

**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**  
**UNIVERSITE BLIDA-1**

Faculté des Sciences de la nature et de la vie

**THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION D'UN DOCTORAT**  
**EN SCIENCES BIOLOGIQUES**

INVESTIGATION PHYTOCHIMIQUE, HISTO-ANATOMIQUE ET  
PHARMACOLOGIQUE DE DEUX PLANTES MEDICINALES :

*Myrtus communis* L. ET *Myrtus nivellei* Batt & Trab.

(MYRTACEAE)

Par

**TOUAIBIA Meriem**

Devant le jury composé de

SAIDI F.	Professeur USDB-1	Présidente
CHAOUCH FZ.	MCA USDB-1	Promotrice
BELHADJ S.	Professeur UZAD	Examinatrice
CHAOUIA C.	MCA USDB-1	Examinatrice
HOUALI A.	Professeur UMMTO	Examineur
SMAIL SAADOUN N.	Professeur UMMTO	Examinatrice

Octobre 2017

## Remerciements

*A*vant tout, mes remerciements infinis sont adressés à « Dieu le Tout Puissant » de m'avoir donné le courage et la santé pour achever ce travail.

*Les travaux qui font l'objet de cette thèse ont été le fruit de collaborations fructueuses de plusieurs laboratoires cités ci-dessous, en particulier : les laboratoires du département de chimie de la Faculté des Sciences de l'université de Blida, les laboratoires du CRAPC (Bousmail/Bab Ezouar), le laboratoire de culture in vitro de l'ENARP-Alger et les laboratoires d'analyses physico-chimiques du CRD Aldar-Mobidal (Alger) et du CRD Antibiotical (Médéa).*

*J'exprime mes profonds remerciements, ma vive reconnaissance et ma sincère gratitude à Dr CHAOUCH Fatma Zohra, qui a bien voulu diriger ce travail avec beaucoup de compétence et d'efficacité. j'ai eu le privilège de bénéficier de son enseignement, de son savoir et de sa grande expérience qui, alliés à ses qualités humaines resteront pour moi un modèle.*

*J'ai l'honneur d'exprimer ma profonde reconnaissance à Mme SAIDI F, Professeur à l'université Blida-1, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury, un grand merci lui est adressé pour son aide énorme, ses conseils et son soutien durant tout ce parcours. Je vous serai éternellement reconnaissante.*

*Je tiens à adresser mes remerciements à Mme CHAOUIA Cherifa, maitre de conférences A et vice doyenne chargée de la PGRS, à l'université Blida-1, d'avoir accepté de faire partie du jury, merci beaucoup pour votre disponibilité et votre aide inestimable dans les moments difficiles, qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance. Merci également au Pr Belhadj S de l'université Ziane Achour de Djelfa, ainsi que Pr HOUALI K et Pr SMAIL SAADOUN N de l'université Mouloud Maameri de Tizi-Ouzou, qui m'ont fait l'honneur d'avoir accepté d'évaluer ce travail.*

*Je remercie Pr BELHAMEL D et son équipe, pour leurs conseils avisés, et pour tout le plaisir que j'ai eu à travailler avec eux. Merci également de m'avoir initié aux joies de la formulation des émulsions ainsi que pour leur collaboration active.*

*Je voudrai bien exprimer, ici, ma respectueuse gratitude au Dr CAZANOVA Joseph, enseignant chercheur à l'université de Corse, pour l'aide énorme qu'il m'a octroyé ainsi que pour ses avis judicieux.*

*Un grand merci est adressé à toute l'équipe du laboratoire de l'ENARP qui m'a accueilli dans une ambiance sympathique et chaleureuse.*

*Le moment est venu de saluer toutes les personnes qui m'ont aidé pour la réalisation de ce travail, un grand merci s'adresse en particulier à tous les ingénieurs des laboratoires de la faculté des sciences de la nature et de la vie, qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à l'aboutissement de ce travail. Je tiens également à saluer tous mes collègues ainsi que mes condisciples pour les bons moments que nous avons passés ensemble et qui rythment la vie du laboratoire.*



## *Dédicace*



*A mes chers parents, pour la qualité de l'éducation qu'ils m'ont conférée et les vertus qu'ils ont cherché à développer en moi. Je leur exprime ici toute mon affection, tout mon amour et toute ma gratitude pour m'avoir encouragé et soutenu tout au long de mes études, et aujourd'hui encore. Qu'ils voient en ce travail l'aboutissement de leurs efforts.*

*Leur fierté à mon égard aujourd'hui est pour moi la meilleure des récompenses*

*A mon frère et mes sœurs*

*A tous mes Amis (es)*

*Meriem*

## Résumé

Ce travail s'intéresse à la valorisation de deux plantes poussant à l'état spontané et appartenant à la famille des Myrtaceae : *Myrtus communis* L. et *Myrtus nivellei* Batt & Trab. Cette étude a été menée suivant deux stratégies complémentaires: la première est basée sur la multiplication *in vitro* de ces plantes, afin de comprendre leur comportement organogène et callogène, la deuxième est axée sur l'étude histo-anatomique et l'extraction des huiles essentielles et des concrètes alcooliques, à partir des feuilles et des baies, afin de rechercher leurs principaux constituants, et mettre en évidence leurs propriétés thérapeutiques et/ou toxiques. Cette initiative peut contribuer au développement durable de notre pays et apporter des preuves scientifiques sur leurs vertus en médecine traditionnelle.

Les essais préliminaires de multiplication *in vitro*, nous ont permis de mettre en place un protocole standard pour la désinfection des graines. L'organogenèse à partir de vitro-semis a montré que le milieu de base MS supplémentés d'hormones de croissances, a permis le développement de plantules entières. Les essais de callogénèse ont révélé que les milieux contenant une balance hormonale équilibrée ont fourni des amas de cellules indifférenciées. Cependant, les explants des feuilles et des entrenœuds sont plus callogènes que les racines.

L'étude histo-anatomique nous a permis de localiser les sites de sécrétion et de stockage de quelques métabolites au niveau des cals, des feuilles et des tiges. Cette étude a été complétée par un criblage phytochimique. L'examen histochimique a permis de recenser la présence tissulaire de plusieurs métabolites d'intérêt.

L'analyse de la composition chimique des huiles essentielles extraites par hydrodistillation, a démontré la richesse de ces fractions volatiles étudiés en monoterpènes hydrocarbonés, à l'exception de l'huile essentielle des feuilles de l'espèce saharo-endémique *M. nivellei*, qui est dominée par les sesquiterpènes oxygénés.

Les dosages chimiques par spectrophotométrie UV-visible ont révélé la présence de concentrations remarquables en polyphénols dans les extraits alcooliques des feuilles et des fruits, alors qu'ils sont faiblement présents dans ceux des cals.

Les huiles essentielles extraites sont douées d'excellents effets anti-inflammatoires avec des pourcentages de réduction de l'œdème dépassant les 55%, et n'expriment aucune toxicité aigue par voie orale. Les extraits alcooliques ont présenté, par contre, une toxicité orale pour les doses allant de 0,5 à 1 g/kg de poids corporel.

L'étude de l'activité anti-microbienne a révélé une grande action inhibitrice des huiles essentielles étudiées sur la croissance des germes pathogènes et phyto-pathogènes, particulièrement contre les souches: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*, qui se sont montrées les plus sensibles.

Les crèmes hydrophiles formulées à base des huiles essentielles extraites, ont présenté une bonne stabilité physico-chimique et microbiologique ainsi qu'une excellente tolérance cutanée. Les crèmes dermiques préparées possèdent *in vivo* d'intéressantes propriétés cicatrisantes des plaies en spot pratiqués sur la peau des rats.

L'activité anti-oxydante par le test DPPH a montré que les extraits éthanoliques des fruits et des feuilles exercent un pouvoir réducteur en tant que donneurs de protons H, cependant le test FRAP a confirmé l'impact des fractions volatiles en tant que donneurs d'électrons dans les réactions de réduction des ions instables.

**Mots clés:** *Myrtus communis*, *Myrtus nivellei*, organogenèse, huiles essentielles, concrètes, anti-inflammatoire, toxicité, anti-microbienne, anti-oxydante, cicatrisant.

## Abstract

This work is focused on the evaluation of two plants, growing wild and belonging to the Myrtaceae family: *Myrtus communis* L. and *Myrtus nivellei* Batt & Trab.

This study was carried in two complementary strategies: the first is based on the *in vitro* propagation of these plants to understand their behavior and organogenesis, the second is based on a histo-anatomical study and the extraction of essential oils and alcoholic extracts, from the leaves and the berries, in order to find out their main components, and highlight their therapeutic properties and / or toxicity. This initiative can contribute to the sustainable development of our country and provide scientific evidence of their virtues in traditional medicine.

Preliminary tests of *in vitro* propagation enabled us to establish a standard protocol for the disinfection of seeds. The micro-propagation from seedling plantlets showed that the basic MS medium supplemented with growth hormones, allowed the development of whole seedlings. Callogenesis tests revealed that media containing an equilibrated hormonal provided undifferentiated cells clusters. However, the leafy and internodal explants are more callogenous than the roots.

The histoanatomic study allowed us to locate the sites of secretion and storage of some metabolites in callus, leaves and stems. This study was supplemented by phytochemical screening. The histochemical examination made it possible to identify the tissue presence of several metabolites of interest.

Analysis of the chemical composition of the essential oils extracted by steam distillation showed the richness of these volatile fractions studied in hydrocarbon monoterpenes with the exception of the essential oil of the leaves of the Saharo-endemic *M. nivellei* species, which is dominated by oxygenated sesquiterpenes.

Chemical assays by UV-visible spectrophotometry revealed the presence of remarkable concentrations of some polyphenols groups in the alcoholic extracts of the leaves and the fruits, however, they are weakly present in the extracts of callus.

Essential oils exhibit an excellent anti-inflammatory effect with oedema reduction percentages exceeding 55%, and express no oral toxicity. Whereas, the alcoholic extracts presented an oral toxicity for doses between 0,5 and 1g/kg body weight.

The antimicrobial study revealed high inhibitory action of essential oils from leaves and berries, on the growth of pathogenic and phytopathogenic germs especially against the strains: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, which were the most sensitive.

Hydrophilic dermal creams containing volatile fractions, showed good physico-chemical and microbiological stability and excellent skin tolerance. The prepared dermal creams have also interesting *in vivo* properties on healing spot wounds performed on rats skin.

The antioxidant activity by the DPPH test has shown that ethanolic extracts of the fruits and leaves exhibit a reducing power as proton (H<sup>+</sup>) donors, better than essential oils, however the FRAP test confirmed the impact of the volatile fractions as electron donors in the reducing reactions of unstable free radicals.

**Keywords:** *Myrtus communis*, *Myrtus nivellei*, organogenesis, essential oils, extracts, anti-inflammatory, toxicity, antimicrobial, antioxidant, healing.

## الملخص

يرتكز هذا العمل على تثمين نبتتين بريتين *Myrtus communis* و *Myrtus nivellei* تنتميان إلى العائلة الأسيية. و قد اعتمدت هذه الدراسة على إستراتيجيتين متكاملتين: تستند الأولى على تكاثر النباتات مخبريا لفهم سلوكهما في النمو، بينما تركز الثانية على الدراسة التشريحية واستخراج الزيوت الأساسية و المستخلصات الكحولية، من الأوراق والثمار، و ذلك بالبحث عن مكوناتها الرئيسية، و تسليط الضوء على خصائصها العلاجية و السمية. هذه المبادرة يمكن أن تساهم في التنمية المستدامة لبلادنا و تقديم الأدلة العلمية عن خصائصهما العلاجية المتداولة في الطب التقليدي.

سمحت لنا الاختبارات الأولية للتكاثر المخبري من وضع بروتوكول لتعقيم البذور أظهر التكاثر الفسيلي للبذور المستنبطة مخبريا تناول الفسائل بشكل جيد في وسط الزرع الذي يحتوي على  $1,5 \text{ mg/l BA} + 0,5 \text{ mg/l ANA}$   $0,05 \text{ mg/l}$  . أما النمو الجذري فهو أفضل في الوسط الذي به  $1 \text{ mg/l ANA}$ . أظهرت الدراسات العملية حول التكاثر الخضري للأنسجة أن أوساط الزرع التي تحتوي على نسب متعادلة لهرمونات النمو (auxine/cytokinine) سمحت بتشكيل أنسجة خلوية، علما أن الأنسجة المستقطعة من الأوراق و السيقان هي الأكثر استجابة للتكاثر الخلوي مقارنة مع أنسجة الجذور.

سمحت دراسة الخصائص التشريحية لنا من تحديد موقع إفراز و مواقع تخزين بعض المركبات في الانسجة الخلوية ، في الأوراق و الأغصان و الأنسجة الخلوية كما تدعمت هذه الدراسة من قبل الفحص الكيميائي النباتي.

تحليل التركيب الكيميائي من الزيوت الأساسية المستخرجة عن طريق التقطير البخار، برهنت على غنى هذه المواد المتطايرة بمركبات monoterpenes المؤكسدة و حددت المكونات الرئيسية لها ، فيما يخص *M. communis*، و تكوين الزيت المستخلصة من الأوراق التي يهيمن عليها الزوجين الليمونين /  $\alpha$ -بينين في حين أن زيت الثمار غني  $\delta$ -elemene و  $\alpha$ -ترينينول ، أما بالنسبة ل *M. nivellei*، تتكون الزيوت الأساسية للأوراق من الليمونين و octadienol، في حين أن الثمار تنتمي إلى النمط الكيميائي اوكالبيتول / ليمونين.

كشفت الفحوصات الكيميائية من خلال القياس الطيفي للأشعة فوق البنفسجية و المرئية تركيزات ملحوظة لبعض من بعض مركبات البوليفينول في المستخلصات الكحولية للنبتتين، في حين كانت نسبتها ضعيفة في المستخلصات المستخرجة من الأنسجة المستنبطة مخبريا.

تميزت الزيوت الأساسية المستخرجة بتأثيرات مضادة للالتهابات ممتازة مع نسب تخفيض الالتهاب تتجاوز 55%، كما انها لم تعبر عن أي سمية بعد أخذها عن طريق الفم. ، إلا إن المستخلصات الكحولية أحدثت سمية عن طريق الفم للجرعات التي تتراوح بين 0,5 و 1 غ/كغ من وزن الجسم.

كشفت الدراسة المضادة للميكروبات فاعلية مثبطة عالية للزيوت الأساسية المستخرجة من الأوراق و الثمار على نمو الجراثيم وطفيليات النباتات، وخاصة ضد السلالات: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* و *Staphylococcus epidermidis* التي تبين انها الأكثر حساسية.

أظهرت الكريمات المرطبة التي تحتوي على الزيوت العطرية خصائص فيزيائية و كيميائية و ميكروبيولوجية جيدة و مستقرة ، كما امتازت بانها لا تسبب تهيجات جلدية. تمتلك هذه الكريمات كذلك خصائص مثيرة للاهتمام في شفاء الجروح العميقة الدائرية التي أجريت على جلد الفئران المخبرية.

أظهرت النشاط المضاد للأكسدة من خلال اختبار DPPH أن مستخلصات الايثانولية للثمار و الأوراق تمارس قوة مرجعة حيث تلعب دورا مانحا لبروتونات  $\text{H}^+$  ، أفضل من نشاط الزيوت العطرية، بينما أكد اختبار FRAP عن تأثير هذه الأخيرة كمصدر مانح للإلكترونات للحد من النشاط الضار للأيونات الغير مستقرة.

الكلمات المفتاحية: *Myrtus communis*، *Myrtus nivellei*، التكاثر المخبري، الزيوت العطرية، المستخلصات ، المضادة للالتهابات ، سمية، مضادة للميكروبات ، مضادة للأكسدة ، شفاء الجروح.

## INTRODUCTION

Depuis les temps les plus anciens, l'Homme s'est intéressé aux plantes qui l'entourent, il en a fait sa nourriture, tiré des éléments de construction, d'habillement et il en a utilisé pour prévenir ou soigner diverses maladies (**Ali-Delille, 2010**).

Au fil des siècles, une première distinction a pu être faite entre les plantes comestibles et toxiques. Les connaissances empiriques accumulées ont permis aux différentes civilisations de prendre les plantes comme source essentielle de médicaments. Jusqu'au début du XX<sup>ème</sup> siècle, presque tous les médicaments étaient à base de plantes (**Gurib-Fakim, 2006**).

Bien que leur emploi a souvent été en relation avec des pratiques basées essentiellement sur des croyances, la phytothérapie a connu un essor important à travers le monde, car les composés synthétisés par la plante, sont plus variés et mieux tolérés que ceux retrouvés dans les médicaments de synthèse, ce qui a suscité l'orientation de la recherche sur les plantes médicinales vers l'obtention de phyto-médicaments, afin de combler les besoins non seulement de la thérapie mais aussi de l'industrie agro-alimentaire et cosmétique (**Karou et al., 2005**).

Parmi ces métabolites secondaires, on retrouve dans une grande mesure les huiles essentielles, qui ont à toute époque, occupé une place importante dans la vie quotidienne des Hommes qui les utilisaient autant pour se parfumer, aromatiser la nourriture ou même se soigner (**Robert et al., 1998**).

Les composés phénoliques ont également fait l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures *in vivo* et *in vitro* de tissus végétaux. Ces produits naturels sont doués d'une grande diversité structurale, et de propriétés pharmaceutiques intéressantes (**Bravo, 1998 ; Chebil, 2006**). Ils sont responsables de nombreux processus physiologiques (**Boizot et Charpentier, 2006**).

La production de métabolites secondaires peut avoir plusieurs alternatives, dont la synthèse chimique, cependant, dans certains cas, le coût élevé, la complexité des molécules et l'aspect polluant de ce type de productions rendent cette synthèse chimique peu rentable. C'est pourquoi le développement de procédés biotechnologiques offre une alternative prometteuse pour améliorer la production de molécules à haute valeur ajoutée (**Verpoorte et al., 1991**).

L'Algérie dispose d'une diversité floristique très variée, à laquelle s'ajoute une tradition séculaire d'utilisation des plantes (**Pereira et al., 2003**). Elle bénéficie d'un climat favorable, avec une hétérogénéité des conditions écologiques. Géographiquement, l'Algérie culmine le bassin méditerranéen au Nord, qui est doté d'une très riche flore couvrant plus de 216 634 000 hectares de secteurs forestiers, avec une panoplie de plantes utilisées comme herbes, aliments et remèdes thérapeutiques, où beaucoup d'entre sont utilisées en la médecine traditionnelle (**Baba Aissa, 2000 ; Beloued, 2001**). Malgré sa nature hétérogène, il y a eu peu d'efforts consacrés au développement des propriétés de ces plantes (**Farombi, 2003**).

En outre, notre pays partage avec ceux du Sahel une large superficie du Sahara central, qui est caractérisé par une végétation clairsemée qui a su développer une stratégie de subsistance particulière, avec un large éventail de composés phytochimiques d'un intérêt grandissant, d'où l'importance de ce travail de recherche. Ce brassage d'espèces constitue pour notre pays une véritable richesse qui doit être préservée et gérée rationnellement et durablement, dans le but de maintenir les équilibres écologiques déjà fragiles et de conserver cette diversité biologique.

C'est dans cette optique et notamment dans le cadre de valorisation des plantes à caractère thérapeutique, notre choix a porté sur deux plantes médicinales appartenant au genre *Myrtus*: l'espèce méditerranéenne *Myrtus communis* L. et l'espèce saharo-endémique *Myrtus nivellei* Batt & Trab. La première étant souvent recommandée en médecine traditionnelle contre les troubles digestifs et respiratoires (**Messaoud et al., 2012**), alors que la deuxième est très utilisée par les nomades touaregs contre les troubles gastro-intestinaux (**Hammiche et Maiza, 2006**)

Le choix des *Myrtaceae* comme sujet général du présent travail a été guidé par les nombreuses utilisations traditionnelles qui en sont répertoriées, mais aussi par le fait qu'il s'agit d'une famille dont le genre *Myrtus* est relativement méconnu.

Ce manuscrit s'articule autour des parties suivantes :

La première partie apporte une description botanique des deux espèces faisant l'objet de ce travail, ainsi qu'une présentation des travaux phytochimiques antérieurs.

