

VARIATION PHÉNOLOGIQUE DU CONTENU PHYTOCHIMIQUE ET DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DE *CYTISUS TRIFLORUS* L'HER

DAGHBOUCHE Selma^{1*}, DAGHBOUCHE Abd El Salem², BOULESSNAM Abd El Malek³, SNOUSSI Sid Ahmed¹ et DJAZOULI Zahr-Eddine¹

1. Université de Blida 1- Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie - Département des Biotechnologies - Laboratoire de Recherche en Biotechnologie des Productions Végétales- P.B. 270, route de Soumâa. Blida, Algérie. Tel/Fax: +213 25 43 48 03.

2. Université de John Carroll - Département de Mathématique & Education - Ohio 44118. Etats-Unis d'Amérique.

3. Institut de Criminologie et de Criminalistique de la Gendarmerie National - PB 194 - 16002 Alger. Algérie

Reçu le 24/07/2017, Révisé le 04/12/2017, Accepté le 31/12/2017

Résumé

Description du sujet: Apprécier la variation phénologique d'une part du contenu en métabolites primaires et secondaires et d'estimer d'autre part le potentiel antibactérien des extraits de *Cytisus triflorus*.

Objectifs: Etablir l'impact de la variation phénologique sur les effets interactifs entre le contenu de synthèse métabolique de *Cytisus triflorus* et sa capacité inhibitrice de la pathogénicité bactérienne.

Méthodes: Deux extraits ont été préparés, à savoir les extraits méthanoliques et aqueux, dont le screening phytochimique a été réalisé par semi-quantification des concentrations des Phénols totaux, des Flavonoïdes, des Protéines et des Sucres totaux. L'activité antibactérienne des différents extraits a été estimée par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé visé à vis cinq bactéries (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 et *Salmonella enterica* ATCC 14028).

Résultats: Les extraits du stade Végétatif contiennent un maximum de Phénols totaux, de Flavonoïdes et de Protéines tandis que les Sucres totaux ont culminés dans les extraits du stade Floraison. De même, les extraits méthanoliques du stade Végétatif ont fournis les meilleurs potentiels antibactériens contre *Staphylococcus aureus* et *Salmonella enterica* par rapport à ceux des stades Floraison et Fructification.

Conclusion: Les modèles de prédictions obtenus nous ont permis de mieux valoriser l'utilisation des extraits de *Cytisus triflorus* et de limiter d'une manière rationnelle certaines infections bactériennes.

Mots clés: Contenu phytochimique; Stades phénologiques; Activité antibactérienne; Extrait méthanolique; Extrait aqueux.

PHENOLOGICAL VARIATION OF PHYTOCHEMICAL CONTENT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *CYTISUS TRIFLORUS*

Abstract

Description of the subject: Appreciate the phenological variation of the primary and secondary metabolites content on the one hand and on the other hand, to estimate the potential antibacterial of the *Cytisus triflorus* extracts.

Objective: Establish the phenological variation impact on the interactive effects between the content of the metabolic synthesis from *Cytisus triflorus* and its inhibitory capacity against the bacterial pathogenicity.

Methods: Two extracts were prepared namely methanolic and aqueous extracts, phytochemical screening of which was carried out by quantification of the total Phenols, Flavonoïds, Protein and total Sugars. The antibacterial activity of the different extracts was estimated using the agar disc diffusion method against five bacteria (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and *Salmonella enterica* ATCC 14028).

Results: Vegetative stage extracts contains a maximum of total Phenols, Flavonoïds and Protein, while total Sugars culminated in the flowering stage extracts. Also, the methanolic extracts of the Vegetative stage provided the best antibacterial potentials against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* compared to those of the Flowering and Fruiting stages.

Conclusion: The predictions models obtained allow us to better evaluate the use of *Cytisus triflorus* extracts and to limit wisely some bacterial infections.

Keywords: Phytochemical content; Phenological stages; Antibacterial activity; Methanolic extract; Aqueous extract.

* Auteur correspondant: DAGHBOUCHE Selma, E-mail: selmadaghbouche88@yahoo.ca

INTRODUCTION

Des résistances bactériennes se sont manifestées quand l'utilisation des antibiotiques était en tant qu'entités uniques, si la prise de conscience d'utilisation de mélanges croisés d'antibiotiques, qui attaquent des sites moléculaires différents dans les microorganismes cibles avaient été employés à la place d'utilisation unique, un tel développement qui génère actuellement un problème sévère, aurait peut-être été confus [1]. Dans ce contexte, les extraits de plantes ont suscité beaucoup d'intérêt scientifique en raison de leur potentiel en tant que source de composés biologiquement actifs, également comme substances antibactériennes, antifongiques et insecticides [2], tandis que la connaissance de fluctuation de ces composés pendant le développement physiologique de la plante permet de concevoir des programmes de récolte optimaux [3].

Les balais *Cytisus sp* se développent principalement dans les zones anthropisées, leur présence favorise souvent la propagation rapide de l'incendie. Le reniement étendues des larges zones anciennement utilisées pour l'agriculture, le grand nombre de feux de forêt qui menacent la diversité végétale entraînent tous un déboisement de vastes espaces qui sont rapidement occupées par ces derniers arbustes. Ces facteurs favorisent l'évaluation de ces espèces comme source de molécules bioactives [4].

Le genre *Cytisus* comprend environ 60 espèces répandu dans le bassin méditerranéen [5]. De nombreuses études ont citées l'utilisation de plantes de ce genre à des fins médicales comme antidiabétique, anti-inflammatoire, diurétique [6] tandis que des études pharmacologiques ont confirmés certaines de ces formes ethnomédicales [7, 8]. *Cytisus triflorus* est l'espèce la plus répandue parmi les huit espèces qui se développent naturellement dans tout le nord de l'Algérie [9], connue localement pour ses propriétés médicinales, utilisée notamment pour traiter les douleurs abdominales, la cicatrisation des plaies et conjointement comme antifongique.

Le screening phytochimique préliminaire du genre *Cytisus* a montré la présence de terpènes, de tanins, de Flavonoïdes, d'acides phénoliques, d'alcaloïdes et de coumarines [10, 11].

