèces végétales contiennent des substances qui peuvent agir, à un niveau ou un autre, sur l'organisme humain et animal. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie. Elles présentent en effet des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus (**Iserin, 2001**).

La raison fondamentale est que les principes actifs végétaux proviennent de processus biotiques répandus dans tout le monde vivant, alors que l'essentiel des médicaments de synthèse sont des xénobiotiques aux effets secondaires très mal maîtrisés (**Bruneton, 2009**).

Les plantes médicinales sont donc importantes pour la recherche pharmaceutique et l'élaboration des médicaments, directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matière première pour la synthèse des médicaments ou comme modèle pour les composés pharmacologiques actifs (**Decaux, 2002**).

1. Généralités sur le genre *Juniperus* (genévrier)

Les cupressacées (Cupressaceae) représentent la famille la plus cosmopolite avec dix genres dans chaque hémisphère, mais la plupart des espèces se trouvent dans l'hémisphère nord (Enright et al., 1996). Par ailleurs, la distribution de cette famille est sous l'influence de facteurs divers : climat, sol, perturbations (catastrophes naturelles, exploitation humaine), etc. (Banks., 2004). D'origine américaine, asiatique, africaine et européenne, le genre *Juniperus* (ou le genévrier), qui appartient à la famille des cupressacées, comprend un grand nombre d'espèces (environ soixante) avec des variétés rigides aux aiguilles piquantes et des variétés souples aux feuillages en écailles (Mansouri et al., 2011). Ce genre est composé d'environ 75 espèces [(Adams et Schwarzbach, 2013) ; (Adams, 2014)]. Il est divisé en trois sections: *Caryocedrus* (1 espèce) ; *Juniperus (Oxycedrus)* (11 espèces) et *Sabina* (55 espèces) (Adams, 2004).

Les genévriers représentent des espèces pionnières peu exigeantes sur le plan écologique. Ce sont des arbres ou arbrisseaux très rameux, exploités pour le bois ou le feuillage, voire à des fins industrielles ou médicinales (Quézel, 1962). Elles occupent une place importante dans le paysage nord-africain, essentiellement en raison de leur rusticité et de leur dynamisme, elles sont présentes depuis le bord de mer jusqu'aux sommets des Atlas. Leur rusticité leur permet de résister aux agressions humaines intenses dont elles sont l'objet car dans de nombreuses régions, elles représentent le seul élément arboré ou arbustif susceptible d'être exploité pour le bois ou le feuillage, voire à des fins industrielles ou médicinales (Quézel et Gast, 1998).

2. Description du *Juniperus phoenicea*

Le genévrier rouge ou *Juniperus phoenicea* L. (Cupressacées) est un arbre monoïque ou rarement dioïque (Mansouri et al., 2011). C'est une espèce pionnière avec une forte demande en lumière et une résistance relativement élevée au climat sec (Dzialuk et al., 2011). Le Genévrier de Phénicie ou genévrier rouge (*J. phoenicea* L.) est un arbrisseau touffu ou un arbuste de 1 à 3 m de hauteur mais pouvant atteindre cependant jusqu'à 8 à 10 mètres (Figure 01). Le fruit globuleux devient rouge et luisant à maturité (Figure 02). Au jeune âge, certaines feuilles sont en aiguilles et d'autres en écailles très petites (Figure 03), très imbriquées, opposées, formant le feuillage vert persistant de l'arbre après les premières années. Cette espèce est indifférente au substrat ; elle est présente en bioclimat surtout semi-aride et aride en ambiance nettement continentale se contentant de précipitations comprises entre 200 et 400 mm [(Lapie et Maige, 1914) ; (Quézel, 1962)].

L'aire de répartition du genévrier rouge (Genévrier de Phénicie) s'intercale entre les formations steppiques de basse altitude et les formations forestières et pré-forestières à chêne vert. Cette position confère au *J. phoenicea* un rôle écologique considérable du fait qu'il se comporte comme un élément de forte résistance à l'érosion éolienne et à la pression anthropique. On le distingue des autres genévriers par la couleur rouge de ses fruits, par son port ramifié et moins puissant, par l'aspect touffu de ses rameaux cylindriques et enfin, par son absence de la haute montagne aux altitudes supérieures à 2 200 mètres (Mansouri et al., 2011). Le peuplement de genévrier de Phénicie peut atteindre des âges importants malgré une taille modeste, des individus de 1.5 m de haut, avec un tronc de 8 cm de diamètre sont âgés de 1150 ans (Mandai, 2005).



Figure 01 : La partie aérienne de la plante *Juniperus phoenicea*



Figure 02 : Tige de *J. phoenicea*



Figure 03 : Feuilles en écailles de *J. phoenicea* (loupe x20)

3. Noms vernaculaires

En Arabe : العرعار الاحمر

En Français : Genévrier rouge, Genévrier de Phénicie.

En Anglais : Phoenician Cedar, Berry Bearing Cedar.

En Allemand: Cypressen Wacholder, Rotbeeriger Wacholder, Grichiseher Wacholder.

En Italien : Cedrolicio.

4. Taxonomie

Le **tableau 01** représente la taxonomie de la plante *Juniperus phoenicea*.

Tableau 01 : Classification botanique de *Juniperus phoenicea* (Quezel et Santa., 1962).

Règne	Plantae
Sous regne	Tracheobionta
Embranchement	Spermatophytes
Sous Embranchement	Gymnospermes
Classe	Pinopsida
Ordre	Pinales
Famille	Cupessaceae
Genre	<i>Juniperus</i> L.
Espece	<i>Juniperus phoenicea</i>

5. Régénération

D'après **Body, (1950)**, sa régénération s'effectue partiellement par rejets, mais surtout par semis naturels. Les graines germent difficilement et restent dans le sol. Pour assurer la régénération par semis, il faudra donc une longue période de 20 à 25 ans au moins. Comme toutes les espèces du genre genévrier, le phoenicea a une croissance lente, la dissémination des graines se fait par les oiseaux (**Seigue, 1985**).

6. Phénologie

Floraison en avril- mai, puis pollinisation par le vent ; le fruit se forme. En juillet, la maturation des fruits est presque totale, ils proviennent des fleurs de l'année précédente (Ageste, 1960).

7. Distribution géographique

Juniperus phoenicea L. est une espèce qui se trouve dans les différentes régions du monde, mais il est fréquent dans la partie Ouest des régions méditerranéennes au sud de l'Europe (également dans l'Est de Portugal jusqu'en Turquie) (Robert et Adams, 1996). Son aire de répartition couvre l'ensemble de la région méditerranéenne, à partir des îles Canaries, des montagnes de l'Atlas en Afrique et du Portugal, à l'ouest, jusqu'à la Jordanie et l'Arabie saoudite à l'est (Mansouri et al., 2011).

En Algérie, l'espèce est présente depuis les dunes littorales jusqu'aux limites sahariennes (Cet arbre constitue au côté du cèdre, la principale couverture végétale dans les montagnes des Aurès) (Figure 04) (Quezel et Santa, 1962).



Figure 04 : Localisation de *Juniperus phoenicea* dans la région méditerranéenne (Adams, 2011).

8. Composition chimique

La majorité des composants chimiques isolés des feuilles et des cônes (fruits) de *Juniperus phoenicea* sont des huiles volatiles (**El sawi et al., 2007**). Des études phytochimique antérieures de cette espèce ont montré que cette plante accumule des terpénoïdes, en particulier des monoterpène, sesquiterpènes et diterpènes. Cette espèce ne comprend que de petites quantités de dérivés phénoliques : Bisflavones et Lignanes (**Aboul et al., 2005**). La même source a signalé la présence de phenylpropanes glycosides, juniperosides, rosarin et Skimmin et deux dérivés furanones glucosides. Stérol et hydrocarbures ont démontré la présence de phoenicosides : un pseudo dimères des deux furan on es précédents, et apparition de phenylpropanes dérivé de la même espèce. En Egypte, ils ont identifié sept nouveaux composants diterpeniques extraits des fruits de *J. phoenicea* à l'éther et un stérol (2-sitosterol), ces diterpènes appartiennent aux groupes Labdane, Pimarane et Abietane (**Elsawi et al., 2007**).

9. Phytothérapie

La première utilisation enregistrée de cette plante était en Egypte vers 1500 avant J.C. (**Al Groshi et al., 2018**). Dans la médecine populaire algérienne. Ses feuilles sont utilisées sous forme de décoction pour traiter le diabète, la diarrhée et les rhumatismes. Le mélange de feuilles et de baies de cette plante est utilisé comme agent hypoglycémie oral, alors que les feuilles sont utilisées contre les maladies broncho-pulmonaires [(**Achak et al., 2008**) ; (**Dob et al., 2008**)].

Les cônes, les rameaux, mais surtout les jeunes pousses préparées en infusion ont des effets diurétiques, stomachiques et digestifs [(**Barrero et al., 2004**) ; (**Bellakhder, 1997**)]. Alors que les fuites séchés et réduits en poudre peuvent guérir les ulcérations de la peau et les abcès (**Qnais et al., 2005**).

Chapitre II:
Généralités sur les métabolites
secondaires

Les plantes possèdent des métabolites dits « **secondaires** » par opposition aux métabolites primaires que sont les protéines, les glucides et les lipides. Ces composés diffèrent en fonction des espèces et, bien que leurs rôles soient encore mal connus, il est cependant clair qu'ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent. Ils sont probablement des éléments essentiels de la coévolution des plantes avec les organismes vivants, tels que parasites, pathogènes et prédateurs, mais aussi pollinisateurs et disséminateurs. Ces différentes relations ont donné lieu à une extrême diversification des composés secondaires. La diversité des espèces utilisées et des métabolites secondaires déjà isolés laisse présager de l'ampleur de ce qui reste à découvrir. On considère effectivement que moins de 10 % des espèces de végétaux supérieurs qui peuplent la planète ont été explorées pour leurs propriétés chimiques et biologiques (**Krief, 2003**).

1. Définition

Les métabolites secondaires (MS) sont présents dans toutes les plantes supérieures, et ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante, dont plus de 200.000 structures ont été définies avec une variété structurale extraordinaire (**Hartman, 2007**).

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes (**Abdrrazak et Joël, 2007**). Ils interviennent dans l'adaptation de la plante à son environnement ainsi que la régulation des symbioses et d'autres interactions plantes-animaux, la défense contre les prédateurs et les pathogènes, comme agents alléopathiques ou pour attirer les agents chargés de la pollinisation ou de la dissémination des fruits (**Judd et al., 2002**).

Ces molécules constituent un groupe de produits naturels qui sont explorés pour des propriétés très divers : antioxydants, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, anticancéreuses, antifongiques, analgésique, etc.... [(**Bruneton., 2009**) ; (**Harborne., 1998**)].

Les métabolites secondaires proviennent à partir de précurseurs originaires des métabolites primaires (acétyl-CoA, acides aminés). Les enzymes responsables de la synthèse des métabolites secondaires sont très diversifiées suite à l'évolution de gènes impliquées, à l'origine, dans les fonctions métaboliques fondamentales [(**Gaitaizis et al., 2002**) ;(**Steyn, 1980**)].

2. Classification

Nous pouvons classer les métabolites secondaires en trois groupes, chacune renferme une très grande diversité biologique (**Bruneton., 2009**) :

- Les composés phénoliques
- Les composés azotés (les alcaloïdes).
- Les terpènes.

2.1. Les composés phénoliques

Plus de 8000 composés phénoliques sont identifiés (**Urquiaga et Leighton, 2000**) dont l'élément structural de base est un noyau benzoïque au quel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthylique, ester, sucre...). Cette structure varie depuis les molécules simples (acides phénolique simple) jusqu'aux molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) (**Bruneton, 2009**).

Les composés phénoliques jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel. Ils peuvent constituer des signaux de reconnaissance entre les plantes, ou bien lui permettant de résister au diverses agression vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stressés variés (**Macheix et al., 2005**).

Les principaux sous classes des composés phénoliques sont :

2.1.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques et se séparent en deux grands groupes distincts que sont les acides hydroxycinnamiques (C6-C3) (**Figure 05**) et les acides hydroxy benzoïques (C6-C1) (**Figure 06**) (**Arimboor et al., 2018**).

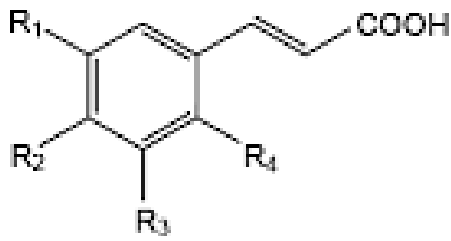


Figure 05 : Acides hydroxycinnamiques (C6-C3) (Gonzalez et al., 1997).

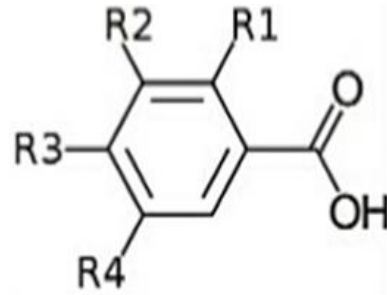


Figure 06 : Acides hydroxy benzoïques (C6-C1) (Gonzalez et al., 1997).

2.1.2. Les flavonoïdes

Ce sont des substances polyphénoliques de faible poids moléculaire. Ils ont en commun une structure chimique de base en C15 (C6-C3-C6) et possèdent un squelette carboné constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi un hétérocycle (C) (**Figure 07**) [(Cook et Samman, 1996) ; (Heim et al., 2002)]. Les flavonoïdes sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles [(Bruneton, 2009) ; (Ghestemetal., 2001)]. Ils protègent les plantes contre les radiations UV et sont impliqués dans les processus de la défense de la plante contre animaux herbivores (Gouts amers et astringent), les infections bactériennes et virales. Ils fonctionnent comme des signaux moléculaires de reconnaissance entre les bactéries symbiotiques et les légumineuses afin de faciliter la fixation de l'azote moléculaire. Ces molécules agissent sur la régulation de l'élongation des tiges et interviennent dans la maturité des fruits (Subramanian et al., 2007).

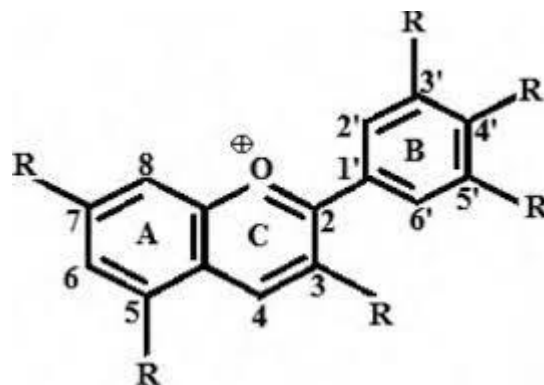


Figure 07: Structure de base des flavonoïdes (Gonzalez et al., 1997)

2.1.3. Les coumarines

Historiquement le nom de coumarine vient de « cumaru » qui est le nom dans une langue amazonienne, de l'arbre de Tonka (*Dipteryx odorata* Willd, Fabaceae) dont les fèves contiennent 1 à 3 % de coumarine (Bruneton, 1999). Les coumarines sont des 2H-1-benzopyran-2-ones que l'on peut considérer, en première approximation, comme étant les lactones des acides 2-hydroxy-7-cinnamiques (Figure 08) (Bruneton, 2009).

Ce sont des molécules biologiquement actives ayant diverses activités : anti-agrégation plaquettaire, anti-inflammatoire, anticoagulante (au niveau du cœur), antitumorale, diurétiques, antimicrobienne, antivirale, et analgésique [(Stefanova et al., 2007) ; (Thai et al., 2007)]. Pour leur activité antibactérienne, elles sont efficaces contre les bactéries à gram positif (Khan et al., 2005).

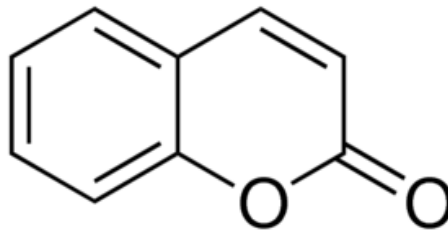


Figure 08 : Structure de base des coumarines (Ford et al., 2001).

2.1.4. Les tanins

Ce sont des produits naturels polyphénoliques qui peuvent précipiter les protéines à partir de leur solution aqueuses (Silanikove et al., 2001). Leur structure est formée par des unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques et leur degré d'oxydation (Ghestem et al., 2001). Les tannins sont classés en deux groupes, les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Bruneton, 2009).

