

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE**



**THESE**



**Présentée devant**

**L'UNIVERSITE LARBI BEN M'HIDI OUM EL BOUAGHI  
FACULTE DES SCIENCES EXACTES ET SCIENCES DE LA NATURE ET DE  
LA VIE  
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
présentée en vue de l'obtention du diplôme de**

**DOCTORAT EN SCIENCES  
Option : Amélioration de la production végétale**

**Souad Mehalaine**

**THEME**

**Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de quelques  
plantes médicinales et amélioration de leur production en culture *in vitro***

**Devant le Jury**

Mohammed Kribaa	Professeur	Université de Oum El Bouaghi	Président
Abdelouahab Yahia	Professeur	Centre universitaire Mila	Rapporteur
Abdallah Ouldjaoui	MCA	Université de Oum El Bouaghi	Examineur
Souhail Maalem	MCA	Université de Tebessa	Examineur

**Année universitaire 2017/2018**

## **Dédicace**

A Larbi Tebessi

A Larbi Ben M'hidi

aux martyrs de l'Algérie

A ma mère

## Remerciements

Avant de présenter ce travail, je tiens à remercier Allah Le Tout Puissant qui m'a donné la force et la santé pour réaliser ce travail.

J'adresse mes remerciements à mon directeur de thèse Monsieur, Abdelouahab Yahia, Professeur au Centre Universitaire de Mila d'avoir accepté de diriger ce travail ainsi que pour sa patience, ses conseils et orientations durant toute la période de la réalisation de ce travail.

Je remercie sincèrement les Membres de Jury d'avoir accepté de juger ce travail : Monsieur Mohammed Kribaa, Professeur au Département de Biologie, Université de Oum El Bouaghi, Monsieur Azzedine Chefrour, Professeur au Département de Biologie, Université de Souk Ahras, Monsieur Abdallah Ouldjaoui, Maître de conférence (A) au Département de Biologie, Université de Oum El Bouaghi, Monsieur Souhail Maalem, Maître de conférence (A) au Département de Biologie des êtres vivants, Université de Tebessa.

Je remercie vivement Docteur Sihem Djalleb, Chef de Département de Biologie des êtres vivants, Faculté des Sciences exactes et Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Tebessa pour toutes les facilités qu'elle m'a apportées pour réaliser ce travail au sein du laboratoire de Biologie végétale.

Mes chaleureux remerciements à Monsieur Slim Bouguessa, du Département de Biologie des êtres vivants, Université de Tebessa pour son aide dans le traitement statistique des résultats ainsi pour ses précieux conseils, son soutien permanent durant la réalisation de ce travail.

Je voudrais exprimer mon grand remerciement à Monsieur Taha Menasria, Maître assistant (A) au Département de Biologie Appliquée, Université de Tebessa pour son aide dans le traitement statistique des résultats, son soutien permanent, ces précieux conseils, directives et critiques constructives.

Ma reconnaissance à Monsieur Haroun Chenchouni, Docteur au Département de Biologie des êtres vivants, Université de Tebessa pour son soutien et ses précieux conseils et critiques.

Ma profonde gratitude va à Monsieur Ali Messaili, ingénieur au Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Mohammed Boudiaf, Oum El Bouaghi de m'avoir aidé à réaliser l'activité antimicrobienne des huiles essentielles par sa compétence scientifique et son expérience en Bactériologie.

Je ne voudrais pas oublier Madame Belfadel Ouahiba, du Laboratoire d'Analyse Organique Fonctionnelle, Faculté de Chimie, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (USTHB) Alger, pour son accueil chaleureux au sein de laboratoire de chimie et d'avoir réalisé l'analyse chimique (GC/MS) des huiles essentielles.

Mes profonds remerciements s'adressent à mon frère Kamel qui n'a ménagé aucun effort dans la collecte des espèces médicinales et des graines.

Enfin je ne remercierai jamais assez ma mère de m'avoir soutenu tout au long de la réalisation de ce travail.

## Résumé

Le but de ce travail est l'étude de la composition chimique et l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites de quelques plantes médicinales de la région semi aride algérienne : *Thymus algeriensis* Boiss & Reut., *Rosmarinus officinalis* L., *Marrubium vulgare* L. de Ain Beida et *Salvia officinalis* L. de Constantine. Ainsi la germination et la propagation *in vitro* de ces espèces ont été évaluées pour objectif de production et conservation.

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation et leur analyse chimique par la technique de la CG/SM. Les huiles essentielles ont été testées pour leur pouvoir antibactérien par la méthode de diffusion de disques et la concentration minimale inhibitrice.

Les graines des quatre plantes ont été testées *in vitro* pour leur capacité germinative et leur réponse à l'effet de l'acide gibbérellique (GA<sub>3</sub>). La propagation *in vitro* a été effectuée par la culture de fragments de 5 mm sur milieu de culture Murachige et Skoog additionné de différentes concentrations de l'acide indole-3-acétique (AIA) et N-6-furfuryladenine (Kin) et l'incubation des explants à une photopériode (16h/25 °C, 8h/15 °C) dans un phytotron.

L'analyse CG/SM a indiqué que les composés majoritaires sont camphor (13.62%), 1,8-cinéole (6.00%), borneol (5.74%), viridiflorol (4.00%), linalool (3.93%),  $\alpha$ -terpineol (3.80%) et caryophyllène oxide (3.50%) pour l'huile de *T. algeriensis*. Camphor (17.09%), Z- $\beta$ -ocimène (10.88%), isobornéol (9.68%),  $\alpha$ -bisabolol (7.89%), bornéol (5.11%), *trans* caryophyllène (4.40%) et  $\alpha$ -terpinéol (4.03%) pour *R. officinalis*.  $\beta$ -thujone (16.44%), viridiflorol (10.93%), camphor (8.99%), 1,8-cinéole (8.11%), *trans*-caryophyllène (5.85%) et  $\alpha$ -humulène (4.69%) pour l'huile de *S. officinalis*.

Les tests antibactériens ont montré que les huiles essentielles de *T. algeriensis* et *S. officinalis* ont présenté des diamètres d'inhibition élevés vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*

( $17.3 \pm 0.58$ ,  $15.5 \pm 0.50$  mm) respectivement avec une faible concentration minimale inhibitrice (CMI=0.20 mg/ml). *Escherichia coli* s'est montré moins sensible et *Pseudomonas aeruginosa* s'est montré le plus résistant vis-à-vis de trois essences testées.

Les tests de germination *in vitro* ont indiqué un pouvoir germinatif important et des taux de germination élevés des graines de *T. algeriensis* (80 à 100%) et *M. vulgare* (53.30 à 86.70%). *R. officinalis* et *S. officinalis* ont présenté des taux de germination très faibles. L'application de la GA<sub>3</sub> n'a exercé aucun effet significatif ( $P > 0.05$ ) sur le taux de germination chez les quatre espèces.

Les résultats obtenus de la propagation *in vitro* ont montré que la combinaison entre l'AIA et la kinétine a exercé des effets significatifs sur la callogénèse et la caulogénèse chez *T. algeriensis*, *R. officinalis* et *M. vulgare* ( $P < 0.05$  et  $P < 0.001$ ). Les concentrations (5 mg/L AIA, 5 mg/L Kin) et (5 mg/L AIA, 10 mg/L Kin) ont présenté les meilleures formations de cals chez *T. algeriensis* (20 et 23.30%). Les concentrations (2.5 mg/L AIA, 5 mg/L Kin) ont induit le meilleur taux de callogénèse chez *R. officinalis* (56.70%). Les interactions (2.5 mg/L AIA, 2.5 mg/L Kin), (2.5 mg/L AIA, 5 mg/L Kin) et (5 mg/L AIA, 5 mg/L Kin) ont présenté les meilleurs taux de cals formés chez *M. vulgare* (33.30 et 36.70%). Les trois espèces ont montré des taux faibles de caulogénèse. Par contre, *S. officinalis* n'a montré aucun changement morphogénique chez toutes les combinaisons hormonales appliquées.

**Mots clés :** Plantes médicinales, huiles essentielles, CG/SM, activité antibactérienne, germination *in vitro*, propagation *in vitro*.

## Abstract

The objective of this study is to assess the chemical composition and the antibacterial activity of the essential oils of some medicinal plants from Algerian semi arid zone: *Thymus algeriensis* Boiss & Reut., *Rosmarinus officinalis* L., *Marrubium vulgare* L. from Ain Beida and *Salvia officinalis* L. from Constantine. In addition, the *in vitro* germination and *in vitro* propagation of these species were evaluated for production and conservation aim.

The essential oils were hydrodistilled and chemically analyzed using gas chromatography (GC) and GC/ mass spectrometry (GC/MS).

The extracted essential oils were tested for their antibacterial activity using the disc diffusion method and minimal inhibitory concentration.

The seeds of the four plants were tested *in vitro* for their germination ability and response to gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) effect. The *in vitro* propagation was achieved by culturing the segments of 5 mm on Murashige and Skoog medium supplemented with various concentrations of indole 3-acetic acid (IAA) and N-6-furfuryladenine (Kinetin) and the explants were incubated under photoperiod (16h/25 °C, 8h/15 °C) in a phytotron.

The GC/MS analysis indicated that the major components are camphor (13.62%), 1,8-cineole (6.00%), borneol (5.74%), viridiflorol (4.00%), linalool (3.93%),  $\alpha$ -terpineol (3.80%) and caryophyllene oxide (3.50%) for *T. algeriensis* essential oil. Camphor (17.09%), Z- $\beta$ -ocimene (10.88%), isoborneol (9.68%),  $\alpha$ -bisabolol (7.89%), borneol (5.11%), *trans* caryophyllene (4.40%) and  $\alpha$ -terpineol (4.03%) for *R. officinalis*.  $\beta$ -thujone (16.44%), viridiflorol (10.93%), camphor (8.99%), 1,8-cineole (8.11%), *trans*-caryophyllene (5.85%) and  $\alpha$ -humulene (4.69%) for *S. officinalis* oil.

The antibacterial tests showed that *T. algeriensis* and *S. officinalis* oils presented high inhibition diameters against *Staphylococcus aureus* ( $17.3 \pm 0.58$ ,  $15.5 \pm 0.50$  mm) respectively and exhibited the lowest minimal inhibitory concentration (MIC = 0.20 mg/ml).

*Escherichia coli* appeared less sensitive and *Pseudomonas aeruginosa* appeared the most resistant against the three oils.

The *in vitro* germination experiment indicated an important germination ability and high germination rates for *T. algeriensis* (80-100%) and *M. vulgare* (53.30-86.70%). However *R. officinalis* and *S. officinalis* presented very low germination percentages. And the application of GA<sub>3</sub> did not exhibit any significant effect ( P > 0.05) on the germination rates of the four plants.

The *in vitro* propagation showed that the combinations of IAA and Kin exhibited significant effects on callogenesis and caulogenesis for *T. algeriensis*, *R. officinalis* and *M. vulgare* (P < 0.05 and P < 0.001). The concentrations of (5 mg/L IAA, 5 mg/L Kin) and (5 mg/L IAA, 10 mg/L Kin) presented the highest formation of callus in *T. algeriensis* (20 and 23.30%). The combination of (2.5 mg/L IAA, 5 mg/L Kin) presented the best callogenesis in *R. officinalis* (56.70%). The concentrations of (2.5 mg/L IAA, 2.5 mg/L Kin), (2.5 mg/L IAA, 5 mg/L Kin) and (5 mg/L IAA, 5 mg/L Kin) exhibited the best callus formation in *M. vulgare* (33.30 and 36.70%). The three species presented low rates of caulogenesis. Whereas, *S. officinalis* did not show any morphogenesis changes with all the hormonal combinations.

**Keywords :** Medicinal plants, essential oils, GC/MS, antibacterial activity, *in vitro* germination, *in vitro* propagation.

## ملخص

يهدف هذا البحث إلى دراسة التركيب الكيميائي و النشاطية ضد بكتيرية للزيوت الأساسية لبعض الأنواع النباتية

الطبية من المنطقة شبه الجافة الجزائرية: *Rosmarinus officinalis* L، *Thymus algeriensis* Bois & Reut، *Salvia officinalis* L و *Marrubium vulgare* L بالإضافة إلى دراسة الإنبات و التعقيل تحت الشروط الزجاجية بهدف وضع إستراتيجية لإنتاج الأنواع النباتية الأربعة و الحفاظ عليها.

تم استخلاص الزيوت الأساسية بواسطة طريقة التقطير المائي و تحليلها كيميائيا بواسطة تقنية GC/MS. كما تم تقدير النشاطية ضد بكتيرية بواسطة تقنية الانتشار عبر الأقراص. بالنسبة لإنتاج الأنواع النباتية، تم تقدير القدرة الإنباتية و استجابة البذور لحامض الجبريليك ( $GA_3$ ) تحت الشروط الزجاجية. كما تم التعقيل على وسط زرع Murachige/Skoog مضاف إليه تراكيز مختلفة من الهرمونين النباتيين IAA و Kinetin و تعريض العينات النباتية لفترة تأقت ضوئي (16 ساعة ضوء / 25 درجة مئوية، 8 ساعات ظلام / 15 درجة مئوية) في غرفة زراعة اصطناعية. بين التحليل الكيميائي أن تركيب الزيوت الطيارة هو كما يلي:

*T. algeriensis* : Camphor (13.62%), 1,8-cinéole (6.00%), borneol (5.74%), viridiflorol (4.00%), linalool (3.93%),  $\alpha$ -terpineol (3.80%), caroyophyllene oxide (3.50%). *R. officinalis* : Camphor (17.09%), Z- $\beta$ -ocimène (10.88%), isobornéol (9.68%),  $\alpha$ -bisabolol (7.89%), bornéol (5.11%), *trans* caryophyllène (4.40%),  $\alpha$ -terpinéol (4.03%). *S. officinalis*:  $\beta$ -thujone (16.44%), viridiflorol (10.93%), camphor (8.99%), 1,8-cinéole (8.11%), *trans*-caryophyllène (5.85%),  $\alpha$ -humulène (4.69%).

بينت نتائج النشاطية ضد بكتيرية أن *Thymus algeriensis* و *Salvia officinalis* سجلا أقطار تثبيط عالية بالنسبة للسلالة البكتيرية *Staphylococcus aureus* ( $0.58 \pm 17.3$  و  $0.50 \pm 15.5$  ملم) على الترتيب مع أقل تركيز مثبط (0.20 ملغ/ملل). *Escherichia coli* كانت مقاومة و *Pseudomonas aeruginosa* كانت أكثر مقاومة للزيوت المستخلصة من الأنواع النباتية الثلاثة.

بينت نتائج اختبار الإنبات أن *Thymus algeriensis* و *Marrubium vulgare* أظهرت قدرة إنباتية عالية و نسبة إنبات عالي (80، 100 %) و (53.3، 86.7 %) على الترتيب. أما *Rosmarinus officinalis* و *Salvia officinalis* سجلا نسب إنبات ضعيفة جدا. و لم تظهر المعالجة بحامض الجبريليك أي تأثير معنوي على نسب الإنبات للأنواع النباتية الأربعة ( $P > 0.05$ ).

بينت نتائج التعقيل تحت الشروط الزجاجية أن التداخلات بين IAA و Kinetin سجلت تأثيرات معنوية على التغير المظهري لكل من *Thymus algeriensis*، *Rosmarinus officinalis* و *Marrubium vulgare* ( $P < 0.05$  و  $P < 0.001$ ) و قد سجل *Rosmarinus officinalis* أحسن نسبة للكالوجناز (56.7 %) عند التراكيز (2.5 ملغ/ل IAA و 5 ملغ/ل Kinetin). أما *Salvia officinalis* لم تحقق أي تغير مظهري عند كل التنظيمات الهرمونية المطبقة.

**الكلمات المفتاحية:** نباتات طبية، زيوت أساسية، GC/MS، نشاطية ضد بكتيرية، إنبات ضمن شروط زجاجية، تعقيل ضمن شروط زجاجية.

## Abréviations

- AIA :** Acide indole 3-acétique
- ATCC :** American type culture collection
- CG/SM :** Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
- CLSI :** Clinical and Laboratory Standards Institute
- CMI :** Concentration minimale inhibitrice
- DMSO :** Sulfoxyde de diméthyle
- GA<sub>3</sub> :** Acide gibbérellique
- Gram<sup>+</sup> :** Bactérie Gram positive
- Gram<sup>-</sup> :** Bactérie Gram négative
- HE :** Huile essentielle
- Kin :** N-6-furfuryladenine (Kinétine)
- MS :** Milieu de culture Murachige et Skoog
- NCCLS :** National Committee for Clinical Laboratory Standard

## Liste des photos

N°	Titre	Page
1	<i>Rosmarinus officinalis</i> Ain Beida (2012)	7
2	<i>Thymus algeriensis</i> Ain Beida (2012)	11
3	<i>Marrubium vulgare</i> Ain Beida (2012)	14
4	Sommités fleuries de <i>Salvia officinalis</i> (2010)	17
5	Hydrodistillation des huiles essentielles	46
6	Effet des HE de <i>T. algeriensis</i> , <i>S. officinalis</i> et <i>R. officinalis</i> sur la croissance de <i>E. coli</i>	70
7	Effet des HE de <i>T. algeriensis</i> , <i>S. officinalis</i> et <i>R. officinalis</i> sur la croissance de <i>S. aureus</i>	70
8	Expérimentation 01 : Test préliminaire de germination	74
9	Expérimentation 02 : Effet de l'acide gibbérellique (GA <sub>3</sub> )	74
10	Callogénèse et caulogénèse	81

## Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Structures chimiques de régulateurs de croissance	42
2	Localisation géographique des sites de collecte des quatre espèces médicinales étudiées dans le Nord-est algérien	44
3	Rendement des huiles essentielles de <i>T. algeriensis</i> , <i>R. officinalis</i> et <i>S. officinalis</i>	53
4	Composés chimiques majeurs des HE de <i>T. algeriensis</i> , <i>R. officinalis</i> et <i>S. officinalis</i>	62
5	Effet antibactérien de l'huile essentielle de <i>T. algeriensis</i> sur les trois souches bactériennes testées	63
6	Effet antibactérien de l'huile essentielle de <i>S. officinalis</i> sur les trois souches bactériennes testées	64
7	Effet antibactérien de l'huile essentielle de <i>R. officinalis</i> sur les trois souches bactériennes testées	64
8	Courbe de germination des graines chez les quatre plantes étudiées	72
9	Nombre de graines germées chez les quatre plantes étudiées	72
10	Nombre d'explants formant des cals et caulogénèse chez <i>T. algeriensis</i>	78
11	Nombre d'explants formant des cals et caulogénèse chez <i>R. officinalis</i>	79
12	Nombre d'explants formant des cals et caulogénèse chez <i>M. vulgare</i>	80

## Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Concentrations de l'AIA et la Kinétine appliquées en combinaisons dans le milieu de culture Murachige et Skoog (MS).	52
2	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Thymus algeriensis</i>	58
3	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i>	59
4	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i>	61
5	Effet de la GA <sub>3</sub> sur le nombre de graines germées de <i>T. algeriensis</i> , <i>R. officinalis</i> , <i>M. vulgare</i> et <i>S. officinalis</i> .	73



## Sommaire

<b>Introduction</b>	1
<b>Revue bibliographique</b>	
<b>Chapitre 01 : Les plantes médicinales étudiées</b>	
1. Famille des Lamiaceae	4
1.1. Description botanique	4
1.2. Intérêt de la famille des Lamiaceae	5
2. Les plantes médicinales étudiées	5
2.1. <i>Rosmarinus officinalis</i>	5
2.1.1. Classification botanique	6
2.1.2. Description botanique	6
2.1.3. Habitat et répartition géographique	7
2.1.4. Composition chimique	8
2.1.5. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i>	8
2.1.6. Propriétés médicinales	8
2.2. <i>Thymus algeriensis</i>	10
2.2.1. Classification botanique	10
2.2.2. Description botanique	10
2.2.3. Habitat et répartition géographique	11
2.2.4. Composition chimique	12
2.2.5. Propriétés médicinales	12
2.3. <i>Marrubium vulgare</i>	12
2.3.1. Classification botanique	12

2.3.2. Description botanique	13
2.3.3. Habitat et répartition géographique	14
2.3.4. Composition chimique	14
2.3.5. Propriétés médicinales	15
2.4. <i>Salvia officinalis</i>	15
2.4.1. Classification botanique	16
2.4.2. Description botanique	16
2.4.3. Habitat et répartition géographique	17
2.4.4. Composition chimique	18
2.4.5. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i>	18
2.4.6. Propriétés médicinales	19
<b>Chapitre 02 : Les huiles essentielles et l'activité antibactérienne</b>	
1. Les huiles essentielles	20
1.1. Définition	20
1.2. Rôle physiologique des huiles essentielles	20
1.3. Rendement et composition chimique des huiles essentielles	21
1.4. Composition chimique des huiles essentielles des Lamiacées	22
1.4.1. Alcools monoterpéniques	22
1.4.2. Alcools sesquiterpéniques	22
1.4.3. Diols diterpéniques	22
1.4.4. Phénols : Thymol et/ou Carvacrol	22
1.4.5. Phénols méthyle éther	22
1.4.6. Oxydes terpéniques	23
1.4.7. Esters terpéniques	23
1.4.8. Aldéhydes terpéniques	23

1.4.9. Cétones monoterpéniques	23
1.5. Biosynthèse des huiles essentielles	24
1.6. Production et accumulation des huiles essentielles dans la plante	24
1.7. Localisation des huiles essentielles dans la plante	25
1.8. Analyse chimique des huiles essentielles	25
2. Activité biologique des huiles essentielles	26
2.1. Activité antibactérienne des huiles essentielles	26
2.2. Mode d'action des huiles essentielles	28
2.3. Bactéries utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles	29
2.3.1. <i>Escherichia coli</i>	29
2.3.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
2.3.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	31
<b>Chapitre 03 : Germination des graines et propagation des plantes</b>	
1. Régénération des plantes	32
1.1. Germination des graines	32
1.1.1. Définition	32
1.1.2. Processus physiologiques de la germination	32
1.1.3. Facteurs influençant la germination des graines	33
1.2. Multiplication végétative	34
1.2.1. Propagation des plantes en culture <i>in vitro</i>	34
1.2.2. Micropropagation	34
1.2.3. Intérêt de la micropropagation	35
2. Culture <i>in vitro</i>	36
2.1. Intérêt de la culture <i>in vitro</i>	36
3. Régulateurs de croissance	37

3.1. Auxine	38
3.1.1. Transport polarisé de l'auxine	38
3.1.2. Destruction de l'AIA	38
3.1.3. Rôles physiologiques des auxines	39
3.2. Cytokinines	39
3.2.1. Rôles physiologiques des cytokinines	40
3.3. Gibbérellines	40
3.3.1. Rôles physiologiques des gibbérellines	41
4. Milieu de culture	42
<b>Matériel et Méthodes</b>	
1. Matériel végétal	44
2. Extraction des huiles essentielles	45
2.1. Analyse chimique des huiles essentielles et identification des molécules	46
2.2. Conditions de l'analyse chimique (CG-SM)	46
2.3. Activité antibactérienne des huiles essentielles	47
2.3.1. Souches bactériennes utilisées	47
2.3.2. Méthode de diffusion de disques	48
2.3.3. Concentration minimale inhibitrice (CMI)	48
3. Germination <i>in vitro</i> des graines	49
3.1. Collection des graines	49
3.2. Stérilisation des graines	49
3.3. Expérimentation 01: Test préliminaire de germination	49
3.4. Expérimentation 02: Effet de l'acide gibbérellique (GA <sub>3</sub> )	50
4. Propagation <i>in vitro</i>	50
4.1. Explants utilisés	50

4.2. Stérilisation des explants	50
4.3. Culture <i>in vitro</i>	51
5. Données statistiques	52
<b>Résultats et discussion</b>	
1. Rendement des huiles essentielles	53
2. Analyse chimique des huiles essentielles	54
2.1. Analyse chimique de l'huile essentielle de <i>Thymus algeriensis</i>	54
2.2. Analyse chimique de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i>	55
2.3. Analyse chimique de l'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i>	56
3. Activité antibactérienne des huiles essentielles	63
3.1. Méthode de diffusion de disques	63
3.2. Concentration minimale inhibitrice (CMI)	65
4. Germination <i>in vitro</i> des graines	71
4.1. Expérimentation 01 : Test préliminaire de germination	71
4.2. Expérimentation 02 : Effet de l'acide gibbéréllique (GA <sub>3</sub> )	73
5. Propagation <i>in vitro</i>	78
5.1. Propagation <i>in vitro</i> de <i>Thymus algeriensis</i>	78
5.2. Propagation <i>in vitro</i> de <i>Rosmarinus officinalis</i>	79
5.3. Propagation <i>in vitro</i> de <i>Marrubium vulgare</i>	80
5.4. Propagation <i>in vitro</i> de <i>Salvia officinalis</i>	81
<b>Conclusion</b>	84
<b>Références bibliographiques</b>	87
<b>Annexe</b>	105

# Introduction

### **Introduction**

Depuis l'Antiquité, les plantes médicinales ont été utilisées pour traiter des maladies infectieuses communes, et quelques médecines traditionnelles constituent actuellement une partie des traitements habituels pour différentes maladies (Rios et Recio, 2005). Les plantes médicinales, comme remèdes, jouent un rôle fondamental dans la médecine folklorique et leur usage augmente dans le monde (Teixeira Durate et al., 2007).

Les extraits aromatiques des plantes ont été utilisés, depuis longtemps, dans différentes formulations pour les médicaments, la parfumerie et comme aromates des aliments (Heath, 1981). Les huiles essentielles ne sont pas seulement employées comme aromates ou comme base principale de la parfumerie, mais aussi comme facteurs médicamenteux de l'aromathérapie moderne (Chiej, 1982). Les essences de plusieurs Lamiacées ont été connues, depuis les premières civilisations, par leur large spectre d'activités biologiques, notamment leur potentiel antimicrobien (Baratta et al., 1998).

Les huiles essentielles sont considérées parmi les plus importants agents antimicrobiens présents dans les plantes médicinales et aromatiques et peuvent aussi avoir différentes activités biologiques. Au cours des dernières décennies, les composés volatiles isolés des plantes, notamment les essences, ont été démontrés comme agents antibactériens, antifongiques et antioxydants (González et al., 2010; Ben Mansour et al., 2013 ; Džamić et al., 2013; Riahi et al., 2013). Ainsi, ils ont été intensivement analysés et employés dans le champs de la pharmacologie, la microbiologie clinique, la phytopathologie et la préservation des aliments (Daferera et al., 2000).