Les activités biologiques sont corrélées à la présence de composés chimiques [12]. Les caractéristiques génotypiques et la phénologie des espèces peuvent influencer la phytochimie de la plante, car certains composés peuvent être accumulés à une période donnée pour répondre aux changements environnementaux [13]. Le matériel végétal recueilli en termes de variations phénologiques peut contenir divers composés bioactifs qui seront en mesure d'extérioriser différents niveaux d'activités biologiques [14]. Cette approche physiologique peut persuader les investigations afin de déterminer le meilleur stade phénologique de *Cytisus triflorus* qui fournirait l'extrait avec le potentiel antibactérien le plus prometteur.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel végétal

Le genre *Cytisus* pousse spontanément dans les monts de l'atlas Blidéen. *Cytisus triflorus* L'Her a été récoltée pendant trois stades phénologiques; stade Végétative, stade Floraison et stade Fructification. La cueillette s'est déroulée dans la région de Chréa (à 800 m d'altitude; de latitude de 36°21' (N) et d'une longitude de 2°45' (E)). Au début de chaque stade phénologique de l'année 2015 : stade Végétative (début avril), stade Floraison (fin mai) et stade Fructification (fin juin).

Seulement les parties aériennes de la plante impétrante ont été utilisées. Le matériel végétal obtenu a été séché séparément à l'abri de la lumière et de l'humidité, à température ambiante (24 ± 1 °C). Après séchage, ce dernier a été broyé avec un broyeur à billes (Retsch) en poudres fines et stockées soigneusement dans un endroit sec. *Cytisus triflorus* échantillonnée a été identifiée par référence au spécimen disponible dans l'herbier du Département de Botanique, de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (E.N.S.A.) El Harrach, Alger.

2. Procédure d'extraction des extraits méthanoliques et aqueux de *Cytisus triflorus*

La partie aérienne de chaque stade phénologique de *Cytisus triflorus* réduite en poudre fine sera destinée à préparer l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique respectivement. 1g de poudre végétale a été extrait avec 10 ml d'eau à 80°C pendant 3h [15]. 60 mg de poudre végétale ont été rajoutés à 2 ml de méthanol à 80% à température ambiante, ces macérats ont été homogénéisés pendant 2h sur un homogénéiseur de rotation à 15 tr / min, puis centrifugés à 10.000 g. pendant 15 min (SIGMA 2-16K, UK) [16]. Les surnageants provenant des extraits aqueux et méthanoliques après centrifugation ont été récupérés et utilisés pour le screening phytochimique. La procédure d'extraction a été effectuée trois fois et exprimée comme (moyennes \pm SE).

3. Screening phytochimique des extraits de *Cytisus triflorus*

3.1. Contenu en Phénols totaux

La proportion des polyphénols totaux a été estimée par recours à l'utilisation du réactif de Folin-Ciocalteu [17]. Le réactif consistait en un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui a été réduit lors de l'oxydation des phénols. Dans un mélange de molybdène bleu et d'oxydes de tungstène, la concentration maximale de couleur variait entre 725 et 760 nm et était proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux [18]. Pour la détermination des Phénols totaux. Un volume de 200 ml de chaque extrait a été mélangé avec 1 ml de réactif Folin-Ciocalteu dilué 10 fois et 0,8 ml d'une solution de carbonate de sodium à 7,5%. Après agitation, l'absorbance a été mesurée par spectrophotomètre UV-vis (Jenway 6305) à la longueur d'onde de 760 nm. La teneur en Phénols totaux a été exprimée en mg équivalent d'acide Gallique/g. de matière végétale (mg EAG/g. mv) en utilisant la courbe d'étalonnage de l'acide Gallique ($R^2=0,977$). Chaque essai a été répété en triple et exprimé comme (moyennes \pm SE).

3.2. Contenu en Flavonoïdes

La quantification des Flavonoïdes a été procédée avec la méthode du trichlorure d'aluminium et de l'hydroxyde de sodium [19]. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les Flavonoïdes et de l'hydroxyde de sodium forme un complexe en rose qui absorbe à la longueur d'onde de 510 nm. 0,3 ml de nitrite de sodium à 5% a été ajouté. Après 5 min, on a ajouté 0,3 ml de chlorure d'aluminium à 10%. À 6 min, on a ajouté 2 ml d'hydroxyde de sodium 1 M au mélange. En même temps, le mélange a été dilué en volume avec addition de 2,4 ml d'eau distillée et bien mélangé. L'absorbance du mélange a été déterminée à 510 nm par spectrophotomètre UV-vis (Jenway 6305). La teneur en Flavonoïdes a été exprimée en mg d'équivalent de Quercétine/g. de matière végétale (mg EQ/g. mv) en utilisant la courbe d'étalonnage de Quercétine ($R^2=0,962$). Chaque essai a été répété en triple et exprimé comme (moyennes \pm SE).

3.3. Contenu en Protéines totales

La teneur en Protéines a été estimée par la méthode de Bradford *et al.* [20]. 1,0 ml d'extrait a été incubé avec 5,0 ml de bleu de Coomassie (G-250) à température ambiante pendant 15 min. L'absorbance a été enregistrée à 595 nm par un spectrophotomètre UV-vis (Jenway 6305). Les lectures de l'absorbance ne seront significatives qu'après la réalisation de la courbe d'étalonnage établie par l'utilisation d'une protéine de référence qui est l'ovalbumine à différentes concentrations. La teneur en Protéines a été exprimée en mg d'équivalent d'Ovalbumine / g de matière végétale (mg OVE/g. mv) en utilisant la courbe d'étalonnage d'Ovalbumine ($R^2=0,986$). Chaque essai a été répété en triple et exprimé comme (moyennes \pm SE).

3.4. Contenu en Sucres totaux

La teneur totale en Sucres a été estimée par la méthode de Dubois *et al.* [21]. 2 ml de chaque échantillon ont été mélangés avec 1 ml de solution de phénol (6%) et avec 5,0 ml d'acide sulfurique à 25°C pendant 5 min, puis la solution réactionnelle est chauffée dans un bain marie pendant 15 min. L'absorbance a été mesurée à 490 nm par spectrophotomètre UV-vis (Jenway 6305).

La teneur en Sucres totaux a été exprimée en mg d'équivalent de Glucose / g de matière végétale (mg EG / g mv) en utilisant la courbe d'étalonnage du Glucose ($R^2 = 0,951$). Chaque essai a été répété en triple et exprimé comme (moyennes \pm SE).

