

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف
1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N°...../SNV/2018

THÈSE

Présentée par

BOUZID-DJIHANE

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: BIOLOGIE

Spécialité: MICROBIOLOGIE

THÈME

**Evaluation de l'activité biologique de l'huile essentielle d'une
plante endémique *Hélichrysum italicum* (Roth) G. DON**

Soutenue publiquement le/...../2018

DEVANT LE JURY

Président	Harzallah Daoud	Pr. UFA Sétif 1
Directeur	Mohamed Mihoub Zerroug	Pr. UFA Sétif 1
Examineurs	Medjekal Samir	MCA, UMB M'sila
	Chikhouné Amirouche	MCA, UAM Béjaia
	Dahia Mustapha	MCA, UZA Djelfa
	Mezaache Samia	MCA, UFA Sétif

Laboratoire de Microbiologie Appliquée

REMERCIEMENTS

J'exprime ma profonde gratitude à Mon enseignant le Professeur ZERROUG Med. Mihoub, université de Sétif-1, et mon directeur de thèse, pour m'avoir encadré, la confiance qui'il ma accordée, sa gentillesse et bienveillance, ainsi que pour ses qualités pédagogiques, ses remarques pertinentes et ses conseils.

Ce travail a été réalisé, en partie, au sein du laboratoire de Microbiologie Appliquée de la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université de Sétif 1, ainsi qu'aux laboratoires de graduation de la faculté des sciences de l'université de M'sila.

Ma vive reconnaissance va à Mr le Pr. Harzallah D., professeur à l'université de Sétif 1, d'avoir accepté de présider le jury de soutenance de thèse, ainsi qu'à Mr. le Pr.Chikhoun A., de l'université de Béjaia, le Pr. De l'université de Djelfa, Mr Dahia M. le Pr. Medjekal S. de l'université de M'Sila et M^{me} Pr.Mezaache S. à l'université de Sétif 1 d'avoir accepté de juger ce travail.

Que toute personne ayant participé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail, trouve ici l'expression de mes très vifs remerciements.

SOMMAIRE

الملخص	I
Liste des abréviations	IV
Listes des figures	V
Liste des tableaux	VII
<i>INTRODUCTION</i>	01
<i>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUES</i>	
I. LES SUBSTANCES BIOACTIVES D'ORIGINE VEGETALE	04
I.1. Les huiles essentielles	06
I.1.1. Définition et localisation	06
I.1.2. Rôle dans la nature	07
I.1.3. Composition des huiles essentielles	07
I.1.4. Méthodes d'extraction des huiles essentielles	09
I.1.4.1. Hydrodistillation	09
I.1.4.2. Enfleurage	10
I.1.4.3. Extraction au CO ₂ supercritique	10
I.1.4.4. Extraction assisté par micro-onde	11
I.2. Mécanismes d'action des huiles essentielles	11
I.2.1. Activité antioxydante	11
I.2.2. Activité anti-inflammatoire	13
I.2.3. Activité antimicrobienne	14
I.2.3.1. Activité antibactérienne	14
I.2.3.2. Activité antifongique	16
II. LES ASTERACEA	18
II.1. Morphologie	18
II.2. Distribution	19
II.3. Phytochimie	19
II.4. Le genre <i>Helichrysum</i>	19
II.5. Propriétés pharmalogiques du genre	20

II.6. <i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G.Don	21
II.6.1. Description botanique	20
II.6.2. Composition chimique de l'huile essentielle	21
II.6.3. Les activités biologiques de l'huile essentielle	23
<i>PARTIE PRATIQUE</i>	
III. MATERIEL ET METHODES	25
III.1. Produits chimiques	25
III.2. Matériel végétal	25
III.3. Matériel biologique	26
III.4. Méthodes expérimentales	27
III.4.1. Techniques histologiques	27
III.4.2. Extraction de l'huile essentielle	27
III.4.3. Calcul du rendement	28
III.4.4. Analyse de l'huile essentielle	29
III.4.5. Activité anti-oxydante	29
III.4.5.1. Réduction du DPPH	29
III.4.5.2. Réduction du fer	31
III.4.6. Activité anti-inflammatoire	32
III.4.7. Activité anti-hémolyse	32
III.4.8. Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle	33
III.4.8.1. Antibiogramme	33
III.4.8.2. Souches des champignons filamenteux	33
III.4.8.2.1. Isolement et purification	33
III.4.8.2.2. Identification	34
III.4.8.2.2.1. Etude des caractères macroscopiques	34
III.4.8.2.2.2. Etude des caractères microscopiques	34
III.4.8.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion par disque	35
III.4.8.4. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)	35

III.4.8.5. Détermination de la Concentration Minimale Fongistatique (CMFs) et la Concentration Minimale Fongicide (CMF _C)	36
III.5. Analyses statistiques	37
IV. RESULTATS	38
IV.1. Description morphologique d' <i>Helichrysum italicum</i>	38
IV.2. Observation microscopique des structures sécrétrices	40
IV.3. Rendement en huile essentielle	41
IV.4. Etude phytochimique	41
IV.5. Activité anti-oxydante	45
IV.5.1. Réduction du DPPH	45
IV.5.2. Test du pouvoir réducteur	48
IV.6. Activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	48
IV.7. Activité anti-hémolytique	49
IV.8. Isolement et identification des souches fongiques	50
IV.8.1. <i>Phoma glomerata</i>	51
IV.8.2. <i>Cladosporium cladosporioides</i>	52
IV.8.3. <i>Chaetomium globosom</i>	52
IV.8.4. <i>Mucor racemosus</i>	53
IV.8.5. <i>Rhizopus stolinifer</i>	53
IV.8.6. <i>Fusarium graminearum</i>	54
IV.8.7. <i>Fusarium oxysporum</i>	54
IV.8.8. <i>Penicillium expansum</i>	55
IV.8.9. <i>Penicillium citrinum</i>	55
IV.8.10. <i>Penicillium roquefortii</i>	56
IV.8.11. <i>Penicillium digitatum</i>	56
IV.8.12. <i>Aspergillus niger</i>	57
IV.8.13. <i>Aspergillus phoenicis</i>	57
IV.8.14. <i>Aspergillus brasiliensis</i>	58
IV.8.15. <i>Aspergillus candidus</i>	58
IV.8.16. <i>Aspergillus flavipes</i>	59
IV.9. Etude de l'activité antimicrobienne	59

IV.9.1. Evaluation de l'activité antibactérienne	59
IV.9.2. Evaluation de l'activité antifongique	63
V. DISCUSSION	67
VI. <i>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</i>	83
REFERENCES	88
<i>ANNEXES</i>	
<i>PUBLICATIONS</i>	

الهدف من دراستنا هو تحديد التركيب الكيميائي والنشاطية البيولوجية للزيت الأساسي HE لنبات *Helichrysum italicum* (Roth) G. DON من شمال الجزائر: تقدير النشاطية المضادة للأوكسدة عن طريق تقنتي ال DPPH والقدرة الإرجاعية، بالإضافة إلى دراسة الزيت المضادة للإلتهاب عن طريق تقنتي حماية الكريات الحمراء وحماية البروتينات من التمسخ وأيضاً دراسة النشاطية ضد الميكروبية للزيت على 12 بكتيريا، خميرتين و 21 فطر (16 منهم تم عزلهم و تحديدهم). تم الحصول على زيت الأجزاء الهوائية للنبتة عن طريق التقطير المائي ثم إجراء التحليل الكيميائي للـ HE بواسطة كروماتوغرافيا متسلسلة على عمود هلام السيليكا، وجد أن زيت *H.italicum* يحتوي أساساً على (7.76%)، *sesquiterpènes oxygénées* و (61.42%) *monoterpènes oxygénées* ونسب من- α *cédrene* (13.61 %), α -Curcumene (11.41 %), Acétate de géranyle (10.05 %), limonène (4.91 %). nérol (5.04 %), Acétate de néryle (6.07 %), و α - pinène (3.78 %) أظهر زيت *H.italicum* قدرة كبيرة على إزاحة جذر DPPH بنسبة (مكغ/مل 40.70 ± 1.96 EC50). أظهر الزيت خاصية كبيرة على حماية البروتينات من التفسخ ب(مكغ/مل $296+43.12$ EC50) مقارنة بديكلفناك الصودي (مكغ/مل $590+11.03$ EC50). الزيت يحمي الغشاء الهولي بنسبة 56.2% بالتركيز 123 مكغ/مل، أستعملت النشاطية ضد الميكروبية عن طريق تقنية الإنتشار على الوسط الصلب. الزيت ثبط جميع السلالات إلا ثلاث بكتريا *K. Chaetomium pneumonia ATCC 4352 and L. monocytogenes ATCC 15313* و خمس فطريات *globosom, Rhizopus stolinifer, Cladosporium cladosporioides, Phoma glomerata* وتظهر الدراسة أن *P. mirabilis ATCC 35659* هي الأكثر حساسية ب(CMI) و (CMB) تقدر ب (1.581 كلغ/مل - 3.162) و (CMFf) - (CMFs) تقدر ب (6.325-12.65 مكغ/مل على الترتيب للسلالات *S. cerevisiae ATCC 9763, C. albicans ATCC 10231, A. brasiliensis, A. flavipes, P. citrinum, P. digitatum* و *P. expansum* كخلاصة هذا الزيت لديه خصائص بيولوجية جد مهمة تعود إلى التركيب الكيميائي

الكلمات المفتاحية: *Helichrysum italicum* (Roth)G. Don، الزيت الأساسي، التركيب الكيميائي، GC-MS، النشاطية المضادة للأوكسدة، النشاطية ضد إنحلال الدم، النشاطية ضد الإلتهاب و النشاطية ضد البكتريا و النشاطية ضد الفطر.

Résumé

L'objectif de ce travail est la détermination de la composition chimique de l'huile essentielle (HE) de l'*Helichrysum italicum* (Roth) G. DON du Nord de l'Algérie, ainsi que la détermination de ses activités biologiques par : l'estimation de l'effet antioxydant de l'HE (test DPPH et pouvoir réducteur du Fer); une étude de l'effet anti-inflammatoire *in vitro* (anti-dénaturation des protéines et anti-hémolyse) et par une activité antimicrobienne contre douze bactéries, deux levures et vingt et un champignons y compris (seize sont isolés et identifiés). Les parties aériennes de l'*Helichrysum italicum* ont été soumises à l'hydrodistillation. L'analyse de l'HE d'*H. italicum* par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) a permis d'identifier 66 composés qui représentent 99.24 % de l'huile totale. Cette HE est caractérisée par la prédominance des sesquiterpènes oxygénés (76.7 %) et des monoterpènes oxygénés (61.42 %). Les principaux constituants de l'huile sont α -cédrene (13.61 %), α -Curcumène (11.41 %), Acétate de géranyle (10.05 %), limonène (6.07 %), nérol (5.04 %), acétate de néryle (4.91 %) et α -pinène (3.78 %). L'HE d'*H.italicum* a une puissante capacité antiradicalaire avec une EC_{50} de $4.70 \pm 1.96 \mu\text{g/ml}$. Les résultats obtenus montrent que l'huile d'*helichrysum italicum* exerce un pouvoir réducteur important avec une $EC_{50} = 14.89 \pm 0.09 \mu\text{g/ml}$. L'HE d'*Helichrysum italicum* possède une activité anti-inflammatoire très importante avec $EC_{50} = 296 \pm 42.12 \mu\text{g/ml}$ par rapport au Diclofénac sodique ($EC_{50} = 590 \pm 11.03 \mu\text{g/ml}$). Le traitement par HE entraîne une stabilité de la membrane plasmique avec un pourcentage de protection de 56.2% à la concentration $132 \mu\text{gml}^{-1}$. L'activité antimicrobienne de l'HE est mesurée par la méthode de diffusion de disque. L'HE inhibe la croissance de tous les microorganismes testés sauf trois bactéries, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumonia* ATCC 4352 et *L. monocytogenes* ATCC 15313 et cinq champignons, *Chaetomium globosum*, *Rhizopus stolonifer*, *Cladosporium cladosporioides*, *Phoma glomerata*. La bactérie la plus sensible est *P. mirabilis* ATCC 35659 avec une (CMI) et (CMB) de 1.581 et $3.162 \mu\text{g ml}^{-1}$ respectivement. La (CMF_s) et (CMF_c) est de $6.325 \mu\text{g ml}^{-1}$ et $12.65 \mu\text{g ml}^{-1}$ respectivement pour *C. albicans* ATCC 10231, *S. cerevisiae* ATCC 9763, *A. brasiliensis*, *A. flavipes*, *P. citrinum*, *P. digitatum* et *P. expansum*. En conclusion cette huile essentielle possède des activités biologiques intéressantes qui peuvent être attribuées à sa composition chimique.

Mots clés : *Helichrysum italicum* (Roth)G. Don, huile essentielle, composition chimique, GC-MS; activité antioxydante, activité anti-inflammatoire, activité antibactérienne, activité antifongique.

Abstract

The objective of this work is the determination of the chemical composition of the essential oil (EO) of the *Helichrysum italicum* (Roth) G. DON from North of Algeria, as well as the determination of its biological activities by: the estimation of the antioxidant effect of EO (DPPH test and the test of the reducing power). Study of anti-inflammatory effect *in vitro* (the inhibition of the denaturing of protein test and the test of anti-hemolysis), and tested by antimicrobial activity against twelve bacteria, two yeasts and twenty one fungi including (sixteen are isolated and identified). The aerial parts of *H.italicum* were subjected to hydrodistillation to obtain EO which had been analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). The EO yielded 0.44% (v/w) and 66 compounds accounting for 99.24% of the oil were identified with a high content of oxygenated sesquiterpenes (61.42%). The most oxygenated sesquiterpene compounds were α -Cedrene (13.61%), α -Curcumene (11.41%), Geranyl acetate (10.05%), Limonene (6.07%), Nerol (5.04%), Neryl acetate (4.91%) and α -Pinene (3.78%). The (EO) of *H.italicum* shows a powerful anti-radical capacity with an EC₅₀ of 4.70±1.96 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. The results obtained show that (EO) of *helichrysum italicum* has an important reducing power with an EC₅₀ 14.89±0.09 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The EO of *Helichrysum italicum* has a good anti-inflammatory activity with EC₅₀ 296±42.12 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ very important compared to the Diclofenac sodium (EC₅₀ 590±11.03 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). EO leads a certain stability of the plasma membrane with percentage of protection 56.2% at the concentration 132 concentration $\mu\text{g}/\text{ml}$. The antimicrobial activity of the EO was assayed by using the disk diffusion method. *H. italicum* inhibited the growth of all the microorganisms tested except three bacteria, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumonia* ATCC 4352 and *L. monocytogenes* ATCC 15313 and five fungi, *Chaetomium globosom*, *Rhizopus stolinifer*, *Cladosporium cladosporioides*, *Phoma glomerata*. The most sensitive bacteria were *P. mirabilis* ATCC 35659 with 1.581 and 3.162 $\mu\text{g ml}^{-1}$ minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration respectively. A minimum fungistatic and fungicide concentration are 6.325 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and 12.65 $\mu\text{g ml}^{-1}$ respectively was obtained with *C. albicans* ATCC 10231, *S. cerevisiae* ATCC 9763, *A. brasiliensis*, *A. flavipes*, *P. citrinum*, *P. digitatum* and *P. expansum*.

Keywords: *Helichrysum italicum* (Roth)G. Don; (EO); Chemical composition; GC–MS; antioxidant activity; anti-inflammatory activity; antibacterial activity; antifungal activity.

ABREVIATIONS

GENT : Gentamicine

ATCC : American Type Culture Collection

ATP : Adénosine Tri Phosphate

BHT : Butylated hydroxytoluen

CG/SM : Chromatographie en phase Gaz Couplée à la Spectrométrie de masse

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMI : Concentration Mininmale Inhibitrice

DMSO : Diméthyle sulfoxyde

DPPH : 1,1- diphenyl-2picryl-hydrazyl

PDA: Potato Dextrose Agar

PDB: Potato Dextrose Broth

HE : Huile essentielle

EC₅₀ : Concentration Effective à 50%

UFC : Unité Formant Colonie

AG : Acide Gallique

LISTE DES FIGURES

Figures		Pages
Figure 1	Photographie des parties aériennes d' <i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G. Don récolté dans le nord de l'Algérie	26
Figure 2	Appareillage type Clevenger utilisé pour l'hydrodistillation d'huile essentielle	28
Figure 3	Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH	30
Figure 4	Feuilles et inflorescences d' <i>Helichrysum italicum</i> Feuilles vertes pâles de la plante (a) présentant un légère tomentum (b), Sommités fleuries jaunes de la plante (c) contient des akènes (d).	39
Figure 5	Coupes transversales d' <i>Helichrysum italicum</i> (Gx 40) (a) feuille (b) poil sécréteur (c) tige et (d) poil protecteur	40
Figure 6	Poils sécréteurs et protecteur d' <i>Helichrysum italicum</i> (Gx 40). (a): poil pluricellulaire; (b): poil unicellulaire; (c): poil glandulaire en phase précoce de développement; (d): poil glandulaire au dernier stade de développement; (e) poil protecteur.	41
Figure 7	Profil chromatographique de l'huile essentielle d' <i>Helichrysum italicum</i>	42
Figure 8	Pourcentage des différents groupes chimiques des composés présents dans l'huile essentielle d' <i>H.italicum</i> . MH : Hydrocarbures de monoterpènes ; OCM : Monoterpènes oxygénés ; SCO : sesquiterpènes oxygénés ; AC : Acides ; Oth : les autres composés.	45
Figure 9	Courbes présentent le pourcentage antiradicalaire de l'huile essentiel HE comparé à celui des standards BHT et AG. La différence entre le pourcentage antiradicalaire d'huile et (AG) n'était pas statistiquement significative, selon le test T à $p > 0.05$. Les valeurs représentent la moyenne \pm SD (n=3).	47
Figure 10	Activité antioxydante de l'huile d' <i>Helichrysum italicum</i> représentée par le test du pouvoir réducteur.	48
Figure 11	<i>Phoma glomerata</i> après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), CH: chlamydospores, PY: Pycnide.	51
Figure 12	<i>Cladosporium cladosporioides</i> après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), C: Conidies de formes et de dimensions variées, CON: Conidiophores et chaînes conidiennes à croissance acropétal.	52

Figure 13.	<i>Chaetomium globosum</i> après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), PE: Périthèce sub-globuleux.	52
Figure 14.	<i>Mucor racemosus</i> après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), SP : sporocystophore, columelle avec reste de la paroi du sporocyste et chlamydo-spore, S : spores.	53
Figure 15	<i>Rhizopus stolonifer</i> après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), COL : columelle, S : spores	53
Figure 16	<i>Fusarium graminearum</i> après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), MA: macroconidie, PH: macrophialides.	54
Figure 17	<i>Fusarium oxysporum</i> après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), MICO: petites microconidies, MACO: macroconidies fusiformes.	54
Figure 18	<i>Penicillium expansum</i> après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), CO : conidiophore lisse ME et PH : métule et phialide en verticille, Co : conidies elliptiques lisses	55
Figure 19	<i>Penicillium citrinum</i> après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), CO: conidiophore, PH: phialides, ME: métule.	62
Figure 20	<i>Penicillium roquefortii</i> après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), CO : conidiophore granuleux ME : métule, PH : phialide, RA : ramification, Co : conidies globuleuses verdâtres.	63
Figure 21.	<i>Pinicillium digitatum</i> après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), CO : conidiophore lisse, ME et PH : métule et phialide cylindriques, Co : conidies elliptiques lisses en chaînes désordonnées.	64
Figure 22.	<i>Aspergillus niger</i> après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), CO: conidiophore, TS: tête sporifère, Co: conidies globuleuse et brunes.	65

Figure 23.	<i>Aspergillus phoenicis</i> après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), CO : conidiophore brun sous la visicule; TC : tête conidienne.	66
Figure 24.	<i>Aspergillus brasiliensis</i> après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), CO : conidiophore; VE: vésicules globuleuses, Co: conidies.	67
Figure 25.	<i>Aspergillus candidus</i> après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), CO : conidiophore lisse brun; VE : vésicules globuleuses ; TC : tête conidienne blanche.	58
Figure 26.	<i>Aspergillus flavipes</i> après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), CO : conidiophore lisse brun; VE : vésicules sub-globuleuses.	59
Figure 27.	Les moyennes des zones d'inhibition de test de sensibilité à l'HE d' <i>H. italicum</i> . Les valeurs représentent la moyenne \pm SD (n = 3). Hautement significative (p<0.001), champignons vs. Bactéries	60
Figure 28.	les zones d'inhibition de <i>M.luteus</i> , la bactérie qui présente une sensibilité importante au test antimicrobien de l'HE d' <i>H.italicum</i>	60
Figure 30.	Le test de sensibilité des souches fongique à l'HE pure d' <i>H. italicum</i> présenté par des zones d'inhibition	63

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAUX		PAGES
Tableau 1.	Les pourcentages des composés majoritaires des huiles essentielles d' <i>H.italicum</i> issues de Corse, de Toscane, de Sardaigne et de l'archipel Toscane	23
Tableau 2.	Etudes ethnopharmacologique d' <i>H. italicum</i> dans plusieurs régions, en indiquant l'utilisation médicale.	24
Tableau 3.	Activité antibactérienne des antibiotiques standards (en µg) exprimée par le diamètre d'inhibition en millimètre. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD (n = 3).	ANNEX II
Tableau 4.	Pourcentage des composés chimiques et les indices de rétention de l'huile essentielle extraite d' <i>Helichrysum italicum</i> .	43
Tableau 5.	Concentration efficace (EC50) et puissance antiradicalaire (ARP) de l'huile essentielle d' <i>Helichrysum italicum</i> (HE), d' Acide gallique (AG) et BHT au DPPH	46
Tableau 6	Les pourcentages d'inhibition de l'huile d' <i>helichrysum italicum</i> sur la dénaturation des protéines	49
Tableau 7.	Les pourcentages d'inhibition de Diclofénac de sodium sur la dénaturation des protéines	49
Tableau 8.	Effet protecteur de l'(HE) contre l'hémolyse des hématies humaines induites par l'hypotonie du milieu. L'aspirine est utilisée comme référence.	50
Tableau 9	Les champignons isolés et leurs origines d'isolement	50
Tableau 10.	L'activité antibactérienne de l'HE d' <i>Helichrysum italicum</i> mesurée en diamètre d'inhibition (mm) et (CMI) (CMB) de l'(HE) <i>H.italicum</i>	61
Tableau 11.	L'activité antifongique de l'(HE) mesurée en diamètre d'inhibition (mm) et CMF _S CMF _C de l'HE	64

INTRODUCTION

Introduction

L'utilisation des plantes comme source de médicament a été exploitée depuis des millénaires par l'homme, certains produits naturels d'origine végétale sont devenus des alternatives efficaces aux composés chimiques qui ont plusieurs effets indésirables sur la santé (Fernell *et al.*, 2004).

Ainsi l'utilisation des conservateurs chimiques ajoutés largement dans de nombreux produits alimentaires pour empêcher principalement la croissance des champignons de détérioration et des microbes pathogènes, causent des effets néfastes sur la santé humaine. Par conséquent les consommateurs et les autorités ont accentué la pression sur les fabricants d'aliments pour remplacer les additifs artificiels nocifs par une alternative des substances naturelles plus efficace et non toxique (Burt, 2004).

L'utilisation des plantes pour se soigner vient essentiellement d'une prise de conscience des malades et de leur désir profond de revenir aux produits naturels et efficaces; possédant de nouvelles propriétés pharmacologiques dues à de nouveaux principes actifs et avec des nombreuses activités biologiques pour traiter à la fois plusieurs affections. Dans ce contexte, l'utilisation des composés naturels avec une activité antimicrobienne et antioxydante démontrent un large éventail d'activités biologiques et pharmacologiques et sont considérés comme ayant des effets bénéfiques en nutrition et santé (Gautam *et al.*, 2014).

Cependant cette utilisation demande une confirmation scientifique et des recherches approfondies doivent être menées. En Algérie, comme dans tous les pays du monde, plus de 20 000 plantes aromatiques médicinales sont utilisées en médecine traditionnelle (Meissner, 2004). *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fait partie de ces plantes aromatiques médicinales longtemps oubliées puis redécouvertes.

Les plantes médicinales ont des propriétés curatives en raison de la présence de divers constituants bioactifs importants (tels que les composés phénoliques, flavonoïdes, alcaloïdes, tanins et terpénoïdes). Les huiles essentielles sont l'un des plus importants produits naturels provenant de plantes pour leurs diverses propriétés biologiques à usages médicamenteux (Elshafie *et al.*, 2015).

Les plantes productrices des huiles essentielles ont été utilisées aussi depuis des milliers d'années. L'exploitation de ces métabolites végétaux a commencé au XIXe siècle, et le plus souvent suivie par la détermination de leur composition chimique et leur activité biologique presque exempts d'effets secondaires (Shaukat *et al.*, 2013). Les principaux avantages de phytothérapie semblent être leur efficacité perçue, la faible incidence d'effets indésirables graves et à leur faible coût (Joseph *et al.*, 2015).

Le nom de genre *Helichrysum* vient de deux mots grecs *helios* (soleil) et *chrysos* (or), rappelant la couleur de la plupart des fleurs de ce genre. Le nom d'espèce *italicum* rappelle l'Italie, pays où la plante a été décrite pour la première fois. L'appellation : française d'« Immortelle » et anglophone *everlasting*, elles souligneraient le fait que les bouquets secs se conservent exceptionnellement longtemps, sans perdre leur couleur (Couplan, 2009).

La composition chimique de l'huile essentielle de cette plante (endémique) retrouvée dans le bassin méditerranéen a été rapporté par plusieurs auteurs (Bianchini *et al.*, 2001 ; Roussis *et al.*, 2000 ; Pirrini *et al.*, 2009 ; Usai *et al.*, 2010). En effet, cette huile est exploitée en industrie cosmétique pour ses propriétés « anti-âge » et pharmacologique, pour ses propriétés, antimicrobienne, antieczymose, anti-inflammatoire, circulatoire, cicatrisante et antioxydante. En Agro-alimentaire l'huile essentielle d'*Helichrysum italicum* est autorisée comme ingrédient dans les arômes par le règlement européen 1882/2003 (Degrelle, 2015).

Cependant, jusqu'à ce jour aucun travail de recherche sur les activités relatives à ce genre poussant en Algérie n'a été effectué.

L'objectif principal de notre travail est orienté vers la détermination des caractéristiques biologiques de l'huile essentielle (HE) d'*Helichrysum italicum* récolté dans le nord de l'Algérie par:

- l'estimation de l'effet antioxydant de l'HE en utilisant deux méthodes; le test du DPPH et le test du pouvoir réducteur.
- l'étude de l'effet anti- inflammatoire *in vitro* de l'HE par les deux tests; le test d'inhibition de la dénaturation des protéines (albumine) et le test anti-hémolytique
- la mise en évidence de son activité antimicrobienne sur douze bactéries et vingt et un champignons filamenteux et deux levures.

Ce manuscrit est organisé en deux parties : Une Revue Bibliographique, consacrée aux substances bioactives d'origine végétales, s'accroissant sur les huiles essentielles et leurs activités biologiques, une présentation de la plante étudiée les substances actives et bien sûr une description ethnobotanique. Une partie expérimentale qui illustre les techniques utilisés pour valoriser l'huile essentielle d'*H. italicum* et ses activités biologiques suivie par les résultats ainsi que la discussion.

PARTIE

BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les substances bioactives d'origine végétale

La phytothérapie désigne la médecine fondée sur les extraits de plantes et les principes actifs naturels. L'OMS définit « la médecine traditionnelle comme comprenant diverses pratiques, approches, connaissances et croyances sanitaires intégrant des médicaments à base de plantes, d'animaux et/ou de minéraux, des traitements spirituels, des techniques manuelles et exercices, appliqués seuls ou en association afin de maintenir le bien-être et traiter, diagnostiquer ou prévenir la maladie » (OMS, 2002).

La recherche sur les substances naturelles connaît un progrès dans les années 1990, avec l'arrivée d'une nouvelle technologie : le criblage à haut débit. Des analyses des milliers d'extraits végétaux par jour pour y détecter des molécules actives, susceptibles d'être efficaces contre telle ou telle pathologie. Plusieurs plantes médicinales traditionnellement importantes contiennent des composés actifs serent comme précurseurs pour synthétiser des métabolites secondaires dont l'activité biologique peut être attribuée comme géranyl-diphosphate (précurseur des monoterpènes), farnésyl diphosphate (précurseur des sesquiterpènes et des triterpènes) et géranyl-géranyl diphosphate (précurseur des diterpènes et des tetraterpènes) (Karthikeyan et Balasubramanian, 2014).

Les produits naturels dérivés de sources végétales ont une plus grande importance, en raison de l'énorme potentiel qu'ils offrent dans la formulation de nouveaux médicaments qui peuvent protéger l'humanité contre de nombreuses maladies (Balunas et Kinghorn, 2005 ; Khalid *et al.*, 2013). Les produits à base de plantes sont utilisés dans le monde, principalement dans les pays en développement pour les soins de santé primaires, grâce à une meilleure acceptabilité culturelle, meilleure compatibilité avec le corps humain et moins d'effets secondaires par rapport aux médicaments synthétiques qui sont

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

considérés comme dangereux pour l'homme et l'environnement (Vinha *et al.*, 2012 ; Nag *et al.*, 2013 ; Popoola *et al.*, 2013).

Les produits naturels sont actuellement utilisés dans divers domaines principalement comme aromatisants, parfums et additifs par les industries cosmétiques et pharmaceutiques (Bauer et Garbe, 1985) et comme arômes (Oosterhaven *et al.*, 1995). Ces substances naturelles sont suggérées dans les denrées alimentaires (Farag *et al.*, 1989) puisqu' ils ont de grandes propriétés antimicrobiennes (Conner et Beuchat, 1984 ; Galli *et al.*, 1985).

L'aromathérapie (lat « aroma », grec « arôma » = arôme, grec « therapeia » = soin, cure) est l'utilisation médicale des extraits aromatiques de plantes (essences et huiles essentielles). Par contre la phytothérapie c'est l'usage de l'ensemble des éléments d'une plante (Belaiche; 1979). Le terme «aromathérapie» a été formulé en 1928, par René Maurice Gattefossé (1881-1950) un ingénieur en chimie, bâtisseur de la recherche scientifique sur les huiles essentielles, commença ses recherches sur le pouvoir de guérison des huiles essentielles après avoir brûlé sa main dans son laboratoire et l'avoir immergée dans l'huile de lavande. Il a été impressionné de la rapidité de guérison de sa brûlure (Pitman, 2004).

La composition chimique des plantes aromatiques est complexe et est constituée de deux fractions. La première fraction dite volatile est présente dans différents organes de la plante selon la famille ; cette fraction est composée de métabolites secondaires qui constituent l'huile essentielle (Heinrich *et al.*, 1983). La deuxième fraction dite non volatile de la plante, composés organiques non volatils, est composée essentiellement de coumarines, flavonoïdes (Cisowski, 1985), composés acétyléniques ainsi que des lactones sesquiterpéniques phénols ou polyphénols jouant un rôle fondamental dans l'activité biologique de la plante (Kubeczka *et al.*, 1982).

I.1. Les huiles essentielles

I-1.1. Définition et localisation

L'huile essentielle est définie selon la norme AFNOR NF T 75-006 comme «un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation» (AFNOR, 1980). Des procédés physiques sont utilisés pour séparer et récupérer l'huile essentielle de la phase aqueuse après hydrodistillation, par exemple la décantation en utilisant un solvant plus volatil que l'eau (éther diéthylique, pentane). Les huiles essentielles sont des liquides huileux volatiles, aromatiques, concentrés et hydrophobes qui proviennent de diverses parties de plantes comme les fleurs, bourgeons, graines, feuilles, branches, écorce, bois, fruits et racines. Les huiles essentielles sont généralement des terpénoïdes, responsable de l'arôme et de la saveur associés avec des herbes, des épices et des parfums, aussi appelées huiles volatiles car ils se répandent facilement dans l'air (Sumonrat *et al.*, 2008).

Les huiles essentielles n'existent que chez les végétaux, elles peuvent être stockées dans tous les organes des plantes aromatiques (i) Fleurs : oranger, rose, lavande, bouton floral (girofle) ; (ii) Feuilles : eucalyptus, menthe, thym, laurier, sarriette, sauge ; (iii) Fruits : fenouil, anis, épicarpes des Citrus ;(iv) Tiges : citronnelles, (v) Rhizomes et racines : gingembre, vétiver, iris ; (vi) Graines : noix de muscade, coriandre ; (vii) Bois et écorces : cannelle, santal, bois de rose (Leon, 2005 ; Teixeira *et al.*, 2013).