➤ Tanins hydrolysables :

Les tanins hydrolysables sont composés de deux types d'unités de base, à savoir un glucide (la plupart du temps le D-glucose) et des acides phénoliques. Il s'agit des gallotanins pour lesquelles le glucide est estérifié par l'acide gallique et des ellagitanins où le glucide est estérifié par l'acide ellagique (Kogel et Knabner, 2002).

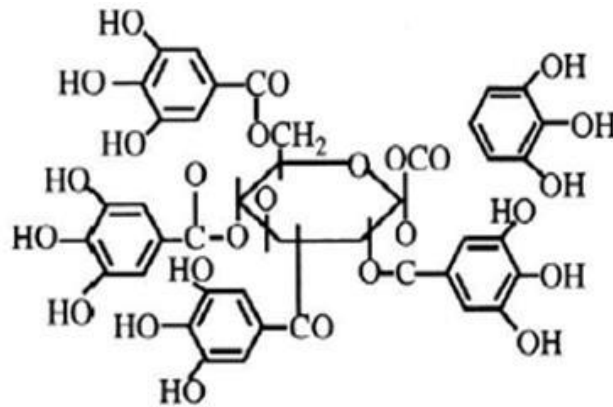


Figure09 : La structure de tanins hydrolysables (Ghestem et al., 2001).

➤ **Tanins condensés :**

Les tanins condensés sont des polymères de polyhydroxyflavan-3-ol, liés la plus part du temps par des liaisons entre C4 et C8 et sporadiquement entre C4 et C6 (**Figure 10**) (Kogel et Knabner, 2002).

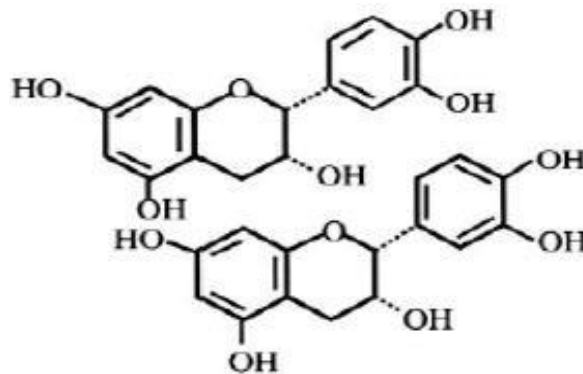


Figure 10 : La structure de tanins condensés (Ghestem et al., 2001).

Le rôle biologique des tanins est lié à sa propre protection contre les infections fongiques et bactériennes, les insectes et les animaux herbivores (**Khanbabaee et Ree, 2001**). Les tanins sont utilisés en pharmacie comme antidiarrhéique, vasoconstricteurs et hémostatiques, mais surtout comme protecteurs veineux dans le traitement des varices et hémorroïdes (**Paris et Hurabielle, 1981**).

2.2. Les alcaloïdes

Ce sont les principaux métabolites secondaires azotés, la plus part ont des propriétés basique. Environ 12000 composés sont synthétisés à partir des acides aminés constitués d'un hétérocycles (Meyer et al., 2008). Un alcaloïde est un composé organique naturel (le plus souvent d'origine végétale), hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, de structure moléculaire complexe plus ou moins basique et doué de propriétés physiologiques prononcées même à faible dose (Figure 11) (Donatien, 2009).

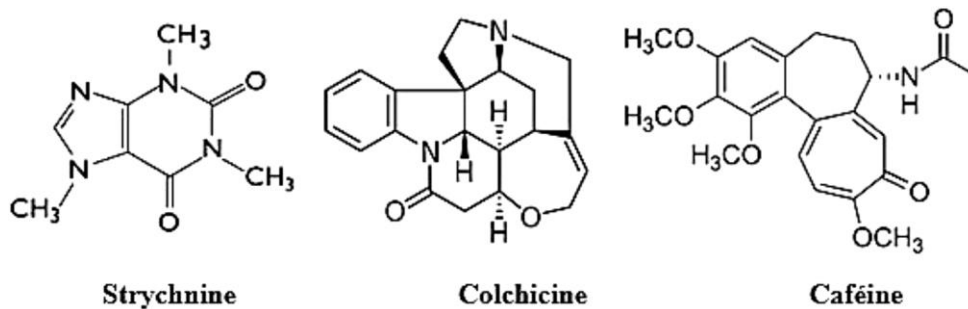


Figure 11 : Quelques exemples d'alcaloïdes (Meyer et al., 2008).

Les alcaloïdes sont généralement classés en :

- **Alcaloïdes vrais** qui sont des dérivés d'acides aminés, dont l'atome d'azote est inclus dans le système hétérocyclique. Ils sont présents dans les plantes, soit sous forme libre, soit sous forme de sel, soit comme N-Oxyde. Ils représentent le plus grand nombre d'alcaloïdes et ils sont toxiques (Kebili et al., 2016).
- **Pseudo- alcaloïdes** qu'ils présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés (Badiaga, 2011). Dans la majorité des cas connus, ce sont des dérivés d'isoprénoïdes (alcaloïdes terpéniques) et du métabolisme de l'acétate (Rakotonanahary, 2012).
- **Proto- alcaloïdes** qui sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique. Ils ont un caractère basique et sont élaborés in vivo à partir d'acides aminés. Ils sont souvent appelés « amines biologiques » et sont soluble dans l'eau (Bruneton, 2009).

Bien que beaucoup d'entre eux soient toxiques, les alcaloïdes représentent les principes actifs de nombreuses plantes médicinales (Omulokoli et al., 2000) et jouent à faible doses, le rôle

d'anesthésiques locaux (cocaine), d'analgésiques (morphine), d'antibiotiques, d'antiparasitaires, d'anti-tumoraux... (Buruneton, 2009).

2.3. Les terpénoïdes :

Les terpènes sont des dérivés d'unité isopréniques IPP (iso-pentényl-pyrophosphate) (Richard et al., 2010). Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structures soit cyclique soit chaîne ouverte : leurs formule brute est $(C_5H_x)_n$ dont x : est variable en fonction de degré d'insaturation de la molécule et n peut prendre des valeurs (1-8) sauf dans les poly terpènes qui peut atteindre plus de 100 (le caoutchouc), la molécule de base est l'isoprène de formule C_5H_8 (Figure 12) (Bezzaz, 2014).

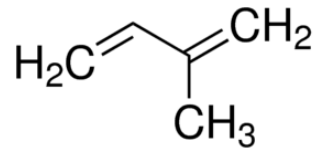


Figure 12 : Structure chimique d'isoprène (Khenaka, 2011).

Ils sont issus d'une voie métabolique secondaire de l'acide mévalonique et ils sont formés du couplage de plusieurs unités isopréniques. Leur classification est basée sur le nombre de répétitions de l'unité de base isoprène hémiterpènes (C_5), monoterpènes (C_{10}), sesquiterpènes (C_{15}), diterpènes (C_{20}), sesterpènes (C_{25}), triterpènes (C_{30}), tétraterpènes (C_{40}) et polyterpènes (Maleeky et al., 2007). Dans la composition de la plupart des huiles essentielles, les monoterpénoïdes et les sesquiterpénoïdes forment la majeure partie [(Benchaar et al., 2008) ; (Calsamiglia et al., 2007)].

Les terpénoïdes sont responsables de la couleur et l'odeur des plantes et des épices (piments, curies) (Langenheim, 1994) et ont un intérêt qui conditionne leur utilisation en médecine par leurs propriétés différentes contre les poux de tête adultes, effets ovicides. Une façon de contrôler l'infestation de poux de tête est en réduisant le développement de leur œuf et repoussant, et aussi pour des propriétés antimicrobiennes, antifongiques, antiparasitaires, antivirales, antioxydantes (Jose et al., 2016).

3. Le rôle des métabolites secondaire

En médecine : Les métabolites secondaires qui font la base des remèdes pour l'homme sont utilisés en : urologie, dermatologie, gastrites aiguës, toux, ulcères d'estomac, laxatifs, sommeil. Par exemple, le Flavoce est un médicament constitué par la flavone non substitué en combinaison avec la rutine et isoquercetine, il est utile dans le traitement de l'athérosclérose.

En alimentation : Les épices et les herbes aromatiques contenant des divers métabolites sont considérées comme condiments et aromates.

En cosmétique : Des produits de beauté, parfums et articles de toilette, produits d'hygiène. (Mohammedi et al., 2006).

Les métabolites secondaires sont impliqués dans :

- les réactions de défense de la plante.
- la communication interbiotique et interspécifique (plante/insectes, plante/microorganismes, plante/plante).
- Les relations intraspécifiques (communication entre les plantes, signaux d'alertes...).
- la protection de la plante contre les stress abiotiques (UV, stress hydrique....) (Bertrand et Andreu, 2013).

4. Technique d'extraction des métabolites secondaires

Presque toutes ces méthodes reposent sur la capacité d'extraction des solvants utilisés et sur l'action combinée de la chaleur et/ou du mélange. Pour obtenir des composés bioactifs à partir de plantes, les techniques classiques couramment utilisées sont les suivantes: décoction, infusion, extraction au Soxhlet, macération et hydrodistillation. Toutes ces méthodes utilisent un solvant, un couple à température élevée et/ou une agitation (Ngahanjila et al., 2017).

4.1. Décoction

C'est une méthode appropriée pour extraire les constituants solubles dans l'eau et qui ne peuvent pas être détruits par l'effet de la chaleur. Pendant la décoction, de l'eau distillée est ajoutée à l'extrait séché et le mélange est soumis à un chauffage continu pendant une période

de temps à une température de 100 °C. On laisse ensuite refroidir à la température ambiante et on filtre pour obtenir le filtrat (**Figure 13**) (Ngahanjila et al., 2017).

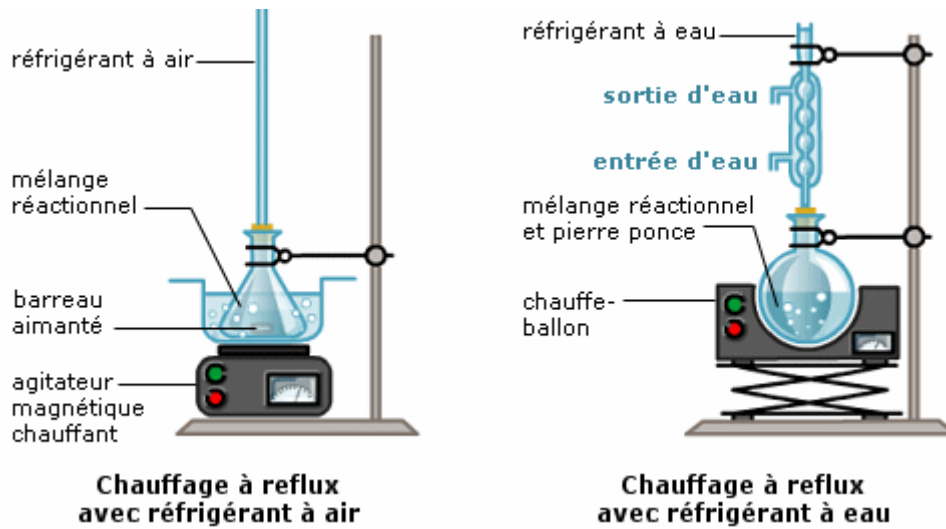


Figure 13: Montage de l'extraction par la décoction (Ngahanjila et al., 2017).

4.2. Infusion

Dans cette méthode, l'extraction consiste à tremper les solides en poudre dans de la poudre d'eau froide ou bouillante pendant une courte période (Ngahanjila et al., 2017)

4.3. Extracteur de Soxhlet

L'extraction par Soxhlet est une méthode suggérée pour l'extraction des lipides par Franz Ritter Von Soxhlet, un chimiste allemand. De nos jours, il est utilisé pour l'extraction de précieux composés bioactifs (solides-liquides) à partir de diverses sources naturelles. L'extraction par Soxhlet est une méthode simple et pratique pour un cycle d'extraction répété à l'infini avec un solvant frais jusqu'à épuisement complet du soluté dans la matière première (**Figure 14**). Lors de l'extraction avec du soxhlet, le processus de distillation est impliqué. Il consiste à chauffer une solution jusqu'à ébullition, puis à le condenser et à le renvoyer dans le ballon d'origine. Pratiquement, une quantité limitée de matière sèche est introduite dans un dé à coudre. Cette cartouche est ensuite déposée dans un ballon de distillation rempli de solvant spécifique. Après avoir atteint un niveau de submersion, un siphon absorbe le solvant dans le porte-cartouche, puis le rejette dans le ballon de distillation. Cette solution contient les extraits Solutés. Ce processus est effectué en continu jusqu'à ce que l'extraction soit terminée (Ngahanjila et al., 2017).

l'échantillon afin d'amener le nouveau solvant dans le menstrum pour un rendement d'extraction supérieur (Ngahanjila et al., 2017).

4.5. Hydrodistillation

L'hydrodistillation est une méthode traditionnelle d'extraction de métabolites de plantes qui n'utilise pas de solvants organiques. Dans l'hydrodistillation, les matières végétales sont emballées dans un compartiment immobile et de l'eau est ajoutée en quantité suffisante, puis amenée à ébullition. Alternativement, de la vapeur directe est injectée dans l'échantillon de plante. L'eau chaude et la vapeur jouent le rôle principal dans la libération des composés bioactifs du tissu végétal. Le refroidissement indirect par eau condense le mélange de vapeur d'eau et d'huile (**Figure 15**). Le mélange condensé s'écoule du condenseur vers un séparateur, dans lequel l'huile et les composés bioactifs se séparent automatiquement de l'eau. L'utilisation de la température d'extraction élevée peut causer la perte de certains composants volatils. Cet inconvénient limite son utilisation pour l'extraction de composés sensibles à la chaleur (Ngahanjila et al., 2017).



Figure 15: Appareil d'extraction des huiles essentielles type Clevenger.

Chapitre III :
Mécanisme d'action antimicrobien de
Juniperus phoenicea L.

Les propriétés antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. Un grand nombre de plantes, aromatiques, des plantes épicées et autres, possèdent des propriétés biologiques très importantes, qui trouvent des applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture **(Bahorun, 1997)**.

Les recherches actuelles sur les molécules antimicrobiennes d'origine naturelle se concentrent principalement sur les plantes, car ils peuvent être achetés plus facilement et seront sélectionnés sur la base de leur utilisation en médecine traditionnelle **(Yano et al., 2006)**.

De nos jours, leur emploi se fait sur des bases scientifiques et rationnelles puisque de nombreux travaux de recherche portent sur les propriétés antimicrobiennes des plantes médicinales **[(Cox et al., 2000) ; (Dorman et al., 2000)]**.

Le mécanisme d'action de ces composés passe par la désorganisation de la membrane plasmique, la formation des complexes avec la paroi, l'inhibition des enzymes, l'interaction avec l'ADN **(Cowan, 1999)**.

1. L'activité antimicrobienne

Une grande partie de la population mondiale dépend encore de la médecine traditionnelle et donc de l'utilisation des plantes à vertus médicinales notamment pour leurs activités antimicrobiennes **(Kasperek et Al-Janabi, 2008)**. L'activité antimicrobienne d'une substance peut être mise en évidence, in vitro, par un grand nombre de techniques classiques, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide **(Elkalamouni, 2010)**.

2.1. Méthode de diffusion en disque dans un milieu gélosé

Des disques de papier whatman, imprégnés des agents antimicrobiens à tester, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure des souches à étudier **(Euzéby, 2009)**. Quand la concentration de l'antimicrobien devient si diluée qu'il ne peut plus inhiber la croissance de la bactérie testée, la zone d'inhibition est démarquée. Les méthodes de diffusion ne permettent pas de chiffrer directement les valeurs des CMI **(Guérin et Carret, 1999)**.

2.2. Méthode de dilution

Ces méthodes peuvent être appliquées en gélose ou en bouillon, à partir desquelles nous pouvons déterminer les CMI (**Prescott et al., 2010**). Il existe une relation simple entre les diamètres des zones d'inhibition et les CMI mesurées par les techniques de dilution. Cette relation, appelée droite de concordance ou droite de régression (**Guérin et Carret, 1999**) dont la zone d'inhibition correspond inversement à la CMI de l'essai (**El kalamouni et al., 2010**).

a) En milieu liquide :

L'inoculum bactérien est distribué dans des cupules (méthode de microdilution) ou dans une série de tubes (méthode de macrodilution) contenant l'agent antimicrobien. Après incubation, la CMI est indiquée par le tube ou la cupule qui contient la plus faible concentration d'agent antimicrobien ou aucune croissance n'est visible (**Euzéby, 2009**).

b) En milieu solide :

L'agent antimicrobien est incorporé dans un milieu gélosé coulé en boîtes de Pétri. La surface de la gélose estensemencée avec un inoculum microbien à étudier. Après incubation, la CMI de chaque souche est déterminée par l'inhibition de la croissance sur le milieu contenant la plus faible concentration d'agent antimicrobien (**Euzéby, 2009**).