4. Activité antibactérienne

Les souches bactériennes choisies pour l'étude de l'activité antibactérienne in vitro des extraits de *Cytisus triflorus* sous la dépendance de la variation phénologique étaient deux bactéries Gram-positif à savoir; *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 et trois bactéries Gram-négatif; *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 et *Salmonella enterica* ATCC 14028. Les souches bactériennes ont été fournies gracieusement par *Microbiologics*[®].

4.1. Souches bactériennes et culture

Toutes les souches ont été pré-cultivées avant leur utilisation. Les suspensions bactériennes ont été préparées en inoculant une boucle de chaque bactérie testée dans 3 ml de bouillon Muller Hinton et les incubées à 37°C pendant 18-24 h d'une culture jeune. La turbidité du bouillon a été ajustée à 0,5 McFarland et ensuite diluée dans 5 à 10 ml de solution de NaCl à 0,9% jusqu'à une concentration finale d'inoculum de 10^6 UFC / ml.

4.2. Méthode de diffusion

L'activité antibactérienne in vitro des extraits méthanoliques et aqueux de l'impétrante *Cytisus triflorus* a été effectuée par la méthode de diffusion des disques selon le protocole de Cseke *et al.* [22]. 100 μ l des inocula ont été répartis sur la surface de chaque boîte de Pétri contenant 20 μ l d'agar nutritive liquide stérile chauffée, refroidie et solidifiée. Les disques en papier filtre (6 mm) ont été imprégnés de 10 μ l / disque de chaque extrait. Les boîtes de Pétri ont été laissées pendant 15 min à température ambiante pour permettre la diffusion des extraits puis elles ont été incubées à 37°C pendant 24 h.

L'activité antibactérienne a été évaluée en mesurant les diamètres des zones d'inhibition par recours au logiciel ImageTool ver.3. Chaque essai a été répété en triple et les diamètres des zones d'inhibition ont été exprimés comme (moyennes \pm SE).

5. Analyses statistiques

Les résultats sont rapportés comme valeurs de trois répétitions (moyennes \pm erreur standard) sur la base d'un C.V. <20%. Les données ont été soumises à une analyse statistique au renfort de Systat (logiciel SPSS ver.12). L'analyse de la variance (ANOVA) suivie du test de Newman-Keuls a été utilisée pour établir l'effet des stades phénologiques, du contenu phytochimique et du type du solvant sur l'activité antibactérienne des extraits de *Cytisus triflorus*, les différences ont été considérées comme significatives à $p < 0,05$. L'analyse en composantes principales (A.C.P.) a été réalisée à l'aide du logiciel XLSTAT ver. 9, afin d'apercevoir l'assemblage dans les relations entre les variables et permettant de classer les effets interactifs des stades phénologiques et le contenu phytochimique des extraits de *Cytisus triflorus* sur l'activité antibactérienne.

Les équations prédictives des fluctuations des diamètres des zones d'inhibition présumant la sensibilité des microorganismes envers les métabolites discerner dans les extraits de *Cytisus triflorus* des différents stades phénologiques ont été développés par le test de régression multiple après vérification de la signification des probabilités associées à chaque variable explicative ($p < 0,05$) par le logiciel PAST ver. 1.37 [23].

RÉSULTATS

1. Rendement des extraits méthanoliques et aqueux de *Cytisus triflorus*

Le pourcentage des rendements en extraits de *Cytisus triflorus* durant les trois stades phénologiques est représenté dans la Figure 1. L'analyse de la variance exprime un écart très significatif en rendement au privilège de l'extrait aqueux durant les trois stades phénologiques.

La comparaison par paires nous a permis d'annoncer une graduation négative en rendement selon un gradient phénologique; Végétatif, Floraison et Fructification.

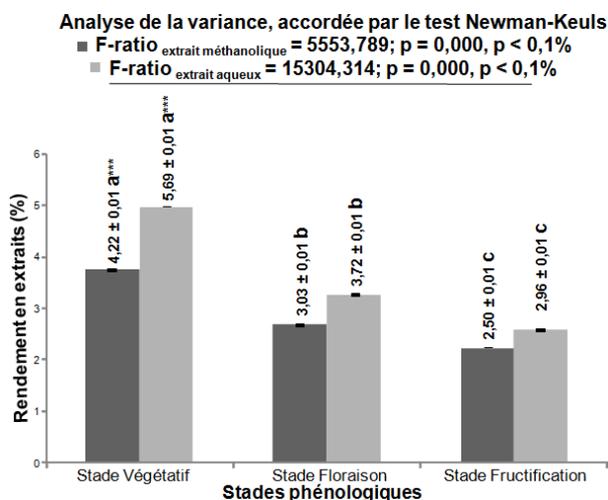


Figure 1: variation des taux de rendement en extraits aqueux et méthanoliques au cours des stades phénologiques des parties aériennes de *Cytisus triflorus* (Moy ± SE, n = 3)

2. Screening phytochimique des extraits de *Cytisus triflorus*

2.1. Tendance du contenu phytochimique des extraits de *Cytisus triflorus* dépendant des stades phénologiques

Dans l'esprit de visualiser les caractéristiques phytochimiques des extraits de *Cytisus triflorus* sous la dépendance des différents stades phénologiques. L'analyse en composantes principales A.C.P. est satisfaisante dans la mesure où un fort pourcentage de contribution a été signalé sur les axes F1×F2 (100%). Les projections des valeurs de contenu des extraits en métabolites primaire et secondaire sur le premier axe (56,41%) ont permis de constater la présence d'une corrélation positive entre les Phénols totaux et les Flavonoïdes avec le stade Végétatif. En revanche, le stade Floraison est corrélé positivement avec les métabolites primaires notamment les Protéines et Sucres et totaux. Ces tendances ont été confirmées par les valeurs respectives du coefficient de corrélation de Pearson ($r=0,982$; $r=0,974$) (Fig. 2).