La région semi aride algérienne occupe une surface importante, se caractérise par des conditions pédoclimatiques dures (salinité élevée, précipitations basses et composition physicochimique pauvre des sols) (Bencherif et al., 2015). Cette région est aussi caractérisée par sa richesse en espèces médicinales endémiques et cultivées. La plupart des plantes

médicinales et aromatiques qui poussent dans cette zone synthétisent une large variété de métabolites secondaires ayant un usage intéressant en médecine traditionnelle et présentant un large spectre d'activités biologiques. Un nombre considérable d'espèces végétales appartenant à la famille des Lamiacées est extensivement utilisé en médecine populaire, industrie alimentaire, pharmaceutique, cosmétique et en parfumerie.

Cependant, les collectes excessives, les usages intensifs, pour des raisons variées, l'urbanisme rapide, la pollution, les activités de l'homme sont des facteurs exposant les plantes médicinales aux différents niveaux de destruction et à une dégénération considérable. Ce problème est devenu de plus en plus important avec l'absence de stratégies pour leur conservation et production. Donc, la culture et la domestication des plantes médicinales constituent la meilleure solution pour leur préservation.

La régénération des plantes par les graines et la propagation sont généralement appliquées pour produire différentes espèces végétales (Rout et al., 2000; Paul et al., 2010; Coelho et al., 2012; De Vitis et al., 2014; Pradhan et al., 2014) et la culture des plantes médicinales communément utilisées est une approche indispensable pour leur conservation et persistance (Moyo et al., 2015).

En Algérie, il y a peu de recherches qui ont tenté d'étudier le pouvoir germinatif et la propagation des espèces médicinales et de les produire hors leur environnement naturel. C'est pour cela, dans notre étude, nous nous sommes intéressés à quatre espèces végétales appartenant à la famille des Lamiacées, très communes en Algérie, possèdent des vertus thérapeutiques importantes et connaissent un usage traditionnel extensif par la médecine populaire en Algérie : *Thymus algeriensis* Boiss & Reut., *Rosmarinus officinalis* L. et *Marrubium vulgare* L., trois espèces qui poussent spontanément dans la région semi aride algérienne et *Salvia officinalis* L., une espèce cultivée dans cette région.

Le but essentiel de ce travail est l'étude de la composition chimique et l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles envers trois souches bactériennes reconnaissables par leur pouvoir pathogènes pour l'homme, ainsi que l'examen de la germination des graines et la propagation *in vitro* de ces quatre plantes médicinales.

Ce manuscrit est divisé en trois parties :

- ✓ La première partie s'intéresse à l'étude bibliographique concernant la description botanique et l'importance médicinale des quatre plantes étudiées, l'importance des huiles essentielles et leurs activités biologiques et les méthodes appliquées pour la régénération des espèces végétales.
- ✓ La deuxième partie décrit le matériel végétal utilisé, les méthodes et les techniques appliquées au laboratoire dans chaque expérimentation de l'étude.
- ✓ La troisième partie traite les résultats obtenus et leur interprétation.

Revue  
bibliographique

# Chapitre 1

## Les plantes médicinales étudiées

## 1. Famille des Lamiaceae

### 1.1. Description botanique

La famille des Lamiaceae comporte des espèces qui affectionnent les zones tempérées chaudes, en particulier méditerranéennes, pouvant s'adapter à des conditions climatiques et pédologiques très variées. La reconnaissance botanique des espèces est facilitée par la présence de tiges tétragones, au moins pour les plus jeunes, et de fleurs labiées, d'où leur ancien nom, ainsi que de caractères aromatiques souvent prononcés (Franchomme, 1999).

Les Lamiacées sont rencontrées sous tous les climats, à tous les latitudes. Certains genres que comporte cette famille sont quasiment cosmopolites (*Salvia*, *Stachys*), d'autres ont une distribution plus restreinte. Rares dans le milieu forestier tropical, les Lamiacées se concentrent dans la région méditerranéenne, herbes et sous arbrisseaux, elles y peuplent maquis et garrigues : *Thymus spp*, *Rosmarinus*, *Lavandula spp*, *Sideritis*, *Micromeria*, etc (Bruneton, 2001).

La famille des Lamiacées est l'une des principales familles avec 258 genres et 6900 espèces plus ou moins cosmopolites, mais particulièrement répandues depuis le bassin méditerranéen jusqu'en Asie centrale. Ce sont des plantes annuelles ou surtout vivaces (Botineau, 2010).

Cette famille est très importante dans la flore de l'Algérie. Les Lamiacées sont des arbustes, sous-arbrisseaux ou plantes herbacées en général odorants, à tiges quadrangulaires. Les feuilles sont en général opposées sans stipules. Les inflorescences sont en cymes axillaires plus ou moins contractées simulant souvent des verticilles, ou encore condensées au sommet des tiges, et simulant des épis (spicastes). Les fleurs sont en général hermaphrodites. Le calice est à cinq divisions plus ou moins bilabié, persistant. La corolle est en général bilabiée, longuement tubuleuse, parfois de 4 à 5 lobes sub égaux ou à une seule lèvre. la lèvre inférieure trilobée, la supérieure bilobée. Les étamines sont en quatre, la cinquième est nulle

ou très réduite ; parfois deux étamines et deux staminodes. Les anthères sont à loges parfois dissociées et à connectif très différencié. L'ovaire est supère à deux carpelles originellement biovulés ensuite uniovulés par la constitution d'une fausse cloison. Le style est bifide, en général gymnobasique. Les fruits sont constitués par quatre akènes plus ou moins soudés par leur face interne et diversement ornés (Quezel et Santa, 1963).

La famille des Lamiacées présente une formule florale comme suit :

**5S + (2+3)P + (2+2)E + 2C** (Botineau, 2010).

## **1.2. Intérêt de la famille des Lamiaceae**

Le caractère aromatique de la famille des Lamiacées est l'origine de son importance économique, que ce soit dans l'industrie de parfum (patchouli, lavande...), l'aromatization des boissons (menthe), la confiserie et les produits d'hygiène. Beaucoup sont appréciées en cuisine (basilic, origan, sarriette, thym, etc.). Un petit nombre ont des racines comestibles (crosne du Japon) (Bruneton, 2001). Les essences localisées dans des glandes épidermiques pédicellées ou sessiles recouvrant les tiges et les feuilles leurs donnent des propriétés thérapeutiques connues depuis longtemps (propriétés sédatives de la lavande, propriétés anti-infectieuses du thym et de la sarriette, propriétés antimigraineuses de la menthe poivrée, etc) (Franchomme, 1999).

## **2. Les plantes médicinales étudiées**

### **2.1. *Rosmarinus officinalis***

Du Latin, ros : apparenté à rhus et signifie arbrisseau ou buisson (Beloued, 2005).

Rosmarina : signifie rosée de la mer, pourrait s'appliquer au parfum de la plante, à la couleur de la fleur ou même à sa prédilection pour le littoral.

Officinalis : rappelle les propriétés médicinales de la plante (Beniston, 1984).

**Nom vernaculaire arabe :** Klil, Hassalban, Hatssa louban.

**Nom targui ou berbère :** Lazir, Azir, Ouzbir, Touzala (Beloued, 2005).

### **2.1.1. Classification botanique**

Règne : Plantae

Sous- règne : Tracheobionta

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous-classe : Asteridae

Ordre: Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : Rosmarinus

Espèce: *Rosmarinus officinalis* L. (Quezel et Santa, 1963 ; Ozenda, 2006).

### **2.1.2. Description botanique**

Le romarin est un arbuste ou sous-arbrisseau très odorant, touffu, rameux, d'environ 1m de hauteur à tiges ligneuses, à feuilles linéaires persistantes opposées, entières, étroitement lancéolées, sessiles, presque aciculaires, à marges révolutes, mesurant 2 cm de longueur sur 2 mm de largeur, verdâtres en dessus, à pubescence tomenteuse blanche sur la face inférieure. Les fleurs sont bleuâtres, disposées en grappes courtes, axillaires, brièvement pédicellées. Les bractées sont petites, caduques. Calice à lèvre supérieure ovale et dont les lobes de la lèvre inférieure sont lancéolées. Corolle bleue rarement blanche avec lèvre supérieure divisée en deux segments et à lèvre inférieure à trois lobes dont un médian plus large. Les deux étamines

saillantes dépassent largement la corolle ; deux autres sont réduites. Le fruit est un tétrakène brun (Quezel et Santa, 1963 ; Wichtl et Anton, 2003 ; Beloued, 2005).

**Floraison** : toute l'année (Beloued, 2005).

**Odeur** : très aromatique, presque camphrée.

**Saveur** : âpre et aromatique, amère, un peu piquante (Wichtl et Anton, 2003).



**Photo 1 : *Rosmarinus officinalis* (Ain Beida 2012)**

(Photo S. Mehalaine)

### **2.1.3. Habitat et répartition géographique**

Le romarin pousse spontanément dans les garrigues, forêts claires, maquis, collines arides et calcaires, non loin de la mer, commun jusqu'au Sahara. Commun dans toute l'Algérie et la région méditerranéenne (Quezel et Santa, 1963 ; Beniston, 1984 ; Wichtl et Anton, 2003 ; Beloued, 2005).

Le romarin est également cultivé dans de nombreux pays, surtout en raison de son allure élancée qui convient particulièrement aux petites haies des jardins, mais aussi pour sa saveur culinaire et comme plante mellifère (Wichtl et Anton, 2003).

#### **2.1.4. Composition chimique**

Le romarin officinal contient des diterpènes phénoliques tricycliques : acide carnosolique (0.35%), rosmadial. Tanins des Labiées (acides phénols) : environ 3% de l'acide caféique avec l'acide rosmarinique notamment. Flavones méthylés : genkwanine, lutéoline, diosmétine et leur hétérosides (phégopoline). Triterpènes et stéroïdes : environ 10% d'acide oléanolique et 5% de dérivés de l'acide ursolique accompagnés de  $\alpha$ - et  $\beta$ -amyrines. Lipides de la cuticule cireuse des jeunes feuilles : n-alkanes (97%), isoalkanes et alkènes. Constituants divers : polysaccharides acides environ 6%, traces de salicylate. Le romarin contient aussi des huiles essentielles de 1 à 2.5% (Wichtel et Anton, 2003).

Les feuilles de romarin contiennent également de la résine, des tanins (8.40%) et une substance amère (Beloued, 2005).

#### **2.1.5. Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis***

Les constituants majeurs de l'huile essentielle de romarin officinal sont 1,8-cinéole (15-30%), camphre (15-25%),  $\alpha$ -pinène (jusque 25%), autres monoterpènes : bornéol libre (10-15%) et estérifié (5-10%), limonène, camphène (5-10%),  $\alpha$ -terpinéol (12-24%),  $\beta$ -pinène,  $\beta$ -caryophyllène, myrcène, etc. La composition chimique de l'huile essentielle peut varier selon la phase de développement et l'origine de la plante (Wichtl et Anton, 2003).

Selon Beloued (2005), les feuilles de romarin officinal contiennent une essence spéciale 1.50 % à odeur aromatique, saveur chaude et camphrée, composée d'acétate et de valérianate de bornyle.

### 2.1.6. Propriétés médicinales

Le romarin est connu pour ses multiples propriétés. En raison de sa teneur en huiles essentielles, la drogue est utilisée comme carminatif et stomachique dans les troubles digestifs, les ballonnements, les flatulences, mais aussi pour stimuler l'appétit et les sécrétions gastriques. Son usage comme cholagogue et cholérétique est surtout dû aux principes amers. L'activité anti-inflammatoire est due à l'acide rosmarinique ; cette propriété peut aussi trouver des applications en dermocosmétologie. Par voie externe, la drogue est employée en traitement complémentaire des pathologies rhumatismales et des troubles circulatoires sous forme d'huiles, de pommades et de liniments, et comme additif de bain (drogue ou huile essentielle) pour stimuler la circulation sanguine et pour son effet vasodilatateur. L'huile essentielle de romarin est aussi un bon antimicrobien vis-à-vis de germes pathogènes.

En médecine traditionnelle, la drogue est utilisée en compresses pour éviter les retards de cicatrisation et l'eczéma et comme insecticide. Grace à ses propriétés antioxydantes, cette plante est très utilisée en cuisine comme condiment et en agroalimentaire comme conservateur naturel pour la conservation des viandes et des graisses (Wichtl et Anton, 2003 ; Ben Jemia et al., 2013).

Le romarin est efficace dans les affections à caractère spasmodique : coqueluche, asthme, vomissements nerveux. La décoction de romarin s'emploie en compresses chaudes sur les entorses, les foulures, les contusions, elle sert encore à la lotion des plaies atones, des ulcères, des parasitoses (gale). En gargarisme, le romarin est efficace contre les aphtes et les maux de gorge (Lieutaghi, 1996).

En Algérie, les feuilles et les fleurs de *R. officinalis* sont considérées, en médecine traditionnelle, comme les meilleurs stimulants, antispasmodiques, diurétiques, cholagogues et vermifuges. Ces organes végétatifs sont aussi utilisés dans les cas de convalescence et stress (Beloued, 2005).

## 2.2. *Thymus algeriensis*

Du mot grec thyo: je parfume ou thymos : force.

**Nom vernaculaire arabe :** Djertil, Hamria, Hamzoucha, Khieta, Mezouquach.

**Nom targui ou berbère :** Azoukni, Rebba, Djouchchen, Touchna (Beloued, 2005).

### 2.2.1. Classification botanique

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous-classe : Asteridae

Ordre: Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Thymus*

Espèce : *Thymus algeriensis* Boiss et Reut. (Quezel et Santa, 1963 ; Ozenda, 2006).

### 2.2.2. Description botanique

Le thym d'Algérie est une plante ligneuse, formant souvent des coussinets. Rameaux serrés, grêles, plus ou moins dressés et velus, recouverts de feuilles opposées, effilées, courtement pétiolées, glabres, mais légèrement ciliées à la base, un peu enroulées sur les bords ; limbe ponctué, très glanduleux, mesurant 1 à 2 cm de long sur 2 à 3 mm de large. Les feuilles florales sont peu différentes lancéolées et égalant ou dépassant les calices. Epis florifères courts et étroits ne dépassant guère 15×12 mm. Fleurs de 5 à 6 mm, à corolle moins de deux fois plus longue que le calice, fleurs rosées, en capitules terminaux, avec un calice

glanduleux, glabre ou légèrement velu, à deux lèvres égales. Corolle bilabée, à lobe médian plus grand (Quezel et Santa, 1963 ; Beloued, 2005).

**Floraison** : Avril-Juin (Beloued, 2005).

**Odeur** : aromatique, intense et caractéristique, rappelant le thymol.

**Saveur** : aromatique, légèrement âpre (Wichtl et Anton, 2003).



**Photo 2:** *Thymus algeriensis* (Ain Beida 2012)

(Photo S. Mehalaine)

### 2.2.3. Habitat et répartition géographique

Le thym d'Algérie se rencontre aux pelouses, rocailles, très commun dans toutes les régions montagneuses, rare ailleurs. Il est endémique du Nord Africain, très commun en Algérie (Quezel et Santa, 1963 ; Beloued, 2005).

#### **2.2.4. Composition chimique**

Le thym d'Algérie contient des huiles essentielles dont les principaux composants sont le thymol et le carvacrol, des tanins, des principes amères, des saponines et des antiseptiques végétaux (Beloued, 2005).

#### **2.2.5. Propriétés médicinales**

Le thym d'Algérie est un amer astringent, stomachique, diaphorétique, antispasmodique et stimulant. On utilise les sommités fleuries pour préparer une infusion stimulant les fonctions digestives, surtout chez les affaiblis, et pour éviter les fermentations de l'estomac et de l'intestin. L'infusion est aussi utile contre toutes les maladies infectieuses comme la grippe, la pneumonie et les affections de l'appareil respiratoire. La distillation des tiges fraîches donne une essence riche en thymol, qui est utilisée contre la coqueluche. On l'utilise en friction dans les cas de névralgies et de sciatique et comme odontalgique sur les maux de dents cariées (Beloued, 2005).

### **2.3. *Marrubium vulgare***

**Nom vernaculaire arabe :** Marriout (Quezel et Santa, 1963).

**Autres noms :** Bonhomme, Herbe vierge, Mont blanc (Lieutaghi, 1996).

#### **2.3.1. Classification botanique**

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous-classe : Asteridae

Ordre: Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : Marrubium

Espèce : *Marrubium vulgare* L. (Quezel et Santa, 1963 ; Ozenda, 2006).

### 2.3.2. Description botanique

Le marrube blanc est une herbacée de 30 à 60 cm de haut, densément tomenteuse, à tige quadrangulaire, les feuilles sont ridées, pétiolées à limbe ovales-orbiculaire, cordiforme, vert jaunâtre à la face supérieure et tomenteux vert blanchâtre à la face inférieure (d'où le nom), possèdent un bord crénelé et dentelé. Les tiges quadrangulaires sont recouvertes de poils duveteux. De nombreuses fleurs blanches axillaires, à corolle bilabée, sont disposées en faux verticilles. Calice à 10 dents terminées en pointe épineuse (Quezel et Santa, 1963 ; Wichtl et Anton, 2003).

**Odeur** : forte, surtout à l'état frais.

**Saveur** : amère, légèrement âpre (Wichtl et Anton, 2003).



**Photo 3 : *Marrubium vulgare* (Ain Beida 2012)**

(Photo S. Mehalaine)

### **2.3.3. Habitat et répartition géographique**

Le marrube blanc est originaire d'Europe, Asie et Afrique du Nord (Kothe, 2007). C'est une plante cosmopolite, très commune dans toute l'Algérie (Quezel et Santa, 1963). Cette espèce végétale préfère les sols calcaires (Wichtl et Anton, 2003).

### **2.3.4. Composition chimique**

Les constituants chimiques du marrube blanc sont les diterpènes amers de la série des furanolabdanes, notamment les composés de lactones comme : marrubine principalement et son précurseur préfuranique, la prémarrubine, pérégrinol, vulgarol, marrubénol et marrubiol. La plante renferme aussi des hétérosides flavoniques et flavoniques, de la luréoline ou de l'apigénine, mais aussi des lactoylflavones et quelques dérivés de l'acide ursolique. Elle contient également des composés azotés caractéristiques de la famille des Lamiaceae : la choline, la stachydrine et la bétonicine. Des tanins spécifiques des Lamiaceae et dérivés de

l'acide hydroxycinnamique jusqu'à 7% comme : l'acide chlorogénique, caféique et caféylquinique. Mais cette plante médicinale se caractérise par la présence d'une faible quantité d'huile essentielle comportant différents composés monoterpéniques (moins de 0.1 % de  $\alpha$ -pinène, camphène, limonène, sabinène, *p*-cymène et *p*-fenchène...) (Wichtl et Anton, 2003).

### 2.3.5. Propriétés médicinales

Depuis un temps immémorial, on prescrit cette plante dans les affections des voies respiratoires, comme expectorant dans la tuberculose pulmonaire où elle intervient aussi comme tonique, dans la bronchite, la trachéite, la toux rebelle et l'asthme humide. Le marrube a, sur les sécrétions bronchiques, des effets fluidifiants et antiseptiques. Cette plante possède également des vertus stomachiques, elle s'indique dans l'inappétence, les maux d'estomac, la dysenterie chronique, ainsi des vertus fébrifuges. Les thérapeutes lui ont reconnu en outre des propriétés cardiotoniques ; la plante est ainsi un très bon remède de l'arythmie (extrasystolique). Les anciens ont aussi vanté le marrube dans les affections hépatiques et spécialement dans la jaunisse, on le recommandait même contre les tumeurs du foie (Lieutaghi, 1996). Cette plante est aussi utilisée comme cholérétique dans les perturbations de la sécrétion biliaire, activité qui est due à l'acide marrubique. En médecine traditionnelle, le marrube est utilisé par voie externe en dermatologie contre les ulcérations et les plaies. C'est aussi un antifongique (Wichtl et Anton, 2003). En Algérie, le *M. vulgare* est utilisé traditionnellement comme agent naturel antidiabétique, leishmanicide et pour traiter les troubles digestives (Allali et al., 2008; Boudjelal et al., 2013).

## 2.4. *Salvia officinalis*

Du Latin *salvare* : sauver, on lui attribuait la propriété de guérir une foule de maladies (Beloued, 2005).

**Nom vernaculaire arabe :** Hondbiq es sedr, Kheyet djrouhat, Salma (Beloued, 2005).

Souaa en nebi (Quezel et Santa, 1963).

**Nom targui ou berbère :** Agourim imeksaouen, Tazzourt (Beloued, 2005).

**Autres noms :** Grande sauge, Herbe sacrée, Thé de Grèce, Orvale (Kothe, 2007).

### 2.4.1. Classification botanique

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous-classe : Asteridae

Ordre: Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Salvia*

Espèce : *Salvia officinalis* L. (Quezel et Santa, 1963 ; Ozenda, 2006).

### 2.4.2. Description botanique

La sauge officinal est un sous arbrisseau atteignant 0.50 à 1m de hauteur, vivace très ramifié et très aromatique, devenant ligneux à la partie basale, dont les tiges forment des rameaux quadrangulaires dressés et velus. Les feuilles sont pétiolées opposées, lancéolées et aiguës, rugueuses, finement crénelées, pubescentes-grisâtres, la base du limbe est arrondie,

simplement ou doublement auriculée. La forme et la grandeur des feuilles varient selon leur position sur la tige. En général, elles ont de 3 à 10 cm de long et jusqu'à 3 à 4 cm de large. Chaque année, les rameaux se dessèchent laissant les inférieurs persistants. Les fleurs sont assez grandes, pédicellées d'environ 2 à 3 cm de long, à corolle bleue violacée nettement bilabée, disposées en verticilles un peu lâches formant une grappe simple, bractées ovales-acuminées, calice pubescent, bilabié, la lèvre supérieure tridentée, à dents lancéolées en alène. Les fruits sont des tétrakènes (Wichtl et Anton, 2003 ; Beloued, 2005 ).

**Floraison** : Mars-Mai (Beloued, 2005).

**Odeur** : fortement balsamique et aromatique.

**Saveur** : aromatique, chaude, amère et astringente (Wichtl et Anton, 2003).



**Photo 4:** *Salvia officinalis* (2010)

(Photo S. Mehalaine)

### 2.4.3. Habitat et répartition géographique

La sauge officinale probablement originaire d'Asie occidentale, est subspontanée ou naturalisée en région méditerranéenne, sur les collines sèches, ensoleillées, dans les lieux

pierreux, surtout sur le calcaire (Lieutaghi, 1996). Selon Wichtl et Anton (2003), la sauge officinale est originaire du bassin méditerranéen, elle préfère les sols calcaires de la région méditerranéenne et particulièrement de l'Adriatique. Cette plante est actuellement cultivée dans différents pays européens, depuis l'Espagne jusqu'à la Yougoslavie. En Algérie, La sauge est une plante cultivée (Quezel et Santa, 1963 ; Beloued, 2005).

#### **2.4.4. Composition chimique**

Les principaux constituants chimiques de la sauge officinale sont des tanins des Labiées (2 à 6%), le constituant majeur étant l'acide rosmarinique. La plante contient des diterpènes comme le carnosol (picrosalvine), formé à partir de l'acide carnosolique lors du séchage et du stockage, rosmanol, isorosmanol et saffcinolide. Ainsi des flavonoïdes (1 à 3 %), dérivés de la lutéoline et de l'apigénine, glycosylflavones comme la vicénine, hétérosides phénoliques comme le caféyl-fructosylglucoside, le caféyl-apiosylglucoside qui sont considérés comme les composés antioxydants des feuilles de sauge. Cette plante renferme également des triterpènes et des huiles essentielles (1 à 2.5%) (Wichtl et Anton, 2003). Elle contient aussi 5.60% de résine, 6% de gomme, mucilage, acides phosphoriques, acides oxaliques, des nitrates, 9% de pentosane, des traces d'asparagine. Les huiles essentielles de la sauge renferment la thujone, bornéol, 1,8-cinéole, camphre, terpènes salvines et picrosalvine (Beloued, 2005).

#### **2.4.5. Composition chimique de l'huile essentielle de *Salvia officinalis***

L'huile essentielle de sauge officinale est constituée principalement de monoterpènes ; sa composition correspond environ à une teneur comprise entre 35 et 60% de thujone (mélange de  $\alpha$ -thujone et  $\beta$ -thujone) ainsi, la forme  $\alpha$ -thujone étant dominante le plus souvent. 20 à 35% de camphre, 1 à 15% de 1,8-cinéole, accompagné de bornéol, d'acétate de bornyle

et environ 6 à 15% de sesquiterpènes dont du viridiflorol et du caryophyllène etc. Les constituants de l'huile essentielle sont parfois présents sous forme d'hétérosides (Wichtl et Anton, 2003).

#### 2.4.6. Propriétés médicinales

La sauge officinale est utilisée depuis l'Antiquité, elle est restée célèbre depuis des siècles, c'est « l'herbe sacrée » des Latins. Elle fut appréciée par **Dioscoride** puis par **Galien**, pour ses propriétés emménagogues et toniques. En médecine traditionnelle, la sauge est utilisée pour ses propriétés oestrogéniques, antigalactogènes, hypoglycémiantes et emménagogues. Ces vertus sont probablement en liaison avec la présence d'huile essentielle à thujone. Par ailleurs, la sauge est très utilisée pour ses propriétés antioxydantes, retardant ou inhibant le rancissement des corps gras, et pour ses propriétés antiseptiques. Son huile essentielle est effectivement bactéricide vis-à-vis de germes Gram+ et Gram -, mais aussi antifongique vis-à-vis de *Candida sp* et *Aspergillus flavus*. De même l'activité antivirale des feuilles de sauge est attribuée à l'huile essentielle. En outre, la sauge est astringente, cicatrisante et réhydratante et trouve des application en cosmétologie (Wichtl et Anton, 2003). La sauge officinale possède aussi des propriétés fébrifuges et vulnéraires et antispasmodiques. Elle active les fonctions circulatoires et cutanées. Cette plante médicinale se montre également fortifiante, réparatrice des troubles circulatoires. Les feuilles fraîches ou la poudre des feuilles séchées en friction préservent les dents de la carie. Elle est employée aussi en bain de bouche et gargarisme pour faire disparaître les aphtes, les engorgements ulcéreux et scorbutique des gencives. Les feuilles sont utilisées couramment en guise de thé (Beloued, 2005). En Algérie, la sauge officinale est utilisée, en médecine folklorique, comme agent naturel antidiabétique, anti hypertensif, contre l'obésité et pour traiter l'eczéma (Boudjelal et al., 2013).