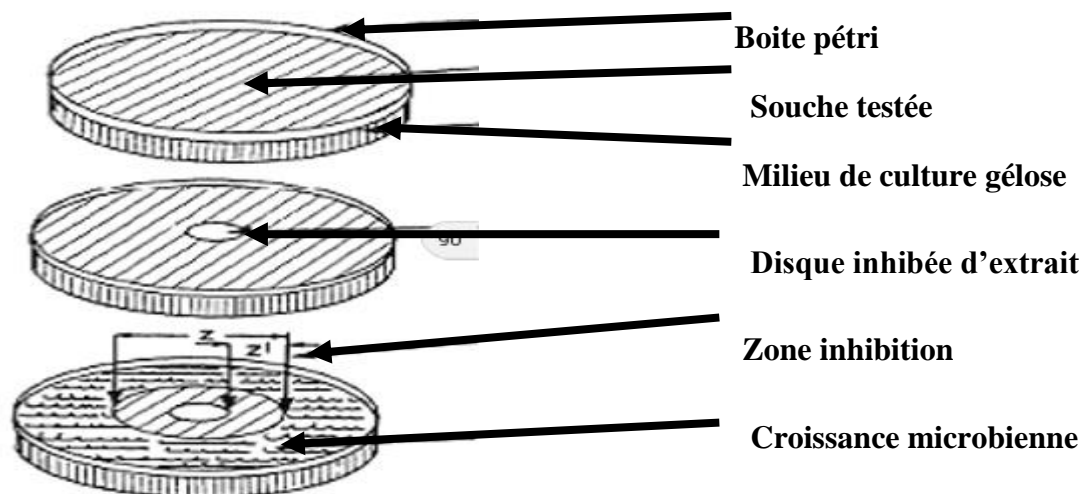


Figure 16 : Aromatogramme sur boîte de pétri à diffusion linéaire à partir d'un disque imprégné de l'extrait (**Euzéby, 2009**).

3. Mécanisme d'action antimicrobien

Les métabolites secondaires (MS) apparaissent comme une alternative ou un complément à la thérapeutique anti-infectieuse classique. De nombreuses études ont quantifié de manière objective leur efficacité, si bien qu'il est possible de dresser un bilan sur l'action des MS sur les infections bactériennes (Marque et al., 2018).

3.1. Mesure de l'efficacité des métabolites secondaires

Afin de pouvoir comparer entre elles des données obtenues par différentes équipes de chercheurs, des paramètres précis ont été définis (Marque et al., 2018).

3.2. La concentration minimale inhibitrice (CMI)

C'est la concentration la plus basse d'un produit qui s'oppose à la croissance visible d'une bactérie (Marque et al., 2018).

La CMI d'un produit est obtenue en préparant des dilutions successives du produit dont on cherche à tester l'activité antibactérienne. Puis on inocule chaque solution avec la même quantité de bactéries à tester. Lorsque, après un temps d'incubation, le tube à essai reste transparent, cela signifie que les bactéries n'ont pas été capables de former des colonies. Lorsqu'il se trouble, c'est que les bactéries se sont développées. Le tube à essai à la concentration la plus faible qui reste transparent après incubation de la bactérie, donne la CMI pour ce produit sur cet agent pathogène (Marque et al., 2018).

3.3. La concentration minimale bactéricide (CMB)

Il s'agit de la plus basse concentration en agent antibactérien requise pour éliminer une bactérie donnée (à 99,9%). Elle est obtenue par dénombrement des bactéries sur milieu gélosé (Marque et al., 2018).

Plus la CMI et la CMB sont faibles, plus le MS est efficace contre le germe testé (Marque et al., 2018).

3.4. Mode d'action des métabolites secondaires sur les bactéries

Les MS peuvent présenter une action cytotoxique sur les bactéries, en agissant sur plusieurs structures (figure 17).

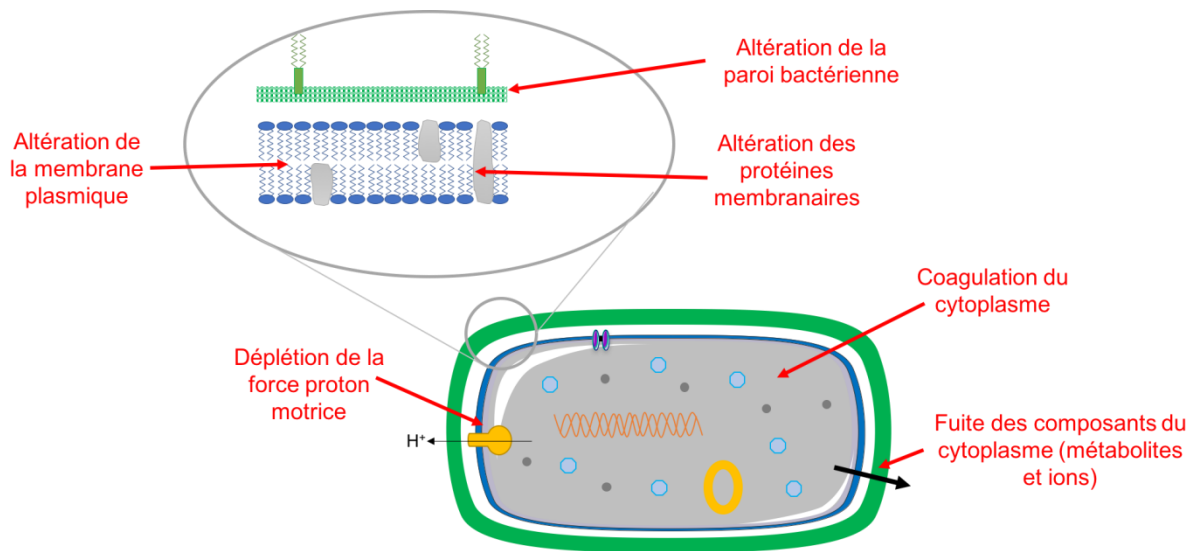


Figure17 : Mode d'action des MS sur les bactéries (Marque et al., 2018).

On peut résumer l'action des MS par deux catégories principales :

- **Dommages membranaires** : en traversant la paroi bactérienne et la membrane plasmique, les composés aromatiques des MS perméabilisent la membrane et perturbent son fonctionnement. Par exemple, ils peuvent la rendre perméable aux protons et à divers ions, et inhiber la production d'ATP. A terme, cela peut aboutir à une lyse de la bactérie. Ils peuvent aussi réduire la fluidité membranaire, ce qui nuit au bon fonctionnement de la bactérie.
- **Dommages cytoplasmiques** : les MS peuvent déclencher une coagulation du cytoplasme et endommager les protéines et lipides qu'il contient.

Les bactéries à gram positif sont plus sensibles aux huiles essentielles et métabolites secondaires que les bactéries à gram négatif. En effet, il semblerait que la membrane externe des bactéries à gram négatif étant rigide, riche en LPS et plus complexe, les molécules aromatiques des MS aient plus de difficulté à la traverser. En revanche, ce système extramembranaire complexe étant absent des bactéries à gram positif, les composés aromatiques peuvent atteindre plus facilement la membrane plasmique, occasionnant ainsi une meilleure activité antibiotique (Marque et al., 2018).

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

Ce travail a été effectué au laboratoire de Biotoxicologie, Pharmacognosie et Valorisation Biologiques des Plantes (LBPVBP) et le laboratoire pédagogique au département de biologie à la faculté des sciences de l'université Dr. Moulay Tahar de Saida.

1. Matériel

1.1. Matériel végétale

Les parties aériennes (feuilles et tiges) de la plante étudiée *Juniperus phoenicea* L., ont été récoltées dans la wilaya d'El Bayadh. La plante a été identifiée par **Pr. Kefifa Abdelkarim**, professeur au département de biologie à la faculté des sciences à l'université Dr. Moulay Tahar de Saïda. Le matériel végétal séché et la partie rameaux sont passés dans un broyeur électrique (**Figures 18 et 19**).



Figure 18 : Les feuilles de *Juniperus phoenicea* L.



Figure 19 : Les feuilles broyées en poudre de *Juniperus phoenicea* L.

1.2. Microorganismes

Six bactéries et trois levures ont été l'objet de l'étude de l'activité antibactérienne et antifongique (**Tableau 02**). La conservation des souches bactériennes se fait dans des tubes de gélose nutritive inclinée et candidas dans des tubes de sabouroud gélosé inclinée à une température de 4°C.

Matériel et méthodes

Bactéries : Dans les tubes à essai stériles contenant 5ml de milieu BN ajouter les gouttes de bactéries dans chaque tube, après garder les tubes en incubation à 37 C° pendant 24h. Les six souches bactériennes conservées sont ensemencées dans des boîtes de Pétri contenant 15ml de gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 24h, afin de stimuler leur croissance (**CLSI-M7-A7, 2006**).

Levures : Dans les tubes à essai stériles contenant 5ml de milieu SB ajouter les gouttes de levures dans chaque tube, après garder les tubes en incubation à 25 C° pendant 24h. Les levures sont ensemencées par la méthode des stries sur milieu Sabouraud en boîtes de Pétri. Ces dernières sont incubées à 25°C pendant 48h (**CLSI-M27-A2, 2002**).

Tableau 02 : Les différents microorganismes utilisés.

	Microorganisme	Référence	
Bactéries	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Gram +
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115	Gram+
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	Gram+
	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311	Gram -
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25933	Gram-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Gram-
Levures	<i>Candida albicans</i>	ATCC 26790	
	<i>Candida albicans</i>	IP444	
	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	

2. Méthodes :

2.1. Préparation des extraits

La préparation de l'extrait a été réalisée par la méthode macération en milieu aqueux, le montage de cette technique de séparation est illustré dans **la figure 20**:



Figure 20 : Macération du matériel végétal.

Les étapes suivies sont les suivantes (**Figure 21**):

- dans un erlenmeyer, mettre 50g de la poudre de la plante *Juniperus phoenicea* L. avec 1000 ml l'eau distillée sous agitation à une température ambiante pendant 24h.
- Après 24h, filtrer le mélange et récupérer le filtrat, gardé dans un four à 50 C°.
- l'extrait préparé est conservés à 4°C et à l'abri de la lumière (**Dohou et al., 2003**).

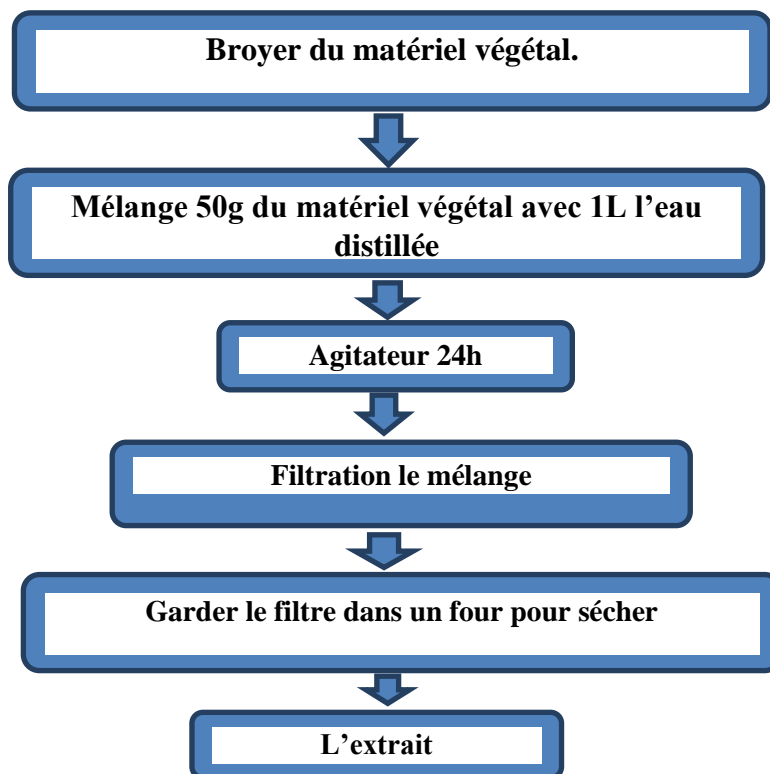


Figure 21 : Protocole de préparation l'extrait

2.2. Calcul des rendements en extrait sec

Nous pouvons déterminer le rendement de l'extrait sec obtenu de la plante étudiée en calculant le rapport suivant :

$$\text{Rdt \%} = \left[\frac{P_1 - P_2}{P_3} \right] \times 100$$

- ◆ **P1** : poids du ballon après évaporation.
- ◆ **P2** : poids du ballon avant évaporation.
- ◆ **P3** : poids de la matière végétale de départ.

2.3. Screening phytochimique

La détection des différentes familles de composés chimiques existant dans la plante est l'un des objectifs essentiels de l'examen phytochimique. Ceci constitue la première étape de la recherche des molécules actives présentes dans la plante étudiée. Les tests phytochimiques sont basés sur des essais de solubilités, des réactions de coloration et de précipitation, ainsi que des examens sous lumière ultraviolette (Cavé, 1993). Les différentes classes recherchées sont les suivantes :

Les tannins : La présence des tannins est mise en évidence en ajoutant à 1ml de l'extrait éthanolique, 2ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl_3 diluée (1 %). L'apparition d'une coloration bleu-noire caractérise la présence des tannins galliques, verte ou bleu-verte celle des tannins catéchiques (Trease et Evans, 1987).

Les flavonoïdes : La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5ml de l'extrait éthanolique avec 1ml de HCl concentré et 0,5g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe après 3 minutes (Cavé, 1993).

Les anthocyanes : Un volume de 2ml d'infusé aqueux est additionné à 2ml de HCl 2N. L'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu-violacé par addition d'ammoniac indique la présence d'anthocyanes [(Debray et al., 1971) ; (Paris et al., 1969)].

Les alcaloïdes : Les tests sont réalisés par des réactions de précipitation avec les réactifs de Mayer, de Wagner et Dragendorff.

6 mL de chaque extrait sont évaporés à sec, le résidu est repris par 5 mL d'HCl 2N. Dans trois tubes à essai contenant 1mL du filtrat, nous avons ajouté 5 gouttes de réactif de Mayer dans le premier tube, 5 gouttes du réactif de Wagner dans le second tube et 5 gouttes du réactif de Dragendorff dans le troisième tube, l'apparition d'un précipité blanc, brun et orange, respectivement, révèle la présence d'alcaloïdes (**Dohou et al., 2003**).

- **Réactif de Dragendorff** : (Tétraiodobismuthate de potassium) ou appelle aussi réactif à l'iodobismuthate de potassium : Solution A : Dissolve 0.5g de bismuth nitrate ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) dans 20 ml d'acide acétique 20% ; Solution B : 5ml de KI préparée à 40% dans l'eau distillé ; Mélanger A et B et Ajuster à 100ml par l'eau distillé.
- **Réactif de Mayer** : Solution A : 1.358g de chlorure de mercure HgCl_2 sont dissous dans 60 ml d'eau distillée ; Solution B : 5g d'iodure de potassium KI sont dissous dans 10ml d'eau distillée ; Les solutions A et B sont mélangées extemporanément et le volume final est ajusté à 100 ml avec d'eau distillée.
- **Réactif de Wagner** : 2g de KI et 1,27g de I sont dissous dans 75ml d'eau distillée, puis ajustés à 100ml avec d'eau distillée.

Anthocyanes : A 1mL de l'extrait, nous avons ajouté 5 mL d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 10% puis de l'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH) à 25%. Si la coloration s'accroît par acidification, puis vire au bleu-violacée en milieu basique, cela permet de conclure la présence des anthocyanes (**Dohou et al., 2003**).

Coumarines (Fluorescence UV) : 5 mL de chaque extrait est évaporé à sec. Le résidu ainsi obtenu est repris dans l'eau chaude. Un volume de cette phase aqueuse est additionné d'une solution d'ammoniaque (NH_4OH) à 10% et un autre volume est gardé comme témoin. L'apparition de fluorescence après observation sous UV à 366 nm indique la présence de coumarins (**Dohou et al., 2003**).