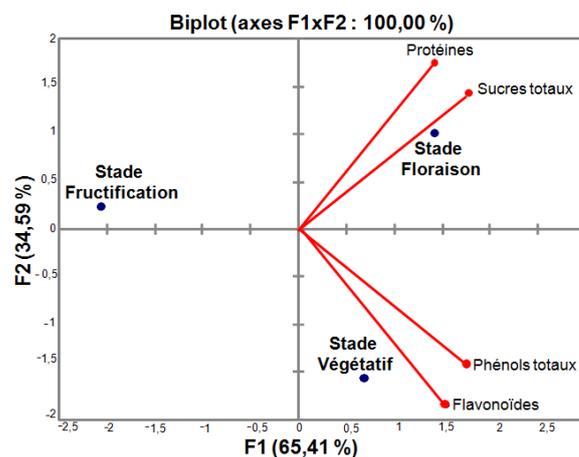


Figure 2: Projection du contenu phytochimique des extraits de *Cytisus triflorus* dépendant des stades phénologiques sur les deux axes de l'ACP

2.2. Variation quantitative du contenu phytochimique des extraits de *Cytisus triflorus* sous l'effet des stades phénologiques

Les résultats du contenu de *Cytisus triflorus* en Phénols totaux et en Flavonoïdes des extraits aqueux et méthanoliques ont annoncé une fluctuation significative très marquée qui paraît la plus performante au stade Végétatif est qui s'accroissent progressivement vers la Fructification de la plante (Fig. 3 A et B). Néanmoins les probabilités associées enregistrées par l'analyse de la variance restreinte que les Phénols totaux et les Flavonoïdes se concentrent significativement mieux dans l'extrait méthanolique que dans l'extrait aqueux (Fig. 3 E et F).

Les résultats présentés dans la figure (3 C et D), démontrent que l'accumulation des Protéines et les Sucres totaux est fortement liée aux stades phénologiques dont la concentration de ces métabolites durant le stade Floraison a dominé significativement celles des stades Végétatif et Fructification. Cependant, la concentration des Protéines a été notablement signalée maximale dans l'extrait méthanolique (Fig. 3 G), tandis que les Sucres totaux se concentrent dans l'extrait aqueux (Fig. 3 H).

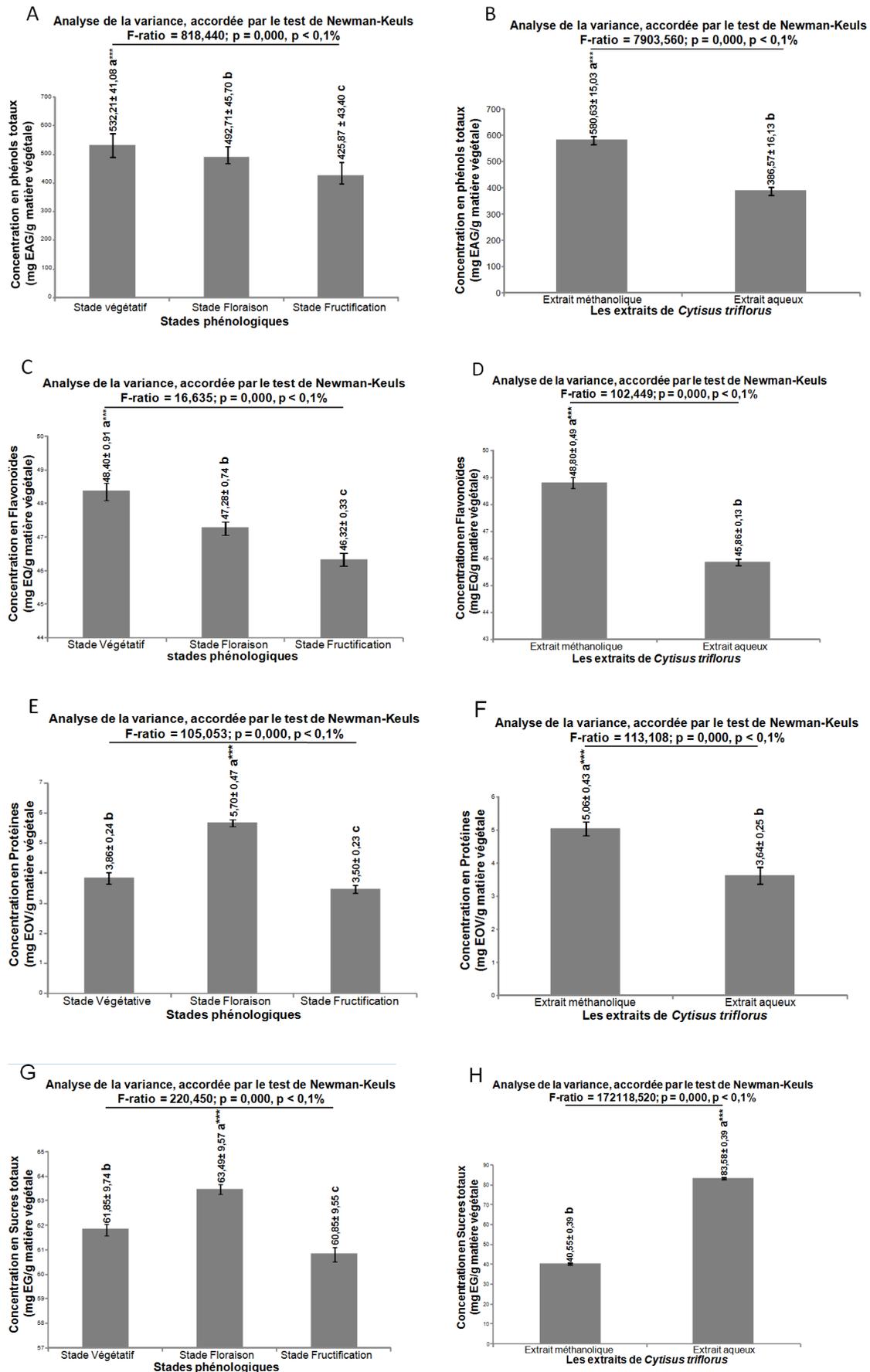


Figure 3: Fluctuations des teneurs en Phénols totaux, en Flavonoïdes, en Protéines et en Sucres totaux des extraits de *Cytisus triflorus* en fonction des stades phénologiques et des solvants d'extraction (Moy ± SE, n=3)

3. Activité antibactérienne

Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits de *Cytisus triflorus* obtenus par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé révélèrent trois paliers de sensibilité à l'égard de la gamme de bactéries pathogènes durant les trois stades phénologiques générant des différences très significatives. Le premier palier s'intéressait à la détermination de la sensibilité des souches en contrôlant le changement des diamètres des zones d'inhibition face aux variations phénologiques de *Cytisus triflorus*. Les résultats ont montrés un décroissement très significatif entre l'activité des extraits du

stade Végétatif, du stade Floraison et du stade Fructification (Fig. 4 A). Le deuxième palier signalait la dominance des extraits méthanoliques par comparaison aux extraits aqueux en termes d'aptitude d'affectation des diamètres des zones d'inhibition des pathogènes (Fig. 4 B). En revanche le troisième palier a montré la forte sensibilité qui bascule entre bactéries à Gram positif et à Gram négatif (*Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*) en première position suivie par l'effet quasiment analogue des extraits sur *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli*. Néanmoins *Pseudomonas aeruginosa* particulièrement a présenté une résistante face à la bioactivité des extraits de *Cytisus triflorus* (Fig. 4 C).