# Chapitre 2

## Huiles essentielles et activité antibactérienne

## **1. Les huiles essentielles**

### **1.1. Définition**

Les essences sont des substances complexes, généralement odorantes (Chiej, 1982).

L'huile essentielle est un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation. La majorité des huiles essentielles sont des liquides très peu colorés, volatils à température ambiante. Les huiles essentielles dégagent une odeur caractéristique et sont, en général plus légères que l'eau tout en possédant des caractéristiques hydrophobes. Elles sont contenues dans des glandes épidermiques ou dans des canaux glandulaires sous forme d'oléorésines ; élaborées par les cellules chlorophylliennes et sécrétrices (Franchomme, 1999).

### **1.2. Rôle physiologique des huiles essentielles**

Une des particularités des végétaux est de former de nombreux composés dont le rôle, au niveau de la plante, est mal connu. Le fait que beaucoup de ces composés ne se rencontrent pas chez toutes les espèces montre qu'ils n'entrent pas dans le métabolisme général ; ce sont des métabolites secondaires, n'exerçant pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal (croissance, développement, reproduction...) (Guignard, 1985). Beaucoup de plantes produisent les huiles essentielles en tant que métabolites secondaires, mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante est inconnu. Cependant, la diversité moléculaire des composés chimiques qu'elles contiennent, leur confère des rôles et des propriétés biologiques très variés.

De nombreuses hypothèses ont été avancées et certaines présentent des points crédibles. Certains chercheurs pensent que les huiles essentielles peuvent éliminer certains métabolites toxiques dans la plante ou peuvent être un moyen de défense contre l'insolation excessive (Balbaa et al., 1981 ; Chiej, 1982).

Les essences ont fréquemment un effet télétoxique sur la germination des graines (Guignard, 1985). Le rôle attractif ou répulsif des huiles essentielles vis-à-vis des prédateurs, les conduit à une localisation épidermique, soit sous forme de cellules isolées (épiderme des pétales des roses), soit le plus souvent sous forme de poils sécréteurs (houblon, menthe, sauge). La teneur élevée du feuillage en essence (millepertuis, laurier sauce, de nombreux Lamiacées) a un effet répulsif pour les herbivores. La présence des huiles essentielles dans les racines (vétiver, gingembre), les écorces (cannelle), le bois (santal) correspond à un effet antiseptique vis-à-vis des parasites présents dans le sol ou attaquant le bois (Guignard, 2000).

### **1.3. Rendement et composition chimique des huiles essentielles**

La teneur des plantes en huiles essentielles est généralement faible, de l'ordre de 1%, avec quelques exceptions comme le bouton floral (clou de girofle) du giroflier où le taux atteint 15% (Guignard, 2000). D'autre part, la quantité d'huile présente dans les plantes varie tout au long de la journée ; c'est pourquoi les récolteurs effectuent leur travail à un moment précis et assurent ainsi une cueillette fructueuse. De même, la lumière provoque sur certains types de plantes une diminution de la concentration de l'essence alors que sur d'autres, l'effet est inverse. La composition du terrain joue, elle aussi, un rôle important sur la production de l'huile essentielle (Chiej, 1982).

Les monoterpènes et les sesquiterpènes sont, avec les cinnamates, les composants principaux des huiles essentielles. A côté des hydrocarbures, on rencontre des dérivés oxygénés divers : alcools, aldéhydes, époxy, cétones et acides (Guignard, 2000 ; Longaray Delamare et al., 2007).

La composition des essences varie considérablement dans une même plante selon l'âge, le cycle végétatif, l'organe (feuille, fleur, fruit, bois) et la saison. De façon générale, les facteurs climatiques, la nature du sol, les pratiques culturales sont à l'origine de chimiotypes. Le thym

vulgaire, par exemple, présente sept races chimiques dont les essences sont caractérisées par un composé préférentiel : thymol, carvacrol, géraniol, linéol,  $\alpha$ -terpinéol... ainsi, un climat sec et ensoleillé favorise leur formation (Elkalamouni, 2010 ; Guignard, 2000). En outre, les essences s'altèrent facilement ; il suffit d'une simple modification de la température ou de l'humidité pour permettre aux enzymes présents de développer leur action (Chiej, 1982).

#### **1.4. Composition chimique des huiles essentielles des Lamiacées**

Les molécules majoritaires retrouvées dans les essences des Lamiacées sont les plus courantes, à quelques exceptions, on peut citer :

##### **1.4.1. Alcools monoterpéniques**

Géraniol (*Monarda fistulosa*), linalol (*Ocimum basilicum*), bornéol (*Thymus satureioides*), menthol (*Mentha arvensis*, *Mentha piperita*), thujanol-4 (*Thymus vulgaris*), terpinène-1-ol-4 (*Origanum majorana*).

##### **1.4.2. Alcools sesquiterpéniques**

Patchoulol (*Pogostemon patchouli*).

##### **1.4.3. Diols diterpéniques**

Sclariol (*Salvia sclarea*).

##### **1.4.4. Phénols : Thymol et/ou Carvacrol**

(*Corydothymus capitatus*, *Monarda punctata*, *Origanum compactum*, *Origanum heracleoticum*, *Origanum syriacum*, *Satureja montana*), eugénol (*Ocimum gratissimum*).

##### **1.4.5. Phénols méthyle éther**

Estragole (*Ocimum basilicum*).

**1.4.6. Oxydes terpéniques**

1,8-cinéole (*Lavandula latifolia*, *Rosmarinus pyramidalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia lavandulaefolia*, *Thymus mastichina*), linalol oxyde (*Hyssopus officinalis*), pipéritone oxyde (*Mentha longifolia*).

**1.4.7. Esters terpéniques**

Acétate de linalyle (*Lavandula angustifolia*, *Mentha citrata*, *Salvia sclarea*).

**1.4.8. Aldéhydes terpéniques**

Citrals et citronnellal (*Melissa officinalis*, *Nepeta cataria*), périllaldéhyde (*Perilla frutescens*).

**1.4.9. Cétones monoterpéniques**

Carvone (*Mentha spicata*), vrebénone (*Rosmarinus officinalis*), fenchone (*Lavandula stoechas*), pulégone (*Mentha pulegium*), iso- et pino camphone (*Hyssopus officinalis*) (Franchomme, 1999).

### 1.5. Biosynthèse des huiles essentielles

La biosynthèse des huiles essentielles est liée à des cellules spécialisées, rarement isolées (feuilles de laurier, gingembre...), le plus souvent regroupées en poches (Rutacées, Myrtacées...) ou en canaux sécréteurs (Apiacées, Astéracées...). L'excrétion de l'huile essentielle dans la cavité des poches ou canaux est réalisée par exocytose (Myrtacées) ou par lyse des cellules bordant la cavité (Rutacées) (Guignard, 2000).

### 1.6. Production et accumulation des huiles essentielles dans la plante

Il n'existe pas de règle générale concernant les lieux d'accumulation des métabolites secondaires dans l'organisme végétal ; suivant les espèces et les diverses catégories de composés, on peut les trouver dans les différents organes ou, au contraire, ne les rencontrer que dans des tissus très spécialisés. Leur taux révélé par l'analyse d'une plante ou d'un fragment, varie grandement durant l'ontogenèse et l'organogenèse.

Par ailleurs, il est certain que la quantité observée de métabolites secondaires, à un moment donné, est la résultante de nombreux mécanismes métaboliques et physiologiques : biosynthèse, dégradation, transport, capacité d'accumulation et de bioconversion.

Les métabolites secondaires varient quantitativement et qualitativement durant le développement de la plante (Guignard, 1985).

Les huiles essentielles sont produites par diverses structures spécialement différenciées dont le nombre et les caractéristiques sont très variables :

- ✓ Les poils sécréteurs épidermiques rencontrés souvent chez les Lamiacées, Géraniacées et Verbénacées. Ils produisent les essences dites superficielles ;
- ✓ Les organes sécréteurs sous-cutanés comprenant des cellules et des poches sécrétrices qui sont généralement disséminées au sein du tissu végétal chez les Myrtacée, Rutacées, ainsi que des canaux sécréteurs chez les Apiacées (Elkalamouni, 2010).

### 1.7. Localisation des huiles essentielles dans la plante

Chez les plantes à essences, ce sont des cellules glandulaires et des poils épidermiques, des poches et des tubes sécréteurs qui renferment les composés terpéniques (Guignard, 1985).

Toutes les parties des plantes aromatiques peuvent contenir de l'huile essentielle.

- ✓ Les fleurs : oranger, rose, lavande, le bouton floral (girofle) ;
- ✓ Les feuilles : Eucalyptus, menthe, thym, laurier, sarriette, sauge, aiguilles de pin et sapin ;
- ✓ Les organes souterrains : racines (vétiver), rhizomes (gingembre) ;
- ✓ Les fruits : fenouil, anis, épicarpes des Citrus ;
- ✓ Les graines : noix de muscade, coriandre ;
- ✓ Le bois et les écorces : cannelle, santal, bois de rose (Elkalamouni, 2010).

### 1.8. Analyse chimique des huiles essentielles

La chimie des essences de plantes a suscité de nombreuses recherches dès la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, avec le développement des grandes maisons de matières premières pour la parfumerie. Depuis lors, des progrès considérables ont été réalisés, grâce à l'invention de la chromatographie en phase gazeuse (CPG), en particulier avec colonnes capillaires puis chirales, et de la chromatographie liquide haute performance (HPLC), ainsi que leurs couplages à la spectrométrie de masse (SM), grâce aussi à l'analyse isotopique (AI) ou encore à la résonance magnétique nucléaire (RMN) (Franchomme, 1999).

La CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. C'est la technique de séparation la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles, car elle permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voir du microgramme. Les progrès technologiques réalisés dans le domaine des

colonnes capillaires, des phases stationnaires et des détecteurs (FID) ont contribué à rendre la CPG incontournable pour l'analyse des huiles essentielles (Paolini, 2005).

## **2. Activité biologique des huiles essentielles**

Les plantes synthétisent des molécules capables d'être à la fois antimicrobiennes et anti-inflammatoires par divers modes d'action, comme par exemple le carvacrol d'*Origanium heracleoticum* et de nombreuses autres espèces appartenant à la famille des Lamiacées. De même, elles élaborent des essences contenant à la fois des molécules antibactériennes, mucolytiques et expectorantes dans les cas des infections catarrhales mucopurulentes des voies respiratoires ; c'est le cas de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*.

L'utilisation des huiles essentielles est importante dans le traitement des pathologies infectieuses, affections urinaires, système respiratoire, gastro-intestinal et biliaire (Rios et Recio, 2005). Les huiles essentielles de certaines plantes médicinales sont utilisées pour traiter l'acné et autres infections dermiques (Vanaclocha et Canigual, 2003).

La diversité moléculaire des huiles essentielles permet de comprendre l'étendue de leur champ d'action, qui couvre les principaux domaines suivant : anti-infectieux et antiseptique (antibactérien, antifongique et antiviral), anthelminthique, antiparasitaire, anti-inflammatoire, antiallergique, antalgique, analgésique, pré-anesthésique, antispasmodique, anti-hypertensif, anticoagulant, cholagogue, cholérétique, antioxydant et anti-tumoral, etc (Franchomme, 1999 ; Kamato et al., 2007 ; Cardile et al., 2009 ; Nikolić et al., 2014).

### **2.1. Activité antibactérienne des huiles essentielles**

Au cours des dernières décennies, la résistance développée par les microorganismes aux antibiotiques constitue un phénomène biologique délicat et la médecine se trouve incapable pour établir des solutions permanentes à ce problème. L'évolution des antibiotiques

ne permet aux bactéries que de s'adapter et la recherche de nouvelles molécules actives et plus puissantes est indispensable. A cet égard, les produits naturels des plantes, à effet antimicrobien, ont gagné un grand intérêt (Essawi et Srour, 2000) et la recherche des agents bioactifs naturels pour combattre les infections est une nécessité absolue pour résoudre les problèmes de résistance. Dans ce contexte, les huiles essentielles des plantes, qui se caractérisent par leur grande richesse de molécules naturelles tant en nombre qu'en variété, peuvent constituer une alternative à l'usage des antibiotiques inefficaces et ouvrir de nouvelles perspectives (Guinoiseau, 2010 ; Derwich et al., 2011). De plus, les huiles essentielles, comme agents antimicrobiens, sont des produits naturels qui assurent plus de sécurité pour les consommateurs et sont considérées moins risqué vis-à-vis de la résistance développée par les microorganismes pathogènes (Cardile et al., 2009).

Le spectre d'action des huiles essentielles est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre. Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries Gram positives que sur les bactéries Gram négatives (Cimanga et al., 2002 ; Tenore et al., 2011; Ben Mansour et al., 2013). Les bactéries Gram négatives paraissent moins sensibles à l'action des huiles essentielles et ceci est directement lié à la présence d'une paroi cellulaire lipopolysaccharide chez les Gram- qui limite la diffusion des composés hydrophobes (Bezić et al., 2003; Burt, 2004; Ruiz-Navajas et al., 2012). Cependant, Burt (2004) a rapporté que les bactéries Gram+ ne sont pas toujours les plus sensibles aux huiles essentielles. A cet égard, il existe quelques exceptions. La bactérie Gram positive *Staphylococcus aureus* a été décrite résistante à l'effet de l'huile de *S. officinalis* et *T. algeriensis* (Hayouni et al., 2008 ; Hazzit et al., 2009). La bactérie Gram négative *Escherichia coli* est très sensible à l'huile de *S. officinalis* (Hayouni et al., 2008). Dans leur étude, Nikolić et al. (2014) ont observé que la bactérie Gram positive *Staphylococcus aureus* et la bactérie

Gram négative *Pseudomonas aeruginosa* sont toutes les deux sensibles à l'action de l'huile de *T. algeriensis*.

Par ailleurs, de nombreux travaux ont démontré que la souche bactérienne la moins sensible à l'effet des huiles essentielles de *S. officinalis*, *R. officinalis* et *T. algeriensis* est la bactérie Gram négative *Pseudomonas aeruginosa* (Longaray Delamare et al., 2007 ; Hayouni et al., 2008 ; Zaouali et al., 2010 ; Zouari et al., 2011).

## **2.2. Mode d'action des huiles essentielles**

De façon générale, l'activité antibactérienne de plusieurs huiles essentielles testées est plus puissante sur les bactéries Gram positives que les bactéries Gram négatives (Longaray Delamare et al., 2007). Mais, le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement établi (Kalembe et Kunicka, 2003 ; Burt, 2004). Les modes d'action des huiles essentielles et de leurs composés majeurs, décrits jusqu'à présent, semblent tous affecter la paroi cellulaire ou la membrane cytoplasmique de la cellule bactérienne (Guinoiseau, 2010). Compte-tenu de la variabilité des constituants chimiques présents dans les huiles essentielles, leur activité antibactérienne est attribuée à la combinaison de plusieurs modes d'action au niveau de la cellule bactérienne (Burt, 2004 ; Guinoiseau, 2010).

Selon Burt (2004), l'action des constituants des huiles essentielles sur la cellule bactérienne réside dans l'augmentation de la perméabilité de la membrane cytoplasmique ce qui entraîne un relargage des éléments cytoplasmiques (ions et métabolites), une fuite de protons, ce qui provoque une chute de la force protomotrice et une coagulation du cytoplasme. Si les constituants cytoplasmiques relargués sont indispensables à la survie de la bactérie et si leur perte est importante, cela provoque la mort de la cellule bactérienne (Guinoiseau, 2010).

### 2.3. Bactéries utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles

Plusieurs souches bactériennes sont reconnaissables par leur pouvoir de provoquer des pathologies chez l'homme et leur sensibilité aux essences a été bien étudiée pour évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles pour combattre les maladies infectieuses entraînées par ces bactéries. Parmi ces microorganismes on peut citer :

*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, etc (Cardile et al., 2009 ; Ben Mansour et al., 2013 ; Nikolić et al., 2014).

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *T. algeriensis*, *R. officinalis* et *S. officinalis* vis-à-vis de trois souches bactériennes pathogènes : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

#### 2.3.1. *Escherichia coli*

Le genre *Escherichia* comprend plusieurs espèces, dont seul *E. coli* (colibacille) est potentiellement pathogène pour l'homme. *E. coli* est une entérobactérie Gram négative, les cellules sont isolées ou par paires, mobiles (flagellées), aérobie ou anaérobie, commensale du tube digestif, capable de fermenter le glucose et le lactose. Il représente l'espèce dominante de la flore intestinale. La colonisation du tube digestif commence dès les premières heures après la naissance et le rythme de division d'*E. coli* lui permet de garder pendant toute la vie de l'individu sa place dominante dans la flore (une division toutes les 20 min à 37 °C et en condition favorable). Cette bactérie se trouve dans la microflore de l'intestin de l'homme et

d'autres animaux, dans le sol, l'eau et/ou les aliments. On considère que sa présence rend l'eau et les aliments impropres à l'utilisation ou à la consommation (Singleton, 1999 ; Carip, 2008).

### **2.3.2. *Pseudomonas aeruginosa***

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles Gram négatifs aérobies ou anaérobies facultatifs, non capsulés, non sporulés, mobiles pourvus de plusieurs flagelles polaires, producteurs de pigments fluorescents (fluorescéine) ou pas (pyocyanine, pyoribine). Chez les mammifères la principale souche rencontrée est *Pseudomonas aeruginosa*, il existe aussi des souches phytopathogènes. Dans la nature, les *Pseudomonas* vivent en saprophyte dans le sol, l'eau et les milieux humides, dans les robinetteries ou les réservoirs d'eau de pluie. Le germe est très souvent retrouvé dans les hôpitaux et, du fait de sa résistance aux antibiotiques, est souvent incriminé dans les infections nosocomiales. Il est capable de synthétiser une entérotoxine et des enzymes pathogènes comme la phospholipase ou la collagénase. Chez l'homme, *P. aeruginosa* se trouve dans la flore de la muqueuse nasale et comme flore de contamination sur la peau. Il peut également se trouver dans la flore intestinale. Il est le plus souvent pathogène opportuniste ; les infections apparaissent chez le patient immunodéprimé, elles sont souvent nosocomiales et parfois graves (septicémie, infection des brûlures...). Dans l'industrie agroalimentaire, les *Pseudomonas* peuvent entraîner des altérations des aliments par protéolyse ou par lipolyse. Les modifications organoleptiques peuvent être importantes, avec apparition de colorations, odeurs ou saveurs anormales (Singleton, 1999 ; Carip, 2008).

### 2.3.3. *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des coques Gram positifs, immobiles, non capsulés et non sporulés, aérobies ou anaérobies facultatifs. Plusieurs espèces de staphylocoques peuvent coloniser l'organisme humain : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus saprophyticus*. Le staphylocoque doré (*S. aureus*) forme des colonies reconnaissables par leur coloration jaune or. Ce germe présente une forte résistance aux agents désinfectants et antiseptiques ; Il résiste notamment aux produits à base d'iode, de chlore et aux peroxydes. Le *S. aureus* est ubiquitaire. Il est commensal de la peau et des muqueuses de nombreux mammifères, y compris l'homme. On le trouve surtout dans les fosses nasales et le pharynx (20 à 50% des individus), dans le tube digestif et sur les téguments des grands plis et du périnée. Il se trouve aussi comme saprophyte dans l'environnement. La transmission de ce germe peut survenir d'homme à homme, d'animal à homme mais aussi par les objets contaminés, la poussière, les vêtements, les squames et les aliments. La bactérie est un pathogène opportuniste, avec un pouvoir invasif et toxinique. Elle développe souvent des résistances aux antibiotiques, ce qui en fait actuellement l'un des germes les plus résistants et l'un des vecteurs les plus dangereux d'infections nosocomiales. Par ailleurs, *S. aureus* est responsable de toxi-infections alimentaires, provoquées par son entérotoxine (Singleton, 1999 ; Carip, 2008).

# Chapitre 3

## Germination des graines et propagation des plantes

## **1. Régénération des plantes**

La régénération des plantes supérieures s'effectue par voie sexuée qui assure la recombinaison du matériel génétique, permettant d'obtenir une descendance présentant les caractères des deux parents. Les événements qui concernent cette modalité de reproduction se réalisent au niveau de la fleur et se terminent par la formation du fruit qui contient des graines assurant à leur tour ce type de reproduction. Les plantes supérieures sont aussi capables de se multiplier par voie végétative qui se déroule en dehors des phénomènes de sexualité. La multiplication végétative est le moyen de reproduire un être vivant sans passer par la voie sexuée (graine). Elle repose sur l'aptitude d'un végétal à pouvoir reconstituer un individu génétiquement identique à la plante mère à partir d'un organe végétatif (tige, racine, feuille...), d'un tissu ou d'une cellule (Hopkins, 2003 ; Ozenda, 2006 ; Laberche, 2010).

### **1.1. Germination des graines**

#### **1.1.1. Définition**

La germination d'une graine comprend deux étapes : une reprise d'activité et une imbibition qui se traduit par la sortie de la radicule (germination au sens strict), puis la croissance des organes embryonnaires, racine et tige (germination au sens large) (Prat, 2007).

#### **1.1.2. Processus physiologiques de la germination**

Lorsque les conditions sont favorables, l'embryon reprend sa croissance et la graine germe. La première étape de la germination est l'absorption d'eau et la réhydratation des tissus de la graine par un processus appelé imbibition. L'imbibition par l'eau est suivie d'une activation générale du métabolisme de la graine, la respiration est l'un des premiers événements détectables dans les graines humides puis très rapidement la libération d'enzymes hydrolytiques qui digèrent et mobilisent les réserves ainsi que la reprise des divisions et du

grandissement cellulaires dans l'axe embryonnaire. Chez la plupart des espèces, la germination est terminée lorsque la radicule émerge des téguments de la graine. L'émergence de la radicule est due à l'action concertée du grandissement des cellules de la radicule et des pressions développées par les forces d'imbibition dans la graine. La rupture des téguments provoque la mise en contact de la radicule qui vient de sortir avec l'eau et les nutriments minéraux qui sont nécessaires à la croissance ultérieure de la jeune plantule (Hamman et al., 2003 ; Hopkins, 2003).

Le développement d'une plante commence par la germination des semences. Ensuite se met en place un programme morphogénétique qui règle les développements relatifs des divers organes de la plante et aboutit à la réalisation d'une plante reconnaissable par sa morphologie (son port ou sa silhouette). Le développement relatif des organes fait intervenir des corrélations trophiques et hormonales. Enfin, les facteurs extérieurs peuvent influencer ce développement en permettant à la plante, par des mouvements souvent discrets, de se positionner par rapport à eux. C'est le cas en particulier des tropismes et des phénomènes de nutation (Prat, 2007).

### **1.1.3. Facteurs influençant la germination des graines**

Il existe un nombre de facteurs qui contrôlent la dormance et la germination des graines incluant l'immaturation de l'embryon, l'imperméabilité des téguments, la résistance mécanique exercée par les téguments sur la croissance de l'embryon, perméabilité réduite des enveloppes aux gazes, dormance chimique, hormones végétales produites par la plante et différentes interactions entre ces facteurs (Kozłowski, 1972; Wang et al., 1982; Miransari et Smith, 2014).

De nombreux résultats concernant la dormance et la germination ont été publiés et plusieurs chercheurs ont élucidé les différents facteurs qui affectent la germination des

graines : stage phénologique pendant la collecte des graines, stratification humide à haute et basse température, stratification chimique, doses d'acide gibbérellique, méthode de stockage, âge des graines, stratification thermique, durée de la stratification thermique, régulateurs de croissance, qualité de la lumière, potentiel osmotique, salinité, profondeur de l'enfouissement des graines (Colin, 1985; Conversa et al., 2010 ; Dissanayake et al., 2010; Güleriyüz et al., 2011; Sharma et al., 2014; Darrudi et al., 2015; Wang et al., 2016).

## **1.2. Multiplication végétative**

La multiplication végétative est l'ensemble des mécanismes qui aboutissent à la production de nouvelles plantes ; soit à partir des organes végétatifs de plantes mères ; soit à partir des organes floraux mais alors sans intervention de la fécondation et de la production de graines (Ozenda, 2006).

### **1.2.1. Propagation des plantes en culture *in vitro***

Les méthodes de culture *in vitro* sont de plus en plus employées pour assurer la propagation clonale des génotypes élités afin de satisfaire les besoins en agriculture et horticulture. La culture *in vitro* est par ailleurs un outil très efficace au service de la recherche biologique et physiologique (Haïcour, 2002).

### **1.2.2. Micropropagation**

Les succès rencontrés par les cultures de tissus ont permis de procéder au clonage, sur une grande échelle, de différentes espèces végétales. Sur un espace relativement faible, ainsi qu'avec un apport de technicité et de matériel peu important, il est possible de produire des millions de plantes de bonne qualité et génétiquement uniformes. Ce processus est connu sous le terme de micropropagation. La technique la plus courante est de placer des méristèmes

excisés sur un milieu artificiel qui réduit la dominance apicale et favorise le développement de bourgeons. Les nouvelles pousses peuvent être isolées et remises en culture afin de produire plus de rameaux axillaires, ou placées sur un milieu favorisant l'enracinement puis repiquées en pots. Alternativement, les tissus peuvent être utilisés pour produire des cultures de cals qui subiront ensuite une induction dont le résultat est la production de racines ou de pousses feuillées. La micropropagation est un moyen efficace d'éliminer les virus et d'autres pathogènes, elle produit des quantités commerciales de propagules indemnes de pathogènes. Les premières plantes produites en masse par culture de tissus, ont été des *Cymbidiums* (Orchidées) indemnes de virus, mais la technique a également été utilisée pour propager la pomme de terre, des lis, des tulipes et d'autres espèces qui sont normalement propagées par voie végétative. Cette technique permet une multiplication très rapide des plantes. On peut obtenir en une année par repiquage en éprouvettes plus de cent milles plants de rosiers ou d'arbres fruitiers à partir d'un seul bourgeon (Hopkins, 2003 ; Ozenda, 2006).