Stérols et triterpènes : Deux essais ont été effectués : Essai 1 : Test pour les stérols et stéroïdes : Un volume de 10 ml de l'extrait éthanolique est placé dans un erlenmeyer. Après évaporation à sec, le résidu est solubilisé avec 10 ml de chloroforme anhydre. Ensuite, on mélange 5 ml de la solution chloroformique avec 5 ml d'anhydre acétique en y ajoutant quelques gouttes d'acide sulfurique concentré, on agite et on laisse la solution se reposer. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert (maximum d'intensité en 30 minutes à 21°C) (**Trease et Evans., 1987**).

Essai 2 : Test pour les hétérosides stéroïques et triterpéniques : Il consiste à évaporer à sec l'extrait éthanolique correspondant à 10 ml. Ensuite, on dissout le résidu obtenu dans un mélange d'anhydride acétique/ chloroforme (5/5 : V/V) ; puis on filtre et on traite le filtrat par quelques gouttes d'acide sulfurique concentré (réaction de Liebermann-Burchardt). Si cette réaction donne des colorations verte-bleue et verte-violette, elle indique alors la présence respective des hétérosides stéroïques et triterpéniques (**Trease et Evans, 1987**).

Les saponosides : Leur présence est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse, degré de dilution d'un décocté aqueux donnant une mousse persistante dans des conditions déterminées. Nous avons procédé à une décoction de 2 grammes de poudre végétale avec 100 ml d'eau distillée qu'on porte à ébullition pendant 30 minutes. Après refroidissement et filtration, on réajuste le volume à 100 ml. A partir de cette solution mère, on prépare 10 tubes (1,3cm de diamètre interne) avec 1,2, ... 10ml, le volume final étant réajusté à 10 ml avec de l'eau distillée. Chacun de ces tubes est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes. Après un repos de 15 minutes en position verticale, on relève la hauteur de la mousse persistante en centimètre. Si elle est proche de 1 cm dans le 10ème tube, alors l'indice de mousse est calculé par la formule suivante : La présence de saponines dans la plante est confirmée avec un indice supérieur à 100 (**Dohou et al., 2003**).

Les composés réducteurs : Leur détection consiste à traiter 1 ml de l'extrait éthanolique avec de l'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling puis chauffer. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge brique (**Trease et Evans, 1987**).

2.4. Evaluation de l'Activité antimicrobienne par la méthode de diffusion des disques

2.4.1. Principe

Cette méthode consiste à mettre en évidence une éventuelle activité antimicrobienne de l'extrait de *Juniperus phoenicea*, en présence des germes tests. Des disques absorbants stériles, imprégnés d'une quantité d'extrait et déposés sur une gélose inoculée avec les souches. La diffusion de l'extrait dans la gélose permet de suivre l'inhibition et la croissance des germes qui se traduira par une zone claire autour de disque dite zone d'inhibition. Le protocole de **Beddou et ces collaborateurs (2014)** a été suivi.

2.4.2. Préparation de la culture bactérienne

L'activité antimicrobienne et des extraits ont été évalués en utilisant six (06) souches bactériennes (03 souches à Gram positif et 03 souches à Gram négatif) et trois (03) levures.

2.4.3. Procédure

➤ Préparation des disques :

Nous avons le papier Whatman coupé en des disques de 6mm, ces derniers doivent avoir un contour régulier pour donner une zone d'inhibition facile à mesurer. Les disques, une fois préparés, sont introduits dans un flacon en verre et placés dans l'autoclave pendant 30 minutes à 120C°.

➤ Préparation des dilutions :

Nous avons préparé une solution mère 1g extrait avec 2 ml DMSO et la filtré aseptiquement à l'aide d'un filtre stérile. Huit dilutions de différentes concentrations de l'extrait étudié ont été préparés dans le diméthylesulfoxyde DMSO (**Tableau 03**) (**Figure 22**).

Tableau 03 : Préparation des dilutions

Concentration	L'extrait pur (mg)	DMSO (µl)
1	500	1000
1/2	250	1000
1/4	125	1000
1/8	62,5	1000
1/16	31,25	1000
1/32	15,6	1000
1/64	7,8	1000
1/128	3,9	1000

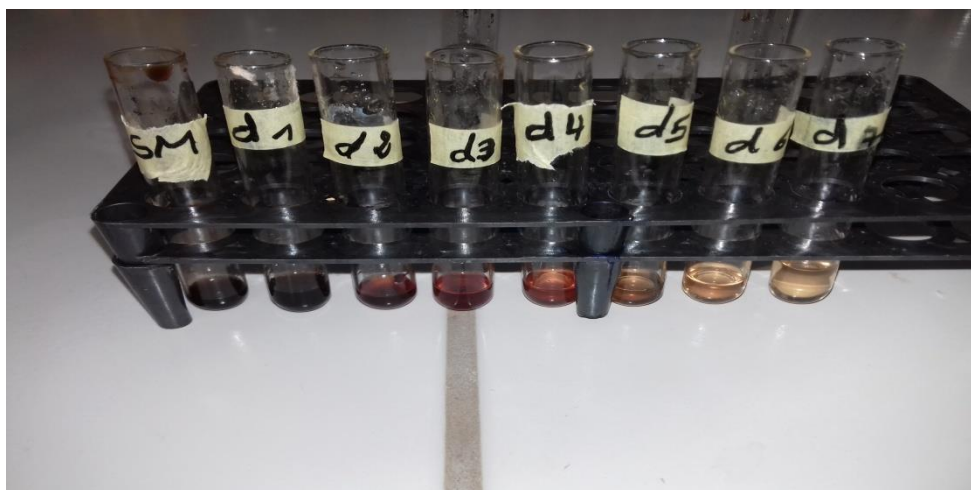


Figure22 : Figure représente des différentes dilutions d'extrait

➤ Réparation des inoculums

L'activité antimicrobienne des extraits est tout d'abord analysée pour leur zone d'inhibition par la méthode de diffusion sur des milieux solides. Les inoculums sont préparés en diluant une masse cellulaire dans la solution de NaCl à 0,9 %, ajusté à l'échelle de McFarland 0,5, confirmée par une lecture spectrophotométrique sur le spectrophotomètre de type (BIBBY, Anadéo). À 625nm ($\lambda = 0,08 - 0,1$, correspondant à 10^8 UFC/mL) pour les bactéries et 530nm ($\lambda = 0,12 - 0,15$, correspondant à $1-5 \times 10^6$ UFC/mL) pour les levures (Pfaller et al., 1998).

➤ Ensemencement et application des disques

Un millilitre de suspension normalisée des micro-organismes testés (10^6 UFC/ml pour les levures et bactéries 10^8 UFC/ml), de gélose de Mueller-Hinton pour les bactéries, et de Sabouraud pour les levures. (Testoret al., 2004). Les suspensions ont été ensemencées sur la surface, à l'aide d'un écouvillon, des plaques des milieux solides. Après séchage, un disque en papier stérile (6mm de diamètre) imprégnés de 10 μ l des extraits sélectif ont été appliqués dans la boîte de Pétri. Un disque préparé dans le même état avec seulement le volume correspondant de DMSO a été utilisé comme contrôle négatif. L'activité a été déterminée en mesurant le diamètre de la zone inhibitrice en mm après incubation à 37° C/24h pour les bactéries, à 30° C / 48h pour levures (Figure 23) (Beddou et al., 2014).

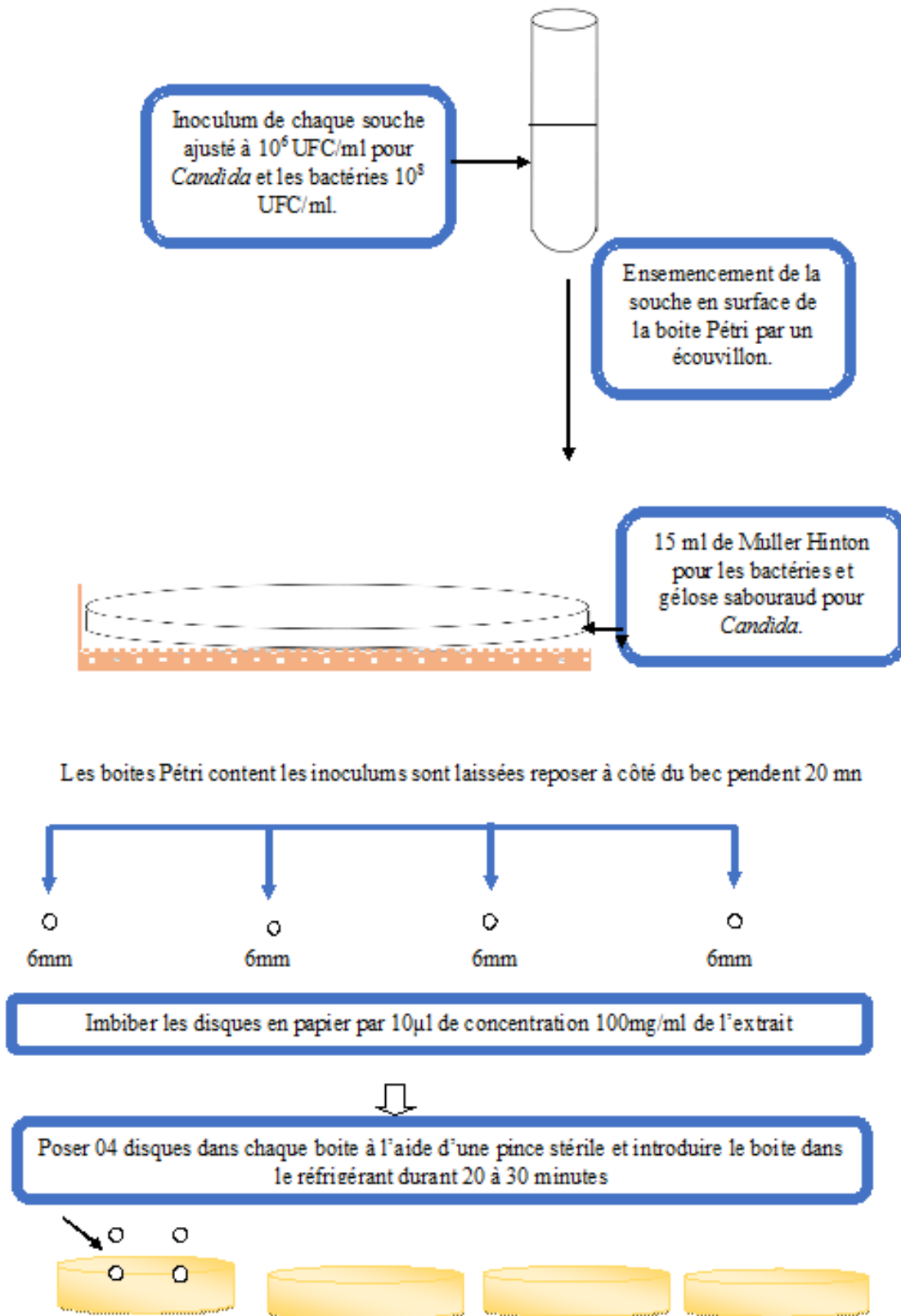


Figure 23 : Schéma descriptif de la préparation des disques et l'ensemencement des souches microbiennes.

➤ La lecture

Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés à l'aide d'une règle, à l'extérieur de la boîte fermée.

- $X \leq 7$ mm aucune activité antimicrobienne -
- $7 \text{ mm} < X < 9,9$ mm activité antimicrobienne faible+
- $10 \text{ mm} < X < 11,9$ mm activité antimicrobienne modeste ++
- $12 \text{ mm} < X < 15$ mm activité antimicrobienne élevée +++
- ≥ 15 mm activité antimicrobienne forte ++++
-

2.5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide

2.5.1. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'extrait a été évaluée par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI). La technique utilisée a été décrite par CLSI en 2006. Elle est basée sur la capacité des microorganismes à produire une croissance visible à l'extrait nu au sein d'une série de dilutions de la substance antimicrobienne (**CLSI-M7-A7, 2006**).

Le Bouillon Muëller Hinton (MH) (pH de 7,2 à 7,4) est largement utilisé comme milieu standard pour la micro-dilution en plaque. Il permet une meilleure croissance de la plupart des bactéries pathogènes non exigeantes, en plus de son faible effet antagoniste vis-à-vis des antibiotiques. Ce bouillon est considéré comme milieu de référence.

A partir d'une pré-culture bactérienne en milieu solide (gélose nutritive) de 24 h à 37°C, nous avons prélevé quelques colonies à l'aide d'une anse de platine que nous avons resuspendues dans du bouillon nutritif. La concentration cellulaire est 10^8 cellules/ ml. Une dilution au $1/100^{\text{ème}}$ est effectuée pour avoir un inoculum final de 10^6 cellules/ ml.

Pour chaque ligne de la microplaque nous avons déposés 50µl de l'inoculum dans les 12 puits à l'exception du puits N°12 qui servira de puits de contrôle de contamination, qui contient seulement le Bouillon Muëller Hinton comme témoin positif (100 µl). Nous avons ensuite ajouté 50 µl de la solution de l'extrait dans les 12 puits à l'exception du puits N°11 et

Matériel et méthodes

puits N°12. Le puits N°11 servira de témoin négatif (croissance sans extrait). Les plaques sont scellées et placées dans une étuve à 37°C pendant 24 heures. La lecture du résultat s'effectue à l'extrait nu à l'aide de d'une source de lumière sous la microplaque pour visualisé si il y'a une inhibition ou non (la croissance sous forme un trouble). [(Espinel-Ingroffet Canton., 2007) ; (Majorosetcoll., 2005)] (Figures : 24, 25 et 26).

La plus faible concentration de chaque fraction ne montrant aucune croissance sera considérée comme la concentration minimale inhibitrice (CMI), elle est confirmée par un ensemencement sur milieu solide (CLSI-M7-A7, 2006).

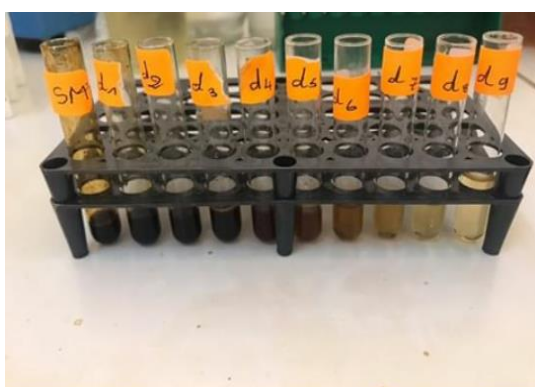


Figure 24 : Montre les différentes dilutions d'extrait.



Figure 25 : Montre la procédure de préparation micro-dilution.

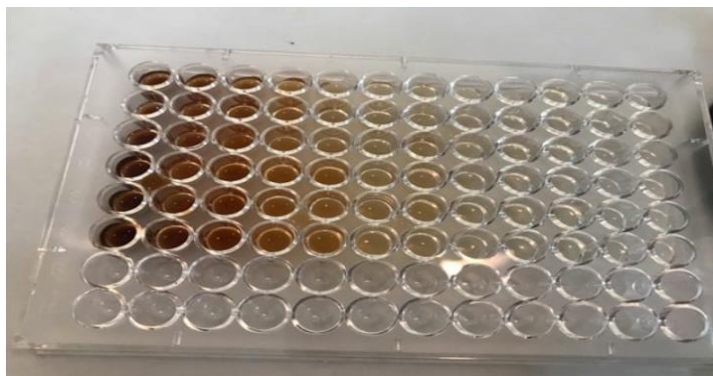


Figure26 : Montre une microplaque après le remplissage.

Pour chaque souche on note :

- La présence ou l'absence de croissance bactérienne après 24 /48H.
- Les cultures sans croissances sont suivies sur 48h pour détecter un possible reprise de la croissance.
- La dilution correspondante à la concentration minimale inhibitrice.

2.5.2. Activité antifongique

L'étude de l'activité antifongique est réalisée par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI). Nous avons utilisé la méthode décrite en **2002** par *Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 (CLSI)*. C'est la méthode de référence qui permet de tester l'efficacité des antifongiques et de déterminer les CMI et les CMF correspondantes (**CLSI-M27-A2, 2002**). La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la concentration la plus faible de la substance antimicrobienne qui inhibe la croissance des microorganismes.

Le principe de cette méthode est d'évaluer la capacité des levures à produire une croissance visible dans les puits d'une microplaque à fond rond (à 96 puits) contenant le milieu de culture liquide, en présence de concentrations décroissantes d'extrait. Le milieu de culture préconisé pour cette technique est le bouillon sabouroud liquide. Nous avons utilisé ce milieu à pH 7,0.

Les souches fongiques conservées dans sabouraud gélose à 4°C, sont ensemencées dans sabouraud liquide à 35°C pendant 24 h, puis réensemencées en strie sur boîte de pétri contenant de sabouraud gélose à 35°C pendant 20 h, nous avons prélevé 5 colonies d'un millimètre de diamètre, que nous avons placé dans un tube à essai contenant 5 ml d'eau physiologique stérile.