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles se font généralement au niveau des structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur la surface de la plante (Brunechon, 1987). Les huiles essentielles sont produites dans des cellules glandulaires spécialisées recouvertes d'une cuticule. Elles sont alors stockées dans, des cellules à huiles essentielles (*Lauraceae* ou *Zingiberaceae*), des poils sécréteurs

(*Lamiaceae*), des poches sécrétrices (*Myrtaceae* ou *Rutaceae*) ou dans des canaux sécréteurs (*Apiaceae* ou *Asteraceae*) (Bruneton, 1999). Elles peuvent aussi être transportées dans l'espace intracellulaire lorsque les poches à essences sont localisées dans les tissus internes. Sur le site de stockage, les gouttelettes d'huile essentielle sont entourées de membranes spéciales constituées d'esters d'acides gras hydroxylés hautement polymérisés, associés à des groupements peroxydes. En raison de leur caractère lipophile et donc de leur perméabilité extrêmement réduite vis-à-vis des gaz, ces membranes limitent fortement l'évaporation des huiles essentielles ainsi que leur oxydation à l'air (Teuscher *et al.*, 2005).

I.1.2. Rôle dans la nature

Les huiles essentielles sont responsables de l'odeur caractéristique des plantes aromatiques qui est importante pour attirer les insectes pollinisateurs de graines. En plus, les huiles essentielles jouent un rôle défensif contre les prédateurs et les maladies (De Sousa, 2015). Ce rôle est lié à leur activité antibactérienne, antifongique et antiviral assurant alors une protection des plantes (Croteau, 1992 ; bakkali *et al.*, 2008).

I.1.3. Composition des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont l'un des plus importants produits naturels provenant de plantes pour leurs diverses propriétés biologiques à usages médicamenteux (Elshafie *et al.*, 2015). Les industries exigent une connaissance parfaite de la composition chimique des huiles essentielles dont le but de contrôler la qualité et la régularité en vue d'une bonne commercialisation et de valorisation. En effet, ces huiles essentielles constituent souvent une matière première destinée à des secteurs d'activités aussi divers que ceux de la parfumerie, des cosmétiques, des industries pharmaceutiques et de l'agroalimentaire (Joulain, 1994).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Quel que soit le secteur concerné, l'analyse des huiles essentielles reste une étape importante qui, malgré les développements des méthodes de séparation et d'identification, demeure une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques (Joulain, 1994).

La composition chimique des huiles essentielles est complexe et résulte très souvent d'un mélange pouvant contenir de 10 à plus de 200 constituants possédant des structures et des fonctions chimiques très diverses (Bruneton, 1999). L'étude de la composition chimique est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) (Salzer, 1977).

Les constituants des huiles essentielles peuvent être répartis en deux classes en fonction de leur voie de biosynthèse : (i) les terpénoïdes (les plus volatils c'est-à-dire à masse moléculaire peu élevée) spécialement les monoterpènes: (C 10) cinéol, menthol, qui constituent parfois plus de 90 % de l'huile essentielle, et sesquiterpènes: (C 15) caryophyllène, humulène, bien que des diterpènes (C 20) peuvent aussi être présents (Dorman et Deans, 2000), dans ce groupe les hydrates de carbone, phénols, alcools, éthers, aldéhydes et cétones, responsables de l'activité antimicrobienne ainsi que de leurs parfums (Sumonrat *et al.*, 2008). (ii) le groupe des composés aromatiques représenté par les phénylpropanoïdes est beaucoup moins fréquent, comme le safrol, l'apiol, l'anisaldéhyde, l'eugénol, la vanilline et le cinnamaldéhyde (Buchanan *et al.*, 2000). On y trouve également, et en faibles concentrations des acides organiques, des cétones et des coumarines volatiles (EL kalamouni, 2010).

Les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes. Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs : les facteurs intrinsèques, liés à l'espèce, au type de clone, à l'organe concerné, à l'interaction avec l'environnement (type de sol ou climat, ...) et au degré de maturité du végétal concerné, voire au moment de la récolte au cours de la journée. Une même plante d'origine géographique différente, ce qui conduit à une variation de la nature du sol, peut produire des huiles essentielles différentes (Bowes, 2003). C'est le cas par exemple, du thym vulgaire à géranjol ne produit cette dernière qu'en hiver alors que l'acétate de géranyle la remplacera en été (Viaud, 1993). et les facteurs extrinsèques, liés à la méthode d'extraction choisit (Besombes, 2008).

I.1.4. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Plusieurs méthodes sont utilisées pour l'extraction des huiles essentielles, des méthodes traditionnelles qui sont les plus utilisées c'est le cas de: l'hydrodistillation ou l'enfleurage (Meyer-Warnod *et al.*, 1984); des méthodes innovatrices comme l'extraction au CO₂ supercritique et l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (Capuzzo *et al.*, 2013).

I.1.4.1. Hydrodistillation

Cette méthode consiste à évaporer l'huile essentielle en chauffant un mélange d'eau ou d'autres matériaux comme les solvants avec la plante, suivie par la liquéfaction des vapeurs dans un condenseur, cette dernière étape peut s'effectuer sans ou avec retour d'eau dans le ballon. Ce recyclage est dit cohobage et le système conçu pour l'opération est appelé Clevenger. La distillation de la plante s'effectue soit avec une immersion de la plante dans l'eau ou par l'injection directe de la vapeur en plaçant la matière végétale sur une grille perforée et n'est pas en contact avec l'eau (Fabrocini, 2007).

Les principes volatils sont entraînés par les vapeurs d'eau puis refroidis et enfin séparés de la phase par décantation (Moro-Buronzo, 2008).

I.1.4.2. Enfleurage

C'est une méthode complexe, elle n'est plus utilisée sauf pour les fleurs. Celles-ci sont étalées délicatement sur des plaques grasses qui absorberont tout le parfum. Les corps gras vont, ensuite, être épuisés par un solvant. Une fois l'arôme des fleurs absorbé, les fleurs sont remplacées par d'autres fraîches, et ceci jusqu'à saturation du corps gras. Au bout de 24 heures, le corps gras et les H.E sont séparés (Moro-Buronzo, 2008).

I.1.4.3. Extraction au CO₂ supercritique

L'extraction de fluide supercritique (EFS) est un processus consistant à séparer une composante de l'autre en utilisant les fluides supercritiques au lieu d'un solvant d'extraction. Cette méthode est utilisée pour l'extraction des huiles essentielles, dont 90 % l'extraction est exécutée avec le dioxyde de carbone (CO₂) pour plusieurs raisons pratiques. Outre une pression critique relativement faible (74 bars) une température de 32C°, le CO₂ est relativement non toxique, ininflammable, non corrosif, sans danger, disponible en grande pureté à un coût relativement faible et s'élimine facilement de l'huile (Rozzi *et al.*, 2002). Le seul inconvénient du CO₂ est son manque de polarité pour l'extraction des composés polaires (Pourmortazavi *et al.*, 2007). Il a été constaté que des extraits préparés par EFS a produit une activité antioxydante plus élevée que les extraits préparés par d'autres méthodes (Fadel *et al.*, 1999). Cette méthode d'extraction produit un meilleur rendement, un coefficient de diffusion plus élevé et une plus faible viscosité. Beaucoup d'huiles essentielles qui ne peuvent pas être extraites par distillation à la vapeur peuvent être obtenues par extraction au dioxyde de carbone.

Néanmoins, cette technique est très coûteuse en raison du prix de l'équipement. L'huile supercritique s'est avéré pour être de qualité supérieure, avec les meilleures résultats d'activités (Capuzzo *et al.*, 2013).

I.1.4.4. Extraction assistée par micro-onde

Cette technique est rapide, économique (pas de solvants) et elle n'est pas thermiquement dangereuse (Mandal *et al.*, 2007). Golmakani *et al.* (2008) ont utilisé avec succès un four à micro-ondes pour l'extraction des principes actifs des plantes. L'efficacité d'hydrodistillation assistée par micro-ondes dépend fortement de la puissance des micro-ondes utilisés (Brachet *et al.*, 2002). Le montage utilisé se rapproche d'un montage d'hydrodistillation classique. Le réacteur contenant seulement le matériel végétal est chauffé par les micro-ondes à l'intérieur du four, les vapeurs sont ensuite entraînées dans le col de cygne avant d'être condensées dans le réfrigérant puis recueillies dans un essencier (Lucchesi, 2006).

I.2. Mécanismes d'action des huiles essentielles

I.2.1. Activité antioxydante

La formation des radicaux libres est un processus continu et évolutif. Ces molécules jouent un rôle vital dans la signalisation cellulaire, contrôle de tonalité vasculaire, défense contre les micro-organismes, la génération de cellule et la régulation de l'homéostasie (Basu, 2010). Toutefois, lorsqu'il y a un excès des radicaux libres, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) participent également à la pathogenèse liées à des dommages de l'ADN et aux protéines causant des modifications des gènes et des mutations protéiques, des dommages glucooxydatifs et une dégradation des lipides membranaires des cellules (Carocho et Ferreira, 2013).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Le mécanisme de défense de l'organisme en général diminue avec l'âge et peut être compromis par les diverses formes de stress oxydatif résultant de facteurs environnementaux causant des troubles de santé : le cancer, le diabète, l'athérosclérose. Toutes ces conditions, ainsi que le processus de vieillissement, sont associés à un stress oxydatif en raison de l'élévation des ROS ou une désintoxication insuffisante de ces espèces, favorisant ainsi le processus de vieillissement précoce ou prématurée de la peau (Igwe et Echeme, 2014).

Il a été démontré qu'*in vitro* les plantes possédaient une capacité antioxydante en convertissant les radicaux libres en produits stables et en inhibant l'activité dégénérative de certaines enzymes de la peau (Ndlovu *et al.*, 2013). Les substances polyphénoliques des huiles essentielles possèdent de nombreuses propriétés biologiques, mais la propriété la mieux décrite dans tous les groupes de composés phénoliques est leur capacité d'agir comme antioxydant. L'activité antioxydante des phénols dépend de la disposition des groupes fonctionnels autour de la structure nucléaire, la configuration, la substitution et le nombre total des groupes hydroxyles qui influencent considérablement les différents effets antioxydants des radicaux et la chélation des métaux (Kumar et Pandey, 2013).

De nombreux auteurs ont rapporté les propriétés antioxydantes et antiradicalaires des huiles essentielles (Sacchetti *et al.*, 2005). Les huiles essentielles, ont été largement évaluées concernant leurs activités antioxydantes puisqu'ils ont été utilisés dans les aliments industriels comme des antioxydants naturels (Hellali, 2016).

Ruberto et Baratta (2000), qui avaient étudié l'activité antioxydante de 98 composants pure de l'huile essentielle de *Teucrium marum*, représentant les principales classes des composés typiques des huiles essentielles, ont montré que les hydrocarbures sesquiterpéniques exerçaient un effet antioxydant faible, alors que les hydrocarbures monoterpéniques ont montré un effet antioxydant significatif, avec plusieurs variantes en

raison des différents groupes fonctionnels. Teixeira *et al.*, (2013) qui ont décrit que l'activité antioxydante élevée de l'huile essentielle du clou de girofle indienne est due à son composé majoritaire l'eugénol qui est un phénylpropanoïde, connu comme un puissant antioxydant.

L'effet antiradicalaire de l'huile essentielle pourrait être dû à la présence d'une grande proportion des composés phénoliques (Almeida *et al.*, 2011). Il est rapporté que les composés phénoliques peuvent donner un atome d'hydrogène aux radicaux libres arrêtant de ce fait la réaction en chaîne de propagation pendant le processus d'oxydation des lipides (Sánchez -Mareno *et al.*, 1998). Les composés phénoliques réagissent selon un mécanisme proposé par Sherwin (1976), l'antioxydant cède un radical hydrogène, qui peut être un transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, par un transfert de protons, pour donner un intermédiaire radical stabilisé.

I.2.2. Activité anti-inflammatoire

L'inflammation est une réponse physiopathologique de la blessure, d'une infection ou d'une destruction caractérisée par la chaleur, la rougeur, la douleur et le gonflement. L'inflammation est une réaction normale de corps pour se protéger des lésions causées par des traumatismes physiques, agents chimiques ou microbes pathogènes. C'est la réponse de l'organisme pour inactiver ou détruire les organismes envahisseurs, pour éliminer les irritants. Elle est déclenchée par la libération de médiateurs chimiques des tissus lésés et migration des cellules. Les médicaments les plus couramment utilisés pour la gestion d'affections inflammatoires sont les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), qui ont plusieurs effets indésirables en particulier l'irritation gastrique conduisant à la formation d'ulcères gastriques (Bennett, 2005 ; Tripathi, 2008).

Les recherches approfondies sur les différentes espèces de plantes et leurs principes actifs thérapeutiques utilisés dans le traitement de la goutte, de l'arthrite et de la fièvre ont aboutis à la mise en évidence de nouveaux composés ayant des activités anti-inflammatoires significatives (Joseph *et al.*, 2015).

Un effet anti-inflammatoire a été décrit pour de nombreuses huiles essentielles, tels que celles de : *Protium strumosum*, *Protium lewellyni*, *Protium grandifolium* (Siani *et al.*, 1999). L'huile essentielle des racines de *Carlina acanthifolia* est capable d'inhiber l'inflammation induite par une injection de carraghénane chez le rat (Dordevic *et al.*, 2007).

Les familles biochimiques à action anti-inflammatoire et/ou antalgique qui constituent les composés de différentes huiles essentielles sont : les Aldéhydes monoterpéniques, les Esters terpéniques, les Sesquiterpènes et les Monoterpènes, l'Eugénol (phénol aromatique), l'Eucalyptol (oxyde terpénique) ou 1,8 cinéole, Alcools terpéniques (Sesquiterpénols, Monoterpénols), les Cétones terpéniques, les Phénol méthyl-éthers (Spinola, 2016).

I.2.3. Activité antimicrobienne

I.2.3.1. Activité antibactérienne

L'utilisation des antibiotiques pour lutter contre des micro-organismes pathogènes est limitée en raison de leurs effets cancérogènes, leur toxicité aiguë et leur danger potentiel pour l'environnement en plus du problème de résistance bactérienne à cette classe thérapeutique. Plus récemment, la prévalence de la résistance aux antimicrobiens a incité les chercheurs à rechercher de nouvelles molécules antimicrobiennes pour inhiber les diverses bactéries pathogènes humaines (Rudramurthy *et al.*, 2016). À cet égard, l'exploitation des huiles essentielles pour contrôler l'épidémie des bactéries pathogènes

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

peut être utile pour lutter contre diverses maladies infectieuses (Mulyaningsih *et al.*, 2010). L'impact antimicrobien des huiles essentielles et de leurs composants chimiques est démontré par plusieurs études (Duschatzky *et al.*, 2005 ; Lang and Buchbauer, 2012 ; Akhtar *et al.*, 2016).

L'action des huiles essentielles s'exerce sur un large spectre de bactéries, incluant les bactéries à Gram positives et les bactéries à Gram négatives. La structure de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positives les rend toutefois plus sensibles à l'action des huiles essentielles (Raut et Karuppayil, 2014). La structure de la paroi cellulaire des bactéries Gram négatives les rend moins sensibles à l'action des huiles essentielles. La présence d'une membrane plasmique hydrophile externe chez les Gram négatives empêche la pénétration intracellulaire des molécules hydrophobes composant la majorité des huiles essentielles. Cette caractéristique confère aux bactéries négatives une résistance à l'huile et même aux antibiotiques (Lewis et Ausubel, 2006).

La composition chimique des extraits de plantes peut être influencée par de multiples facteurs, incluant l'espèce à laquelle appartient la plante prélevée, le matériel végétal (feuilles, fleurs, rameaux, fruits) utilisé pour produire les extraits, ainsi que le procédé employé pour réaliser l'extraction. La combinaison de ces divers paramètres semble être une explication aux différences d'activité antibactérienne observées entre les huiles essentielles (Burt *et al.*, 2004).

Dans l'ensemble, le mécanisme d'action antibactérien est favorisé par une série de réactions biochimiques dans la cellule bactérienne, qui dépendent du type et des caractéristiques des constituants chimiques présents dans l'huile essentielle (Nazzaro *et al.*, 2013). Les constituants chimiques de l'huile essentielle ont une propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne (Keita, 2002). Les molécules oxygénées, qui entrent dans la

composition des huiles essentielles, sont généralement plus actives que les molécules hydrocarbonées, connues pour leurs faibles propriétés antibactériennes. L'activité antibactérienne de ces molécules dépend, à la fois, du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Parmi les composés de l'huile essentielle les phénols, sont, du fait du caractère acide de leur substituant hydroxyle, décrits comme les composés les plus actifs. Les composés carbonylés, avec des groupements aldéhydiques ou cétoniques, et les alcools sont également reconnus pour leurs propriétés antibactériennes (Kalemba et Kunicka, 2003).

Les composants actifs de l'huile essentielle du Romarin tel que le cinéole, le camphre et l' α -pinène, agissent sur plusieurs sites de la cellule bactérienne (Rožman et Jersek, 2009). Des cellules bactériennes traitées avec la fraction oxygénée de l'huile essentielle de *Quercus infectoria* est également endommagé. Le matériel intracellulaire forme des agrégats, qui présentent un aspect vacuolaire, due à une modification de la perméabilité membranaire qui conduit à une perte des éléments cytoplasmiques (Suwalak et Voravuthikunchai, 2009).

I.2.3.2. Activité antifongique

Les huiles essentielles constituent une source potentielle pour des nouveaux médicaments antifongiques, soit sous leur forme pure soit sous forme de dérivés des composés originaux pour une optimisation thérapeutique plus efficace et plus sûre (Peralta *et al.*, 2015). Les huiles essentielles ou leurs composés actifs sont également employés comme agents antifongiques dans les industries agro-alimentaires (Zambonelli *et al.*, 2004).

L'eugénol est un composé antifongique efficace qui cause des dommages permanents aux cellules des levures tels que *Candida albicans* (Latifah-Munirah *et al.*,

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

2015), et des champignons : *Aspergillus ochraceus*, *A. versicolor*, *A. niger*, *A. fumigates*, *Trichoderma viride* et *P. funiculosum* (Beatovic *et al.*, 2015).

Papajani *et al.* (2015) ont rapporté l'activité antifongique de l'huile essentielle de romarin sur les dermatophytes tels que : *Epidermophyton floccosum*, *Arthroderma cajetani*, *Microsporum gypseum*, *Microsporum canis*, *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* et *Trichophyton tonsurans*, et des champignons phytopathogènes tels que *Botrytis cinerea* et *Pleomorphomonas oryzae*.

Les composés phénoliques des huiles essentielles modifient la perméabilité cellulaire fongique en interagissant avec les protéines de la membrane. Cela provoque la déformation de la structure cellulaire, et perturbe la fonctionnalité aboutissant alors à la perte des macromolécules conduisant à une inhibition de la croissance fongique (Pramila, *et al.*, 2012).

D'autre part, la pectine composé essentiel des parois des cellules végétales nécessaire à l'adhésion cellulaire, est hydrolysée par les pectinases fongiques. Il semblerait que les composés phénoliques des HE joueraient un rôle inhibiteur de celles-ci (Vermeriss et Nicholoso, 2006).

L'exposition des cellules fongiques à l'huile essentielle conduit généralement, à la coagulation des composants cellulaires dus à des dommages irréversibles de la membrane cellulaire. Chez la levure, l'huile essentielle établit un potentiel membranaire en perturbant la production d'ATP, ce qui conduit à la lyse cellulaire (Aleksic et Knezevic, 2014).

Les huiles essentielles ont la capacité de pénétrer et de perturber la paroi cellulaire des champignons et des membranes cytoplasmiques grâce à un processus de perméabilisation, ce qui conduit à la désintégration des membranes mitochondriales. Ceci est causé par des altérations dans le flux. Cela peut aussi endommager les lipides, les

protéines et les acides nucléiques contenus dans les cellules infectées par les champignons pathogènes (Arnal-Schnebelen *et al.*, 2004).

Les huiles essentielles pourraient également perturber la dépolarisation de la membrane mitochondriale en agissant sur les canaux d'ions, surtout les ions du Ca^{2+} , pompes à protons et pools d'ATP qui amène vers une diminution du potentiel membranaire. Ce changement dans la fluidité des membranes peut causer une perte d'électrolytes par la perturbation des voies de cytochrome C, des métabolismes des protéines et des concentrations d'ions du calcium. Par conséquent, cette modification de la perméabilité des membranes mitochondriales internes et externes peut entraîner l'apoptose des cellules conduisant à la mort cellulaire (Yoon *et al.*, 2000).

II. Les *Asteraceae*

II.1. Morphologie

Le nom *Asteraceae* provient du mot « Aster » = étoile, qui est en relation avec la forme de la fleur. Les *Asteraceae* (Sous-embanchement: *Angiospermes*, Classe: *Dicotylédones*, Sous-classe: *Gamopétales*, Ordre: *Astérales*, Famille : *Astéracées*).

C'est une plante annuelle, se présentant sous forme d'arbuste, de plante grimpante et arbre, mais dans la plus part des cas c'est une plante herbacée avec des feuilles isolées. Son appareil végétatif est reconnaissable par des inflorescences très caractéristiques : le capitule, involucre dans de nombreuses petites fleurs à l'extérieur et parfois seulement sous-tendus par des bractées. Les anthères sont fusionnés et forment un tube à travers lequel le style s'étend et sépare deux lobes stigmatiques et devient recourbés, tandis que le fruit à graine unique ont généralement un pappus plumeux (Galbany-casals, *et al.*, 2014).

II.2. Distribution

Les *Asteraceae* sont la plus grande famille de la floraison dans le monde, comprenant 23 600 espèces attribuées à 1620 genres et ont une distribution cosmopolite, mais sont particulièrement diversifiées dans les régions tropicales et subtropicales d'Afrique australe, la région méditerranéenne, Asie centrale, sud-ouest de la Chine et en Australie (Funk, *et al.*, 2009). Cette famille engendre en Algérie, 109 genres et 408 espèces (Quezel, 1963).

Cette famille est divisée en 13 sous-familles (Panero, *et al.*, 2014), dont la sous-famillee *Asteroideae* qui contient plus de 70 % des espèces actuellement reconnues. Les études moléculaires récentes ont révélé trois lignées principales au sein des *Asteroideae* (Robinson, 2004).

II.3. Phytochimie

La caractéristique commune de la famille des *Asteraceae* est la présence des différents composés tel que : les flavones, les flavanols, les alcaloïdes et les terpenoïdes (Menichini *et al.*, 1994). Cette composition chimique est à la base taxonomique de cette famille (Oksuz *et al.*, 1990).

II.4. Le genre *Helichrysum*

Helichrysum (Mill.) est classée dans la tribu *Gnaphalieae* qui contient 500 à 600 espèces. L'espèce la mieux étudiée de ce genre est *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. Le nom du genre est dérivé des mots grecs « helios » (soleil) et « chryos » (or) et se rapporte aux jaune durable et lumineux des inflorescences, appelées fleurs or-éternel ou éternelles (Pignatti, 1982). Ces espèces sont réparties principalement en Afrique, mais aussi en Europe, Asie et Australie (Hilliard, 1983 ; Manning et Goldbatt 2012). Les espèces *Helichrysum* sont généralement considérées comme des plantes vivaces

aromatiques avec poils dense ou feuilles laineuses et persistantes, et de capitules de variétés différentes (Wyk *et al.*, 2009). Cette plante est utilisée en phytothérapie vu sa diversification en produits bioactifs (Tolstikhina et Semenov., 1998).

II.5. Propriétés pharmacologiques du genre *Helichrysum*

Les espèces du genre *Helichrysum* ont été utilisées en médecine traditionnelle dans le monde en Europe, l'Égypte, l'Amérique du Nord, Chine et Australie. (Lwande *et al.*, 1993 ; Ruberto *et al.*, 2002). Ces plantes ont été utilisées en médecine traditionnelle dans la région méditerranéenne par exemple, pour traiter les lésions de la peau, en raison de son efficacité dans le traitement des cicatrices (Kladar *et al.*, 2015). C'est aussi le cas des espèces d'Afrique du sud connues pour leur utilisation dans les traitements des infections de la peau (Lourens *et al.*, 2008).

Ce genre possède aussi des propriétés anti-inflammatoires, antimicrobiennes et antioxydantes et comme complément alimentaire (Cavar *et al.*, 2015). L'espèce d'*H. microphyllum* répandue dans les îles Baléares, la Corse et la Sardaigne est utilisé traditionnellement pour atténuer la toux, les brûlures et comme un anti-rhumatismal, analgésique, antispasmodiques, antioxydants, antibactériens et antiallergiques (Ornano *et al.*, 2015).

Les espèces d'*Helichrysum* sont naturellement riches en métabolites secondaires, comme les composés phénoliques (flavonoïdes, dérivés de phloroglucinol et chalcones), les dérivés d' α -pyrone et les dérivés d'acétophénones (Lourens *et al.*, 2008), qui leur donnent une caractéristique d'application dans le domaine cosmétique et pharmaceutique comme anti-inflammatoire (Viegas *et al.*, 2014), agents antibactérien et antioxydant (Kolayli *et al.*, 2010 ; Rigan *et al.*, 2014).

II.6. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don

II.6.1. Description botanique

George Don avait décrit en 1830 l'espèce *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don pour la première fois, cette espèce est divisée en trois sous-espèces (*Helichrysum italicum* subsp. *italicum*, *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum*, *Helichrysum italicum* subsp. *serotinum* (Rovesti, 1930). C'est un arbuste ligneux nain à fleurs jaunes qui pousse sur les falaises sèches et les sols sableux très répandue le long de la côte et des îles de la mer Adriatique (Mastelić *et al.*, 2008).

II.6.2. Composition chimique de l'huile essentielle

Trois génotypes d'*H. italicum* ssp ont été identifiés présentent une composition chimique différente : (a) un génotype riche en nérol et ses esters ; (b) un génotype avec une dominance des α - et β -sélinène; (c) un génotype avec des quantités élevées de γ -curcumène. Les huiles essentielles d'*H. italicum* ssp. sont caractérisées par des quantités élevées de monoterpénoïdes tels que l'acétate de néryle, propanoate de néryle et l' α -pinène (Bianchini *et al.*, 2001 ; Paolini *et al.*, 2006).

Une huile essentielle d' *H. italicum* ssp. riche en géraniol et acétate de géranyle a été signalée pour les plantes récoltées en Grèce (Chinou *et al.*, 1996). D'autres études ont signalé des populations de *H. italicum* ssp. caractérisée par de grandes quantités de sesquiterpènes (Bianchini *et al.*, 2001).

La corrélation entre la composition de l'huile essentielle d'*H.italicum* et divers paramètres ont été montrées : la texture et l'acidité des sols, la composition inorganique de la plante et le sol, le stade de développement végétatif (Bianchini *et al.*, 2009). Par exemple : les huiles essentielles d'*H. italicum* de la Méditerranée ont montré des compositions différentes. L'huile essentielle d' *H. italicum* de la côte Adriatique (sous-

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

espèces non précisés) contient de l' α -pinène, α - et γ -curcumene comme principaux composants (Conti *et al.*, 2010), l'HE (*italicum* subsp) de Toscane contient principalement des α -pinène et acétate de néryle (Bianchini *et al.*, 2003), alors qu'un échantillon d'huile du sud de l'Italie est dominé par l'iso-italicene époxyde (Mancini *et al.*, 2011). D'autre HE d'origine italienne contenait principalement du γ -curcumene, β -sélinène et α -sélinène (Morone-Fortunato *et al.*, 2010). D'autre part, l'huile de l'île grecque d'Amorgos (ssp *italicum*) était dominée par le géraniol (Chinou *et al.*, 1996), tandis que les plantes de Crète (ssp *microphyllum*) produisent une huile contenant principalement des hydrocarbures sesquiterpène (Roussis *et al.*, 2000).

Bianchini *et al.* (2003) ont étudié et comparé la composition chimique des huiles essentielles d'*H. italicum* issues de plusieurs régions d'Europe, de Corse, de Toscane, de Sardaigne, et de l'archipel Toscan. Les résultats sont résumés dans le **(tableau 1)**. La subsp. *italicum* se trouve en Corse, en Toscane et dans l'archipel Toscan. Par contre en Sardaigne il y a la dominance de la subsp. *microphyllum* qui est caractérisé par une huile essentielle riche en composés oxygénés (70-75%) et d'acétate de néryle (40-52) et l'absence de β -dicétones. Les composés oxygénés présents en pourcentages élevés dans tous les sous-espèces sauf chez l'huile essentielle de Toscane qui a une teneur élevée en composés carbonés (40-77%). Les pourcentages des composés majoritaires des échantillons issus de Corse et de l'archipel Toscan sont relativement proches.

Ces différences de composition chimique des huiles essentielles d'*H.italicum* peuvent s'expliquer par le moment de floraison, la région de récolte, les conditions climatiques et la nature du sol (Bianchini *et al.*, 2003).

Tableau 1. Les pourcentages des composés majoritaires des huiles essentielles d’*H.italicum* issues de Corse, de Toscane, de Sardaigne et de l’archipel Toscane (Bianchini *et al.*, 2003).

Composition chimiques %	<i>Helichrysum italicum</i>			
	subsp. <i>italicum</i> (Corse)	subsp. <i>microphyllum</i> (Toscane)	subsp. <i>italicum</i> (Sardaigne)	subsp. <i>italicum</i> (l’archipel Toscane)
hydrocarbonnés	10-32	40-77	11-16	14-31
oxygénés	60-77	8-44	70.75	57-79
γ -curcumène	1-13	5-14	1-3	5-14
β -dicétones	4-18	0.4-7	-	4-42
Acétyle de néryle	16-43	0.3-21	40-52	15-45

II.6.3. Les activités biologiques de l’huile essentielle

Helichrysum italicum a été largement utilisé en médecine populaire (**tableau 2**). Dans le système médical gréco-romain, *H. italicum* a été utilisé comme plante anti-inflammatoire et anti-infectieuse (Bataa et Maxia, 2006). En outre, des fleurs séchées d’*H. italicum* sont connues dans la médecine traditionnelle comme un cholérétique, diurétique et expectorante (Chinou *et al.*, 1996). Les activités biologiques de nombreux métabolites d’*H. italicum*, en particulier les composantes volatiles des huiles essentielles, produites dans les poils glandulaires présentent sur les feuilles et les capitules de la plante (Morone Fortunato *et al.*, 2010), ont été confirmées dans de nombreuses études. Des études antérieures avaient signalé de nombreuses activités : anti-inflammatoire (Sala *et al.*, 2002), antioxydantes (Appendino *et al.*, 2007), anti-allergiques (Chinou *et al.*, 1996), antibactériennes (Nostro *et al.*, 2001) et antivirales (Appendino *et al.*, 2007).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 2. Etudes ethnopharmacologique d' *H. italicum* dans plusieurs régions, en indiquant l'utilisation médicale.

L'année	Région	Préparation	L'utilisation Médical	Partie de Plante	Références
1989	Grenade, Espagne	Infusion bain de Bouche	Mal des dents	Fleure	(González-Tejero, 1989)
1999	Giglio, Archipel toscan , Italie	Infusion En Vapeur	Toux Rhume Trachéite	Partie aérienne	(Uncini Manganelli et Tomei, 1999)
2000	Garfagnana, Sardaigne Italie	Infusion En Vapeur	Rhume	Partie aérienne	(Pieroni <i>et al.</i> , 2000)
2005	Jaén, Espagne	-	Rhume Désordre Digestif	-	(Pardo de Santayana <i>et al.</i> , 2005)
	Ibi, Alicante, Espagne	Infusion Bain de Bouche	Mal Des Dents Antiseptique de Bouche	Fleure	(Barber <i>et al.</i> , 2005)
2007	Alt Empordà, Catalunya, Espagne	Infusion	Distordre digestif	Fleure	(Parada, 2007)
	Bosnie Herzégovine	Infusion	La Toux Trouble de Foie	Fleure	(Redzic, 2007)
	Calabre, Italie	Infusion En poudre avec le miel	Pharyngite Bronchite	Fleure	(Passalacqua <i>et al.</i> , 2007)
2008	Sannio, Bénévent, Campanie, Italie	Infusion Décoction	La toux	Fleure	(Guarino <i>et al.</i> , 2008)
	La Corogne, Espagne	Infusion pour l'utilisation externe	L'inflammation de la peau	Fleure	(Latorre, 2008)
	Valence, Espagne	-	Les infections Parasitaires des intestins	-	(Latorre, 2008)
2009	Baixo Alentejo, Barlavento, Algarve, Portugal	L'huile essentielle	Désordres dermatologiques	Partie aérienne	(Proença da Cunha <i>et al.</i> , 2007)
2013	Parc National Du Cilento Et Vallo Di Diano, Compagnie, Italie	Decoction	Asthme	Fleure	(Di Novella <i>et al.</i> , 2013)

MATERIEL

ET

METHODES

III.1. Produits chimiques

Les produits chimiques utilisés dans la présente étude sont tous de grade analytique. Le 2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl (DPPH), l'aspirine, le tween 80, le Diméthyle sulfoxyde (DMSO), l'acide trichloracétique (TCA), l'acide ethylenediamine tétraacétique (EDTA), le chlorure ferrique (FeCl_3), le ferricyanide de potassium [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$], sont des produits Sigma (Allemagne). Le 2, 6 di-tert-butyl-4-methyl phenol (BHT) est un produit Fluka (France). Les sels utilisés pour la préparation des solutions tampons sont obtenus auprès de Panreac (Espagne). Les solvants organiques et les colorants Vert d'iode, Carmin aluné, bleu de méthylène sont obtenus auprès de Prolabo (France). 5-formylcytosine (5FC) et les antibiotiques provenant de Sanofi Diagnostics Pasteur. Les milieux de culture pour bactéries, la gélose Mueller Hinton (MH), la gélose nutritive (GN) et les bouillons nutritifs sont aussi des produits Sigma. Par contre la gélose dextrose à la pomme de terre (PDA) et le bouillon de dextrose à la pomme de terre (PDB) utilisés pour la culture des champignons sont préparés au laboratoire (**annexe I**).