Dans la deuxième partie, nous avons développé quatre volets complémentaires : le premier est consacré à la réalisation d'une étude histo-anatomique et histo-chimique pour mieux comprendre l'anatomie des espèces étudiées et localiser les sites de synthèse des métabolites, le deuxième volet s'est intéressé à *in vitro*, pour comprendre leur comportement callogène et organogène, le troisième volet est consacré à la présentation des différentes méthodes pratiquées pour l'extraction, la caractérisation et la quantifications des fractions volatiles et polaires recherchés. Le quatrième volet s'est intéressé à l'évaluation de tests pharmaco-toxicologiques pour l'étude de la toxicité aigüe par voie orale et cutanée, l'effet anti-inflammatoire par le test d'induction d'œdème à la carragénine, le test de cicatrisation sur des plaies en spots par des crèmes formulées à base des huiles essentielles extraites, le test de mise en évidence de l'effet anti-microbien et des tests déterminant le pouvoir anti-oxydant exercé sur les radicaux libres *in vitro*.

La troisième partie comprend les résultats et la discussion relatifs aux différents tests pratiqués. Le manuscrit se termine par une conclusion générale basée sur une lecture attentive des différents résultats obtenus.

Ce travail tente d'apporter une contribution à l'investigation des myrtes algériens, dans la perspective de leur exploitation dans la formulation de phyto-médicaments.

## TABLE DES MATIERES

Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1
<b>Première partie : Synthèse bibliographique</b>	
<b>I. Présentation des espèces étudiées</b>	
I.1. Historique.....	3
I.2. Présentation de la famille des <i>Myrtaceae</i> .....	4
I.3. Le genre <i>Myrtus</i> .....	5
I.3.1. Systématique du genre <i>Myrtus</i> .....	6
I.4. Description botanique de <i>Myrtus communis</i> L.....	6
I.4.1. Nomenclature.....	6
I.4.2. Position systématique.....	6
I.4.3. Origine et répartition géographique.....	6
I.4.4. Description botanique.....	7
I.4.5. Ecologie et régénération.....	8
I.4.6. Composition chimique.....	9
I.4.7. Propriétés thérapeutiques.....	13
I.4.8. Usages en médecine traditionnelle.....	14
I.5. Description botanique de <i>Myrtus nivellei</i> Batt & Trab.....	15
I.5.1. Nomenclature.....	15
I.5.2. Position systématique.....	16
I.5.3. Origine et répartition géographique.....	16
I.5.4. Description botanique.....	17
I.5.5. Composition chimique.....	18
I.5.6. Propriétés thérapeutiques.....	18
I.5.7. Utilisation en médecine traditionnelle.....	19
I.6. Composés du métabolisme des plantes.....	19
I.6.1. Définition et fonctions des métabolites secondaires.....	20
I.6.2. Classification des métabolites secondaires.....	20
I.6.2.1. Les composés phénoliques.....	20
I.6.2.2. Les huiles essentielles.....	30
I.7. Intérêts de l'extraction des métabolites secondaires à partir des végétaux.....	33
I.8. Biotechnologies végétales pour la production des métabolites secondaires.....	34
I.9. Travaux antérieurs sur la multiplication in vitro du genre <i>Myrtus</i> .....	34
<b>Deuxième partie : Matériel et méthodes</b>	
II.1. Présentation des sites de récolte.....	35
II.2. Lieux des expérimentations .....	37
II.3. Matériels .....	37
II.3.1. Instruments et réactifs .....	37
II.3.2. Matériel biologique.....	37
II.4. Séchage et conservation.....	39
II.5. Etude botanique des plantes étudiées.....	40
II.6. Partie culture <i>in vitro</i> .....	42
II.6.1. Milieux de culture.....	42
II.6.2. Stérilisation des instruments utilisés .....	43
II.6.3. Désinfection du matériel végétal .....	43
II.6.4. Multiplication à partir de vitro-semis .....	44
II.6.5. Multiplication par micro-bouturage .....	45

II.6.6. Induction de la callogenèse à partir des vitro-plants (culture de tissus) .....	46
II.6.7. Conditions de culture.....	47
II.7. Partie étude phytochimique .....	47
II.7.1. Caractérisation physico-chimique des poudres végétales .....	47
II.7.2. Screening phytochimique des métabolites .....	49
II.7.3. Etude des composés volatils (les huiles essentielles) .....	52
II.7.3.1. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation .....	52
II.7.3.2. Evaluation des propriétés organoleptiques des huiles essentielles .....	54
II.7.3.3. Evaluation des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles.....	54
II.7.3.4. Analyse des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse CG/SM .....	58
II.7.4. Etude des composés non volatils polaires .....	59
II.7.4.1. Extractions par solvant (solide-liquide) .....	59
II.7.4.2. Analyse spectrophotométrique.....	61
II.8. Activités pharmaco-toxicologiques sur model animal ( <i>in vivo</i> ).....	65
II.8.1. Préparation des solutions à tester.....	65
II.8.2. Etude de la toxicité aigüe par voie orale .....	66
II.8.3. Etude de la toxicité cutanée des HE et des concrètes <i>in vivo</i> .....	68
II.8.4. Etude de l'activité anti-inflammatoire .....	70
II.8.5. Etude de l'effet cicatrisant des huiles essentielles .....	71
II.8.5.1. Formulation des crèmes dermiques.....	72
II.8.5.2. Contrôles organoleptique, physico-chimique et microbiologique des crèmes formulées.....	74
II.8.5.3. Evaluation de l'activité cicatrisante des crèmes.....	76
II.8.6. Etude du pouvoir anti-microbien des huiles essentielles et des extraits.....	78
II.8.7. Etude de l'activité anti-oxydante des huiles essentielles et des extraits.....	82
II.9. Analyse statistique .....	84

### **Troisième partie : Résultats et discussion**

III.1. Etude botanique des plantes.....	85
III.1.1. Etude morphologique.....	85
III.1.2. Etude histo-anatomique .....	89
III.1.3. Etude histo-chimique des métabolites.....	98
III.2. Résultats des essais <i>in vitro</i> .....	107
III.2.1. Résultats de la désinfection des micro-boutures récoltées <i>in situ</i> .....	107
III.2.2. Résultats de la désinfection des graines.....	108
III.2.3. Résultats de la germination des graines sur boites de Pétri.....	109
III.2.4. Résultats des essais de multiplication <i>in vitro</i> .....	111
III.2.4.1. Résultats de la cinétique de croissance des vitro-semis.....	111
III.2.4.2. Résultats de la multiplication par micro-bouturage des vitro-semis.....	115
III.2.4.3. Résultats de la callogenèse.....	122
III.3. Résultats de l'étude phytochimique.....	128
III.3.1. Caractérisation physico-chimiques des parties étudiées.....	128
III.3.2. Résultats du Screening phytochimique.....	131
III.3.3. Résultats de l'étude des fractions volatiles et polaires.....	133
III.3.4. Résultats des essais pharmaco-toxicologiques.....	162
III.3.4.1. Evaluation de la toxicité aigüe .....	162
III.3.4.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	166
III.3.4.3. Evaluation de l'effet cicatrisant.....	173
III.3.4.4. Evaluation du pouvoir anti-microbien .....	181
III.3.4.5. Evaluation du pouvoir anti-oxydant <i>in vitro</i> .....	191
Conclusion-Perspectives.....	210
Références bibliographiques	
Appendices	
Glossaire	



## LISTE DES ABREVIATIONS, SYMBOLS ET CONVENTIONS

### Partie phytochimie

Abs	: Absorbance
AFNOR	: Association française de normalisation
Ac gal	: Acide gallique
Ac tan	: Acide tannique
ATCC	: American Type Culture Collection (catalogue de microorganismes)
CG/SM	: Chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
Cp	: Contrôle positif
Cyan	: Cyanidine
$d^{20}$	: Densité
DPPH	: 1,1-DiPhényl-1,2PicrylHydrazyle
DO	: Densité optique
EE	: Extrait éthanolique
EEFeMC	: Extrait éthanolique des feuilles de <i>M. communis</i>
EEFeMN	: Extrait éthanolique des feuilles de <i>M. nivellei</i>
EEFrMC	: Extrait éthanolique des fruits de <i>M. communis</i>
EEFrMN	: Extrait éthanolique des fruits de <i>M. nivellei</i>
EM	: Extrait méthanolique
EMFeMC	: Extrait méthanolique des feuilles de <i>M. communis</i>
EMFeMN	: Extrait méthanolique des feuilles de <i>M. nivellei</i>
EMFrMC	: Extrait méthanolique des fruits de <i>M. communis</i>
EMFrMN	: Extrait méthanolique des fruits de <i>M. nivellei</i>
EMCaMC	: Extrait méthanolique des cals de <i>M. communis</i>
EMCaMN	: Extrait méthanolique des cals de <i>M. nivellei</i>
ES	: Extrait sec
EtOH	: Ethanol
eV	: Electron volt
FCR	: Folin Ciocalteu Reagent
FeMC	: Feuilles de <i>M. communis</i>
FeMN	: Feuilles de <i>M. nivellei</i>
FrMC	: Fruits de <i>M. communis</i>
FrMN	: Fruits de <i>M. nivellei</i>
FRAP	: Ferric Reducing Antioxidant Power
HCl	: Acide Chlorhydrique
HE	: Huile Essentielle
HEFeMC	: Huile essentielle des feuilles de <i>M. communis</i>
HEFeMN	: Huile essentielle des feuilles de <i>M. nivellei</i>
HEFrMC	: Huile essentielle des fruits de <i>M. communis</i>
HEFrMN	: Huile essentielle des fruits de <i>M. nivellei</i>
Hydroc	: Hydrocarboné
IA	: Indice d'acide
IE	: Indice d'ester
IPC	: Indice d'irritation primaire cutané
IR	: Indice de refraction
IS	: Indice de saponification
INCI	: International nomenclature of cosmetic ingredients
MH	: Milieu Muller-Hinton
MeOH	: Méthanol
mpa.s	: Millipascal seconde
nm	: Nanomètre
NMRI	: Naval Medical Research Institute
PA	: Principe actif

PDA	: Milieu Pomme de terre-Dextrose-Agar
Pharm Europ	: Pharmacopée européenne
Quer	: Quercetine
Qsp	: Quantité suffisante pour
R	: Rendement
Ra	: Racines
RL	: Radicaux libres (= ERO : espèces réactives oxygénées)
Rut	: Rutine
TCA	: Acide trichloracétique
Ti	: Tiges
UV-vis	: UV-visible
UFC	: Unite formant colonie
Vit C	: Vitamine C= Acide ascorbique
Vit E	: Vitamine E= Alpha tocophérol
I%	: Pourcentage d'inhibition des radicaux libres
%AUG	: Pourcentage d'augmentation de l'œdème
%RED	: Pourcentage de réduction de l'œdème

### Partie culture *in vitro*

2,4-D	: Acide 2,4-Dichlorophénoxyacétique
ANA	: Acide Naphtalène Acétique
BA	: Benzyladenine
BAP	: 6-Benzyl Amino Purine
ENARP	: Entreprise National d'Aménagement des Réserves des Parcs nationaux et de loisirs
GA <sub>3</sub>	: Acide Gibbérellique 3
KIN	: Kinétine
MC	: <i>Myrtus communis</i>
MCc	: Cals de <i>M communis</i>
MN	: <i>Myrtus nivellei</i> .
MNc	: Cals de <i>M nivellei</i>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1	: Différentes partie aériennes de <i>Myrtus communis</i> L.	8
Figure 2	: Rameau feuillé et fructifère de <i>Myrtus nivellei</i>	18
Figure 3	: Voies de biosynthèse des composés phénoliques.	22
Figure 4	: Quelques dérivés de l'acide hydroxybenzoïque	23
Figure 5	: Quelques dérivés de l'acide hydroxycinnamique.	24
Figure 6	: Structure de base des coumarines.	24
Figure 7	: Structure de base des tanins hydrolysables.	26
Figure 8	: Structure de quelques tanins condensés.	26
Figure 9	: Squelette de base des flavonoïdes.	28
Figure 10	: Structure de l'unité isoprène (C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> ).	31
Figure 11	: Structure de quelques composés des huiles essentielles	31
Figure 12	: Position géographique des sites de récolte des deux espèces étudiées	36
Figure 13	: Méthodologie de séchage des feuilles et des baies.	39
Figure 14	: Principe de la spectrophotométrie UV-visible.	62
Figure 15	: Récapitulatif du procédé de formulation de la crème dermique.	74
Figure 16	: Incision en spot dans la région dorsolombaire du rat.	77
Figure 17	: Disposition opposée décussée des feuilles sur la tige de <i>M. communis</i>	85
Figure 18	: Feuilles simples à limbe entier de <i>M. communis</i> .	85
Figure 19	: Disposition des feuilles sur la tige.	86
Figure 20	: Feuilles de <i>M. nivellei</i> .	86
Figure 21	: Disposition des baies à l'aisselle des feuilles	87
Figure 22	: Taille et calibre de la baie	87
Figure 23	: Fruit de <i>M. communis</i> vu de profil.	87
Figure 24	: Taille de la graine (G:x4).	87
Figure 25	: Disposition des baies sur le rameau.	88
Figure 26	: Taille et diamètre de la baie.	88
Figure 27	: Fruit de <i>M. nivellei</i> vu de profil.	88
Figure 28	: Taille de la graine (G:x6).	88
Figure 29	: Coupe transversale dans un cal de <i>M. communis</i> (G:x40).	90
Figure 30	: Coupe transversale dans un cal de <i>M. nivellei</i> (G:x40).	90
Figure 31	: Coupe transversale de la feuille au niveau de la nervure centrale (G:x40).	91
Figure 32	: Pigmentation naturelle de la feuille jeune à l'état vital (G:x10).	91
Figure 33	: Poche sécrétrice dans la feuille (G:x40).	92
Figure 34	: Coupe transversale dans la nervure centrale de la feuille (G:x40).	92
Figure 35	: Coupe transversale au niveau de la tige ligneuse (G:x40).	93
Figure 36	: Bois hétéroxylé de la tige (G:x40).	93
Figure 37	: Parenchyme médullaire de la tige de <i>M. communis</i> (G:x40).	94
Figure 38	: Parenchyme médullaire de la tige de <i>M. nivellei</i> (G:x40).	94
Figure 39	: Coupe transversale d'une jeune tige (G:x10).	94
Figure 40	: Poche sécrétrice au niveau d'une jeune tige (G:x40).	95
Figure 41	: Différents stades de formation des glandes sécrétrices.	97
Figure 42	: Distribution des composés phénoliques au niveau d'une coupe transversale d'un cal de <i>M. communis</i> (à gauche) et <i>M. nivellei</i> (à droite) (G:x40).	98
Figure 43	: Répartition tissulaire des polyphénols dans une coupe transversale d'une feuille de <i>M. communis</i> (à gauche) et <i>M. nivellei</i> (à droite) (G:x40).	99
Figure 44	: Répartition tissulaire des polyphénols dans une coupe transversale d'une tige de <i>M. communis</i> (à gauche) et <i>M. nivellei</i> (à droite) (G:x40).	99
Figure 45	: Coupes histologiques montrant la présence de polysaccharides dans les foyers de divisions cellulaires intensives dans les cals de <i>M. communis</i> (à gauche) et <i>M. nivellei</i> (à droite) (G:x40).	101
Figure 46	: Distribution des composés polysaccharidiques dans les feuilles de <i>M. communis</i> (à gauche) et <i>M. nivellei</i> (à droite) (G:x100).	102
Figure 47	: Distribution des composés polysaccharidiques dans les tiges de <i>M. communis</i> (à gauche) et <i>M. nivellei</i> (à droite) (G:x40).	102
Figure 48	: Distribution des amyloplastes au niveau du parenchyme médullaire de la tige de <i>M. communis</i> (à droite) et <i>M. nivellei</i> (à droite) (G:x40).	102

Figure 49	: Distribution des amyloplastés dans les cellules des cals de <i>M. communis</i> (à droite) et <i>M. nivellei</i> (à gauche) (G:x40).	103
Figure 50	: Distribution des substances de nature protéique dans la feuille de <i>M. communis</i> .	103
Figure 51	: Distribution des substances de nature protéique dans la feuille de <i>M. nivellei</i> .	103
Figure 52	: Graines d'aleurone dans une cellule de l'albumen de la graine de <i>M. communis</i> (à gauche) et <i>M. nivellei</i> (à droite) (G:x100).	104
Figure 53	: Coupe histologique représentant la cuticule dans une feuille de <i>M. communis</i> (G:x40).	105
Figure 54	: Coupe histologique représentant la cuticule dans une feuille de <i>M. nivellei</i> (G:x40).	105
Figure 55	: Aspect des poils tecteurs au niveau des tiges jeunes de <i>M. communis</i> (à gauche) et <i>M. nivellei</i> (à droite) (G:x40).	105
Figure 56	: Effet des différentes concentrations de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ sur le taux de contaminations des micro-boutures de <i>M. communis</i> .	107
Figure 57	: Différents stades d'évolution des micro-boutures de <i>M. communis</i> .	108
Figure 58	: Evaluation de la cinétique de germination des graines entières de <i>M. communis</i> et <i>M. nivellei</i> sur boîtes de Pétri.	110
Figure 59	: Evaluation de la cinétique de germination des graines de <i>M. communis</i> et <i>M. nivellei</i> scarifiées.	111
Figure 60	: Vitro-semis de <i>M. communis</i> âgé de 8 semaines.	112
Figure 61	: Vitro-semis de <i>M. nivellei</i> âgé de 8 semaines.	112
Figure 62	: Evaluation de la cinétique d'allongement des hypocotyles chez les vitro-semis de <i>M. communis</i> et <i>M. nivellei</i> .	112
Figure 63	: Evaluation de la cinétique d'apparition des feuilles chez les vitro-semis de <i>M. communis</i> et <i>M. nivellei</i> .	113
Figure 64	: Evaluation du développement racinaire de <i>M. communis</i> et <i>M. nivellei</i> .	114
Figure 65	: Développement des racines adventives chez <i>M. communis</i> .	114
Figure 66	: Taux de débourrement des bourgeons chez <i>M. communis</i> et <i>M. nivellei</i> .	115
Figure 67	: Micro-boutures de <i>M. communis</i> (à gauche) et <i>M. nivellei</i> (à droite) en début de dédifférenciation sur le milieu $M_6$ .	116
Figure 68	: Croissance des micro-boutures de <i>M. communis</i> selon la balance hormonale.	117
Figure 69	: Croissance des micro-boutures de <i>M. nivellei</i> selon la balance hormonale.	118
Figure 70	: Vitro-plant à entre-nœuds très courts de <i>M. communis</i> (à gauche) et <i>M. nivellei</i> (à droite).	118
Figure 71	: Allongement des vitro-plants de <i>M. communis</i> (à gauche) et <i>M. nivellei</i> (à droite) après un mois sur milieu $M_2(0,1\text{mg/ml ANA}+1,5\text{ mg/ml BA}+0,05\text{ mg/ml AG}_3)$ .	119
Figure 72	: Effet de $\text{AG}_3$ sur l'allongement moyen des vitro-plants de <i>M. communis</i> et <i>M. nivellei</i> .	120
Figure 73	: Développement de racines sur des vitro-plants de <i>M. communis</i> (à gauche) et <i>M. nivellei</i> (à droite).	120
Figure 74	: Effet de la variation de la concentration en ANA sur l'enracinement des vitro-plants de <i>M. communis</i> et <i>M. nivellei</i> .	121
Figure 75	: Vitro-plant de <i>M. communis</i> (à gauche) et <i>M. nivellei</i> (à droite) dépourvus de racines.	121
Figure 76	: Effet des balances hormonales auxine/cytokinine sur le pourcentage d'induction de callogenèse chez <i>M. communis</i> .	125
Figure 77	: Effet des balances hormonales auxine/cytokinine sur le pourcentage d'induction de callogenèse chez <i>M. nivellei</i> .	125
Figure 78	: Evolution du rendement en HE des feuilles en fonction de la température d'extraction par hydrodistillation.	137
Figure 79	: Evolution du rendement en HE des fruits en fonction de la température d'extraction par hydrodistillation.	137
Figure 80	: Evolution du rendement en HE des feuilles en fonction de la masse végétale de <i>M. communis</i> et <i>M. nivellei</i> .	138
Figure 81	: Evolution du rendement en HE des fruits en fonction de la masse végétale de <i>M. communis</i> et <i>M. nivellei</i> .	138
Figure 82	: Evolution du rendement en HE des feuilles en fonction du temps d'extraction par hydrodistillation de <i>M. communis</i> et <i>M. nivellei</i> .	139