La concentration cellulaire de cette solution est ensuite ajustée à 10^8 cellules/ml par cellule de Thomas. Une dilution au $1/100^{\text{ème}}$ est effectuée pour avoir un inoculum final de 10^6 cellules/ml.

Pour chaque ligne de la microplaque, nous avons déposés 50µl de l'inoculum dans les 12 puits à l'exception du puits N°12 qui servira de puits de contrôle de contamination qui contient seulement sabouroud liquide comme témoin positif (100 µl). Nous avons ensuite ajouté 50 µl de la solution de l'extrait dans les 12 puits à l'exception du puits N°11 et puits N°12. Le puits N°11 servira de témoin négatif (croissance sans extrait). Les plaques sont scellées et placées dans une étuve à 35°C pendant 24 heures (CLSI-M27-A2, 2002).

La lecture du résultat s'effectue à l'extrait nu à l'aide d'une source de lumière sous la microplaque pour visualisé si il y'a une inhibition ou non (la croissance sous forme une trouble). [(Espinell-Ingroff et Canton., 2007) ; (Majoroset al., 2005)].

La plus faible concentration de chaque fraction ne montrant aucune croissance sera considérée comme la concentration minimale inhibitrice (CMI), elle est confirmée par là un ensemencement sur milieu solide (CLSI-M27-A2, 2002).

2.6. Détermination des concentrations minimales bactéricide (CMB) ou fongicide (CMF)

2.6.1. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La CMB est définie comme la plus faible concentration de l'antibactérien qui détruit 99,9% de la concentration cellulaire finale. Après la détermination de la CMI (durant 24h d'incubation à 37°C), les deux puits contenant les concentrations en l'extrait strictement inférieure à la CMI et le CMI et le puits contenant concentration en l'extrait supérieur à la CMI vont servir pour la détermination de la CMB. Pour ce faire, un échantillon de 10 µl de chaque puits (ne présentant pas de croissance) va être transféré dans des boîtes de Pétri contenant du milieu Gélose nutritive. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 h. Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boîte de celle de la CMB renferme un nombre de colonies inférieur à 3 (**Prescott et al. 1995**).

2.6.2. Détermination de la concentration minimale fongicide (CMF)

La CMF est définie comme la plus faible concentration de l'antifongique qui tue 99,9% de la concentration cellulaire. Pour la détermination de la concentration minimale fongicide, nous avons utilisé la méthode décrite par (**Canton et al., 2003**). Cette méthode est en accord avec les exigences de le sabouraud liquide (**Espinelgroff et Canton, 2007**).

Après la détermination de la CMI (durant 24h d'incubation à 35°C), les deux puits contenant les concentrations de substances antifongiques strictement inférieurs à la CMI le CMI et le puits contenant concentration en l'extrait supérieur à la CMI vont servir pour la détermination de la CMF. Pour ce faire, 10 µl de chaque puits vont être transférés dans des boîtes de Pétri contenant du milieu sabouraud gélose. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 35 °C pendant 48 h. Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boîte correspondant à la CMF renferme un nombre de colonies inférieures à 3 (**MAJOROS et coll., 2005**).

2.7. Mécanisme d'action antibactérien de l'extrait

2.7.1. Conditions expérimentales générales

Les concentrations de l'extrait utilisées ont été choisies selon les CMI précédemment déterminées. La gamme de ces concentrations est de : CMI/4, CMI et CMI x 4(CMB), CMI x 16 de la souche *S.aureus* (**Tableaux 04 et 05**). La souche *S. aureus* a été sélectionnée parce qu'elle a montré la plus forte sensibilité vis-à-vis l'extrait testé. La solution tampon utilisée pour ces tests est la solution tampon phosphate (PBS).

Tableau 04 : Détermination du rapport CMB/CMI ou CMF/CMI (mg/ml)

Souche	CMI	CMB
<i>S.aureus</i>	1,95	7,81

Tableau 05 : Concentrations utilisées (mg/ml) d'extrait pour les tests de la viabilité cellulaire, la tolérance au sel et l'activité des lipases

Souche	CMIx16	CMIx4	CMI	CMI /2
<i>S. aureus</i>	31,25	7,81	1,95	0,48

2.7.2. Préparation des cellules

Bactéries: La suspension bactérienne (la phase exponentielle de croissance) a été préparée par inoculation de cinq colonies d'une culture jeune de bactéries dans 50 ml de Mueller-Hinton bouillon. Ensuite, elle a été incubée à 37°C pendant 4-5 h sous agitation. Après l'incubation, les bactéries ont été séparées au milieu de culture PBS (pH 7.4) (**De Barros et al., 2009**).

2.7.3. Tests de la viabilité cellulaire

Par centrifugation à 5000 tr/min durant 20 min à 4°C, ensuite le culot bactérien est lavé deux fois par la solution.

Les tests de la viabilité cellulaire ont été réalisés par un comptage des cellules viables sur milieu solide. Pour cela, Des volumes de 500 µl des concentrations finales C₁, C₂, C₃, C₄ ont été prélevés, dilués en série dans l'eau peptonée stérile (0.1 g 100 ml⁻¹) et puis versés sur des boîtes coulées par un neutraliseur stérile, suivie d'ensemencement par inondation (**De Barros et al., 2009**). Après 24 h d'incubation à 37°C, les colonies ont été comptées et le nombre de

cellules viables rapporté comme unités formant des colonies(UFC) par ml et les résultats ont été exprimés en Log d'UFC/ ml. Des tubes de contrôle sans extrait ont été testés de la même façon.

2.7.4. Tolérance au sel

La capacité de cellule de *S. aureus* traité avec l'extrait à croître sur un milieu de culture solide additionné de NaCl a été étudiée.

Une quantité de 100µl de cultures ont été diluée dans de l'eau peptonée stérile et ont été étalée sur GN-NaCl (**Carson et al., 2002**). Les tubes de contrôle sans l'extrait ont été testés de la même façon. Après 24 h d'incubation, le nombre d'UFC/ml sur chaque boîte GN-NaCl ont été comparés à ceux obtenus pour l'essai de contrôle, et les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules capables de former des colonies.

2.7.5. Activité des lipases

L'activité de la lipase a été évaluée sur le milieu de culture Agar Salty Tween-AST (**Nostroet al. 2001**) à pH 7,2. Des cultures cellulaires diluée dans de l'eau peptonée stérile ont été étalées sur l'AST, suivie à incubation à 37 °C pendant 24 h. Après la période d'incubation, le nombre de colonies (UFC/ml) présentant une activité de lipase positif sur chaque boîte AST ont été comptées, et les résultats ont été exprimés en pourcentage de cellules capables de former des colonies (**De Barroset al., 2009**).

Résultats et discussion

Notre objectif consiste à étudier l'activité antimicrobienne et les mécanismes d'action de l'extrait aqueux de la plante *Juniperus phoenicea L.* Dans un premier temps, nous avons analysé qualitativement l'extrait en métabolites secondaires après leur extraction.

Dans un deuxième temps, nous avons évalué les activités biologiques suivantes :

- Etude du pouvoir antimicrobien par la méthode de diffusion des disques de l'extrait aqueux de la plante étudiée vis-à-vis de six souches bactériennes et trois souches fongiques de références.
- Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide et les concentrations minimales bactéricide (CMB) ou fongicide (CMF) vis-à-vis six souches bactériennes et trois souches fongiques de références.
- Etude de mécanisme d'action antibactérien de l'extrait (la viabilité cellulaire, la tolérance au sel et l'activité des lipases) de la souche sélectionnée *S. aureus* (bactérie à Gram positive).

1. Calcul du rendement

Le rendement R en extrait est calculé à l'aide de la formule suivante :

Rdt %= [poids du ballon après évaporation- poids du ballon avant évaporation / poids de la matière végétale de départ] x **100**. Les résultats sont résumés dans **le tableau 06**.

Tableau 06 : Rendement massique d'extrait

Espèces	Parties utilisées	Rdt (%)
<i>Juniperus phoenicea L.</i>	Parties aériennes	11,9%

La différence de rendement en comparaison avec la littérature peut être expliquée par divers facteurs tels que la provenance, la période de récolte, l'âge de la plante, l'humidité du matériel végétal, la technique d'extraction, et aussi les facteurs environnementaux (**Zrira et Benjilali, 1991; 1992**)

2. Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de métabolites secondaires existants dans la partie aérienne de *Juniperus phoenicea* L. par des réactions de caractérisation qualitatives. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés.

Les résultats expérimentaux du screening phytochimique sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau 07 : Résultat du screening phytochimique.

Composé cherché	<i>Juniperus phoenicea. L</i>
Alcaloïdes	+
Tanins	+
Flavonoïdes	+
Stérols et Triterpènes	+
Saponosides	+ I = 1100
Anthocyanes	-
Composé réducteur	+

(+) = présence ; (-) = absence.

Nos résultats de son en accord avec ceux obtenus par les travaux de **Medini et al. (2013)** qui ont signalé la présence des tannins, flavonoïdes dans l'extrait des feuilles de *J. phoenicea*. D'autre part, **Fadel et al. (2016)** ont enregistré la présence des saponines et des alcaloïdes. D'autres part, la recherche des stérols révélée positive au cours de notre analyse, et qui a été en accord avec l'étude de **Makhloufi et al. (2014)** et **Amalich et al. (2016)**.

3. Activités antimicrobienne

3.1. Méthode de diffusion sur disques

Dans cette partie, l'extrait obtenu par la méthode de macération en milieu aqueux a été testé contre une gamme de microorganismes (Bactéries et levures de références). L'efficacité et la puissance de l'extrait a été évaluée par la méthode de diffusion des disques sur milieu solide, basée sur la mesure des diamètres des zones d'inhibitions en mm ou en cm (**Tableaux 08 et 09**).

Les figures

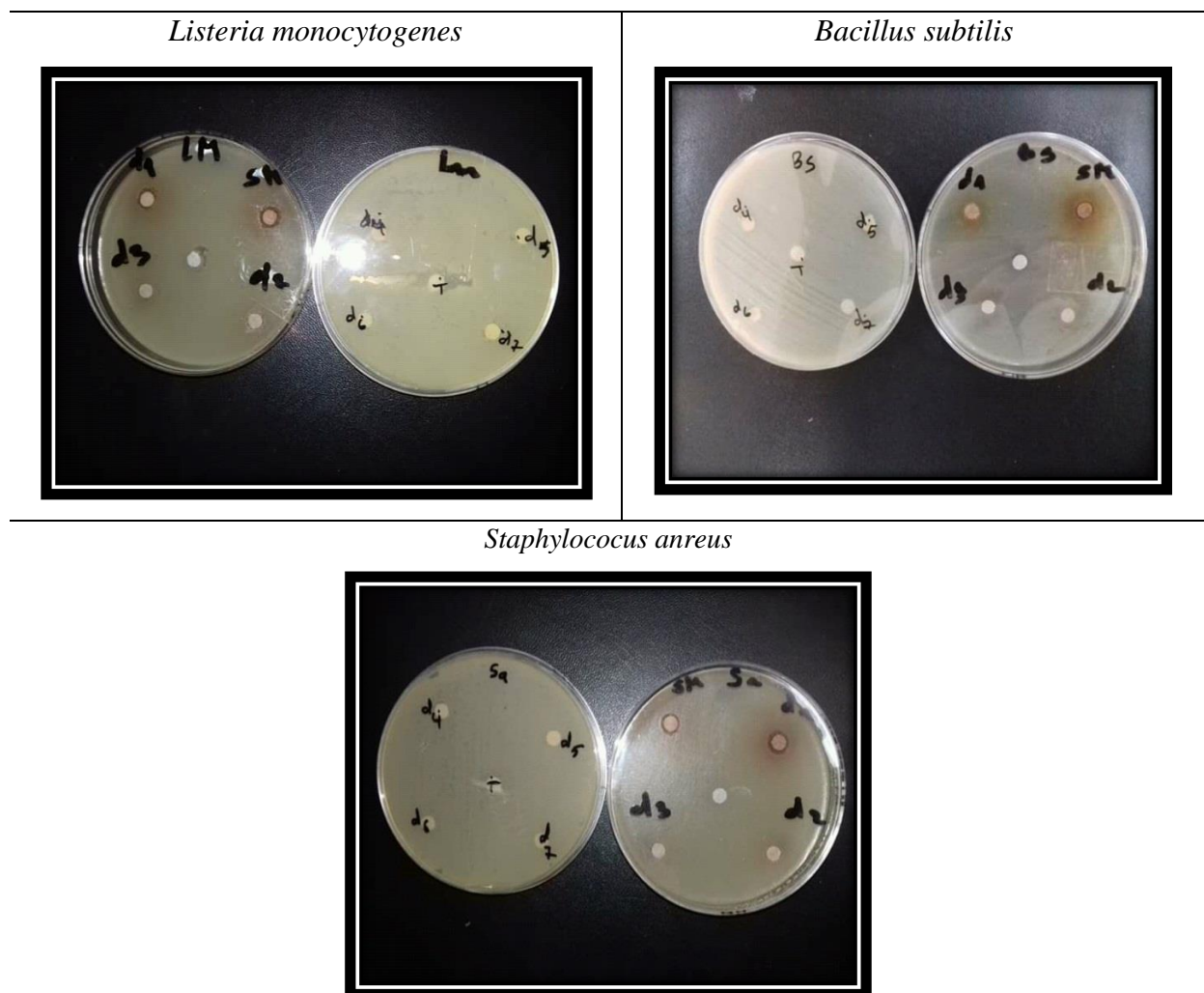


Figure 28 : Résultats obtenus par la méthode de diffusion des disques de l'extrait aqueux de *J. phoenicea* vis-à-vis des bactéries à gram positif

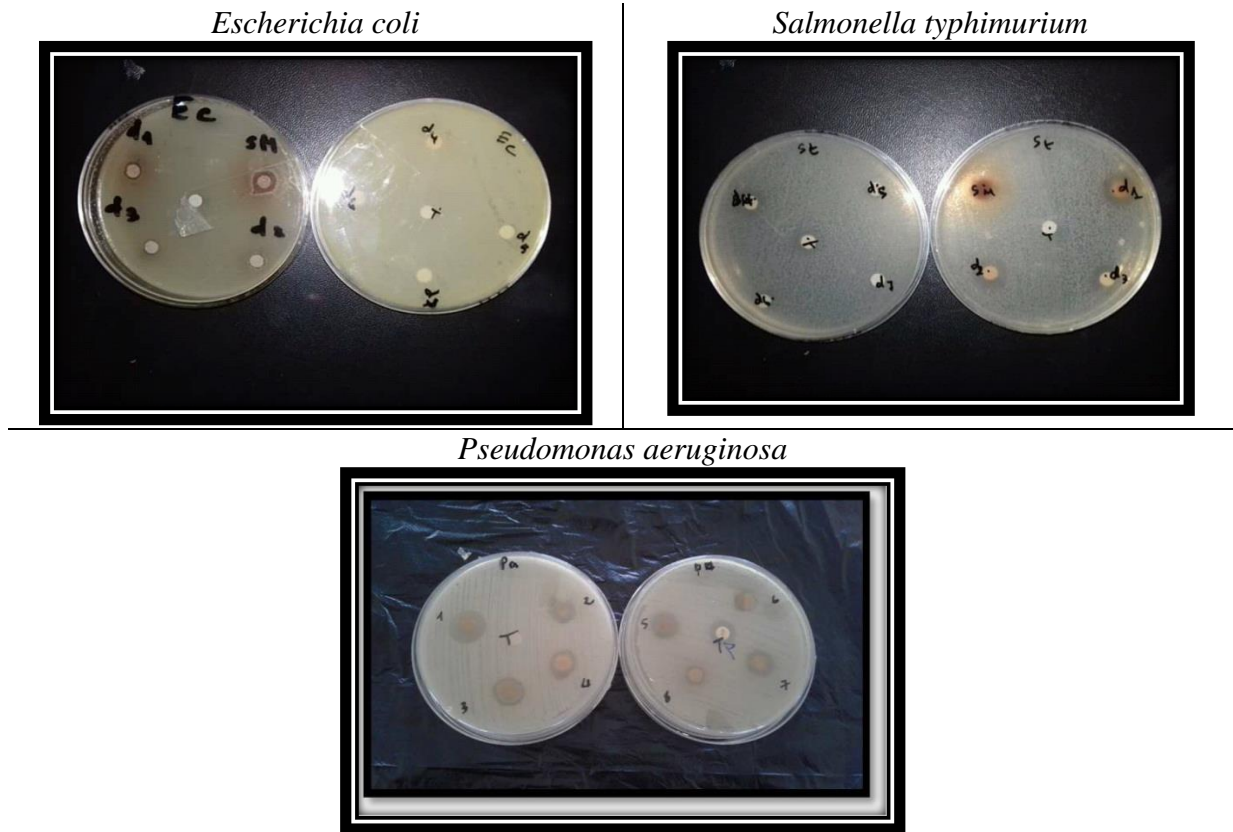
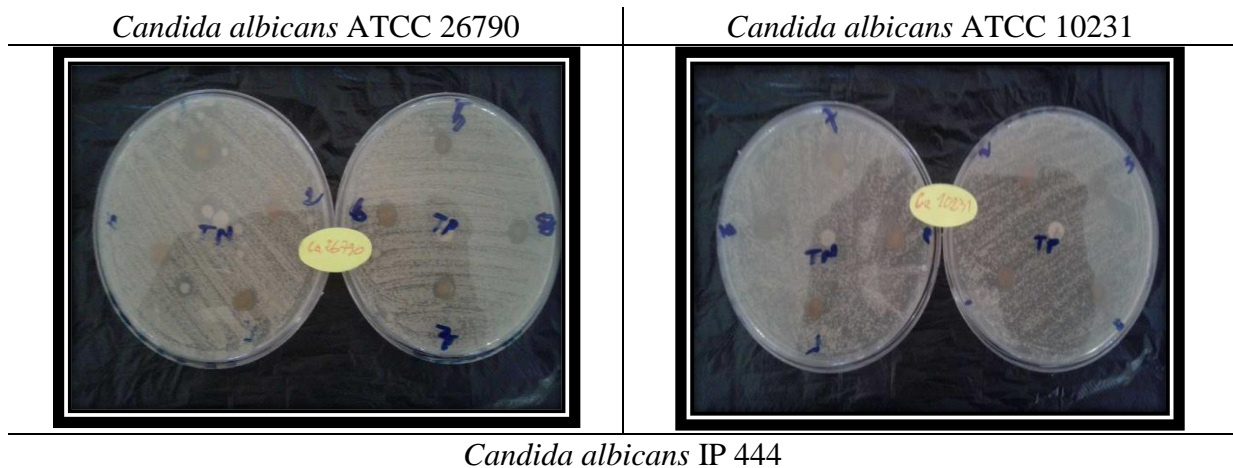