### 1.2.3. Intérêt de la micropropagation

La micropropagation figure parmi les techniques de base les plus développées. Elle permet, à partir d'un matériel de départ souvent très restreint pondéralement, d'obtenir en un temps relativement court et dans un espace minimum, un rythme de multiplication extrêmement élevé et donc la formation rapide d'un clone.

D'une manière générale, la propagation en culture *in vitro* des plantes apporte une solution à de nombreux problèmes. Elle permet :

- ✓ La conservation des génotypes dans des conditions idéales de protection contre les intempéries, les agressions des ravageurs et agents pathogènes. Il suffit de quelques individus en tube pour assurer une grande quantité de plants, d'où la possibilité de stocker dans un espace peu important des génotypes divers ;

- ✓ La maintenance permanente d'un stock suffisant d'individus pour assurer la fourniture régulière d'une variété couramment commercialisée ;
- ✓ La multiplication accélérée et la propagation de plantes dont la sexualité est défailante (cas de certains hybrides) ;
- ✓ Le microbouturage *in vitro* peut, en outre, être programmé indépendamment des saisons ;
- ✓ La technique de propagation utilisant des microboutures pourvues au minimum d'un méristème caulinaire, est certainement la plus généralisable et la plus efficace pour éviter la vitrovariation et aboutir à la production en masse de plantes (copies conformes) de la plante de départ ou à la conservation du génotype mis en culture. C'est par la poursuite simultanée de ces deux objectifs que le risque d'érosion génétique lié à l'utilisation abusive de clones peut être maîtrisé (Haïcour, 2002).

## 2. Culture *in vitro*

### 2.1. Intérêt de la culture *in vitro*

La culture *in vitro* est un excellent moyen de recherche en biologie végétale, dans des domaines auxquels nous n'avons pas accès par l'étude de la plante entière. Elle permet ainsi la démonstration expérimentale de la totipotence de la cellule végétale.

Les travaux réalisés *in vitro* sont orientés en deux axes principaux :

**En agronomie** : l'organogenèse *in vitro* est actuellement un procédé appliqué très largement à l'échelle industrielle, à titre d'exemple :

- ✓ Micropropagation conforme d'un individu végétal sélectionné pour ses qualités ;
- ✓ Obtention de variants ou de mutants présentant de nouvelles caractéristiques dont on désire la conservation et la multiplication ;

- ✓ Régénération de plantes saines à partir des méristèmes prélevés sur des plantes virosées. C'est un moyen largement utilisé pour régénérer de nombreuses variétés cultivées atteintes par des virus, en effet, chez ces plantes, seul le méristème n'est pas envahi par le virus ;
- ✓ Multiplication rapide de nombreuses variétés d'Orchidées.  
**En phytochimie** : tout particulièrement pour l'obtention de molécules à activité pharmacologique. On peut distinguer quatre niveaux d'intérêt :
  - ✓ Etude de voies de biosynthèse des métabolites secondaires dans des conditions expérimentales plus favorables que celles de la plante entière ;
  - ✓ Obtention de métabolites secondaires déjà connus pour leur activité ou utilisables pour l'hémisynthèse de diverses molécules ;
  - ✓ Création de nouvelles molécules inconnues dans la plante entière ;
  - ✓ Biotransformation de molécules (naturelles ou de synthèse) fournies comme substrat aux cellules végétales ce qui aboutit à des dérivés nouveaux pouvant présenter des propriétés intéressantes (Guignard et al., 1985).

Bien que les plantules produites par la culture de tissus sont des clones de cellules somatiques (non sexuelles), en principe identiques, les plantes régénérées peuvent exhiber d'importantes variations tant de leur morphologie que de leur physiologie. Ce phénomène est appelé variation somaclonale. Les causes de la variation somaclonales sont mal connues, mais elle fait intervenir des modifications génétiques induites par les conditions de culture (Hopkins, 2003).

### 3. Régulateurs de croissance

La croissance des plantes est le résultat d'une prolifération cellulaire ou mères qui, au niveau des méristèmes, augmente le nombre de cellules puis les cellules en s'éloignant de la zone de multiplication, s'allongent et progressivement se différencient. L'auxèse se fait

généralement dans l'axe de l'organe ; croissance en longueur. La différenciation se produit avant la fin de l'élongation, mais n'est totalement réalisée que lorsque la croissance s'arrête.

Auxine (AIA), cytokinines (CKs) et gibbérellines (GAs) sont les principales hormones intervenant dans la croissance des plantes (Guignard, 2000).

### **3.1. Auxine**

L'auxine ou acide indole 3-acétique (AIA), première substance de croissance isolée chez les végétaux, est synthétisée à partir de l'indole 3-glycérate ou du tryptophane. Cette synthèse se produit au niveau des zones de croissance : les apex caulinaires et racinaires ainsi dans les jeunes feuilles en bourgeons, tube pollinique, graines lors de la transformation de l'ovaire en fruit. Après sa synthèse, l'auxine est transportée dans l'axe de la plante.

(Guignard, 2000 ; Hopkins, 2003).

#### **3.1.1. Transport polarisé de l'auxine**

L'auxine est une molécule à faible poids moléculaire et lipophile, elle migre par simple diffusion à partir des centres de formation. Notamment le transport de l'AIA synthétisé dans les feuilles s'effectue de façon passive via le phloème. A ces mécanismes de diffusion passive se superpose un transport polarisé du haut de la plante vers les racines. La vitesse de ce transport est de l'ordre de 10 à 20 mm par heure ; il est surtout marqué au niveau des rameaux végétatifs (Augé et al., 1989 ; Guignard, 2000).

#### **3.1.2. Destruction de l'AIA**

L'AIA se produit et rapidement détruit, si bien que la croissance d'un organe nécessite un continuel renouvellement à partir des centres formateurs. En raison du transport polarisé, l'accumulation de l'auxine dans les parties basses conduirait rapidement à des phénomènes de

toxicité au niveau des racines. L'AIA est peu stable, se décompose en quelques jours à la lumière. Dans la plante, sa destruction correspond à des oxydations par l'auxine oxydase (Augé et al., 1989 ; Guignard, 2000).

### 3.1.3. Rôles physiologiques des auxines

Les auxines sont capables d'influencer de nombreuses réponses comme :

- ✓ La croissance cellulaire et la différenciation ;
- ✓ La croissance des bourgeons axillaires ;
- ✓ La dominance apicale et les réponses tropiques sont également contrôlées par l'auxine ;
- ✓ A très faibles concentrations, l'auxine provoque l'allongement de racines, à l'inverse, elle stimule l'allongement des tiges ;
- ✓ Les auxines provoquent également la formation des racines adventives sur les tiges ;
- ✓ Développement des fleurs et des fruits ;
- ✓ Induction de la parthénocarpié chez un petit nombre d'espèces comme celles appartenant à la famille des Solanacées (tomate, poivron) et les Cucurbitacées (concombre, citrouille) et chez les Citrus ;
- ✓ Les auxines peuvent aussi contrôler l'abscission des fruits. Selon la dose appliquée et selon le moment de son application, l'auxine peut soit provoquer, soit empêcher une chute prématurée du fruit ;
- ✓ L'abscission des feuilles semble dépendre des concentrations relatives d'auxines de part et d'autre de la zone d'abscission (Augé et al., 1989 ; Hopkins, 2003).

## 3.2. Cytokinines

La première cytokinine naturelle, la zéatine a été isolée du caryopse du maïs en 1964. Depuis plus de trentaine de molécules ont été isolées et identifiées. Ce sont des N<sub>6</sub> dérivés de

l'adénine. Les laboratoires utilisent des cytokinines de synthèse comme, par exemple, la kinétine ou N<sub>6</sub>-furfuryladénine à propriétés analogues mais plus économiques. Les cytokinines sont synthétisées à partir de l'adénine, la synthèse a lieu au niveau des racines. Leur circulation est sans polarité ; le xylème assure leur transport et leur présence dans tous les tissus (Augé et al., 1989 ; Guignard, 2000).

### 3.2.1. Rôles physiologiques des cytokinines

- ✓ Les cytokinines stimulent la division cellulaire ; elles interviennent, toujours en présence de l'AIA, sur des cellules déjà différenciées dont elles assurent la dédifférenciation puis la multiplication ;
- ✓ Au niveau de la plante entière, l'action des cytokinines porte essentiellement sur la différenciation et la croissance des bourgeons ;
- ✓ Elles exercent un effet antagoniste de la dominance apicale ;
- ✓ En culture *in vitro*, elles assurent la balance entre la formation de racines et celle des bourgeons (Augé et al., 1989 ; Guignard, 2000).

### 3.3. Gibbérellines

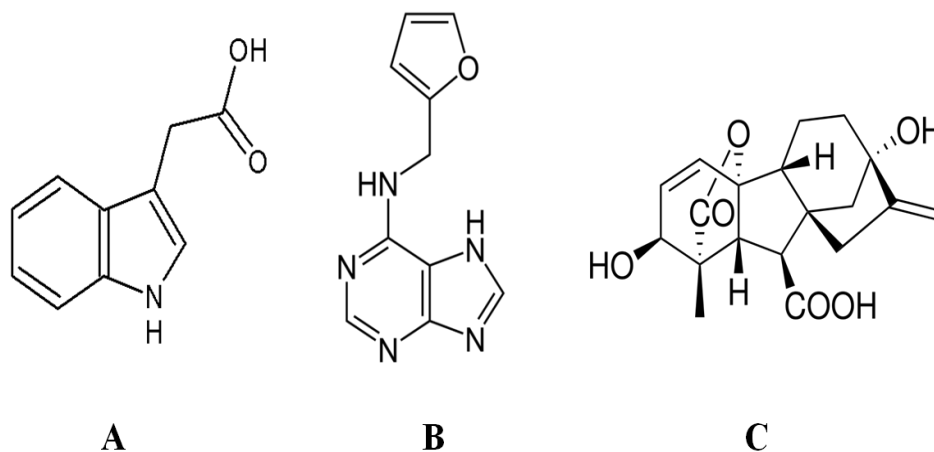
Les gibbérellines (GAs) sont des diterpènes provenant de la cyclisation du géranyl géranyl pyrophosphate (C<sub>20</sub>), elles sont représentées par plus de quatre vingt composés de structures chimiques voisines. Dans une même espèce coexistent en petite quantité plusieurs GAs. La première gibbérelline identifiée est l'acide gibbérellique ou GA<sub>3</sub> à partir du champignon *Gibberella fujikuroi*. Cette première découverte a été suivie par de nombreuses autres gibbérellines puisque chez le champignon ou chez les plantes une cinquantaine de gibbérellines ont été identifiées ; ce sont toutes des composés endogènes. Les gibbérellines les plus utilisées sont la GA<sub>3</sub> puis les mélanges GA<sub>4</sub> + GA<sub>7</sub> et GA<sub>7</sub>. Tous ces composés présentent

un noyau semblable (noyau gibbane), ils diffèrent entre eux par la qualité et la position des substituants sur le noyau.

Les GAs sont synthétisées dans les apex des jeunes tiges, en particulier dans les graines en germination au niveau du point végétatif embryonnaire. Elles sont capables d'une certaine migration, en particulier par le phloème, mais leur transport n'est pas polarisé. La GA<sub>3</sub> est produite industriellement à partir du champignon *Gibberella fujikuroi* (Augé et al., 1989 ; Guignard, 2000).

### 3.3.1. Rôles physiologiques des gibbérellines

- ✓ Les GAs agissent sur la multiplication cellulaire des méristèmes primaires alors qu'elles sont, à la différence de l'AIA, sans effet sur les cambiums (méristèmes secondaires) ;
- ✓ Leur action la plus spectaculaire a lieu sur les allongements des entre-nœuds par stimulation des méristèmes intercalaires (résultants de la fragmentation des méristèmes primaires) ;
- ✓ Les GAs interviennent également dans les phénomènes de levée de dormance soit sur les semences soit sur les bourgeons ;
- ✓ Elles favorisent la production d'enzymes hydrolysantes ;
- ✓ Les GAs exercent une action complexe sur la floraison (Augé et al., 1989 ; Guignard, 2000 ; Miransari et Smith, 2014).



**Figure 1: Structures chimiques des régulateurs de croissance**

(A) : Acide indole 3-acétique, (B) : N-6-furfuryladénine (Kinétine), (C): Acide gibbérellique (GA<sub>3</sub>).

#### 4. Milieu de culture

Le milieu de culture a pour rôle d'assurer la nutrition des explants, les éléments indispensables sont les sels minéraux et une source carbonée, car du fait de la faible assimilation photosynthétique en culture *in vitro*, les explantes sont hétérotrophes. Par ailleurs, on ajoute des vitamines qui favorisent la croissance des tissus en culture. Enfin, suivant les besoins, on ajoute des régulateurs de croissance. Le pH du milieu est ajusté vers 5.7 à 5.8 (Haïcour, 2002). Tous les milieux de culture sont constitués de sels minéraux, de substances organiques et de phytohormones. Pour la plupart des plantes supérieures les constituants minéraux et organiques sont :

- a-** Les macroéléments : Il s'agit de six éléments présents à des concentrations élevées tels que l'azote, le calcium, le potassium, le soufre, le magnésium et le phosphore.
- b-** Les microéléments : bien qu'ils ne soient nécessaires à la plante qu'en faibles concentrations, leur rôle est essentiel. Les principaux d'entre eux sont le fer, le cuivre, le zinc, le manganèse, le molybdène, le bore, le chlore, et le cobalt.

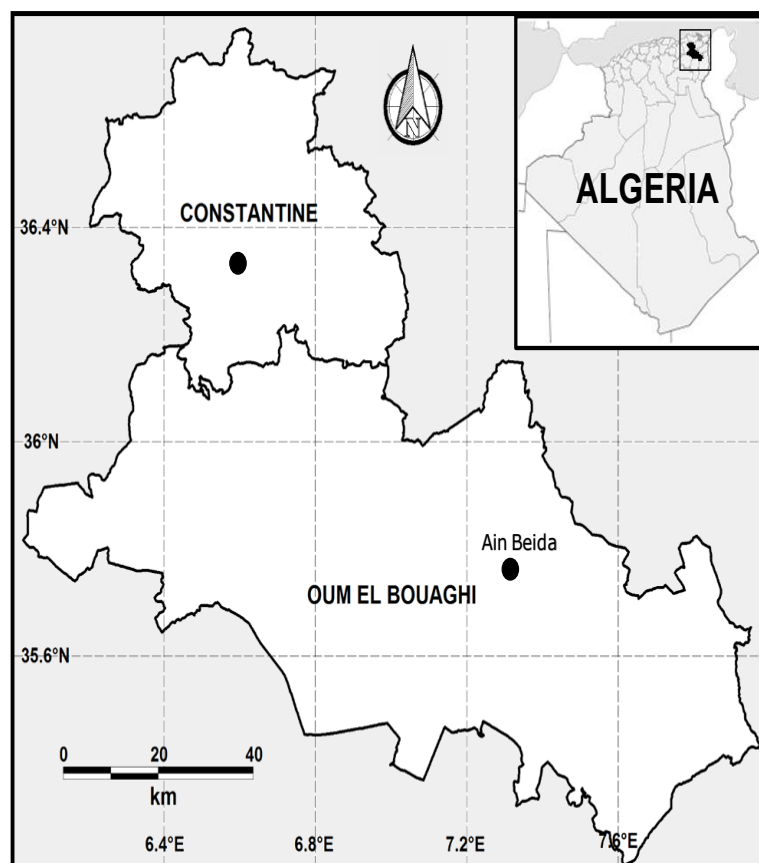
- c- Saccharose : pour la culture *in vitro*, le saccharose constitue une source d'énergie car la plante n'est pas encore arrivée à satisfaire ses besoins énergétiques.
- d- Vitamines : elles sont des substances organiques reconnues pour stimuler la croissance. Elles sont particulièrement utiles en micropropagation lorsqu'un fragment seulement de la plante est utilisé pour générer la culture de plante entière. En culture *in vitro*, certaines vitamines sont favorables aux croissances des tissus, parmi les principales: la thiamine, l'acide nicotinique, la pyridoxine et le meso-inositol.

De nombreuses formulations ont été proposées et les plus utilisées sont celles de Murachige et Skoog (MS) ; l'équilibre minéral mis au point en 1962 par Murachige et Skoog est largement répandu. De nombreux travaux ont utilisé le milieu de culture (MS) pour réussir les cultures *in vitro* chez différentes espèces végétales (Misra et Chaturvedi, 1991 ; Cheruvathur et al., 2015 ; Shekhawat et al., 2015 ; Kousalya et Narmatha Bai, 2016).

# Matériel et Méthodes

## 1. Matériel végétal

Les parties aériennes fraîches (tiges, feuilles et fleurs) des trois plantes médicinales *T. algeriensis*, *R. officinalis* et *M. vulgare* ont été collectées au stade floraison de leur environnement naturel de la région semi aride dans le Nord-est algérien de Ain Beida (latitude: 35.805° N, longitude: 7.376° E, altitude: 920 m). Celles de *S. officinalis* ont été collectées de Constantine (latitude: 36.362° N, longitude: 6.618° E, altitude: 560 m) (Figure 2). Les parties aériennes des quatre plantes ont été coupées en tronçons de 1 à 2 cm environ, puis séchées et stockées à l'obscurité et à la température ambiante de la chambre ( $20 \pm 5$  °C) jusqu'à leur utilisation pour l'extraction des huiles essentielles.



**Figure 2 :** Localisation géographique des sites de collecte (●) des quatre espèces médicinales étudiées dans le Nord-est algérien

## 2. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par un hydrodistillateur de type Clevenger selon la méthode décrite par la pharmacopée européenne (Council of Europe, 1997). La distillation a été réalisée par ébullition de cent grammes de la matière végétale sèche dans un litre d'eau distillée pendant 2 heures. Les huiles essentielles obtenues ont été séparées complètement de l'eau distillée et stockées dans des flacons en verre fumés et stériles à une température de 4 °C jusqu'à leur utilisation pour l'analyse chimique (CG/SM) et l'activité antibactérienne. L'extraction des huiles essentielles a été réalisée en trois répétitions et le rendement a été calculé en pourcentage par rapport à la matière sèche végétale selon la formule suivante :

$$\text{Rdt HE (\%)} = \text{M (HE)} / \text{M (MSV)} \times 100$$

**Rdt HE (%)**: Rendement des huiles essentielles en pourcentage.

**M (HE)**: Masse des huiles essentielles en gramme.

**M (MSV)**: Masse de la matière sèche végétale utilisée pour l'extraction en gramme.



**Photo 5:** Hydrodistillation des huiles essentielles

(Photo S. Mehalaine)

## **2.1. Analyse chimique des huiles essentielles et identification des molécules**

L'analyse chimique des huiles essentielles a été effectuée par la chromatographie en phase gazeuse (CG) couplée à la spectrométrie de masse (SM) au niveau du laboratoire d'Analyse Organique Fonctionnelle, Faculté de Chimie, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, Alger.

## **2.2. Conditions de l'analyse chimique (CG-SM)**

L'analyse chimique des huiles essentielles a été réalisée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse CG/SM (EI) de type AGILENT (Hewlett-Packard 6890 série II) couplé à un spectromètre de masse quadripôle (model HP MSD 5973) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'un injecteur automatique.

Les conditions de l'analyse chimique adoptées sont les suivantes :

- ✓ Colonne capillaire apolaire HP-5MS de longueur de 30 m, diamètre interne de 0.25 mm et épaisseur du film de 0.25  $\mu\text{m}$  ;
- ✓ La température de la colonne varie de 45 °C à 250 °C avec une vitesse de programmation de 2 °C/min après une isotherme de 8 min ;
- ✓ Gaz vecteur : Hélium avec un débit de 0.5 ml/min ;
- ✓ Température de l'injection est de 250 °C ;
- ✓ Volume injecté : 1  $\mu\text{l}$  de l'huile essentielle ;
- ✓ Les températures du détecteur FID et la source sont 230 °C ;
- ✓ Spectrométrie de masse : mode Impact électronique à balayage ; potentiel d'ionisation : 70eV (Ferhat et al., 2006).

Les composés chimiques des huiles essentielles ont été identifiés par la comparaison de leurs spectres de masse avec ceux de la banque de données (Wiley 7N et NIST 2002 libraries) et avec la comparaison de leurs indices de rétention (indice de Kovats KI) relatifs à une série de n-alkanes (C7–C20) avec la littérature (Adams, 1995).

### **2.3. Activité antibactérienne des huiles essentielles**

#### **2.3.1. Souches bactériennes utilisées**

Pour tester l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *T. algeriensis*, *R. officinalis* et *S. officinalis*, trois souches bactériennes de référence ont été utilisées ; Gram négative *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et Gram positive *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Les souches bactériennes de référence ont été fournies par l'institut Pasteur (Alger). Les bactéries ont été maintenues à 4 °C dans l'agar nutritive (NA) (Merck, Germany) jusqu'à leur utilisation pour l'activité antibactérienne.

### **2.3.2. Méthode de diffusion de disques**

La méthode de diffusion de disques a été appliquée pour évaluer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *T. algeriensis*, *R. officinalis* et *S. officinalis* (NCCLS, 2001). La culture bactérienne a été préparée dans un bouillon nutritif (Merck, Germany) et incubée à 37 °C pendant 24 h. Après l'incubation, la suspension bactérienne a été ajustée à 10<sup>6</sup> cfu/ml puis déversée et distribuée sur le Muller Hinton (Merck, Germany) dans des boîtes de Pétri stériles. Des disques stériles de papier Whatman (N° 03) de 6 mm de diamètre ont été imbibés avec chaque huile essentielle diluée par une quantité du sulfoxyde de diméthyle (DMSO) (500 mg HE/10 ml DMSO). Les disques ont été placés sur les boîtes de Pétri inoculées. Après une période d'incubation de 24 h à 37 °C, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés en millimètre. Des disques imbibés avec le DMSO sans l'huile essentielle ont été utilisés comme control négatif dans les mêmes conditions pour tester la sensibilité des bactéries au solvant. L'expérimentation a été effectuée en trois répétitions pour calculer la moyenne du diamètre d'inhibition.

### **2.3.3. Concentration minimale inhibitrice (CMI)**

Pour confirmer l'effet antibactérien des trois huiles essentielles sur les trois souches bactériennes utilisées, la concentration minimale inhibitrice a été déterminée en utilisant la méthode de dilution sur milieu solide (CLSI, 2006). Les trois huiles essentielles ont été diluées par le sulfoxyde de diméthyle (DMSO). Puis le mélange a été ajouté au Mueller Hinton (MHA) stérile et refroidi à 45-50 °C de façon à obtenir une série de concentrations dans l'ordre de (3.33, 2.50, 1.66, 0.83, 0.41, 0.20, 0.10, 0.05, 0.02 mg/ml). Les solutions résultantes ont été immédiatement déversées sur des boîtes de Pétri stériles. Ces dernières ont été ensuite inoculées par la suspension bactérienne ajustée à 10<sup>6</sup> cfu/ml et incubées à 37 °C pendant 24 h. Après l'incubation, la valeur de la CMI a été déterminée comme la plus faible

concentration de l'huile essentielle qui inhibe la croissance visible des microorganismes testés. Un control négatif a été appliqué dans les mêmes conditions pour tester la sensibilité des trois souches bactériennes au DMSO. L'expérimentation a été réalisée en trois répétitions.

### **3. Germination *in vitro* des graines**

#### **3.1. Collection des graines**

Les graines de *T. algeriensis*, *R. officinalis*, *M. vulgare* et *S. officinalis* ont été collectées au stade fructification de l'habitat naturel des quatre espèces médicinales (Figure 2), au cours de l'année 2012-2013. Les graines ont été stockées dans des sacs en papier à la température ambiante pour quelques mois jusqu'au début de l'expérimentation.

#### **3.2. Stérilisation des graines**

Les graines ont été lavées sous l'eau de robinet pendant presque 30 minutes, puis stérilisées par une solution de l'hypochlorite de sodium (NaOCl) pendant 5 minutes et rincées trois fois par l'eau distillée stérile à un intervalle de 10 minutes pour chaque rinçage. Ensuite, les graines stérilisées ont été soumises à deux expérimentations. Toutes les manipulations ont été effectuées devant le bec Bunsen.

#### **3.3. Expérimentation 01: Test préliminaire de germination**

Les graines désinfectées des quatre plantes ont été immergées dans l'eau distillée stérile pendant une heure. Trente graines par chaque espèce ont été placées sur trois couches du papier filtre stérile et recouvertes par une autre couche dans des boîtes de Pétri stériles et incubées à la température ambiante ( $23 \pm 2$  °C) et à l'obscurité absolue au laboratoire (Prat, 2007). Les graines ont été imbibées quotidiennement avec de l'eau distillée stérile. L'expérimentation a été réalisée en trois répétitions.

### **3.4. Expérimentation 02: Effet de l'acide gibbérellique (GA<sub>3</sub>)**

Les graines décontaminées ont été traitées par trois doses croissantes de l'acide gibbérellique (GA<sub>3</sub>) (125, 250, 500 mg/L) pendant deux heures. Puis dix graines de chaque espèce ont été placées sur Agar-agar (6 g/L) dans des boîtes de Pétri stériles et incubées à une obscurité absolue et thermopériode (25 °C/16h, 15 °C/8h) dans un phytotron (Snijders, Model ECP 01E). L'expérimentation a été réalisée en trois répétitions.

Dans les deux expérimentations, les graines germées ont été comptées chaque jour pendant un mois. Les graines sont considérées germées quand la radicule sort des téguments de la graine (longueur de la radicule  $\geq 2$  mm). Le taux de la germination a été calculé de la formule suivante :

$$\text{Nombre de graines germées} / \text{Nombre de graines testées} \times 100$$

## **4. Propagation *in vitro***

### **4.1. Explants utilisés**

Les explants utilisés pour la propagation *in vitro* sont des fragments de 0.5 cm coupés de jeunes rameaux des quatre plantes étudiées au stade plein végétatif.

### **4.2. Stérilisation des explants**

Les explants ont été lavés sous l'eau de robinet pendant 30 minutes. Puis ils ont été stérilisés par immersion dans l'éthanol (70%) pendant 1 minute suivie d'une immersion dans une solution de chlorure de mercure (HgCl<sub>2</sub> 0.1% ) pendant 2 minutes. Par la suite, les explants désinfectés ont été rincés par l'eau distillée stérile trois fois à un intervalle de 10 minutes pour chaque rinçage.