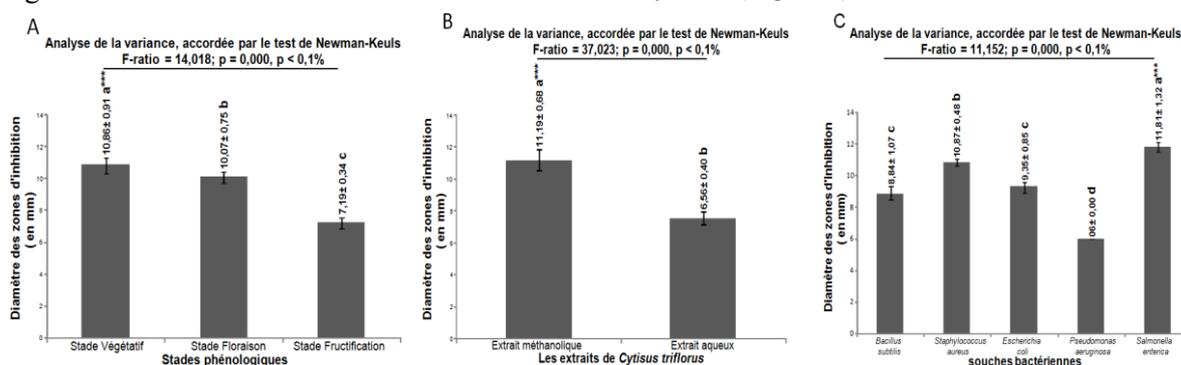


Figure 4: Fluctuations des diamètres des zones d'inhibition sous l'effet de la nature des extraits de *Cytisus triflorus* en relation avec les stades phénologiques et les souches bactériennes (Moy ± SE, n=3).

La projection mutuelle des concentrations des composés des extraits et des valeurs des zones d'inhibition sur les deux axes F1×F2 de l'ACP, admet de constater que la sensibilité des bactéries exposait une corrélation positive avec les Phénols totaux (r=0,985), les Flavonoïdes (r=0,934) durant

le stade Végétatif et de même avec les Protéines(r=0,458) et les Sucres totaux (r=0,648) pendant le stade Floraison, alors que les extraits du stade Fructification réagissait négativement avec la sensibilité des bactéries (Fig. 5).

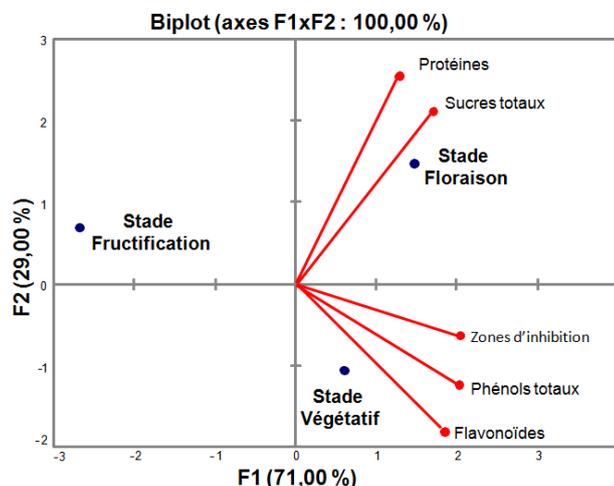


Figure 5: Projection de la composition phytochimique et de l'activité antibactérienne des extraits de *Cytisus triflorus* dépendant des stades phénologiques sur les deux axes de l'ACP

4. Modèle d'ajustement et d'optimisation de l'activité antibactérienne des extraits de *Cytisus triflorus*

La réflexion sur la modélisation de l'optimisation des activités biologiques des extraits dans le cadre d'une rationalisation d'utilisation des ressources phylogénétiques a permis de contribuer à une meilleure compréhension de la qualité phytochimique des plantes médicinales dans les activités antibactériennes. Ainsi, l'intégration des teneurs en Phénols totaux, en Flavonoïdes, en Protéines et en Sucres totaux des différents stades phénologiques (variables explicatives) et les zones d'inhibition des souches testées (variable expliquée) nous

permettras de prédire les grandes propriétés fonctionnelles des extraits de *Cytisus triflorus*. Les résultats des régressions multiples (Tableau 1) souscrit d'obtenir plusieurs modèles prédictifs relatifs aux souches selon l'origine phénologique des extraits. Les équations polynomiales ont été arrêtées après vérification de la signification des probabilités associées à chaque variable explicative. Les valeurs de coefficients de détermination ont également confirmé le degré élevé de corrélation entre les valeurs observées et prédites. En revanche, le coefficient de corrélation a indiqué un haut degré de lien entre les variables explicatives (contenu des extraits) et la variable expliquée (zone d'inhibition).

Tableau 1: Présentation des équations prédictives de l'activité antibactérienne des composés des extraits de *Cytisus triflorus* vis à vis des microorganismes testés en fonction des stades phénologiques

Souche Bactérienne	Stade phénologique	Variables explicatives	R ²	r	Prédiction de l'activité antibactérienne des extraits
<i>Salmonella enterica</i>	stade Floraison	FLV	0,986	0,993	$Y_{ZI} = 1,50 \text{ FLV} - 2,42$
<i>Staphylococcus aureus</i>	stade Floraison	FLV et PRT	0,997	0,998	$Y_{ZI} = 31,92 \text{ FLV} - 2,10 \text{ PRT} - 96,59$
<i>Bacillus subtilis</i>	Stade Fructification	PRT	0,999	0,999	$Y_{ZI} = 0,93 \text{ PRT} + 3,33$

Y_{ZI} : équation de prédiction de l'activité antibactérienne des extraits de *Cytisus triflorus* par mesure du paramètre zones d'inhibition; FLV: Flavonoïdes; PRT: Protéines; R²: Coefficient de tendance; r: Coefficient de corrélation de Pearson

Salmonella enterica, paraît très sensible aux Flavonoïdes (FLV) des extraits du stade Floraison. Cependant *Staphylococcus aureus*, sa sensibilité paraît réagir différemment aux contenus des extraits par effet synergique entre les Flavonoïdes (FLV) et les Protéines (PRT) pendant le stade Floraison, tandis que la sensibilité de *Bacillus subtilis* serait accrue aux Protéines (PRT) dans les extraits du stade Fructification.