Figure 29 : Résultats obtenus par la méthode de diffusion des disques de l'extrait aqueux de *J. phoenicea* vis-à-vis des bactéries à gram négatif



Résultats et discussion



Figure 30: Résultats obtenus par la méthode de diffusion des disques de l'extrait aqueux de *J. phoenicea* vis-à-vis des *Candida albicans*

Tableau 08 : Diamètre d'inhibition de l'extrait aqueux de *J. phoenicea* vis-à-vis des bactéries et des levures testés (en mm)

Les souches testées	Diamètre d'inhibition (mm)							
	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,8	3,9
<i>S.aureus</i>	13	10	8	9	6	7	7	6
<i>L.monocytogenes</i>	15	13	15	14	10	8	6	6
<i>B. subtilis</i>	10	8	6	6	7	7	6	6
<i>S.typhimurium</i>	15	11	7	8	6	6	6	6
<i>E.coli</i>	12	9	8	7	6	6	6	8
<i>P.aeruginosa</i>	18	13	15	16	15	12	13	10
<i>C. albicans</i> 26790	11	8	10	6	7	8	10	13
<i>C. albicans</i> 10231	18	7	10	7	8	10	10	9

Résultats et discussion

<i>C. albicans</i> IP444	6	6	6	6	6	6	6	6
--------------------------	---	---	---	---	---	---	---	---

Les diamètres des zones d'inhibition moins de 7 mm ont été enregistrées comme inactifs, entre 7 et 9,9 mm ont été enregistrés comme faiblement active, entre 10 et 11,9 mm ont été enregistrés comme modeste actif et entre 12 et 15 comme élevé activité et plus de 15 mm, ont été enregistrés comme fort actif. Le tableau suivant résume le degré de sensibilité des différentes bactéries et levures vis-à-vis nos extrait.

Tableau 09: Degrés de sensibilité de l'extrait aqueux de *J. phoenicea* vis-à-vis des bactéries et des levures testés

Souches testées	Degré de sensibilité							
	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,8	3,9
<i>S. aureus</i>	E.A	M.A	F.A	F.A	I	I	I	I
<i>L. monocytogenes</i>	E.A	E.A	E.A	E.A	M.A	F.A	I	I
<i>B. subtilis</i>	M.A	F.A	I	I	I	I	I	I
<i>S. typhimurium</i>	E.A	M.A	I	F.A	I	I	I	I
<i>E. coli</i>	E.A	M.A	F.A	I	I	I	I	F.A
<i>P. aeruginosa</i>	B.F	E.A	E.A	B.F	E.A	E.A	E.A	M.A
<i>C. albicans</i> 26790	M.A	F.A	M.A	I	I	F.A	M.A	E.A
<i>C. albicans</i> 10231	B.F	I	M.A	I	F.A	M.A	M.A	F.A

Résultats et discussion

<i>C. albicans</i> IP444	I	I	I	I	I	I	I	I
--------------------------	---	---	---	---	---	---	---	---

I : Inactive ; **F.A** : Faiblement actif ; **M.A** : Modeste actif ; **E.A** : Elevé actif **B.A** : Bien actif

Les résultats de l'étude effectuée sur le *Juniperus phoenicea* L., montrent que l'extrait de la plante a été très actif sur *P. aeruginosa* ATTC 27853 (selon les valeurs des diamètres des zones d'inhibitions). D'après **Nikaido (2003)**, les résultats montrent une activité vis-à-vis des bactéries à gram positif que les bactéries à gram négatif. Les résultats pourraient être dus à la composition de la membrane des bactéries à gram négatif. En effet, ces dernières possèdent une membrane qui présente une perméabilité sélective ; la surface des lipopolysaccharides contient des charges négatives, qui empêchent la diffusion des molécules hydrophobes, et des porines qui bloquent le passage des molécules à haut poids moléculaire (**Garrett et Grisham, 2000**).

3.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB)

L'évaluation des concentrations minimales inhibitrices de l'extrait de plante *Juniperus phoenicea* nous a permis de mettre en évidence les concentrations minimales à partir desquelles les bactéries que nous avons testé, sont inhibées. La méthode des microdilutions sur milieu liquide est une technique quantitative permettant de déterminer la sensibilité des microorganismes vis-à-vis une substance antimicrobienne. Cette méthode se base sur le pouvoir inhibiteur d'extrait à l'intérieur d'un puits, dans un milieu nutritif (Mueller Hinton bouillon) ensemencée par l'inoculum des souches à testées. Ces résultats sont présentés dans le **tableau 10**.

Tableau 10: Les différentes concentrations minimales inhibitrices et bactéricide de l'extrait aqueux de *J. phoenicea* (mg/ml)

Les souches	CMI	CMB
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,95	7,81
<i>Listeria monocytogenes</i>	7,81	3,9

Résultats et discussion

<i>Bacillus subtilis</i>	3,9	Nd
<i>Salmonella typhimurium</i>	7,81	Nd
<i>Escherichia coli</i>	15,62	15,62
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15,62	Nd
<i>Candida albicans</i> 26790	31,25	Nd
<i>Candida albicans</i> 10231	62,5	Nd
<i>Candida albicans</i> IP444	Nd	Nd

Les résultats de la méthode de microdilution montrent que l'extrait de *Juniperus phoenicea* a un effet inhibiteur à une concentration de 1,95 mg/ml vis-à-vis de la souche *S.aureus* qui représente la souche la plus sensible parmi nos souches testées. La CMI est de 3.9 mg/ml vis-à-vis de *B. subtilis*. Cependant, *S.typhemuriunet* *L.monocytogenes* ont montré une même valeur de CMI qui est de 7,81 mg/ml. La concentration minimale inhibitrice la plus forte a été enregistrée vis-à-vis des souches : *E.coli*, *P.aerugmosa* par une valeur de 15,62 mg/ml.

Nos résultats ont montré aussi que l'extrait aqueux de *J.phoenicea* a un effet bactéricide à une concentration de 7,81 mg/ml vis-à-vis de la souche *S. aureus*, de 3,9 mg/ml vis-à-vis de *L. monocytogenes* et de 15,62 mg/ml vis-à-vis de la souche *E. coli*. Nous pouvons conclure que l'extrait *J.phoenicea* a un effet inhibiteur et bactéricide.

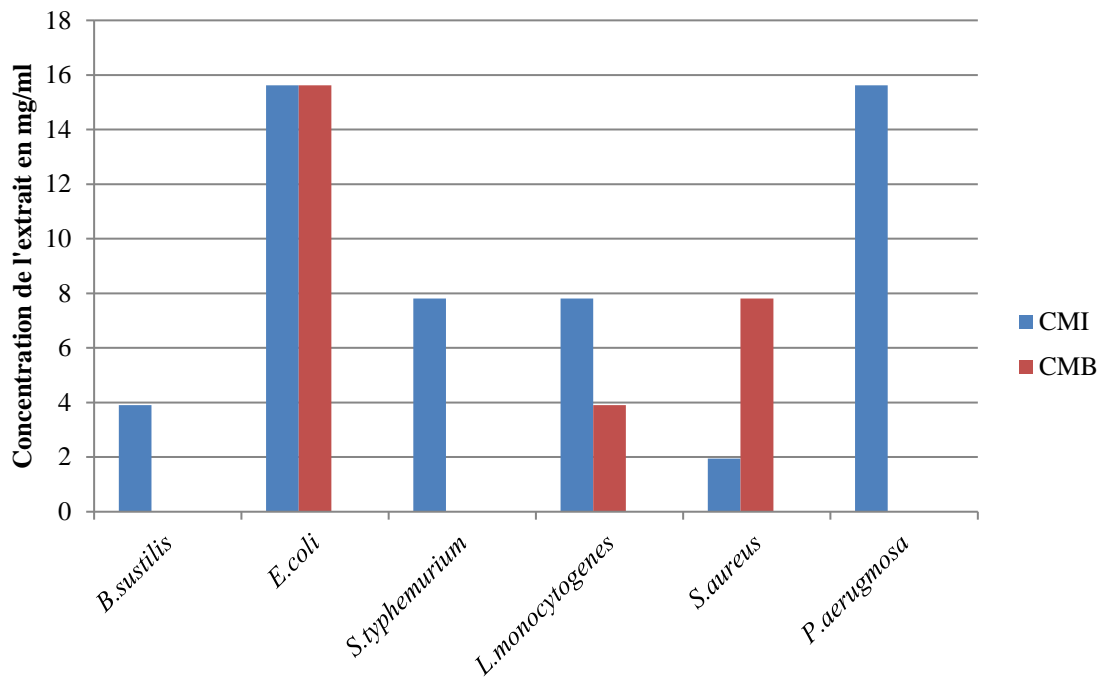


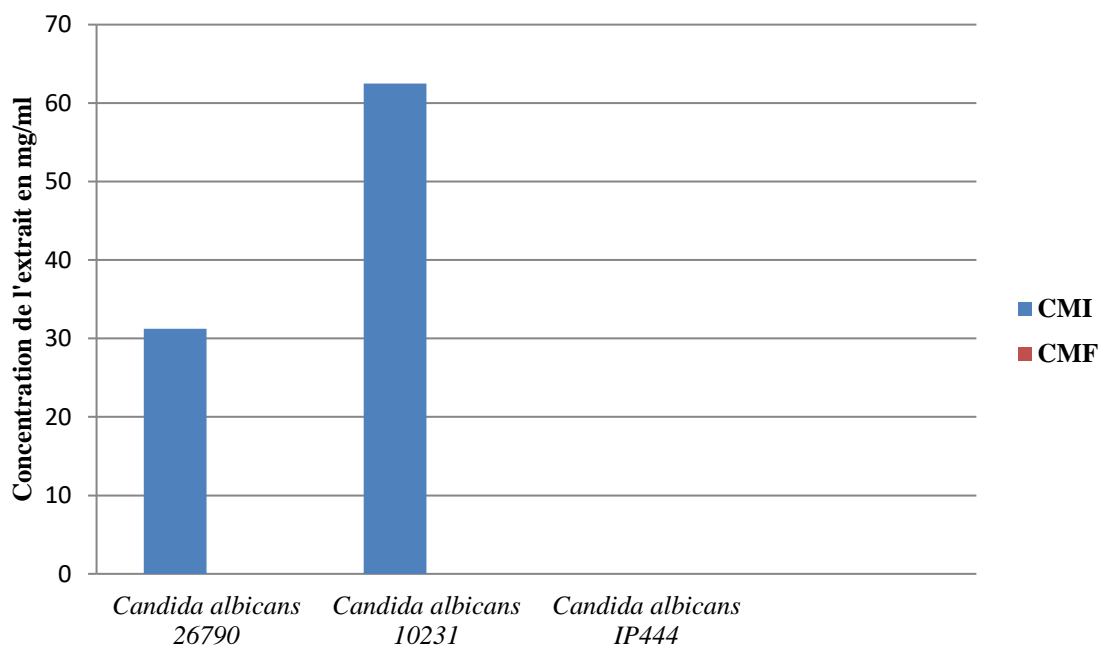
Figure 31: Résultat des CMI et des CMB de l'extrait aqueux de *Juniperus phoenicea*. L. vis-à-vis des souches bactériennes.

CMI : Concentration minimale inhibitrice **CMB :** Concentration minimale bactéricide

ND : Non déterminé

3.3. Activité antifongique : détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales fongicides (CMF)

La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) d'extrait de *Juniperus phoenicea*. L vis-à-vis trois souches de levures est réalisée par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide. Nous avons utilisé le milieu de culture : le Bouillon Sabouraud (BS).



La figure 32 : Résultats des CMI et des CMF d'extrait *J.phoenicea* vis-à-vis de trois souches fongiques testées

CMI : Concentration minimale inhibitrice **CMF :** Concentration minimale fongicide

Nd : Non déterminé

Les résultats concernant la détermination des concentrations minimales inhibitrice (CMI) montrent que l'extrait de *Juniperus phoenicea* a un effet inhibiteur avec une concentration de 31.25mg/ml vis-à-vis *Candida albicans* ATCC 26790 et *Candida albicans* 10231 de concentration de 62,5 mg/ml et le CMF non déterminé. Les rapports des valeurs de CMI et de CMF montrent que notre extrait à un effet faible sur les levures. Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux obtenus par **H'maimed (2016)** qui enregistré des valeurs de CMI de 375µg/ml et la plus faible concentration minimale inhibitrice enregistrée est de 23µg/ml chez la fraction 1-butanol de *J. phoenicea* face à *Staphylococcus aureus*.

4. Etude de mécanisme d'action antibactérien

Pour étudier l'effet de l'extrait aqueux de *Juniperus phoenicea* sur la viabilité cellulaire, l'activité des lipases et la tolérance au sel, nous avons sélectionné une seule souche comme model : une bactérie à Gram positive *S. aureus* (ATCC 25923). Pour déterminer la nature

bactéricide ou bactériostatique de l'extrait vis-à-vis une seule souche, nous avons calculé le rapport CMB/CMI. Si ce rapport est inférieur ou égal à 2, l'extrait est considérée comme bactéricide ; si ce rapport est supérieur à 2, l'extrait est considérée comme bactériostatique (Derwiche et al., 2010). En effet le rapport qui a été obtenu vis-à-vis de *S. aureus* est supérieur à 2, alors que l'extrait est considérée comme bactériostatique (Tableau 10).

Tableau 11 : Détermination du rapport CMB/CMI

Souche	CMI	CMB	CMB/CMI
<i>S. aureus</i>	1,95	7,81	4

Dans cette partie, nous avons étudié l'effet de l'extrait sur la viabilité cellulaire, la tolérance au sel et l'activité des lipases. Des tests de la viabilité cellulaire ont été réalisés pour élucider les effets induits par des traitements temps et dose dépendants. La tolérance au sel et l'activité des lipases des microorganismes traités par l'extrait ont été étudiés par l'utilisation des milieux de culture spécifiques. Le tableau 11 présent les concentrations utilisées de l'extrait pour ces trois tests.