### 4.3. Culture *in vitro*

Les explants désinfectés ont été placés dans des boîtes de Pétri stériles contenant 15 ml du milieu de culture Murachige et Skoog (MS) (Haïcour, 2002), additionné de différentes concentrations de régulateurs de croissance : acide indole 3-acétique (AIA) et N-6-furfuryladenine (Kénitine) (Tableau 1). Les échantillons ont été incubés à une photopériode et thermopériode (16h lumière/25 °C, 8h obscurité/15 °C) dans un phytotron pour favoriser la formation de cals. Le taux de réussite de callogénèse a été calculé de la formule suivante :

$$\text{Nombre d'explants développés en cals} / \text{Nombre total d'explants} \times 100$$

Les cals sains et vigoureux obtenus ont été transmis sur d'autres milieux de culture (MS) contenant les mêmes combinaisons de l'AIA et la Kin et soumis aux mêmes conditions de culture pour favoriser la caulogénèse. Le taux de réussite de caulogénèse a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Nombre de cals développés en pousses feuillées} / \text{Nombre total de cals} \times 100$$

Les changements en morphologie (induction de cals et caulogénèse) ont été vérifiés chaque semaine durant 3 mois. L'expérimentation a été effectuée en trois répétitions, chaque répétition a contenu 10 explants pour la callogénèse et la caulogénèse.

**Tableau 1.** Concentrations de l'AIA et la Kinétine appliquées en combinaisons dans le milieu de culture Murachige et Skoog (MS).

Concentrations de l'AIA et la Kinétine	
MS1	Témoin : 0 mg/L AIA, 0 mg/L Kin
MS2	2.5 mg/L AIA, 2.5 mg/L Kin
MS3	2.5 mg/L AIA, 5 mg/L Kin
MS4	5 mg/L AIA, 5 mg/L Kin
MS5	5 mg/L AIA, 10 mg/L Kin

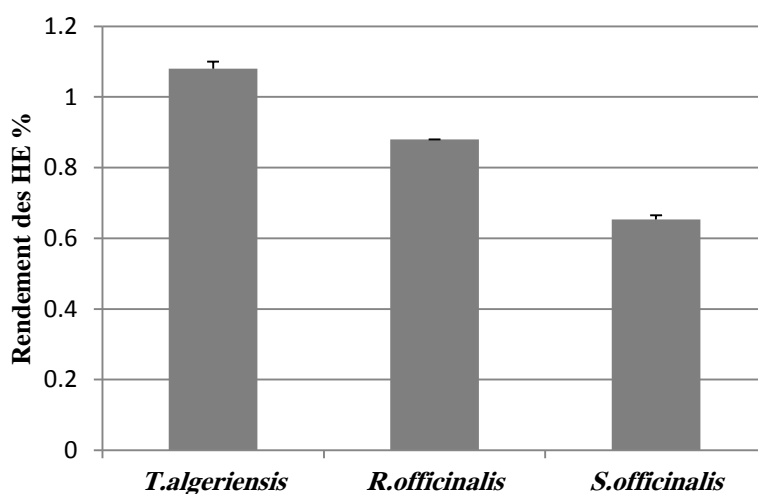
### 5. Données statistiques

Les résultats obtenus de l'expérimentation de la germination *in vitro* et de la propagation *in vitro* ont été soumis à une analyse de la variance (ANOVA) à un seul facteur pour tester l'effet de l'acide gibbérellique sur la germination des graines et l'effet de différentes concentrations des régulateurs de croissance (AIA) et (Kin) sur la callogénèse et la caulogénèse à une probabilité de 5%. Les moyennes et les déviations standards ont été calculées indépendamment pour chaque expérimentation. En outre, des comparaisons multiples des moyennes ont été effectuées par le test de Tukey pour distinguer les groupes homogènes et hétérogènes parmi les deux variables (callogénèse et caulogénèse). Tous les traitements statistiques ont été faits par le logiciel Minitab (version 16).

# Résultats et discussion

### 1. Rendement des huiles essentielles

Le rendement des huiles essentielles a été exprimé par rapport au poids de la matière sèche végétale. *T. algeriensis* a présenté un rendement élevé ( $1.08 \pm 0.02\%$ ) suivi de *R. officinalis* ( $0.88 \pm 0.00\%$ ) et enfin *S. officinalis* ( $0.65 \pm 0.01\%$ ). Pour *M. vulgare*, nous n'avons pas obtenu des huiles essentielles par hydrodistillation (Figure 3).



**Figure 3 :** Rendement des huiles essentielles de *T. algeriensis*, *R. officinalis* et *S. officinalis*

Nos résultats obtenus concordent relativement avec ceux de la littérature. Dob et al. (2006) ont obtenu un rendement des huiles essentielles élevé et estimé à 1.13% de la partie aérienne de *T. algeriensis* collectée de Media dans le Nord central d'Algérie. Alors qu' une autre étude a montré une valeur relativement faible (0.3%) des huiles essentielles de la partie aérienne de *T. algeriensis* collecté de Maroc (Amarti et al., 2010).

Les feuilles de romarin collectées de Maroc ont présenté un rendement de 0.54% (Derwich et al., 2011). Alors que Zaouali et al. (2013) ont montré des rendements différentes : (1.17% ) chez les feuilles, (0.056%) chez les fleurs et (0.0048% ) chez les tiges. Ainsi, la teneur la plus élevée a été obtenue des feuilles collectées au stade floraison (1.43%) et

l'ensemble des tiges et feuilles ont montré des rendements de 0.64%, 0.71% et 0.40% au stade végétatif, floraison et fructification respectivement.

Concernant *S. officinalis*, la teneur en huile essentielle obtenue dans notre étude est plus élevée que celle obtenue par Hayouni et al. (2008) de la partie aérienne de *S. officinalis* collectée de Tunisie au stade floraison (0.58%).

Selon ces études, le rendement des huiles essentielles dépend de plusieurs facteurs tels : la région géographique de l'espèce végétale, le stade phénologique de la plante et/ou la saison de collecte et l'organe végétatif utilisé pour l'extraction des huiles essentielles.

## 2. Analyse chimique des huiles essentielles

### 2.1. Analyse chimique de l'huile essentielle de *Thymus algeriensis*

Pour l'huile de *T. algeriensis*, 36 molécules ont été identifiées, représentant 68.65% du total de l'huile essentielle. Ce pourcentage est faible par rapport aux plusieurs études qui ont montré des pourcentages de molécules identifiées plus élevés chez l'huile de *T. algeriensis* : (91.2%, 95.00%, 97.1%) (Hazzit et al., 2009), (97.71%) (Zouari et al., 2011) et (99.98%) (Nikolić et al., 2014). Les composés majeurs sont camphor (13.62%), 1,8-cinéole (6.00%), borneol (5.74%), viridiflorol (4.00%), linalool (3.93%),  $\alpha$ -terpineol (3.80%) et caroyophyllène oxide (3.50%) (Tableau 2).

Nos résultats s'accordent relativement avec plusieurs études ; l'analyse CG/SM a indiqué la présence de viridiflorol à un pourcentage similaire à celui obtenu par Zouari et al. (2011) à partir des huiles extraites des feuilles et fleurs de *T. algeriensis* de Tunisie au stade floraison, et l'huile est dominée par camphor, 1,8-cinéole, 4-terpinéol, *cis*-sabinène hydrate. Au contraire, viridiflorol n'a pas été trouvé dans l'huile extraite des feuilles et inflorescences de *T. algeriensis* collecté de Blida et El-Asnam (Algérie), ainsi l'étude a démontré que thymol est le constituant majeur (29.5%) à côté de terpinyl acetate, nerolidol, bornéol,  $\alpha$ -pinène, 4-

terpinéol, camphor et *p*-cymene (Hazzit et al., 2009). Notre huile essentielle est caractérisée par l'absence de thymol, alors que Dob et al. (2006) ont trouvé dans la partie aérienne de *T. algeriensis* collecté de Medea (Nord-central Algérie) que linalool (47.3%), qui a présenté un taux faible dans notre huile, thymol (29.2%) et *p*-cymene (6.8%) sont les composés majeurs. Nikolić et al. (2014) ont montré que thymol est le constituant principal (56.0%) suivi de carvacrol (14.0%) dans l'huile essentielle isolée des parties aériennes de *T. algeriensis* collecté de Zentan (Libya). En outre, les résultats obtenus par Amarti et al. (2010) ont montré que les majeurs composés de l'huile isolée des parties aériennes de *T. algeriensis* de Maroc sont camphor (27,7%),  $\alpha$ -pinène (20,5%),  $\alpha$ -thujène,  $\beta$ -pinène, 1,8-cinéole et une faible quantité de thymol (0.15%).

### 2.2. Analyse chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*

Quarante huit molécules ont été identifiées pour l'huile essentielle de *R. officinalis*, représentant 86.18% du total de l'essence. Ce taux est plus élevé que celui obtenu par Derwich et al. (2011) qui ont rapporté un total identifié de 65.61% de l'huile extraite des feuilles de *R. officinalis*. Selon les résultats obtenus par Zaouali et al. (2013), le taux le plus élevé a été observé au stade végétatif (87.3%) suivi de stade fructification (83.8%) et enfin le stade floraison (81.3%) en outre, la quantité des molécules identifiées varie suivant l'organe étudié (feuilles, fleurs, tiges).

Les composés majeurs détectés dans notre essence sont camphor (17.09%) suivi de *Z*- $\beta$ -ocimène (10.88%), isobornéol (9.68%),  $\alpha$ -bisabolol (7.89%), bornéol (5.11%), *trans* caryophyllène (4.40%) et  $\alpha$ -terpinéol (4.03%) (Tableau 3). L'huile essentielle de *R. officinalis* est caractérisée par l'absence de 1,8-cinéole,  $\beta$ -caryophyllène et la présence d'une faible quantité de caryophyllène oxide,  $\alpha$ -pinène, camphène, bornyl acetate,  $\delta$ -cadinène et myrcène ; molécules identifiées comme constituants majeurs dans plusieurs études : 1,8-cinéole

(40.0%), camphor (17.9%),  $\alpha$ -pinène (18.25%),  $\beta$ -pinène (4.58%), camphène (11.8%), caryophyllène oxide (11.4%),  $\beta$ -caryophyllène (16.68%), bornyl acetate (9.63%),  $\delta$ -cadinène (9.57%), myrcène (9.0%) (Zaouali et al., 2010; Derwich et al., 2011; Laborda et al., 2013; Zaouali et al., 2013). Contrairement à nos résultats, Z- $\beta$ -Ocimène, isobornéol n'ont pas été identifiés par les études précédentes et  $\alpha$ -bisabolol a été détecté en très faible quantité.

Les différences détectées entre le profile chimique de l'huile de *T. algeriensis* et *R. officinalis* et celui des autres huiles chez les mêmes espèces peuvent être attribuées à l'origine géographique de l'espèce, les conditions environnementales (climatiques et variations des sols), stade de développement et/ou saison au cours de la collecte et organe végétatif utilisé pour l'hydrodistillation.

### 2.3. Analyse chimique de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*

Concernant *S. officinalis*, 33 molécules ont été identifiées, représentant 74.32% du total de l'huile essentielle. Les composés majeurs sont  $\beta$ -thujone (16.44%) suivi de viridiflorol (10.93%), camphor (8.99%), 1,8-cinéole (8.11%), *trans*-caryophyllène (5.85%) et  $\alpha$ -humulène (4.69%). Caryophyllène oxide (3.72%),  $\alpha$ -thujone (3.62%) et bornéol (3.13%) ont relativement présenté de faibles concentrations (Tableau 4).

Nos résultats s'accordent avec plusieurs études, notamment en ce qui concerne les constituants principales ( $\alpha$ -thujone,  $\beta$ -thujone, camphor, 1,8-cinéole, bornéol et  $\alpha$ -humulène) (Longaray Delamare et al., 2007; Pinto et al., 2007; Hayouni et al., 2008; Glisic et al., 2010; Laborda et al., 2013). Notre huile contient un taux élevé de viridiflorol, cela concorde avec les résultats de Radulescu et al.(2004) qui ont obtenu un taux de 11.71% de cette molécule.

1-octen-3-ol,  $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -pinène, camphène ont présenté des taux faibles dans notre étude mais ont été caractérisés par des concentrations plus élevées dans d'autres travaux (Radulescu et al., 2004; Longaray Delamare et al., 2007; Pinto et al., 2007; Hayouni et al., 2008; Laborda

et al., 2013). De plus,  $\beta$ -elemène,  $\delta$ -Gurjunène n'ont pas été trouvés dans notre échantillon mais ils ont montré des quantités élevées chez d'autres *S. officinalis* de Brésil et Tunisie (Longaray Delamare et al., 2007; Hayouni et al., 2008).

La composition chimique des huiles essentielles des espèces de *Salvia* est influencée par le facteur génétique et environnemental (Cardile et al., 2009), la saison (Kamatou et al., 2008), les conditions agronomiques, le stade de développement, le moment de collecte et la méthode d'extraction (Laborda et al., 2013). Ainsi, la concentration des molécules de l'huile essentielle de *S. officinalis* varie suivant l'origine géographique, la partie de la plante utilisée pour l'hydrodistillation et la méthode d'extraction (Glisic et al., 2010).

Au cours de notre expérimentation concernant l'extraction des huiles essentielles durant les années (2010-2013), le *M. vulgare* n'a pas montré la présence des huiles essentielles. Cela peut être expliqué par le facteur génétique, la région géographique, les conditions pédoclimatiques, ainsi l'utilisation de nouvelles techniques d'extraction peut augmenter le rendement des huiles essentielles extraites chez le marrube blanc comme l'extraction au moyen de dioxyde de carbone liquide à basse température et sous haute pression ou l'extraction assistée par ultrasons ou micro-ondes.

**Tableau 2.** Composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus algeriensis*.

N°	Composés	Pourcentage %	Indice de rétention IR
1	Heptane	2,54	700
2	$\alpha$ -Pinene	0,14	935
3	Camphene	0,12	950
4	$\beta$ -Pinene	0,13	978
5	1,8-Cineole	6,00	1036
6	Cis-sabinene hydrate	1,34	1070
7	Linalool	3,93	1109
8	Thujone	0,92	1118
9	Camphor	13,62	1157
10	Pinocarvone	0,76	1167
11	Borneol	5,74	1178
12	4 Terpineol	1,35	1183
13	$\alpha$ -Terpineol	3,80	1200
14	Myrtenol	0,85	1204
15	Verbenone	1,88	1217
16	<i>trans</i> -Carveol	0,89	1224
17	Isobornyl acetate	1,61	1285
18	Para cymene-7-ol	0,41	1293
19	Caryophyllene	0,34	1415
20	Aromadendrene	1,03	1458
21	$\alpha$ -Amorphene	0,17	1471
22	Germacerene D	0,12	1478
23	$\alpha$ -Muralene	0,45	1494
24	$\gamma$ -Cadinene	0,49	1510
25	Endobourbananol	0,99	1516
26	Caryophyllene oxide	3,50	1592
27	Veridiflorol	4,00	1606
28	Ledol	1,26	1615
29	Humulene oxide	0,56	1620
30	$\alpha$ -Copene	0,52	1624
31	Tau cadinol	2,25	1652
32	$\beta$ -Fudesmol	1,21	1664
33	$\alpha$ -Cadinol	2,27	1668
34	Cis-z- $\alpha$ -Bisabolene epoxide	2,55	1833
35	Iso spathulenol	0,29	1866
36	$\beta$ -Qulopenane	0,47	1965

**Tableau 3.** Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.

N°	Composés	Pourcentage %	Indice de rétention IR
1	$\alpha$ -Pinene	0,71	935
2	Camphene	1,22	950
3	$\beta$ -Pinene	1,06	979
4	1-Octene-3-ol	0,21	984
5	p-Myrcene	0,40	991
6	$\alpha$ -Phellandrene	0,11	1006
7	$\delta$ -3-Carene	0,04	1011
8	$\alpha$ -Terpinene	0,23	1018
9	$\beta$ -Ocimene Z	10,88	1038
10	$\gamma$ -Terpinene	0,53	1059
11	Cis hydrate sabinene	0,49	1070
12	Terpinolene	0,52	1087
13	$\alpha$ -Thujone	1,19	1118
14	Camphor	17,09	1158
15	Isoborneol	9,68	1164
16	Pinocarvone	0,14	1169
17	Borneol	5,11	1177
18	L Terpinol	2,97	1185
19	$\alpha$ -Terpinol	4,03	1199
20	Myrtenol	0,28	1202
21	Trans Carveol	0,25	1222
22	Bronyl acetate	1,79	1284
23	Thymol	0,56	1289
24	Carvacrol	0,25	1299
25	$\alpha$ -Cubebene	0,26	1344
26	Eugerol	0,40	1356
27	$\alpha$ -Ylangene	0,26	1367
28	$\alpha$ -Copaene	0,81	1372
29	$\beta$ -Bourbonene	0,15	1380
30	$\beta$ -Cubebene	0,12	1384
31	Methyl egerol	0,29	1399
32	Trans caryophyllene	4,40	1420
33	$\alpha$ -Humulene	0,69	1450
34	Germacrene D	0,23	1478
35	$\beta$ -Bisabolene	0,52	1502
36	$\gamma$ -Cadinene	1,01	1511
37	$\delta$ -Cadinene	2,17	1521
38	Cadinen 1,4-diene	0,26	1529
39	Cis- $\alpha$ -Bisabolene	0,41	1534

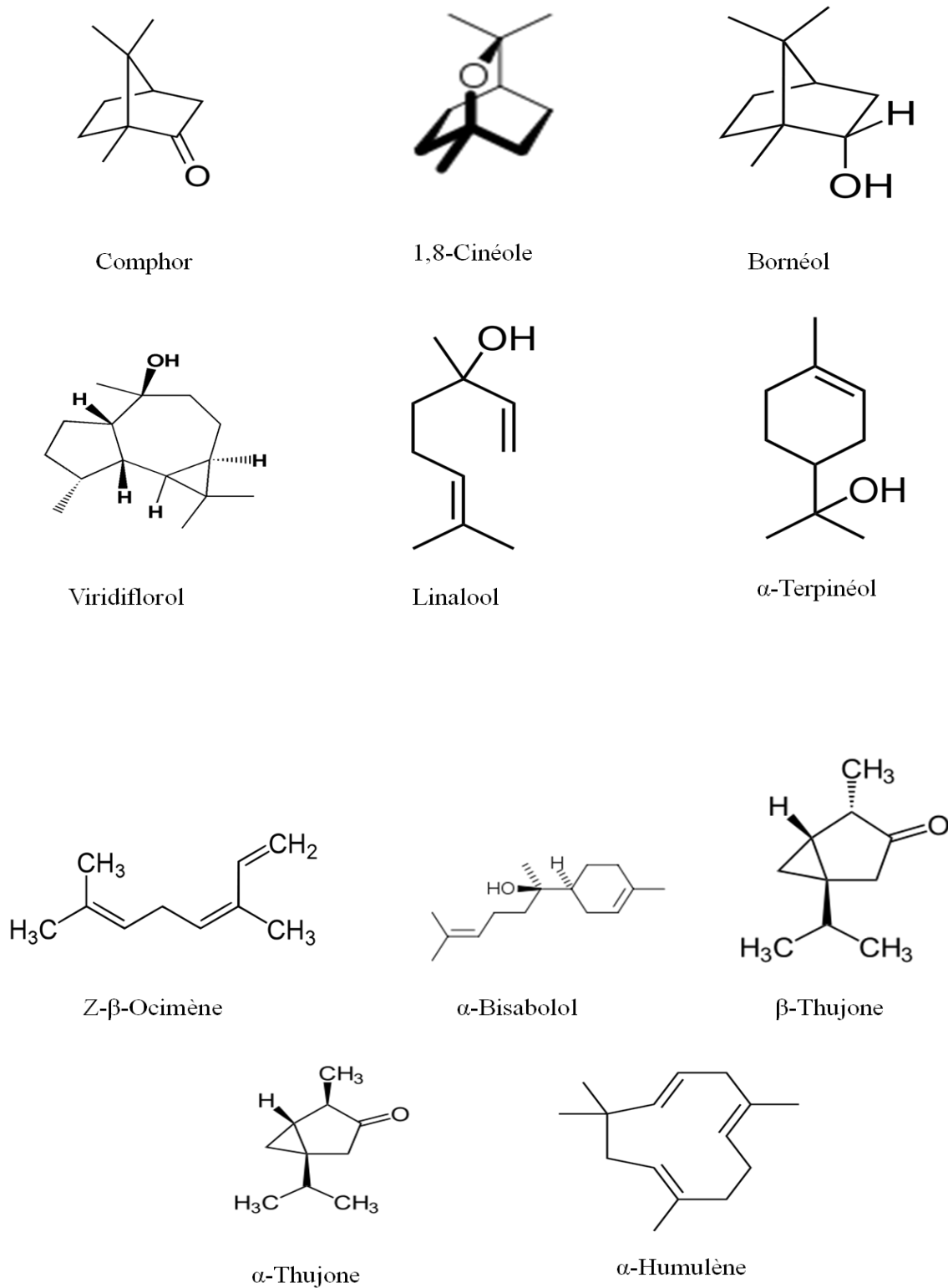
## Résultats et discussion

---

40	$\alpha$ -Calacarene	0,29	1540
41	Caryophyllene oxide	2,19	1585
42	Tau cadinol	1,03	1645
43	Methyl jasmonate	0,87	1652
44	$\alpha$ -Cadinol	0,97	1661
45	$\beta$ -Bisabolol	0,31	1675
46	$\alpha$ -Bisabolol	7,89	1699
47	$\alpha$ -Santalol	0,32	1704
48	$\alpha$ -Sinensol	0,34	1763

**Tableau 4.** Composition chimique de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*.

N°	Composés	Pourcentage %	Indice de rétention
1	Heptane	0.17	700
2	$\alpha$ -Pinene	0.19	935
3	Camphene	0.17	950
4	$\beta$ -Pinene	0.18	978
5	Octene-3-ol	0.17	983
6	$\beta$ -Myrcene	0.23	991
7	1,8-Cineole	8.11	1036
8	$\beta$ -Ocimene	0.03	1047
9	$\gamma$ -Terpinene	0.14	1058
10	Cis sabinene hydrate	0.09	1070
11	$\alpha$ -Thujone	3.62	1109
12	$\beta$ -Thujone	16.44	1131
13	Camphor	8.99	1160
14	Borneol	3.13	1175
15	Terpineol	1.44	1183
16	$\alpha$ -Terpinol	0.64	1194
17	Myrtenol	0.61	1200
18	Trans carveol	0.13	1221
19	Pulegone	0.36	1240
20	Bornyl acetate	1.86	1285
21	Sabinyl acetate	0.50	1288
22	Thymol	0.12	1297
23	Carvacrol	0.36	1306
24	Myrtenyl acetate	0.24	1321
25	Piperitenone oxide	0.21	1364
26	$\beta$ -Bourbanene	0.18	1380
27	Caryophyllene trans	5.85	1421
28	$\alpha$ -Humulene	4.69	1455
29	Aromadendrene	0.20	1459
30	Germacerene D	0.17	1471
31	Cis calamenene	0.32	1519
32	Caryophyllene oxide	3.72	1593
33	Viridiflorol	10.93	1612



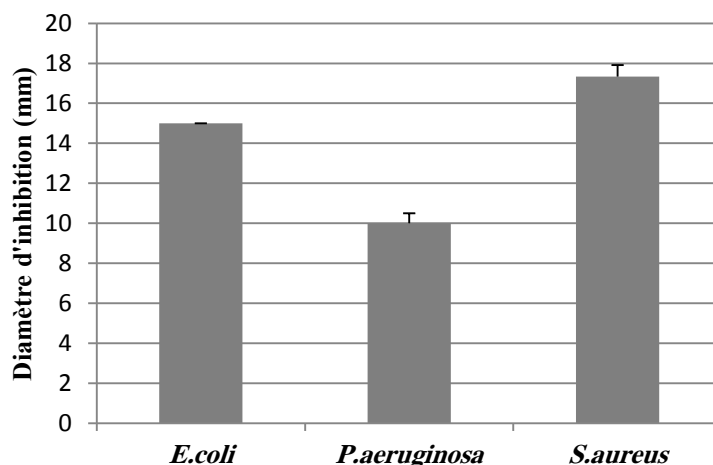
**Figure 4:** Composés chimiques majeurs des HE de *T. algeriensis*, *R. officinalis* et *S. officinalis*

### 3. Activité antibactérienne des huiles essentielles

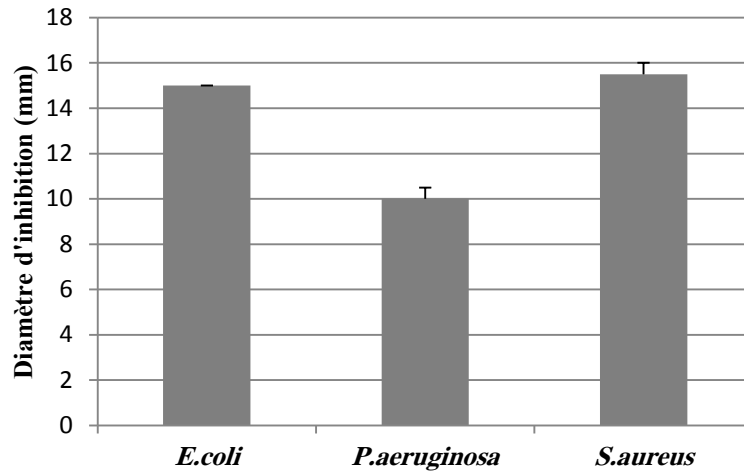
#### 3.1. Méthode de diffusion sur disques

L'activité antibactérienne des trois huiles essentielles extraites de *T. algeriensis*, *R. officinalis* et *S. officinalis* évaluée *in vitro* vis-à-vis de trois souches bactériennes par la méthode de diffusion de disques a montré que les trois essences ont exercé différents effets antibactériens envers les bactéries testées.