Figure 83	: Evolution du rendement en huiles essentielles des fruits en fonction du temps d'extraction par hydrodistillation de <i>M. communis</i> et <i>M. nivellei</i> .	139
Figure 84	: Spectre UV-visible de l'acide gallique.	153
Figure 85	: Spectre UV-visible de l'extrait méthanolique des feuilles de <i>M. communis</i> (EMFeMC).	154
Figure 86	: Spectre UV-visible de l'extrait méthanolique des feuilles de <i>M. nivellei</i> (EMFeMN)	154
Figure 87	: Spectre UV-visible de l'extrait méthanolique des fruits de <i>M. communis</i> (EMFrMC)	154
Figure 88	: Spectre UV-visible de l'extrait méthanolique des fruits de <i>M. nivellei</i> (EMFrMN)	154
Figure 89	: Spectre UV-visible de l'extrait méthanolique des cals de <i>M. communis</i> (EMCaMC)	154
Figure 90	: Spectre UV-visible de l'extrait méthanolique des cals de <i>M. nivellei</i> (EMCaMN)	154
Figure 91	: Spectre UV-visible de l'extrait éthanolique des feuilles de <i>M. communis</i> (EEFeMC)	155
Figure 92	: Spectre UV-visible de l'extrait éthanolique des feuilles de <i>M. nivellei</i> (EEFeMN)	155
Figure 93	: Spectre UV-visible de l'extrait éthanolique des fruits de <i>M. communis</i> (EEFrMC)	155
Figure 94	: Spectre UV-visible de l'extrait éthanolique des fruits de <i>M. nivellei</i> (EEFrMN)	155
Figure 95	: Concentrations en polyphénols des différents extraits de <i>M. communis</i> et <i>M. nivellei</i> .	157
Figure 96	: Concentrations en flavonoïdes des différents extraits de <i>M. communis</i> et <i>M. nivellei</i> .	158
Figure 97	: Concentrations en flavonols des différents extraits de <i>M. communis</i> et <i>M. nivellei</i> .	159
Figure 98	: Concentrations en tanins des différents extraits de <i>M. communis</i> et <i>M. nivellei</i> .	160
Figure 99	: Concentrations en anthocyanes des différents extraits de <i>M. communis</i> et <i>M. nivellei</i> .	161
Figure 100	: Evaluation du pourcentage de réduction de l'œdème par les HE testées.	168
Figure 101	: Evaluation du pourcentage de réduction de l'œdème par les extraits préparés à partir des concrètes.	169
Figure 102	: Aspect de l'une des crèmes dermiques formulées (0,3%).	173
Figure 103	: Aspect granulométrique de l'une des crèmes formulées.	174
Figure 104	: Courbe représentant l'évolution des moyennes des superficies des plaies traitées /non traitées par le placebo (E1).	178
Figure 105	: Courbe représentant l'évolution des moyennes des superficies des plaies traitées /non traitées par la crème de référence Madecassol® (E2).	178
Figure 106	: Courbe représentant l'évolution des moyennes des superficies des plaies traitées /non traitées par la crème à base de l'HE des feuilles de <i>M. communis</i> (C1)	178
Figure 107	: Courbe représentant l'évolution des moyennes des superficies des plaies traitées /non traitées par la crème à base de l'HE des feuilles de <i>M. nivellei</i> (C2)	178
Figure 108	: Courbe représentant l'évolution des moyenne des superficies des plaies traitées /non traitées par la crème à base de l'HE des fruits de <i>M. communis</i> (C3)	178
Figure 109	: Courbe représentant l'évolution des moyenne des superficies des plaies traitées /non traitées par la crème à base de l'HE des fruits de <i>M. nivellei</i> (C4)	178
Figure 110	: Courbe représentant le pourcentage de réduction des surfaces des plaies traitées chez les lots E1, E2, C1, C2, C3 et C4.	180
Figure 111	: Relation entre l'effet anti-inflammatoire et l'effet cicatrisant.	181
Figure 112	: Effet des trois solvants sélectionnés sur la croissance bactérienne.	181
Figure 113	: Activité des huiles essentielles de <i>M. communis</i> et <i>M. nivellei</i> sur la croissance des différentes souches étudiées (exprimée en diamètre de la zone d'inhibition).	185
Figure 114	: Activité des extraits méthanoliques de <i>M. communis</i> et <i>M. nivellei</i> sur la croissance des différentes souches étudiées (exprimée en diamètre de la zone d'inhibition).	187
Figure 115	: Activité des extraits éthanoliques d <i>M. communis</i> et <i>M. nivellei</i> sur la croissance des différentes souches étudiées (exprimée en diamètre de la zone d'inhibition).	189
Figure 116	: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'acide ascorbique.	194
Figure 117	: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de la quercétine	194

Figure 118	: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l' $\alpha$ -tocophérol.	194
Figure 119	: Pouvoir anti-oxydant exercé par les HE des feuilles et des baies de <i>M. communis</i>	196
Figure 120	: Pouvoir anti-oxydant exercé par les HE des feuilles et des baies de <i>M. nivellei</i>	197
Figure 121	: Variation du pouvoir anti-oxydant des HE en fonction du temps d'incubation.	198
Figure 122	: Pouvoir anti-oxydant exercé par les extraits éthanoliques des feuilles et des baies de <i>M. communis</i> .	199
Figure 123	: Pouvoir anti-oxydant exercé par les extraits éthanoliques des feuilles et des baies de <i>M. nivellei</i> .	200
Figure 124	: Pouvoir anti-oxydant exercé par les extraits méthanoliques des feuilles et des baies de <i>M. communis</i> .	202
Figure 125	: Pouvoir anti-oxydant exercé par les extraits méthanoliques des feuilles et des baies de <i>M. nivellei</i> .	203
Figure 126	: Pouvoir anti-oxydant exercé par les extraits méthanoliques des cals de <i>M. communis</i> (à gauche) et <i>M. nivellei</i> (à droite).	204
Figure 127	: Relation entre la concentration des extraits en polyphénols et l'effet anti-oxydant.	206
Figure 128	: Pouvoir chélateur du fer exercé par les HE et les extraits de <i>M. communis</i> et <i>M. nivellei</i> .	208
Figure 129	: Relation entre les résultats du test DPPH et ceux du test FRAP réalisés sur les HE et les extraits.	209

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	: Activités biologiques de certaines espèces de la famille des <i>Myrtaceae</i> .	5
Tableau 2	: Principaux chémotypes de <i>M. communis</i> selon l'origine géographique.	9
Tableau 3	: Composés phénoliques retrouvés dans l'espèce <i>M. communis</i> .	12
Tableau 4	: Bio-activité de quelques composés des huiles essentielles.	33
Tableau 5	: Coordonnées géographiques du site de récolte de <i>M. nivellei</i>	35
Tableau 6	: Coordonnées géographiques du site de récolte de <i>M. communis</i>	36
Tableau 7	: Les parties récoltées de chaque espèce étudiée	37
Tableau 8	: Mode de désinfection des boutures prélevées <i>in situ</i> .	44
Tableau 9	: Mode de désinfection des graines.	44
Tableau 10	: Combinaisons hormonales des milieux de multiplication.	45
Tableau 11	: Combinaisons hormonales des milieux d'élongation.	46
Tableau 12	: Combinaisons hormonales des milieux d'élongation supplémentés d'acide gibbérellique (AG <sub>3</sub> ).	46
Tableau 13	: Différentes concentrations hormonales des milieux d'enracinement.	46
Tableau 14	: Combinaisons hormonales utilisées pour l'évaluation de la callogenèse	47
Tableau 15	: Conditions opératoire d'analyse des HE par CG/SM.	59
Tableau 16	: Conditions des extractions solide-liquide effectuées.	60
Tableau 17	: Répartition des lots pour l'évaluation de la toxicité aigüe par voie orale des extraits étudiés.	67
Tableau 18	: Classes de toxicité : échelle de Hodge et Sterner.	68
Tableau 19	: Classification des érythèmes et des œdèmes.	69
Tableau 20	: Interprétation des différents types de réponses cutanées.	70
Tableau 21	: Répartition des lots utilisés pour l'évaluation de l'effet anti-inflammatoire.	71
Tableau 22	: Excipients de base des crèmes dermiques.	72
Tableau 23	: Formule adoptée pour la préparation des crèmes.	73
Tableau 24	: Répartition des rats selon les lots ainsi que leurs traitements appropriés.	76
Tableau 25	: Liste des souches microbiennes utilisées.	79
Tableau 26	: Caractéristiques morphologiques et organoleptiques des feuilles étudiées.	86
Tableau 27	: Caractéristiques morphologiques et organoleptiques des fruits étudiées.	89
Tableau 28	: Effet de Ca(ClO) <sub>2</sub> et Na(ClO) <sub>2</sub> sur le taux de contamination des graines de <i>M. communis</i> (MC) et <i>M. nivellei</i> (MN).	109
Tableau 29	: Effet de la balance hormonale BA/ANA sur l'allongement moyen des tiges et le nombre moyen des feuilles chez <i>M. communis</i> .	116
Tableau 30	: Effet de la balance hormonale BA/ANA sur l'allongement moyen des tiges et le nombre moyen des feuilles chez <i>M. nivellei</i> .	117
Tableau 31	: Aspect et couleur des cals obtenus à partir des explants de feuilles.	126
Tableau 32	: Aspect et couleur des cals obtenus à partir des explants d'entre-nœuds.	127
Tableau 33	: Paramètres physico-chimiques des organes étudiés de chaque plante.	128
Tableau 34	: Résultats du Screening phytochimique de <i>M. communis</i> (MC).	131
Tableau 35	: Résultats du Screening phytochimique de <i>M. nivellei</i> (MN).	132
Tableau 36	: Rendement des huiles essentielles étudiées.	134
Tableau 37	: Caractères organoleptiques des huiles essentielles étudiées.	140
Tableau 38	: Densité relative des huiles essentielles étudiées.	141
Tableau 39	: Indices de réfraction (IR) des huiles essentielles étudiées.	142
Tableau 40	: Pouvoir rotatoire des huiles essentielles étudiées.	143
Tableau 41	: Indices d'acide (IA) des huiles essentielles étudiées.	143
Tableau 42	: Indices d'ester (IE) des huiles essentielles étudiées.	144
Tableau 43	: Potentiel hydrogène (pH) des huiles essentielles étudiées.	144
Tableau 44	: Composés majoritaires des HE de <i>M. communis</i> .	146
Tableau 45	: Composition chimique de l'HE des feuilles de <i>M. communis</i> (HEFeMC) par rapport à d'autres références bibliographiques.	147
Tableau 46	: Composition chimique de l'HE des baies de <i>M. communis</i> (HEFrMC) par rapport à d'autres références bibliographiques.	148
Tableau 47	: Composés majoritaires des HE de <i>M. nivellei</i> .	149
Tableau 48	: Rendement, aspect et couleur des extraits obtenus.	152

Tableau 49	: Etalons sélectionnés pour les dosages et leurs longueurs d'ondes.	156
Tableau 50	: Relation entre le taux de mortalité et la dose d'extrait administré.	164
Tableau 51	: Valeurs des IPC pour les HE et les concrètes testés sur des lapins.	165
Tableau 52	: Evaluation de l'effet anti-inflammatoire des HE et des extraits de <i>M. communis</i> et <i>M. nivellei</i> .	167
Tableau 53	: Analyse de variance (comparaison lots traités/lot référence).	172
Tableau 54	: Paramètres physico-chimiques des crèmes formulées.	174
Tableau 55	: Résultats de l'analyse microbiologique des crèmes.	175
Tableau 56	: Evolution des superficies des plaies traitées/non traitées pour les 6 lots testés.	176
Tableau 57	: Effets de la nystatine sur les souches fongiques utilisées.	182
Tableau 58	: Effets de l'Amoxicilline sur les souches bactériennes utilisées.	182
Tableau 59	: Valeurs des CMI des HE et des extraits sur les souches testées sensibles.	190
Tableau 60	: Pouvoir anti-oxydant des HE et des extraits par le test DPPH.	192



## I.1. Historique

Le myrte est connu depuis l'antiquité, dans la mythologie de la Grèce antique, on l'utilisait pour couronner les guerriers glorieux et les vainqueurs aux jeux olympiques, signifiant la pérennité de l'existence (**Knight, 1993**). Le myrte est le symbole de la déesse Venus (**Bianchini et Corbetta, 1975 ; Ferber 2007**).

En Rome antique, le myrte était un arbuste sacré, utilisé pour célébrer les mariages; les jeunes épouses se ceignaient la tête avec ses branches. Ses baies étaient consommées comme plat de dessert. Le myrte est considéré comme le symbole d'amour, de beauté, de pureté et de jeunesse (**Özkan et Güray, 2009**). Bien que le myrte occupait une grande place dans les mythes et les cérémonies religieuses, il n'était pas encore entré dans la pratique médicale (**Bianchini et Corbetta, 1975**).

Les anciens perses vénéraient le myrte dans les cérémonies de sacrifice, ainsi que dans leur vie quotidienne pour la fabrication des parfums, qu'ils utilisaient pour purifier leurs âmes (**Davis, 1982**).

Le myrte a été utilisé dans les rites funéraires, en association avec la menthe et le romarin, pour compenser l'odeur de la décomposition des corps enterrés et faisait également partie des formulations utilisées pour l'embaumement des morts (**Graves, 1955**). De nombreuses références ont rapporté l'usage du myrte dans les anciens textes médicaux égyptiens, comme un remède contre les troubles urinaires, les douleurs, les brûlures d'estomac, l'enflure des membres et l'élimination du mucus de la poitrine. En médecine Copte, on faisait macérer les feuilles du myrte dans l'huile d'olive afin que cette dernière absorbe l'huile parfumée contenue dans les feuilles, cette préparation servait pour traiter certaines maladies de la peau (**Manniche, 1999**), ainsi que pour traiter les piqures d'araignées venimeuses (**Riddle, 1992**).

Cette plante jouissait autrefois d'un grand prestige, elle est le symbole de la paix pour les hébreux (**Abrahams, 2004**), considérée comme l'une des plantes sacrées, les feuilles sont utilisées pour célébrer leurs prières et leurs cérémonies (**Klein et al., 2000**) ainsi que pour commémorer leur départ de l'Égypte (**Özkan et Güray, 2009**).

Une tradition plus commune même chez les musulmans consiste à déposer des brindilles de myrte sur les tombes durant les fêtes religieuses. Ce rituel est commun à la plupart des pays de la mer Egée et de l'Anatolie (**Ertuğ et al., 2004**). Selon la croyance locale, l'action du myrte consiste à réduire les tourments de la personne décédée dans la tombe et proclame une bénédiction sur le Prophète bien-aimé (**Çıblak, 2002; Selçuk, 2004; Çınar 2007**). **Dafni et al. (2006)** ont également rapporté que le myrte est souvent planté dans les cimetières musulmans et juifs.

A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation de cette plante médicinale, afin d'extraire et d'isoler les substances responsables de ses vertus thérapeutiques (**Bonjar et al., 2003 ; Deriu et al., 2007 ; Sepici et al., 2007**).

## I.2. Présentation de la famille des Myrtaceae

Les *Myrtaceae* représentent une grande famille de dicotylédones composée de 5650 espèces réparties en 140 genres, distribués à travers le monde et qu'on retrouve surtout dans les pays chauds (**Govaerts et al., 2008 ; Chabert, 2013**), bien que certains auteurs n'en répertorient que 133 genres (**Oldrich et al., 2005**).

Ce sont des végétaux ligneux (arbustes et grands arbres) souvent producteurs d'huiles aromatiques, ils présentent un large éventail d'habitats notamment dans le bassin méditerranéen, les zones tempérées, sub-tropicales à tropicales, l'Australie, l'Afrique sub-saharienne, Madagascar, les régions tropicales et tempérées d'Asie, et les îles du Pacifique (**Rice-Evans et al., 1996**). Certaines plantes de cette famille sont traditionnellement utilisées pour la conservation des denrées en post-récolte dans les pays en voie de développement (**Ho et al., 1994; Tapandjo et al., 2000**).

Selon **Quezel et Santa (1963)**, les Myrtaceae sont des plantes à feuilles entières, alternes et opposées, à limbe entier et assez souvent coriaces (certaines feuilles sont recouvertes d'une cuticule épaisse). Les fleurs à odeur suave des Myrtaceae sont axillaires et hermaphrodites, elles sont pollinisées par divers insectes, oiseaux ou mammifères.

Chez les genres *Eucalyptus*, *Melaleuca* et *Callistemon*, les étamines sont plus remarquables que les pétales, donnant aux fleurs un aspect de goupillon. Le calice est cupuliforme, les étamines sont très nombreuses, insérées avec les pétales au sommet du tube calycinal. Le gynécée a une position infère à 5 carpelles uniloculaires, à ovules nombreux, et à placentation axiale. Les graines des espèces à fruit charnu sont disséminées par les oiseaux et les mammifères, alors que les espèces à fruits capsulaires ont de petites graines parfois ailées qui sont disséminées par le vent ou par l'eau (**Rice-Evans et al., 1996**).

Les Myrtaceae sont caractérisées par leurs poches sécrétrices d'essences, d'où leur usage condimentaire ou médicinal (**Govaerts et Lucas, 2008**). Ces organes de sécrétion se localisent sous l'épiderme foliaire et dans l'écorce des tiges (**Crété, 1965**). Cependant, cette famille présente la particularité d'avoir du phloème qui est situé au dessus et au dessous du xylème.

- Intérêt biologique de la famille des Myrtaceae

Beaucoup d'espèces de cette famille possèdent des propriétés thérapeutiques et sont utilisées en médecine traditionnelle (tableau 1). De nombreuses espèces de cette famille sont riches en composés phénoliques, en tannins et en flavonoïdes (**Huq et Misra, 1997; Wollenweber et al., 2000**).

Tableau 1: Activités biologiques de certaines espèces de la famille des *Myrtaceae*.

Espèces	Activités biologiques	Références
<i>Cleistocalyx operculatus</i>	Anti-septique Anti-oxydante Anti-microbienne Anti-tumorale	(Chun et al., 2004) (Dung et al., 2009)
<i>Leptospermum polygalifolium</i>	Anti-microbienne	(Kamarul'Ain et al., 2003)
<i>Leptospermum scoparium</i>	Anti-microbienne	(Malcolm et al., 2004)
<i>Psidium guajava</i>	Anti-oxydante Anti-diabetique Anti-allergique Anti-tumorale Anti-inflammatoire	(Rosa et al., 2008)
<i>Syzygium samarangense</i>	Cytotoxique Anti-oxydante	(Mario et al. (2008)
<i>Syzygium aromaticum</i>	Anti-hypertensive Anti-oxydante	(Kim et al., 1998) (Wojdylo et al., 2007)
<i>Syzygium guineense</i>	Anti-oxydante Anti-inflammatoire	(Diallo, 2005)
<i>Eucalyptus saligna</i>	Anti-bacterienne	(Cimanga et al., 2002)
<i>Eucalyptus rostrata</i>	Anti-oxydante	(Hideo et al., 1993)
<i>Eugenia jambolana</i>	Anti-diabetique Anti-lipidemique	(Bhavna et al., 2008)
<i>Myrtus communis</i>	Anti-diabetique Anti-oxydante Anti-microbienne Anti-mutagenique	(Aylin et al., 2004) (Yadergarinia et al., 2006) (Hayder et al., 2008) (Aleksic et Knezevic, 2014)
<i>Psidium acutangulum</i>	Anti-paludique Anti-fongique	(Houël, 2011)

### 1.3. Le genre *Myrtus*

Le genre *Myrtus* comporte deux espèces, il s'agit d'arbustes caractérisés par une huile essentielle très aromatique dans leurs organes aériens. Les pièces florales stériles (pétales et sépales) sont des multiples de cinq, avec un nombre très important d'étamines. Les fleurs sont pollinisées par les insectes et les baies sont de couleur bleu-noirâtre (Bianchini et Corbetta, 1975).

### I.3.1. Systématique du genre *Myrtus*

La classification retenue est celle de l'APG III (2009):

**Règne** : Archeoplastides.

**Clade** : Angiospermes.

**Classe** : Dicotyledones vraies.

**Ordre** : Myrtales.

**Famille** : Myrtaceae.

**Sous-famille** : Myrtoideae.

**Genre** : *Myrtus*.

**Espèce 1** : *Myrtus communis* L.

**Espèce 2** : *Myrtus nivellei* Batt & Trab.

### I.4. Description botanique de *Myrtus communis* L.

#### I.4.1. Nomenclature

Le mot "Myrtus" vient du grec "Myrtos", lui-même dérivé de "Muron" qui signifie parfum, ceci indique que toute la plante est aromatique, *communis* signifie commun (Beniston, 1985). Etymologiquement, l'existence du nom de cette plante dans la langue parlée de différentes cultures lui a fourni plusieurs noms vernaculaires:

Nom latin: *Myrtus communis* (Beloued, 2001).

Nom anglais : myrtle (Özcan et Güray, 2009).

Nom français: Myrte commun (Chabert, 2013), Herbe du lagui (Beloued, 2001).

Nom arabe: Rihan (ريحان), Hadas, Mersin, Henblass, As (اس) (Beloued, 2001).

Nom berbère: Chelmoun, Halmouch. (Beloued, 2001).