Tableau 12 : Concentrations utilisées (mg/ml) d'extrait pour les tests de la viabilité cellulaire, la tolérance au sel et l'activité des lipases

Souche	CMIx16	CMIx4(CMB)	CMI	CMI /4
<i>S.aureus</i>	31,25	7,81	1,95	0,48

4.1. Viabilité cellulaire :

Les résultats de l'effet de l'extrait aqueux de *Juniperus phoenicea* sur la viabilité de *S.aureus* est présenté dans la figure 33. Cette souche a été traitée par les concentrations de l'extrait CMI/4, CMI et CMI x 4 (CMB), CMI x 16. La courbe de la viabilité de souche testée a été obtenue à des intervalles de temps de 0 min à 60 min, sont présentées dans la figure 33.

Résultats et discussion

Le traitement de *S.aureus* par des différentes concentrations de l'extrait de *Juniperus phoenicea* montré un nombre de colonies plus faible que le témoin à des concentrations de 0.48 mg/ml à 31,25 mg/ml qui correspondent respectivement au CMI/4, CMI et CMI x 4(CMB) , CMI x 16 de 30 s jusqu'à 60 minutes d'incubation (**Figure 33**).

Nos résultats ont montré qu'au premier temps la courbe est stable et indique que l'extrait n'a pas un effet sur la paroi. Après certain temps nous avons observées la diminution de la courbe sa signifie que l'extrait traversée la paroi pour inhibée la croissance de la souche.

Ces résultats montrent un effet inhibiteur intéressant de l'extrait de *Juniperus phoenicea L.*

À toutes les concentrations utilisées, l'extrait a donné un nombre limité de cellules viables de la souche *S.aureus* par rapport au témoin. Notamment la concentration 31,25 mg/ml (CMI x 16) de l'extrait qui inhibe la croissance de la bactérie.

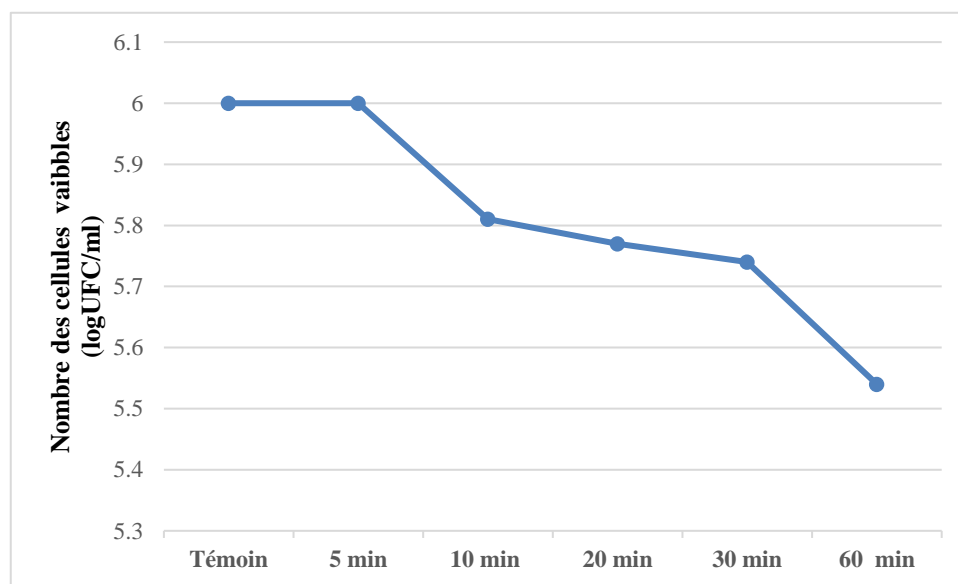


Figure 33: Effet d'extrait sur la viabilité cellulaire de 0 – 60 min chez *S.aureus*.

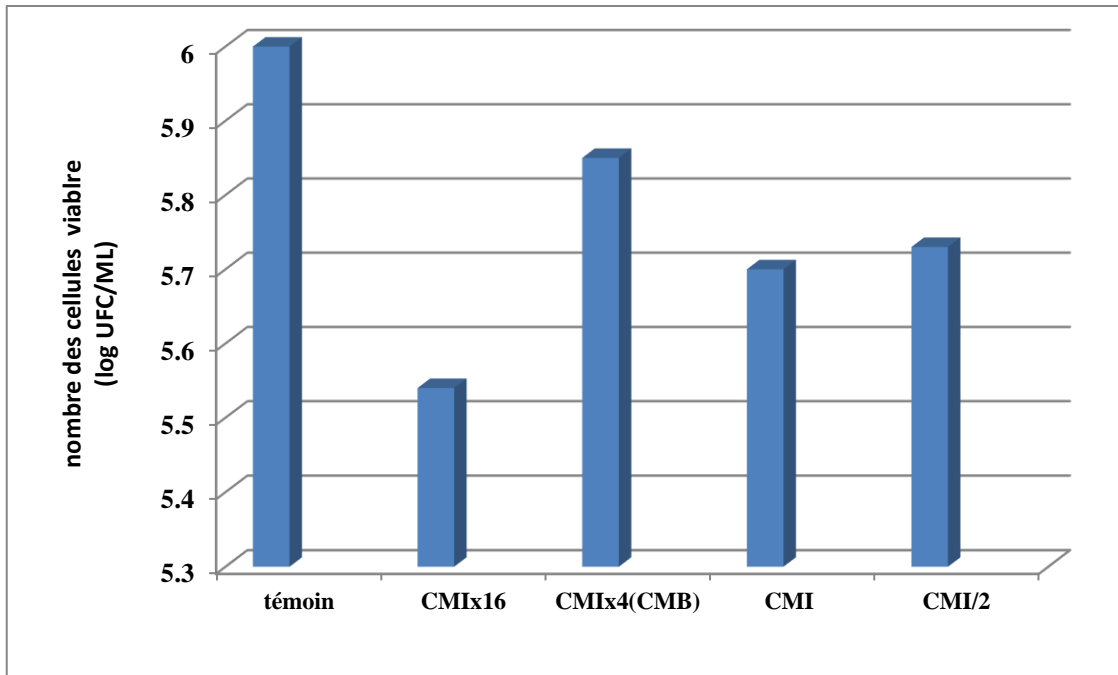


Figure 34: Effet d'extrait sur la viabilité cellulaire chez *S.aureus*

D'autres travaux sur la même souche mais avec notre plante c'est l'huile de *Melaleuca alternifolia* ont montré que l'échec de *Melaleuca alternifolia* ou de ses composants à lyser les cellules de *S. aureus* suggère que leur principal mécanisme d'action n'est pas un dommage brut de la paroi cellulaire. La libération induite par le traitement des enzymes autolytiques de la paroi cellulaire liées à la membrane va éventuellement induire une lyse, ce qui pourrait expliquer la lyse retardée de *S. aureus* observée lorsque les suspensions ont été réexaminées après plusieurs heures (Christine et al., 2002).

4.2. Tolérance au sel :

Les résultats de test de tolérance au sel des cellules de *S. aureus* après exposition aux concentrations de l'extrait de *Juniperus phoenicea L.* sont présentés dans le **tableau 12**. Nos résultats montrent que l'addition de l'extrait diminue la capacité des cellules traitées de former des colonies. Les proportions des cellules capables de former des colonies sur GN-NaCl ont été déterminées après 60 minutes d'exposition à des concentrations sub-inhibitrices de l'extrait.

Tableau 13: Proportion des cellules de *S.aureus* capables de former des colonies sur

Résultats et discussion

GN-NaCl après exposition à des concentrations sub- inhibitrices de l'extrait aqueux de
Juniperus phoenicea

S. aureus

Temps d'incubation (min)	Concentrations de l'extrait (mg/ml)				
	Témoin	31,25	7,81	1,95	0,48
60	100 %	8,57%	5,71%	8,57%	17,14%

Le traitement de *S. aureus*, l'extrait a réduit la capacité des survivants à former des colonies sur GN-NaCl. Cet effet a été plus marqué dans le traitement par la CMIx4 (CMB) (7,81 mg/ml) de 5,71% qui a entraîné une perte importante de la tolérance au sel.

Les lésions létales de la membrane cellulaire microbienne induites par l'extrait peuvent modifier leur perméabilité (Carson et al., 2002). La perte de la tolérance salée pourrait révéler des dommages à la membrane dans les cellules de *S. aureus* stressées par l'extrait de *Juniperus phoenicea* L.

D'autres résultats de la perte de tolérance au sel. Les résultats des tests de perte de tolérance au sel. L'ajout de NaCl a NA a réduit la capacité de formation de colonies de cellules de *S.aureus* non traitées la perte de tolérance aux sels ou à d'autres composés potentiellement toxiques peut être exploitée pour révéler des dommages à la membrane. Le traitement de *S. aureus* avec du *Melaleuca alternifolia* ou ses composants a considérablement réduit la capacité des survivants à former des colonies sur des milieux contenant du NaCl (Christine et al., 2002).

4.3. Activité des lipases

Les lipases sont largement répandues chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. Elles sont aussi bien produites par les bactéries à Gram positif que par des bactéries à Gram négatif (Fickers et al., 2008).

Résultats et discussion

Les proportions des cellules de *S. aureus* (présentant des colonies avec une activité lipase positive) après exposition à des différentes concentrations de l'extrait sont indiquées dans la **figure 35**.

Les concentrations CMIx4 (7,81 mg/ml) de l'extrait ont montré une inhibition de l'activité de la lipase de la souche *S. Aureus* avec des nombre de 1×10^5 UFC /ml après 60 minutes de contact.

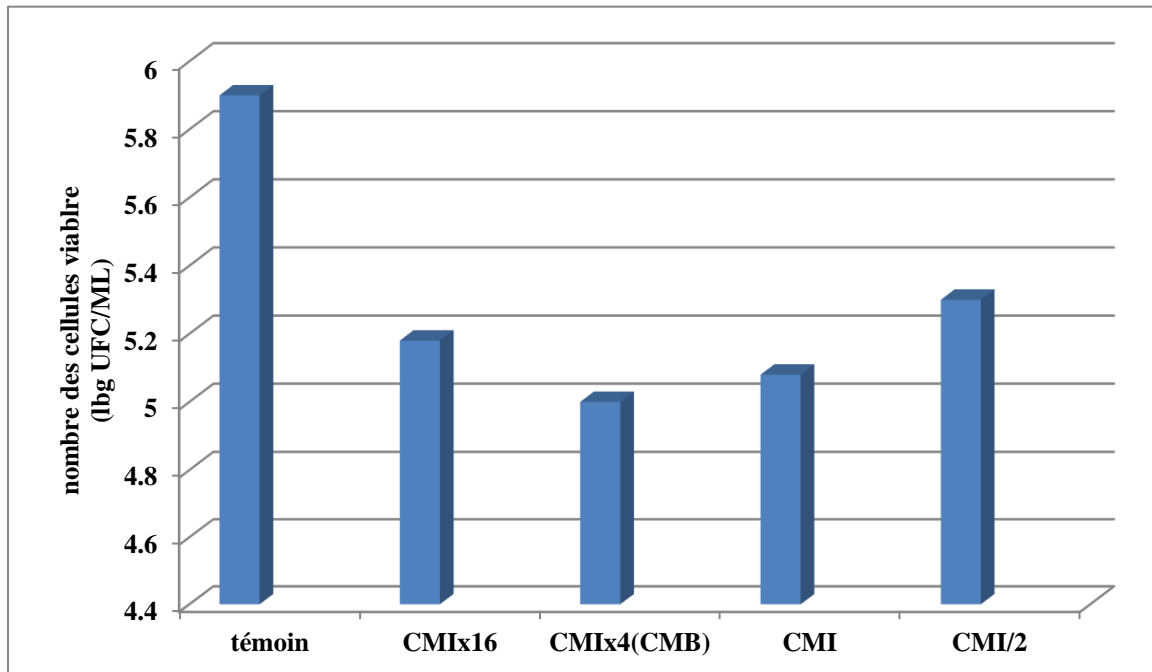


Figure 35 : Proportion de cellule de *S. aureus* présentant des colonies d'activité lipase positive sur l'Agar Salty Tween (AST) ajoutée à des concentrations différentes de l'extrait de *Juniperus phoenicea*.

Les résultats ont montré La diminution des colonnes dans chaque concentration signifie un manque de sécrétion lipide par la bactérie et de celle-ci un extrait qui inhibe lipase (**Christine et al., 2002**).

Conclusion

Conclusion :

Notre étude réalisée nous a permis de mettre en évidence la présence des différentes familles de composés chimiques dans la plante *Juniperus phoenicea L.*, ainsi que l'évaluation des activités biologiques et le mécanisme d'action antimicrobien de cette plante.

Les tests phytochimiques ont montré la présence des polyphénols, des saponosides, des flavonoïdes, et des tanins en quantité importante. Au cours de l'extraction sélective des composés, le rendement a été obtenu dans la plante (11,9%).

L'étude du pouvoir antimicrobien a montré que les extraits de *Juniperus phoenicea L.*, montré des capacités à inhiber toutes les souches microbiennes que nous avons utilisés sauf *Candida albicans IP444*, la souche microbienne *Bacillus subtilis* a montré une très une très forte sensibilité par la méthode de diffusion des disques.

La mise en évidence de l'étude des concentrations minimales inhibitrices d'extrait aqueux de *Juniperus phoenicea L.* a montré des valeurs allant de 1,95 à 15,62 mg/ml. Et des concentrations minimales bactéricides allant de 7,81 à 15,62 mg/ml vis-à-vis de *S.aureus*, *L.monocytogene*, *E.coli* respectivement.

Ces résultats préliminaires complétés par d'autre étude plus approfondie comme le mécanisme d'action antimicrobien vis-à-vis de la souche la plus sensible par la méthode de micro dilution qu'était *S.aureus* qui a présenté une inhibition intéressante par l'extrait aqueux de *Juniperus phoenicea L.* dans les tests de la viabilité cellulaire. Du même le test de la Tolérance au sel montré que l'extrait a entraîné une perte importante de la tolérance au sel. En plus, le teste d'activité des lipases révéla une inhibition de l'activité de la lipase de la souche *S. aureus* par l'extrait aqueux de *Juniperus phoenicea* .

Annexes

Annexes

Milieux de culture

Bouillon Nutritif (BN, Fluka) :

Formule (en g/l)

Peptone 15,0
Extrait de levure 3,0
Chlorure de sodium.....6,0
Glucose1,0

Eau Distillée qsp1L

pH = 7,5 ($\pm 0,2$) à 37°C

Suspendre 25g de la poudre dans un litre d'eau distillée, en suite stériliser par autoclavage à 121 °C pendant 15 min.

Gélose Nutritive (GN, Fluka):

Formule (en g/l)

Peptone..... 15,0
Extrait de levure..... 3,0
Chlorure de sodium..... 6,0
Glucose..... 1,0
Agar..... 15,0

Eau Distillée qsp 1L

pH = 7,5 ($\pm 0,2$) à 37°C

Suspendre 40g de la poudre dans un litre d'eau distillée, en suite chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

Bouillon Sabouraud :

Formule (en g/l)

Peptone (Fluka)..... 10,0
Extrait de levure (Fluka)..... 3,0
Glucose (Sigma-Aldrich)..... 20,0

Eau Distillée qsp 1L

pH = 5,8 ($\pm 0,2$) à 37°C

Suspendre la poudre dans un litre d'eau distillée, chauffer si c'est nécessaire pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121 °C pendant 15 min.

Gélose Sabouraud :

Formule (en g/l)

Peptone (Fluka)..... 10,0
Extrait de levure (Fluka)..... 3,0
Glucose (Sigma-Aldrich).....20,0
Agar..... 15,0

Eau Distillée qsp 1L

pH = 5,8 ($\pm 0,2$) à 37°C

Suspendre la poudre dans un litre d'eau distillée, en suite chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121 °C pendant 15 min.

Bouillon Mueller Hinton:Formule (en g/l)

Infusion de viande de bœuf.....	2,0
Hydrolysate de caséine.....	17,5
Amidon.....	1,5

Eau Distillée qsp 1L

pH = 7,4 (±0,2) à 37°C

Suspendre 23 g de la poudre dans un litre d'eau distillée, en suite stériliser par autoclavage à 12°C pendant 15 min.

Gélose Mueller Hinton (GMH,Fluka) :Formule (en g/l)

Infusion de viande de bœuf.....	4,0
Hydrolysate de caséine.....	17,5
Amidon.....	1,5
Agar.....	17

Eau Distillée qsp 1L

pH = 6,8 (±0,2) à 37°C

Suspendre 38 g de la poudre dans un litre d'eau distillée, en suite chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121 °C pendant 15 min.