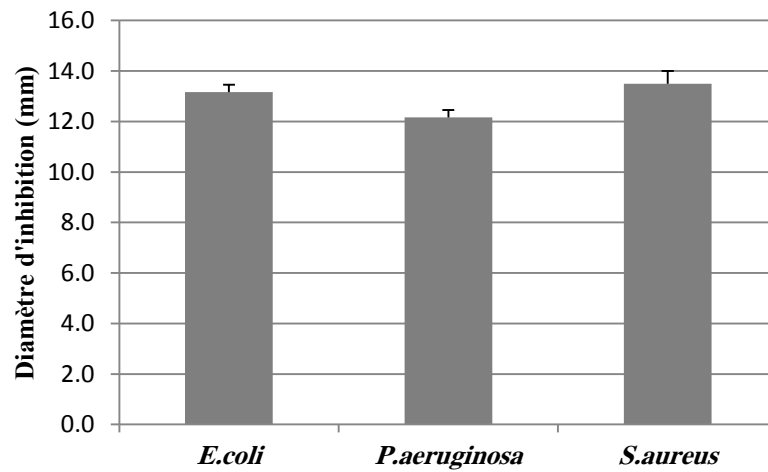
La méthode de diffusion de disques a montré que l'huile essentielle de *T. algeriensis* et *S. officinalis* ont présenté des diamètres d'inhibition élevés vis-à-vis de *S. aureus* ( $17.3 \pm 0.58$ ,  $15.5 \pm 0.50$  mm) respectivement et le même diamètre d'inhibition envers *E. coli* ( $15 \pm 0.00$  mm). Alors que ces deux essences ont enregistré un diamètre d'inhibition faible envers *P. aeruginosa* ( $10 \pm 0.50$  mm). L'huile de *R. officinalis* a présenté des zones d'inhibition moyennes vis-à-vis de *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa* ( $13.5 \pm 0.50$ ,  $13.1 \pm 0.29$ ,  $12.1 \pm 0.29$  mm) respectivement (Figure 5, 6, 7).



**Figure 5:** Effet antibactérien de l'huile essentielle de *T. algeriensis* sur les trois souches bactériennes testées



**Figure 6:** Effet antibactérien de l'huile essentielle de *S. officinalis* sur les trois souches bactériennes testées



**Figure 7:** Effet antibactérien de l'huile essentielle de *R. officinalis* sur les trois souches bactériennes testées

### 3.2. Concentration minimale inhibitrice (CMI)

Pour confirmer les effets d'inhibition de croissance exercés par les trois huiles essentielles à partir des diamètres d'inhibition, la concentration minimale inhibitrice a été déterminée. Les valeurs de CMI obtenues peuvent être classifiées selon les niveaux standards de CMI établis par Aligiannis et al. (2001) (inhibiteurs puissants : CMI jusqu'à 500 µg/ml, inhibiteurs moyens : CMI entre 600 et 1500 µg/ml, inhibiteurs faibles : CMI à partir de 1600 µg/ml). L'huile de *T. algeriensis* et *S. officinalis* ont exercé un effet très fort envers *Staphylococcus aureus* à une faible CMI (0.20 mg/ml). L'huile de *T. algeriensis* a présenté une faible activité vis-à-vis de *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* à des valeurs élevées de CMI (2.5, 1.66 mg/ml) respectivement. L'essence de *S. officinalis* a aussi présenté un faible effet envers *Escherichia coli* à une CMI de (1.66 mg/ml). En outre, cette huile s'est montrée inactive envers *Pseudomonas aeruginosa* (CMI > 3.33 mg/ml). L'huile de *R. officinalis* a présenté une très faible activité inhibitrice vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* avec une CMI élevée (3.33 mg/ml). De plus, cette essence apparaît inactive à l'égard de *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (CMI > 3.33 mg/ml).

Nos résultats de l'activité antibactérienne sont relativement en accord avec plusieurs recherches en particulier en ce qui concerne la résistance de *P. aeruginosa* vis-à-vis des trois huiles testées.

Il a été rapporté que l'huile essentielle extraite de *T. algeriensis* ne s'est pas montrée active ou a exercé un effet faible sur *S. aureus* CFSA2, un isolat environnemental, qui s'est montré résistant à cette essence avec un diamètre d'inhibition faible (9.33 mm). En outre, un échantillon de la même espèce médicinale contenant le thymol comme composé majeur est plus active qu'une huile caractérisée par la présence d'une faible quantité ou trace de ce composé phénolique (Hazzit et al., 2009).

Zouari et al. (2011) ont montré que l'huile de *T. algeriensis* a exercé des zones d'inhibition moyennes (14 et 14.5 mm) et des concentrations minimales inhibitrices (CMI) élevées sur *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, de plus les bactéries Gram positives ont été trouvées plus sensibles à l'huile de *T. algeriensis* que les bactéries Gram négatives. Nikolić et al. (2014) ont observé que l'essence de *T. algeriensis* a présenté un effet antibactérien similaire sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Pseudomonas aeruginosa* (IBR P001), un clinique isolat d'oreille, à la même CMI (80 µg/ml).

Selon ces auteurs, l'activité antimicrobienne des huiles extraites des espèces appartenant au genre *Thymus* est liée à la présence d'un taux élevé de thymol mais qui n'est pas le seul composé responsable de l'effet antimicrobien ; le rôle des constituants moins abondants doit être pris en considération. Plusieurs recherches ont montré que l'effet antimicrobien puissant des essences des espèces de *Thymus* est en relation avec leur teneur élevée en thymol et carvacrol (Giordani et al., 2008; Hazzit et al., 2009; Ruiz-Navajas et al., 2012). Ainsi, carvacrol est un inhibiteur antimicrobien plus puissant que camphor et 1,8-cinéole mais le type de la souche bactérienne exerce aussi son influence sur l'effectivité de l'huile essentielle testée (Ruiz-Navajas et al., 2012).

Longaray Delamare et al. (2007) ont trouvé que l'huile essentielle de *S. officinalis* a exercé un effet très faible sur *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, cela ne concorde pas avec nos résultats et peut être attribué au type des souches bactériennes testées. Mais *Pseudomonas aeruginosa* s'est montrée toujours résistante selon ces auteurs. Nos résultats concernant les diamètres de la zone d'inhibition et les CMI ne sont pas complètement en accord avec ceux publiés par Hayouni et al. (2008) qui ont montré que l'essence de *S. officinalis* n'est pas active vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et a exercé une forte activité envers *E. coli* ATCC 25922, alors que *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 s'est montrée la plus résistante.

L'activité antimicrobienne de l'huile de *S. officinalis* peut être essentiellement attribuée à la présence de concentrations élevées de camphor, 1,8-cinéole,  $\alpha$ -thujone et  $\beta$ -thujone (Radulescu et al., 2004; Longaray Delamare et al., 2007). Plusieurs études ont confirmé que les bactéries Gram positives comme *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 sont plus sensibles aux huiles des espèces du genre *Salvia* que les bactéries Gram négatives comme *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Kamatou et al., 2007; Cardile et al., 2009; Tenore et al., 2011).

Nos résultats concernant l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *R. officinalis*, estimée par le diamètre d'inhibition, ne sont pas complètement en concordance avec multiples travaux. Zaouali et al. (2010) ont observé une forte activité de l'huile de *R. officinalis* vis-à-vis de *E. coli* ATCC 10536 avec des zones d'inhibition importantes (18 mm) et des activités moyennes vis-à-vis de *S. aureus* ATCC 6538 (14 mm), alors que *P. aeruginosa* ATCC 9027 s'est montrée résistante ou a présenté des zones d'inhibition très faibles (7.5 mm). Derwich et al. (2011) ont observé des effets moyens envers *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* et selon leurs résultats, l'efficacité de l'huile de *R. officinalis* a été attribuée au composé majeur  $\alpha$ -pinène. Quelques études ont expliqué l'activité de cette essence vis-à-vis des bactéries Gram positives et Gram négatives par la présence d'une concentration élevée de  $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -pinène et 1,8-cinéole (Sivropoulou et al., 1997; Moghtader et Afzali, 2009).

Les activités biologiques des huiles essentielles sont généralement liées à leur profil chimique et leur potentiel à inhiber la croissance microbienne peut être partiellement expliqué par la variation de leur composition chimique (Kamatou et al., 2007).

Les huiles essentielles sont constituées d'un mélange complexe de molécules différentes et la détermination des constituants responsables de l'activité antimicrobienne est

difficile (Hazzit et al., 2009). En réalité, l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est le plus souvent attribuée à leurs composés majeurs, mais plusieurs recherches ont suggéré que l'effet synergique et antagoniste des composés majeurs et mineurs doit être pris en considération pour expliquer leurs activités biologiques (Burt, 2004; Longaray Delamare et al., 2007; Zouari et al., 2011; Ben Mansour et al., 2013).

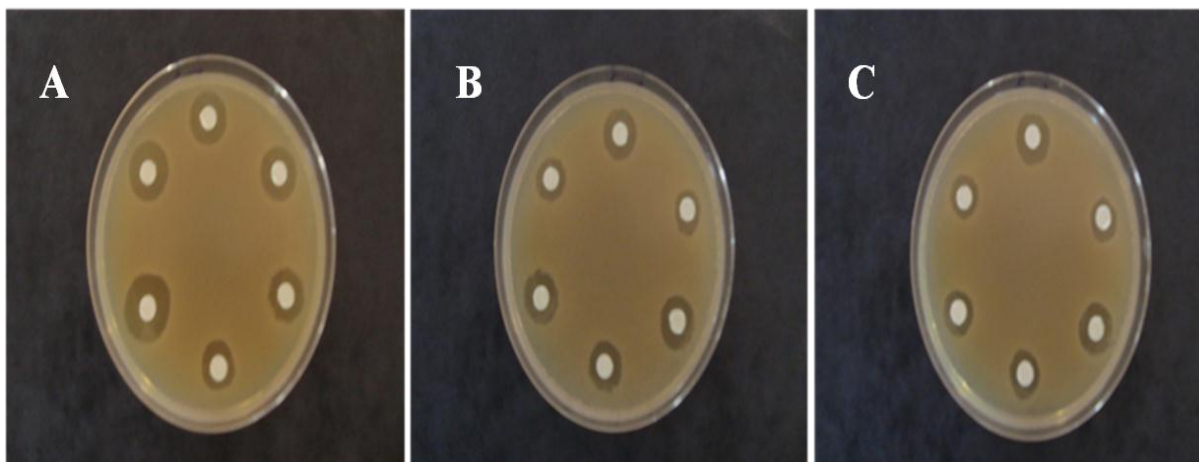
Il a été fréquemment rapporté que les bactéries Gram négatives sont moins sensibles que les bactéries Gram positives aux huiles essentielles et leurs composés (Cardile et al., 2009; Tenore et al., 2011; Ben Mansour et al., 2013). Cette susceptibilité différentielle à l'effet des huiles essentielles a été attribuée à la présence d'une paroi cellulaire lipopolysaccharide, chez le groupe Gram négatif, qui limite la diffusion des molécules hydrophobes et empêche leur pénétration à la cellule bactérienne (Burt, 2004; Ruiz-Navajas et al., 2012).

La résistance des bactéries Gram négatives vis-à-vis de l'effet des huiles essentielles est due à la présence d'une paroi lipopolysaccharide (Nikaido et Vaara, 1985). L'absence de cette barrière chez les bactéries Gram positives permet un contact direct des constituants hydrophobes des huiles essentielles et la bicouche phospholipidique de la membrane cytoplasmique ce qui permet leur solubilisation dans la membrane et provoque une déformation de sa structure et une augmentation de sa perméabilité. Ces modifications entraînent une fuite d'ions et des constituants intracellulaires et des troubles dans le système enzymatique chez la bactérie testée (Wendakoon et Sakaguchi, 1995 ; Cowan, 1999).

Cependant Burt (2004) a rapporté que les bactéries Gram+ ne sont pas souvent plus sensibles à l'action des huiles. L'inhibition exercée par les huiles essentielles sur les bactéries peut être attribuée à plusieurs facteurs comme le type des constituants chimiques de l'essence et leurs quantités, le type du microorganisme testé, la solubilité de l'huile ou non dans le milieu de culture, le facteur génétique de l'espèce végétale et son origine géographique et les

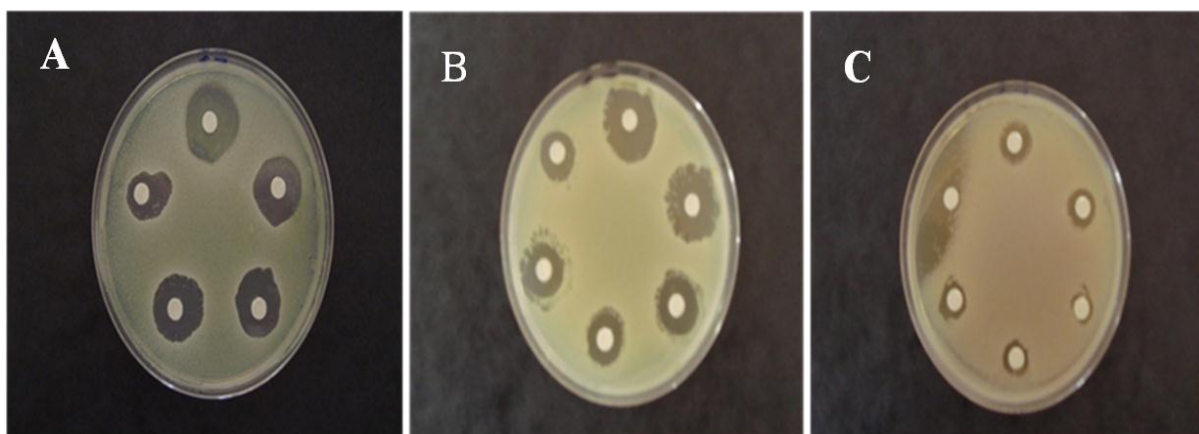
variations de la susceptibilité des souches bactériennes envers les huiles essentielles appliquées (Pattnaik et al., 1997 ; Marino et al., 2001; Hayouni et al., 2007 ; Longaray Delamare et al; 2007).

Le potentiel antibactérien des huiles essentielles isolées de différentes espèces végétales a été largement étudié mais le mécanisme d'action des essences n'a pas été élucidé de façon détaillée. A cause du nombre élevé de composés chimiques entrant dans la composition des huiles essentielles, l'activité antibactérienne ne peut pas être expliquée par un seul mode d'action mais il y a plusieurs mécanismes qui agissent au sein de la cellule bactérienne (Burt, 2004).



**Photo 6 : Effet des HE de *T. algeriensis*, *S. officinalis* et *R. officinalis* sur la croissance de *E. coli*.**

(A) : Effet de HE de *T. algeriensis*, (B) : Effet de HE de *S. officinalis*, (C) : Effet de HE de *R. officinalis* (Photo S. Mehalaine)



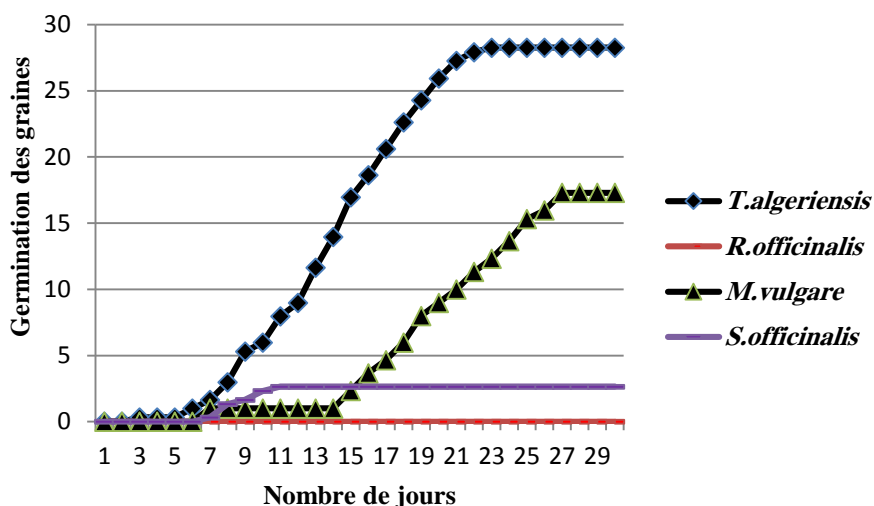
**Photo 7: Effet des HE de *T. algeriensis*, *S. officinalis* et *R. officinalis* sur la croissance de *S. aureus***

(A) : Effet de HE de *T. algeriensis*, (B) : Effet de HE de *S. officinalis*, (C) : Effet de HE de *R. officinalis* (Photo S. Mehalaine)

#### 4. Germination *in vitro* des graines

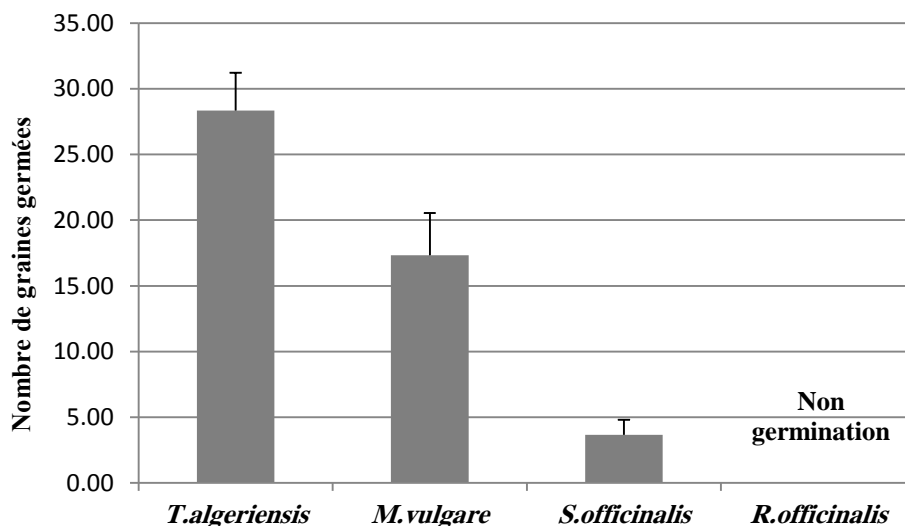
##### 4.1. Expérimentation 01 : Test préliminaire de germination

La figure 8 illustre le dynamique de germination des graines des quatre plantes. La courbe de germination de *T. algeriensis*, *M. vulgare* et *S. officinalis* décrit trois phase importantes. Une première phase de latence qui correspond à l'imbibition des graines ; cette phase est très courte (deux jours) pour *T. algeriensis* mais s'est montrée longue (six jours) pour *M. vulgare* et *S. officinalis*. Une deuxième phase exponentielle correspondant à une accélération de la germination, qui a commencé au 15<sup>ème</sup> jour pour *M. vulgare* et au 6<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jour pour *T. algeriensis* et *S. officinalis* respectivement. La troisième phase est stationnaire correspondant à un arrêt de la germination et à la constance du nombre de graines germées après l'obtention du maximum de la capacité germinative au 11<sup>ème</sup>, 23<sup>ème</sup> et 27<sup>ème</sup> jour pour *S. officinalis*, *T. algeriensis* et *M. vulgare* respectivement. La courbe de germination a montré aussi une phase notable correspondant à un arrêt de la germination entre le début de ce processus et la phase ascendante ; cette phase est courte (deux jours) pour *T. algeriensis* alors que chez *M. vulgare* elle est relativement longue et a duré six jours. Au contraire, cette phase n'a pas été observée chez les graines de *S. officinalis*. Cette fluctuation caractérisant le dynamique de germination peut être attribuée aux caractéristiques des téguments des graines testées. Au cours de notre manipulation des graines, nous avons observé que l'enveloppe des graines de *M. vulgare* est très dure contrairement à celle des graines de *T. algeriensis* et *S. officinalis*. Cela peut réduire la vitesse de pénétration de l'eau et l'imbibition des graines de *M. vulgare*.



**Figure 8 :** Courbe de germination des graines des quatre plantes étudiées

En outre, les résultats obtenus ont montré que *T. algeriensis* a présenté un nombre élevé de graines germées ( $28.33 \pm 2.89$ ) suivi de *M. vulgare* ( $17.33 \pm 3.21$ ) et *S. officinalis* ( $3.67 \pm 1.15$ ) ce qui correspond à des taux de germination de 94.43%, 57.76% et 12.23% respectivement. Au contraire, les graines de *R. officinalis* n'ont pas germé (Figure 9).



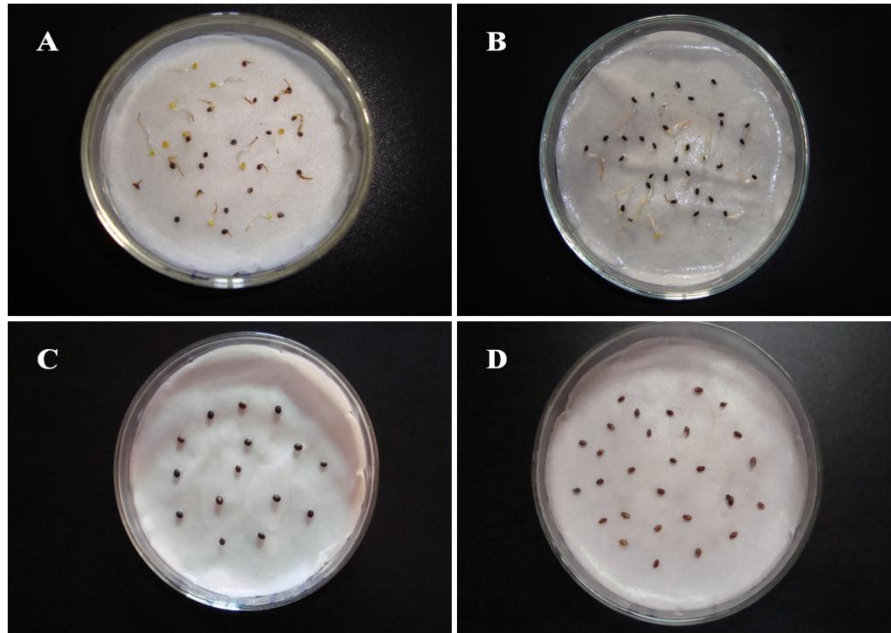
**Figure 9:** Nombre de graines germées chez les quatre plantes étudiées

#### 4.2. Expérimentation 02 : Effet de l'acide gibbérellique (GA<sub>3</sub>)

Le traitement des graines par l'acide gibbérellique n'a présenté aucun effet significatif sur le nombre de graines germées chez les quatre espèces médicinales ( $P > 0.05$ ) (Annexe 1). *T. algeriensis* a présenté un nombre de graines germées élevé chez le témoin ( $8 \pm 1.73$ ) et  $10 \pm 0.00$  chez les trois doses de la GA<sub>3</sub> ce qui correspond à des taux de 80 et 100% respectivement. *M. vulgare* a présenté un nombre de graines germées entre  $5.33 \pm 1.53$  et  $8.67 \pm 0.58$  ce qui correspond à des taux de 53.30 et 86.70%. *R. officinalis* a montré un nombre très faible, dans l'ordre de  $0.33 \pm 0.58$  et  $1.67 \pm 0.58$  avec des taux de 3.30 et 16.70% . Au contraire, les graines de *S. officinalis* n'ont pas germé (Tableau 5).

**Tableau 5.** Effet de la GA<sub>3</sub> sur le nombre de graines germées de *T. algeriensis*, *R. officinalis*, *M. vulgare* et *S. officinalis*. (%) : taux de germination.

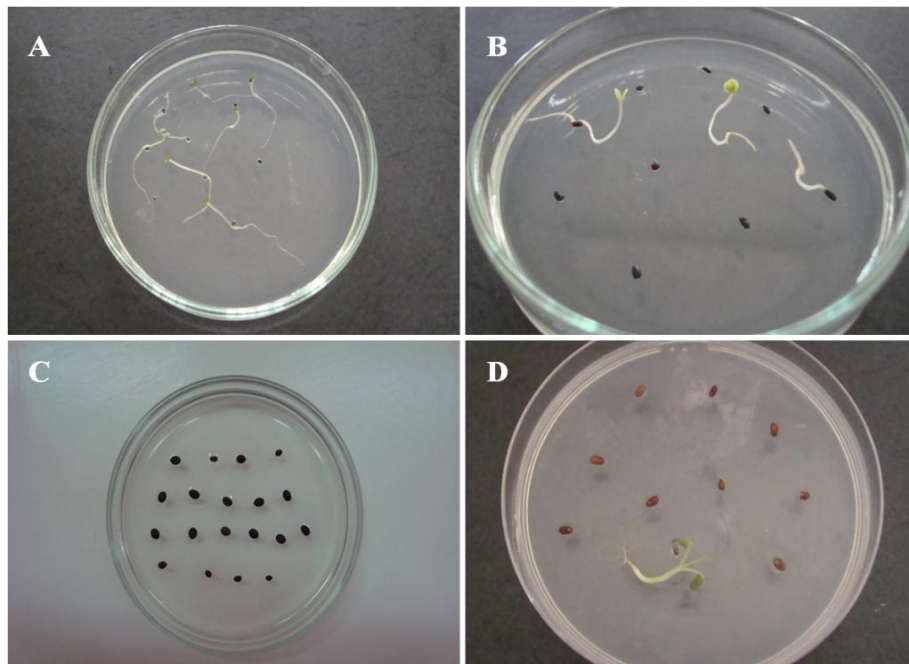
Plante	Doses de la GA <sub>3</sub>			
	Témoin	125 mg/L	250 mg/L	500 mg/L
<i>T. algeriensis</i> %	$8 \pm 1.73$ 80	$10 \pm 0.00$ 100	$10 \pm 0.00$ 100	$10 \pm 0.00$ 100
<i>R. officinalis</i> %	$0.33 \pm 0.58$ 3.30	$0.33 \pm 0.58$ 3.30	$1.67 \pm 0.58$ 16.70	$0.67 \pm 0.58$ 6.70
<i>M. vulgare</i> %	$5.33 \pm 1.53$ 53.30	$7.33 \pm 2.08$ 73.30	$7.33 \pm 0.58$ 73.30	$8.67 \pm 0.58$ 86.70
<i>S. officinalis</i> %	-	-	-	-



**Photo 8 : Expérimentation 01 : Test préliminaire de germination**

(A) : *T. algeriensis*, (B) : *M. vulgare*, (C) : *S. officinalis*, (D): *R. officinalis*

(Photo S. Mehalaine)



**Photo 9 : Expérimentation 02 : Effet de l'acide gibbérellique (GA<sub>3</sub>)**

(A) : *T. algeriensis*, (B) : *M. vulgare*, (C) : *S. officinalis*, (D): *R. officinalis*

(Photo S. Mehalaine)

Les résultats obtenus du test préliminaire indiquent que les graines de *T. algeriensis* et *M. vulgare* sont capables de germer dans les conditions ambiantes sans prétraitement. Et les résultats obtenus de l'expérimentation 2 montrent que le traitement par la GA<sub>3</sub> n'a exercé aucun effet pour améliorer le nombre des graines germées chez ces deux espèces. Donc à partir des résultats obtenus des deux expérimentations et selon Baskin et Baskin (2004), nous pouvons constater que nos graines testées ne sont pas dormantes. Cela peut être attribué à l'action de l'acide gibbérellique endogène et aux conditions expérimentales qui apparaissent favorables à induire la germination chez *T. algeriensis* et *M. vulgare*.