Nom tamahaq: Tarihane, Tchlmoun (Somon, 1987).

Nom Person : مورد (Mour) (Özcan et Güray, 2009).

Nom turque : Murt, Mersyne (Özcan et Güray, 2009).

#### I.4.2. Position systématique

Selon Bruna et al. (2007), l'espèce méditerranéenne *Myrtus communis* inclue plusieurs sous-espèces dont il convient de citer :

- *Myrtus communis* ssp. *angustifolia* L.
- *Myrtus communis* ssp. *communis* L.
- *Myrtus communis* ssp. *baetica* L.
- *Myrtus communis* ssp. *tarentina* L.
- *Myrtus communis* ssp. *variegata* L.

Dans le cadre de ce travail nous nous sommes intéressée à l'étude de *Myrtus communis* ssp. *communis* L. étant donné que c'est la seule espèce qui pousse spontanément en Algérie.

#### I.4.3. Origine et répartition géographique

Le myrte est une espèce méditerranéenne (**Sallé, 1991**), elle pousse spontanément dans les maquis, les bois humides, les bords des routes ainsi qu'à proximité du littoral (**Kovacs 1989 ; Cicarelli et al., 2008**).

- Dans le monde: L'espèce *M. communis* pousse dans différentes régions du monde (**Davis, 1982 ; Akgul, 1993 ; Ozek et al., 2000**). On la trouve à l'est de l'Amérique et dans les régions tempérées chaudes de l'hémisphère boréal (**Quezel et Santa, 1963 ; Bonafé, 1979**), son aire de diffusion s'étend de l'Asie jusqu'en Perse (**Bianchini et Corbetta, 1975 ; Bianchini et Azzura, 1975 ; Vicidomini, 2007**). Cette plante rentre dans l'ethno-pharmacopée de nombreux pays méditerranéens dont: l'île de Chypre, l'Éthiopie, l'Iran, l'Irak, l'Italie, le Maroc, la Palestine, la Tunisie, la Turquie et le Yémen (**Salih et Nadir, 1984; Alhindawi et al., 1989; Varisco, 1996 ; Mansouri et al., 2001 ; Bnouham et al., 2002 ; Viegi et al., 2003 ; Bonjar et al., 2004 ; Cakir, 2004 ; Azeizah et al., 2006 ; Della et al., 2006 ; Sepici Dincel et al., 2007 ; Teklehaymanot et Giday, 2007 ; Roddier, 2008**) et le moyen orient (**Özkan et Güray, 2009**).
- En Algérie: *M. communis* habite les forêts de chêne et le Tell littoral algéro-canstantinois (**Poletti, 1982 ; Beloued, 2001**), le mot Tell utilisé désigne le nord de l'Algérie.

#### 1.4.4. Description botanique

L'espèce *M. communis* est un arbuste ramifié, très odorant d'environ 1 à 3 mètres de haut, qui pousse en buisson dense d'un vert brillant. Elle est présente au niveau de l'étage de végétation méso-méditerranéen (**Jeanmonod et Gamisans, 2007**). Sur le plan génétique, elle est constituée de 22 paires de chromosomes (**Valdes et al., 2005**). La plante renferme de nombreuses poches sécrétrices localisées principalement dans les feuilles. Ces dernières sont ovoïdes lancéolées, 2 à 3 fois plus longues que larges (figure 1.A), à nervation pennée persistantes, opposées, à très court pétiole et coriaces (**Bianchini et Corbetta, 1975**).

Les rameaux sont de taille fine et de couleur verte, qui se transforme rapidement en brun orangé, pubescents dans leur jeunesse (figure 1.B) (**Quezel et Santa, 1963; Barboni et al., 2010**). Avec le temps, l'écorce devient grisâtre (**Bartels, 1998**).

Les fleurs apparaissent au début de l'été ; elles ont un diamètre de 10 à 15 mm, solitaires, portées sur de longs pédoncules à l'aisselle des feuilles et très odorantes, elles sont pourvues, à la base, de bractées très petites, rapidement caduques. Chaque fleur renferme une touffe d'étamines (figure 1.D). Le gynécée est constitué d'un ovaire infère (**Somon, 1987; Bartels, 1998**). Les fleurs sont pollinisées par les insectes (**Blakeley, 1959**).

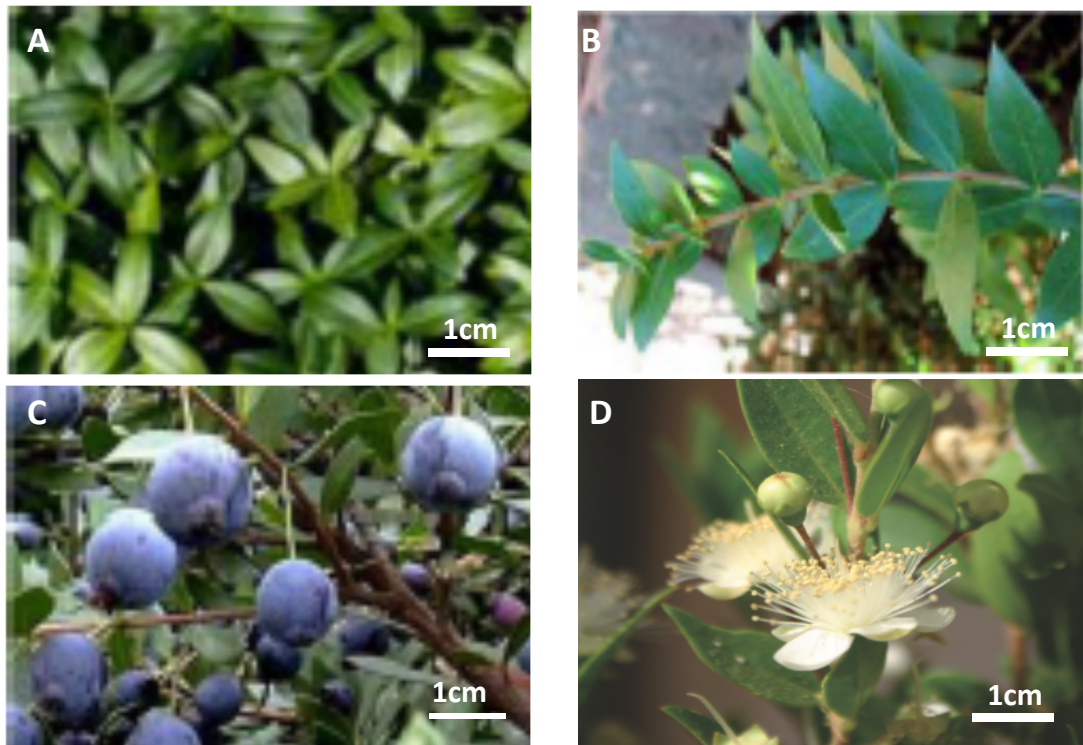


Figure 1 : Différentes partie aériennes de *Myrtus communis* L. (Aleksic et Knezevic, 2014)  
 A- Feuilles, B- Fleurs, C- Fruits bleu-noirâtres, D- Rameau feuillé.

Les fruits sont des baies ovoïdes de 6 à 8 mm de diamètre, noires bleuâtres à peau charnue, conservant à leur partie supérieure les restes du calice (figure 1.C). Ils sont comestibles mais âpres et astringents, leur pleine maturité est atteinte en automne (Compbell, 1968 ; Bianchini et Corbetta, 1975; Boukef, 1986).

Les graines sont réniformes de couleur jaune, leur nombre est de 3 à 8 par baie (Somon, 1987; Bartels, 1998). Elles sont disséminées par les merles (Herera, 1984), les mammifères (Aronne et Russo, 1997) et les fourmis (Aronne et Wilcock, 1994; Özkan et Güray, 2009).

#### 1.4.5. Ecologie et régénération

Le myrte pousse en plein soleil ou en mi-ombre et préfère un sol argilo-siliceux. Il résiste au gel jusqu'à  $-10^{\circ}\text{C}$  et s'adapte très bien aux conditions d'aridité, pouvant tolérer des températures avoisinant  $45^{\circ}\text{C}$ . En raison de sa localisation géographique, elle bénéficie d'une humidité importante tout au long de l'année (Ramdani, 1994).

La multiplication du myrte se fait, soit par bouturage en juin avec des rameaux semi-lignifiés (Belot, 1987), soit par marcottage en début d'automne, ou alors par semis en septembre. La plante fleurie de juin à août et sa floraison peut se prolonger jusqu'au mois d'octobre (Bianchini et Azzura, 1975; Diaz et Abeger, 1987; Taylor, 1993). La récolte des fruits commence à partir du mois de novembre et s'étale tout au long de l'hiver (Davis, 1982).

Cependant, les feuilles sont récoltées selon le besoin tout au long de l'année (**Ramdani, 1994**). Pour l'entretenir, il suffit de le tailler au mois de Mai (**Bianchini et Azzura, 1975**).

Le myrte est traditionnellement propagé à partir des graines (**Khosh-Khui et Bassiri, 1976**) et des boutures (**Holcomb et Michalas, 1992**). Cependant, la première dépend de la viabilité des graines et la deuxième peut disséminer les maladies. Ces problèmes peuvent être résolus par les méthodes de multiplication *in vitro* qui permettent d'accentuer le cycle de reproduction et d'obtenir des clones indemnes de virus (**Buccon-Gibod, 1989**).

#### I.4.6. Composition chimique

##### I.4.6.1. Les composés volatils

Plusieurs auteurs se sont intéressés à l'étude de la composition chimique des huiles essentielles (HE) de *M. communis*, qui s'est avérée très riche en monoterpènes oxygénés surtout en période estivale (eucalyptol, myrténol et  $\alpha$ -pinène) (**Bradesi et al., 1997; Porter, 2001**).

Cependant, plusieurs facteurs environnementaux comme l'ensoleillement, la nature du sol, la période de récolte, l'origine géographique et le climat sont responsables de l'apparition de chémotypes différents (Tableau 2), avec des réponses thérapeutiques spécifiques.

Tableau 2: Principaux chémotypes de *M. communis* selon l'origine géographique

Composés majoritaires	Origine	Parties utilisées	Références
Alpha pinène/Limonène	Italie	Feuilles	<b>Flamini et al. (2004)</b>
Acétate de myrtenyl/Alpha pinène	Grèce Maroc Croatie	Rameaux feuillés	<b>Jerkovic et al. (2002)</b> <b>Farah et al. (2006)</b> <b>Gardeli et al. (2008)</b>
Alpha pinène/Limonène	Iran Grèce Italie Sardaigne	Feuilles	<b>Koukos et al. (2001)</b> <b>Rapparini et al. (2005)</b> <b>Yadegarinia et al. (2006)</b> <b>Dell'Agli et al. (2012)</b>
Eucalyptol/Alpha pinène	Tunisie Iran	Feuilles	<b>Messaoud et al. (2005)</b> <b>Brada et al (2012)</b>
Limonène/Alpha pinène	Turquie Tunisie Suède	Feuilles	<b>Agkul et Bayrak (1989)</b> <b>Shikhiev et al. (1989)</b> <b>Messaoud et al. (2005)</b>
Cineole/Hexanal	Turquie	Baies	<b>Kefkas et al., (2013)</b>

La grande majorité de recherches effectuées concernent l'analyse des HE obtenues par hydrodistillation à partir des feuilles.

En **1978**, **Lawrence** a établi, pour la première fois, une composition riche en monoterpènes avec l' $\alpha$ -pinène et l'eucalyptol comme composés majoritaires de l'HE.

Cependant, deux principaux chemotypes ont été distingués, ultérieurement, sur la base de la présence ou non d'acétate de myrtényle :

- le premier groupe, caractérisé par des teneurs importantes en  $\alpha$ -pinène (8-36%) et en acétate de myrtényle (9-36%), comprend les HE du Maroc (**Gauthier, 1988; Garry et Chalchat, 1992**), du Portugal [**Boelens et Jimenez, 1991**], de France continentale (**Gauthier, 1989**), d'Albanie (**Boelens et Jimenez, 1991**), de Yougoslavie (**Garry et Chalchat, 1992**), d'Espagne (**Boelens et Jimenez, 1992**) et de Grèce (**Gardeli et al., 2008**).

- le second groupe, marqué par de fortes abondances en eucalyptol (20-40%) et en  $\alpha$ -pinène (20-45%), il rassemble les HE d'Iran (**Weyerstahl et al., 1994**) et du Liban (**Garry et Chalchat, 1992**). Au sein de ce groupe, on trouve également les HE de Tunisie (**Aidi-Wannes et al., 2010**), de Sardaigne (**Tateo et Picci, 1982**) et de Corse (**Bradesi et al., 1997**) qui se caractérisent par des taux élevés en  $\alpha$ -pinène (50-60%) et des teneurs plus faibles en eucalyptol (20-30%).

Cependant, certaines HE du Maroc et de France (**Gauthier, 1988**), rattachées au premier groupe, ont présenté des taux élevés en terpinène-4-ol (8-10%). De façon analogue, certaines HE d'Espagne (**Boelens et Jimenez, 1992**), ont montré une abondance particulièrement marquée en acétate de myrtényle (35%) et une proportion relativement faible en  $\alpha$ -pinène (8%). Cependant, **Garry et Chalchat (1992)** ont rapporté que les HE de Grèce se singularisent de celles d'autres provenances, par une quantité appréciable en linalool (10%) et en limonène (15%).

S'agissant plus spécifiquement de la composition de l'HE de Corse, **Bradesi et al. (1997)** ont rapporté qu'elle est constituée de 18 composés dont les majoritaires sont l' $\alpha$ -pinène (54,3%), l'eucalyptol (24,7%), le limonène (5,3%), l'acétate de géranyle (1,5%) et l' $\alpha$ -terpinéol (1,3%). En outre, la composition chimique s'est révélée relativement stable au cours de leur cycle végétatif de juin à novembre.

En ce qui concerne les baies de *M. communis*, la bibliographie sur la composition volatile est nettement moins abondante. La première étude a été réalisée par **Mazza (1983)** à partir de fruits d'origine Italienne. L'auteur a identifié et quantifié, par CG/DIF et CG/SM, 16 terpènes hydrocarbonés et 38 composés oxygénés (terpéniques ou non). Les composés hydrocarbonés majoritaires sont l' $\alpha$ -pinène (77,1 mg/kg), le limonène (18,4 mg/kg), le  $p$ -cymène (5,7 mg/kg), le  $p$ -3-carène (3,9 mg/kg) et le  $\gamma$ -terpinène (3,6 mg/kg). Les constituants oxygénés les plus abondants sont l'eucalyptol (69,3 mg/kg), l' $\alpha$ -terpinéol (8,3 mg/kg) et le linalool (6,0 mg/kg).

**Flamini et al. (2004)** ont étudié la fraction volatile des baies récoltées dans deux stations Italiennes. Les analyses également réalisées par CG/DIF et CG/SM ont permis d'identifier l' $\alpha$ -pinène (47,2% et 24,7%), l'eucalyptol (14,6% et 8,0%), le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène (7,9% et 14,4%) et le  $\beta$ -élémyène (17,2%) comme composés majoritaires.



**Tuberoso et al. (2006)** ont étudié la composition volatile des HE extraites à partir des baies issues de dix stations, réparties sur l'ensemble de la Sardaigne. En premier lieu, ils ont constaté que les profils chromatographiques obtenus après extraction par hydrodistillation sont qualitativement similaires. Ensuite, en fonction de la localisation des échantillons, ils ont observé de fortes variations des abondances pour les composés majoritaires: limonène (3,7-44,5%),  $\alpha$ -pinène (18,2-38,9%), eucalyptol (5,8-24,8%) et  $p$ -cymène (0,1-10,3%).

**Aidi-Wannes et al. (2009)** ont réalisé un suivi de la composition chimique de l'HE de baies de myrte de Tunisie en fonction du stade végétatif. Ils ont identifié 47 composés, et ont noté que les composés majoritaires sont : l'eucalyptol (7,3-41,0%), l'acétate de géranyle (1,8-20,5%), le linalool (0,7-18,9%) et l' $\alpha$ -pinène (1,2-12,6%) avec de fortes variations de leur teneur en fonction de la date de récolte. En Août, l'HE est dominée par l'acétate de géranyle (20,5%), l' $\alpha$ -pinène (12,6%) et le  $\beta$ -caryophyllène (10,8%). Les teneurs de ces trois composés diminuent au fil des mois pour atteindre en janvier: 2,1%, 1,2% et 1,0%, respectivement. A l'inverse, les teneurs de l'eucalyptol et du linalool augmentent d'Août (7,3% et 0,7%, respectivement) à Janvier (34,6% et 9,5%, respectivement).

#### 1.4.6.2. Les composés phénoliques

Le myrte contient un faible taux en acides phénoliques (acide gallique, ellagique et caféique) alors que les flavonoïdes (quercétine, catéchine et myricétine) et les tanins sont détectés en grandes quantités (**Umedavi et al., 1988; Baytop, 1999; Romani et al., 1999; Romani et al., 2004; Alamani et Cossu, 2004; Aydin et Ozcan, 2007**). La teneur la plus élevée en polyphénols a été observée en période de pleine floraison (**Gardeli et al., 2008**).

Les premières études sur les composés phénoliques ont été réalisées en **1967** par **El-Sissi et El-Ansary**, qui se sont intéressés à l'analyse des flavonoïdes contenus dans les feuilles.

En **1987**, **Diaz et Abeger** ont analysé les composés phénoliques, principalement les flavonoïdes et les acides phénoliques contenus dans les graines des baies du myrte d'Espagne. L'analyse par spectrophotométrie UV-VIS des extraits a permis l'identification de la quercétine, la patulétine, les acides ellagique et gallique.

Les travaux de **Martin et al. (1999)** sur les composés polyphénoliques du péricarpe du fruit du myrte ont indiqué qu'il est riche en myricétine, en hespéridine et en esculine.

**Romani et al. (1999)** ont étudié la composition des polyphénols dans les extraits éthanoliques préparés à partir des feuilles du myrte.

**Montoro et al. (2006)** ont travaillé sur la stabilité et l'activité anti-oxydante des polyphénols extraits des baies du myrte pour la préparation des liqueurs en Sardaigne et en Italie. Ils ont utilisé différentes techniques pour l'identification (RMN et LC/MS/MS) et la quantification des anthocyanes présents dans les baies du myrte (HPLC/UV-VIS).

**Gardeli et al. (2008)** ont réalisé l'extraction par macération au méthanol de feuilles de myrte d'origine grecque à trois périodes de l'année (Février, Mai et Août). Ils ont constaté que la concentration massique en phénols totaux varie au cours du cycle végétatif, passant de 307 mg/g de plante en Février, à 352 mg/g en Mai et à 373 mg/g en Août.

En réalisant une extraction de feuilles de myrte par un mélange eau/acétone (30:70), puis quatre extractions successives (n-hexane, acétate d'éthyle, n-butanol et eau) de cette solution, **Yoshimura et al. (2008)** ont signalé pour la première fois la présence d'oenoteheine B, d'eugeniflorine D2, de tellimagrandine I, de tellimagrandine II et de myricétine-3-O-Dxylosidedans.

Les travaux de **Aidi-Wannes et al. (2010)** sur l'analyse des composés phénoliques du myrte par HPLC ont permis d'identifier 10 composés, parmi lesquels quatre tanins hydrolysables (oenothéin B, eugeniflorin, D2-tellimagrandins I et tellimagrandins), 2 acides phénoliques (acide gallique et acide quinique 3,5-di-O-gallate) et 4 myricétine-glycosides (myricétine 3-O-b-D-xyloside, myricétine 3-O-b-D galactoside, myricétine 3-O-b-D-galactoside 6-O-gallate et myricétine 3-O-a-L-rhamnoside).

**Tuberoso et al. (2010)** ont étudié la composition chimique d'extraits obtenus par macération des baies de Sardaigne dans trois solvants : éthanol, eau et acétate d'éthyle. L'éthanol permet l'extraction d'une plus grande quantité de matière sèche (99,0 g/l), suivi par l'eau (86,3 g/l), puis par l'acétate d'éthyle (12,8 g/l). D'autres travaux, ciblant la recherche des composés phénoliques de cette plante, se sont intéressés au fractionnement et à l'identification des flavonoïdes et des acides phénoliques (tableau 3).

Tableau 3 : Composés phénoliques retrouvés dans l'espèce *M. communis*.