III.2. Matériel végétal

La plante *Helichrysum italicum* (Roth) G. Dona (**figure 1**) est récoltée durant la phase de floraison en juin 2013 dans la région de Bejaia (nord d'Algérie). Elle est identifiée par le Pr. Kaabeche Mohamed (Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ferhat Abbas Sétif 1). La partie aérienne est nettoyée, séchée à l'ombre et à température ambiante. Ensuite le matériel végétal est coupé en petits morceaux avec un couteau universel puis stockée à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation.



Figure 1. Photographie des parties aériennes d'*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don récolté dans le nord de l'Algérie

III.3. Matériel biologique

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*Helichrysum italicum* est évaluée sur 12 souches bactériennes de référence, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Klebsiella pneumonia* ATCC 4352, *Enterococcus cereus* ATCC 2035, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 9372, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, deux levures *Candida albicans* ATCC 10231 et *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 et quatre champignons *Fusarium solani* var. *coeruleum*, *Alternaria alternata*, et *Ascochyta rabiei* proviennent du laboratoire de Microbiologie Appliquée, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ferhat Abbas, Sétif 1 et de laboratoire de Microbiologie, Faculté des Sciences, Université de

M'sila. Les autres souches fongiques ont été isolées et identifiées au niveau du laboratoire de Microbiologie Appliquée, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ferhat Abass, Sétif 1.

III.4. Méthodes expérimentales

II.4.1. Technique histologique

Une étude histologique des coupes anatomiques des feuilles et tiges d' *Helichrysum italicum* est réalisée par la technique de la double coloration (Prat, 2007). Sur une coupe aussi fine que possible, les coupes sont placées successivement dans des bains successifs, l'eau de javel à 12° (pendant 15 min); pour vider le contenu cytoplasmique des cellules puis l'acide acétique à 20% (pendant 3 min); pour neutraliser l'excès d'eau de javel, suivit du vert d'Iode (pendant 3 min); colore les parois lignifiées ou tubérisées en vert, bleu, ou violet selon le degré de modification de la paroi (degré de lignification) comme celle du bois et du sclérenchyme. Le dernier bain utilisé est le Carmin aluné (5 à 10 min), ce dernier colore les parois cellulosesiques en rose (caractéristique du parenchyme celluloseique, du liber et du collenchyme). A la fin les coupes sont rincées avec de l'eau distillée entre chaque étape de coloration et préparés pour observations microscopique. Les coupes doivent être immédiatement recueillies dans l'eau pour éviter la déshydratation.

II.4.2. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle est réalisée par hydrodistillation en utilisant un clevenger. Un mélange de 100 g de matière sèche et 1L d'eau distillée sont chauffés jusqu'à ébullition dans un chauffe ballon (Garnero, 1996) (**figure 2**).

Les vapeurs chargées d'huile essentielle passent à travers le tube vertical puis dans le serpentín de refroidissement où aura lieu la condensation. Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans le tube rempli auparavant d'eau distillée. L'huile essentielle

de faible densité par rapport à l'eau, surnage à la surface de cette dernière. L'huile ainsi obtenue est récupérée est conservée dans des flacons opaques bien scellés à basse température (4-5 C°). L'opération d'extraction dure trois heures à partir du début d'ébullition (El Kalamouni, 2010).

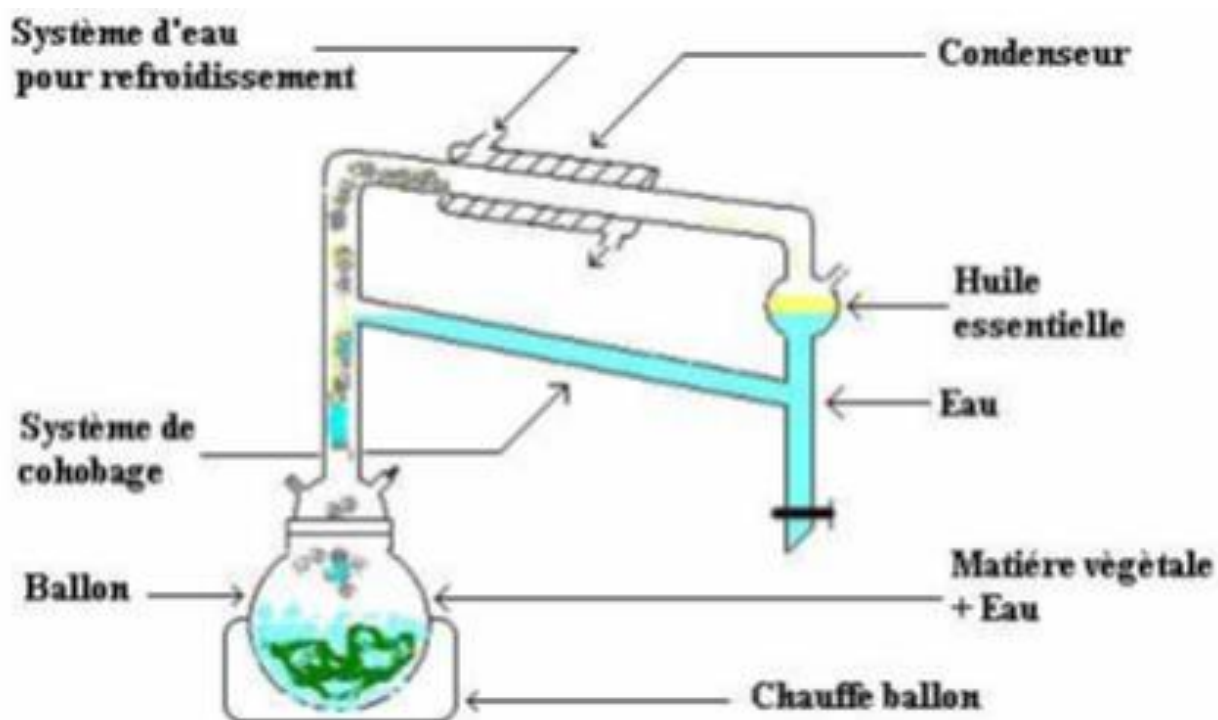


Figure 2. Appareillage type Clevenger utilisé pour l'hydrodistillation d'huile essentielle (El Kalamouni, 2010).

III.4.3. Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante utilisée (Caree, 1953). Le rendement exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante :

$R\% = P1 / P2 \times 100$ Où R% : rendement de l'huile en pourcentage ; P1 : poids de l'huile en g ; P2 : poids de plante en g.

III.4.4. Analyse de l'huile essentielle

L'analyse GC/MS a été effectuée selon la méthode décrite par Popova *et al.* (2005). La séparation et l'identification des constituants de l'huile essentielle sont réalisées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) à colonne apolaire en utilisant un système de Hewlett-Packard GC-MS (GC : 6890 série II ; MS-HP 6972). La colonne capillaire en silice fondue HP5 (30 m de long, de 0.25 mm de diamètre intérieur, épaisseur du film de 0.25 μm) et directement couplé à la SM. La température est réglée de 100 à 325°C à raison de 5°C / min. Le gaz vecteur était l'hélium, avec un débit de 20 ml/min, le rapport de division est de 50 :1, et la température de l'injection est de 280°C, volume injecté 1 μl . L'appareil est contrôlé par un système informatique de type «HP ChemStation », la gestion de l'opération de l'appareil est de suivre l'évolution des analyses chromatographiques avec une bibliothèque de spectres de masse de NIST 2008. Les constituants d'huile essentielle sont identifiés par comparaison de leurs spectres de masse et leurs indices de rétention (RI) avec celles de la bibliothèque spectrométrie de masse NIST 08. L'analyse par GC/MS a été réalisée au niveau du centre SACE de l'université de Murcie, Espagne.

III.4.5. Activités anti-oxydantes

III.4.5.1. Réduction du DPPH

L'activité antioxydante exprime la capacité à réduire les radicaux libres. Elle est étudiée par la méthode du DPPH°, ce radical libre présente une coloration violet foncé, lorsqu'il est piégé par les antioxydants, il apparaît sous sa forme réduite de couleur jaune pâle (**Figure 3**) (Soares *et al.*, 1997 ; Molyneux, 2004).

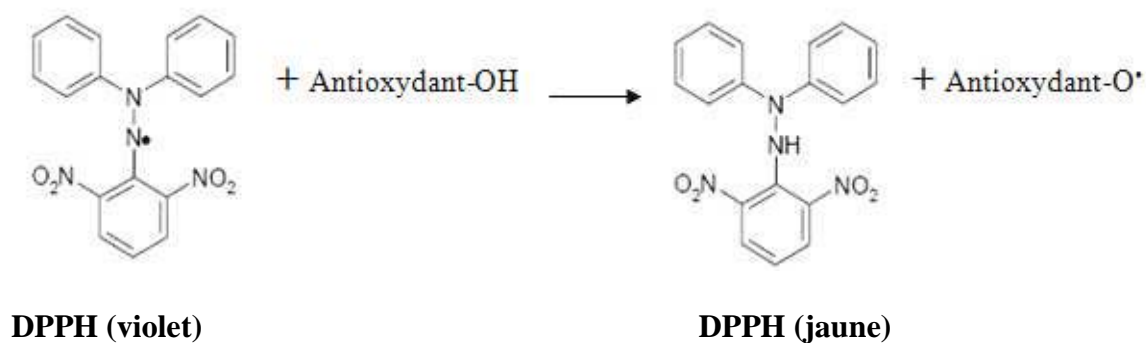


Figure 3. Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (Molyneux, 2004)

La réduction du radical libre DPPH° par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517nm provoquée par des antioxydants (Molyneux, 2004).

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire de l'HE vis-à-vis du DPPH est effectuée selon la méthode décrite par Que *et al.*, (2006) avec une légère modification. 600 µL de diverses solutions d'HE ou standard BHT (l'hydroxytoluene) et l'acide gallique (AG) sont mélangés avec 600 µL d'une solution de méthanol de 0,004 % de DPPH. L'huile est testé à des concentrations allant de 0 à 13µg/ml, pour le l'hydroxytoluene (BHT) de 0 à 183µg/ml et pour l'acide gallique (AG) 0 à 9.9µg / ml. Le BHT et l'AG sont utilisés comme des antioxydants de référence. Le mélange réactionnel est incubé 30 min à l'obscurité et à température ambiante, puis l'absorbance est lue à 517 nm.

Selon Dung *et al.* (2008) l'activité antiradicalaire (pourcentage d'inhibition) est estimée selon la formule suivante :

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A₀ : absorbance du contrôle.

A₁ : absorbance de l'échantillon test.

Le pourcentage d'inhibition permet de calculer le paramètre EC_{50} « Efficient Concentration ». Il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH (Molyneux, 2004). Ces EC_{50} sont déterminées graphiquement par la droite de régression dont l'abscisse représente la concentration des échantillons et l'ordonnée l'activité antioxydante en pourcentage. Le pouvoir antiradicalaire relatif (APR) est inversement proportionnel à l' EC_{50} ou $APR = 1/EC_{50}$ (Prakash *et al.*, 2007).

III.4.5.2. Réduction du fer

Le pouvoir réducteur est déterminé selon la méthode d'Oyaizu (1986). 2.5 mL de chaque concentration d'HE, 2.5 mL de tampon de phosphate de sodium 200 mmol/l (pH 6,6) et 2.5 mL de ferrocyanure de potassium [K_2FeCN_6] à 10 mg/mL sont ajoutés. Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 minutes. Après refroidissement, 2.5 mL d'acide trichloracétique à 100 mg/mL sont ajoutés, le mélange est centrifugé à 200g pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu (5 mL) est mélangé avec 5mL d'eau distillée et 1mL de chlorure ferrique [$FeCl_3$] à 1 mg/mL. L'absorbance est mesurée à 700 nm contre un blanc contenant le tampon phosphate. Le principe de cette méthode est basé sur la mesure de l'absorbance du complexe bleu de Prusse formé suite à l'addition d'un excès de Fe^{3+} .

Une absorption plus élevée indique un pouvoir réducteur plus élevé. EC_{50} (d'HE $\mu\text{g/mL}$) est la concentration effective au cours de laquelle l'absorbance est de 0.5 pour réduire la puissance et est obtenue par extrapolation à partir d'une analyse de régression linéaire. L'acide ascorbique et le BHT sont utilisés comme contrôles positifs (Huangs et Mau, 2006).

III.4.6. Activité anti-inflammatoire *in vitro*

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* est évaluée par la méthode de dénaturation des protéines (Chandra *et al.*, 2012). Le Diclofinac sodique est un médicament anti-inflammatoire puissant utilisé comme témoin positif. Le mélange réactionnel (5 ml) se compose de 0,2 ml d'albumine d'œuf (de l'œuf de poule frais), 2.8 ml de solution saline tamponnée au phosphate (PBS ; pH 6.4) et 2 ml de diverses concentrations d'huile essentielle d'*Helichrysum italicum*, pour avoir les concentrations finales suivantes 35.2, 70.4, 140.8, 281.6 563.2 et 1126.4 µg/ml. Le même volume d'eau distillée a servi de témoin. Puis les mélanges sont incubés à 37±2°C pendant 15 minutes, ensuite chauffés à 70°C pendant 5 minutes. Après refroidissement, l'absorbance est lue à 660 nm. Ce même protocole est réalisé pour les concentrations finales de Diclofenac sodique, dont les concentrations finales sont 78.125, 156.25, 312.5, 625, 1250 et 2500 µg/ml.

III.4.7. Activité anti-hémolytique

L'activité stabilisante de la membrane plasmique des globules rouges humaines (GRH) est évaluée en utilisant la technique d'hémolyse induite par un milieu hypotonique selon Debnath *et al.*, (2013) avec de légères modifications. Un prélèvement sanguin est réalisé sur des tubes à EDTA. Le sang est centrifugé pendant 10 min à 3000 rpm. Après trois lavages, une suspension d'érythrocytes (10%, V/V) est préparée avec une solution tampon isotonique (tampon phosphate de sodium 10 mM, pH 7,4, NaCl 0.9%).

Les tubes échantillons renfermant 100 µl de la suspension érythrocytaire sont mélangés avec 1 ml d'HE ou d'acide acetylsalicylique le témoin positif (0.1 mg/ml). La solution est préparée dans un milieu hypotonique (tampon phosphate de sodium 10 mM, pH 7.4 ; NaCl, 0.29%). Le tube contrôle contient 100 µl de la suspension érythrocytaire mélangée avec 1 ml de la solution hypotonique. Le mélange est incubé pendant 10 min à

température ambiante puis centrifugé pendant 10 min à 3000 rpm. L'absorbance du surnageant est lue à 540 nm. Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse est calculé selon la formule :

$$\text{Inhibition de l'hémolyse \%} = 100 \times (A_T - A_E / A_T) \text{ ou :}$$

At: absorbance du contrôle, Ae : absorbance des échantillons.

Toutefois, le pourcentage de stabilisation de membrane de GRH peut être calculé comme suit : Protection (%) = 100 – [(densité optique d'échantillon/ densité optique de contrôle) × 100] (Seema *et al.*, 2011).

III.4.8. Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle

III.4.8.1. L'antibiogramme

L'antibiogramme est utilisé pour sélectionner l'antibiotique qui servira de témoin positif dans les tests bactériologiques effectués. La Gentamycine a été choisie pour son activité sur toutes les souches étudiées (**tableau 3 ; annexe II**).

III.4.8.2. Souches des champignons filamenteux

III.4.8.2.1. Isolement et purification

Les champignons sont isolés à partir des différentes sources (sol, légumes, pain). Des parties infectées sont déposées sur les milieux de culture PDA dans des boîtes de Petri. Les boîtes sont incubées à 28-20°C jusqu'à ce que la boîte soit envahie par les champignons. Une purification des champignons obtenue est effectuée par le prélèvement d'un hyphes terminal qui sera ensuite cultivé sur une nouvelle boîte contenant le même milieu de culture (Guiraud, 1998).

III.4.8.2.2. Identification

L'identification des moisissures est réalisée par examen de la culture sur milieux solides en boîte de Pétri. L'examen est effectué à l'œil nu, à la loupe et au microscope optique.

III.4.8.2.2.1. Etude des caractères macroscopiques

Les caractères cultureux sont remarqués de préférence sur un milieu PDA car les milieux trop riches en sucre et en peptone entraînent des phénomènes de pléomorphisme, les colonies peuvent perdre leur aspect caractéristique et ne pas sporuler (Guiraud, 1998).

Les caractères cultureux ainsi remarqués sont : Vitesse de croissance, Couleur des colonies et variation des couleurs en fonction du temps, Structure du thalle, Couleur de l'envers des colonies, Couleur et changement de couleur du milieu, Présence de gouttes de transpiration sur le mycélium aérien (exsudat), Odeurs.

III.4.8.2.2.2. Etude des caractères microscopiques

La détermination des moisissures fait appel aux caractères morphologiques. Elle nécessite le montage de préparations microscopiques, parfois une coloration du matériel à examiner et des mesures micrométriques sont nécessaires (Botton *et al.*, 1999).

L'examen microscopique permet d'étudier les caractères suivants : Hyphes cloisonnés ou non, Mycélium diffus, épais, coloré, incolore, Présence et type de spores sexuelles : oospore, zygosporé, ascospores et basidiospores, Présence de spores asexuées : type et apparence, Agencement des conidiophores et sporangiophores.

L'examen microscopique s'effectue sur des préparations à l'état frais et après une coloration au bleu de méthylène dans quelque cas et sans coloration dans la majorité des cas à différents grossissements (x10, x40) et (x100) pour l'étude des spores.

III.4.8.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion par disque

Une étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle est réalisée par la méthode de diffusion en gélose avec de petite modifications (Hayes et Markovic, 2002) en utilisant des disques de papier filtre stérile de 6 mm (Whatman N°1).

Une suspension bactérienne de densité équivalente à 0.5 de Mac Farland (10^8 UFC.mL⁻¹) est préparée puis diluée au 1/100. Les suspensions de levure et de spores fongiques sont normalisées à 10^7 UFC/mL et 10^6 spores/ml respectivement.

Les disques sont imprégnés de 15 µL (6.6µg) de la solution d'huile essentielle brute ou huile essentielle diluée (1/2, 1/5 et 1/10 v/v) dans 10 % de Diméthyl Sulfoxyde (DMSO) et déposés à égale distance sur la surface de la géloseensemencée MHA et PDA. DMSO 10 % est utilisée comme contrôle négatif, la Gentamycine (GEN 10 µg) et le 5 Fluorocytosine (5CF 10 µg) sont utilisés comme témoins positifs pour les bactéries et les champignons respectivement.

Les boîtes sont déposées dans un réfrigérateur à 4°C pendant 12 heures pour assurer une bonne diffusion de l'huile dans la gélose. Le diamètre d'inhibition est mesuré après 24 h à 37 °C pour les bactéries, 48 h à 37°C pour la levure et 7 jours à 28 °C pour les champignons. Les essais sont réalisés en trois répétitions.

III.4.8.4. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

Cette technique consiste à inoculer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en huile essentielle afin de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB). La CMI correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la

croissance bactérienne. Par contre la CMB correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable de tuer plus de 99,9 % de l'inoculum bactérien initial (soit moins de 0,01 % de survivants). Elle définit l'effet bactéricide d'une huile essentielle après 5 jours d'incubation à 37 °C.

L'huile essentielle est dissoute dans le DMSO 10 % à un ratio de 01 : 20 V/V. 1ml de chaque concentration finale (101.2, 50.6, 25.3, 12.65, 6.325, 3.162, 1.581 et 0.79 µg/ml) est rajouté aseptiquement à dix-neuf millilitres (19 ml) de MHA contenant 0,5 % (v/v) de tween 80. Le milieu obtenu (solution d'agar et solution de DMSO) est agité pendant 1 min et immédiatement versé dans des boîtes de Pétri stérile et laissé pour se solidifier durant 30 min.

Les boîtes sont inoculées ensuite par écouvillonnage d'une suspension bactérienne et incubées à 37°C pendant 24 à 48 h. Le DMSO 10% est utilisé comme témoin négatif. Chaque essai est réalisé en trois répétitions.

Les effets bactéricides et bactériostatiques de l'huile essentielle sont déterminés par le calcul du ratio de CMB/CMI. L'effet de l'huile est bactériostatique avec un ratio supérieur à 4 et bactéricide avec un ratio inférieur ou égal à 4 (Bajpai et Kang, 2010).

III.4.8.5. Détermination de la Concentration Minimale Fongistatique (CMF_S) et la Concentration Minimale Fongicide (CMF_C)

Les concentrations minimales fongistatique (CMF_S) et fongicide (CMF_C) de l'huile essentielle sont déterminées suivant la méthode de dilution en bouillon rapportée par Bajpai et Kang (2010) dérivée de la méthode originale de Murray *et al.* (1995).

L'huile essentielle est diluée dans le DMSO 10 % pour obtenir une concentration de 2024 µg/ml. 1 ml de cette solution est introduit dans un tube contenant 9 ml de bouillon de dextrose de pomme de terre (PDB), contenant 0.5 % Tween 80, pour avoir une

concentration de 202.4 µg/ml. Une série de dilution au demi est réalisée à partir de cette concentration pour obtenir les 101.2, 50.6, 25.3, 12.65 et 6.325 µg/ml. Dix microlitres (10µL) de suspension de spores (10^6 spores/ml) des souches fongiques à tester sont inoculés dans des tubes à essai contenant le milieu PDB à différentes concentrations. Le mélange, constituant le PDB, suspension fongique et l'huile essentielle, est homogénéisé et incubé à 30°C pendant 2-7 jours. Des tubes témoins contenant le milieu de PDB, sont inoculés seulement avec la suspension fongique. Le mélange DMSO (10%) et le tween 80 (0.5%) est utilisé comme témoin négatif

Après 2 à 7 jours d'incubation, les premiers tubes avec inhibition totale, par rapport au contrôle sont réensemencés dans les boîtes contenant 20 ml de milieu de culture PDA et incubés pendant un à 4 jours à 30°C. Lorsqu'il y a une reprise de la croissance mycélienne, la concentration est fongistatique (CMF_s), par contre s'il n'y a pas de croissance la concentration est fongicide. Les CMF_s et CMF_c sont exprimées en µg/ml. L'effet de l'huile est fongicide avec un ratio inférieur à 4 et fongistatique lorsque le rapport est supérieur ou égale à 4 (Derwich *et al.*, 2010).

III.5. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne ± SD. Les valeurs de la concentration effective à 50% sont calculées par la régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)]. L'analyse de variance est effectuée par le test ANOVA à un facteur (univariée) suivie par le test de Dunnett pour les comparaisons multiples, en utilisant le logiciel de Graph Pad Prism.V6.00. La différence est considérée statistiquement significative au seuil de 5% (p<0.05).

RESULTATS

IV. RESULTATS

IV.1. Description morphologique d'*Helichrysum italicum*

Les échantillons d'*Helichrysum italicum* récoltés sont de 20, 30 et de 50 cm de hauteur, avec une exception d'un échantillon de 80 cm. C'est une plante dressée, aromatique à rameaux anguleux d'une hauteur moyenne de trente centimètres, herbacée ou partiellement ligneuse à la base (**figure 4**). Les feuilles vertes pâles sur les deux faces, sont grêles et allongées (1.5 à 3 cm de long), alternes, linéaires très étroites, à marge enroulée en dessous; (**Figure 4.a**), elles sont faiblement tomenteuses ou présentant un léger tomentum blanchâtre, couvertes de petites glandes blanches, brillantes (**figure 4. b**). Il est à signaler que ces feuilles ont un léger arôme de curry. Les fleurs sont groupées en capitules d'un diamètre maximum de 3 mm, serrés en corymbe de 1.5 à 8cm de large. Elles présentent un périanthe tubuleux voire légèrement campanulé et elles sont tubulées jaunes et les bractées jaune d'or densément imbriquées, les extérieures coriaces, les intérieures plus étroites et au moins 5 fois aussi longues, glanduleuses (**figure 4.c**).

L'akène est très petit si on la froisse entre les mains, la plante répand une odeur caractéristique (**figure 4.d**).



Figure 4. Feuilles et inflorescences d'*Helichrysum italicum* Feuilles vertes pâles de la plante (a) présentant un légère tomentum (b), Sommités fleuries jaunes de la plante (c) contient des akènes (d).

IV.2. Observations microscopiques des structures sécrétrices

L'étude microscopique a permis de localiser les sites sécréteurs des essences végétales. L'observation morphologique des tiges et feuilles sous loupe binoculaire a mis en évidence la présence d'un tapis de poils épidermiques (**figure 5**).

Les coupes transversales au niveau des tiges et des feuilles font apparaître la présence de 2 types de poils responsables de la sécrétion de l'HE d'*Helichrysum italicum* : les poils sécréteurs pluricellulaires (**figure 6.a**), unicellulaire (**figure 6.b**), poils glandulaires (**figure 6. c et d**), ainsi que les poils protecteurs (**Figure 6.e**)

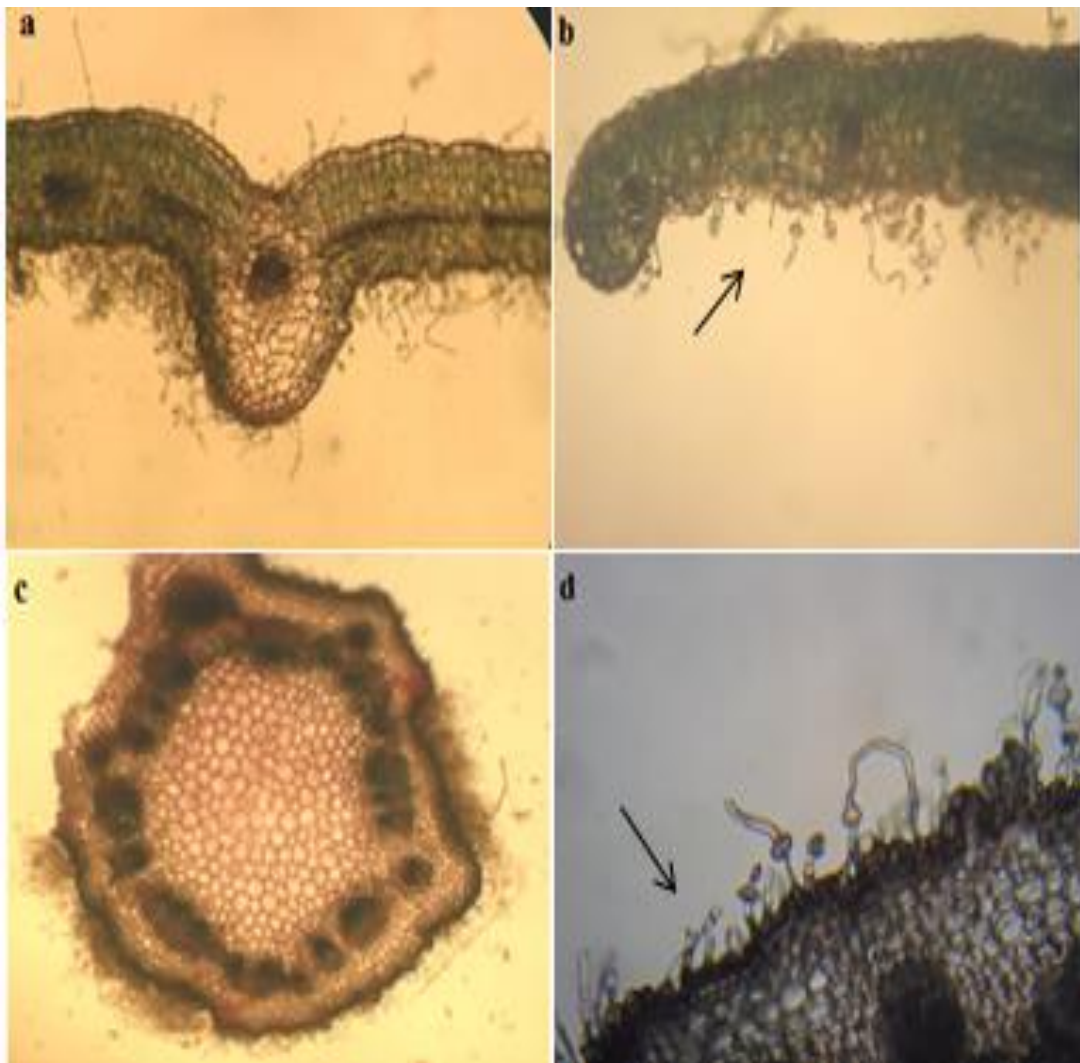


Figure 5. Coupes transversales d'*Helichrysum italicum* (Gx 40) (a) feuille (b) poil sécréteur (c) tige et (d) poil protecteur.

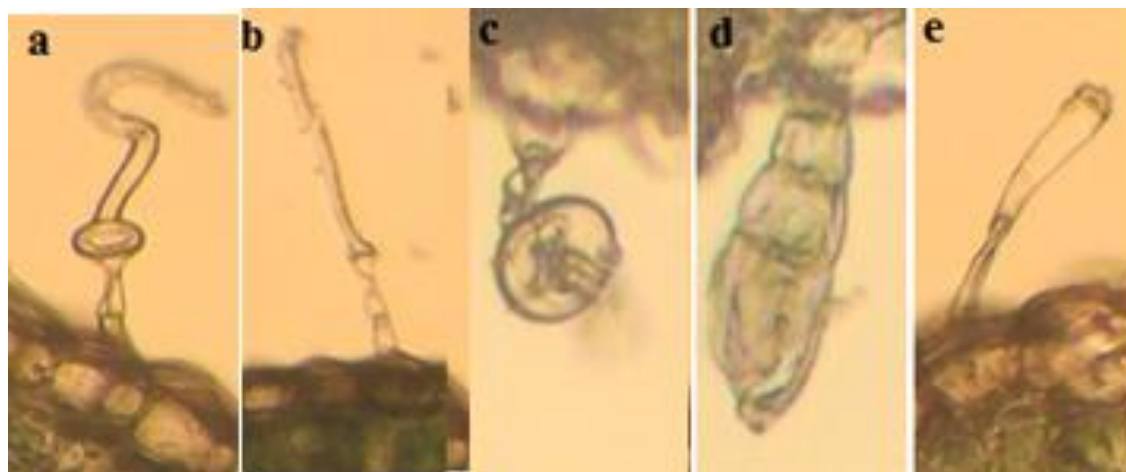


Figure 6. Poils sécréteurs et protecteur d'*Helichrysum italicum* (Gx 40). (a): poil pluricellulaire; (b): poil unicellulaire; (c): poil glandulaire en phase précoce de développement; (d): poil glandulaire au dernier stade de développement; (e) poil protecteur.

IV.3. Rendement en huile essentielle

Le rendement moyen en huile essentielle d'*Helichrysum italicum* calculé en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne de la plante a fourni un taux de $0.44 \pm 0.02\%$ (v/p), de couleur jaune clair et d'une odeur de curry.

IV.4. Etude phytochimique

L'analyse de l'huile essentielle d'*Helichrysum italicum* par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) a permis d'identifier 66 composés (**tableau 4**) qui représentent 99,24 % de l'huile total (**Figure 7**).