Au cours de la germination, les graines absorbent l'eau qui induit l'expansion et l'élongation de l'embryon ce qui provoque la sortie de la radicule (Hermann et al., 2007). De plus, l'embryon est la source de l'acide gibbérellique et en présence de la couche aleurone dans la périphérie de l'albumen, l'acide gibbérellique stimule la production de  $\alpha$ -amylase, enzyme responsable de l'hydrolyse des nutriments nécessaires pour la croissance de l'embryon et le développement des plantules (Hamman et al., 2003; Hopkins, 2003).

La non germination ou le très faible taux de germination marqués chez les graines de *R. officinalis* et *S. officinalis* au cours des deux expérimentations indiquent que ces graines ne sont pas capables de germer sous les conditions expérimentales appliquées. Cela peut être du au type de dormance et au différentes interactions entre les hormones de croissance endogènes et la GA<sub>3</sub> exogène utilisée.

La dormance est un mécanisme qui permet aux graines d'inhiber leur germination pour la synchroniser avec les conditions favorables (dormance secondaire) (Baskin et Baskin, 1998; Finkelstein et al., 2008). Alors que la dormance primaire est provoquée par l'effet de l'acide abscissique pendant le développement de la graine (Bewley, 1997). A partir des résultats obtenus, les graines de *R. officinalis* et *S. officinalis* peuvent contenir une quantité suffisante de l'acide abscissique capable de garder la dormance primaire chez ces graines.

Les gibbérellines sont nécessaires pour la germination des graines en provoquant l'épuisement de l'endosperme et l'élongation des cellules embryonnaires (Miransari et Smith, 2014). Dissanayake et al. (2010) ont rapporté que la GA<sub>3</sub> a induit la germination et a levé la dormance chez les graines de *Parthenium argentatum* mais l'application de l'acide abscissique a presque empêché leur germination. L'acide abscissique peut totalement exercer l'effet inverse de celui de l'acide gibbérellique et la dormance/germination est régulée par l'équilibre entre les promoteurs (gibbérellines) et inhibiteurs (acide abscissique).

D'après Graeber et al. (2010), l'effet inhibiteur de l'acide abscissique sur la germination des graines réside dans le retard de l'élongation de la radicule et l'épuisement de l'endosperme. De plus, l'excès de l'acide abscissique empêche l'expansion de l'embryon ce qui inhibe l'effet de la gibbérelline sur la croissance de la radicule et par conséquent la suppression de sa sortie au travers les téguments (Nonogaki, 2008).

D'un autre côté, les cytokinines sont capables de provoquer les divisions cellulaires (Miller et al., 1955). Selon Güleriyüz et al. (2011), la combinaison de la GA<sub>3</sub> et la Kinétine a entraîné la levée de la dormance et a augmenté le taux de germination chez les graines de *Stachys germanica*. En outre, la quantité élevée de l'acide abscissique contenue dans ces graines pouvait être uniquement diminuée par la combinaison de la GA<sub>3</sub> et la Kinétine.

Khan (1971) a rapporté que les gibbérellines induisent la germination mais ils ne peuvent pas exercer leur effet en présence de l'acide abscissique sauf s'il y a une quantité suffisante de la cytokinine. A cet effet, il apparaît qu'il y a une synergie entre les cytokinines et les gibbérellines pour la régulation de la dormance et la germination (Güleriyüz et al., 2011).

Parmi les facteurs extérieurs qui influent sur la germination des graines, la température. Selon Padilla et Encina (2003), les graines exigent une température appropriée pour les différents processus de la germination. Plusieurs recherches ont élucidé l'effet de la température sur la germination.

Padilla et Encina (2003) ont observé qu'une température élevée de (30 °C) s'est montrée adéquate pour améliorer le taux de germination chez les graines de *Annona cherimola*. Cependant, plusieurs études ont démontré que des températures entre (15 et 20 °C) ont levé la dormance et augmenté les taux de germination chez différentes espèces comme (*Myrsine parvifolia* et *Thymus lotocephalus*) (Coelho et al., 2012; Emamipoor et Maziah, 2014; Darrudi et al., 2015; Ribeiro et Costa, 2015). Ainsi, la soumission des graines à une stratification des températures basses est un moyen efficace pour lever la dormance chez plusieurs espèces notamment celles des régions tempérées (Baskin et Baskin, 1998).

Les concentrations de la GA<sub>3</sub> peuvent aussi affecter la germination des graines. Il a été rapporté que les concentrations optimales de la GA<sub>3</sub>, capables de lever la dormance, sont entre 250 et 500 ppm (Dissanayake et al., 2010; Güleriyüz et al., 2011; Darrudi et al., 2015). De plus, les doses de l'acide gibbérellique dépendent du niveau de la dormance (Dissanayake et al., 2010). A cet effet, nous pouvons suggérer que les doses de la GA<sub>3</sub> appliquées ne sont pas adéquates pour induire la germination chez *R. officinalis* et *S. officinalis*.

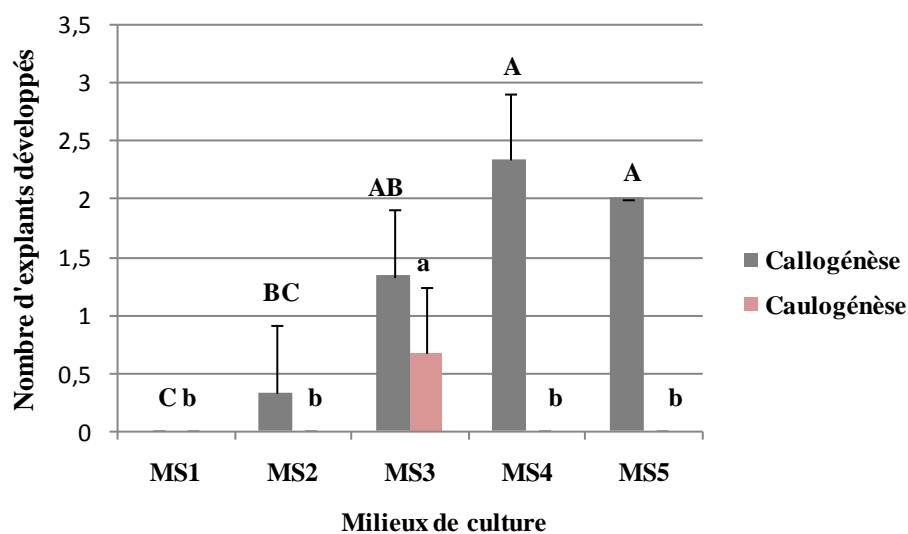
Un autre facteur important peut également être responsable de la non germination des graines de *R. officinalis* et *S. officinalis*; les caractéristiques des téguments des graines testées. Plusieurs études ont montré que les téguments durs empêchent la pénétration des régulateurs de croissance vers la graine et la scarification mécanique et chimique peut réduire l'action inhibitrice exercée par les enveloppes sur l'embryon et permettre l'entrée du traitement (Colin, 1985; Dissanayake et al., 2010; Ribeiro et Costa, 2015).

Par ailleurs, l'origine géographique des graines peut influencer leur germination (Urbanska et Schütz, 1986; Pérez-García et al., 2003; Güleriyüz et al., 2011) et l'examen de la capacité germinative doit être réalisé sur plusieurs populations de la même espèce végétale (Coelho et al., 2012).

## 5. Propagation *in vitro*

### 5.1. Propagation *in vitro* de *Thymus algeriensis*

La combinaison entre l'AIA et la Kinétine a présenté un effet significatif sur la formation des cals ( $P < 0.001$ ) et la caulogénèse ( $P < 0.05$ ) chez *T. algeriensis* (Annexe 2). L'induction de cals a été observée chez le milieu MS2 (2.5 mg/L AIA, 2.5 mg/L Kin) avec un faible développement ( $0.33 \pm 0.58$ ) et les meilleures formations de cals ont été observées chez le milieu MS4 (5 mg/L AIA, 5 mg/L Kin) ( $2.33 \pm 0.58$ ) et MS5 (5 mg/L AIA, 10 mg/L Kin) ( $2 \pm 0.00$ ) suivi du milieu MS3 (2.5 mg/L AIA, 5 mg/L Kin) ( $1.33 \pm 0.58$ ) ce qui correspond à des taux de réussite entre 3.30 et 23.30%. La caulogénèse a été induite uniquement par le milieu MS3 ( $0.67 \pm 0.58$ ) avec un taux de réussite de 6.70% (Figure 10).

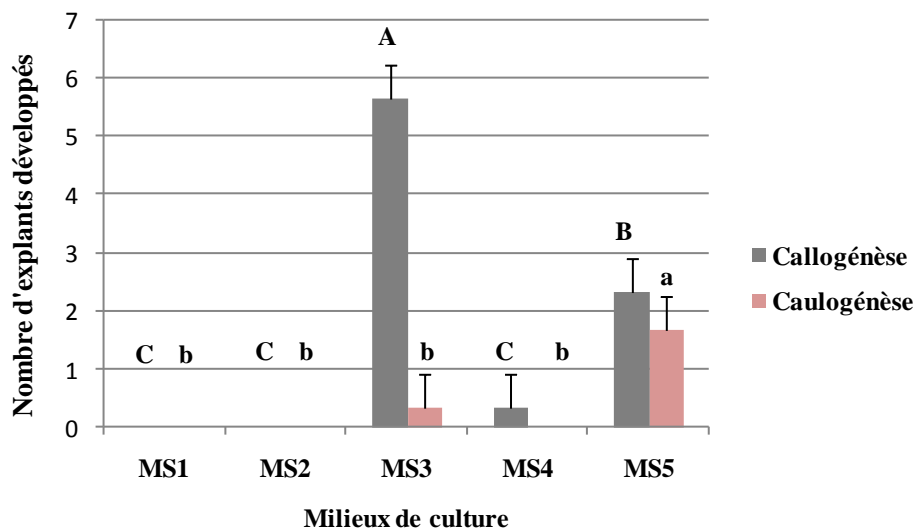


**Figure 10: Nombre d'explants formant des cals et caulogénèse chez *T. algeriensis***

Les barres verticales représentent l'écartype, les lettres majuscules représentent les groupes homogènes et hétérogènes pour la callogenèse, les lettres minuscules représentent les groupes homogènes et hétérogènes pour la caulogénèse selon le test de Tukey.

## 5.2. Propagation *in vitro* de *Rosmarinus officinalis*

La combinaison entre l'AIA et la Kinétine a exercé un effet significatif sur la callogénèse ( $P < 0.001$ ) et la caulogénèse ( $P < 0.001$ ) chez *R. officinalis* (Annexe 2). L'initiation de cals a été observée chez le milieu MS4 (5 mg/L AIA, 5 mg/L Kin) avec une valeur très faible ( $0.33 \pm 0.58$ ). Le milieu MS3 (2.5 mg/L AIA, 5 mg/L Kin) a présenté la meilleure formation de cals ( $5.67 \pm 0.58$ ) suivi du milieu MS5 (5 mg/L AIA, 10 mg/L Kin) ( $2.33 \pm 0.58$ ) ce qui correspond à des taux de réussite de 3.30, 56.70, 23.30% respectivement. La caulogénèse a été entraînée par le milieu MS3 ( $0.33 \pm 0.58$ ) et une formation plus élevée, de pousses feuillées, a été provoquée par le milieu MS5 ( $1.67 \pm 0.58$ ) avec des taux de réussite de (3.30, 16.70%) respectivement (Figure 11).

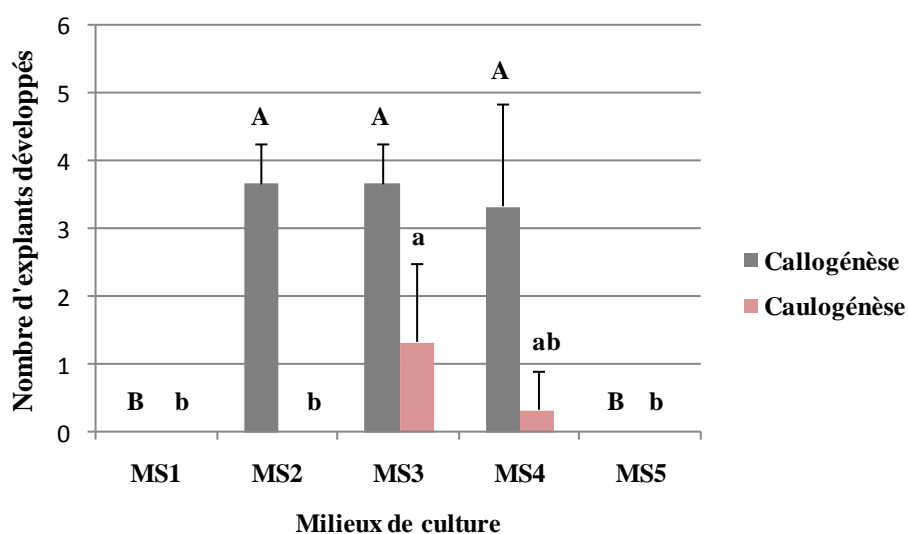


**Figure 11: Nombre d'explants formant des cals et caulogénèse chez *R. officinalis***

Les barres verticales représentent l'écartype, les lettres majuscules représentent les groupes homogènes et hétérogènes pour la callogénèse, les lettres minuscules représentent les groupes homogènes et hétérogènes pour la caulogénèse selon le test de Tukey.

### 5.3. Propagation *in vitro* de *Marrubium vulgare*

L'interaction entre l'AIA et la Kinétine a présenté un effet significatif sur la callogénèse ( $P < 0.001$ ) et la caulogénèse ( $P < 0.05$ ) chez *M. vulgare* (Annexe 2). L'induction de cals a été observée chez le milieu MS2 (2.5 mg/L AIA, 2.5 mg/L Kin), MS3 (2.5 mg/L AIA, 5 mg/L Kin) et MS4 (5 mg/L AIA, 5 mg/L Kin) avec les meilleures formations de cals ( $3.67 \pm 0.58$ ) et ( $3.33 \pm 1.53$ ) ce qui correspond à des taux de réussite de 36.70 et 33.30% respectivement. L'initiation de la caulogénèse a été marquée chez le milieu MS4 avec une faible formation de pousses ( $0.33 \pm 0.58$ ) et avec une formation plus élevée chez le milieu MS3 ( $1.33 \pm 1.15$ ) ce qui correspond à des taux de réussite de 3.30 et 13.30% respectivement (Figure 12).

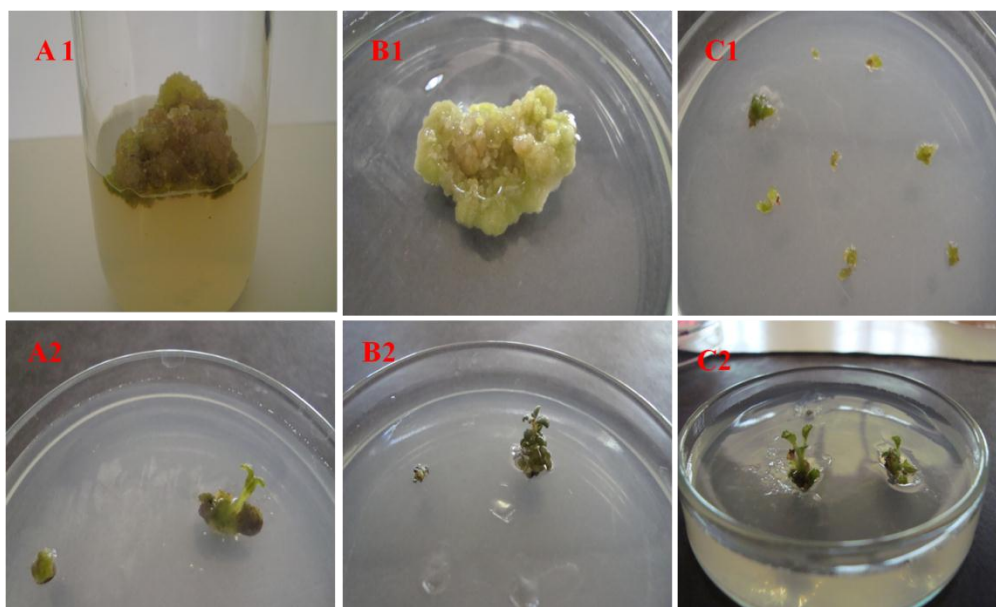


**Figure 12: Nombre d'explants formant des cals et caulogénèse chez *M. vulgare***

Les barres verticales représentent l'écartype, les lettres majuscules représentent les groupes homogènes et hétérogènes pour la callogénèse, les lettres minuscules représentent les groupes homogènes et hétérogènes pour la caulogénèse selon le test de Tukey.

#### 5.4. Propagation *in vitro* de *Salvia officinalis*

Pour *S. officinalis*, nous n'avons pas observé l'induction de cals chez toutes les combinaisons de l'AIA et la Kinétine appliquées, en effet la caulogénèse n'a pas été obtenue.



**Photo 10 : Callogénèse et caulogénèse**

A1: cals, A2: caulogénèse (*R. officinalis*), B1: cals, B2: caulogénèse (*T. algeriensis*), C1: cals, C2: caulogénèse (*M. vulgare*) (Photo S. Mehalaine)

En multiplication végétative, il y a un seul aspect fondamental qui détermine la régénération des espèces végétales à partir de fragments prélevés de différentes parties de la plante ; c'est l'aptitude de la matière végétale à proliférer et à se différencier (Ozenda, 2006).

En culture *in vitro* des explants de petites tailles, l'activité des régulateurs de croissance oriente la régénération soit vers le stade caulogène, rhizogène, callogène, ou vers le stade reproducteur (Augé et al., 1989).

À partir des résultats obtenus, nous avons pu déterminer les concentrations de l'AIA et la Kinétine combinées qui peuvent induire la formation de cals et de nouvelles pousses. Selon Hopkins (2003), l'auxine stimule la croissance et la différenciation cellulaire ainsi que l'élongation des rameaux. Les cytokinines induisent les divisions cellulaires (Miller et al., 1955). En outre, l'effet de la cytokinine est exercé en présence de l'auxine (Guignard, 2000). Shekhawat et al. (2015) ont rapporté que les cytokinines apparaissent responsables de la division, l'élongation cellulaire et l'induction de jeunes rameaux. Et l'application des cytokinines (BAP ou Kin) a provoqué l'initiation des bourgeons végétatifs à partir des segments des entre nœuds chez l'espèce *Morinda coreia*. Ainsi, la combinaison entre la Kin et l'AIA a entraîné la formation des cals.

Dans leur étude, Kousalya et Narmatha Bai (2016) ont montré que l'application de la BAP et la Kin a augmenté le nombre des jeunes rameaux. De plus, l'utilisation de l'auxine (NAA) seul ou combinée avec plusieurs cytokinines a stimulé la formation des cals chez l'espèce *Canscora decussate*.

Chez l'espèce *Ipomoea sepiaria*, la meilleure prolifération des jeunes rameaux a été obtenue par l'application de 6-benzyladenine (BA) et NAA (Cheruvathur et al., 2015).

Par ailleurs, la composition du milieu de culture utilisé affecte extrêmement la stimulation ou l'inhibition de la croissance *in vitro* des plantes. Selon Misra et Chaturvedi (1991), l'efficacité des cytokinines pour induire la caulogénèse chez *Rosmarinus officinalis* est influencée par la présence des sels minéraux dans le milieu de culture comme, par exemple,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$  et  $\text{CaCl}_2$ .

De nombreuses recherches ont montré que le choix du type du milieu de culture est important pour réussir le développement des explants et le milieu Murachige et Skoog ainsi que l'auxine (AIA) et la cytokinine (Kin), avec une large série de concentrations, ont été utilisés dans plusieurs expérimentations *in vitro* pour produire différentes espèces. En outre, la

concentration optimale de l'AIA et la Kin dépend extrêmement des explants utilisés et des espèces végétales régénérées.

Dans notre expérimentation, nous avons obtenu indépendamment les cals et la caulogénèse après trois mois, alors que certains chercheurs ont obtenu la callogénèse et la caulogénèse en une période très courte (Panizza et Tognoni, 1988; Cheruvathur et al., 2015; Shekhawat et al., 2015). Cela peut être expliqué par le type et la taille des explants utilisés pour propager les espèces végétales en question.

Panizza et Tognoni (1988) ont observé que le taux de cals formés dépend du type de l'explant de départ (fleur, feuille, entre nœuds). Et Selon Augé et al. (1989), la mise en culture des explants constitués de tissus différenciés, tels que les fragments de tiges, de racines et de feuilles provoque un retour en arrière complet pour redonner aux cellules la capacité d'entrer d'abord en division puis de retrouver un pouvoir organogène. Pour ce type d'explants, toutes les parties d'une plante sont susceptibles de suivre le processus de dédifférenciation suivi d'une nouvelle organisation. D'une manière générale, ce sont les feuilles et les tiges jeunes qui présentent les meilleures réactions. Mais ici, la différence entre les espèces est grande.

# Conclusion

### Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours la source potentielle de principes actifs, comme les huiles essentielles, ayant des propriétés thérapeutiques et couvrant différents champs d'activités biologiques. L'utilisation excessive des plantes médicinales a contribué à un épuisement important de cette source naturelle et l'établissement de stratégies pour leur production et leur conservation est indispensable.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de la composition chimique et l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites des quatre plantes médicinales collectées de la région semi aride algérienne (Ain Beida) : *Thymus algeriensis*, *Rosmarinus officinalis*, *Marrubium vulgare* et *Salvia officinalis*. La capacité germinative et la propagation *in vitro* de ces espèces ont été aussi évaluées.

✓ L'hydrodistillation a donné des rendements des huiles essentielles estimés à :  $1.08 \pm 0.02\%$  pour *T. algeriensis*,  $0.88 \pm 0.00\%$  pour *R. officinalis* et  $0.65 \pm 0.01\%$  pour *S. officinalis*. Au contraire, *M. vulgare* n'a pas montré la présence des huiles essentielles.

L'analyse chimique des essences par la technique CG/SM a montré la présence des composés chimiques majoritaires qui confèrent aux huiles essentielles leurs propriétés biologiques.

- ✓ Les composés majeurs de l'huile essentielle de *T. algeriensis* sont : camphor, 1,8-cinéole, borneol, viridiflorol, linalool,  $\alpha$ -terpineol et caryophyllène oxide.
- ✓ Pour l'huile de *R. officinalis*, les constituants majeurs sont : camphor, Z- $\beta$ -ocimène, isobornéol,  $\alpha$ -bisabolol, bornéol, *trans* caryophyllène et  $\alpha$ -terpinéol.
- ✓ Ceux détectés dans l'huile essentielles de *S. officinalis* sont :  $\beta$ -thujone, viridiflorol, camphor, 1,8-cinéole, *trans*-caryophyllène,  $\alpha$ -humulène, caryophyllène oxide,  $\alpha$ -thujone et bornéol.

Les tests de l'activité antibactérienne ont indiqué que :

- ✓ *S. aureus* s'est montré sensible à l'huile de *T. algeriensis* et *S. officinalis* ; les diamètres d'inhibition marqués sont élevés et la CMI est faible (0.20 mg/ml).
- ✓ *E. coli* s'est montré résistant aux essences de *T. algeriensis* et *S. officinalis* ; avec des valeurs de CMI élevées (2.5, 1.66 mg/ml) respectivement.
- ✓ La souche bactérienne *P. aeruginosa* a exercé une résistance importante aux essences de *T. algeriensis* et *S. officinalis* avec des diamètres d'inhibition faibles et CMI élevée (CMI =1.66 et CMI > 3.33 mg/ml) respectivement.
- ✓ Les trois bactéries testées se sont montrées résistantes à l'huile essentielle de *R. officinalis* ; en présentant des valeurs de CMI élevées (CMI=3.33 et CMI > 3.33 mg/ml).

Le test préliminaire de la germination *in vitro* a montré que :

- ✓ Les graines de *T. algeriensis* et *M. vulgare* présentent un pouvoir germinatif important ; elles sont capables de germer à la température ambiante et à l'obscurité continue en présentant des taux de germination élevés (94.43, 57.76 %) respectivement, contrairement à celles de *R. officinalis* et *S. officinalis*.
- ✓ Le traitement par l'acide gibbérellique (GA<sub>3</sub>) n'a exercé aucun effet significatif pour améliorer le taux de germination chez *R. officinalis* et *S. officinalis*. En outre, les graines traitées par la GA<sub>3</sub> et le témoin de *T. algeriensis* et *M. vulgare* n'ont pas révélé une différence significative et ont enregistré toujours des taux de germination élevés (80 à 100%), (53.30 à 86.70%) respectivement.

Les résultats obtenus de l'expérimentation de la propagation *in vitro* ont indiqué que : l'application de l'AIA et la kinétine combinées a exercé des effets significatifs sur la callogénèse et la caulogénèse chez *T. algeriensis*, *R. officinalis* et *M. vulgare*.