Composés phénoliques	Organe	Références
Flavonoïdes Anthocyanes Proanthocyanidines	Feuilles Fruits	<b>Fine (2000)</b> <b>Okuda (2005)</b> <b>Montoro et al. (2006)</b>
Anthocyanines	Fruits	<b>Serio et al. (2014)</b>
Acides phénoliques (Ac. Gallique, Ac. Caféique, Ac. Vanillique, Ac. Ferulique)	Feuilles Fleurs Fruits	<b>Othman et al. (2007)</b> <b>Shan et al. (2007)</b>
Flavonols	Feuilles Fruits	<b>Harborne et Williams (2000)</b>

#### 1.4.6.3. Les minéraux

Selon **Ozkan et Akbulut (2007)**, le myrte est riche en nitrates avec un très faible taux en nitrites, ce même travail a révélé la présence de 18 minéraux avec des teneurs notables en Aluminium, en Bore, en Fer, en Manganèse et en Zinc.

#### I.4.6.4. Les acides gras

Selon **Cakir (2004)**, le mésocarpe des fruits du myrte est riche en acide oléique (72,1%), linoléique (8,7%) et palmitique (15,7%), la quantité des acides gras saturés est plus faible que celle des acides gras poly-insaturés, dont la carence peut provoquer de sérieux problèmes dermiques (**Poelman, 1937**). La richesse de ses graines en lipides (acides gras poly-insaturés) leur ouvre de larges perspectives dans le domaine de la cosmétologie (**Albasini et Bertilli, 1999**).

#### I.4.6.5. Autres

Les feuilles contiennent de l'acide ascorbique (vitamine C) en faibles teneurs, ainsi que des substances résineuses et des acides organiques, comme l'acide malique et l'acide citrique (**Paris et Moyses, 1967**).

#### I.4.7. Propriétés thérapeutiques

- Propriétés digestives et anti-spasmodiques

Toutes les parties du myrte présentent des propriétés stomachiques (**Boukef, 1986 ; Beloued, 2001 ; Oulmouhoub, 2005**). Cette plante a le pouvoir de contracter les tissus (**Boullard, 2001**).

- Propriétés anti-septiques et anti-microbiennes

Ces deux propriétés sont dues à la présence des terpènes (cinéole, myrténol,  $\alpha$ -pinène, limonène) et des phloroglucinols complexes, qui auraient le même effet que la pénicilline et la streptomycine sur les bactéries Gram+ (**Kashman et al., 1974 ; Bezenger, 1980, Yadegarinia et al., 2006**). Ces constituants justifient l'utilisation du myrte dans les affections de la sphère bronco-pulmonaire et des voies urinaires (**Bezenger, 1980 ; Porter, 2001; Oulmouhoub, 2005**). Il est préconisé en gargarisme pour traiter les aphtes et les gingivites, généralement d'origine fongique (**Boukef, 1986; Bharate et al., 2007; Azad-Ehyae et al., 2010**). Les myrtucomulones et la quercétine des feuilles du myrte montrent une forte action anti-virale contre trois taxons de virus dont: les Retroviridae (**Spedding et al., 1989**), les Picornaviridae (**Veckenstedt et Pusztai, 1981**) et les Herpesviridae (**Ohnishi et Bennai, 1993**).

- Propriétés astringentes, tonifiantes et stimulantes

Le myrte est très riche en tanins, auxquels il doit son action astringente (**Bezenger, 1980**). Il a le pouvoir de tonifier les tissus (**Sallé, 1991**). C'est un immuno-stimulant, il augmente le taux des leucocytes et stimule la fabrication des plaquettes (**Alves, 2002**).

- Propriétés anti-parasitaires

La toxicité du myrte sur de nombreux parasites a été démontrée par de nombreux travaux contre: *Plasmodium falciparum* (**Verotta et Appendino, 2005 ; Torre Mendoza, 2006 ; Dell'Agli et al., 2012**), *Trichomonas vaginalis* (**Azadbakht et al., 2003**) et *Leishmania donovani* (**Bharate et al., 2007**). Cette plante possède également des propriétés:

- Anti-helminthique: réputée contre *Peduculus humanus* (Pediculidae) (**Gauthier, 1989**), *Meloidogyne javanica* (Tylenchidae) (**Oka et al., 2000**), *Culex pipiens* (Culicidae) (**Traboulsi et al., 2002**).
- Insecticide: l'HE de *M. communis* a présenté une excellente activité insecticide contre *Ephesta kuehniella*, *Plodia interpunctella*, *Acanthoscelides obtectus*, *Anophales gambiae* et *Pediculus humanis capitis* (**Ayvaz et al., 2010; Milhau et al., 1997; Dell-Agli et al., 2012**). Les recherches menées par **Bardeau (1978)** sur le pouvoir insecticide de l'HE du myrte sur les cafards, ont montré que la fraction de distillation la plus active est l'eucalyptol.
- Anti-mollucide: les extraits hydro-alcooliques des feuilles de myrte ont un effet remarquable contre *Biomphalaria glabrata* (**Deruaz et Raynaud, 1993**).
- Autres propriétés

Le myrte est très connu pour ses propriétés anti-radicalaires et anti-génotoxiques (**Hayder et al., 2003; Romani et al., 2004; Gardeli et al., 2008; Aidi-Wannes et al., 2010 ; Tuberoso et al., 2010**), en plus de son pouvoir anti-trombotique (**Harborne et Williams, 2000**), anti-hyperglycémiant (**Elfellah et al., 1984 ; Travset et al., 2001 ; Yesilada, 2002, Sepici et al., 2004; Onal et al., 2005 ; Fahim et al., 2009**), analgésique (**Twaij et al., 1989**), hypo-cholestérolémiant (**Rosa et al., 2003; Sepici et al., 2004**) et anti-inflammatoire (**Feisst et al., 2005; Montoro et al., 2006, Rossi et al., 2009**) et anti-mutagenique (**Hayder et al., 2008; Mimica-Dukić, 2010**).

Sur le plan écologique, **Moreno-Jimenez et al. (2008)**, ont rapporté que le myrte est bénéfique dans la dépollution et la revégétation des sols contaminés par l'arsenic.

Cet arbuste est caractérisé par une teneur élevée en composés phénoliques, son usage comme additif au foin dans l'élevage des ruminants, protège contre la perte de leurs poids durant la saison sèche, surtout s'il est associé au propylène glycol, qui augmente sa valeur nutritive et facilite sa digestibilité (**Guasmi-Boubaker et al., 2006**).

#### 1.4.8. Usages en médecine traditionnelle

Les organes de cette plante sont utilisés comme remède populaire, pour combattre de nombreuses maladies, selon le mode d'administration:

- Usage interne

La plante entière est utilisée en infusion ou en décoction contre les infections urinaires et vaginales (**Sallé, 1991**), elle est également recommandée contre les maladies des voies respiratoires, l'otite, la diarrhée ainsi que les hémorroïdes (**Maccioni et al., 1995; Marchini et Maccioni, 2004**).

- Les feuilles en décoction sont utiles pour traiter les troubles gastriques, c'est un excellent hémostatique, anti-septique, laxatif et anti-malariale (**Duke, 1988; Twaij et al., 1989 ; Ogur, 1994; Chalchat et al., 1998; Benigni et al., 2004; Gortzi et al., 2008; Messaoud et al., 2012**)-

Les tiges sont très utiles contre les troubles intestinaux et urinaires, elles sont également prescrites pour soulager les peaux lésées par l'eczéma et le psoriasis **(Ziyat et al., 1997)**

- Les fleurs en décoction sont utiles contre les affections hépatiques **(Beloued, 2001)** et pour traiter les veines variqueuses **(Oulmouhoub, 2005)**.

- Les fruits sont soit consommés frais ou séchés pour fortifier le cœur, soit préparés en infusion comme hypo-glycémiant **(Baba Aissa, 1999; Mimica-Dukic et al., 2010)**. Ils sont utilisés contre la variole et la diarrhée **(Oulmouhoub, 2005)**. Le décocté des baies est préconisé pour soulager l'ulcère ainsi que les douleurs gastriques **(Hammiche et Maiza, 2006)**

- Usage externe

Les feuilles et les fruits en décoction sont utiles en gargarisme désinfectant, en compresse sur les plaies suppurantes et les blessures, ainsi que les affections cutanées en raison de leur action anti-septique et hémostatique **(Bianchini et Corbetta, 1975 ; Beloued, 2001)**. Les feuilles broyées sont employées dans le traitement des cheveux en association avec le henné pour les noircir et contre les piqûres des scorpions **(Riddle, 1992)**. L'HE est utilisée en inhalation et en massage des plexus, elle est très bien tolérée par la peau **(Sallé, 1991; Alves, 2002)**.

- Autres usages

En raison de ses propriétés balsamiques et sa qualité aromatique, le myrte commun a trouvé de multiples applications dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques et agro-alimentaires **(Baytop, 1999; Serce et al., 2010 ; Messaoud et al., 2012)**. Dans certaines régions méditerranéennes, la macération des baies dans l'alcool est utilisée pour la préparation de liqueurs et de vins, ou pour confectionner des eaux de vie **(Agkul et Bayrak, 1989; Boelens et Jimenez, 1992; Chelchat et al., 1998 ; Ozek et al., 2000; Aydin et Ozcan, 2007 ; Barboni et al., 2010)**.

Les baies séchées peuvent également servir à agrémenter certains plats cuisinés comme substituant du poivre. Les feuilles peuvent servir à aromatiser les préparations de viandes en sauce ou à parfumer les grillades **(Canhoto et al., 1998)**.

En Russie, les tiges et les racines du myrte sont utilisées pour tanner le cuir. Cependant, les feuilles et les fruits de cette plante sont utilisés pour teinter les fibres de laine, destinée au tissage des tapis et des moquettes dans plusieurs régions en Anatolie **(Yilmaz et Karakuş, 1991)**.

## 1.5. Description botanique de *Myrtus nivellei* Batt & Trab.

### 1.5.1. Nomenclature

*Myrtus nivellei* Batt & Trab est une plante endémique du Sahara central, appartenant à la famille des Myrtaceae **(Ozenda, 1977)**.

Le nom du genre *Myrtus* vient du grec "*Myrtos*" qui signifie parfum, alors que le nom de l'espèce dérive du nom d'un lieutenant français appelé Nivelles, cette espèce fut décrite en 1911 par Battandier et Trabut. Plusieurs noms vernaculaires lui ont été attribués dont:

Nom tamahaq : *Tafaltast* ou *Tefaltast* (Kossman, 2005), *Tafiltast* (Mondelino, 2006).

Nom français : *Myrte de nivelles*, *Myrte du sahara* (Quezel et Santa, 1963).

Nom anglais: *Sahara myrtle* (Migliore et al., 2012).

Nom arabe : ریحان الصحراء الوسطی (Bouzabata et al., 2013).

### 1.5.2. Position systématique

Selon Quezel (1958), l'espèce *Myrtus nivelles* Batt & Trab comporte deux sous-espèces :

- *M. nivelles* ssp. *nivelles* : endémique de l'Ahagar et du Tassili algérien
- *M. nivelles* ssp. *tibesticus* : endémique du Tibesti chadien

Dans le cadre de ce travail nous nous sommes intéressée à l'étude de l'espèce endémique algérienne uniquement.

### 1.5.3. Origine et répartition géographique

*Myrtus nivelles* Batt & Trab. est une plante saharo-endémique, restreinte aux montagnes du Tassili n'Ajjer (figure 4), Tassili n'Immidir, Tefedest et des massifs de l'Ahaggar, où elle couvre des zones très réduites, caractérisées par une pluviométrie qui varie entre 50 et 100 mm par an (Quezel, 1958; Dubief, 1959 ; Iredde, 1957). Sa présence, aussi restreinte qu'elle soit, a fait preuve d'une remarquable capacité de survie, face aux changements climatiques successifs.

Cousin du myrte commun de la méditerranée, le myrte de Nivelles subsiste depuis un million d'années en plein cœur du Sahara central. Grâce aux travaux de l'Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie Marine (IMBEM-Marseille), on en sait plus actuellement sur la façon dont cette plante a fait face à la succession d'épisodes climatiques humides, puis arides qui ont marqué l'histoire de la région du Sahara (Migliore et al., 2013).

Les populations actuelles sont très variables en taille, allant de moins de dix à plusieurs centaines d'individus. Les buissons de cette espèce sont toujours localisés à proximité des oueds sablonneux rocheux (les lits ou les vallées des cours d'eau qui sont généralement secs, sauf pendant les pluies occasionnelles) ou des points d'eau permanents, à près de 1400 à 2500 m d'altitude, où se développent une belle végétation ligneuse comprenant: *Nerium oleander*, *Pistacia atlantica*, *Lavandula antinea* et quelques fougères (Quezel, 1954 ; Bulletin de la société préhistorique française, 1963; Hammiche et Maiza, 2006; Migliore et al., 2012).

Cette espèce est listée parmi les espèces en voie de disparition (décret exécutif N°93-285 du 23/11/1993 fixant la liste des espèces végétales non cultivées protégées en Algérie – **Code de l'environnement, 2002**).

L'histoire du genre *Myrtus* s'explique par deux périodes de diversification liées aux changements environnementaux survenus à la transition Miocène / Pliocène (vers 6,7 Millions d'années) et au cours du Pléistocène (depuis 2,7 Millions d'années). De nombreux mouvements ont eu lieu tout autour de la Méditerranée et notamment une descente dans le désert au début du Pléistocène. En fonction des conditions climatiques qui y régnaient, le Sahara a en effet constitué une barrière à la migration durant les phases arides, mais aussi un territoire d'échanges et de contacts des flores lors des épisodes pluviaux du Pléistocène, à l'époque du fameux « Sahara vert », avec l'ouverture de corridors biologiques vers le sud (**Migliore et al., 2012**).

Arrivée il y a un million d'années des rives méditerranéennes, à la faveur d'un des nombreux épisodes humides qui ont jalonné l'histoire de ce désert, le myrte de Nivelles survit depuis, dans ces forteresses de pierres séparées de plusieurs kilomètres. Pour percer le secret de cette longévité, des chercheurs de l'Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale (CNRS/Avignon) se sont livrés à une vaste étude qui a analysé les conséquences génétiques de la fragmentation et de l'isolement des populations de myrte, réfugiées dans les massifs du Sahara central lors de l'aridification du désert depuis 5000 ans (**Migliore et al., 2013**).

#### I.5.4. Description botanique

*Myrtus nivelles* est un arbuste de 0,5 à 2 mètres de hauteur (figure 2), poussant spontanément. Il s'adapte très bien à la sécheresse, pouvant tolérer des températures estivales avoisinant 48°C. Cette plante est morphologiquement similaire à l'espèce méditerranéenne *Myrtus communis*, mais possède des feuilles plus linéaires (**Battendier et Trabut, 1911**). Le fruit est une petite baie globuleuse de couleur bleu-noire, de 1cm de diamètre. Ses fleurs blanches sont pollinisées par les insectes et ses graines sont disséminées par les animaux (**Migliore et al., 2013**). Elle a été signalée par plusieurs botanistes comme plante ayant la capacité de fleurir à différents moments de l'année, probablement en réponse à l'irrégularité des pluies.

- Les tiges: Elles sont ramifiées, ligneuses, à écorce rougeâtre (**Ozenda, 1977**).
- Les feuilles: Elles sont opposées, lancéolées et sessiles (figure 2) comportant des glandes oléifères minuscules sur les deux faces, responsables de la sécrétion d'une HE insectifuge (**Cloudsley, 1954; Ozenda, 1977**).
- Les fleurs: Elles sont blanches, isolées à l'aisselle des feuilles, chaque fleur est constituée par un ovaire infère, surmonté de cinq dents courtes, de cinq pétales blanches et de nombreuses étamines, et un style long et fin (**Battendier et Trabut, 1911 ; Ozenda, 1977**). Elles sont pollinisées par les insectes (**Trabut, 1955**).

- Les fruits: Les fruits sont des petites baies globuleuses, de couleur bleu-noire (Ozenda, 1977; Migliore et al., 2013), dont la taille est plus petite en comparaison avec les fruits de *M. communis*.



Figure 2 : Rameau feuillé et fructifère de *M. nivellei* (Photo originale, 2012).

#### 1.5.5. Composition chimique

Suite à la recherche bibliographique effectuée, très peu de travaux se sont focalisés sur la mise en évidence de la composition chimique de cette espèce endémique.

##### 1.5.5.1. Composés volatiles

**Bouzabata et al. (2013)** ont rapporté que les HE du Myrte de Nivelles algérien, extraites par hydrodistillation, ont présenté des rendements allant de 1,4 à 2%, ces dernières se sont montrées particulièrement riches en eucalyptol (37,5%) et en limonène (25%).

##### 1.5.5.2. Composés phénoliques

**Rached et al. (2010)** ont rapporté que les feuilles de l'espèce *M. nivellei* sont riches en phénols totaux ( $242,68 \pm 9,79$  mg eq acide gallique/g d'extrait sec) et en flavonoïdes ( $28,53 \pm 4,51$  mg eq catechine/g d'extrait sec).

#### 1.5.6. Propriétés thérapeutiques

Très peu nombreux sont les travaux de recherches qui se sont intéressés à l'étude des propriétés thérapeutiques de l'espèce saharo-endémique *M. nivellei*.

- Propriétés anti-oxydantes

**Rached et al. (2010)** ont démontré que les extraits alcooliques de *M. nivellei* expriment un excellent effet réducteur des radicaux libres par le test DPPH ( $EC_{50} = 4,90 \pm 0,52$  µg/ml), ils ont attribué cette action au taux relativement élevé des composés phénoliques contenus dans ces extraits ( $242,68 \pm 9,79$  mg acide gallique/g d'extrait sec).



Dans ce même contexte, les analyses spectrophotométriques effectuées par **Touaibia et Chaouch (2014b)**, ont démontré que les extraits aqueux, méthanolique et éthanolique de cette plante récoltée *in situ* se sont avérés riches en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en flavonols. Ils expriment un excellent pouvoir de capture des radicaux libres ( $EC_{50}$  égale à 0,71 ; 0,98 et 0,59mg/ml), mais qui demeurent inférieurs à celui de l'acide ascorbique ( $EC_{50}=0,39$ mg/ml).

- Autres propriétés

D'après les travaux de **Bouzabata et al. (2013)**, l'HE de *M.nivellei* ne présente aucune cyto-toxicité sur les keratinocytes, suite à une application topique, elle exerce également une excellente activité antifongique contre *Cryptococcus neoformans* (CMI =0,16 µg/ml), ce qui explique son usage par les nomades touaregs comme traitement pour de nombreuses dermatophytoses.

#### I.5.7. Utilisation en médecine traditionnelle

*Myrtus nivellei* est très réputée au sud algérien pour ses vertus thérapeutiques en médecine populaire (**Travaux, 1954 ; Ozenda, 1977**). D'après l'enquête ethnobotanique effectuée par **Hammiche et Maiza (2006)** avec les populations nomades, l'infusé des feuilles est utilisé en usage interne contre la fièvre, le mal de gorge, le diabète, les troubles gastro-intestinaux, les mycoses ainsi que les problèmes hépatiques. Cependant, les baies très sucrées sont consommées soit fraîches ou bien séchées, pour traiter les aphtes de la sphère bucco-dentaire.

Les feuilles sont utilisées en usage externe pour traiter les dermatoses, et comme produit de beauté en macération dans du beurre fondu. Cette préparation (brillantine) est nécessaire à la coiffure des femmes et parfume agréablement le corps (**Wichens, 1998**). Elles sont utilisées également comme épice et aromatisant du thé (**Maiza, 2008**).

Les touaregs l'utilisent aussi comme ressource pastorale pour la faune domestique, comme aromate ou condiment culinaire, et parfois même comme matériaux de l'artisanat et de l'habitat, au même titre que l'acacias, l'olivier et bien d'autres espèces encore, ainsi que pour teinter les peaux d'animaux destinées à la fabrication des sacs et des ceintures.

#### I.6. Composés du métabolisme des plantes

Tous les êtres vivants ont un métabolisme primaire qui fournit les molécules de base (acides nucléiques, lipides, protéines, acides aminés et glucides). Les plantes produisent, en plus, un grand nombre de composés qui ne sont pas formés directement lors de la photosynthèse, mais résultent des réactions chimiques ultérieures. Ces composés sont appelés métabolites secondaires, dont la plupart sont utilisés dans la formulation de médicaments (**Cuendet, 1999, Kansole, 2009**).

### I.6.1. Définition et fonctions des métabolites secondaires

Le métabolisme secondaire désigne un métabolisme dont la distribution taxonomique serait restreinte exclusivement au fonctionnement cellulaire ou au développement des plantes (**Gravot, 2008**).

Les métabolites secondaires sont vitaux pour l'organisme. Ces molécules furent sélectionnées au cours de l'évolution pour l'interaction qu'elles ont avec un récepteur d'un autre organisme. Elles représentent donc une grande source potentielle d'agents thérapeutiques (**Thomas, 2009**).