Cette huile est caractérisée (**Figure 8**) par la prédominance des sesquiterpènes oxygénés (76,7 %) et des monoterpènes oxygénés (61.42 %). Les principaux constituants de l'huile sont α -cédrene (13,61 %), α -Curcumene (11,41 %), acétate de géranyle (10,05 %), limonène (6,07 %), nérol (5,04 %), acétate de néryle (4,91 %) et α -pinène (3,78 %)

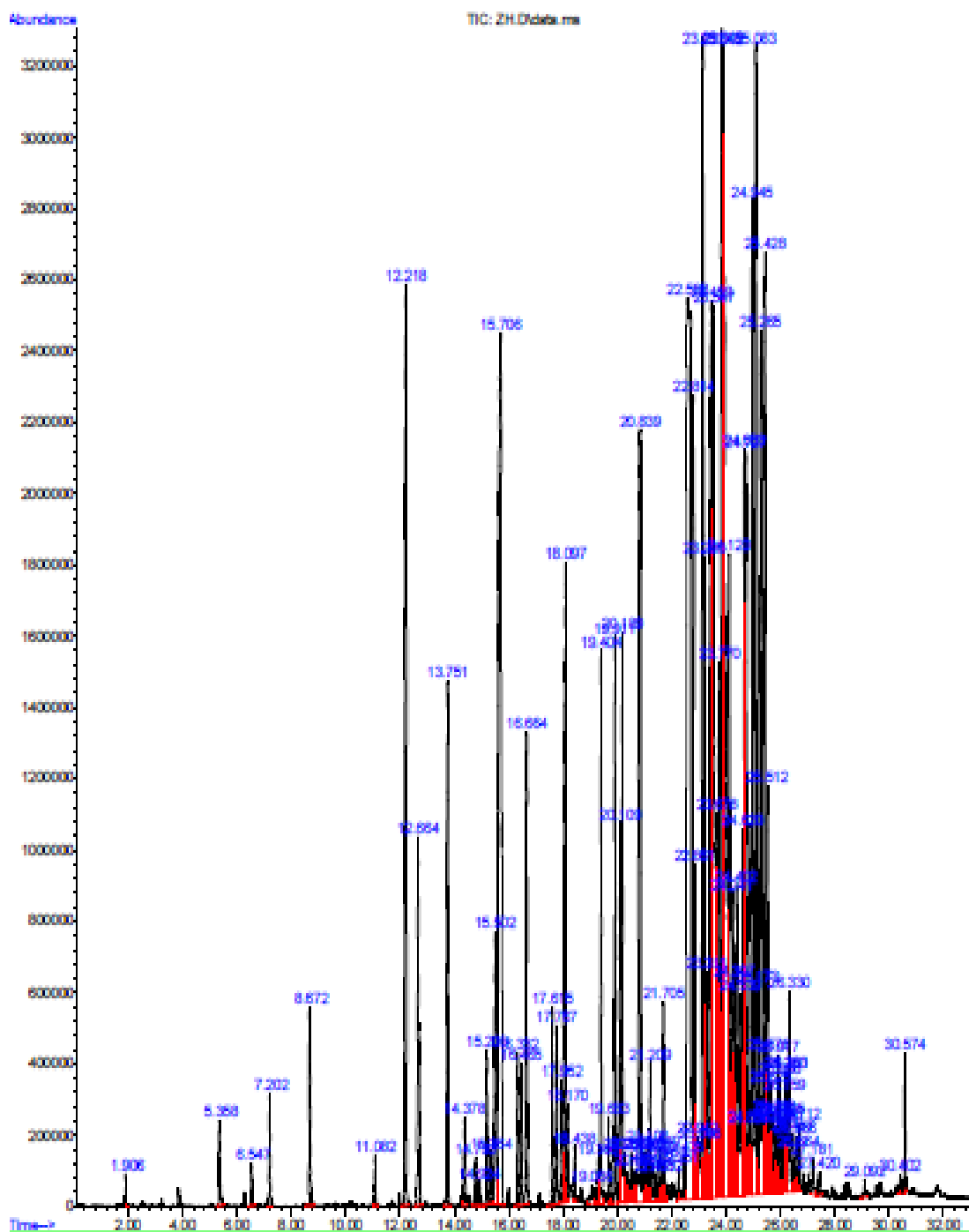


Figure 7. Profil chromatographique de l'huile essentielle d'*Helichrysum italicum*

Tableau 4. Pourcentage des composés chimiques et les indices de rétention de l'huile essentielle extraite d' *Helichrysum italicum*.

Pic	RT	Composés	RI	%
1	1.908	Ethylether	529	0.04
2	5.358	Methyl butanoate	721	0.22
3	6.548	Butanoic acid, 2-methyl-4-methylhexyl Ester	1304	0.1
4	7.203	2-Methyl-2-heptene	981	0.29
5	8,672	2-methyl- Hexanoic acid	1027	0.53
6	11.083	δ -3-Carene	1008	1.08
7	12.219	α -Pinene	932	3.78
8	12.662	α -Fenchene	945	1.43
9	13.751	β -Pinene	974	1.52
10	14.38	Cyclopentanol	780	0.28
11	14.794	Isopropyl-2-methyl butyrate	880	0.37
12	15.204	Terpinolene	1086	0.40
13	15.364	<i>p</i> -Methylanisol	1015	0.15
14	15.504	<i>p</i> -Cymene	1020	1.02
15	15.506	Limonene	1024	6.07
16	16.331	(E)- β -ocimène	1044	0.37
17	16.466	2- Butenoic acid, 3-methyl	881	2.24
18	16.665	γ -Terpinen	1054	1.26
19	17.767	2-Nonanone	1087	0.46
20	17.952	3-Hexanone	945	0.34
21	18.096	Linalool	1095	2.98
22	18.172	Isovaleric acid	827	0.23
23	18.483	(+)-Fenchol	1114	0.12
24	19.067	Adamantane	1118	0.11
25	19.684	Borneol	1165	0.25
26	19.912	α -Terpineol	1014	2.47
27	20.11	3-Pentanone	788	1.26
28	20.279	Myrtenol	1194	0.18
29	20.667	<i>cis</i> -Pinocarveol	1182	0,15
30	20.841	Nerol	1227	5.04
31	20.993	Neral	1235	0.12
32	21.064	Camphene	946	0.09
33	21.419	Geraniol	1249	0.06
34	21.541	Linalyl	1095	0.15
35	21.651	Bornyl acetate	1284	0.05
36	21.706	2-Undecanone	1293	0.3
37	21.761	n-Tridecane	1300	0.07
38	22.436	α -Terpinyl acetate	1346	0.09

39	22.589	Geranyl acetate	1379	10.05
40	22.812	α -Cedrene	1410	13.61
41	22.863	1.3.8- ρ -Menthatriene	1108	0.58
42	22.943	n-Tetradecane	1400	0.18
43	23.201	α -Bergamotene	1411	1.06
44	23.311	Caryophyllene	1417	0.48
45	23.458	α - curcumene	1479	11.41
46	23.547	Neryl acetate	1359	4.91
47	23.678	β -Himachalene	1500	1,87
48	24,239	Acetic acid	1393	1,38
49	24,539	(Z)-Nerolidol	1531	1,65
50	24,725	β -curcumene	1514	2,25
51	24,865	<i>cis</i> -4-Caranone	1200	0,23
52	24,945	Guaiol	1600	2,36
53	25,084	Anisole	913	2.99
54	25.173	δ -Selinene	1492	0.33
55	25.265	ρ -Cresol	1071	2.42
56	25.43	α -Eudesmol	1652	2.88
57	25.51	Bulnesol	1670	0.59
58	25.624	(Z)- α - <i>trans</i> -Bergamotol	1690	0.35
59	25.764	δ - Cadinene	1522	0.14
60	25.869	<i>cis</i> -Carveol	1226	0.11
61	25.916	dehydro-1.8-Cineole	988	0.39
62	26.074	o-Cresol	1050	0.12
63	26.456	Eugenol	1356	0.62
64	26.566	Geranyl butanoate	1562	0.2
65	26.663	2-Pentadecanone	1697	0.2
66	30.573	2,3-dimethyl-Benzofuran	1219	0.21
Total (%)			99.24	
Hydrocarbures de monoterpènes			10.83	
Monoterpènes oxygénés			18.95	
sesquiterpènes oxygénés			61.42	
Acides			4.48	
autres			2.17	

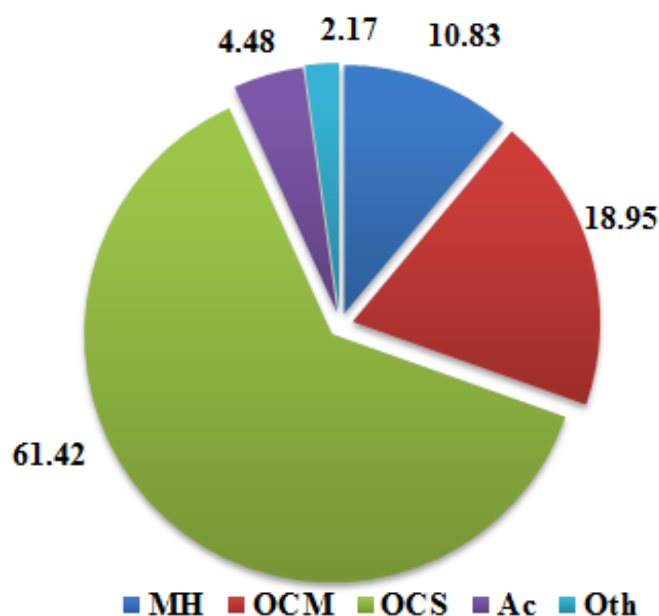


Figure 8. Pourcentage des différents groupes chimiques des composés présents dans l'huile essentielle d' *H.italicum*. MH : Hydrocarbures de monoterpènes ; OCM : Monoterpènes oxygénés ; SCO : sesquiterpènes oxygénés ; AC : Acides ; Oth : les autres composés.

IV.5. Activité anti-oxydante

IV.5.1. Réduction du DPPH

L'huile essentielle d'*H.italicum* diluée dans du méthanol a montré une activité antiradicalaire très importante. Cette huile essentielle a réduit le radical DPPH stable au diphenylhydrazine jaune. L'efficacité de l'huile pour réduire le radical DPPH stable augmente avec l'augmentation de concentration de l'huile et elle est plus élevée que les standards utilisés.

Cette capacité antiradicalaire est puissante avec une EC_{50} de $4.70 \pm 1.96 \mu\text{g/ml}$, proche de celle de l'acide gallique ($IC_{50} = 4.66 \pm 0.12 \mu\text{g / ml}$), et plus forte que celle du BHT où l' $EC_{50} = 141,23 \pm 5.02 \mu\text{g/ml}$ (**figure 9**).

L'activité antioxydante de l'huile par rapport aux standards (BHT) et (AG) est exprimée en EC₅₀. Ce paramètre définit la concentration effective du substrat qui provoque la perte de 50 % de l'activité de DPPH (couleur). Un autre paramètre qui exprime le pouvoir anti-radicalaire est calculé à partir du premier paramètre c'est (le pouvoir anti-radicalaire (PAR) égale à 1/EC₅₀). Plus ces valeurs s'éloignent du zéro, plus la puissance antioxydante augmente (**tableau 5**).

Tableau 5. Concentration efficace (EC₅₀) et puissance antiradicalaire (ARP) de l'huile essentielle d'*Helichrysum italicum* (HE), d'Acide gallique (AG) et BHT au DPPH

L'huile essentielle et standard	EC₅₀ (µg/ml)	ARP
HE	4.7±1.96	0.21 ^{ns}
AG	4.66±0.12	0.21 ^{ns}
BHT	141.23±5.02	0.007***

Des comparaisons sont faites entre le standard (AG) et (BHT) et l'huile essentielle. $p \leq 0.002$, ns : non significatif.

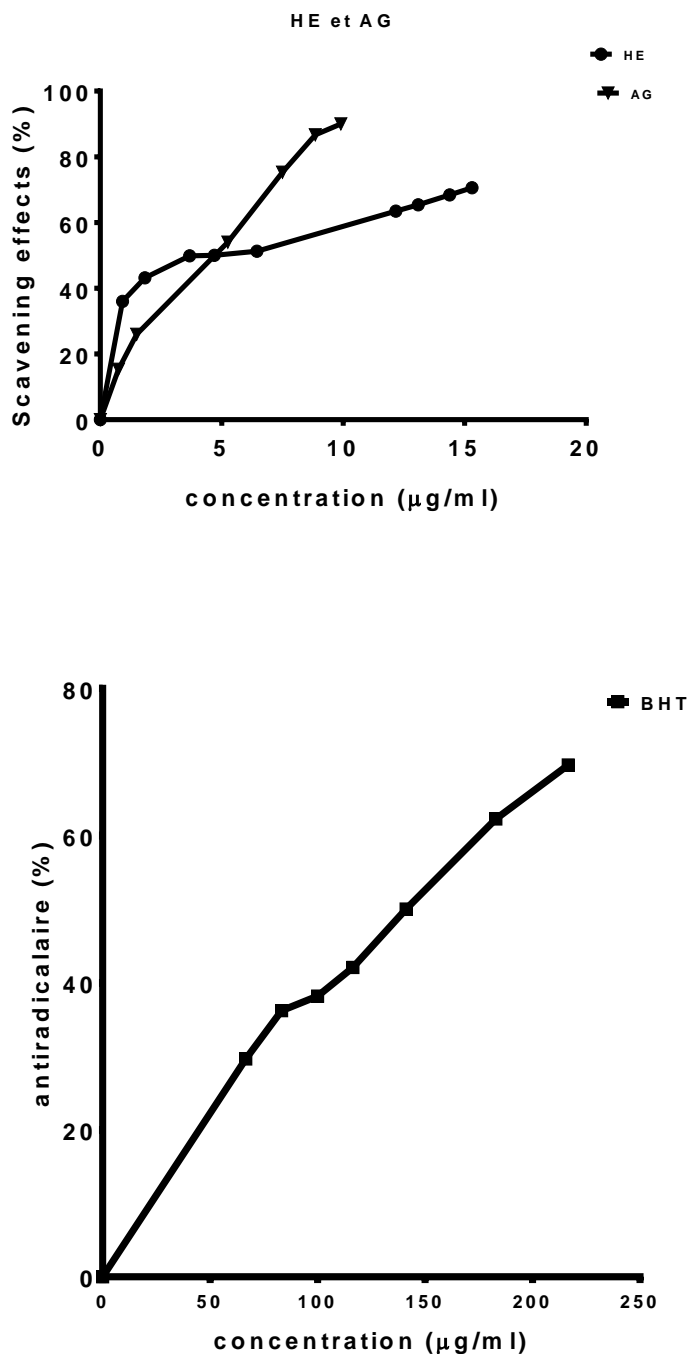


Figure 9. Courbes présentant le pourcentage antiradicalaire de l'huile essentiel comparé à celui des standards BHT et AG. La différence entre le pourcentage antiradicalaire d'huile et AG n'était pas statistiquement significative, selon le test T à $p > 0.05$. Les valeurs représentent la moyenne \pm SD (n=3).

IV.5.2. Réduction du fer

Les résultats obtenus montrent que l'huile d'*Helichrysum italicum* exerce un pouvoir réducteur important avec une $EC_{50} = 14.89 \pm 0.09 \mu\text{g/ml}$, qui semble proche de ceux des standards, BHT ($EC_{50} = 13.52 \pm 0.28 \mu\text{g/ml}$), et l'acide gallique ($EC_{50} = 10.09 \pm 0.18 \mu\text{g/ml}$). Statistiquement il n'y a pas de différence significative entre ces valeurs (test Newman - Keuls comparaison de plusieurs tests, $P > 0,05$) (**figure 10**).

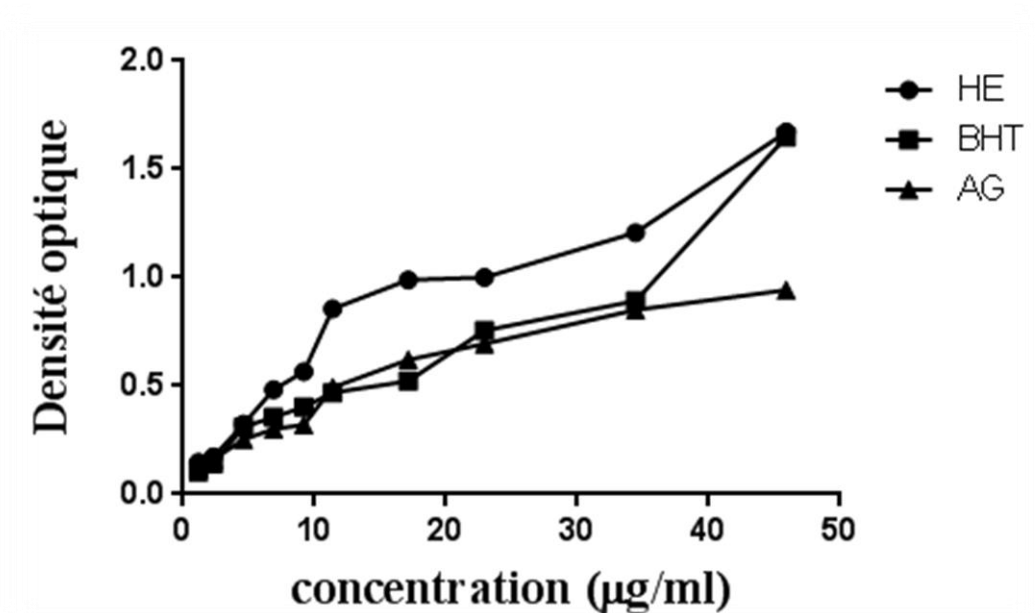


Figure 10. Activité antioxydante de l'huile d'*Helichrysum italicum* représentée par le test du pouvoir réducteur.

IV.6. Activité anti-inflammatoire *in vitro*

L'HE d'*Helichrysum italicum* possède une activité anti-inflammatoire avec $EC_{50} = 296 \pm 42.12 \mu\text{g/ml}$ très importante par rapport au Diclofénac sodique avec un $EC_{50} = 590 \pm 11.03 \mu\text{g/ml}$ (une différence significative à $P < 0.001$). Les pourcentages d'inhibition de l'huile d'*Helichrysum italicum* et du Diclofénac sodique sur la dénaturation des protéines sont présentés dans les tableaux 6 et 7 respectivement.

Tableau 6. Les pourcentages d'inhibition de l'huile d'*helichrysum italicum* sur la dénaturation des protéines

Concentration (µg/ml)	% Inhibition
35.2	7.48±0.12
70.4	20.3±2.23
140.8	32.74±12.4
281.6	47.46±9.12
563.2	55.62±11.62
1126.4	94.86±3.45

Tableau 7. Les pourcentages d'inhibition de Diclofénac de sodium sur la dénaturation des protéines

Concentration (µg/ml)	% Inhibition
78.125	13.11±1.56
156.25	13.24±3.71
312.5	26.48±2.74
625	52.96±10.62
1250	205.92±12.26
2500	211.84±13.04

IV.7. Activité anti-hémolytique

Les résultats montrent que le milieu hypotonique induit une altération de la membrane plasmique des érythrocytes humains, conduisant à l'hémolyse des hématies. Le traitement par 1ml de l'huile d'*Helichrysum italicum* à des concentrations de 33µg/ml, 66µg/ml et 132µg/ml protège les érythrocytes contre l'hémolyse induite par le milieu hypotonique (**tableau 8**). Le traitement par l'HE entraîne donc une certaine stabilité de la membrane plasmique. Le pourcentage de protection de l'HE est de 56.2% à la concentration 132 µg/ml.

Tableau 8. Effet protecteur de l'HE contre l'hémolyse des hématies humaines induites par l'hypotonie du milieu. L'aspirine est utilisée comme contrôle.

Traitements		Inhibition%
Contrôle		/
Aspirine		6.41±1.91
HE concentrations µg /ml	33 µg /ml	81,92±0.33***
	66 µg /ml	67.17±0.41***
	132 µg /ml	43.80±1.58***

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD (n = 3). ***: p<0.001 vs. contrôle

IV.8. Isolement et identification des souches fongiques

Les méthodes d'isolement, de purification et d'identification ont permis d'identifier 16 champignons isolés ces isolats sont :

Chaetomium globosom, *Rhizopus stolinifer*, *Mucor racemosus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Phoma glomerata*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus phoenicis*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium roquefortii*, *Penicillium expansum*, *Penicillium digitatum* (**tableau 9**).

Tableau 9. Les champignons isolés et leurs origines d'isolement

Champignons isolé	Origine d'isolement	Champignons isolé	Origine d'isolement
<i>Chaetomium globosom</i>	Pain	<i>Aspergillus flavipes</i>	Charcuterie (poulet)
<i>Rhizopus stolinifer</i>	Sol	<i>Aspergillus candidus</i>	Plante
<i>Mucor racemosus</i>	Tomate	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Pain
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Poivron	<i>Aspergillus phoenicis</i>	Pain
<i>Phoma glomerata</i>	Pomme	<i>Penicillium citrinum</i>	Citron
<i>Fusarium graminearum</i>	Pomme	<i>Penicillium roquefortii</i>	Tomate conserve
<i>Fusarium oxysporum</i>	Tomate	<i>Penicillium expansum</i>	Pain
		<i>Penicillium digitatum</i>	Orange

Les méthodes classiques d'identification citées plus haut, sont révélées la dominance qualitative – en nombre d'espèces – du genre *Aspergillus* avec 31.25 % de la totalité des souches isolées; les espèces du genre *Penicillium* sont classées en deuxième position, correspondant à 25 % de celle-là. Les espèces du genre *Fusarium* en constituent 12.5 %. Les souches restantes correspondent à 6.25 % et incluent les genres suivants : *Phoma glomerata*, *Chaetomium globosum*, *Rhizopus stolonifer*, *Mucor racemosus* et *Cladosporium cladosporioides* dont chacun n'est représenté que par une seule espèce. Nous avons classé les genres décrits, dans l'ordre croissant suivant la dominance :

IV.8.1. *Phoma glomerata*

Colonie de *Phoma glomerata* à thalle brun; pycnides noires abondantes; conidies unicellulaires brunâtres ovoïdes à elliptiques; chlamydospores abondamment cloisonnées en chaînes (figure 11).

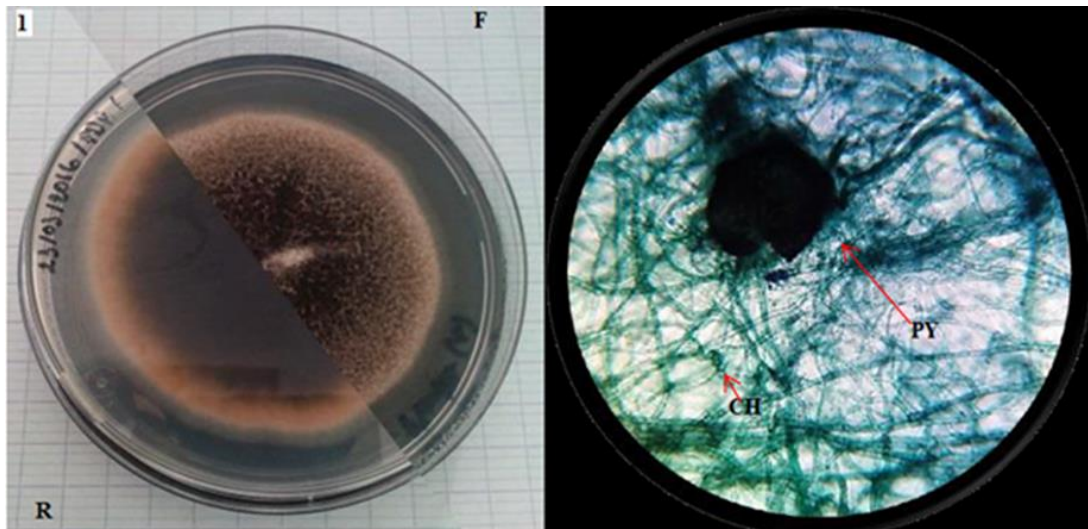


Figure 11. *Phoma glomerata* après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), CH: chlamydospores, PY: Pycnide.

IV.8.2. *Cladosporium cladosporioides*

Le champignon *Cladosporium cladosporioides* a un thalle velouté brun olivacé a revers noire verdâtre ; les conidiophores atteignant 400µm de long ; conidies brunes a brun verdâtre ; lisse ou finement verruqueuses généralement unicellulaires (**figure 12**).

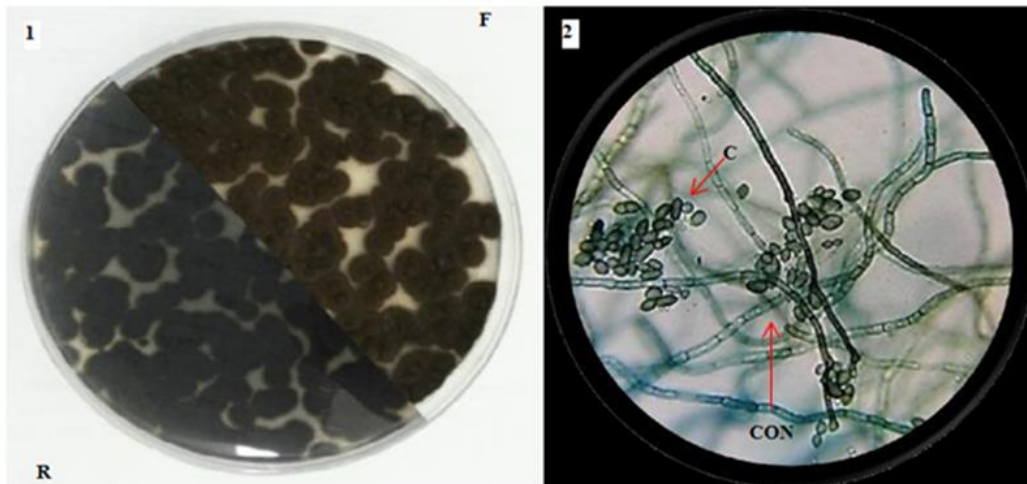


Figure 12. *Cladosporium cladosporioides* après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), C: Conidies de formes et de dimensions variées, CON: Conidiophores et chaînes conidiennes à croissance acropétal.

IV.8.3. *Chaetomium globosom*

Colonies plates, duveteuse, beige claire, revers peut être beige ou pigmenté en vert, périthèces sub-globuleux 250-300µm sans columelle différencié, brun noir, garnis de long poils, asques clariforme, pédicellés ; ascospores ellipsoïdales ou citriformes noires pourvues d'un seul pore germinatif (**figure 13**).

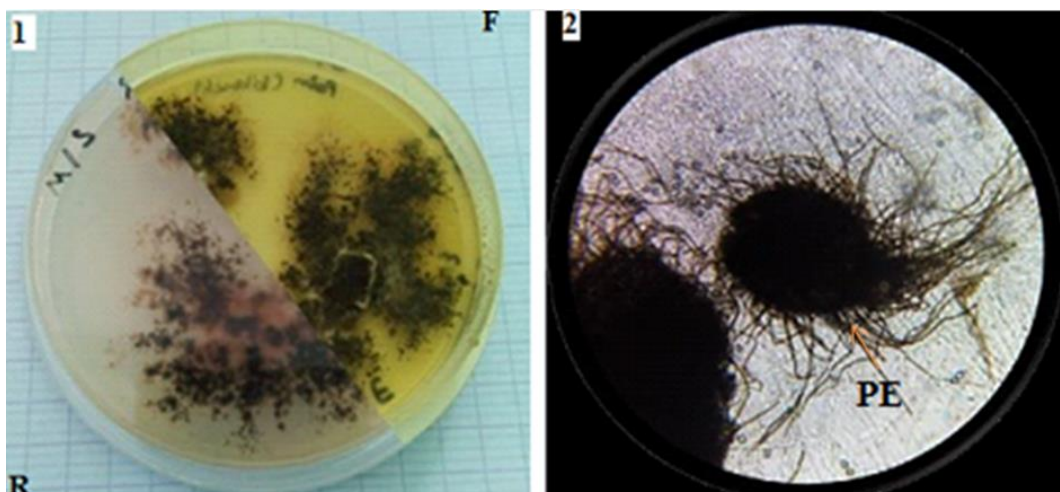


Figure 13. *Chaetomium globosom* après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), PE: Périthèce sub-globuleux.

IV.8.4. *Mucor racemosus*

Colonie de *Mucore racemosus* à thalle blanc devenant grisâtre, floconeux, le sporocystophores de taille variable, sporocyste gloueux hyalins puis brunâtres de taille très inégales à paroi finement échinulée. Columelles variable, globuleuses, ovoïdes, souvent pourvues à la base de la paroi du sporocyste, spores elliptiques lisse, chlamidospores très nombreuses (**figure14**).

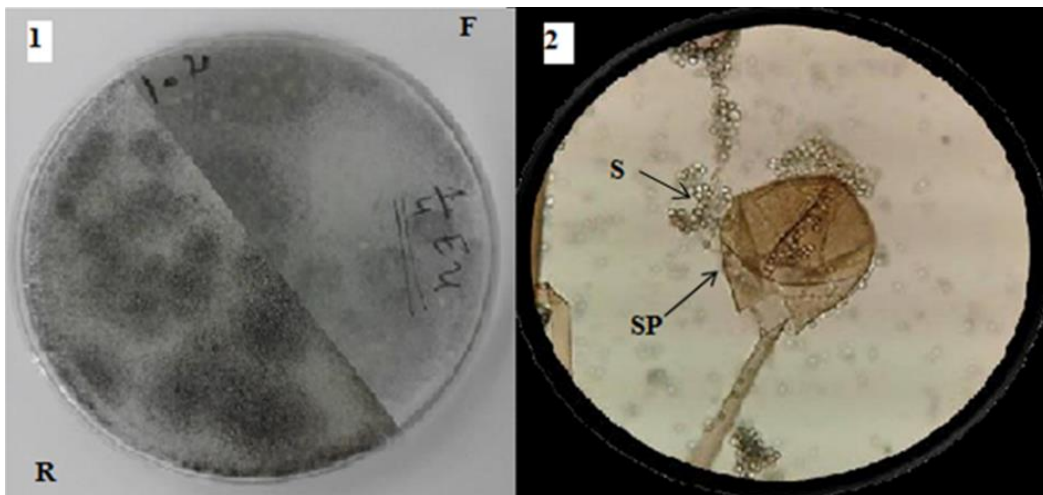


Figure 14. *Mucor racemosus* après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), SP : sporocystophore, columelle avec reste de la paroi du sporocyste et chlamyospore, S : spores.

IV.8.5. *Rhizopus stolinifer*

Colonie de *Rhizopus stolinifer* à thalle à croissance rapide, blanchâtre, stolons bien différenciés se terminant par un système de rizoïde. Sporocystophores isolés, sporosytes globuleux d'abords blanc puis noirs (350µm) de diamètre. Columelles globuleuses à ovoïdes, pas de chlamyospores (**figure 15**).

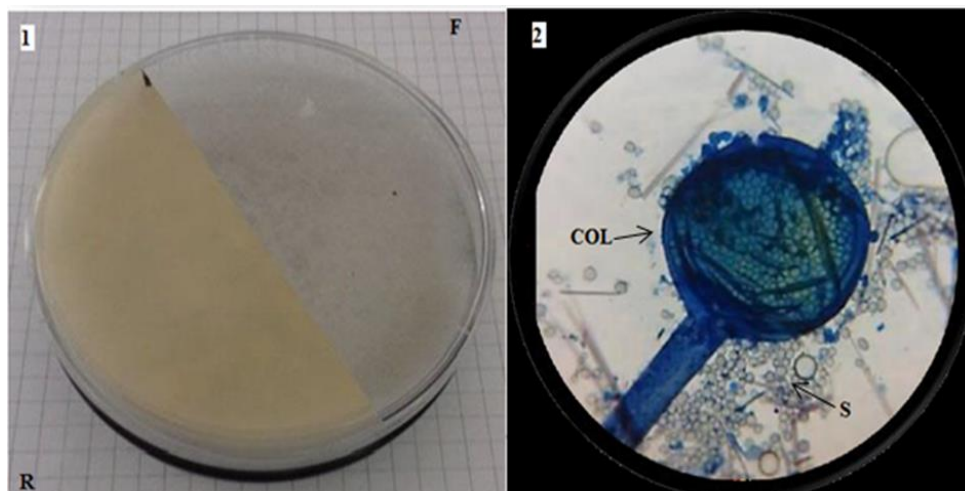


Figure 15. *Rhizopus stolinifer* après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), COL : columelle, S : spores

IV.8.6. *Fusarium graminearum*

Colonie de *Fusarium graminearum* à thalle rose grisâtre ou rouge à pourpre devenant brun vineux; floconneux. Pas de microconidies. Phialides (10 à 14×3,5-5µm), macroconidies fusiformes; courbes. chlamydospores intercalaires, globuleuses, hyalines à brun pâle, formés par le mycélium (**figure 16**).