Il est possible que, selon les stades phénologiques de l'année, le contenu et la présence des composés bioactifs puissent varier en parallèle avec la présence ou l'absence des stimuli externes, ce qui entraîne une modification des propriétés antibactériennes. Ce qui a été exploité par les extraits de *Cytisus triflorus* peut présenter des alternatives pour réduire certaines résistances chez certains microorganismes

DISCUSSION

La distinction signalée au niveau des rendements des extraits peut être attribuée au degré de polarité des composés extraits et aux solvants utilisés, néanmoins la forte solubilité des pigments, des enzymes et des composés bioactives dans l'eau, témoigne son utilisation universelle dans les préparations des décoctions à base de plantes comme remèdes thérapeutiques [24].

La transition entre les différents stades phénologiques pendant le cycle de développement de la plante simulent le contenu des métabolites secondaires d'où on assiste à des fluctuations de concentration le long du cycle végétale, néanmoins la variation quantitative du contenu phytochimique sont tributaires des différentes conditions environnementales et des besoins de la plante,

ce qui réaffirme les écarts enregistrés en termes d'accumulation en Phénols totaux et en Flavonoïdes en termes des différents stades phénologiques de *Cytisus triflorus*. Cet état de fait serait dû aux fluctuations des facteurs climatiques caractérisant les périodes d'échantillonnages coïncidaient avec les phases cruciales de développement phénologique. L'hypothèse avancée corrobore avec plusieurs travaux, qui avançaient que la biosynthèse et l'accumulation de métabolites secondaires responsables de la bioactivité dans les plantes, sont dépendantes de facteurs endogènes entre autres, la différenciation tissulaire, le stade de développement, la concurrence, l'état nutritionnel et l'attaque microbienne, comme des facteurs exogènes dont le principal facteur est le climat. Ces facteurs ont se sont révélés avoir un impact sur le profil de ces métabolite chez les plantes [25, 26 et 27]. Dans la même concordance, il a été accomplis que la concentration la plus élevée des Phénols totaux a été acquise dans les plantes récoltées en hiver, suivies par celles d'automne et d'été [28], ce qui suggère que l'accumulation de composés phénoliques y compris les Phénols totaux peut être liée à l'activation des voies phénylpropanoïdes par les basses températures [29]. Tandis que les plus basses concentrations de Flavonoïdes ont été signalées en plein automne coïncidant avec la phase Floraison et qui constituait l'intervalle de la pré-élection d'accumulation de ces composés afin de s'accommoder au processus de lignification [30, 31].

En outre, les résultats ont dévoilés que les composés phénoliques se concentrent d'une manière significative dans l'extrait méthanolique que dans l'extrait aqueux. Nous présumons que la concentration de ces métabolites dans les solvants d'extraction est fortement liée à la solubilité et au degré de polymérisation. Cette hypothèse a été entretenue par certaines suggestions duquel il a été illusionné la nature du solvant et à la polarité des composés phénolique lors de leurs extractions [32].

Par référence aux quantités de Protéines et de Sucres totaux accumulées au stade Floraison,

nous apprécions que cette dernière revendique le métabolisme primaire en termes de composés énergétiques afin de rationaliser ce stade cruel dans la production végétale. Notre hypothèse rejoignait des propos récents qui ont révélés que la teneur en Protéines était maximale au début du stade Floraison, pendant la croissance initiale des feuilles qui s'accompagne d'une forte activité mitotique et d'une forte requête aux nutriments, en particulier l'azote [33, 34 et 35]. Par la suite, le taux décline pendant la saison de croissance, en réponse au vieillissement tissulaire, quand les nutriments sont transférés dans les tissus perpétrés avant l'abscission. Cependant il a été investiguer que l'accumulation des Sucres solubles est étroitement liée au développement des fleurs et augmente de façon rigoureuse en pleine Floraison. Cette accumulation durant ce stade phénologique serait liée aux rôles multifonctionnels que peut assurer ce métabolite primaire [36, 37], dont Il agirait comme source d'énergie [38], comme régulateurs osmotiques et comme précurseur des processus métaboliques [39].

Les discriminations dans le mode de concentration et d'accumulation des Sucres totaux et des Protéines totales dans les solvants d'extraction sont étroitement liées à la nature chimique du métabolite. En revanche, il a été apprécié que les Sucres totaux accumulés dans les plantes soient généralement extraits avec de l'eau [40], tandis que les solvants organiques sont les plus appropriées pour la purification des Protéines, puisque ces dernières se dénaturent facilement et perdent leurs structures dans ces solvants [41].

Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits du stade Végétatif de *Cytisus triflorus* présentaient une forte sensibilité de la majorité des souches bactériennes y compris les souches à Gram positif que celles à Gram négatif envers les extraits testés avec la dominance de l'efficacité de l'extrait méthanolique. Nous suggérons que l'activité biologique des extraits dépend largement de la nature du solvant d'extraction et du contenu en principes actifs du stade phénologique.

Cela est soutenu par certains travaux où il a été évoqué que le stade de développement représente probablement un facteur important pour identifier les variations et pour localiser les meilleures activités biologiques et les composés visant à accroître les propriétés fonctionnelles [42], et que le solvant d'extraction joue un rôle important dans le comportement antibactérien des extraits du genre *Cytisus scoparius* [43]. De plus la meilleure activité antibactérienne en hiver, suggère que les plantes pourraient minimiser le coût métabolique en récupérant les métabolites des tissus foliaires et le transport des composés vers les parties souterraines [44]. Les différents résultats observés dans l'activité antibactérienne s'expliquent aussi par les distinctions structurelles de la paroi cellulaire bactérienne des bactéries Gram positif et Gram négatif. Les bactéries Gram négatif, à l'exception de la membrane cellulaire, possèdent une membrane de couche externe supplémentaire, qui se compose de phospholipides, de Protéines et de lipopolysaccharides, où cette membrane est imperméable à la plupart des molécules [45].