Neutraliseur :Formule (en g/l)

Gélose nutritive.....	23
NaCl.....	5
Tween 80.....	5
Jaune d'œuf.....	75

Agar Salty Tween (AST):Formule (en g/l)

Peptone	10
NaCl.....	75
CaCl ₂ H ₂ O.....	0.1
Tween 80.....	10
Agar.....	20

GN-NaCl :Formule (en g/l)

GN.....	23
NaCl.....	50
Tween 80.....	5
Jaune d'œuf.....	75

L'eau physiologie :

NaCl.....	9
-----------	---

L'eau distillé qsp 1L

L'eau peptonée:

Peptone

L'eau distillé qsp 1L

Les références :

- **Abderrazak M., Joel R. (2007)** . La botanique de A à Z. *Ed Dunod Paris*, p 177.
- **Aboul-Ela, M., El-Shaer, N., & El-Azim, T. A. (2005)**. Chemical constituents and antihepatotoxic effect of the berries of *Juniperus Phoenicea* Part II. *Natural Product Sciences*, 11(4), 240-247.
- **Adams R P. (2004)**. Junipers of the World: The Genus *Juniperus* 4th Edition, Trafford Publishing, Vancouver, B. C.
- **Adams R P. (2014)**. Junipers of the word: the genus *Juniperus* 4ème édition (Ed) .Trafford Publishing Co Bloomington, IN 415 P.
- **Adams R P., Schwarzbach A E. (2013)**. Phylogeny of *Juniperus* using nrDNA and four cp DNA regions *Phytologia*. 95(2): 179-187.
- **Adams, RP. (2004)**. Junipers of the World: The genus *Juniperus* Trafford Publishing, Vancouver, BC, Canada.
- **Ageste, M., (1960)**. La flore forestière "les végétaux ligneux qui croissent spontanément en France et des essences importants de l'Algérie. *IIème édition ancienne maison Griblot et Cie*. N, Grosjean, Successeur 353p.
- **Alignan, M. (2006)** .Thèse de doctorat : Phoma du Tournesol : déterminisme de la tolérance de l'hôte à la maladie. *Toulouse France*.
- **Arimboor, R., Kumar, K. S., & Arumughan, C. (2008)**. Simultaneous estimation of phenolic acids in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) using RP-HPLC with DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47(1), 31-38.
- **Badiaga M. (2011)**. Étude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea Latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali. thèse de doctorat, *université de Bamako*.
- **Bahorun T. (1997)**. Substances Naturelles Actives: La Flore Mauricienne, Une Source D'approvisionnement Potentielle AMAS Food and Agricultural Research Council Réduit Mauritius.
- **Banks J C G. (2004)**. Southern Hemisphere Conifers In: *Tropical Ecosystems*: 1712–1719.
- **Barros, Carina, Simionato et al. (2009)**. Rentabilidade da produção de ovinos de corte empastagem e emconfinamento." *Revistabrasileira de zootecnia= Brazilian journal of animal science*. Viçosa, MG. Vol. 38, n, p. 2270-2279 (2009).
- **Barros Passos., Eduardo., and Regina.(2009)**. Benevides from Barros. "A cartografia com o método de pesquisa-intervenção." *Pistas do método da cartografia: pesquisa-intervenção e produção de subjetividade*.

- **Benchaar C., Calsamiglia S., Chaves AV., Fraser GR., Colombatto D., McAllister TA. (2008).** Plant derived essential oils in ruminant nutrition and production *Animal. Feed Science and Technology*.145: 209-228.
- **Bermudez-torres K et legal L et lieutier F., (2013).**Exploitation des métabolites secondaires de la plante hôte. 279-293.
- **Bertrand C,Andreu. (2013).** Caractéristiques et intérêts des préparations à base de plantes.
- **BezzazN. (2014).** Détermination structurale des métabolites secondaires, et extraction des huiles essentielles de *Mentharotundifolia*. Mémoire de magistère : chimie organique. m'sila: *Université de M'sila. Algérie*.page :14.
- **Boudy, P. (1950).** guide du forestier en Afrique du nord Tome IV. Paris ,274-278.
- **Bouzouita N., Kachouri F., Ben Halima M & Chaabouni M M. (2008).** Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus Phœnicea*. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*10, 119-125.
- **Bruneton J. (2009).** Pharmacognosie , phytochimie, plantes médicinales. 4ème Edition, *lavoisier Paris*.P 1269.
- **Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3ème Ed : *Tec & Doc*.
- **Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo PW., Castillejos L., Ferret A.(2007).** Invited review Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*.90: 2580-2595.
- **Carillon, E. (2000).** La phytothérapie face à l'évolution médicinale. Ed : Phyto 10-15.
- **Christine F. Carson, Brian J. Mee and Thomas V. Riley. (2002).** Antimicrob. Agents Chemother. 46(6):1914.
- **Colette-Keller, D. (2004).** Les plantes médicinales ALS. (séance du 25 Avril 2004) P 58.
- **Cook NC and Samman S. (1996).** Flavonoids, Chemistry, metabolism, cardioprotectiveeffects, and dietary sources. *The journal of Nutritional Biochemistry* 7(2) :66-76.

- **Cowan M M. (1999).** Plant product as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*. 12 (4), 564-582.
- **Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C. Gustafson J.E., Warmington J.R., Wyllie S.G. (2000).** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88, 170–175.
- **Decaux I. (2002).** Phytothérapie : Mode d'emploi. *Ed : Le bien public*. Pp 6.
- **Donatien K. (2009).** Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes: extraction, identification d' alcaloïdes-caractérisation, quantification de polyphénols: étude de leur activité antioxydante . (*Doctoral dissertation, Université Paul Verlaine-Metz*).
- **Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000).** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88 (2), 308-316.
- **Dzialuk A., Mazur M ., Boratyńska k., Jose M Montserrat ., Angel Romo A., Boratyński A. (2011).** Population genetic structure of *Juniperus phoenicea* (Cupressaceae) in the western Mediterranean Basin: gradient of diversity on a broad geographical scale.*Annals of Forest Science* 68 1341–1350.
- **Eder B., Walmir SG., Lidilhone H., Caroline T., Fernanda RG. (2008).** Bioactive Pentacyclic Triterpenes from the Stems of *Combretum laxum* Molecules : (13) 2717-2728.
- **El Kalamouni, C. (2010).** Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. (Doctoral dissertation).
- **El –sawi, s a, h m motawae, m a amal. (2007).** chemical composition, cytotoxic activity and antimicrobial activity of essential oils of leaves and berries of *juniperus phoenicea* grown in egypt african *journal of traditional, complementary and alternative medicines* 4,(4), 417-426.
- **Enright N J., Hill R S., and Veblen T T. (1996).** The southern conifers - An introduction Ecology of the Southern Conifers Washington, D C, USA: Smithsonian Institution Press, pp 1-9.
- **Euzéby JP. (2009).** Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. Evaluation *in vitro* de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.
- **Flamini G., Cioni P L., Puleio R., Morelli I., Panizzi L. (1999).** Antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* and its constituent pulegone against bacteria and fungi .*Phytother Res*. 13(4), 349-351.

- **Ford RA., Hawkins DR., Mayo BC. (2001).** The in vitro dermal absorption and metabolism of coumarin by rats and by human volunteers under simulated conditions of use in fragrances. *Food and Chemical Toxicology*.39: 153 -162 .
- **Fouché GP., Marquet A et Hambuckers A. (2000).** Les plantes medicinale : de la plante au médicament Exposition temporaire de 19.09 au 30.09. 2000.
- **Ghestem A., Seguin E., Paris M., Orecchioni AM. (2001).** Le préparateur en pharmacie dossier.2^{ème} Ed *Techniques et documentation Paris*. p 275.
- **Gonzalez AG and Estevez-Brauna A. (1997).** Coumarins Natural. *Product Research* 14 : 465-475.
- **Guérin-Faublée V, Carret. (1999).** L'antibiogramme : principes, méthodologie, intérêt et limites. *Journées nationales GTV-INRA*, 5-12.
- **Haluk J., Roussel C. (2000).** Caractérisation et origine des tropolones responsables de la durabilité naturelle des Cupressacées Application potentielle en préservation du bois. *INRA, EDP Sciences*. 57 : 819–829.
- **Hartmann T. (2007).** From waste products to ecochemicals : Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*. 68 : 2831–2846.
- **Hostettmann K., Potterat O., Wolfender J.-L. (1998).** The Potential of Higher Plants as a Source of New Drugs. *Chimia* .52, 10-17.
- **Iserin P. (2001).** Encyclopedie des plantes medicinales. Ed : *Larousse Bourdasse Paris*.p 335.
- **Joses ; Dalbolena et al. (2016).** Terpènes: Natural Products for Controlling Insects of Importance to Human Health—A Structure-Activity Relationship Study. *Hindawi Publishing Corporation*.17:2-3-5.
- **Judd WS., Campbell CS., Kellogg EA., Stevens P. (2002).** Botanique Systématique : une perspective phylogénétique. Ed 1: *DEBOECK*, p 84-336.
- **Kasparck Max et al-Janabi Suhel.(2008).**Plantes médicinales La diversité biologique au service de la santé Division Environnement et changement climatique Programme « Mise en oeuvre de la Convention sur la Biodiversité ». *Publié par Deutsche Gcsell schaftf UrTechnisehe, Zusammenarbeit (GTZ) GmbH*.
- **Kebili Z. (2016).** Contribution à l'étude de quelques activités biologiques des extraits de Ephedra alata de la région d'Ouargla Mémoire de magister : Biologie Ouargla: Université Kasdi Merbah Algérie. page : 21.

- **Khan I., Kulkari MV., Gopal M., Shahabuddin MS., Sun CM. (2005).** Synthesis and biological evaluation of novel angularly fused polycyclic coumarins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 15: 3584-3587.
- **Khanbabaee K., Ree TR. (2001).** Tannins: Classification and defentition. *Journal of Royal Society of Chemistry*. 18 : 641-649.
- **Khenaka K. (2011).** Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogénèse ruminale chez l'ovin. Diplôme de Magister En Microbiologie Appliquée. Université Mentouri Constantine.
- **Kogel-Knabner I. (2002).** The macromole cularorganic composition of plant and microbialresidues as inputs to soilorganicmatter. *SoilBiology and biochemistry*. 34: 139-162.
- **KRIEF S. (2003).** These de doctorat : Métabolites secondaires des plantes et comportement animal.
- **Langenheim JH. (1994) .** Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology*. 20: 1223-1280.
- **Lapie G., Maige L A. (1914).** Flore forestière de l'Algérie E Orlhac. *éditeur Librairie générale de l'Enseignement 1, rue Dantd Paris*. 1 : 357 p.
- **Larousse., (2001).** Encyclopédie des plantes médicinales: Identification, préparations, soins. Ed. Larousse, Londres, 14-29.
- **Macheix JJ., Fleuriet A., Jay-Allemand C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique Presses polytechniques et universitaires romandes Lausanne.
- **Maleeky M., Enjalbert F., Feinberg M. (2007).** Métabolisme des terpénoides chez les caprins INRA. UMR 791 Physiologie de la Nutrition et Alimentation. F-75231 Paris.
- **Mandai, J P. (2005).** Découverte de très vieux genévriers de Phénicie (*Juniperus phoenicea*) dans les gorges de l'Ardèche (France) . *J Bot Soc Bot France*. 29: 53-62.
- **Mansouri N., Satrani B., Ghanmi M., El Ghadraoui L., Boukir A & Aafi A. (2011).** Effet de la provenance sur le rendement, la composition chimique et l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des rameaux de *Juniperus phoenicea* L du Maroc. *Acta Bot Gallica*. 158 (2), 215-224.
- **Mansouri N., Satrani B., Ghanmi M., El Ghadraoui L & Aafi A. (2011).** Étude chimique et biologique des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* ssp *lycia* et *Juniperus phoenicea* ssp *turbinata* du Maroc *Biotechnol Agron Soc* 15(3), 415-424.

- **Marino M., Bersani C., Comi G. (1999).** Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L measured using a bioimpedometric method *J. Food Prot.* 62(9): 1017-23.
- **Marque, L., Baumes, N., & Panier, M. (2018).** Le mode d'action des huiles essentielles sur les bactéries.
- **Maurice N. (1997).** De l'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire. du XXIe siècle Ed : Lavoisier, Paris. 12- 14.
- **Mazari k., Bendinerad N., Benkhechi C ., Fernande X. (2010).** Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil Isolated from Algerian *Juniperus phoenicea* L. and *Cupressus sempervirens*. *Medicinal Plants Research*, 4(10): 959-964.
- **Meyer S., Reeb C., Bosdeveix R. (2008).** Botanique : biologie et physiologie végétales. 2 Edition Maloine Paris. Pp : 14 15.
- **Mohammedi.Z. (2006).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de magister. *Université Abou Bakr Belkaïd. Tlemcen. Algérie. 2006. page: 155.*
- **Ngahanjila M., Mahdi E., Massoma Lembe D., Nde Z., Nyonseu D. (2017).** Review on Extraction and Isolation of Plant Secondary Metabolites Conference on Agricultural. *Chemical, Biological and Environmental Sciences.*
- **Nostroet., Braga., (2005).** Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production." *Journal of Ethnopharmacology* 96.1: 335-339.
- **Omulokoli E., Khan B., Chhabra SC. (2000).** Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology.* 56 :133-137.
- **Paris M ., Hurabielle. (1981).** Abrégé de matière médicale, Pharmacognosie, Tome 1, Masson paris.
- **Pierangeli, G, Vital, G and Windell, R. (2009).** Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Chromolaena odorata* (L f) King and Robinson and *Uncaria perrottetii* (A Rich) Merr Extracts *J Medicinal Plants Res* 3(7) : 511-518.
- **Prescott ML, Harley JP, Klein DA, Willey MJ, Sherwood ML, Woolverton JC. (2010).** Microbiologie. de boeck. pp.835-834.
- **Qnais E Y, Abdullah YY & Abdou Ghlyun p., (2005).** Antidiarrheal effect of *Juniperus phoenicea* L leaves extract in rats *J Biol* 8(6) ,867-871.

- **Quézel P et Santa S. (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales éd CNRS, Paris, vol 1, 1-565.
- **Quezel P., Gast M. (1998).** « Genévrier ». in Encyclopédie berbère. 20 | Gauda – Girrei, Aixen-Provence. Ed isud « Volumes ». 20: 3016-3023.
- **Rakotonanahary M. (2012).** Thèse présentée pour l'obtention du titre de docteur en pharmacie. diplôme d'état. *Université Joseph Fourier*.16, 19- 27, 28.
- **Rameau J-C ., Mansion D et Dumé, G. (2008).** Flore forestière française: Région méditerranéenne. *Institue pour le développement forestier*.P 2426.
- **Richard D., Giraud N., Pradere F& Soubaya T. (2010).** Biologie : Les métabolites secondaires des végétaux Duonod, Paris pp 192, 193.
- **Robert P., Adams. (1996).** Comparisons of the Leaf Essential Oils of *Juniperus phoenicea*. *J phoenicea subsp eu-mediterranea* Lebr & Thiv and *J phoenicea var turbinata* (Guss) Parl.*Journal Essent Oil Res*.8 : 367 -371.l
- **Seigue A. (1985).** La foret circumméditerranéenne et ses problèmes .*Ed : G P Maisonneuve et Larose*. P 216.
- **Silanikove N., Perevolotsky A., Provenza FD. (2001).** Use of tannin-bindingchemicals to assay for tannins and theirnegativepostingestiveeffects in ruminants.*Animal feed Science and Technology*. 91(1) : 69-81.
- **Stefanova T., Nikolova N., Michailova A., Mitov I., Iancovii., Zlabinger GI., Neychev H. (2007).** Enhanced resistance to *Salmonella enteric sero var typhimurium* infection in mice after coumarin treatment. *Microbes and infection*. 9 :7-14.
- **Steyn, P S. (1980)** .The biosynthesis of mycotoxins. *AcademicPress : New York*. pp 1-4.
- **Subramanian S., Stacey G., Yu O.(2007).** Distinct. crucial roles of flavonoids during legume nodulation *Trends plant science*. 12: 282-285.
- **Thati B., Noble A., Rowan R., Creaven SB., Walsh M., Egan d&Kavanagh K. (2007).** Mechanism of action of coumarin and silver coumarin complexes against the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Toxicology in vitro*. 21: 801-808.
- **Varlet E. (2008).** Description des espèces In découvrez les fruits sauvages.*Ed : Elleboresang de la terre Paris*. p- 254.
- **Wyllie S G. (2000).** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*(teatreeoil). *Journal of AppliedMicrobiology*. 88, 170–175.
- **Yano Y., Satomi M., Oikawa H. (2006).** Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus* .*International J Food Microbiology* .111: 6-11.