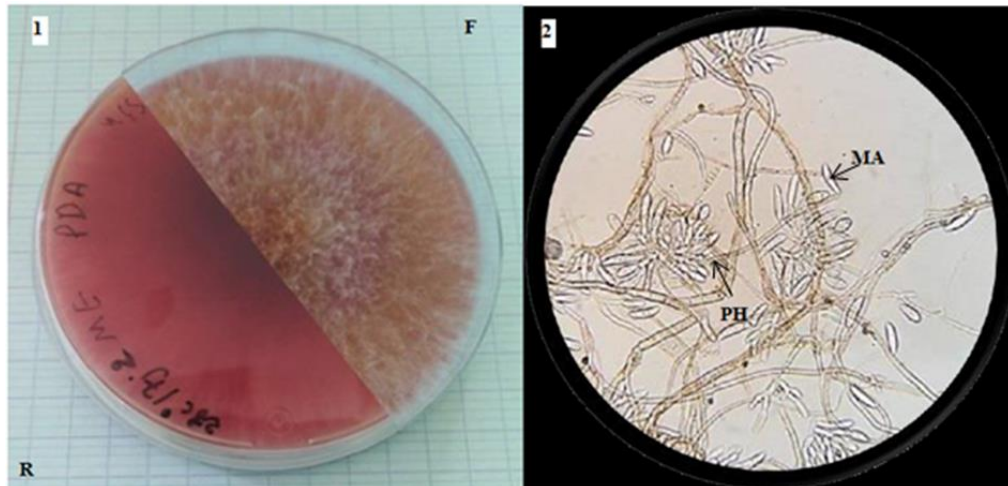


Figure 16. *Fusarium graminearum* après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), MA: macroconidie, PH: macrophialides.

IV.8.7. *Fusarium oxysporum*

Colonie de *Fusarium oxysporum* à thalle à croissance modérée, blanc, rose saumon à violet, révers pourpre. Petites microconidies fusiformes ou ovoïdes, isolées ou sur de courts conidiophores ramifiés; macroconidies fusoïdes, souvent courbés, Chlamydospores absentes ou présentes terminales ou intercalaires (**figure 17**).

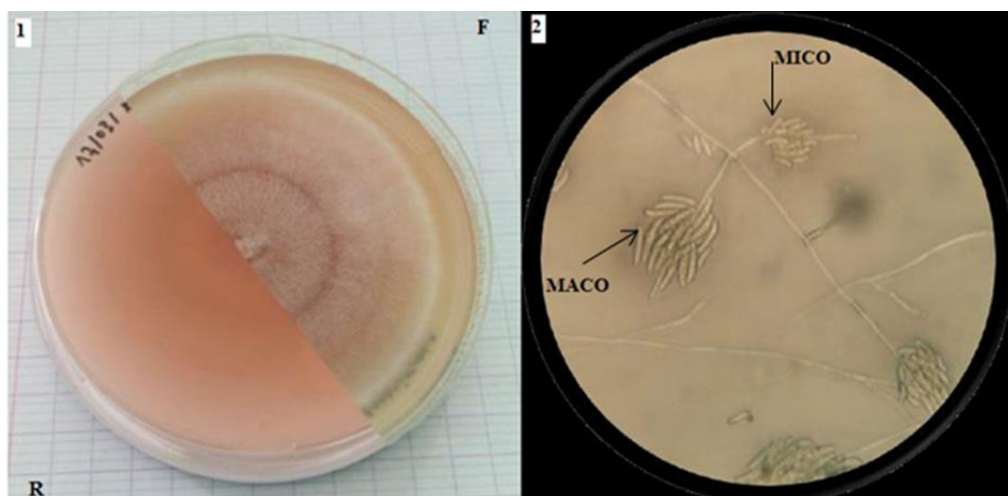


Figure 17. *Fusarium oxysporum* après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), MICO: petites microconidies, MACO: macroconidies fusiformes.

IV.8.8. *Penicillium expansum*

Colonie de *Penicillium expansum* à thalle à croissance rapide, vert terne souvent zoné, granuleux dès le départ revers incolore ou brunâtre. Exsudat et pigmentation présents au milieu. Pénicille long et compact, tri-verticillés asymétrique. conidiophores isolées, lisse, métules et phialides en verticilles, conidies elliptiques lisses (**figure 18**).

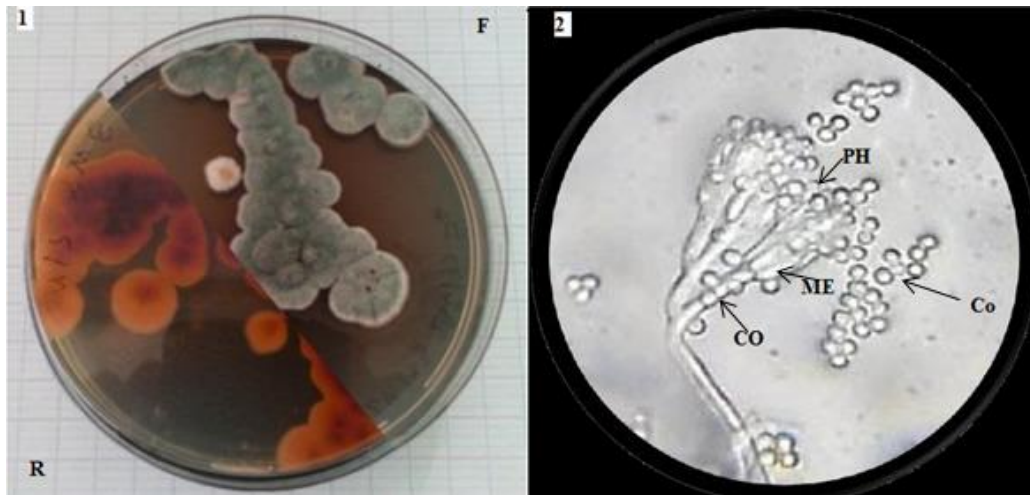


Figure 18. *Penicillium expansum* après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), CO : conidiophore lisse ME et PH : métule et phialide en verticille, Co : conidies elliptiques lisses.

IV.8.9. *Penicillium citrinum*

Colonie de *Penicillium citrinum* à thalle à croissance très lente, velouté, vert gris, réverse et milieu jaune à orang. Pénicille biverticillé asymétriques, conidiophores a 50-300 $\mu\text{m} \times 2-3 \mu\text{m}$, lisses, terminés par un groupe de 3-10 métubes divergentes. Conidies globuleuses lisses groupées sur métule en colonne individualisées (**figure 19**).

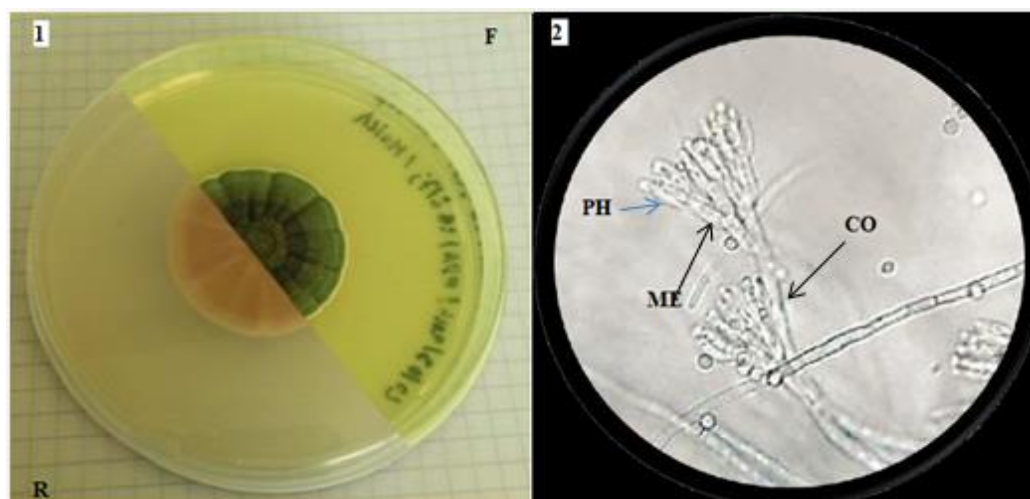


Figure 19. *Penicillium citrinum* après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), CO: conidiophore, PH: phialides, ME: métule.

IV.8.10. *Penicillium roquefortii*

Colonie de *Penicillium roquefortii* à thalle à croissance rapide, velouté, vert bleu à la marge et vert sombre ailleurs, revers pâle, brun ou vert très foncé. Pénicilles tri-verticillés, asymétriques. Conidiophore à (100–200 × 4-6µm), fortement granuleux avec souvent une seule ramification, conidies globuleuses verdâtre, lisses et grosses (**figure 20**).

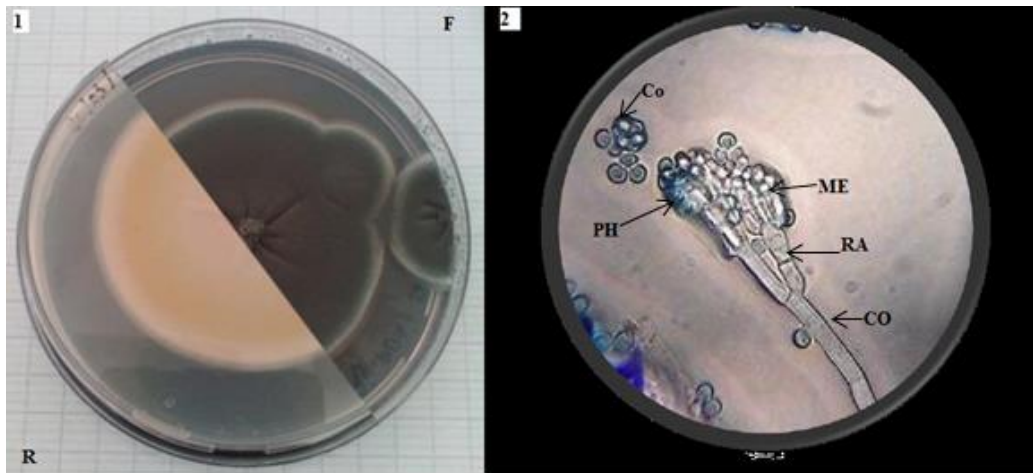


Figure 20. *Penicillium roquefortii* après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), CO : conidiophore granuleux ME : métule, PH : phialide, RA : ramification, Co : conidies globuleuses verdâtres.

IV.8.11. *Penicillium digitatum*

Colonie de *Penicillium digitatum* à thalle à croissance rapide, velouté vert jaune à vert brun, revers pâle à jaune. Pénicille tri-verticillés et asymétrique souvent bi-verticillés très irréguliers à métules et phialides peu nombreuses par verticilles. Conidiophores lisses, ramifiés, métules par 2-3 et phialides solitaires ou par 2-5 cylindriques, conidies elliptiques a cylindrique lisses en chaînes désordonnées (**figure 21**).

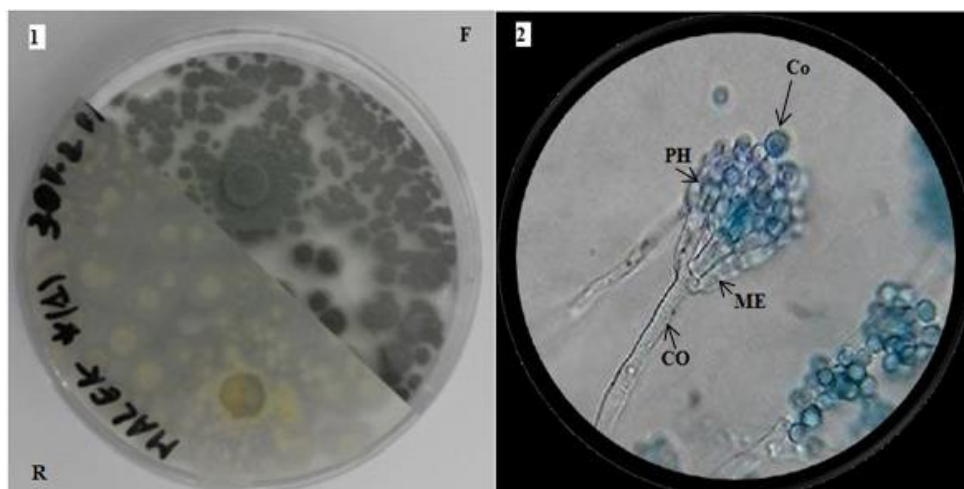


Figure 21. *Penicillium digitatum* après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), CO : conidiophore lisse, ME et PH : métule et phialide cylindriques, Co : conidies elliptiques lisses en chaînes désordonnées.

IV.8.12. *Aspergillus niger*

Récto: colonies blanchâtres puis granuleuses noires ; Verso: incolore à jaune pâle, thalle à croissance rapide (48-72h). Têtes conidiennes bisériées radiées, se scindant généralement en plusieurs colones, noire brunâtres foncés ou noires. Conidiophores (1.5 à 3mm) lisses hyalin ou brunatres dans leur moitié supérieure. Vésicule globuleuses de 30 à 100µm, métules brunâtres. Conidies globuleuses, parfois légèrement aplaties (**Figure 22**).

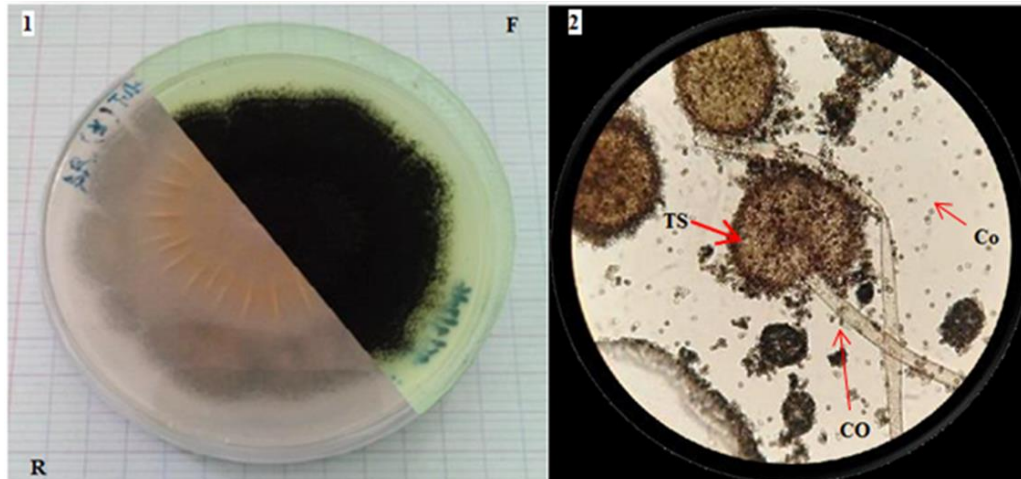


Figure 22. *Aspergillus niger* après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), CO: conidiophore, TS: tête sporifère, Co: conidies globuleuse et brunes.

IV.8.13. *Aspergillus phoenicis*

Colonie d'*Aspergillus phoenicis* à thalles a révers blanc ou grisâtre, tête conidienne bisériées, d'abord globuleuse puis divisées en colonnes noires très foncé. Conidiophores rétrécis sous la vésicule fragile a l'écrasement, lisses et un peu colorés en brun sous la vésicule. Vésicule globuleuse, métules brunâtres, conidies globuleuses (**figure 23**).

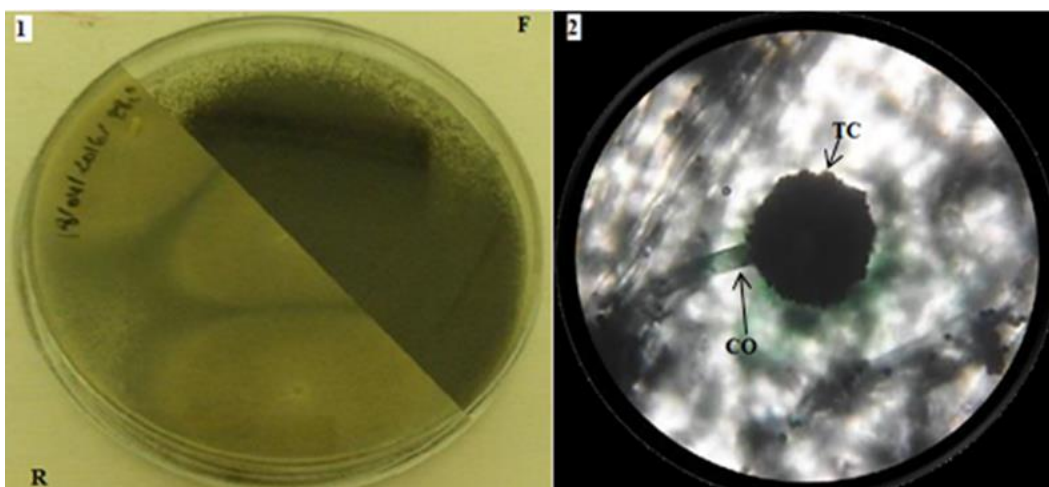


Figure 23. *Aspergillus phoenicis* après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), CO : conidiophore brun sous la visicule; TC : tête conidienne.

IV.8.14. *Aspergillus brasiliensis*

Colonie initialement blanche ou jaunâtre, devient noire après. vitesse de croissance rapide, conidiophores ayant terminés par des vésicules globuleux portant des phialides (unisériés) ou (souvent) métule avec phialides (bisériés) qui produisent des chaînes des conidies (**figure 24**).

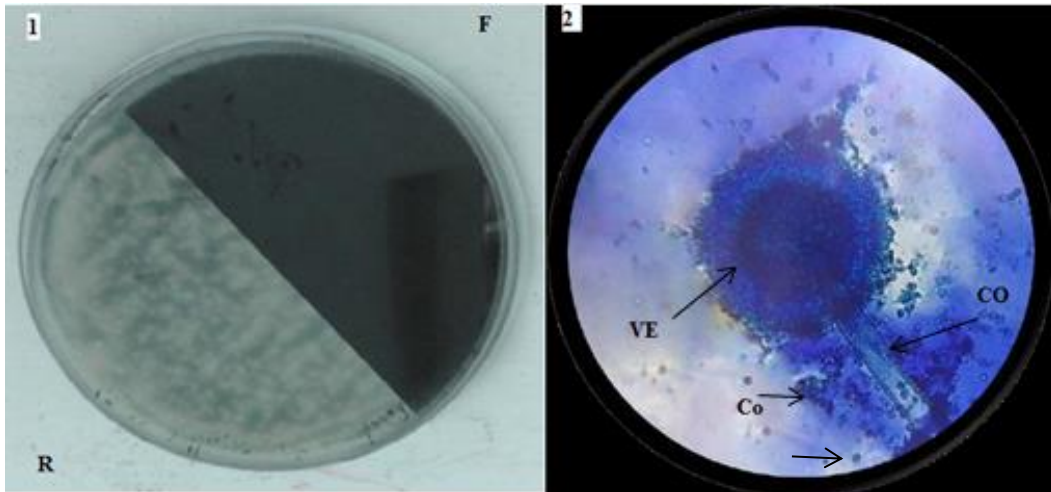


Figure 24. *Aspergillus brasiliensis* après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), CO : conidiophore; VE: vésicules globuleuses, Co: conidies.

IV.8.15. *Aspergillus candidus*

Colonies blanches, restreintes, veloutées, revers pourpres à bruns. Têtes conidiennes blanches, d'abord radiées puis se scindant en colonnes sporales divergentes, souvent humide dans les isolats récents, conidiophore blanc et lisse. Vésicules sub-globuleuses à globuleuses (10 - 4µm), des conidies globuleuses et lisses hyalines (**figure 25**).

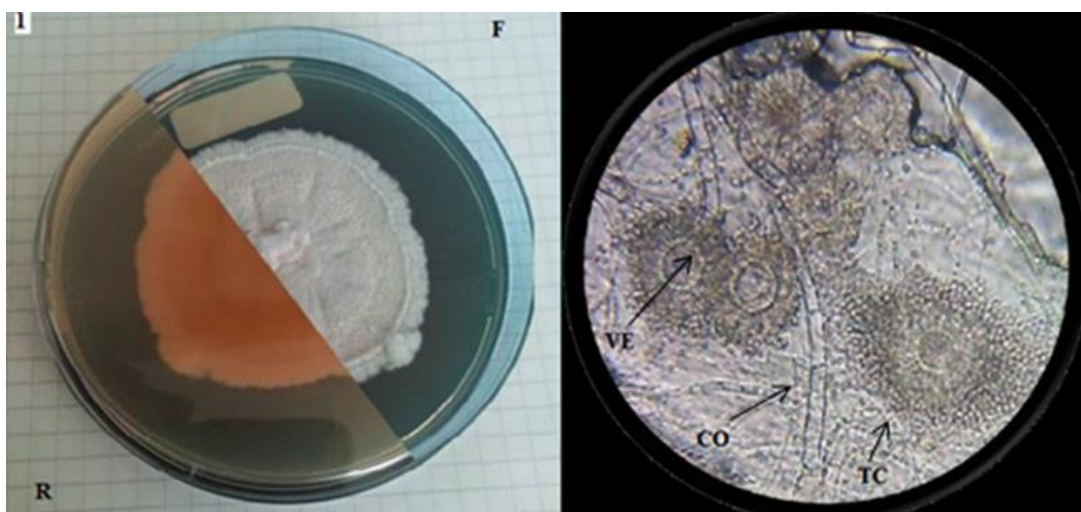


Figure 25. *Aspergillus candidus* après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), CO : conidiophore lisse brun, VE : vésicules globuleuses ; TC : tête conidienne blanche.

IV.8.16. *Aspergillus flavipes*

Colonie plate, farineuse, blanche au stade jeune, virant plus tard au beige puis au chamois pâle ; elle est ombiliquée, à contour plus ou moins régulier. A la surface apparaissent des grains de couleur beige; Revers et milieu de culture bruns. Têtes conidiennes bisériées radiées; conidiophores lisses, brun-jaune; vésicules sub-globuleuses, ovées, ou allongées, peu colorées; métules et phialides réparties sur toute leur surface; conidies globuleuses à subglobuleuses (**figure 26**).

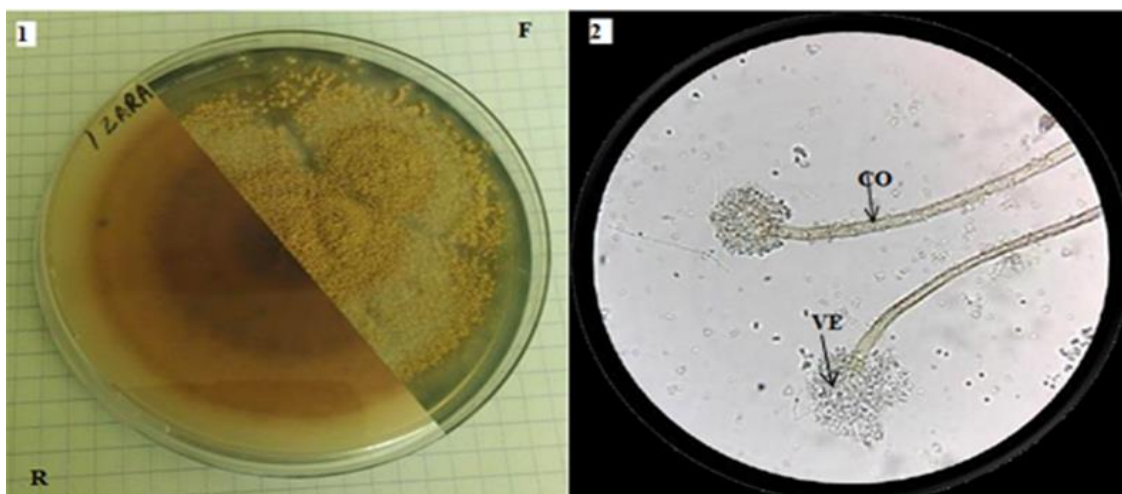


Figure 26. *Aspergillus flavipes* après incubation à 28-30°C, (1) observation macroscopique (F=Face, R=revers), (2) observation microscopique (g x40), CO : conidiophore lisse brun; VE : vésicules sub-globuleuses

IV.9. Etude de l'activité antimicrobienne

Les résultats indiquent que l'huile essentielle d'*H.italicum* a une activité sur les souches bactériennes et sur les souches fongiques (**tableaux 9 et 10**). On constate en calculant la moyenne des zones d'inhibition du test de sensibilité à l'HE d'*H.italicum*, que les souches fongiques sont plus sensibles à l'huile par rapport aux bactéries (**figure 27**).

IV.9.1. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'essai antibactérien indique que les souches bactériennes les plus résistantes à toutes les dilutions sont *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumonia* ATCC 4352 et *L. monocytogenes* ATCC 15313. En revanche, les plus sensibles sont *M. luteus* ATCC 1533

(figure 28) et *S. aureus* ATCC 6538 avec des zones d'inhibition de 30 ± 0.2 mm et 27 ± 0.1 respectivement (tableau 10).

Le pourcentage des bactéries à Gram+ sensible est de 87.5% par rapport aux Gram-sensible (33.33%), ce qui indique que les Gram+ sont plus sensibles à l'HE. Cette activité s'est manifestée par des CMI allant de $50.6 \mu\text{g/ml}$ à $0.79 \mu\text{g/ml}$ et des CMB obtenues de $101.2 \mu\text{g/ml}$ à $3.162 \mu\text{g/ml}$. Ces valeurs indiquent que l'huile essentielle a un effet bactéricide (tableau 10).

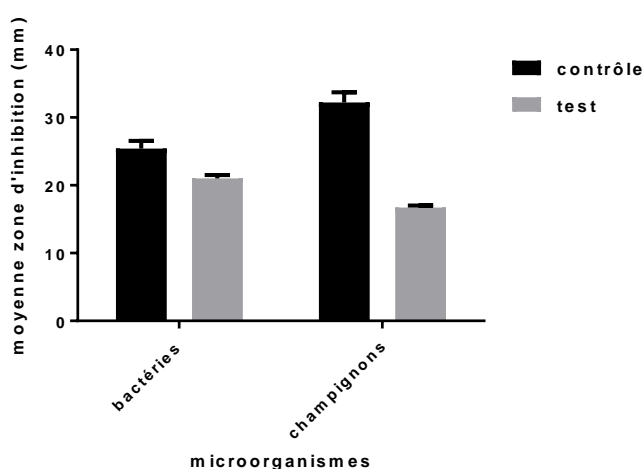


Figure 27. Les moyennes des zones d'inhibition du test de sensibilité à l'HE d'*H. italicum*. Les valeurs représentent la moyenne \pm SD (n = 3). Hautement significative ($p < 0.001$), champignons vs. Bactéries



Figure 28. les zones d'inhibition de *M.luteus*, la bactérie qui présente une sensibilité importante au test antimicrobien de l'HE d'*H.italicum*.

Tableau 10. L'activité antibactérienne de l'HE d'*Helichrysum italicum* mesurée en diamètre d'inhibition (mm) et (CMI) (CMB) de l'(HE) *H.italicum*

Souches bactériennes	L'(HE) <i>H. italicum</i> diluée à DMSO 10%							contrôle	
	1/1	1/2	1/5	1/10	CMI (µg/ml)	CMB (µg/ml)	CMB/CMI	GEN	DMSO
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	-	33	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	27±0.10	23±0.20	16±0.20	-	50.6	50.6	1	25	-
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698	30±0.20	21±0.6	17±0.4	-	6.325	12.65	2	24	-
<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 4352	-	-	-	-	-	-	-	21	-
<i>Enterococcus cereus</i> ATCC 2035	17±0.4	15±0.2	-	-	-	-	-	22	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	21±0.2	19±0.6	13±0.1	-	3.162	12.65	4	30	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	23±0.5	18±0.3	14±0.2	-	25.3	25.3	1	33	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372	19±0.2	16±0.1	-	-	12.65	50.6	4	33	-
<i>pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	18±0.4	12±0.2	09±0.1	-	12.65	12.65	1	26	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	19±0.5	17±0.1	14±0.3	-	50.6	101.2	2	30	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	18±0.2	12±0.4	07±0.1	-	1.581	3.162	2	25	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	-	-	-	-	-	-	-	23	-

– indique aucune croissance, GEN. (Gentamicine) contrôle positif ; DMSO (Dimethyl sulfoxid) contrôle négatif.

IV.9.2. Evaluation de l'activité antifongique

L'activité antifongique indique que l'huile essentielle inhibe la croissance de tous les champignons testés à toutes les dilutions, sauf *A.alternata*, *F.oxysporum*, *F. graminearum*, *A.flavipes*, *A.candidus*, *P.citrinum* et *P.expansum* qui sont résistants à la dilution de 1/5, et *Chaetomium globosom*, *Rhizopus stolinifer*, *Cladosporium cladosporioides*, *Phoma glomerata*, qui sont résistants à l'huile pure. A souligner que chez quelques souches il y a un changement de couleur du mycélium (**figure 30**).

La différence entre l'effet antifongique de l'HE est le 5-FC (5-Fluorocytosine) n'est pas hautement significatif $P \geq 0.05$ pour les souches *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 et *Mucor racemosus* et est hautement significatif $p < 0.001$ pour la souche *Candida albicans* ATCC 10231 qui présente une activité proche de celle de 5-FC avec une zone d'inhibition 29 ± 0.2 mm (**tableau 11**).

Les résultats montrent que *C. albicans* ATCC 10231 est la plus sensible suivie par *S. cerevisiae* ATCC 9763, *M. racemosus*, *A. phoenicis* et *P. citrinum* avec des zones d'inhibition de 29 ± 0.2 mm, 27 ± 0.7 mm, 24 ± 0.5 mm, 22 ± 0.4 mm, 18 ± 0.3 mm respectivement. Une exception est enregistrée chez *F. solani* var. *coeruleum* avec une même zone d'inhibition $12 \pm 0,1$ mm pour les deux dilutions 1/2 et 1/5. *P. expansum* et *F. graminearum* présentent la zone d'inhibition la plus faible (09 ± 0.3 mm). L'activité antifongique enregistrée s'est traduite par des CMF_C de $12,65 \mu\text{g/ml}$ à $50,6 \mu\text{g/ml}$ et des CMF_S de $6,325 \mu\text{g/ml}$ à $50,6 \mu\text{g/ml}$ (**tableau 11**).

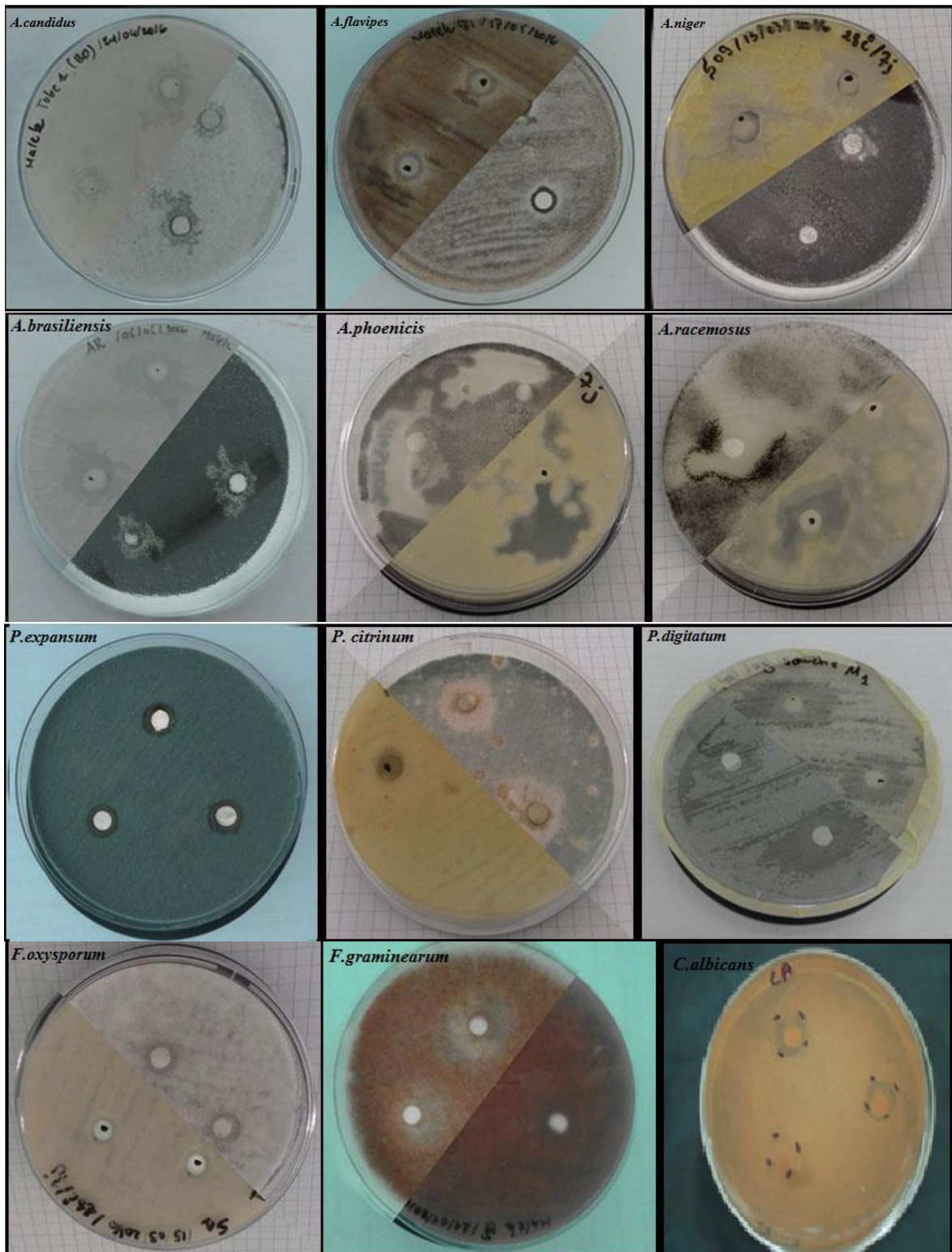


Figure 30. Le test de sensibilité des souches fongique à l'HE pure d'*H. italicum* présenté par des zones d'inhibition.