Les corrélations positives signalées entre les Phénols totaux, les Flavonoïdes des extraits du stade Végétatif ainsi que les Protéines, les Sucres totaux des extraits du stade Floraison et la sensibilité des souches pathogènes seraient dus à l'effet individuel et/ou synergique des composés quantifiés. Il a été démontré que les extraits de *Cytisus scoparius* exerçaient une action antibactérienne positive envers les souches *Staphylococcus aureus* et *Bacillus spp.*, néanmoins ces extraits peuvent aussi conférer un effet protecteur à certaines espèces bactériennes [43], cela avait été le cas chez *Pseudomonas aeruginosa* qui a présente une résistance via nos extraits testés. Il a été également affirmé que la variation saisonnière de l'activité antibactérienne des extraits de *Bifurcaria bifurcata* (Sargassaceae) dépendait à la fois des espèces végétales et du microorganisme testé [46]. Toutefois, la nature des composés individuels et leurs concentrations n'est pas statique mais diffère d'un organe à l'autre, dans un cycle de développement d'une plante, et de plus à l'intérieur et entre les populations.

Cette variation, qui conduit à des mélanges complexes de métabolites, est probablement une stratégie contre la sélection d'herbivores ou d'agents pathogènes spécifiques [47, 48]. Il existait des preuves expérimentales selon lesquelles une potentialisation synergique des activités biologiques est réalisée par des combinaisons de composés de défense individuels dans un mélange [49]. Cependant l'effet antibactérien des composés phénoliques peut être dû à leur capacité à modifier la perméabilité des cellules microbiennes permettant ainsi la perte de macromolécules à l'intérieur [50]. De plus, la littérature a signalé aussi que les Protéines présentaient une activité antibactérienne contre certaines souches bactériennes pathogènes [51]. Tandis que, les Sucres totaux eux-mêmes ont exprimés une activité antibactérienne du fait qu'ils disposaient de capacités à rendre la paroi cellulaire de la membrane bactérienne perméables [52].

CONCLUSION

La présente étude a mis en évidence que le stade Végétatif annonce le plus important rendement en extraits de *Cytisus triflorus* L'Her. Tandis que les extraits méthanoliques des stades Végétatif et Floraison ont concentrés différemment les métabolites primaires et secondaires. Les extraits de *Cytisus triflorus* du stade Végétatif balançaient leurs activités antibactériennes entre certaines bactéries à Gram positif ainsi que pour d'autres à Gram négatif. Dans l'ensemble, le présent travail est une rémunération pour l'élucidation métabolique et antibactérienne des Fabaceae Algériennes dont le genre *Cytisus*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Wink M. (2013). Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). *South African Journal of Botany*. 89: 164-175.
- [2]. Celiktas O.Y., Kocabas E.E.H., Bedir E., Sukan F.V., Ozek T. & Baser K.H.C. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis* depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*. 100: 553-559.

- [3]. Fattahi M., Bonfill M., Fattahi B., Torras-Claveria L., Sefidkon F., Cusido R.M., Palazon J. (2016). Secondary metabolites profiling of *Dracocephalum kotschyi* Boiss at three phenological stages using uni and multivariate methods. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 3(4): 177-185.
- [4]. Núñez-Regueira L., Proupín-Castiñeiras J. & Rodríguez-Añón J.A. (2004). Energy evaluation of forest residues originated from shrub species in Galicia. *Bioresource Technology*. 91: 215-221.
- [5]. Quezel P. & Santa S. (1962). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Vol 2, Paris, 1170p. Edité par le Centre National de la Recherche Scientifique
- [6]. Bossard C. & Rejmanek M. (1992). Why Have Green Stems? *Functional Ecology*. 6(2): 197205.
- [7]. González N., Ribeiro D., Fernandes E., Nogueira DR., Conde E., Moure A., Vinardell MP., Mitjans M. & Dominguez H. (2013). Potential use of *Cytisus scoparius* extracts in topical applications for skin protection against oxidative damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 125: 83-89.
- [8]. Sundararajan R., Haja NA., Kumar V., Mukherjee K., Saha BP., Bandyopadhyay A. & Mukherjee PK. (2006). *Cytisus scoparius* link-a natural antioxidant. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 6(8): 1-7.
- [9]. Quezel P. & Santa S. (1963). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. C.N.R.S. Tome I, Paris, p 484.
- [10]. Sundararajan R. & Koduru R. (2014). *Cytisus scoparius*: a review of ethnomedical: phytochemical and pharmacological information. *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*. 4(4): 2151-2169.
- [11]. Aourahoun K., Aissaoui M., Fazouan F., Larit F., Chalard P., Chalchat J.C., Figueredo G., Benayache F. & Benayache S. (2013). Essential oil of *Cytisus triflorus* L'Her. *Der Pharmacia Lettre*. 5(5): 276-279.
- [12]. Fillipini R., Piovan A., Borsarini A. & Caniato R. (2010). Study of dynamic accumulation of secondary metabolites in three subspecies of *Hypericum perforatum*. *Fitoterapia*. 81: 115-119.
- [13]. Koenen E.V. (2001). *Medicinal poisonous and edible plants in Namibia*. Klaus Hess Publishers, Verlag, Berlin.
- [14]. Eloff J.N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*. 64: 711-713.
- [15]. Midorikawa K., Banskota A.H., Tezuka Y., Nagaoka T., Matsushige K., Message D., Huertas A.A.G. & Kadota S. (2001). Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of propolis. *Phytochemical Analysis*. 12: 366-373.
- [16]. Šamec D., Durgo K., Gruz J., Kremer D., Kosalec I., Piljac-Zegarac J. & Salopek-Sondi B. (2015). Genetic and phytochemical variability of six *Teucrium arduini* L. populations and their antioxidant/prooxidant behaviour examined by biochemical, macromolecule- and cell-based approaches. *Food Chemistry*. 186: 298-305.
- [17]. Singleton V. L. & Rossi J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16: 144-158.
- [18]. Boizot N. & Charpentier J.P. (2006). *Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques*. INRA, Paris. p. 79-82.
- [19]. Zhishen J., Mengcheng T. & Jianming W. (1999). The determination of Flavonoïds contents in mulberry and their scanenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*. 64: 555-559.
- [20]. Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- [21]. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A & Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Biochemistry*. 28: 350-356.