Les principales fonctions attribuées à ces composés, chez les végétaux sont la protection contre les pathogènes et les herbivores, ainsi que la limitation des dommages dûs aux radiations UV et l'attraction des pollinisateurs. Dans ce cas, ils agissent par effet d'écran et par effet anti-oxydant (**Gravot, 2008**).

### I.6.2. Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, il existe plus de 200 000 métabolites secondaires, classés selon leur appartenance chimique en l'occurrence : les composés phénoliques (dont les acides phénoliques, les coumarines, les tanins, les flavonoïdes) et les huiles essentielles.

#### I.6.2.1. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques (polyphénols) sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires. Ils constituent un des groupes le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques, présentes dans tous les organes de la plante (**Lugasi et al., 2003**).

Les polyphénols sont des molécules hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton, l'élément structural de base est un noyau benzoïque, auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthylique, ester, sucre...) (**Bruneton, 1993 ; Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

Les composés phénoliques jouent des rôles multiples sur les plans physiologique, technologique et nutritionnel. Ils interviennent dans la défense des plantes. Leurs interactions avec les protéines, les polysaccharides, la flore fermentaire ainsi que leurs propriétés anti-oxydante affectent plusieurs caractères organoleptiques tels que la couleur, l'amertume, l'astringence et l'arôme des fruits, des légumes et de leurs produits dérivés. Ces multiples rôles sont en relation avec leurs structures chimiques, d'où l'intérêt particulier accordé aux recherches sur les polyphénols (**Adrian et Frangne, 1991 ; Milane, 2004; Bouhadjara, 2005**).

#### I.6.2.1.1. Biosynthèse des composés phénoliques

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'aromagenèse (figure 3):

- **Voie du shikimate**

La voie la plus courante est celle du shikimate, elle débute par la condensation d'un phosphoenolpyruvate (PEP) avec l'érythrose-4-phosphate, pour former un composé hétérocycle à sept carbones C7, le 3-désoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate (DAHP), lequel après déphosphorylation et réduction donne du shikimate. Une série de réactions assure ensuite l'accrochage d'une chaîne latérale et la création d'une double liaison sur le cycle, d'où la formation de l'acide chorismique, qui se transforme en acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine), conduisant par la suite à l'acide cinnamique et ses dérivés: acide benzoïque, acétophénones, lignines et lignanes, coumarines...etc.) (**Richter, 1993; Bruneton, 1999**)

- **Voie du poly-acétate**

Cette voie commence de l'acétate et conduit à des poly  $\beta$ -cétoesters de longueur variable (polyacétates) qui engendrent, par cyclisation des composés dont: les quinones, les xanthones, les chromones et les isocoumarines (**Richter, 1993; Bruneton, 1999**). De plus, la diversité structurale des composés phénoliques, due à cette double origine biosynthétique, est encore accrue par la possibilité, très fréquente, d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate à l'élaboration de composé d'origine mixte des deux voies, tels que les flavonoïdes (**Bruneton, 1999**).

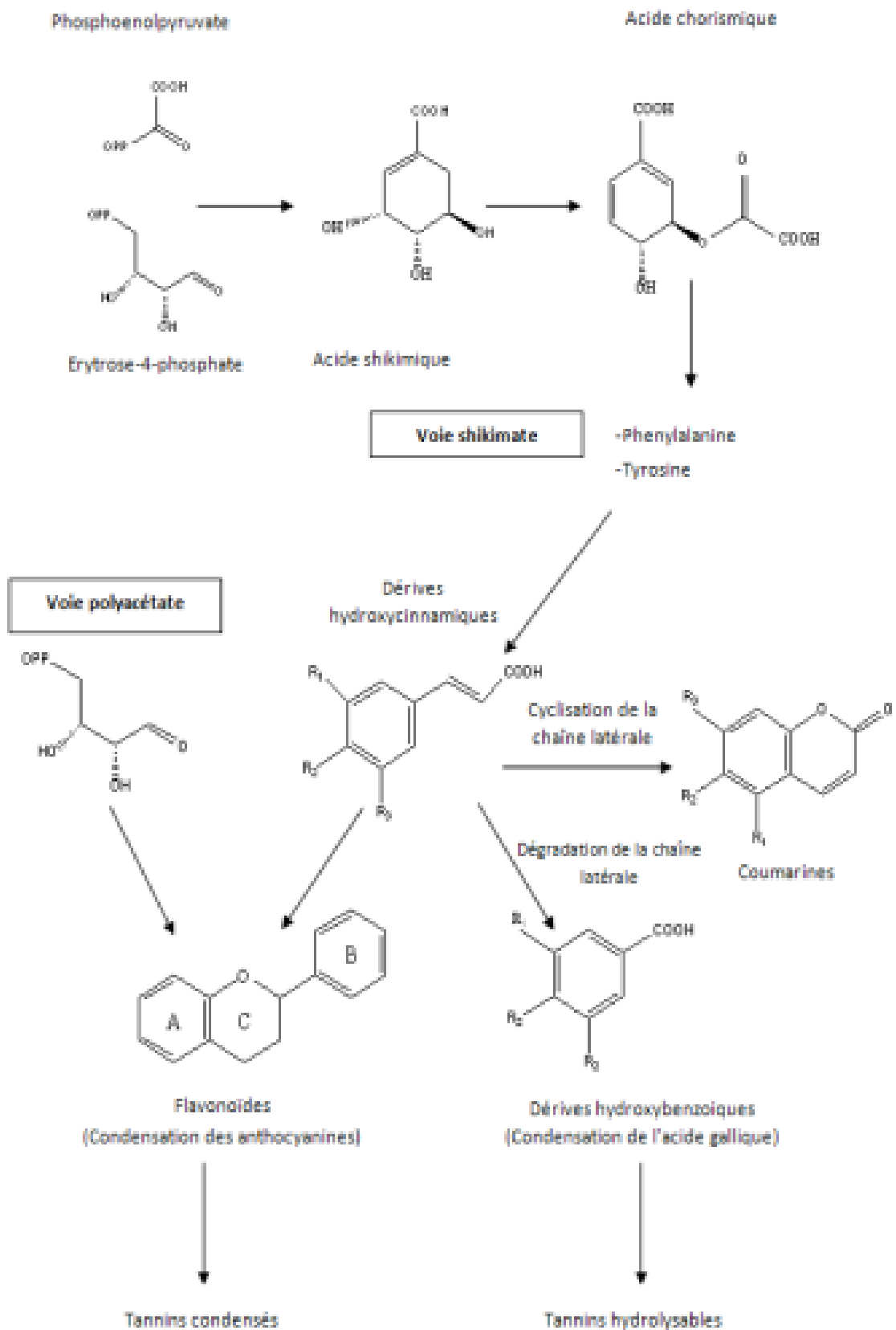


Figure 3 : Voies de biosynthèse des composés phénoliques (Bruneton, 1999)

### I.6.2.1.2. Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en plusieurs classes, ils se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées), ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation...), et enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques) (**Macheix et al., 2005**).

#### I.6.2.1.2.1. Les acides phénoliques

- Structure

Sur le plan structural, on distingue deux types d'acides phénoliques :

- Les dérivés de l'acide benzoïque

Ils sont constitués d'un squelette à sept carbones et sont principalement représentés par les acides p-hydroxybenzoïques, protocatéchiques, vanilliques, galliques, syringiques, salicyliques, o-hydroxy-benzoïques et gentisiques. Les acides protocatéchiques et galliques (Figure 4) ont probablement une origine et des fonctions différentes dans la plante. Le premier est très largement répandu, le second est plus rare, on le rencontre dans la nature surtout sous forme de dimère (**Ribereau, 1968**).

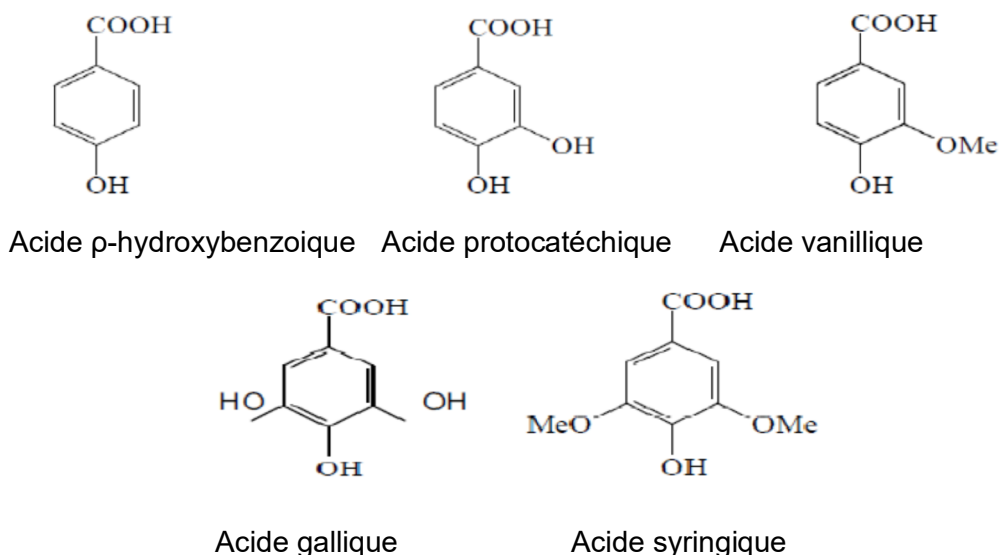


Figure 4: Quelques dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (**Macheix et al., 2005**).

- Les dérivés de l'acide cinnamique

Ces acides possèdent une structure du type C6-C3 (**Barboni, 2006**). Les composés les plus fréquents sont l'acide p-coumarique, l'acide caféique et l'acide cinnamique (Figure 5) (**Ribereau, 1968**).

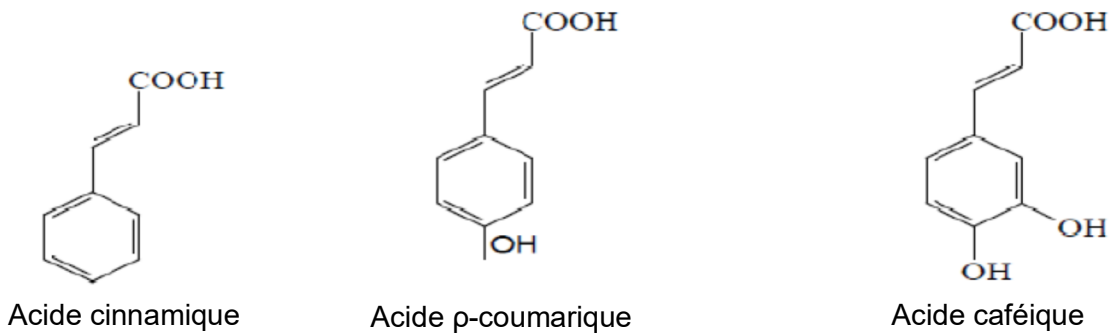


Figure 5: Quelques dérivés de l'acide hydroxycinnamique (Macheix et al., 2005).

- Propriétés physico-chimiques

Les acides phénoliques sont des molécules solubles dans l'éther, ils ne possèdent pas de squelette flavane et peuvent être associés à la lignine dans les feuilles, ils sont insolubles dans l'alcool (Barboni, 2006).

- Propriétés biologiques

Les acides phénoliques présentent des propriétés biologiques intéressantes: anti-inflammatoires, anti-septiques des voies urinaires, anti-radicalaires, cholagogues, hépato-protectrices et immuno-stimulantes (Bruneton, 1999).

#### 1.6.2.1.2.2. Les coumarines

- Structure

Les coumarines sont parmi les composés phénoliques les plus connus. Elles sont substituées en C6 et C7 par un hydroxyle (figure 6). La 7-hydroxycoumarine, connue sous le nom d'ombelliférone, est le précurseur des coumarines 6,7-di et 6,7,8-trihydroxylées.

Les coumarines sont des solides cristallisés blancs ou jaunâtres de saveur généralement amère, certaines sont sublimes et entraînés à la vapeur d'eau. Les hétérosides et les génines sont assez solubles dans l'eau et l'alcool. Les coumarines hydroxylées possèdent une intense fluorescence bleue en lumière ultraviolette. Leur spectre UV est également caractéristique et sert à leur identification (Macheix et al., 2005).

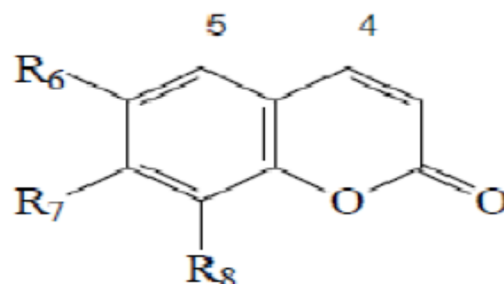


Figure 6: Structure de base des coumarines (Macheix et al., 2005).

- Propriétés physico-chimiques

Les propriétés chimiques sont principalement dues à la fonction lactone par son ouverture et sa solubilisation en milieu alcalin puis, par fermeture en milieu acide pour la régénérer (**Bouhadjara, 2005**)

- Propriétés biologiques

Les coumarines se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Elles sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, super-oxydes et peroxydes. Elles sont connues par leurs activités cytotoxiques, Immuno-stimulantes, tranquillisantes, vaso-dilatatrices, anti-inflammatoires, anti-coagulantes, hypotensives, et sont également bénéfiques en cas d'affections cutanées (**Garcia-Aguez et al., 2000**) et digestives (**Resch et al., 1998**) .

#### 1.6.2.1.2.3. Les tanins

Le mot "Tanin" est relatif à un large groupe de polyphénols naturellement produits par les plantes. Ces composés se caractérisent par leur faculté à se combiner aux protéines et à d'autres polymères organiques, tels que les glucides, les acides nucléiques, les stéroïdes et les alcaloïdes, pour former avec eux des complexes stables. Ce sont des molécules assez volumineuses avec un poids moléculaire généralement compris entre 500 et 3000 Dalton (**Zhu et al., 1997**). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques, qui varient par leurs centres asymétriques ainsi que leur degré d'oxydation (**Hemingway, 1992**).

- Structure et classification

Du point de vue structural, les tanins constituent un groupe chimique hétérogène, avec des structures variées. Selon **Khababee et Vanree (2001)**, les tanins sont subdivisés en deux groupes distincts en fonction du type de l'acide phénolique et du type des liaisons, qui déterminent la taille et la réactivité chimique de la molécule. On y distingue:

- Les tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des esters de glucides et d'acide phénols, qui se scindent facilement par les acides ou les enzymes (Tannases). Selon la nature de ces tanins, on distingue les tanins galliques, dans le cas de l'acide gallique et les tanins ellagiques, dans le cas de l'acide ellagique (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

Ce groupe de tanins est caractéristique des Dicotylédones. En raison de leurs nombreux groupements OH (figure 7), les tanins se dissolvent plus ou moins dans l'eau (en fonction de leur poids moléculaire), en formant des solutions colloïdales (**Guigniard, 1996**).

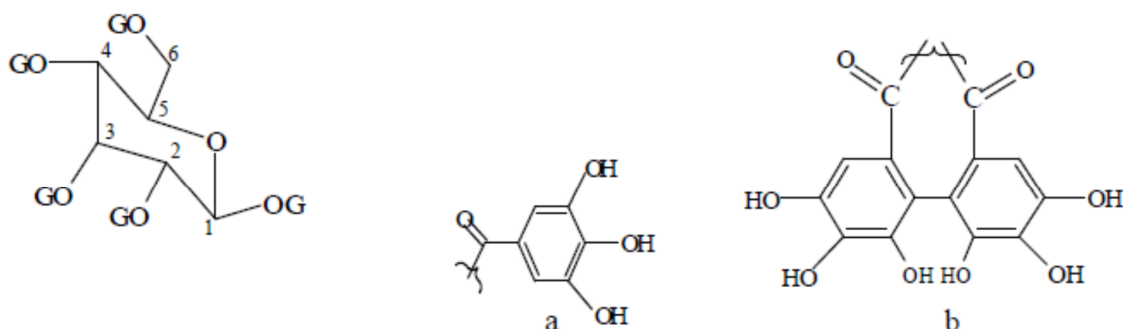
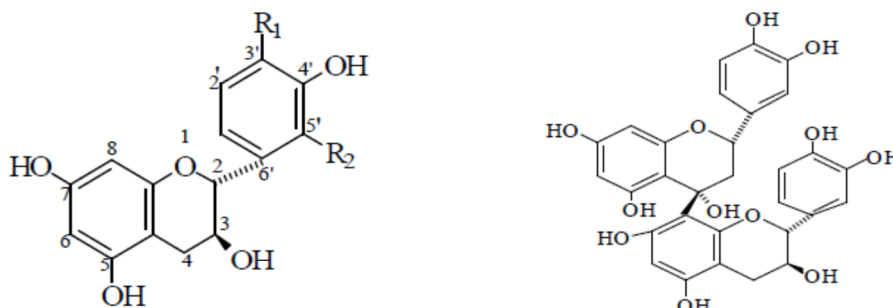


Figure 7: Structure de base des tanins hydrolysables (G= galloyl a ou b)  
(Bouhadjara, 2005)

- Les tanins condensés

Les tanins condensés ou proanthocyanidols diffèrent fondamentalement des tanins hydrolysables. Leur structure est voisine de celle des flavonoïdes, ils ne possèdent pas de sucre dans la molécule et sont formés de deux ou plusieurs molécules de flavan-3-ols, leur union se fait par des liaisons carbone-carbone (figure 8), le plus souvent en position 4-8 ou 4-6, ce qui rend ces molécules difficilement hydrolysables. Ils ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide à chaud par rupture de la liaison inter-monomérique (Guigniard, 1996), et peuvent également former des liaisons stables avec les protéines (Sarni-Manchado et Cheyner, 2006).



Serie 2R, 3S

$R_1=R_2= H$  Afzelichol

$R_1= OH, R_2= H$  Catéchol

Figure 8: Structure de quelques tanins condensés (Macheix et al., 2005).

• Distribution et localisation des tanins

Les tanins sont largement répandus dans le règne végétal, où on les retrouve aussi bien chez les angiospermes que chez les gymnospermes. Pour les angiospermes, les tanins sont plus abondants chez les dicotylédones que les monocotylédones (Konig et al., 1994). Dans une même espèce végétale synthétisant les deux classes de tanins, il y a une distribution des tanins hydrolysables et des tanins condensés dans les différents organes de la plantes (Jean-Blain, 1998).



De même, au niveau cellulaire, les tanins hydrolysables sont majoritairement présents dans les parois cellulaires et les espaces intracellulaires, alors que les tanins condensés sont surtout stockés dans les vacuoles intracellulaires, sous forme libre et en proportion variable, liées aux fibres des parois cellulaires ou aux protéines cellulaires (**Terrill et al., 1992**).

- Propriétés physico-chimiques des tanins

La solubilité des tanins dans l'eau dépend de leur poids moléculaire et de leur degré de polymérisation (**Bruneton, 1999**). Les tanins sont également solubles dans l'acétone et les alcools. Pour cette raison, l'extraction des tanins est généralement réalisée par une solution acétone-eau ou méthanol-eau (**Makkar, 2000**).

Les tanins se fixent à la quasi-totalité des protéines formant ainsi des complexes insolubles à pH physiologique de 7,4 (**Zimmer et Cordesse, 1996**). En plus, ils sont capables de former des liaisons directes avec les protéines, ainsi les tanins établissent des ponts avec les protéines, les sels et les métaux lourds, ce qui entraîne leur précipitation (**Bruneton, 1999**), qui serait maximale dans une gamme de pH comprise entre 3,5 et 7,0 (**Jones et Mangan, 1977**). Cette action est responsable de l'effet de tannage sur le cuir, ainsi que de ses actions anti-diarrhéiques et astringentes (**Hagerman, 1989**). Les tanins peuvent également former des complexes avec les acides nucléiques, induisant ainsi des modifications conformationnelles (**Labieniec et Gabryelak, 2006**).

- Propriétés biologiques

L'une des conséquences directes de la capacité des tannins à complexer les protéines est l'inactivation des enzymes, soit directement, par fixation aux sites actifs, soit indirectement, par l'encombrement stérique, créé par la fixation des molécules de tannins sur l'enzyme (**Zimmer et Cordesse, 1996**).

Des activités anti-mutagènes et anti-cancéreuses ont été attribuées à certains tannins en raison de leur propriété anti-oxydante contre les radicaux libres, qui s'attaquent à l'ADN et perturbent le processus de réplication (**Chung et al., 1998**). Ils peuvent aussi jouer le rôle de donneurs de protons aux radicaux libres produits au cours de la peroxydation, ce qui permet de stopper la réaction en chaîne de l'auto-oxydation des lipides (**Cavin, 1999**).