Tableau 11. L'activité antifongique de l'(HE) mesurée en diamètre d'inhibition (mm) et CMF_S CMF_C de l'HE.

Souches fongiques	L'(HE) <i>H.italicum</i> diluée en DMSO10% (v/v)							Contrôle	
	1/1	1/2	1/5	1/10	CMF _S (µg/ml)	CMF _C (µg/ml)	CMF _C /CMF _S	5-FC	DMSO
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	29±0.2	22 ±0.4	13 ±0.1	-	6.325	12.65	2	24	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	27±0.7	21 ±0.2	11 ±0.3	-	6.325	12.65	2	30	-
<i>Fusarium solani</i> var. <i>coeruleum</i>	13±0.4	12 ±0.1	12 ±0.1	-	50.6	50.6	1	27	-
<i>Aspergillus niger</i>	14±0.2	11 ±0.5	08 ±0.2	-	25.3	50.6	2	65	-
<i>Alternaria alternata</i>	11±0.4	07 ±0.1	-	-	25.3	50.6	2	34	-
<i>Ascochyta rabiei</i>	14±0.8	12±0.4	10±0.1	-	50.6	50.6	1	28	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	15±0.1	10±0.5	-	-	50.6	50.6	1	28	-
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	20±0.3	17±01	16±0.3	-	6.325	12.65	2	35	-
<i>Penicillium citrinum</i>	18±0.3	15±0.7	-	-	6.325	12.65	2	45	-
<i>Aspergillus flavipes</i>	16±0.1	11±0.6	-	-	6.325	12.65	2	28	-
<i>Mucor racemosus</i>	24±0.5	20±0.5	08±0.1	-	25.3	50.6	2	26	-
<i>Aspergillus candidus</i>	15±1.4	10±0.9	-	-	50.6	50.6	1	24	-
<i>Fusarium graminearum</i>	09±0.3	05±0.3	-	-	25.3	50.6	2	28	-
<i>Penicillium digitatum</i>	20±0.7	17±0.8	12±0.7	-	6.325	12.65	2	30	-
<i>Aspergillus phoenicis</i>	22±0.4	19±0.2	14±0.3	-	50.6	50.6	1	31	-
<i>Penicillium expansum</i>	09±0.3	06±0.5	-	-	6.325	12.65	2	26	-

– indique aucune croissance, 5-FC5-FC (5-Fluorocytosin) contrôle positif ; DMSO (Dimethyl sulfoxid) contrôle négatif.

DISCUSSION

V. DISCUSSION

Le genre *Helichrysum* (Miller) appartient à la famille des *Asteraceae* un très vaste genre comprenant environ 600 espèces répandu partout dans le monde. La plupart des espèces des *Asteraceae* sont herbacées, mais un grand nombre se présentent sous forme d'arbustes, de vignes ou d'arbres. Les espèces appartenant à cette famille sont d'une grande importance dans la phytothérapie (Nuzhat et Vidyasagar, 2013). Les espèces d'*Helichrysum* de la basse-méso-Méditerranée sont réparties aux milieux humide, et à une altitudes du niveau de la mer de 400 m à 1700 m, préférant des sols sableux ou limoneux (Perrini *et al.*, 2009). Près de 25 espèces sont originaires du bassin méditerranéen et l'espèce la plus répandue est *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don syn. *H. augustifolium* DC (Guinoiseau *et al.*, 2013).

En Algérie, peu de données sont disponibles sur le genre *Helichrysum*. Dans le sous domaine oro-algérien qui présente effectivement plus de 200 plantes communes aux sommets de l'Est algérien, ce sont des espèces endémiques Algériennes et Magrébines qui sont retrouvées tels que *H. lacteum* et *H. stoechas* (Quezel, 1957).

L'étude microscopique a permis de révéler des sites sécrétoires. Les coupes histologiques des tiges et feuilles de la plante d'*Helichrysum italicum* montrent la présence de plusieurs types de poils sécréteurs. Une étude morphologique par microscope optique est réalisée en 1971 par Osipova, qui avait montré la présence des mêmes types des poils sécréteurs. Par contre des études microscopiques des sommités fleuries et des feuilles d'*H. italicum* ssp. *microphyllum* ont indiqué que les trichomes glandulaires sécrétant les huiles essentielles sont d'un seul type morphologique (Perrini *et al.*, 2009).

Les glandes de tous les génotypes de *H. italicum* ssp *italicum* concordent avec ceux rapportés par Perrini *et al.*, (2009). Les glandes des plantes utilisées dans la présente étude ressemblent aux poils glandulaires (glandes) de l'*Arctium lappa*, autrement

considérés comme représentatifs de la famille des *Asteraceae* (Fahn, 1979). La présence de l'huile essentielle produite par la partie aérienne d'*Helichrysum italicum*, est due particulièrement à la richesse de la plante en structures sécrétoires comme le confirment nos observations histologiques (Osipova, 1971).

Le rendement d'HE obtenu est proche de ceux cités dans plusieurs travaux (Satta *et al.*, 1999 ; Roussis *et al.*, 2000 ; Pirrini *et al.*, 2009 ; Usai *et al.*, 2010). Les résultats obtenus montrent que le meilleur rendement en HE d' *Helichrysum italicum* est obtenu à la fin de la floraison de la plante Juin-juillet (Combalot, 2013. Pirrini *et al.*, (2009) ont obtenu un rendement 0.50% et 0.54% pour deux génotypes d'*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *microphyllum*. Le rendement d'huile de la plante récoltée en Mai est trop faible (non quantifiable), de même que celui utilisant la plante à l'état frais. Ces résultats s'accordent avec ceux de Mancini *et al.*, (2011) et Mastelic *et al.*, (2008) qui eux aussi ont obtenus un rendement très faible (0.02%) et (0.12 à 0.21%) respectivement, en utilisant des plantes récoltées en Mai et fraîche.

Plusieurs travaux relatifs au séchage des plantes aromatiques et médicinales indiquent des modifications considérables, particulièrement sur le plan quantitatif, au niveau des huiles essentielles. Or, une plante si elle n'est pas séchée dans de bonnes conditions, elle risque de se dégrader et par suite, la perte de la totalité de ses huiles essentielles (Aghfir, 2007). Dans ce sens, Benjlali *et al.*, (2005) ont trouvé que la teneur en huile essentielle des feuilles de romarin séchée à l'ombre pendant une semaine est quatre fois plus élevée que celle de la plante fraîche. L'augmentation de la teneur en huiles essentielles avec le séchage suggère la continuité et l'accélération de la biosynthèse des huiles essentielles après la récolte du matériel végétal (Silou *et al.*, 2002 ; Bourkhiss *et al.*, 2009).

On constate que le rendement est variable; cette variabilité est due probablement à la variation des facteurs tels que, le stade de croissance, les conditions pédoclimatiques, la période de la récolte, le temps de la récolte et le séchage. Le volume d'huile essentielle récupéré dépend du rendement de la distillation, qui est variable, chez une même plante, en fonction de la saison (Gonny *et al.*, 2004). De nouvelles techniques, permettant d'augmenter le rendement de production, ont été développées, comme l'extraction au moyen de dioxyde de carbone liquide à basse température et sous haute pression (Santoyo *et al.*, 2005) ou l'extraction assistée par ultrasons ou micro-ondes (Kimbaris *et al.*, 2006).

La composition chimique de l'huile essentielle d'*H. italicum* des échantillons étudiés est différente de celles des autres pays. Cette différence est caractérisée par la présence de l' α -cédrène, α -curcumène, géranyle d'acétate, nérol, acétate de néryle et α -pinène comme constituants majoritaires et par le faible pourcentage de géraniol (0,02 %). *H. italicum* de la côte Adriatique (sous-espèces non précisés) produit des huiles essentielles avec l' α -pinène, l' α -et le γ -curcumène en tant que composants majeurs (Conti *et al.*, 2010). Par contre, l'huile essentielle des sous espèces (*italicum* subsp) de Toscane contient principalement de l' α -pinène et acétate de néryle (Bianchini *et al.*, 2001), alors que l'échantillon de l'huile du sud de l'Italie est dominée par l'époxyde iso-italicène (Mancini *et al.*, 2011). Une autre huile d'origine italienne contient principalement du γ -curcumène, β -sélinène et α -sélinène (Morone-Fortunato *et al.*, 2010).

L'acétate de néryle est également l'un des principaux composants de l'huile d'*H. italicum* ssp *italicum* d'Amérique du Nord (Mastelic *et al.*, 2005), et dans l'huile de *H. italicum* du sud de Croatie (Tucker *et al.*, 1997). Le Nérol et ses esters sont les principaux composants de l'huile essentielle des fleurs de certains génotypes d'*H. italicum* ssp *Microphyllum* (Satta *et al.*, 1999).

Les espèces d'*Helichrysum* comprennent différents écotypes ainsi que différents chémotypes. Les analyses chimiques de diverses espèces d'*Helichrysum* démontrent qu'elles synthétisent un large éventail de métabolites (Powell *et al.*, 1965 ; Jakupovic *et al.*, 1986 ; Opitz et Hänsel, 1971 ; Manitto *et al.*, 1972 ; Lawrence, 1998 ; Appendino *et al.*, 2007). Morone-Fortunato *et al.* (2010) ont montré une grande diversité dans la composition chimique de l'HE entre les différentes populations des spécimens d'*H. italicum* en Italie dû à leur diversité génétique.

Les parties les plus riches en principes actifs dans la plante d'*Helichrysum* sont les fleurs et les portions triennales de la tige, à l'état sec (Pino, 1947)

Les plantes aromatiques ont la particularité de renfermer au sein de leurs organes sécréteurs, des cellules génératrices de métabolites secondaires où il y a la synthèse de molécules très volatiles à partir des unités méthyl-2-buta-1,3-diène (isoprène) et où les réactions d'addition de ces unités conduisent aux terpènes, sesquiterpènes, déterpènes et leurs produits d'oxydation tels que les alcools, aldéhydes, cétones, éthers et esters terpéniques. L'ensemble de ces produits sont accumulés dans des cellules sécrétrices offrant à la plante une odeur caractéristique (Heinrich *et al.*, 1983). Cette différence peut s'expliquer par différents facteurs, par exemple le moment de la récolte et les facteurs saisonniers climatiques locaux et géographiques (Morone Fortunato *et al.*, 2010). Ens *et al.* (2008) ont démontré la corrélation entre la composition de l'huile essentielle et les différents paramètres comme la composition inorganique du sol, le stade végétatif de développement, la texture et l'acidité du sol.

L'activité antioxydante de l'huile essentielle est déterminée par deux méthodes, le test du DPPH et le test du pouvoir réducteur du Fer qui sert comme indicateur significatif de l'activité antioxydante potentielle des composés (Narasimhan *et al.*, 2014).

L'activité antioxydante importante de l'huile essentielle d'*H. italicum* vis-à-vis du radical DPPH est évaluée en suivant la réduction de celui-ci. La molécule antioxydante peut neutraliser les radicaux DPPH en fournissant un atome d'hydrogène ou un électron (Que *et al.*, 2006). L'huile essentielle d'*H. italicum* a montré une meilleure activité de piégeage des radicaux libres par rapport à celle obtenue avec le BHT, utilisé comme antioxydant standard et égale à celle de l'acide gallique. Cette activité antiradicalaire est probablement due aux composés polyphénoliques, connus par leurs activités antioxydantes (Almaraz-Abarca *et al.*, 2007 ; Vukics *et al.*, 2008). De même, ce pouvoir réducteur exprime la capacité d'un composé à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) en fer ferreux (Fe²⁺) par transfert d'un électron. Ce pouvoir est probablement dû à la présence des molécules ayant une capacité réductrice qui inhibe les réactions en chaînes déclenchées par les radicaux libres (Prasad *et al.*, 2010).

En effet l'huile d'*H. italicum* contient les polyphénols tels que l' α -Eudesmol, *p*-Cresol, *o*-Cresol, l'Eugénol et l'anisol en plus des alcools. Ces composés ont été identifiés aussi par Josip *et al.*, (2008). Ces constituants sont censés jouer un rôle important dans l'activité antiradicalaire du DPPH (Kulis^{ic} *et al.*, 2004). Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance à 517 nm (Majhenic *et al.*, 2007).

Le pouvoir réducteur de l'HE qui est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques, contenus dans cette huile, peuvent servir comme donneur d'électrons. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs désactivant les oxydants. Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme indicateur significatif de sa potentielle activité antioxydante (Jeong *et al.*, 2004 ; Kumaran et Karunakaran, 2007).

Les huiles essentielles et la majorité de leurs composés représentent les plus importants additifs alimentaires utilisés pour la préservation contre leurs dégradations par

l'oxydation lipidique due à leur forte réactivité avec le radical peroxy. Le mécanisme d'action de ces antioxydants naturels dans les réactions de l'oxydation lipidique est basé sur les phénols et les autres composés avec le groupe hydroxyle présent dans l'HE. L'atome d'hydrogène du groupe hydroxyle des phénols peut réagir avec les radicaux peroxy produites dans des étapes précoces du mécanisme d'oxydation pour produire des radicaux phénoxy stables (Amorati *et al.*, 2013).

La dénaturation des protéines est une cause de l'inflammation. Plusieurs médicaments anti-inflammatoires ont montré la capacité d'inhiber la dénaturation des protéines induite thermiquement (Deattu *et al.*, 2012). L'activité inhibitrice de la dénaturation des protéines (albumine) par l'HE est plus forte que celle du Diclofinac sodique. Les présents résultats ont présenté une concentration nécessaire à l'inhibition de la dénaturation des protéines inférieure au médicament standard Diclofinac sodique. Par ailleurs, ce dernier est toxique à des doses élevés et cause aussi des effets indésirables tels que la gastrite, cependant aucun rapport sur la toxicité possible des métabolites secondaires de l'HE d'*H.italicum* n'ont été signalés (Guinoiseau *et al.*, 2013). Ce pourcentage d'inhibition est tellement important à faible dose ce qui rend cette huile intéressante pour traiter les maladies inflammatoires.

L'activité inhibitrice de l'HE due à l'inhibition de la dénaturation des protéines (Albumine) indiquant alors une stabilisation des protéines. Cette dénaturation est un processus où les protéines perdent leurs structures secondaires et tertiaires par l'interaction avec d'autres facteurs externes, tels qu'un acide fort, une base, un sel inorganique concentré, un solvant organique ou la chaleur. La dénaturation des protéines tissulaires est un des premiers signes enregistrés de l'inflammation (Opie, 1962). Cet effet est peut être due à la présence des trois phénols dans l'HE, le thymol, l'eugénol et le 3-isopropyl-phénol (Mastelić *et al.*, 2008).

Les esters terpéniques de l'HE d'*Helichrysum italicum* sont des anti-inflammatoires et anti-spasmodiques (Bruneton, 2009). Notre huile contient aussi des esters terpéniques à des pourcentages élevés comme, acétate de géranyle, acétate de néryle et d'autres esters terpéniques à faible pourcentage comme Acétate de terpényle et Butanoate de géranyle ces constituants peuvent être à l'origine de l'effet anti-inflammatoire puissant de l'huile.

Bauer *et al.*, (2011) ont identifié l'Arzanol, et l' α -pyrone comme constituants majoritaires de l'huile d'*Helichrysum italicum*. Ces composés sont des cétones qui contribuent dans la réduction du processus inflammatoire. Ces constituants ne sont pas identifiés dans notre huile, la présence d'autres composés cétoniques à faible pourcentage comme le 2-Nonanone et le 3-Hexanone, peuvent être à l'origine de l'activité anti-inflammatoire enregistrée. Les esters terpéniques qui se trouvent dans l'HE de *Cymbopogon winterianus* ont une activité anti-inflammatoire comme, l'acétate de géranyle, les monoterpènes comme le limonène, les alcools monoterpéniques comme le linalol, l' α -terpinéol, le nérol, le géraniol. Les esters: acétates de géranyle, de néryle, géraniol, néral de l'HE de zestes d'Orange amère (*Citrus aurantium*) ont une activité anti-inflammatoire aussi (Franchomme *et al.*, 2001). Ces composés sont également présents dans l'huile d' *H.italicum*.

Le test d'anti-hémolyse est un autre test descriptif de l'activité anti-inflammatoire, la présente étude montre que l'HE protège la membrane érythrocytaire humaine contre la lyse induite par la solution hypotonique. L'érythrocyte dont la membrane est analogue à la membrane lysosomale, est utilisée comme modèle pour étudier l'interaction des médicaments avec les membranes (Sessa et Weisman, 1968 ; Litman *et al.*, 1976 ; Oyedepo et Famurewa, 1995 ; Chou, 1997).

L'activité anti-inflammatoire de l'HE d'*Helichrysum italicum* peut être expliquée par la stabilité de la membrane des lysosomes, qui empêche la libération des protéases. La

présence de polyphénols dans l'huile pourrait être responsable de cette activité (Murugasan *et al.*, 1981). Des médicaments tels que les anti-inflammatoires non stéroïdien stabilisent les érythrocytes contre le stress hypotonique qui induit l'hémolyse en empêchant la sortie d'hémoglobines et donc conduit à une stabilité membranaire (Seema *et al.*, 2011).

L'huile essentielle d'*H. italicum* exerce une activité antimicrobienne très importante. Les huiles essentielles sont considérées comme actives si elles produisent des diamètres d'inhibition supérieurs ou égaux à 15 mm (Rossi *et al.*, 2007). Sur la base des résultats obtenus, l'huile essentielle d' *H. italicum* a une activité bactéricide et fongicide importante. Les CMB/CMI obtenus qui sont compris entre 1 et 4, sont semblables à celles obtenues par Canillac et Mourey (2001). De même les MFCc/CMFs obtenus qui se situaient entre 1 et 2 (moins de 4) sont semblables à celles de Derwich *et al.*, (2010). Selon Aligiannis *et al.* (2001) l'activité est forte si la CMFs est inférieure ou égale à 500µg/ml, l'HE d'*H. italicum* présente une activité antifongique puissante sur toutes les souches fongiques (Aligiannis *et al.* 2001).

L'activité antimicrobienne d' *H. italicum* peut être attribuée à sa composition chimique. En fait les composés oxygénés sont probablement responsables de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*H. italicum* tels que l'acétate de néryle, l'acétate de géranyle, le géraniol et le nérol (Bajpai *et al.*, 2013). Ces composés sont les principaux constituants de notre HE d'*H.italicum*.

Oussalah *et al.*, (2007) ont rapporté que la composition de l'HE ne peut pas être similaire chaque année même si elles sont extraites de la même région. Par exemple, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de quatre différents chémotypes d'huile de thym (linalol, thuyanol, le carvacrol et le thymol type) contre *Staphylococcus aureus* variait de 250 à 4000 µg/mL selon la présence du thymol.

En plus de ces composés, cette activité peut être attribuée à la présence des groupements acétates tel que l'acétate de géranyle un composé majoritaire dans l'HE d'*Helichrysum italicum*. En effet l'acétate de géranyle est plus actif que le géraniol contre certaines bactéries à Gram positives et à Gram négatives (Dorman et Deans, 2000).

Les alcools sont d'ailleurs reconnus pour exercer un effet plutôt bactéricide que bactériostatique (Dorman et Deans, 2000 ; Kalemba et Kunicka, 2003). La forte teneur en alcools de l'HE d'*H. italicum* peut expliquer son effet bactéricide.

Inouye *et al.*, (2001) et Hammer *et al.*, (1999) ont rapporté que malgré que limonène est un constituant mineur dans l'huile des agrumes, il contribue à l'activité antibactérienne de cette huile.

Mastelic *et al.*, (2005) ont montré que l'HE d'*Helichrysum italicum* et ses fractions terpéniques ont une activité antimicrobienne puissante surtout contre *S.aureus* et *C. albicans* ce qui s'accorde avec les résultats obtenus. La susceptibilité de *C. albicans* est probablement due à la présence de l'acétate de géranyle (10,05 %), dans notre huile essentielle. Toutefois, les hydrocarbures monoterpènes ou sesquiterpénique représentent 10,83 % des composés identifiés, et leurs dérivés oxygénés présentent une activité antimicrobienne potentielle (Siti *et al.*, 2010).

Lorenzi *et al.*, (2009) ont montré que l'huile essentielle d'*Helichrysum italicum* réduit considérablement la multi résistance des bactéries nosocomiales tels que *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*. Cette activité est due aux alcools terpéniques (notamment le géraniol) agissant par inhibition des pompes à efflux. Ces pompes, sont à l'origine du système de résistance des bactéries, sont inhibées par les alcools terpéniques empêchant l'expulsion des antibiotiques hors de la bactérie.

Certaines huiles comme notre huile ont une inhibition sélective pour certaines bactéries, par exemple *S. aureus* est plus sensible à l'huile par rapport à *E. coli*, par contre l'activité antibactérienne d'autres huiles est inversée (Plant et Stephens., 2015). Cette différence dans l'activité est peut être due aux mécanismes d'action de ces huiles.

Il y a une certaine controverse au sujet des quels des composants de l'huile responsables de l'activité antibactérienne d' *H. italicum* contre *Staphylococcus aureus*. Certaines études suggèrent la fraction terpénoïdes (Mastelic *et al.*, 2005), tandis que d'autres suggèrent que ces activités pourraient être due à la fois aux terpènes et aux flavonoïdes (Nostro *et al.*, 2001 ; Nostro *et al.*, 2002).

Plusieurs huiles essentielles ont démontré des activités antimicrobiennes différentes selon les tests effectués ou selon d'autres facteurs tels que le milieu de culture et la méthode utilisée. Par exemple, l'HE du citron a montré dans une certaine mesure un effet inhibiteur clair contre *Escherichia coli* sur le milieu PDA (Fisher et Phillips, 2006). Cependant, d'autres chercheurs n'ont pas remarqué cette activité inhibitrice de l'huile de citron contre le même micro-organisme cible en utilisant un autre milieu nutritif dans le test (Deans *et al.*, 1987).

Cependant, on devrait considérer l'activité antimicrobienne synergique possible des composés mineurs, α -pinène, β -pinène et le limonène sur l'activité antimicrobienne (Filipiowicz *et al.*, 2003). L' α - et le β -pinène sont capables de perturber l'intégrité cellulaire et d'inhiber la respiration et les processus de transport des ions (Tzakou *et al.*, 1998; Tekaya - Karoui *et al.*, 2011).

La synergie entre les composants de la plante aromatique joue souvent un rôle essentiel dans l'activité antimicrobienne. le carvacrol, le γ -terpinène et le p-cymène sont plus efficaces quand ils sont combinés (Adebayo *et al.*, 2012).

Les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus par Cantore *et al.*, (2004), qui ont signalé que les bactéries à Gram positives sont plus sensibles aux huiles essentielles des plantes que les bactéries à Gram négatives. Rossi *et al.*, (2007) ont démontré aussi que l'huile essentielle, obtenue à partir des plantes endémiques de la Corse, est plus efficace contre les bactéries à Gram positives comme *S. aureus* que contre des souches à Gram négatives comme *E. coli*, *Enterobacter aerogenes* et *P. aeruginosa*. Tandis qu'*E. coli* (bactérie Gram⁺) et *P. aeruginosa* (bactérie Gram⁻) développent une résistance vis-à-vis d'un certain nombre d'huiles essentielles (Delamare *et al.*, 2007; Kheyar *et al.*, 2014). D'autre part, ces bactéries sont très sensibles à d'autres huiles essentielles (Bouhdid, 2005 ; Amrouni *et al.*, 2014).

Il est communément connu que les Gram négatives sont moins sensibles aux huiles essentielles que les bactéries à Gram positives, et cela est directement lié à la structure de la paroi cellulaire bactérienne. Chez les bactéries à Gram négatives, la paroi cellulaire est une enveloppe complexe constituée par la membrane cytoplasmique, le périplasme et la membrane externe. Ce dernier restreint la diffusion des molécules hydrophobes à travers sa couche lipopolysaccharidique agissant ainsi comme une barrière de perméabilité. En plus des altérations membranaires provoquées, ces molécules peuvent franchir la bicouche lipidique, pénétrer à l'intérieur des cellules et interagir avec des cibles intracytoplasmiques (Cristani *et al.*, 2007). Compte tenu de la diversité moléculaire des huiles essentielles, il semble plus probable que leur activité antibactérienne résulte de l'association de plusieurs mécanismes, qui s'exercent sur différentes cibles cellulaires (Burt, 2004).

A signaler que l'utilisation de DMSO 10% comme solvant de l'HE augmente l'efficacité du test antimicrobien. En effet l'utilisation du DMSO sans dilution peut avoir un effet négatif sur l'activité des huiles essentielles (Guinoiseau *et al.*, 2013).

Beaucoup de chercheurs ont confirmé la présence de l'activité bactérienne de l'HE essentielle d'*Helichrysum italicum* d'autres régions du monde mais très peu d'études parlent de son activité antifongique. Les résultats obtenus montrent que l'HE d' *H.italicum* d'Algérie a une activité antifongique intéressante.

La résistance de quelque souches fongique peut être expliqué par la variété des enzymes produites par le mycélium qui peuvent détoxifier les composés de l'huile en forme inactive (Farooq *et al.*, 2002a). Cette détoxification est une deuxième étape parmi les quatre grandes étapes d'interactions complexes ente les composés chimiques des plantes et les champignons phytopathogènes : 1) Production de métabolites secondaires antifongiques par les plantes, 2) la détoxification des métabolites antifongique de plantes par les champignons phytopathogènes, 3) la production de métabolites phytotoxiques par les champignons phytopathogènes et 4) la détoxification des métabolites phytotoxiques par les plantes (Farooq *et al.*, 2002b).

Toutefois, des données limitées sont disponibles sur l'activité antifongique des huiles essentielles contre les champignons qui causent des mycoses et des champignons phytopathogènes (Nuzhat et Vidyasagar, 2013). Les champignons du genre *Aspergillus*, *Fusarium* et *Alternaria* sont considérés comme les pathogènes majeurs et producteurs de mycotoxines dans le monde (Ghafoor et Khan, 1976). Ces champignons ont une sensibilité considérable à l'huile d'*H.italicum*.

Des rapports sur l'activité antifongique et la composition chimique des huiles essentielles de plantes aromatiques, *Chrysanthemum coronarium* L. appartenant à la famille des *Asteraceae* est évaluée contre douze champignons phytopathogènes. Les principaux composés dans l'huile ont été le camphre, α - et β -pinènes et l'acétate de lyratyl (Alvarez -Castellanos *et al.*, 2001). Glisic *et al.*, (2007) ont établi que les fractions contenant les concentrations élevées des α -pinène, sabinène inhibent efficacement la

croissance des micro-organismes, en particulier les champignons. En outre, l'activité antimicrobienne est trop dépendante de la teneur en β -pinène.

Les huiles essentielles provenant de trois espèces d'*Artemisia*; *A. absinthium* L., *A. santonicum* L. et *A. spicigera* C. Koch. de la famille des *Asteraceae* ont des effets inhibiteurs puissants sur tous les champignons testés (Kordali *et al.*, 2005). L'huile essentielle de *Tagetes patula* L. a également une bonne activité antifongique contre deux champignons phytopathogènes, *Botrytis cinerea* et *Penicillium digitatum*, manifestée par l'inhibition complète de la croissance (Romagnoli *et al.*, 2005).

D'autres exemples d'huiles essentielles antifongiques de la famille des *Asteraceae* comprennent également l'huile essentielle de *Chrysactinia mexicana* Grag, qui a complètement inhibé la croissance d'*Aspergillus flavus* et *H. italicum* (Roth) Don. actif contre le *Pythium ultimum*. Pipéritone et Piperitenone deux principaux composés de ces plantes contribuent dans les modifications structurales des mycéliums observées par microscopie électronique, et des modifications considérables dans la morphologie des hyphes et sur plusieurs sites (Cardenas *et al.*, 2005 ; Tundis *et al.*, 2005). Une activité antifongique puissante révélée des huiles essentielles des parties aériennes de trois plantes de la famille des *Asteraceae* contre trois phytopathogènes fongiques des espèces du *Colletotrichum* (Nurhayat *et al.*, 2007).

Le pouvoir antifongique d'huile essentielle d'*Helichrysum italicum* peut être attribué à la présence de composants doués d'activité antifongique tels que: le curcumène, le pinène, le terpinène et le à différentes proportions (Papajani *et al.*, 2015). De même Chu et Kemper (2001) signalent que le pouvoir antifongique d'huile essentielle du *Lavandula stoechas* est lié aux: β -pinène, *p*-cimène, 1,8 cinéole et α -pinène (Papajani *et al.*, 2015).

Soylu *et al.* (2005) ont supposé que la nature lipophile de l'huile essentielle la rend plus absorbable par les mycéliums fongiques que par la gélose de nature hydrophile.

Les membranes des champignons contiennent de l'ergostérol. Ces derniers assurent la rigidité de la membrane cytoplasmique donc le moindre effet qui perturbe l'ergostérol membranaire peut provoquer la lyse cellulaires (Knobloch, *et al.*, 1989).

Soylu *et al.* (2007) ont observé des altérations dans la morphologie des hyphes et une lyse de la paroi de l'hyphe couramment observé pour les mycéliums traités avec des huiles essentielles. Cette altération peut être liée à l'effet de l'huile essentielle sur les réactions enzymatiques et la régulation de la synthèse de la paroi (Soylu *et al.*, 2010).

Le mécanisme d'action des composés phénoliques des huiles essentielles sur les champignons est fondé principalement sur l'inhibition des enzymes fongiques contenant le groupement SH dans leur site actif (Celimene *et al.*, 1999).

Dorman et Deans (2000) rapportent que l'effet fongicide de l'HE d'*H.italicum* est lié à la présence des carvacrol, et linalol, ce dernier est l'un des composés majeurs de l'HE d'*H. italicum*, connus par leurs effets fongicides.

Elshafie *et al.*, (2015) ont conclu que le carvacrol et thymol montre une inhibition de la maladie de la pourriture brune des pêches causée par *M. laxa*, *M. fructicola* et *M. fructigena*. L'effet antifongique est principalement attribué à l'inhibition de la germination des spores et de la croissance du mycélium.

L'effet antifongique des huiles essentielles vis-à-vis *C. albicans* est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure (Cox *et al.*, 2000). Les composés de l'huile essentielle de menthe, menthol, menthone et carvone, suppriment la croissance de *C. albicans* en perturbant la concentration d'ergostérol dans la membrane cellulaire, ainsi que la lyse provoquée par eux est inférieure à celle induite par le fluconazole (Samber *et al.*, 2015).

Les propriétés antifongiques des huiles essentielles sont étroitement liées à la nature de leurs constituants et des groupements ou fonctions chimiques qu'ils possèdent ; c'est le cas de l'activité antifongique qui décroît selon le type de fonctions chimiques :

Phénols >Alcools> Aldéhydes> Cétones> Ethers> Hydrocarbures (Billerbeck, 2007). Les propriétés biologiques des huiles essentielles sont associées à la prédominance des fonctions chimiques. Etant donné la grande complexité de la composition chémotypique des huiles essentielles, et malgré de possibles synergies, certains auteurs préfèrent étudier l'effet d'un composé isolé pour pouvoir ensuite le comparer à l'activité globale de l'huile (Chaumont et Leger, 1989 ; De Billerbeck, 2007).

D'après Wiley (2005), la couleur caractéristique de beaucoup des moisissures est due à la pigmentation des conidiums. En conséquence, le changement de la couleur des espèces fongiques pourrait être dû à l'effet de l'HE d'*H.italicum* sur les conidiums. Cette action peut affecter principalement le processus de la sporulation du champignon en perturbant le fonctionnement du conidium. L'altération de la couleur des colonies de certains champignons par l'HE d'*H.italicum* peut être en relation de l'interférence des composés de cette huile avec la biosynthèse de mélanine. Toutefois, la production de mélanine par certains champignons contribue à leur virulence (Butler *et al.*, 2001).