- [22]. Cseke L.J., Kirakosyan A., Kaufman P.B., Warber S.L., Duke J.A. & Brielman H.L. (2006). Natural Products from Plants, second Ed. Taylor and Francis Group.
- [23]. Hammer Ø., Harper D. & Ryan P. (2001). PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electronica*. 4(1): 9.
- [24]. Hsu B. & Coupár IM. (2006). Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the Doum palm, *Hyphaene thebaica*. *Food Chemistry*. 98: 317-328.
- [25]. Nacif de Abreu I. & Mazzafera P. (2005). Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum bassiliense* Choisy. *Plant Physiology and Biochemistry*. 43: 241-248.
- [26]. Treutter D. (2001). Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. *Plant Growth Regulation*. 34: 71-89.
- [27]. Harborne G. (1982). *Introduction to Ecological Biochemistry*. Academic Press, London.
- [28]. Astarita L.V. & Santarém E.R. (2008). Plant secondary metabolism in response to the environment. *Advanced plant physiology*. 10: 31-89.
- [29]. Zanon, M.L.B. & Finger C.A.G. (2010). Relação de variáveis meteorológicas com o crescimento das árvores de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze em povoamentos implantados. *Ciência Florestal*. 20: 467-476.
- [30]. Abad M.J., Bessa A.L., Ballarin B., Aragon O., Gonzales E. & Bermejo P. (2006). Anti-inflammatory activity of four Bolivian *Baccharis* species (Compositae). *Journal of Ethnopharmacology*. 103: 338-344.
- [31]. Ammar I.M., Ennouri Khemakhem B., Yangui T. & Attia H. (2012). Variation in chemical composition and biological activities of two species of *Opuntia* flowers at four stages of flowering. *Industrial Crops and Products*. 37: 34-40.
- [32]. Hashem M. (2011). Antifungal properties of crude extracts of five Egyptian medicinal plants against dermatophytes and emerging fungi. *Mycopath*. 172: 37-46.
- [33]. Niu X., Chen X., Su H., Eneji A.E., Guo Y. & Dong X. (2014). Changes of secondary metabolites and trace elements in *Gentiana macrophylla* flowers: A potential medicinal plant part. *Chinese Herbal Medicines*. 6 (2): 145-151.
- [34]. Ryan D.F. & Bormann F.H. (1982). Nutrient resorption in Northern hardwood forests. *Bioscience* 32: 29-32
- [35]. Ammar H., López S., González J.S. & Ranilla M.J. (2004). Seasonal variations in the chemical composition and in vitro digestibility of some Spanish leguminous shrub species. *Animal Feed Science and Technology*. 115: 327-340.
- [36]. Yap YM., Loh CS. & Ong BL. (2008). Regulation of flower development in *Dendrobium crumenatum* by changes in carbohydrate contents, water status and cell wall metabolism. *Scientia Horticulturae -Amsterdam*. 119: 59-66.
- [37]. Sood S., Vyas D. & Nagar PK. (2006). *Scientia Horticulturae -Amsterdam*. 108: 390-396.
- [38]. Moalem-Beno D., Tamari G. & Leiter Y. (1997). Sugar-dependent gibberellin-induced chalcone synthase gene expression in *Petunia corollas*. *Plant Physiology*. 13: 419-424.
- [39]. Lay-Yee M., Stead AD. & Reid MS. (1992). Flower senescence in daylily (*Hemerocallis*). *Physiologia Plantarum*. 86: 308-314.
- [40]. Zanger R.A., Green AS., Lampman RL. & Berenbaum MR. (1997). Phenological changes in primary and secondary chemistry of reproductive parts in wild parsnip. *Phytochemistry*. 44 (5): 825-831.
- [41]. Kaijia X., Yuzhi W., Yanhua H., Na L. & Qian W. (2015). A green deep eutectic solvent-based aqueous two-phase system for protein extracting. *Analytica Chimica Acta*. 864: 9-20.
- [42]. Lores M., Pájaro M., Á-Casas M., Domínguez J. & García-Jares C. (2015). Use of ethyl lactate to extract bioactive compounds from *Cytisus scoparius*: Comparison of pressurized liquid extraction and medium scale ambient temperature systems. *Talanta*. 140: 134-142.

- [43]. **McKey D. (1979).** *The distribution of secondary compounds within plants.* In: **Rosenthal G.A. & Janzen D.H.** Ed, *Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites.* Academic Press, San Diego.
- [44]. **Carlos Silva J., Rodrigues S., Feás X. & Estevinho L.M. (2012).** Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of *propolis*. *Food and Chemical Toxicology.* 50: 1790-1795.
- [45]. **Kamatou G.P.P., Van Zyl R.L., Van Vuuren S.F., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G. & Viljoen A.M. (2008).** Seasonal variation in essential oil composition, oil toxicity and the biological activity of solvent extracts of three South African *Salvia* species. *South African Journal of Botany.* 74: 230-237.
- [46]. **Wink M. (2008a).** Plant secondary metabolism: diversity, function and its evolution. *Natural Products Communications.* 3: 1205-1216.
- [47]. **Wink M., Mohamed G.I.A. (2003).** Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: mapping of distribution patterns of secondary metabolites on amolecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the *rbcL* gene. *Biochemical Systematics and Ecology.* 31: 897-917.
- [48]. **Wink M. (2008b).** Evolutionary advantage and molecular modes of action of multi-component mixtures used in phytomedicine. *Current Drug Metabolism.* 9: 996-1009.
- [50]. **Tiwari B.K., Valdramidis V.P., O'Donnell C.P., Muthukumarappan K., Bourke P., & Cullen P.J. (2009).** Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 57: 5987-6000.
- [51]. **Park S.C., Moon J.C., Shin S.Y., Son H., Jung Y.J., Kim N-H., Kim Y-M., Jang M-K. & Lee J.R. (2016).** Functional characterization of alpha-synuclein protein with antimicrobial activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 478: 924-928.
- [52]. **Hana Q., Wub Z., Huanga B., Suna L., Dinga C., Yuanc S., Zhange Z., Chena Y., Hua C., Zhoua L., Liua J., Huang Y., Liaoa J. & Yuan M. (2016).** Extraction, antioxidant and antibacterial activities of *Broussonetia papyrifera* fruits polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules.* 92: 116-124.