## Conclusion

---

- ✓ Les milieux MS4 (5 mg/L AIA, 5 mg/L Kin) et MS5 (5 mg/L AIA, 10 mg/L Kin) ont induit les meilleures formations de cals chez *T. algeriensis* avec des taux de réussite de 20 et 23.30% et la caulogénèse a été induite seulement par le milieu MS3 (2.5 mg/L AIA, 5 mg/L Kin) avec un taux faible (6.70%).
- ✓ Le milieu MS3 (2.5 mg/L AIA, 5 mg/L Kin) a présenté la meilleure formation de cals chez *R. officinalis* avec un taux de réussite élevé 56.70% et la caulogénèse a été entraînée par le milieu MS3 et relativement augmentée par le milieu MS5 (5 mg/L AIA, 10 mg/L Kin) avec des taux de (3.30, 16.70%) respectivement.
- ✓ Pour *M. vulgare*, les meilleures formations de cals ont été provoquées par les milieux MS2, MS3 et MS4 avec des taux de réussite relativement élevés entre 33.30 et 36.70%. Le milieu MS3 a augmenté relativement la caulogénèse (13.30%).
- ✓ *S. officinalis* n'a montré aucun changement morphogénique chez toutes les concentrations de l'AIA et la Kin appliquées.

En conclusion, la résistance développée par les microorganismes vis-à-vis des antibiotiques utilisés est un phénomène biologique compliqué. A cet égard, la plante reste toujours la source naturelle qui fournit de nouvelles molécules actives capables de réduire ou inhiber la croissance bactérienne. Les huiles essentielles de *T. algeriensis*, *R. officinalis* et *S. officinalis* peuvent fournir des molécules naturelles pouvant constituer une alternative à l'usage des antibiotiques synthétisés chimiquement.

A partir des résultats obtenus des deux expérimentations de la germination et la propagation *in vitro*, nous pouvons conclure que la levée de la dormance et l'amélioration des taux de germination chez les graines de *R. officinalis* et *S. officinalis* ainsi que l'induction de la callogénèse et la caulogénèse chez *S. officinalis* et la réalisation de la rhizogénèse chez les autres trois plantes exigent le développement d'autres protocoles et l'établissement d'autres stratégies plus efficaces et plus reproductibles.

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

### (A)

Adams, R.P. (1995). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL.

Allali, H., Benmehdi, H., Dib, M.A., Tabti, B., Ghalem, S., Benabadji, N. (2008). Phytotherapy of diabetes in west Algeria. Asian Journal of Chemistry 20, 2701-2710.

Aliyiannis, N., Kalpotzakis, E., Mitaku, S., Chinou, I.B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. Journal of Agricultural and Food Chemistry 40, 4168-4170.

Amarti, F., Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Aarab, L., El Ajjouri, M., Chaouch, A. (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Thymus algeriensis* Boiss & Reut. and *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. from Morocco. Biotechnol. Agron. Soc. Environ 14 (1), 141-148.

Augé, R., Beauchesne, G., Boccon-Gibod, J., Decourtye, L., Digat, B., Jalouzot, R., Minier, R., Morand, J., Reynoird, J.P., Strullu, D.G., Vidalie, H. (1989). La culture *in vitro* et ses applications horticoles. 3<sup>ème</sup> édition, Technique et Documentation, Lavoisier, Paris. P : 8-13.

### (B)

Balbaa, S.I., Hilal, S.H., Zaki, A.Y. (1981). Medicinal plants constituents. Third Edition, General organization for university and school books. P: 11-12.

Baratta, M.T., Dorman, H.J.D., Deans, S.G., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Ruberto, G. (1998). Antibacterial and anti-oxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* 13, 235-244.

Baskin, C.C., Baskin, J.M. (1998). *Seeds. Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press, San Diego.

Baskin, J.M., Baskin, C.C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Sci Res* 14, 1-16.

Beloued, A. (2005). *Plantes médicinales d'Algérie*. Office des publications universitaires, Alger. P : 184, 196, 206.

Bencherif, K., Boutekrabt, A., Fontaine, J., Laruelle, F., Dalpè, Y., Hadj Sahraoui, A.L. (2015). Impact of soil salinity on arbuscular mycorrhizal fungi biodiversity and microflora biomass associated with *Tamarix articulata* Vahl rhizosphere in arid and semi-arid Algerian areas. *Science of the Total Environment* 533, 488-494.

Ben Jemia, M., Tundis, R., Maggio, A., Rosselli, S., Senatore, F., Menichini, F., Bruno, M., Kchouk, M.E., Loizzo, M.R. (2013). NMR-based quantification of rosmarinic and carnosic acids, GC-MS profile and bioactivity relevant to neurodegenerative disorders of *Rosmarinus officinalis* L. extracts. *Journal of functional foods* 5, 1873-1882.

Beniston, WS. (1984). *Fleurs d'Algérie*. Entreprise nationale du livre, Alger. P : 47.

Ben Mansour, M., Balti, R., Rabaoui, L., Bougatef, A., Guerfel, M. (2013). Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil from south Tunisian *Ajuga pseudoiva* Rob. Lamiaceae. *Process Biochemistry* 48, 723-729.

Bewley, J.D. (1997). Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9, 1055-1066.

Bezić, N., Skocibusić, M., Dunkić, V., Radonić, A. (2003). Composition and antimicrobial activity of *Achillea clavennae* L. essential oil. *Phytotherapy Research* 17, 1037-1040.

Botineau, M. (2010). *Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs*. Edition Tec & Doc Lavoisier, Paris. P : 1021, 1024.

Boudjelal, A., Henchiri, C., Sari, M., Sarri, D., Hendel, N., Benkhaled, A., Ruberto, G. (2013). Herbalists and wild medicinal plants in M'Sila (North Algeria): An ethnopharmacology survey. *Journal of Ethnopharmacology* 148,395-402.

Bruneton, J. (2001). *Plantes toxiques, végétaux dangereux pour l'homme et les animaux*. Edition Tec & Doc. Paris. P : 337.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223-253.

(C)

Cardile, V., Russo, A., Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Arnold, N.A., Piozzi, F. (2009). Essential oils of *Salvia bracteata* and *Salvia rubifolia* from Lebanon: Chemical composition, antimicrobial activity and inhibitory effect on human melanoma cells. *Journal of Ethnopharmacology* 126, 265-272.

Carip, C. (2008). *Microbiologie Hygiène, Bases microbiologies de la diététique*. Edition Tec & Doc, Lavoisier, Paris. P : 79, 102, 103.

Cheruvathur, M.K., Abraham, J., Thomas, T.D. (2015). In vitro micropropagation and flowering in *Ipomoea sepiaria* Roxb. An important ethanomedicinal plant. *Asian Pacific Journal of Reproduction* 4 (1), 49-53.

Chiej, R. (1982). *Guide vert, les plantes médicinales*. Ed : Arnoldo Mandadori, Milan, Itali. 443 P.

Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans, N., Totte, J., Pieters, L., Vlietinck, A.J. (2002). Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology* 79, 213-220.

CLSI. (2007). *Clinical and Laboratory Standards Institute-Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests- M2–A9*, Vol. 26 No. 1. Approved Standard-Ninth Edition. 177 P.

Coelho, N., Gonçalves, S., González-Benito, M.E., Romano, A. (2012). Germination and cryopreservation tolerance of seeds from the rare aromatic species *Thymus lotocephalus*. *Scientia Horticulturae* 145, 84-86.

Colin, R. Norton. (1985). The use of gibberellic acid, ethephon and cold treatment to promote germination of *Rhus typhina* L. seeds. *Scientia Horticulturae* 27, 163-169.

Conversa, G., Lazzizzera, C., Elia, A. (2010). Effects of after-ripening, stratification and GA<sub>3</sub> on dormancy release and on germination of wild asparagus (*Asparagus acutifolius* L.) seeds. *Scientia Horticulturae* 125, 196–202.

Council of Europe. (1997). European Pharmacopoeia, third ed. Council of Europe, Strasbourg, France.

Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology Reviews* 12, 564-582.

#### (D)

Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G. (2000). GC–MS Analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 48, 2576-2581.

Darrudi, R., Hassandokht, M.R., Nazeri, V. (2015). Effects of moist stratification, GA<sub>3</sub> and seed age on seed germination of *Rheum khorasanicum* B. Baradaran & A. Jafari. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 2, 168-173.

Derwich, E., Benziane, Z., Chabir, R., Taouil, R. (2011). In vitro antibacterial activity and GC/MS analysis of the essential oil extract of leaves of *Rosmarinus officinalis* grown in Morocco. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 3, 89-95.

De Vitis, M., Seal, C.E., Ulian, T., Pritchard, H.W., Magrini, S., Fabrini, G., Mattana, E. (2014). Rapid adaptation of seed germination requirements of the threatened Mediterranean species *Malcolmia littorea* (Brassicaceae) and implications for its reintroduction. *South African Journal of Botany* 94, 46–50.

Dissanayake, P., George, D.L., Gupta, M.L. (2010). Effect of light, gibberellic acid and abscisic acid on germination of guayule (*Parthenium argentatum* Gray) seed. *Industrial Crops and Products* 32, 111-117.

Dob, T., Darhmane, D., Benabdelkader, T., Chelghoum, T.C. (2006). Studies on the essential oils and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss & Reut. *International Journal of Aromatherapy* 16 (2), 95-100.

Džamić, A.M., Soković, M.D., Novaković, M., Jadranin, M., Mihailo, S., Ristić, M.S., Tešević, V., Marin, P.D. (2013). Composition, antifungal and antioxidant properties of *Hyssopus officinalis* L. subsp. *pilifer* (Pant.) Murb. essential oil and deodorized extracts. *Industrial Crops and Products* 51, 401- 407.

#### (E)

El Kalamouni, C. (2010). Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de doctorat, Université de Toulouse. 263 P.

Emamipoor, Y., Maziah, M. (2014). An efficient method in breaking of dormancy from *Bunium persicum* (Boiss) Fedtsch seeds: a valuable herb of Middle East and Central Asia. *Asian Pacific Journal Trop Biomed* 4 (8), 642-649.

Essawi, T., Srour, M. (2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 70, 343-349.

#### (F)

Ferhat, M.A., Meklati, B.Y., Smadja, J., Chemat, F. (2006). An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. *Journal of Chromatography* 1112, 121-126.

Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T., Steber, C. (2008). Molecular aspects of seed dormancy. *Ann Rev Plant Biol* 59, 387-415.

Franchomme, P. (1999). *L'aromathérapie, Thérapeutique de pointe en médecine naturelle*. Volume I-1. Première édition française. Sinceiro Entreprises Ltd. 231 P.

#### (G)

Giordani, R., Hadeif, Y., Kaloustian, J. (2008). Composition and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia* 79, 199-203.

Glisic, S., Ivanovica, J., Ristic, M., Skalaa, D. (2010). Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by supercritical CO<sub>2</sub>: Kinetic data, chemical composition and selectivity of diterpenes. *Journal of Supercritical Fluids* 52, 62-70.

González, M.J., Marioli, J.M. (2010). Antibacterial activity of water extracts and essential oils of various aromatic plants against *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood. *Journal of Invertebrate Pathology* 104,209-213.

Graeber, K., Linkies, A., Muller, K., Wunchova, A., Rott, A., Leubner-Metzger, G. (2010). Cross-species approaches to seed dormancy and germination: conservation and biodiversity of ABA-regulated mechanisms and the Brassicaceae DOG1 genes. *Plant Mol Biol.* 73, 67-87.

Guignard, J.L., Cosson, L., Henry, M. (1985). *Abrégé de phytochimie*. Masson, Paris. P : 123, 205-206.

Guignard, J.L. (2000). *Biochimie végétale*. 2ème Edition, Dunod, Paris. P: 181-184.

Guinoiseau, E. (2010). *Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : Séparation, identification et mode d'action*. Thèse de Doctorat, Université de Corse-Pasquale Paoli. 143 P.

Gul, B., Ansari, R., Flowers, T.J., Khan, M.A. (2013). Germination strategies of halophyte seeds under salinity. *Environmental and Experimental Botany* 92 4-18.

Güleryüz, G., Kırmızı, S., Arslan, H., Sakar, F.S. (2011). Dormancy and germination in *Stachys germanica* L. subsp. *bithynica* (Boiss.) Bhattacharjee seeds: Effects of short-time moist chilling and plant growth Regulators. *Flora* 206, 943-948.

## (H)

Haïcour, R. (2002). Biotechnologies végétales, techniques de laboratoire. Edition Tec & Doc Lavoisier Paris. 305 P.

Hamman, B., Koning, G., Him Lok, K. (2003). Homeopathically prepared gibberellic acid and Barley seed germination. *Homeopathy* 92, 140–144.

Hayouni, E.A., Aberabba, M., Bouix, M., Hamdi, M. (2007). The effects of solvents and the extraction method on the phenolic contents and biological activities of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry* 105, 1126-1134.

Hayouni, E., Chraief, I., Abedrabba, M., Bouix, M., Leveau, J.Y., Mohammed, H., Hamdi, M. (2008). Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology* 125, 242-251.

Hazzit, M., Baaliouamer, A., Veríssimo, A.R., Faleiro, M.L., Miguel, M.G. (2009). Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food Chemistry* 116, 714-721.

Heath, H.B. (1981). Source book of flavours. Westport: Avi, In: Longaray Delamare, A.P., Moschen-Pistorello, I.T., Artico, L., Atti-Serafini, L., Echeverrigaray, S. (2007). Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry* 100, 603-608.

Hermann, K., Meinhard, J., Dobrev, P., Linkies, A., Pesek, B., Heß, B., Machackova, I., Fischer, U., Leubner-Metzger, G. (2007). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid and abscisic acid during the germination of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) A comparative study of fruits and seeds. *Journal of Experimental Botany* 58, 3047–3060.

Hopkins, W.G. (2003). *Physiologie végétale*. Edition De Boeck. Bruxelles. 514 P.

### (K)

Kalemba, D., Kunicka, A. (2003) Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem* 10, 813-829.

Kamato, G.P.P., Viljoen, A.M., Figueiredo, A.C., Tilney, P.M., Van Zyl, R.L., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Van Vuuren, S.F. (2007). Trichomes, essential oil composition and biological activities of *Salvia albicaulis* Benth. and *S. dolomitica* Codd, two species from the Cape region of South Africa. *South African Journal of Botany* 73, 102-108.

Kamatou, G.P.P., Van Zyl, R.L., Van Vuuren, S.F., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Viljoen, A.M. (2008). Seasonal variation in essential oil composition, oil toxicity and the biological activity of solvent extracts of three South African *Salvia* species. *South African Journal of Botany* 74, 230-237.

Khan, A.A. (1971). Cytokinins: permissive roles in seed germination. *Science* 171, 853-859.

Kothe Hans, W. (2007). 1000 plantes aromatiques et médicinales. Terres Editions. P : 204.

Kousalya, L., Narmatha Bai, V. (2016). Effect of growth regulators on rapid micropropagation and antioxidant activity of *Canscora decussata* (Roxb.) Roem. & Schult. A threatened medicinal plant. *Asian Pacific Journal of Reproduction* 5 (2), 161-170.

ozlowski, T.T. (1972). *Seed Biology*. Academic Press, New York. 447 P.

### (L)

Laberche, J.C. (2010). *Biologie végétale*. 3<sup>ème</sup> édition, Dunod. Paris. P : 136-142.

Laborda, R., Manzano, I., Gamón, M., Gavidia, I., Pérez-Bermúdez, P., Boluda, R. (2013). Effects of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* essential oils on *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Industrial Crops and Products* 48, 106- 110.

Lieutaghi. P. (1996). *Le livre des bonnes herbes*. Edition Actes Sud. P : 394-395.

Longaray Delamare, A.P., Moschen-Pistorello, I.T., Artico, L., Atti-Serafini, L., Echeverrigaray, S. (2007). Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry* 100, 603-608.

### (M)

Marino, M., Bersani, C., Comi, G. (2001). Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *International Journal of Food Microbiology* 67, 187-195.

Miller, C., Skoog, F., Saltza, M.V., Strong, M. (1955). Kinetic, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. J Am Chem Soc. 77, 1392-1393. In: Miransari, M., Smith, D.L. (2014). Plant hormones and seed germination. Environmental and Experimental Botany 99, 110-121.

Miransari, M., Smith, D.L. (2014). Plant hormones and seed germination. Environmental and Experimental Botany 99, 110-121.

Misra, P., Chaturvedi, H.C. (1991). Influence of inorganic salts on cytokinin induced caulogenesis in leaf segments of *Rosmarinus off'cinalis* L. Plant Science 79, 229-235.

Moghtader, M., Afzali, D. (2009). Study of the antibacterial properties of the essential oil of Rosemary. American-Eurasian J. Agric. Environ Sci 5 (3), 393-397.

Moyo, M., Aremu, A.O., Staden, J.V. (2015). Medicinal plants: An invaluable, dwindling resource in sub-Saharan Africa. Journal of Ethnopharmacology 174, 595-606.

## (N)

NCCLS. (2001). (National Committee for Clinical Laboratory Standards) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eleventh Informational Supplement. NCCLS Document M 100-S11.

Nikaido, H., Vaara, M. (1985). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiological reviews 49, 1-32.

Nikolić, M., Glamočlija, J., Ferreira, I.C.F.R., Calhelha, R.C., Fernandes, Â., Marković, T., Marković, D., Giweli, A., Soković, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products* 52, 183- 190.

Nonogaki, H. (2008). Repression of transcription factors by microRNA during seed germination and postgermination. Another level of molecular repression in seeds. *Plant Signaling and Behavior* 1, 65-67.

### (O)

Ozenda, P. (2006). *Les végétaux, organisation et diversité biologique*. 2<sup>ème</sup> Edition, Dunod, Paris. 516 P.

### (P)

Padilla, I.M.G., Encina, C.L. (2003). In vitro germination of Cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). *Scientia Horticulturae* 97, 219-227.

Panizza, M., Tognoni, F. (1988). Clonal Propagation, Callus Formation and Plant Regeneration of Lavandin. *Scientia Horticulturae* 37, 157-163.

Paolini, J. (2005). Caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM-(IE et IC) et RMN du carbone-13 de *Cistus albidus* et de deux Asteraceae endémiques de Corse : *Eupatorium cannabinum* subsp Corsicum et *Doronicum corcicum*. Thèse de doctorat, Université de Corse. 333 P.

Paul, A., Thapa, G., Basu, A., Mazumdar, P., Kalita, M.C., Sahoo, L. (2010). Rapid plant regeneration, analysis of genetic fidelity and essential aromatic oil content of micropropagated plants of Patchouli, *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. – An industrially important aromatic plant. *Industrial Crops and Products* 32, 366-374.

Pattnaik, S., Subramanyam, V.R., Bapaji, M., Kole, C.R. (1997). Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios* 89, 39-46.

Pérez-García, F., Hornero, J., González-Benito, M.E. (2003). Interpopulation variation in seed germination of five Mediterranean Labiatae shrubby species. *Isr. J. Plant Sci* 51, 117-124.

Pinto, E., Salgueiro, L.R., Cavaleiro, C., Palmeira, A., Gonçalves, M.J. (2007). In vitro susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. *Industrial Crops and Products* 26,135-141.

Pradhan, S., Tiruwa, B., Subedee, B.R., Pant, B. (2014). In vitro germination and propagation of a threatened medicinal orchid, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. through artificial seed. *Asian Pac J Trop Biomed* 4(12), 971-976.

Prat, R. (2007). *Expérimentation en biologie et physiologie végétale*. Hermann, Editeurs des sciences et des arts. Edition Quae. P : 167-168.

## (Q)

Quezel, P., Santa, S. (1963). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Tome 2<sup>ème</sup> Ed: C.N.R.S, Paris. P: 781, 793, 794, 801, 806.

(R)

Radulescu, V., Chiliment, S., Oprea, E. (2004). Capillary gas chromatography–mass spectrometry of volatile and semi-volatile compounds of *Salvia officinalis*. Journal of Chromatography A 1027,121-126.

Riahi, L., Elferchichi, M., Ghazghazi, H., Jebali, J., Ziadi, S., Aouadhi, C., Chograni, H., Zaouali, Y., Zoghlami, N., Mliki, A. (2013). Phytochemistry, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of *Mentha rotundifolia* L. in Tunisia. Industrial Crops and Products 49, 883-889.

Ribeiro, J.N.S., Costa, C.S.B. (2015). The effect of temperature regulation on seed germination of the tropical tree *Myrsine parvifolia* A. DC near its southern limit. South African Journal of Botany 98,128-133.

Rios, J.L., Recio, M.C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. Journal of Ethnopharmacology 100, 80-84.

Rout, G.R., Samantaray, S., Das, P. (2000). In vitro manipulation and propagation of medicinal plants Biotechnology Advances 18, 91-120.

Ruiz-Navajas, Y .,Viuda-Martos, M ., Sendra, E ., Perez-Alvarez, J.A ., Fernández-López, J. (2012). Chemical characterization and antibacterial activity of *Thymus moroderi* and *Thymus piperella* essential oils, two *Thymus* endemic species from southeast of Spain. Food Control 27, 294-299.

(S)

Sharma, R.K., Sharma, S., Sharma, S.S. (2014). The long-term ambient storage-induced alterations in seed viability, germination and seedling vigour of *Saussurea costus*, a critically endangered medicinal herb of North West Himalaya. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 1, 92-97.

Shekhawat, M.S., Kannan, N., Manokari, M. (2015). In vitro propagation of traditional medicinal and dye yielding plant *Morinda coreia* Buch.–Ham. *South African Journal of Botany* 100, 43-50.

Singleton, P. (1999). *Bactériologie*. 4<sup>ème</sup> édition, Dunod, Paris. P : 387, 391, 392.

Sivropoulou, A., Nikolaou, C., Papanikolaou, E., Kokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M. (1997). Antimicrobial, cytotoxic, and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. *Journal of agricultural and Food Chemistry* 45, 3197-3201.

(T)

Teixeira Durate, M.C., Leme, E.E., Delarmelina, C., Soares, A.A., Figueira, G.M., Sartoratto, A. (2007). Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *Journal of Ethnopharmacology* 111, 197-201.

Tenore, G.C., Ciampaglia, R., Apostolides Arnold, N., Piozzi, F., Napolitano, F., Rigano, D., Senatore, F. (2011). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil of *Salvia lanigera* from Cyprus. *Food and Chemical Toxicology* 49, 238-243.

(U)

Urbanska, K.M., Schütz, M. (1986). Reproduction by seed in alpine plants and vegetation research above timberline. *Bot. Helvet* 96, 43-60.

(V)

Vanaclocha, B., Cañigüeral, S. (2003). Fitoterapia, In: Rios, J.L., Recio, M.C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 80-84.

(W)

Wang, B.S.P., Pitel, J.A., Webb, D.P. (1982). Environmental and genetic factors affecting tree and shrub seeds. *Adv. Res. Technoh Seeds* 7, 87-135.

Wang, P., Mo, B., Long, Z., Fan, S., Wang, H., Wang, L. (2016). Factors affecting seed germination and emergence of *Sophora davidii*. *Industrial Crops and Products* 87, 261-265.

Wendakoon, C.N., Sakaguchi, M. (1995). Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Anterobacter aerogenes* by active components of spices. *Journal of food protection* 58, 280-283.

Wichtl. M., Anton. R. (2003). *Planes thérapeutiques*. Edition Tec & Doc Lavoisier, Paris. P : 364, 523, 538.

(Z)

Zaouali, Y., Bouzaine, T., Boussaid, M. (2010). Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. Food and Chemical Toxicology 48, 3144-3152.

Zaouali, Y., Chograni, H., Trimech, R., Boussaid, M. (2013). Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. var. *typicus* Batt. organs during growth and incidence on the antioxidant activity. Industrial Crops and Products 43, 412- 419.

Zouari, N., Fakhfakh, N., Zouari, S., Bougatef, A., Karray, A., Neffati, M., Ayadi, M.A. (2011). Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. (Lamiaceae). food and bioproducts processing 89, 257-265.

# Annexe

## Annexe

**Annexe 1.** Analyse de la variance (ANOVA) de l'effet de la GA<sub>3</sub> sur la germination des graines de *T. algeriensis*, *R. officinalis* et *M. vulgare*. NS : Non significatif.

Source	DL	CM	F	P	
<b><i>T. algeriensis</i></b>					
GA <sub>3</sub> doses	3	3.00	4.00	0.052	NS
<b><i>R. officinalis</i></b>					
GA <sub>3</sub> doses	3	1.194	3.58	0.066	NS
<b><i>M. vulgare</i></b>					
GA <sub>3</sub> doses	3	5.67	3.09	0.090	NS

**Annexe 2.** Analyse de la variance (ANOVA) testant l'effet de l'AIA et la Kin en combinaison sur la propagation *in vitro* de *T. algeriensis*, *R. officinalis* et *M. vulgare*. (\*\*: hautement significatif, \*\*\*: très hautement significatif).

	Source	DL	CM	F	P	
<b><i>T. algeriensis</i></b>	Callogenèse	7	2.928	23.43	0.000	***
	Caulogenèse	7	0.166	4.00	0.010	**
<b><i>R. officinalis</i></b>	Callogenèse	7	12.422	99.38	0.000	***
	Caulogenèse	7	1.023	12.29	0.000	***
<b><i>M. vulgare</i></b>	Callogenèse	7	10.190	27.17	0.000	***
	Caulogenèse	7	0.660	3.17	0.026	**

**Annexe 3.** Composition chimique du milieu de culture Murachige et Skoog (MS)

(Haïcour, 2002).

<b>Macroéléments</b>	<b>Quantités (mg/L)</b>
Nitrate d'ammonium (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	1650 mg/L
Chlorure de calcium (CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O)	440 mg/L
Sulfate de magnésium (MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O)	370 mg/L
Phosphate de potassium (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	170 mg/L
Nitrate de potassium (KNO <sub>3</sub> )	1900 mg/L
<b>Microéléments</b>	<b>Quantités (mg/L)</b>
Sulfate de manganèse (MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O)	22.3 mg/L
Iodure de potassium (KI)	0.83 mg/L
Molybdate de sodium (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O)	0.25 mg/L
Sulfate de zinc (ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O)	8.6 mg/L
Acide borique (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	6.2 mg/L
Chlorure de cobalt (CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O)	0.025 mg/L
Sulfate de cuivre (CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O)	0.025 mg/L
Sulfate de fer (FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O)	27.8 mg/L
EDTA (Na <sub>2</sub> EDTA*2H <sub>2</sub> O)	37.2 mg/L
<b>Vitamines et additifs organiques</b>	<b>Quantités (mg/L)</b>
Myo-Inositol	100 mg/L
Acide nicotinique	0.5 mg/L
Pyridoxine	0.5 mg/L
Thiamine	0.1 mg/L
Glycine	2.0 mg/L
Saccharose	20 g/L
Agar-agar	7 g/L