Certaines drogues à tannins présentent des effets anti-microbiens (**Bruneton, 1999**), anti-viraux (**Song et al., 2005**) et anti-septiques (**Bruneton, 1993**).

Des études ont montré que les tannins servent surtout en thérapeutique pour leurs propriétés astringentes en usage externe, et anti-diurétiques en usage interne, ils provoquent sur la peau et les muqueuses une sorte de tannage, rendant les couches superficielles moins perméables et protégeant ainsi les couches sous-jacentes.

Il est ajouté que les tanins possèdent une action vaso-constrictrice des vaisseaux, d'où leur emploi contre les hémorroïdes (**Atefeibu, 2002**). Les extraits tanniques ont également une action anti-inflammatoire sur les brûlures (**Paris et Moyse, 1971**).

Les tanins favorisent la régénération des tissus en cas de brûlures. Ils sont utilisés comme anti-diarrhéiques et hémostatiques (**Kansole, 2009**). En cosmologie, les tanins sont des astringents très utilisés, sous forme de lotions tonifiantes. Ils sont également employés dans l'industrie, notamment dans l'industrie du cuir, des vernis et de la peinture (**Bouhadjara, 2005**)

#### 1.6.2.1.2.4. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques, presque toujours hydrosolubles et très répandus dans le règne végétal. Ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits, et parfois des feuilles (**Djellili, 2013**). Le plus souvent, ils sont sous forme d'hétérosides ou de flavonosides.

Le terme flavonoïde, provenant du latin "flavus" signifiant "jaune" (**Duval et Duval, 1978**), désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (**Gabor, 1988**). Ces composés représentent le groupe de composés phénoliques le plus diversifié ; plus de 4000 flavonoïdes ont déjà été identifiés (**Harborne, 1989; Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

- Structure et classification

La structure chimique des flavonoïdes est basée principalement sur un squelette de 15 atomes de carbone (figure 9), constitués de deux cycles aromatiques (A) et (B), qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3, en formant ainsi l'hétérocycle (C) (**Erdman et al., 2007**). Des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule (**Narayana et al., 2001**).

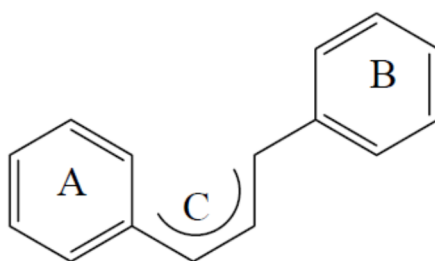


Figure 9: Squelette de base des flavonoïdes (**Chaouche, 2010**)

Selon **Stefan et Mithöfer (2006)**, les flavonoïdes peuvent être classés en plusieurs groupes selon le degré d'oxydation du noyau central, dont les plus importants sont (**Appendice A**) :

- Phényl-2-chromones : flavones, flavonols et flavanones.
- Phényl-2-chromanes (flavanes) : flavan-3-ols et flavan-3,4-diols.
- Flavyliums : anthocyanes.
- Chalcones : formes isomères ouvertes des flavanones, isoflavones.
- Aurones : homologues des flavones à hétérocycles pentagonales.

- Distribution et localisation

Les flavonoïdes sont largement distribués dans le règne végétal. Ils apparaissent chez les bryophytes et les fougères. Chez les gymnospermes, ils sont présents mais leur variété structurale est faible. Par contre, ils sont très largement représentés chez les angiospermes où leur diversité structurale est maximale. Cependant, ils sont quasiment absents chez les algues (**Bruneton, 1993**).

Les flavonoïdes varient quantitativement et qualitativement, selon le stade de développement du végétal (**Fritch et Griesbach, 1975**). Les formes hétérosidiques des flavonoïdes s'accumulent dans les vacuoles, et selon les espèces, se concentrent dans l'épiderme des feuilles ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophylle. Dans le cas des fleurs, elles sont concentrées dans les cellules épidermiques. Quant aux chalcones, elles se trouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs. Ce sont des pigments naturels, au même titre que les chlorophylles et les caroténoïdes. Les flavones, les aurones et les chalcones donnent plutôt des couleurs jaune, beige voire blanche et participent aux nuances produites par les anthocyanes et les caroténoïdes (**Bouhadjara, 2005**).

- Propriétés physico-chimiques

Les flavonoïdes sont des solides cristallisés dont la teinte, varie du blanc ivoire au jaune orangé. La solubilité des flavonoïdes dépend de la nature et du nombre des substituants ; plus le nombre d'hydroxyles libres est élevé, plus ils sont solubles dans les solvants polaires et vis-versa (**Harborne et al., 1975**). Si en règle générale, les hétérosides sont solubles dans les alcools et l'eau (surtout à chaud), les aglycones sont solubles dans les solutions aqueuses d'hydroxydes alcalins (**Bruneton, 1999**). Ils sont insolubles dans les solvants organiques apolaires. Les génines sont peu solubles dans l'eau et l'éther. Les flavonoïdes sont aussi solubles dans les solutions alcalines (ammoniacque et potasse) en donnant une coloration jaune qui disparaît par addition d'acide.

Les flavonoïdes présentent une vaste gamme de couleurs, cependant, certaines sont incolores comme : les flavonols, les flavanones, les dihydro-chalcones et les flavan-3,4-diols (**Rakipov, 1987**). Souvent, les chalcones, les aurones, les flavonols et les flavones, sont caractérisés par une coloration jaune. Quant aux anthocyanidines, elles se distinguent par une gamme de couleurs vives et variées, allant du rose au violet-noir. Lorsque le nombre de substitution augmente dans les anthocyanidines, la coloration bleue devient plus intense (delphinidine), la méthylation des groupes hydroxyles conduit au contraire au rouge (malvidine) (**Bouhadjara, 2005**).

- Propriétés biologiques

Dans la nature, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attractif sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant ainsi une étape fondamentale de sa reproduction.

On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, jouent un rôle dans la protection des plantes et sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV sur les cellules photosynthétiques (**Lois, 1994; Hadi, 2004**).

Sur le plan eco-biologique, les flavonoïdes montrent d'autres propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes, en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance (**Merfak, 2003**).

Les flavonoïdes jouent un rôle important dans l'interaction symbiotique entre les bactéries de la famille des Rhizobiaceae et leurs plantes hôtes de la famille des légumineuses. Les bactéries reconnaissent les flavonoïdes et d'autres molécules sécrétées par la plante, ces molécules induisent la production de facteurs Nod par les *rhizobia* qui déclenchent le programme de nodogenèse chez la plante hôte (**Mergaert et al., 2001**).

Les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités anti-hémorragiques (**Hadi, 2004**), anti-virales, anti-tumorales (**Narayana et al., 2001**), anti-inflammatoires et anti-allergiques (**Middleton et Kardasnam, 1993**), anti-ulcéreuses, anti-hépatotoxiques, inhibitrices d'enzymes telles que l'aldose réductase et la xanthine oxydase (**Wang et Mazza, 2002**), anti-microbienne (**Harikrishna et al., 2004**). Ces métabolites possèdent des propriétés lipolytiques, protectrices de l'ADN voire même anti-âge, leur effet anti-âge est lié à l'action de la quercétine et le kaempférol qui augmentent la synthèse de collagène (**Diehl et al. 2001**).

#### I.6.2.2. Les Huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE), parfois appelées essences, sont des mélanges complexes de substances odorantes et volatiles, issues du métabolisme secondaire de la plante. Elles sont obtenues par deux procédés, soit par distillation ou entraînement à la vapeur d'eau, ou plus rarement par pression à froid des épicarpes des agrumes. Pour améliorer la qualité aromatique des HE, l'extraction se fait à basse température et pression (**AFNOR, 2000**). La teneur des HE est généralement faible, elle est de l'ordre de 1% à 5% (**Bouhadjara, 2005**). En général, elles sont constituées d'un mélange de terpènes, d'alcools, d'aldéhydes, de cétones et d'esters (**Padrini et Lucheroni, 2006**)

- Structure

Les HE renferment des constituants qui appartiennent de façon quasi-exclusive à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes: le groupe des terpènes d'une part et le groupe des composés aromatiques, dérivés du phénylpropane d'autre part. Elles peuvent aussi renfermer des composés divers, issus de processus dégradatifs, mettant en jeu des constituants non volatils (**Bruneton, 1999, Guignard, 1999**).

- Terpènes

Les terpènes constituent une famille de composés très répandus dans le règne végétal. Leur particularité structurale est la présence, dans leur squelette, d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbone ( $C_5H_8$ ) (figure 10). Selon **Mohammedi (2006)**, Cet isoprène est à la base du concept de la "règle isoprénique" énoncée en 1953 par Ruzicka et complétée par Lynen et *al.* (1958) et Bloch et *al.* (1959).

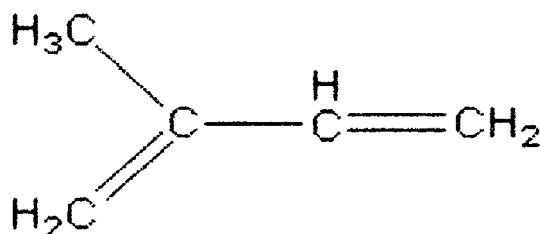


Figure 10: Structure de l'unité isoprène ( $C_5H_8$ ) (**Mohammedi, 2006**).

Les terpènes sont classés selon le nombre d'unités isoprène en une série de structures homologues: hémiterpènes  $C_5$ , monoterpènes  $C_{10}$ , sesquiterpènes  $C_{15}$ , diterpènes  $C_{20}$ , triterpènes  $C_{30}$ , polyterpènes  $(C_5)_n$  où  $n$  peut être compris entre 9 et 30000 (**Mohammedi, 2006**). Dans le cas des HE, seuls seront rencontrés les terpènes les plus volatils, comme les monoterpènes, les sesquiterpènes et leurs dérivés oxygénés (**Bruneton, 1999**). Mais selon **Richter (1993)**, même les diterpènes ont un point d'ébullition peu élevé, qui détermine leur caractère volatil. Ainsi, les monoterpènes constituent avec les sesquiterpènes et les diterpènes, la plus grande partie des HE (figure 11).

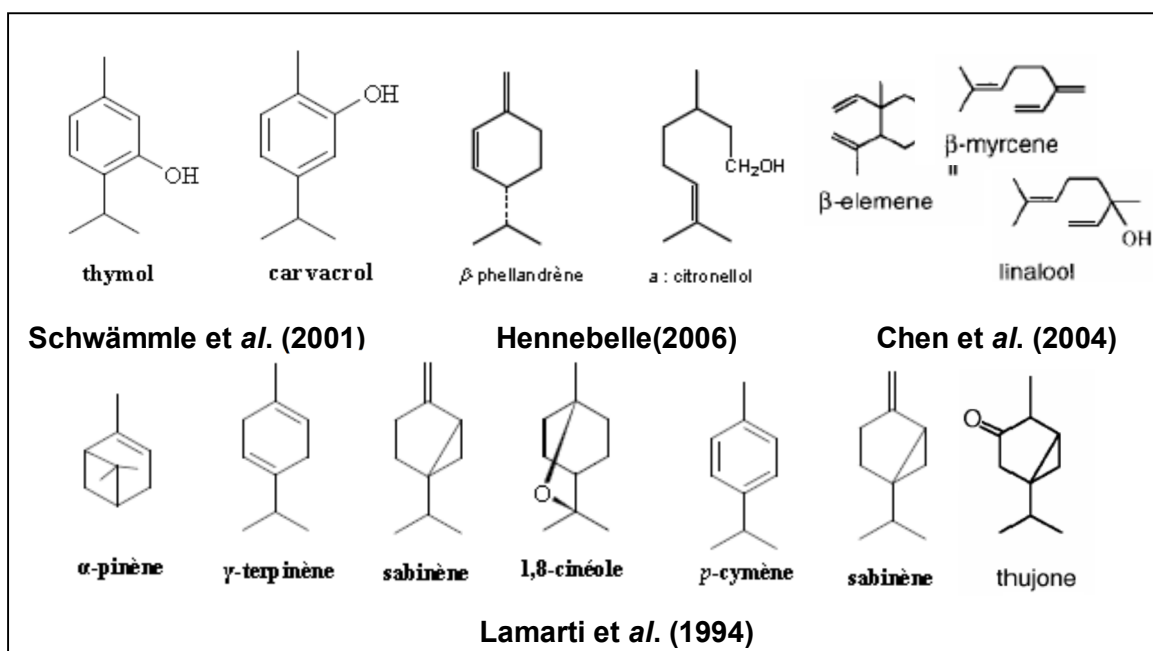


Figure 11: Structure de quelques composés des huiles essentielles.

- Composés aromatiques

Les dérivés du phénylpropane (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) sont beaucoup moins fréquents que les terpènes. On peut également rencontrer dans les HE des composés (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>), comme la vanilline ou les lactones dérivées des acides cinnamiques (**Bakkali, 2008**). Ils sont entraînés par la vapeur d'eau (**Bruneton, 1999**).

- Composés d'origines diverses

Selon **Bruneton (1999)**, les HE, entraînées par la vapeur d'eau, contiennent des produits résultant de la transformation de molécules non volatiles. Ces composés contribuent souvent aux arômes des fruits. Compte tenu de leur mode de préparation, les concrètes et les absolues peuvent aussi en renfermer.

- Localisation et lieu de synthèse

Les HE n'existent quasiment que chez les plantes supérieures (**Bruneton, 1999**). La synthèse et l'accumulation de ce métabolite sont généralement associées à des structures histologiques spécialisées, localisées à proximité de la surface des organes de la plante (**Garnero, 1991**). Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une même espèce, voire dans un même organe (**Paris et Harbielle, 1981 ; Fahn, 1988**).

Elles sont élaborées au sein du cytoplasme des cellules sécrétrices, sous la forme de minuscules gouttelettes qui peuvent se trouver aussi bien dans les organes végétatifs que dans les organes reproducteurs (**Padrini et Lucheroni, 1996**). L'excrétion dans les cavités des poches ou des canaux est réalisée par exocytose ou par lyse des cellules bordant la cavité (**Guignard, 2001**). Dans une même espèce, la composition de l'HE peut différer d'un organe à un autre (**Willem, 2004**).

- Propriétés physico-chimiques

Les HE sont des molécules volatiles, réfringentes, optiquement actives, ayant une couleur et une odeur tout à fait caractéristique (**Volak et Stodola, 1984**). Elles s'oxydent facilement à l'air, insolubles dans l'eau, mais totalement solubles dans les graisses et les solvants organiques d'où le nom d'huile, soulignant le caractère visqueux et hydrophobe (**Naves, 1974**). Mais contrairement aux huiles végétales, les HE ne contiennent pas de corps gras (**Larousse encyclopedie Memo, 1999**). Leur densité est le plus souvent, inférieure à celle de l'eau (**Bouhadjara 2005**).

- Propriétés biologiques

Les HE utilisées en usage externe, sont connues pour leurs propriétés anti-septiques (**Sallé, 1991**), anti-inflammatoires (**Al-Hindawi et al., 1989**), anti-infectieuses (**Buchbauer et Jirovetz, 1994**), spasmolytiques (**Bruneton, 1993**), analgésiques (**Schwimmlé et al., 2001**), cicatrisantes (**Chamouleau, 1979; Caillard, 2003**) et anti-oxydantes (**Jukié et Milo, 2005**). Ces plantes peuvent souvent remplacer les antibiotiques, et combattre certaines infections, cependant, elles peuvent parfois déclencher des phénomènes d'irritation en stimulant les cellules à mucus et en augmentant les mouvements de l'épithélium situé au niveau de l'arbre bronchique (**Bruneton, 1993**).

En outre, elles peuvent avoir d'intéressantes applications thérapeutiques (tableau 4). Elles désinfectent, désodorisent et parfument l'air. Cette pratique est utile en particulier dans le milieu hospitalier (**Bouchikhi-Tani, 2011**). Elles sont actuellement employées comme arômes alimentaires et sont également connus pour leurs propriétés anti-oxydantes, anti-fongiques et anti-microbiennes sur plusieurs germes responsables de la détérioration des denrées alimentaires lors de leurs stockage donc pouvant servir d'agents de conservation alimentaires (**Mahadevan, 1982 ; Kim et al., 1995 ; Mejholm et Dalgaard, 2002; Touaibia, 2015**). Il convient de signaler que dans le désert, les essences volatiles saturent l'air autour de la plante et permettent de maintenir une humidité pendant le jour (**Belaiche, 1979**).

Tableau 4: Bio-activité de quelques composés des huiles essentielles.

Composés	Bio-activités	Références
Acétate de bornyl	Anti-bactérien, anti-spasmodique, anti-viral, expectorant	<b>Teixeira Da Silva (2004)</b>
Camphre	Analgésique, anesthésique, anti-oxydant, anti-septique anti-diabétique, anti-dysentérique, anti-spasmodique	
$\alpha$ - thujone	Anti-bactérienne, insecticide, larvicide, pesticide	
Eucaluptol	Anti-microbien	<b>Svoboda et Hampson (2006)</b>
Linalool	Anti-microbien, hypnotique, hypothermique	
$\beta$ - asarone	Sédatif, hypnotique	

#### I.7. Intérêts de l'extraction des métabolites secondaires à partir des végétaux

Les végétaux sont utilisés par l'Homme pour des applications très diverses et en particulier à des fins thérapeutiques. Dans le cas des plantes médicinales, leur utilisation par la médecine traditionnelle remonte à plusieurs milliers d'années. Aussi, on utilise soit des tissus végétatifs frais, soit des plantes séchées à partir desquelles on prépare des décoctions ou des macérations pour le traitement de diverses maladies.

Depuis un peu plus d'un siècle, sur la base des données de la médecine traditionnelle, l'Homme a développé des procédés d'extraction qui ont permis la fabrication de médicaments à partir d'agents phytochimiques extraits des plantes. Parallèlement, les progrès de la chimie ont permis la synthèse de la plupart des matières actives intervenant dans la composition des médicaments. Néanmoins, les plantes médicinales sont encore cultivées aux champs ou récoltées dans les espaces naturels afin d'en extraire des principes actifs que l'on ne sait pas synthétiser à faible coût et/ou avec un rendement suffisant. C'est tout particulièrement le cas des pays en voie de développement, où l'extraction des métabolites secondaires à partir des plantes est souvent faite pour des raisons d'abord économiques (coût de production). Ceci explique pourquoi on trouve encore la co-existence des pratiques de la médecine traditionnelle et moderne dans divers pays (**Nadeem et al., 2002 ; Sreevalli et al., 2004 ; Kumar et al., 2004**).

## 1.8. Biotechnologies végétales pour la production des métabolites secondaires

La culture *in vitro* permet d'étudier les voies de biosynthèse des métabolites secondaires, dans des conditions expérimentales plus favorables que celles de la plante entière, dans son environnement naturel. Elle peut fournir des métabolites intéressants en raison de leurs activités biologiques, ou utilisables pour l'hémisynthèse d'autres molécules (**Zryd, 1988**).

Actuellement, la demande en produits d'origine végétale est en forte croissance et la production des métabolites secondaires, par l'intermédiaire de cultures aux champs, est parfois insuffisante à cause des rendements limités (maladies, ravageurs,...etc). Par ailleurs, beaucoup de plantes intéressantes ne peuvent être cultivées que dans des conditions pédo-climatiques particulières, d'où la nécessité d'importer ces produits, à un coût parfois élevé.

Ces diverses considérations ont conduit les chercheurs à se tourner vers de nouvelles voies de production en faisant appel aux techniques de culture *in vitro* et à la production de biomasse (**Bourgaud et al., 2001**). Les organes, cellules ou tissus végétaux ainsi produits sont ensuite soumis à diverses méthodes d'extraction en vue d'obtenir les métabolites secondaires recherchés. Ces techniques sont destructives et nécessitent de régénérer continuellement la biomasse pour assurer de nouvelles productions.

Afin de diminuer le surcoût engendré par la destruction de la biomasse, des scientifiques ont développé de nouvelles techniques, permettant de faire libérer les métabolites secondaires dans le milieu de culture sans perte de viabilité du matériel végétal. Ces techniques visent à stimuler la synthèse, puis la libération des métabolites secondaires dans le milieu de culture, par transformation génétique (**Moyano et al., 2003 ; Luo et He, 2004**) ou par utilisation de différentes combinaisons de régulateurs de croissance (**appendice B**).

## 1.9. Travaux antérieurs sur la multiplication *in vitro* du genre *Myrtus*

Peu nombreux sont les travaux de recherches qui se sont intéressés à l'introduction *in vitro* de l'espèce *M. communis* par micropropagation à partir des vitro-semis (**Khoch-Khui et Bassiri, 1976; Scarpa et al., 2000; Nobre, 1997; Grigoriadou et Leventakis, 2000; Damiano et al., 2008**), ainsi qu'une étude de leur comportement organogène et son développement callogène (**Touaibia et al., 2012**). **Mata et Kongjika (2010)** ont étudié l'impact de la composition du milieu ainsi que la période d'éclairage sur la croissance des vitro-plants de *M. communis*.