Les études microscopiques montrent que les huiles essentielles des plantes causent des distorsions des hyphes avec plusieurs fragmentations et désorganisations des organes de reproduction et causent aussi une séparation de la membrane cytoplasmique de la paroi cellulaire et donc une destruction des organelles cellulaires (Kocic'-Tanackov *et al.*, 2012).

Les agents antifongiques synthétiques sont appliqués à grande échelle pour empêcher la croissance mycélienne. Ces produits chimiques sont également connus pour posséder des propriétés cancérigènes, tératogéniques, oncogènes et génotoxiques (Nagendra *et al.*, 2010).

La difficulté de développer une molécule antifongique est liée, d'une part à l'ultrastructure de la cellule fongique qui présente trois barrières : la paroi cellulaire chitineuse, les ergostérols membranaires et le noyau eucaryote (Chami, 2005) ; et d'autre part, les molécules antifongiques elles-mêmes qui peuvent engendrer des résistances (Nagendra *et al.*, 2010; Prasad *et al.*, 2010). Les huiles essentielles peuvent être utiles en tant qu'agents antifongiques parce qu'elles affectent plusieurs cibles simultanément et il n'y a aucun rapport de résistance ou d'adaptation des microorganismes à cause de la diversité des composés chimiques (Bakkali *et al.*, 2008).

CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'utilisation des produits naturels dans la sécurité alimentaires et dans la phytothérapie, présentent un large éventail d'activités biologiques et pharmacologiques. Actuellement, les produits naturels sont utilisés dans des préparations alimentaires principalement comme aromatisants et par les industries cosmétiques et pharmaceutiques, comme parfums et additifs. Ces substances naturelles ont été suggérées dans les denrées alimentaires parce qu'ils ont des propriétés antimicrobiennes importantes contre les bactéries et les champignons et même une activité antioxydante. Ainsi que l'utilisation des différents conservateurs pour assurer que les aliments manufacturés demeurent sécuritaires et intacte, tandis que les conservateurs chimiques ont des activités cancérigènes potentielles, et une toxicité résiduelle.

Le problème d'utilisation des médicaments synthétique pose aussi un problème de santé comme le problème de résistance microbienne, et les effets indésirables de ces médicaments chimique nocif pour l'homme. Les chercheurs se sont trouvés, alors face à la recherche et la découverte d'autres agents d'origine naturelles dotés d'activités biologiques avec moins d'effets néfastes sur la santé humaine.

Ce travail a pour objectif de valoriser l'huile essentielle et ses activités biologiques d'une plante endémique *Helichrysum italicum* (Roth) G.Don de la famille des *Asteraceae*. Cette huile essentielle présente un grand intérêt médical et pharmaceutique et même cosmétique.

Pour évaluer les activités de cette huile essentielle on a d'abord commencé par l'analyse chimique de l'HE par (GC-MS), qui a montrée la présence de α -cédrène (13.61 %), α -Curcumene (11.41 %), acétate de géranyle (10.05 %), limonène (6.07 %), nérol (5.04 %), acétate de néryle (4.91 %) et α -pinène (3.78 %) comme constituants majoritaires.

L'huile essentielle a montrée une activité anti-oxydante très importante avec des EC_{50} ($4.70 \pm 1.96 \mu\text{g/ml}$) très intéressantes par la technique DPPH, et même proche de celle de l'Acide gallique EC_{50} ($4.66 \pm 0.12 \mu\text{g} / \text{ml}$) et plus forte que celle du BHT avec une (EC_{50} $141.23 \pm 5.02 \mu\text{g/ml}$). Les résultats obtenus par le test du pouvoir réducteur de Fer montrent que l'huile d'*helichrysum italicum* exerce un pouvoir réducteur important avec une $EC_{50} = 14.89 \pm 0.09 \mu\text{g/ml}$, qui semble proche de ceux des standards, le BHT ($EC_{50} = 13.52 \pm 0.28 \mu\text{g/ml}$), et l'acide gallique ($EC_{50} = 10.09 \pm 0.18 \mu\text{g/ml}$).

On a aussi estimé le pouvoir protecteur des érythrocytes et l'inhibition de la dénaturation protéique, et donc l'inhibition du processus inflammatoire. L'HE d'*H. italicum* possède une activité anti-inflammatoire très importante avec EC_{50} $296 \pm 42.12 \mu\text{g/ml}$ par rapport au Diclofénac sodique (EC_{50} $590 \pm 11.03 \mu\text{g/ml}$), la concentration élevée de ce derniers cause des effets indésirables sur le corps humain. Le traitement par HE entraîne une stabilité de la membrane plasmique avec un pourcentage de protection de 56.2% à la concentration $132 \mu\text{g/ml}$, cette concentration apparaît très faible par rapport à l'aspirine.

Pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne de cette HE, on a utilisé des souches bactériennes de références, des champignons proviennent de laboratoire de recherche et des champignons isolés et identifiés à partir des aliments commercialisés au marché local.

Par des méthodes classiques d'identification nous avons mis au point la dominance qualitative – en nombre d'espèces – du genre *Aspergillus* avec 31.25 % de la totalité des souches isolées; les espèces du genre *Penicillium* sont classées en deuxième position, correspondant à 25 % de celle-là. Les espèces du genre *Fusarium* en constituent 12.5 %. Les souches restantes correspondent à 6.25 % et incluent les genres suivants : *Phoma glomerata*, *Chaetomium globosom*, *Rhizopus stolonifer*, *Mucor racemosus* et *Cladosporium cladosporioides* dont chacun n'est représenté que par une seule espèce. Au total, 33

souches microbiennes ont été mises à l'étude de l'activité antimicrobienne de l'HE d'*H.italicum*

L'activité antimicrobienne de l'HE est mesurée par la méthode de diffusion de disque sur milieu solide. L'HE inhibe la croissance de tous les microorganismes testés sauf trois bactéries, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumonia* ATCC 4352 and *L. monocytogenes* ATCC 15313 et cinq champignons, *Chaetomium globosom*, *Rhizopus stolinifer*, *Cladosporium cladosporioides*, *Phoma glomerata*. La bactérie la plus sensible est *P. mirabilis* ATCC 35659 avec une (CMI) et (CMB) 1.581 et 3.162 $\mu\text{g ml}^{-1}$ respectivement. La (CMFs) et (CMFc) est de 6.325 $\mu\text{g ml}^{-1}$ et 12.65 $\mu\text{g ml}^{-1}$ respectivement pour *C. albicans* ATCC 10231, *S. cerevisiae* ATCC 9763, *A. brasiliensis*, *A. flavipes*, *P. citrinum*, *P. digitatum* and *P. expansum*.

Ainsi que les bactéries *M. luteus* ATCC 1533 et *S. aureus* ATCC 6538 avec des zone d'inhibition de $30 \pm 0,2$ mm et $27 \pm 0,1$ respectivement, l'HE présente une activité antibactérienne mieux que le contrôle Gentamicine, la différence est hautement significative $p < 0.001$. Le pourcentage de bactéries Gram+ sensible est de 87.5% par rapport au 33.33% des Gram- sensible, ce qui indique que les Gram+ sont plus sensibles à l'HE.

La différence entre l'effet antifongique de l'(HE) est le 5-FC (5-Fluorocytosin) est n'est pas hautement significative $P \geq 0.05$ pour les souches *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 et *Mucor racemosus* et hautement significative $p < 0.001$ pour la souche *Candida albicans* ATCC 10231 avec une activité proche de celle de 5-FC avec une zone d'inhibition 29 ± 0.2 mm. L'activité antifongique enregistrée s'est traduit par des CMFc de 12,65 $\mu\text{g ml}^{-1}$ à 50,6 $\mu\text{g/ml}$ et des CMFs de 6,325 $\mu\text{g/ml}$ à 50,6 $\mu\text{g/ml}$.

Pour améliorer la recherche des agents antimicrobiens de nombreuses huiles essentielles des plantes, plusieurs facteurs expérimentaux et biologiques devraient être pris

en considération tels que (i) la standardisation appropriée et exacte des tests microbiologiques ; (ii) la disponibilité des souches standards provenant de différentes collections ; (iii) les essais sur une variété des microorganismes soit Gram positif, Gram négatif, champignons phytopathogènes et levures ; (iv) l'identification botanique exacte de la plante d'origine productrice d'huile ; (v) caractérisation biochimique de l'HE extraits ainsi que leur production, conditions de stockage et l'âge. En outre, la solubilité dans l'eau et la volatilité des nombreux HE permettent à révéler un large spectre d'activité dans divers essais *in vitro* comme la bonne diffusion dans l'agar, et les dilutions utilisées.

Enfin, sur la base de toutes les activités biologiques démontrées par l'HE d'*H.italicum* dû à la synergie de ses divers constituants, cette huile peut être proposée comme un alternatif agent : antimicrobien, anti-oxydant, anti-inflammatoire, sachant qu'aucune démonstration de l'effet de cette huile provient de la même espèce a été signalé.

Afin d'étendre nos connaissances sur l'efficacité des produits bioactifs naturels et explorer leur application, les recherches doivent se concentrer sur les questions suivantes :

- L'identification de chaque constituant de cette HE et exploiter l'action inhibitrice de chaque constituant identifié *in vitro* ainsi *in vivo*.
- Étude de la relation structure-activité des composés isolés avec leur spécificité biologique respective.
- Mener des analyses phytochimiques et biologiques comparatives sur les constituants chimiques isolés présents dans l'espèce sélectionnée d' *Helichrysum* aux composés chimiques existantes isolés du genre.
- l'élucidation mécanismes moléculaire de la cellule par lesquels le micro-organisme réagir contre les produits bioactifs naturels ; la définition des effets de matrice sur

l'efficacité antimicrobienne d'un produit naturel bioactif en combinaison avec d'autres obstacles.

- l'utilisation de technologies émergentes en combinaison avec des produits naturels, qui peuvent agir en synergie pour la prévention de la prolifération microbienne ; la détermination d'autres activités biologiques des produits naturels, par exemple, celles relatives à l'antioxydant et le potentiel anticancéreux et l'identification des mécanismes possibles d'action
- la compréhension des attitudes des consommateurs et de la perception de la qualité. En outre, il faudrait mettre davantage l'accent sur les dosages de la prévalence des microorganismes pathogènes en relation avec l'utilisation d'antimicrobiens naturels au cours des différentes étapes de la production dans l'industrie.

REFERENCES

REFERENCES

- Adebayo O., Dang T., B'elanger A. and Khanizadeh S. 2012. Antifungal Studies of Selected Essential Oils and a Commercial Formulation against *Botrytis Cinerea*, **Journal of Food Research**. 2(1):217.
- AFNOR, 1980. Huile essentielle, recueil des normes françaises. NFT 75-006. Paris: AFNOR.
- Akhtar S., Degaga B. and Azam T. 2016. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: a review. **Biological Sciences and Pharmaceutical Research**. (2)1:1–7.
- Aleksic V. and Knezevic P. 2014. Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. **Microbiological Research**. (169)4:240-254.
- 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.
- Almaraz-Abarca N., Campos M.D.G., Reyes J.A., Jimenez N.N, Corral J.H, Gonzalez-Valdez L.S. 2007. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, *Leguminosae*). **Journal of Food Composition and Analysis**. 20:119-124.
- Almeida M.M.B., Sousa P.H.M., Arriaga A.M.C., et al. 2011. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh fruits from Northeastern Brazil. **Food Research International**. 44:2155-2159.
- Alvarez -Castellanos P.P., Bishop C.D, Pascual M. 2001. Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of *garland chrysanthemum* (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. **Journal of Phytochemistry**. 57(1):99-102.
- Amorati R., Foti M.C., Valgimigli L. 2013. Antioxidant activity of essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 61:10835-10847.
- Amrouni S., Touati M., Hadeif Y., Djahoudi A. 2014. Effet de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* et de *Thymus ciliatus* sur *Pseudomonas aeruginosa* VIM-2 carbapénémase **Phytothérapie**. 12(5):309–313.
- Teuscher E., Anton R., Lobstein A. 2005. Girofle. In: **Plantes aromatiques**. Collection TEC & DOC, Éditions Lavoisier, Cachan, 266-272.
- Appendino G., Ottino M., Marquez N., Bianchi F., Giana A., Ballero M., Sterner O., Fiebich, B.L., Munoz E. 2007. Arzanol, an anti-inflammatory and anti-HIV-1 phloroglucinol –pyrone from *Helichrysum italicum* ssp. *microphyllum*. **Journal of Natural Products**. 70: 608–612.
- Arnal-Schnebel B., Hadji-Minaglou F., Peroteau J.F., Ribeyre F., De Billerbeck V.G. 2004. Essential oils in infectious gynaecological disease: a statistical study of 658 cases. **International Journal of Aromatherapy**. 14(4):192–197.

REFERENCES

- Bajpai V.K. and Kang S.C. 2010. Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Mikiex. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. 87:327–336.
- Bajpai V.K., Sharma A., Baek, K.H. 2013. Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. **Food Control**. 32:582–590.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils- a review. **Food and Chemical Toxicology**. 46:446-475.
- Balunas M.J. and Kinghorn A.D. 2005. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**. 78:431-441.
- Barber A., Rendero S., Corbi M., Alba B., Molina D., Barber, J.X. 2005. Aproximación al conocimiento etnobiológico y etnoecológico de Ibi (*Foia de Castalla-L'Alcoià, Alicante*). Identia Institute, Spain.
- Basu S. 2010. Fatty acid oxidation and isoprostanes: Oxidative strain and oxidative stress. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. 82:219-225.
- Bauer J., Koeberle A., Dehma F., et al. 2011. Arzanol a prenylated heterodimeric phlorogluciny pyrone, inhibits eicosanoid biosynthesis and exhibits anti-inflammatory efficacy in vivo. **Biochemical Pharmacology**. 81:259-268.
- Bauer, K. and Garbe, D. 1985. Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses. **VCH Verlagsgesellschaft**, Weinheim, Germany.
- Beatovic D., Krstic-Milošević D., Trifunovic S., et al., 2015. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of twelve *Ocimum basilicum* L. cultivars grown in Serbia. **Records of Natural Products**. 9(1):62–75.
- Belaiche P.1979. Traité de Phytothérapie et d'Aromathérapie. Ed: MALOINE. 18- 35.
- Benjlali B., Zrira S. and Aboukasssem H. 2005. Plantes Aromatiques et Médicinales, Atouts du Secteur et Exigences Pour Une Valorisation Durable. Edition Actes, Rabat.
- Bennett P.N., Brown M.J. 2005. Clinical pharmacology. Churchill Livingstone: New Delhi.
- Besombes C. 2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse Doctorat. Université de La Rochelle. 41-45.
- Bianchini K.J., Houston R.J., Greve K.W., et al. 2003. Malingered Neurocognitive Dysfunction in neurotoxic exposure: An application of the slick criteria. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**. 45:1087-1099.
- Bianchini A., Santoni F., Paolini J., Bernardini A.F., Mouillot D., Costa J. 2009. Partitioning the Relative Contributions of Inorganic Plant Composition and Soil Characteristics to the Quality of *Helichrysum italicum* subsp. *italicum* (Roth) G. Don essential oil. **Chemistry and Biodiversity**. 6:1014-1033.

REFERENCES

- Bianchini A., Tomi P., Costa J., Bernardini A.F. 2001. Composition of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. Subsp. *italicum* essential oils from Corsica (France). **Flavour and Fragrance Journal**. 16:30-34.
- Botton B., Bertron A., Fevere M., et al. 1999. Les champignons mycologie fondamentale et appliqué, Masson. 36-45.
- Bouhdid S., Idaomar M., Zhiri A., Baudoux D., Senhajiskli N., et Abrini J. 2005. L'effet antibactérien *in vitro* de l'huile essentielle d'*Origanum compactum* vis-à-vis de souches d'origines cliniques. **Nouvelles Tendances dans l'Ingénierie Biomédicale**. 11:142-149.
- Bourkhiss M., Hnach M., Bourkhiss B., Ouhssine M., Chaouch A., Satrani B. 2009. Effet de séchage sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata*, (Vahl) Masters, Productions végétales. **Agrosolutions**. 20(1):44-48.
- Brachet A., Christen P. and Veuthey J.L. 2002. Focused microwave-assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. **Phytochemical Analysis**. 13:162-169.
- Brunechon J. 1987. Pharmacognosie. **Ecole technique de documentation**, Ed. Ravoilie.
- Bruneton J. 1999. Pharmacognosie- phytochimie, plantes médicinales. 4eme Ed. **Tec & Doc**, Paris,1288.
- Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R.L. 2000. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. **American Society of Plant Physiologists**: Rockville, MA, 1367
- Butler J.M., Day A.W., Henson J.M. and Money N.P. 2001. Pathogenic properties of fungal melanins. **Mycologia**. 93:1-8.
- Canillac N. and Mourey A. 2001. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. **Food Microbiology**. 18:261-268.
- Cantore L.P., Iacobellis S.N., Marco D.A., Capasso F., Senatore F. 2004. Antibacterial activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Miller var. (MILLER) Essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 7862–7866
- Capuzzo A., Maffei M.E., Occhipinti A. 2013. Supercritical fluid extraction of plant flavors and fragrances. **Molecules**.18:7194-7238.
- Cardenas N.C., Zavala M.A., Aguirre J.R., Perez C. and Perez S. 2005. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Chrysactinia mexicana* Gray. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53(11):4347-9.
- Carocho M., and Ferreira I. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**. 51:15-25.
- Cavar Z.S., Solic M.E. and Maksimovic M. 2015. Volatiles of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don from Croatia. **Natural Product Research**. 5(4):319-323

REFERENCES

- Celimene C.C., Micales J.A., Ferge L. and Young R.A. 1999. Efficacy of pinosylvins against white rot and brown rots fungi. **Holzforschung**.53:491- 497.
- El Kalamouni C. 2010. Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse.
- Chami F. 2005. Evaluation *in vitro* de l'action antifongique des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composés majoritaires *in vivo* application dans la prophylaxie et le traitement de la Candidose Vaginale sur des modèles de rat et de souris immunodéprimés, Thèse de doctorat, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc, 266.
- Chandra S.P., Chatterjee P.D., Bhattacharya S. 2012. **Pharmacognosy Journal**. 47-49.
- Chaumont J.P., Leger D. 1989. Propriétés antifongiques de quelques phénols et de composés chimiquement très voisin. Relation structure - activité. **Medecinal plant and Phytoterapy**. 23(2):124-126.
- Chinou I.B., Roussis V., Perdetzolou D., Loukis A. 1996. Chemical and biological studies on two *Helichrysum* species of greek origin. **Planta Medica**. 62:377-339.
- Chu J., Kemper K. J. 2001. *Lavender (Lavan du lassung)*. **Longwood Herbal task Force**.32.
- Cisowski W. 1985. Flavonoid compounds in *Myrrhis odorata* (L.) **Scope Herbal Polonica**.31:13-19.
- Combalot M., 2013. L'Immortelle d'Italie (*Helichrysum italicum*) et son huile essentielle. Université Joseph Fourier, faculté de pharmacie de Grenoble.
- Conner D.E. and Beuchat, L. R. 1984. Sensitivity of heat-stressed yeasts to essential oils of plants. **Applied and Environmental Microbiology**. 47(2):229–233.
- Conti B., Canale A., Bertoli A., Gozzini F., Pistelli L. 2010. Essential oil composition and larvicidal activity of six Mediterranean aromatic plants against the mosquito *Aedes albopictus* (*Diptera: Culicidae*). **Parasitology Research**. 107:1455-1461.
- Couplan F. 2009. Dictionnaire étymologique de botanique: comprendre facilement tous les noms scientifiques. Eds. Delachaux et Niestlé, Lausanne, Paris. 103-9
- Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L. et al. 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**. 88:170-175.
- Cristani M., D'Arrigo M., Mandalari G., et al.2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 55:6300-6308.
- Croteau R. 1992. Biochemistry of monoterpenes and sesquiterpenes of the essential oils. In: Herbs, Spices, bioand Medicinal Plants, Recent Advances in Botany, Horticulture, and Pharmacology. **Food Product Press**. 1:81-133.
- De Billerbeck V.G. 2007. Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. **Phytothérapie** 5:249-253.

REFERENCES

- Degrelle M. 2015. Les hélíchryses ou immortelles en aromathérapie. Zoom sur l'hélíchryse italienne corse.
- De Sousa D.P. 2015. Bioactive essential oils and cancer. 1st Ed. New York, USA: **Springer International Publishing**. 292.
- Deans S.G and Ritchie G., 1987. Antibacterial properties of plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology**. (5)2:165-180.
- Deattu N., Narayanan N., Suseela L. 2012. Evaluation of Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of Polyherbal Extract by In Vitro Methods. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**.3 (4):727-732.
- Debnath P.C., Das A., Islam A., Islam M.A., Hassan MM., Gias Uddin S.M. 2013. Membrane stabilization, a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of a Bangladeshi medicinal plant: *Erioglossum rubiginosum* (Bara Harina). **Pharmacognosy Journal**.5:104-107.
- Delamare A.P.L., Ivete A., Luciana A.S. and Sergio E. 2007. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in south Brazil. **Food Chemistry**.100:603-608.
- Derwich E., Benziane Z., Boukir A. 2010. GC/MS Analysis and antibacterial activity of the essential oil of *Mentha pulegium* grown in Morocco, **Research journal of agriculture and biological sciences**. 6 :191-198.
- Di Novella R., Di Novella N., De Martino L., Mancini E., De Feo V. 2013. Traditional plant use in the National Park of Cilento and Vallo di Diano, Campania, Southern, Italy. **Journal of Ethnopharmacology**.145:328-342.
- Dordevic S., Petrovic S., Dobric S., et al. 2007. Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**.109:58-463.
- Dorman H.J, Deans S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**. 88:308-316.
- Dung N.T., Kim J.M, Kang S.C. 2008. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. **Food and Chemical Toxicology**.46:3632-3639.
- Duschatzky C.B., Possetto M.L., alaricoet L.B.T., et al. 2005.Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oils from South American plants. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**.16(4):247-251.
- Elshafie H.S., Mancini E., Sakr S., et al. 2015. Antifungal Activity of Some Constituents of *Origanum vulgare* L. Essential Oil against Postharvest Disease of Peach Fruit. **Journal of Medicinal Food**.18(8):929-934.

REFERENCES

- Ens E.J., Bremner J.B., French K., Korth J. 2008. Identification of volatile compounds released by roots of an invasive plant, *bitou bush* (*Chrysanthemoides monilifera* spp. *rotundata*), and their inhibition of native seedling growth. **Biological Invasions**. 11:275-287.
- Fabrocini V.C. 2007. Comment se soigner avec L'AROMATHERAPIE et guérir : agitation, anxiété, allergie, asthme, déprime, insomnie, lombalgie, mal de dos, migraines, palpitations, etc. Ed. de vecchi.4-17.
- Fadel H., Marx F., El-Sawy A., El-Gorab A. 1999. Effect of extraction techniques on the chemical composition and antioxidant activity of *Eucalyptus camaldulensis* var. *brevirostris* leaf oils. 208:212-216.
- Fahn A. 1979. Secretory Tissues in Plants. Academic Press, London.
- Farag R.S., Daw Z.Y., Hewedi F. M., El-Baroty G.S.A. 1989. Antimicrobial activity of some egyptian spice essential oils. **Journal of Food Protection**.52:665-667.
- Farooq A., Choudhary M.I., Rahman A. and Tahara S. 2002_a. Detoxification of terpinolene by plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Zeitschrift für Naturforschung**. 57:863-866.
- Farooq A., Tahara S., Choudhary M. I., Atta-ur-Rahman A. Z., Baser K.H.C., Demirci F., 2002_b. Biotransformation of (-)- α -pinene by *Botrytis cinerea*. **Zeitschrift für Naturforschung**. 57:303-306.
- Fernnell C.W., Lindsey K.L., McGaw L.J., et al., 2004. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacology screening and toxicology. **Journal of Ethnopharmacology**. 94:205-217.
- Filipiwick N., Kamiski M., Kurlenda J., Asztemborska M., Ochocha J.R., 2003. Antibacterial and antifungal activity of juniper berry oil and its selected components. **Phytoterapy Research**.17:227-231.
- Fisher K. and Phillips C. A. 2006. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* *in vitro* and in food systems. **Journal of Applied Microbiology**.101(6):1232-1240.
- Franchomme P., Jollois R., Phénoël D., Mars J. 2001. L'aromathérapie exactement : encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles : fondements, démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle. Limoge: R. Jollois.490.
- Funk V.A., Susanna, A., Stuessy, T.F. and Robinson, H. 2009. Systematics, evolution and biogeography of the compositae. International Association of Plant Taxonomy, Vienna.
- Galbany-casals M., Unwin M., Garcia-Jacas N., Smitsen R.D., Susanna A. and Bayer R.J., 2014. Phylogenetic relationship in *Helichrysum* (*Compositae*, *Gnaphalieae*) and related genera: Incongruence between nuclear and plastid phylogenies, biogeographic and morphological patterns, and implications for generic delimitations. **Taxon**.63:608-624.

REFERENCES

- Galli, A., Franzetti, L. and Briguglio, D. 1985. Antimicrobial properties *in vitro* of essential oils and extract of spices used for food. **Industrial Alimentaries**.24:463-466.
- Garnero J. 1996. Huiles essentielles. **Techniques de l'ingénieur**.45:10.
- Gautam N., Mantha A.K. and Mittal S. 2014. Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. **BioMed Research International**.1-23.
- Ghafoor A. and Khan S.A.J. 1976. List of diseases of economic plants in Pakistan. Ministry of Food and Agriculture, Islamabad, Pakistan.26.
- Glisic S.B., Milojevic S.Z., Dimimitrijevic S.L., Orlovic A.M., Skala D., 2007. Antimicrobial activity of the essential oil and different fractions of *Juniperus communis* L. and comparison with some commercial antibiotics. **Journal of the Serbian Chemical Society**. 2:311-320.
- Golmakani M.T. and Rezaei K. 2008. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. **Food Chemistry**.109:925-930.
- Gonny M., Bradesi P., Casanova J. 2004. Identification of the components of the essential oil from wild Corsican *Daucus carota* L. using ¹³C-NMR spectroscopy. **Flavour Fragrance Journal**.19:424-433.
- González-Tejero M.R. 1989. Investigaciones Etnobotánicas en la provincia de Granada. PhD Thesis, University of Granada, Granada.
- Guarino C., De Simone L., Santoro S. 2008. Ethnobotanical study of the Sannio Area, Campania, Southern Italy. **Ethnobotany Research & Applications**. 6:255-317.
- Guinoiseau E., Lorenzi V., Luciani A., et al., 2013. Biological properties and resistance reversal effect of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Dom A. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education (Méndez-Vilas.Ed.)**. 1072-1080.
- Guiraud., 1998. Microbiologie alimentaire. Ed Dunod, Paris, p 8, 98-99, 157, 321-329.
- Hammer K.A, Carson C.F, Riley T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**. 86:985-990.
- Hayes A.J. and Markovic B. 2002. Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1 Antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity. **Food and Chemical Toxicology**. 40:535-543.
- Heinrich G., Schultze W., Pfab I., Boettger M. 1983. The site of essential oil biosynthesis in *Poncirus trifoliata* and *Monarda fistulosa*. **Physiologie Vegetale**. 21:257-268.
- Hellali N., Mahammed M.H., Ramdane F., Talli A. 2016. Antimicrobial and antioxidant activities of *Cytopogon schoenanthus* (L.) Spreng essential oil, growing in Illizi – Algeria. **Journal of medicinal plant research**.10:188-194.

REFERENCES

- Hilliard, O.M. 1983. Asteraceae. In: O.A. Leistner (ed.), Flora of southern Africa. Botanical Research Institute of South Africa, Pretoria.
- Huang J, Mau J.L. 2006. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agaricus blazei* with various doses of γ -irradiation. **Swiss Society of Food Science and Technology**. 39:707–716.
- Inouye B., Takizawa T., Yamaguchi H. 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 47:565-573.
- Jakupovic J., Kuhnke J., Schuster A., Metwally M.A., Bohlmann F. 1986. Phloroglucinol derivatives and other constituents from South African *Helichrysum* species. **Phytochemistry**. 25:1133-1142.
- Jeong S.M., Kim S.Y., Kim D.R., et al., 2004. Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. 52: 3389-3393.
- Joseph M.N., Regina A.O., Alexander K.N., Dorothy Y.M., Phyllis G.A., 2015. Medicinal plants used to treat TB in Ghana. **International Journal of Mycobacteriology**.4:116-23.
- Josip M., Olivera P., Igor J. 2008. Contribution to the Analysis of the Essential Oil of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. Determination of Ester Bonded Acids and Phenols. **Molecules**.13:795-803.
- Joulain D.1994. Modern methodologies applied to the analysis of essential oil and other complex natural mixture : use and abuse. **Perfumer & Flavorist**. 19:5-17.
- Kalemba D., Kunicka A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr.Med. Chem.* 10: 813-829.
- Karthikeyan M., and Balasubramanian T. 2014. Phytochemical analysis of *Cynanchum callialatum* through GCMS and LCMS. **Homeopathy & Ayurvedic Medicine**. 3(1):1-6.
- Keita R.M. 2002. Etude de l'activité antifongique et antibactérienne de 14 plantes utilisées dans le traitement des I.S.T. Thèse de pharmacie, Bamako.130.
- Khalid, S., Rizwan, G.H., Yasin, H., et al. 2013. Medicinal importance of *Holoptela integrifolia* (Roxb). Planch Its biological and pharmacological activities. **Natural Products Chemistry & Research**. 2(1):1-4.
- Kimbaris A.C., Siatis N.G., Daferera D.J., Tarantilis P.A., Pappas C.S., Polissiou M.G. 2006. Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). **Ultrasonics Sonochemistry**.13:54-60.
- Kladar N.V., Anackov G.T., Rat M.M., et al. 2015. Biochemical characterization of *Helichrysum italicum* (Roth) G.Don subsp. *Italicum* (Asteraceae) from Montenegro: Phytochemical screening, chemotaxonomy, and antioxidant Properties. **Chemistry and Biodiversity**.12:419-431.

REFERENCES

- Knobloch K., Pauli P., Iberl B., Weigand H., Weiss N. 1989. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**.1:119-128.
- Kolayli S., Sahin H., Ulusoy E. and Tarhan O. 2010. Phenolic composition and antioxidant capacities of *Helichrysum plicatum*. **Journal of Biology and Chemistry**. 38(4):269-276.
- Kordali S., Cakir A, Mavi A., Kilic H., Yildirim. 2005. A Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish *artemisia* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53(5):1408-16.
- Kocić-Tanackov S.D., Dimić G.R., Tanackov I.J., et al. 2012. Antifungal activity of *Oregano* (*Origanum vulgare* L.) extract on the growth of *Fusarium* and *Penicillium* species isolated from food. **Hemijaska Industrija**.66:33-41
- Kubeczka K.H., Bartsch A., Ullmann I. 1982. Recent studies on essential oils of *Apiaceae*. **Ätherische Öle wirken gegen Krankenhauskeime**.158-187.
- Kulis'ic' T., Radonic' A., Katalinic' V., Milos' M. 2004. Use of different methods for testing antioxydatve activity of *Oreagano* essential oil. **Food Chemistry**. 85:633-640.
- Kumar S. and Pandey A.K. 2013. Chemistry and biological activities of Flavonoids: An overview. **The Scientific World Journal**.1-16.
- Kumaran A. and Karunakaran R.J. 2007. *In vitro* antioxidant activities of methanol extracts of *Phyllanthus* species from India. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**. 40: 344-352.
- Lang G. and Buchbauer G. 2012. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. Areview. **Flavour and Fragrance Journal**.27(1):13–39.
- Latifah-Munirah B., Himratul-Aznita W.H., Mohd Zain N. 2015. Eugenol, an essential oil of clove, causes disruption to the cell wall of *Candida albicans* (ATCC 14053). **Frontiers in Life Science**.8(3):231-240.
- Latorre J.A. 2008. Estudio etnobotánico de la provincia de La Coruña. PhD Thesis, University of Valencia, Valencia.
- Lawrence B.M. 1998. *Helichrysum* oil and extract. **Performance Flavors**.23:55-59.
- Leon R. H. O. 2005. Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combine « solvant/actif » d'origine végétale. Thèse de l'institut national polytechnique de Toulouse, France.
- Lewis K., Ausubel F.M. 2006. Prospects for plant derived antibacterials. **National Biotechnology**. 24:1504-1507.
- Lorenzi V., Muselli A., Bernardini A.F., et al. 2009. Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from gram-negative species. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. 53:2209-2211.

REFERENCES

- Lourens, A.C.U., Viljoen, A.M., Van Heerden, F.R. 2008. South African *Helichrysum* species: A review of the traditional uses, biological activity and phytochemistry. **Journal of Ethnopharmacology**.119:630-650.
- Lucchesi M.E. 2006. Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à L'extraction des Huiles Essentielles. Thèse de Doctorat. 16-59.
- Lwande W., Hassanali A., Wanyama O.B., Ngola S., Mwangi J.W. 1993. Constituents of the essential oil of *Helichrysum odoratissimum* (L.) Less. **Journal of Essential Oil Research**.5:3-95.
- Majhenic L., Kerget M.S., Knez Z. 2007. Antioxidant and antimicrobial activity of *guarana* seed extracts. **Food Chemistry**. 104:1258-1268.
- Mancini E., De Martino L., Marandino A., Scognamiglio M.R., De Feo V. 2011. Chemical composition and possible *in vitro* phytotoxic activity of *Helichrysum italicum* (Roth). Don ssp. *italicum*. **Molecules**.16:7725-7735.
- Mandal V., Mohan Y., Hemalatha S. 2007. Microwave-assisted extraction-An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. **Pharmacognosy Reviews**. 1(1):7-18.
- Manitto P., Monti D., Colombo E. 1972. Two new –diketones from *Helichrysum italicum*. **Phytochemistry**.11:2112-2114.
- Manning J. and Goldbatt P. 2012. Plants of the greater cape floristic region 1: The core cape flora. 29 ed. Pretoria: Strelitzia.
- Mastelic J., Jerkovic I., Blazevic I., et al., 2008. Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56:3989-3996.
- Mastelic J., Politeo, O., Jerkovic, I., Radosevic, N. 2005. Composition and antimicrobial activity of *Helichrysum italicum* essential oil and its terpene and terpenoid fractions. **Chemistry of Natural Compounds**. 41, 35–40.
- Meissner O. 2004. Editorial: The traditional healer as part of the primary health care team? **South African Medical Journal**. 94:901-902.
- Menichini F., Statti G., Delle Monache F. 1994. Dipartimento di Chimica, Università degli Studi della Calabria, Arcavacata di Rende, Italy. Flavonoid glycosides from *Scorzonera columnae*. **Fitoterapia**. 65(6):555-6.
- Meyer-Warnod B. 1984. Natural essential oils: extraction processes and application to some major oils. **Perfumer & Flavorist**. 9: 93-104.
- Aghfir M., Kouhila M., Jamali A., Ait Mohamed L. 2007. Sechage solaire convectif pour la conservation des feuilles de romarin (*Rosmarinus ocinalis*). Jean Jacques BEZIAN. JITH, Albi, France. ENSTIMAC.5.

REFERENCES

- Molyneux P., 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH^o) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin; Journal of Sciences and Technologies, 26 (2): 211-219.
- Moro - Buronzo A. 2008. Grand guide des huiles essentielles : Santé, Beauté, Bien- Etre, Hachette pratique. 14.
- Morone-Fortunato I., Montemurro C., Ruta C., et al. 2010. Essential oils, genetic relationships and *in vitro* establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from wild Mediterranean germplasm. **Industrial Crops and Products**. 32:639-649.
- Mulyaningsih S., Sporer F., Zimmermann S., Reichling J., Wink M. 2010. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1, 8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. **Phytomedicine**.17(13):1061-1066.
- Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M., Tenover F.C., Tenover F.C., Tenover F.C., Yolke R.H. 1995. Manual of Clinical Microbiology 6, ASM, Washington.
- Nag, S., Paul, A., Dutta, R. 2013. Phytochemical analysis of methanol extracts of leaves of some medicinal Plants. **International Journal of Science Research Publication**. 3(1):1-5.
- Nagendra P.M.N., Shankara B.S., Sreenivasa M.Y. 2010. Antifungal activity of essential oils against *Phomopsis azadirachtae*- the causative agent of die-back disease of neem. **Journal of Agricultural Technology**.6(1):127-133.
- Narasimhan, S., Rajeevan, N., Liu, L., et al. 2014. Gut microbiota of the tick vector *Ixodes scapularis* modulate colonization of the Lyme disease spirochete. **Cell Host Microbe**. 15: 58-71.
- Kheyar N., Meridja D., Belhamel K. 2014. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* de la région de Bejaia. **Algerian Journal of Natural Products**.2(1):18-26
- Nazzaro F., Fratianni F., De Martino L., Coppola R., De Feo V. 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. Pharmaceuticals, vol. 6, no. 12, p 1451–1474.
- Ndlovu G., Fouche G., Tselanyane M., Cordier W. and Steenkamp V., 2013. *In vitro* determination of the anti-aging potential of four southern African medicinal plants. **BMC Complementary and Alternative Medicine**.13(304):1-7.
- Nostro A., Bisignano G., Angela Cannatelli M., Crisafi, G., Paola Germano, M., Alonzo, V. 2001. Effects of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**.17:517-520.
- Nostro A., Cannatelli M.A., Musolino A.D., Procopio F., Alonzo V. 2002. *Helichrysum italicum* extract interferes with the production of enterotoxins by *Staphylococcus aureus*. **Letters in Applied Microbiology**. 35:181-184.

REFERENCES

- Nurhayat T., Betul D., Sara L.C., Kemal H.B and David E.W. 2007. Chemical Composition and Antifungal Activity of *Arnica longifolia*, *Aster hesperius*, and *Chrysothamnus nauseosus* Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 55:8430-8435.
- Nuzhat T., and Vidyasagar G.M. 2013. Antifungal investigations on plant essential oils. **A review international Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**.5(2):19-28.
- Oksuz S., Goren N.; Ulubelen A. 1990. Terpenoids from *Scorzonera tomentosa*. **Fitoterapia**. 61(1):92-3.
- Oosterhaven K., Poolman B., Smid E.J. 1995. S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteriostatic compound. **Industrial Crops and Products**. 4(1): 23-31.
- Opie E.L. 1962. On the relation of necrosis and inflammation to denaturation of proteins. **Journal of Experimental Medicine**.115:597-608.
- Opitz L., Hänsel, R. 1971. Phtalides aus *Helichrysum italicum*. **Archiv der Pharmazie**. 304:228-230.
- OMS, Organisation Mondiale de la Santé. 2002. Stratégie de l’OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005. OMS, Suisse.
- Osipova, EA. 1971. Anatomical and morphological peculiarities of *Helichrysum italicum* (Roth) Guss. with its containing essential oils. **Botanichnyi Zhurnal**. 5: 1499-1511.
- Ornano L., Venditti A., Sanna C., et al. 2015. Chemical composition and biological activity of the essential oil from *Helichrysum microphyllum* Cambess. ssp. *tyrrhenicum* Bacch., Brullo e Giusso growing in La Maddalena Archipelago, Sardinia. **Journal of Oleo Science**. 64(1):19-26.
- Oussalah M., Caillet S., Saucier L. and Lacroix M. 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**.18(5):414-420.
- Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. **Japanese Journal of Nutrition**.307-315.
- Oyedepo O., Famurewa A.J. 1995. Anti-protease and membrane stabilizing activities of extracts of *Fagara. Zanthoxyloides*, *Olox sub-scorpioidea* and *Tetrapleura tetraptera*. **International Journal of Pharmacognosy**. 33:65-69.
- Panero J.L., Freire S. E., Espinar L. A., et al. 2014. Resolution of deep nodes yields an improved backbone phylogeny and a new basal lineage to study early evolution of Asteraceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 80:43-53.

REFERENCES

- Paolini J., Desjobert J.M., Costa J., et al. 2006. Composition of essential oils of *Helichrysum italicum* G. Don fil. Subsp. *italicum* from Tuscan Archipelago islands. **Flavour Fragrance Journal**. 21:805-808.
- Papajani V., Haloci E., Goci E., Shkrelidze R., Manfredini S. 2015. Evaluation of antifungal activity of *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* essential oil before and after inclusion in β -cyclodextrine. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. 7(5):270-273.
- Popova, M., Silic, S. i, Kaftanoglu, O., Bankova, V.S. 2005. Antibacterial activity of Turkish *propolis* and its qualitative and quantitative chemical composition. **Phytomedicine**. 12:221-228.
- Parada M. 2007. Estudi etnobotànic de la comarca de l'Alt Empordà. PhD Thesis, University of Barcelona, Barcelona.
- Pardo de Santayana M., Blanco E., Morales R. 2005. Plants known as té in Spain: An ethno-pharmacobotanical review. **Journal of Ethnopharmacology**. 98:1-19.
- Passalacqua N.G., Guarrera P.M., De Fine G. 2007. Contribution to the knowledge of the folk plant medicine in Calabria region (Southern Italy). **Fitoterapia**. 78:52-68.
- Peralta M.A., Silva Da., Ortega M.G., Cabrera J.L., Paraje M.G. 2015. Antifungal activity of a prenylated flavonoid from *Dalea elegans* against *Candida albicans* biofilms. **Phytomedicine**. 22(11):975-980.
- Perrini R., Morone-Fortunato I., Lorusso E., Avato P., 2009. Glands, essential oils and in vitro establishment of *Helichrysum italicum*. (Roth) G. Don ssp. *italicum*. *Ind. Crops Prod.* 29, p 395–403.
- Pieroni A. 2000. Medicinal plants and food medicines in the folk traditions of the upper Lucca Province, Italy. **Journal of Ethnopharmacology**. 70:235-273.
- Pino A. 1947. Recherches sur les variations du taux du lactose dans le lait de vache pendant le travail. *Le Lait*, Paris. 263-264.
- Pitman V. 2004. *Aromatherapy: A Practical Approach*. Ed: Nelson Thornes. 1-137.
- Plant J. and Stephens B. 2015. Evaluation of the Antibacterial Activity of a *Sizable Set* of Essential Oils. **Medicinal and Aromatic Plants**. 4: 185.
- Popoola O.K., Elbagory A.M., Ameer F., Ahmed A.H. 2013. Marrubiin. **Molecules**. 18:9049-9060.
- Pourmortazavi S.M. and Hajimirsadeghi S.S. 2007. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. **Journal of Chromatography A**. 1163:2-24.
- Powell R.G., Smith J.R., C.R., Glass C.A., Wolff I.A. 1965. *Helichrysum* seed oil. II. Structure and chemistry of a new enynolic acid. **Journal of Organic Chemistry**. 30:610-615.

REFERENCES

- Prakash D., Upadhyay G, Brahma N., Singh H.B. 2007. antioxidant and free radical scavenging activities of seeds and agriwastes of some varieties of soybean (*Glycine max*), **Food Chemistry**.104:783-790.
- Pramila R, Padmavathy K, Ramesh KV, Mahalakshmi K. 2012. *Brevibacillus parabrevis*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas citronellolis*-Potential candidates for biodegradation of low density polyethylene (LDPE). **African Journal of Bacteriology Research. Abbreviation**. 4(1):9-14.
- Prasad K.N., Xie H., Hao J., et al. 2010. Antioxidant and anticancer activities of 8-hydroxypsoralen isolated from wampee [*Clausena lansium* (Lour.) Skeels] peel. **Food Chemistry**. 118:62-66.
- Prat R., 2007. Expérimentation en biologie et physiologie végétales : 300 manipulations Edition : QUAE, Herman éditeurs, Paris. 56.
- Proença da Cunha A., Alves Ribeiro J., Rodrigues Roque O. 2007. Plantas aromáticas em Portugal: caracterização e utilizações, 2nd ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisbon.
- Que F., Mao L., Pan X. 2006. Antioxidant activities of five Chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds. **Food Research International**. 39:581-587.
- Quezel P. and Santa S., 1963. Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertique et méridionales. Tome II, Edition CNRS, Paris.
- Quezel P., 1957. Peuplement végétal des hautes montagnes d'Afrique du Nord. Encyclopédie Biogéographique et Ecologique, p 10.
- Raut J. S. and Karuppayil S. M. 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**. 62:250-264.
- Redzic S.S. 2007. The ecological aspect of ethnobotany and ethnopharmacology of population in Bosnia and Herzegovina. **Collegium Antropologicum** 31:869-890.
- Rigan, D., Formisano C., Pagan, E., et al. 2014. A new acetophenone derivative from flowers of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. **Fitoterapia**. 99:198-203.
- Robinson H. 2004. New supertribes Helianthodae and Senecionade, for the subfamily *Asteroidae* (*Asteraceae*). **Phytologia**. 86:116-120.
- Romagnoli C., Bruni R., Andreotti E., Rai M.K., Vicentini C.B., Mares D., 2005. Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capitula from wild Indian *Tagetes patula* L. *Protoplasma*. 225(1-2):57-65.
- Rossi P.G., Berti L., Panighi J., et al. 2007. Antibacterial action of essential oils from Corsica. **Journal of Essential Oil Research**. 19:176-182.
- Roussis V., Tsoukatou M., Petrakis P.V., Ioanna C., Skoula M., Harborne J.B., 2000. Volatile constituents of four *Helichrysum* species growing in Greece. *Biochemical Systematics and Ecology* 28, p 163-175.

REFERENCES

- Rovesti P. 1930. Contributo allo studio delle essenze italiane di *Helichrysum stoechas* Moench. **Rivista Italiana Essenze e Profumi**. 12:149-54.
- Rožman T. and Jeršek B. 2009. Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*. **Acta agriculturae Slovenica**. 93:51-58.
- Rozzi N.L., Phippen W., Simon J.E., Singh R.K. 2002. Supercritical fluid extraction of essential oil components from lemon-scented botanicals. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**.35:319-324.
- Ruberto G., Baratta M.T. 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**. 69:167-174.
- Ruberto G., Biondi D.M., Barbagallo C., Meli R., Savoca F. 2002. Constituents of stem and flower oils of *Helichrysum litoreum* Guss. **Flavour and Fragrance Journal**. 17:46-48.
- Rudramurthy G.R., Swamy M.K., Sinniah U.R., Ghasemzadeh A. 2016. Nanoparticles: alternatives against drug-resistant pathogenic microbes. **Molecules**.21:7-8.
- Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S., Radice M. 2005. Comparative evaluation of essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**. 91:621-632.
- Salzer U.J. 1977. The analysis of essential oils and extracts (*Oleoresins*) from seasonings a critical review. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 9:345-373.
- Samber N., Khan A., Varma A., Manzoor N. 2015. Synergistic anti-candidal activity and mode of action of *Mentha piperita* essential oil and its major components, **Pharmaceutical Biology**. 53(10):1496-1504.
- Sánchez-Moreno C., Larrauri J.A., Saura-Calixto F. 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**.76:270-276.
- Santoyo S., Cavero S., Jaime L., Ibanez E., Senorans F.J., Reglero G. 2005, Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L, essential oil obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Food Protection**. 68:790-795.
- Satta M., Tuberoso C.L.G., Angioni A., Pirisi F.M., Cabras P. 1999. Analysis of the essential oil of *Helichrysum italicum* G. Don. **Journal of Essential Oil Research**. 11:11-715.
- Seema C.C., Sharan S.V., Srinivasa R.B., Meena V. 2011. *In vitro* anti-inflammatory activity of Methanolic extract of *Centella asiatica* by HRBC Membrane stabilization. **Rasayan journal of chemistry**. 4(2):457-460.
- Sessa G., Weisman G. 1968. Effect of components of the polyene antibiotic. Fillipin on phospholipids spherules (liposome) and erythrocytes. **The Journal of Biological Chemistry**. 243:4364-4371.

REFERENCES

- Sherwin E.R. 1976. Antioxidants for vegetable oils. **Journal of American Oil Chemical Society**. 53:430-436.
- Siani A.C., Ramos M.F., Menezes-de-Lima O.Jr., et al. 1999. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **Journal of Ethnopharmacology**. 66:57-69.
- Silou T., Rocquelin G., Mouragadja I., Gallon G. 2002. Chemical composition and nutritional characteristics of safou of Cameroon, the Congo-Brazzaville, the Congo-Kinshasa and Osipova, EA. Anatomical and morphological peculiarities of *Helichrysum italicum* (Roth) Guss with its containing essential oils. **Botanichnyi Zhurnal**. 56: 1499-1511.
- Siti, H.A.G., Nor, A.M.A., Mastura M., et al. 2010. Chemical constituents and antimicrobial activity of *Goniothalamus macrophyllus* (Annonaceae) from Pasoh Forest Reserve, Malaysia. **African Journal of Biotechnology**. 9:5511-5515.
- Shaukat, K., Ghazala, H.R., Hina, Y., et al. 2013. Medicinal importance of *Holoptela integrifolia* (Roxb.) Planch - its biological and pharmacological activities. **Natural Products Chemistry & Research**. 2(1):1-4.
- Soares J.R, Dinis T.C.P., Cunha A.P., Almeida L.M. 1997. Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*. **Free Radical Research**. 26:469-478.
- Soylu E. M., Kurt S., Soylu S. 2010. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. **International Journal of Food Microbiology**. 143(3):183-189.
- Soylu S., Yigitbas H., Soylu E. M., & Kurt S. 2007. Antifungal effects of essential oils from *Oregano* and *fennel* on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Applied Microbiology**. 103:1021-1030.
- Soylu E. M., Yiğitbaş H., Tok F. M., et al. 2005. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Artemisia annua* L. against foliar and soil-borne fungal pathogens. **Journal of Plant Diseases and Protection**. 112:229-239.
- Spinola M. 2016. Prise en charge de l'arthrose par les thérapeutiques alternatives et/ou complémentaires à l'allopathie (homéopathie – phytothérapie – aromathérapie – compléments alimentaires). Thèse Présentée à la Faculté de Pharmacie de Dijon pour l'obtention du Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie. Université de Bourgogne UFR des Sciences de Santé Circonscription Pharmacie.
- Sumonrat C., Suphitchaya C. and Tipparat H. 2008. Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical *Citrus* spp. against food-related microorganisms. **Songklanakarinn Journal of Science and Technology**. 30(1):125-131.
- Suwalak S. and Voravuthikunchai S.P. 2009. Morphological and ultrastructural changes in the cell structure of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 following treatment with *Quercus infectoria* nut galls. **Journal of Electron Microscopy**. 58: 315-320.

REFERENCES

- Teixeira B., Marques A., Ramos C. 2013. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. **Industrial Crops and Products**. 43: 587-595.
- Tekaya-Karoui A., Boughalleb N., Hammam S., Ben Jannet H., Mighri Z. 2011. Chemical composition and antifungal activity of volatile components from woody terminal branches and roots of *Tetraclinis articulate* (Vahl). Masters growing in Tunisia. **African Journal of Plant Science**. 5:115-122.
- Tolstikhina V.V. and Semenov A.A. 1998. Minor metabolites of *Scorzonera hispanica* L. Cell culture SO RAN, Irkutsk, Russia. **Rastitel'nye Resursy** 34(2):77-80.
- Tripathi K.D. 2008. Essentials of medical pharmacology. 6th ed. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd.: New Delhi.
- Tucker A.O., Maciarello M.J., Charles D.J., Simon J.E. 1997. Volatile leaf oil of the curry Plant [*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum*] and dwarf curry plant [subsp. *Microphyllum* (Willd.) Nyman] in the North American herb trade. **Journal of Essential Oil Research**. 9:583-585.
- Tundis R., Statti G.A., Conforti F., Bianchi A., Agrimonti C., Sachetti G. 2005. Influence of environmental factors on composition of volatile constituents and biological activity of *Helichrysum italicum* (Roth) Don (*Asteraceae*). **Natural Product Research**. 19(4):379-87.
- Tzakou O., Verykokidou E., Roussis V., Chinou I. 1998. Chemical composition and antibacterial properties of *thymus longicaulis* subsp. *Chaubardii* oils: three chemotypes in the same population. **Journal of Essential Oil Research**. 10:97-99.
- Uncini Manganello R.E., Tomei P.E. 1999. Ethnopharmacobotanical studies of the Tuscan Archipelago. **Journal of Ethnopharmacology**. 65:181-202.
- Usai, M., Foddai, M., Bernardini, A.F., Muselli, A., Costa, J., Marchetti, M. 2010. Chemical composition and variation of the essential oil of wild sardinian *Helichrysum italicum* G. Don subsp. *Microphyllum* (Willd.) Nym from vegetative period to post-blooming. **Journal of Essential Oil Research**. 22:373-380.
- Vermeriss W., Nicholson R. 2006. Phenolic Compound Biochemistry. Springer, New York, NY, p 273–274.
- Viaud H. 1993. Les huiles essentielles et leur distillation. Thérapeutique naturelle. 924 .
- Viegas D.A., Palmeira-de-Oliveira A. and Salgueiro L. 2014. *Helichrysum italicum*: From traditional use to scientific data. **Journal of Ethnopharmacology**. 151:54-65.
- Vinha, A.F., Soares, M.O., Castro, A., Santos, A., Oliveira, M.B., Machado, M. 2012. Phytochemical characterization and radical scavenging activity of aqueous extracts of medicinal plants from Portugal. **European Journal Medicinal Plants**. 2(4):335-347.
- Vukics V., Kery A., Bonn G.K., Guttman A. 2008. Analysis of *heartsease* (*Viola tricolor* L.) flavonoid glycosides by micro-liquid chromatography coupled to multistage mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 1206:11-20.

REFERENCES

- Wanchaitanawong P., Chaungwanit P., Poovarodom N., Nitisinprasert S. 2005. *In vitro* Antifungal activity of thai herb and spice extracts against food spoilage fungi. **Kasetsart Journal Natural Science**. 39:400-405.
- Wang S.V., Wu J.H., Shyur L.F., Kuoy H. & Chang S.T. 2002. Antioxidant activity of abietane-type diterpenes from heartwood of *Taiwania cryptomerioides* Hayata. **Holzforschung**. 56(5):487-492.
- Wiley J. 2005. Essential microbiology. Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England.481.
- Wyk B.-E., Oudtshoorn B.V., Gericke N., 2009. Medicinal Plants of South Africa. 2nd ed. Pretoria: Briza Publications.
- Yen T.B., and Chang S.T. 2008. Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi. **Bioresource Technology**. 99:232-236.
- Yoon H.S., Moon S.C., Kim N.D., Park B.S., Jeong M.H., and Yoo Y.H. 2000. Genistein induces apoptosis of RPE-J cells by opening mitochondrial PTP. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 276(1):151-156.
- Zambonelli A., D'Aurelio A.Z., Severi A., Benvenuti E., Maggi L., Bianchi A. 2004. Chemical composition and fungicidal activity of comercial oils of *thymus vulgaris* L. **Journal Essential Oil Research**. 16(1):69-74.

ANNEXES

Annexe I : Composition des milieux de culture**Potato Dextrose Agar (PDA)**

Pomme de terre	250g
Glucose	20g
Agar	15g
Eau distillée	1litre
pH: 5.1 ± 0.2	

MH gélosé

Infusion de viande de bœuf déshydraté	300g
Hydrolysate de caséine	17.5g
Amidan de maïs	1.5g
Agar agar	13g
Eau distillée	1litre

Bouillon nutritif

Peptone	5g
Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2g
Chlorure de sodium	5g
Eau distillée	1litre

Potato Dextrose Broth (PDB)

Potato Infusion from 200 g	4 g
Dextrose	20 g
Eau distillée	1litre
pH: 5.1 ± 0.2	

4,0 g d'extrait de pomme de terre équivaut à 200 g d'infusion de pommes de terre

Annexe II**Tableau 3.** Activité antibactérienne des antibiotiques standards (en µg) exprimée par le diamètre d'inhibition en millimètre. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD (n = 3).

Bactéries	Antibiotiques					
	CTX (30)	TE (30)	TOB (10)	IPM (10)	CIP (5)	GEN (10)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	29±0.02	20±0.12	30±0.08	26±0.02	35±0.01	30±0.01
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	25±0.04
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	-	15±0.02	-	26±0.13	-	30±0.01
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	26±1.11	-	-	-	25±0.90	25±0.02
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372	-	-	-	-	-	33±0.06
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698	-	-	-	-	-	24±0.00
<i>Enterococcus cereus</i> ATCC 2035	-	20±1.51	-	-	-	22±0.01
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876 3	10±1.04	21±2.88	29±2.50	26±0.86	29±0.12	30±0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	16±1.54	23±1.25	30±0.65	50±0.45	29±0.32	33±1.01
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	43±1.24	25±1.02	29±1.22	26±0.36	-	33±0.55
<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 4352	30±1.66	16±0.22	20±0.26	35±0.12	30±0.85	21±0.14
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	24±1.25	12±0.78	20±0.36	30±1.22	29±0.02	23±0.31

PUBLICATIONS

المخلص

الهدف من دراستنا هو تحديد التركيب الكيميائي والنشاطية البيولوجية للزيت الأساسي لنبات *Helichrysum italicum* (Roth) G. DON من شمال الجزائر: تقدير النشاطية المضادة للأوكسدة عن طريق تقنيتي ال DPPH والقدرة الإرجاعية. بالإضافة إلى دراسة الزيت المضادة للإلتهاب عن طريق تقنيتي حماية الكريات الحمراء وحماية البروتينات من التمسح وأيضا دراسة النشاطية ضد الميكروبية للزيت على 12 بكتيريا، خميرتين و 21 فطر (16 منهم تم عزلهم وتحديدهم). تم الحصول على زيت الأجزاء الهوائية للنبات عن طريق التقطير المائي ثم إجراء التحليل الكيميائي للـ HE بواسطة كروماتوغرافيا متسلسلة على عمود هلام السيليكا، وجد أن زيت *H.italicum* يحتوي أساسا على (7.76%)، *sesquiterpènes oxygénées* و (61.42%) *monoterpènes oxygénées* ونسب من α -cédrene (13.61 %)، α -Curcumene (11.41 %)، Acétate de géranyle (10.05 %)، limonène (6.07 %)، nérol (5.04 %)، Acétate de néryle (4.91 %). α -pinène (3.78 %) أظهر زيت *H.italicum* قدرة كبيرة على إزاحة جذر DPPH بنسبة (مكغ/مل 40.70 ± 1.96 EC₅₀). أظهر الزيت خاصية كبيرة على حماية البروتينات من التفسخ ب(مكغ/مل $296 + 43.12$ EC₅₀) مقارنة بديكلفنالك الصودي (مكغ/مل $590 + 11.03$ EC₅₀). الزيت يحمي الغشاء الهيليولي بنسبة 56.2% بالتركيز 123 مكغ/مل، أستعملت النشاطية ضد الميكروبية عن طريق تقنية الإنتشار على الوسط الصلب. الزيت ثبت جميع السلالات إلا ثلاث بكتيريا *K. pneumonia* ATCC 4352 و *L. monocytogenes* ATCC 15313 و خمس فطريات، *Chaetomium globosom*، *Rhizopus stolonifer*، *Cladosporium cladosporioides*، *Phoma glomerata* وتظهر الدراسة أن *P. mirabilis* ATCC 35659 هي الأكثر حساسية ب(CMI) و (CMB) تقدر ب (1.581 كلغ/مل - 3.162) (CMFs) و (CMFc) تقدر ب 6.325-12.65 مكغ/مل على الترتيب للسلالات، *S. cerevisiae* ATCC 9763، *C. albicans* ATCC 10231، *A. brasiliensis*، *A. flavipes*، *P. citrinum*، *P. digitatum* و *P. expansum* كخلاصة هذا الزيت لديه خصائص بيولوجية جد مهمة تعود إلى التركيب الكيميائي.

Résumé

L'objectif de ce travail est la détermination de la composition chimique de l'huile essentielle (HE) de l'*Helichrysum italicum* (Roth) G. DON du Nord de l'Algérie, ainsi que la détermination de ses activités biologiques par : l'estimation de l'effet antioxydant de l'HE (test DPPH et pouvoir réducteur du Fer); une étude de l'effet anti-inflammatoire *in vitro* (anti-dénaturation des protéines et anti-hémolyse) et par une activité antimicrobienne contre douze bactéries, deux levures et vingt et un champignons y compris (seize sont isolés et identifiés). Les parties aériennes de l'*Helichrysum italicum* ont été soumises à l'hydrodistillation. L'analyse de l'HE d'*H. italicum* par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) a permis d'identifier 66 composés qui représentent 99.24 % de l'huile total. Cette HE est caractérisée par la prédominance des sesquiterpènes oxygénés (76.7 %) et des monoterpènes oxygénés (61.42 %). Les principaux constituants de l'huile sont α -cédrene (13.61 %), α -Curcumene (11.41 %), Acétate de géranyle (10.05 %), limonène (6.07 %), nérol (5.04 %), acétate de néryle (4.91 %) et α -pinène (3.78 %). L'HE d'*H.italicum* a une puissante capacité antiradicalaire avec une EC₅₀ de 4.70 ± 1.96 $\mu\text{g/ml}$. Les résultats obtenus montrent que l'huile d'*helichrysum italicum* exerce un pouvoir réducteur important avec une EC₅₀ = 14.89 ± 0.09 $\mu\text{g/ml}$. L'HE d'*Helichrysum italicum* possède une activité anti-inflammatoire très importante avec EC₅₀ 296 ± 42.12 $\mu\text{g/ml}$ par rapport au Diclofénac sodique (EC₅₀ 590 ± 11.03 $\mu\text{g/ml}$). Le traitement par HE entraîne une stabilité de la membrane plasmique avec un pourcentage de protection de 56.2% à la concentration 132 μgml^{-1} . L'activité antimicrobienne de l'HE est mesurée par la méthode de diffusion de disque. L'HE inhibe la croissance de tous les microorganismes testés sauf trois bactéries, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumonia* ATCC 4352 et *L. monocytogenes* ATCC 15313 et cinq champignons, *Chaetomium globosom*, *Rhizopus stolonifer*, *Cladosporium cladosporioides*, *Phoma glomerata*. La bactérie la plus sensible est *P. mirabilis* ATCC 35659 avec une (CMI) et (CMB) de 1.581 et 3.162 $\mu\text{g ml}^{-1}$ respectivement. La (CMFs) et (CMFc) est de 6.325 $\mu\text{g ml}^{-1}$ et 12.65 $\mu\text{g ml}^{-1}$ respectivement pour *C. albicans* ATCC 10231, *S. cerevisiae* ATCC 9763, *A. brasiliensis*, *A. flavipes*, *P. citrinum*, *P. digitatum* et *P. expansum*. En conclusion cette huile essentielle possède des activités biologiques intéressantes qui peuvent être attribuées à sa composition chimique.

Abstract

The objective of this work is the determination of the chemical composition of the essential oil (EO) of the *Helichrysum italicum* (Roth) G. DON from North of Algeria, as well as the determination of its biological activities by: the estimation of the antioxidant effect of EO (DPPH test and the test of the reducing power). Study of anti-inflammatory effect *in vitro* (the inhibition of the denaturing of protein test and the test of anti-hemolysis), and tested by antimicrobial activity against twelve bacteria, two yeasts and twenty one fungi including (sixteen are isolated and identified). The aerial parts of *H.italicum* were subjected to hydrodistillation to obtain EO which had been analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). The EO yielded 0.44% (v/w) and 66 compounds accounting for 99.24% of the oil were identified with a high content of oxygenated sesquiterpenes (61.42%). The most oxygenated sesquiterpene compounds were α -Cedrene (13.61%), α -Curcumene (11.41%), Geranyl acetate (10.05%), Limonene (6.07%), Nerol (5.04%), Neryl acetate (4.91%) and α -Pinene (3.78%). The (EO) of *H.italicum* shows a powerful anti-radical capacity with an EC₅₀ of 4.70 ± 1.96 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. The results obtained show that (EO) of *helichrysum italicum* has an important reducing power with an EC₅₀ 14.89 ± 0.09 $\mu\text{g/ml}$. The EO of *Helichrysum italicum* has a good anti-inflammatory activity with EC₅₀ 296 ± 42.12 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ very important compared to the Diclofenac sodium (EC₅₀ 590 ± 11.03 $\mu\text{g.ml}^{-1}$). EO leads a certain stability of the plasma membrane with percentage of protection 56.2% at the concentration 132 $\mu\text{g/ml}$. The antimicrobial activity of the EO was assayed by using the disk diffusion method. *H. italicum* inhibited the growth of all the microorganisms tested except three bacteria, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumonia* ATCC 4352 and *L. monocytogenes* ATCC 15313 and five fungi, *Chaetomium globosom*, *Rhizopus stolonifer*, *Cladosporium cladosporioides*, *Phoma glomerata*. The most sensitive bacteria was *P. mirabilis* ATCC 35659 with 1.581 and 3.162 $\mu\text{g ml}^{-1}$ minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration respectively. A minimum fungistatic and fungicide concentration are 6.325 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and 12.65 $\mu\text{g ml}^{-1}$ respectively was obtained with *C. albicans* ATCC 10231, *S. cerevisiae* ATCC 9763, *A. brasiliensis*, *A. flavipes*, *P. citrinum*, *P. digitatum* and *P. expansum*.