Néanmoins, l'espèce *M. nivellei* n'avait fait l'objet que d'un seul travail de recherche entrepris dans le cadre d'une micro-propagation (**Touaibia et al., 2012**).



## MATERIEL ET METHODES

### II.1. Présentation des sites de récolte

#### II.1.1. Le Tassili n'Ajjer

Le Tassili n'Ajjer est un massif montagneux situé au Sud-Est de l'Algérie, c'est un haut plateau aride à plus de 1 500 mètres d'altitude, qui s'étend au centre du Sahara sur 50 à 60 km d'Est en Ouest, et sur 800 km du Nord au Sud, soit une superficie de près de 7 200 000 hectares, aux frontières de la Libye, du Niger et du Mali. Ce vaste plateau, présente un taux d'endémisme proche de 50 % (**Guide des parcs nationaux d'Afrique, 1992**).

Son paysage se caractérise par de profondes gorges et des lits de rivières asséchés, l'érosion éolienne a créé des formations rocheuses, qui ressemblent à des ruines, appelées "forêts de rochers". Le massif est habité par les Touaregs du groupe *Kel Ajjer*. Sa ville principale est Djanet; une petite oasis située en bordure occidentale de la région.

Le Tassili est caractérisé par un climat désertique hyper aride dont le taux hygrométrique est inférieur à 26 %, soit environ 50 à 100 millimètres par an (**Verschuren, 1984**). Les précipitations sont caractérisées par une répartition particulière, liée au fait que ce plateau présente des points caractérisés par un climat sub-aride, favorable pour la survie de reliques méditerranéens de faune et de flore (**Le Houerou, 1990**). Malgré les quantités de pluies extrêmement réduites, une couverture végétale basse et clairsemée se retrouve, le plus souvent, confinée au niveau des oueds et des hauteurs dépassant 1600 mètres (**Verschuren, 1984**).

L'espèce *M nivellei* Batt & Trab. a été récolté à 146 km du chef lieu de la wilaya de Djanet, cette station est située à 94,8 km au sud de Ihrir, faisant partie du parc national du Tassili (tableau 5 et figure 12).

Tableau 5: Coordonnées géographiques du site de récolte de *M. nivellei*.

Région	Localisation	Altitude	Latitude	Longitude	Etage bioclimatique
Tassili n'Ajjer	Wilaya de Djanet	2018 m	24°59' Nord	8°07' Ouest	Aride à hiver frais (Sahara central) ( <b>Verschuren, 1984</b> ).

#### II.1.2. Zaccar

Le mont de Zaccar, longeant le massif du Dhahra, raccordé au massif de l'Ouarsenis au Sud, est situé au Nord-Ouest de l'Algérie, il culmine à plus de 1 500 mètres d'altitude dans la wilaya de Ain Defla. Il est caractérisé par un climat semi aride, à hiver tempéré, caractérisé par de fortes précipitations, dépassant 150,2 millimètres par an.

Le mont Zaccar représente à la fois un refuge pour la faune et la flore, on y trouve notamment de vastes forêts de cèdres, ces forêts sont marquées par des conditions naturelles difficiles, et subissent un surpâturage lié au surnombre des troupeaux de cheptels ovins et caprins. La flore présente une proportion élevée de peuplements dégradés, mais qui constituent néanmoins un capital, qu'il convient de protéger en le préservant des dégradations naturelles, humaines et animales (**Verschuren, 1984**).

L'espèce *Myrtus communis* L. a été récolté à 32 km du chef lieu de la wilaya de Ain Defla, à proximité de la commune de Ain Torki (tableau 6 et figure 12).

Tableau 6: Coordonnées géographiques du site de récolte de *M communis*.

Région	Localisation	Altitude	Latitude	Longitude	Etage bioclimatique
Zaccar	Wilaya de Ain Defla	522 m	36°18' Nord	2°16' Est	Semi-aride à hiver tempéré (Atlas tellien) ( <b>Verschuren, 1984</b> ).

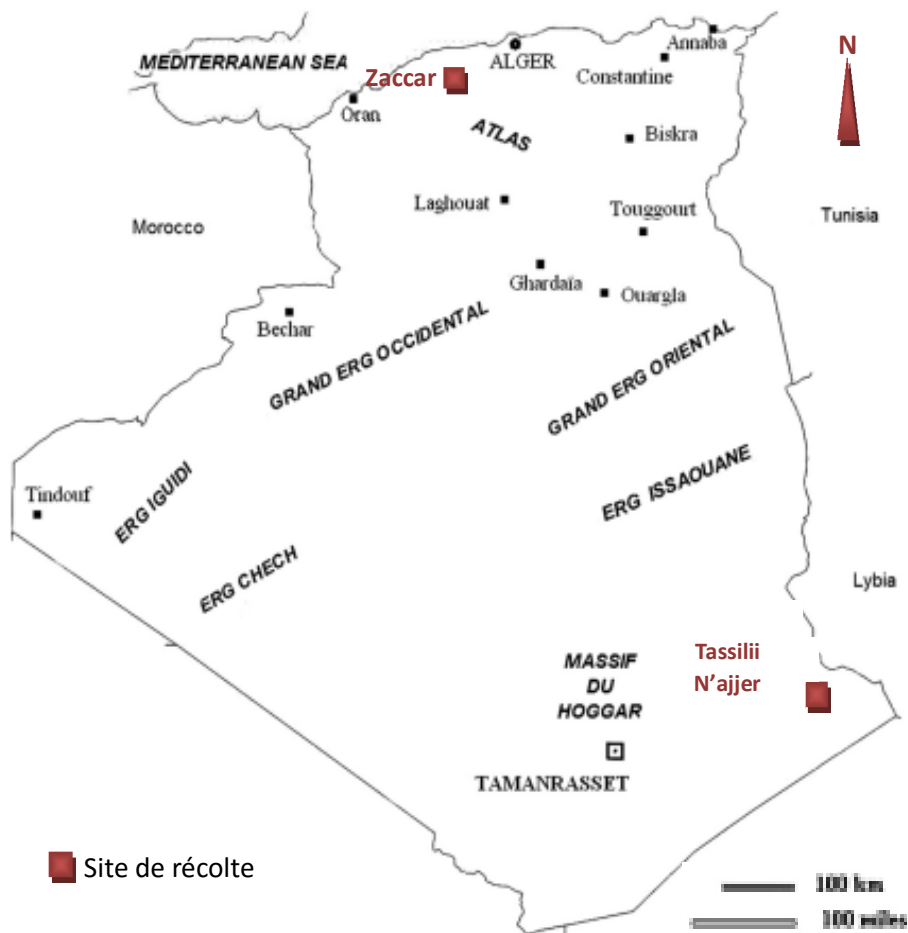


Figure 12 : Position géographique des sites de récolte des deux espèces étudiées

## II.2. Lieux des expérimentations

La première partie expérimentale qui concerne l'étude botanique et histo-anatomique, a été réalisée au niveau du laboratoire de biotechnologie végétale de l'université Blida-1. La deuxième partie relative à l'extraction des huiles essentielles et des concrètes, ainsi que la formulation des crèmes, a été réalisée au niveau du laboratoire de biochimie de l'unité Extral-bio (Chiffa-Blida) ainsi qu'aux laboratoires du centre de recherche et d'analyses physico-chimiques (CRAPC-Bousmail).

Les essais de culture *in vitro* des espèces étudiées ont été entrepris au niveau du laboratoire d'amélioration des plantes de l'université Blida-1, ainsi qu'au niveau des laboratoires de culture *in vitro* de l'entreprise nationale de l'aménagement des réserves des parcs nationaux et de loisirs (ENARP-Alger).

La dernière partie expérimentale (Analyses physicochimiques, microbiologiques, étude pharmaco-toxicologique) a été effectuée au niveau des laboratoires de physicochimie, de microbiologie et de pharmaco-toxicologie du groupe pharmaceutique SAIDAL-Antibiotical (Ain D'heb-Médéa) ainsi qu'au laboratoire de formulation du groupe VENUS.

## II.3. Matériels

### II.3.1. Instruments et réactifs

Le détail des instruments et des réactifs utilisés est représenté en **appendice C**.

### II.3.2. Matériel biologique

#### II.3.2.1. Matériel végétal

Le choix des plantes : *M. communis* L. et *M. nivellei* Batt & Trab. Comme sujet d'étude a été guidé non seulement par les nombreuses utilisations traditionnelles qui en sont répertoriées, mais aussi par le fait que ces deux espèces sont relativement très peu étudiées en Algérie. Sur cette base, nous avons utilisé les feuilles et les fruits qui ont été récoltés respectivement, dans la forêt de Zaccar et les montages du Tassili n'Ajjer, dans des endroits naturels et peu fréquentés (tableau 7). Les échantillons ont été identifiés au niveau du laboratoire de botanique de l'Institut National d'Agronomie – El Harrach (Alger).

Tableau 7 : Les parties récoltées de chaque espèce étudiée.

Nom botanique	Organes récoltés	Date de récolte	Usage/quantité
<i>M. communis</i>	Feuilles	06/2011 05/2012	- <b>Feuilles et fruits</b> : (1kg) Etude botanique, histo-anatomique, extraction des huiles essentielles et des concrètes - <b>Graines</b> : (200g) Etude botanique et culture <i>in vitro</i>
	Fruits et Graines	10/2011 11/2012	
<i>M. nivellei</i>	Feuilles	05/2011 05/2012	
	Fruits et Graines	09/2011 09/2012	

### II.3.2.2. Le matériel végétal *in vitro*

Des boutures herbacées et semi-ligneuses, provenant de leur biotope naturel, ont servi de matériel de base pour réaliser un essai de micro-bouturage. Les graines récupérées à partir des fruits murs ont été utilisées pour générer un matériel végétal juvénile, nécessaire aux essais de callogenèse et de micro-bouturage. Des cals ont été initiés à partir des vitro-plants (explants de feuilles, d'hypocotyles et de racines) sur un milieu de callogenèse. Les cultures ont été entretenues par repiquages successifs tous les 21 jours. Les cals sont récupérés après un cycle de 70 jours.

### II.3.2.3. Matériel animal

Pour l'évaluation des propriétés biologiques de ces plantes, nous avons travaillé sur des animaux de laboratoire, provenant de l'animalerie du laboratoire de Pharmacologie/Toxicologie du groupe Antibiotique (Médéa), il s'agit de :

- Souris Albinos de souche *NMRI*, ayant un poids qui varie entre 20 et 22g, pour l'étude de la toxicité aiguë et l'effet anti-inflammatoire.
- Rats Albinos pesant entre 200 et 240g, pour l'évaluation de l'effet cicatrisant des HE.
- Lapins Albinos pesant entre 1,5 et 2,3 kg, pour l'étude de la tolérance cutanée.

Les animaux de laboratoire utilisés ont été soumis à des conditions de stabulation contrôlées (**Appendice D**).

### II.3.2.4. Souches microbiennes

Les souches utilisées pour la mise en évidence de l'effet anti-microbien regroupent :

- Quatorze souches bactériennes, souvent responsables d'infections alimentaires, urinaires ou nosocomiales [*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619), *Moraxella catarrhalis* (ATCC 49143), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Acinetobacter lwoffii* (ATCC 19002), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13043), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhi* (ATCC 4404540), *Shigella flexneri* (ATCC 25936), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Proteus mirabilis* (ATCC 7002), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (ATCC 237013)],

- Deux levures responsables de candidoses et d'infections cutanées [*Candida albicans* (ATCC 10239), *Candida krusei* (ATCC 6258)]

- Quatre souches fongiques dont une moisissure [*Penicillium sp*] et trois souches phytopathogènes [*Alternaria sp*, *Fusarium oxysporum ssp albidinis* et *Fusarium oxysporum ssp lycopersici*].

## II.4. Séchage et conservation

Le matériel végétal utilisé pour les différentes expérimentations a été divisé en trois parties : la première partie a servi pour l'étude histologique, la seconde partie à l'introduction *in vitro*, la troisième partie à l'extraction et aux analyses phytochimiques des fractions volatiles (HE) et polaire afin d'évaluer quelques unes de leurs activités biologiques.

### II.4.1. Feuilles et fruits

Une partie des feuilles et des fruits, fraîchement récoltées du terrain, a été directement destinée à l'extraction des HE, et également pour l'étude histologique et la détermination de la teneur en eau ainsi que des caractéristiques organoleptiques et morphologiques.

Les feuilles ont été nettoyées et séchées à une température ambiante, dans un endroit sec et aéré à l'abri de la lumière, jusqu'à leur dessèchement complet (figure 13).

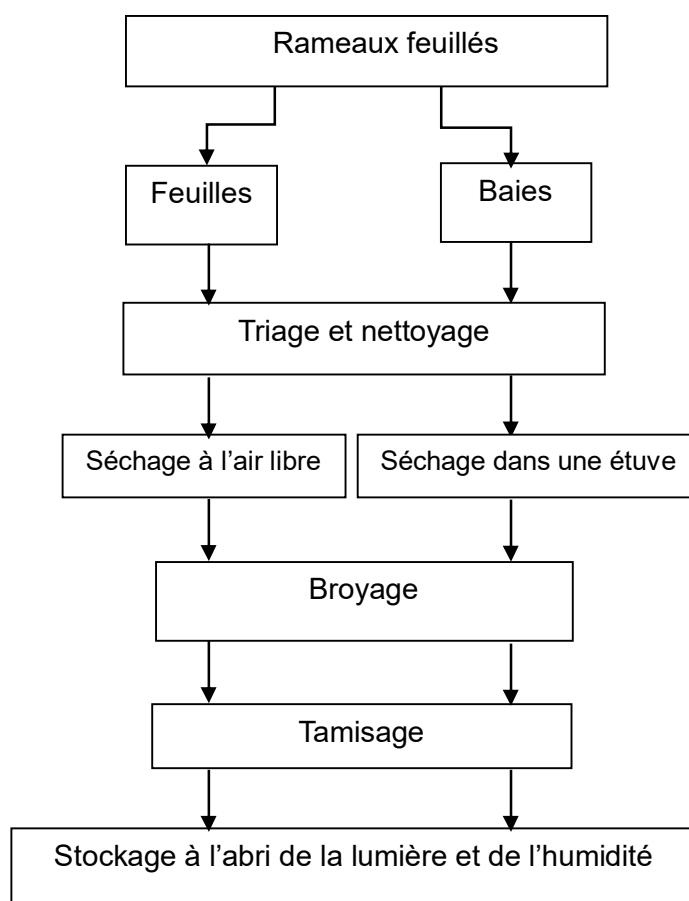


Figure 13 : Méthodologie de séchage des feuilles et des baies

Cependant, le séchage des baies a été réalisé dans une étuve ventilée (Type Melag 405) munie d'un thermomètre. Dans la chambre de séchage, les baies de chaque plante ont été étendues sur un plateau perforé recouvert de papier aluminium lui-même perforé.

Le séchage est réalisé par le contact direct entre le matériel végétal et l'air chaud circulant à l'intérieur de l'étuve. La température de séchage a été réglée à 37°C, jusqu'à obtention d'un poids constant, contrôlé à l'aide d'une balance analytique (période estimée à 10 jours). Le séchage est un moyen important afin d'augmenter la résistance des métabolites à la dégradation.

La matière végétale séchée est ensuite broyée à l'aide d'un broyeur électrique (Type MF10 IKA WERKE) en poudre fine de couleur verte pour les feuilles, et violet noirâtre pour les fruits. Les broyats ont été ensuite tamisés afin d'obtenir une poudre fine à granulométrie homogène inférieure à 63µm. Les poudres obtenues ont été ensuite conservées dans des bocaux en verre, fermés hermétiquement et stockées à l'abri de la lumière jusqu'à leurs utilisations. Les graines ont été conservées dans leurs baies et stockées au frais (à 16°C) jusqu'à leur utilisation.

#### II.4.2. Cals développés *in vitro*

Une partie des cals développés *in vitro* a servi à l'étude histo-anatomique et à la caractérisation physico-chimique, la partie restante a été séchée à l'étuve à 25°C pendant trois semaines dans des boîtes de Pétri en verre, fermées pour éviter les contaminations, puis réduites en poudre fine, tamisées et conservées dans des boîtes hermétiquement fermées jusqu'à leur utilisation.

#### II.4.3. Souches microbiennes

Les souches microbiennes ont été conservées selon leur nature :

- Les souches bactériennes sur gélose nutritive inclinée à 4°C.
- Les champignons phyto-pathogènes sur milieu PDA à 16°C.
- Les levures sur gélose Sabouraud, additionnée de chloramphénicol à 16°C.

Ces souches sont entretenues par un repiquage régulier sur un nouveau milieu chaque deux mois.

### II.5. Etude botanique des plantes étudiées

L'étude botanique est nécessaire pour mettre en évidence l'existence des principales différences morphologiques apparentes de ces deux espèces, appartenant au genre *Myrtus*, et de mettre en évidence les sites cellulaires impliqués dans la sécrétion des huiles essentielles.

L'espèce *M. communis* a fait l'objet de nombreuses études, afin d'évaluer sa composition chimique. Cependant, du point de vue histologique, une seule étude a été effectuée sur les fleurs réalisée par **Ciccareli et al. (2008)**, alors que l'espèce *M. nivellei* n'a fait l'objet d'aucune exploration histo-anatomique au préalable. Ceci nous a conduit à approfondir l'étude sur les différents tissus typiques de la partie aérienne, afin de mieux connaître leur anatomie.

### II.5.1. Etude morphologique et organoleptique des feuilles et des fruits

L'étude morphologique et la caractérisation organoleptique ont été réalisées sur de nombreux échantillons (1000 spécimens), prélevés à différents stades de végétation selon la méthode de **Traveset et al. (2001)**. La première est basée sur des observations à l'œil nu, puis à la loupe binoculaire, afin de chercher les spécificités morphologiques et anatomiques de chaque plante. Pour cela, nous avons effectué :

- Un examen macroscopique des feuilles: afin de décrire les caractéristiques foliaires de chaque espèce (type de nervation, taille et aspect des feuilles, phyllotaxie).
- Un examen macroscopique des fruits et des graines: Nous nous sommes basé sur la description de :
  - La forme, la taille et la couleur des graines.
  - La consistance, le goût et la texture du mésocarpe.
  - Le pourcentage pondéral (pulpe/fruit et graines/fruit).

### II.5.2. Etude histo-anatomique et histo-chimique

Un examen microscopique est établi au niveau des cals (agés de 6 semaines), des feuilles et des tiges in situ, afin de dévoiler leur structure anatomique et rechercher éventuellement les sites d'accumulation de certains métabolites.

L'histochimie permet d'étudier la répartition des molécules biologiques dans les tissus, ce qui peut nous fournir d'amples renseignements sur leur localisation, et peut éventuellement nous orienter dans le choix de la meilleure méthode d'extraction à adopter pour isoler ces métabolites (localisation endogène ou exogène).

Les techniques histochimiques sont basées sur des réactions biochimiques, qui permettent de mettre en évidence différents constituants (glucides, protéines, lipides, etc) dans les cellules ou dans les tissus.

Cette approche nous permet de souligner l'importance des tissus et/ou des cellules, qui sont le siège d'accumulation de ces substances. Cette étude a été restreinte aux feuilles et aux tiges des deux espèces. Elle se déroule en plusieurs étapes dont : - Réalisation de coupes histologiques

- Coloration histochimique

#### II.5.2.1. Coloration histochimique

La coloration histochimique joue un rôle important; elle différencie les parties élémentaires de la cellule et fournit des renseignements sur la présence ou non de certaines substances (**Jadin, 1974**).

Chaque molécule biologique présente un ou plusieurs révélateurs colorimétriques spécifiques. Les tissus obtenus se trouvent dans un bon état, qui leur permet de subir avec succès une procédure de coloration.

Les observations microscopiques sont faites en présence ou non de réactifs appropriés avec un microscope photonique.

#### A.1. Mise en évidence des composés phénoliques:

L'histochimie des composés phénoliques est réalisée sur les coupes histologiques de tiges, de feuilles et de cals de chaque espèce, par l'utilisation du Chlorure ferrique à 1%, ce colorant met en évidence les composés phénoliques d'une manière globale (coloration bleu noirâtre).

#### A.2. Mise en évidence des polysaccharides:

La révélation des polysaccharides est faite par le réactif de l'acide périodique-Schiff (APS), qui est une solution de fuchsine basique décolorée par l'action de l'HCl et du métabisulfite de sodium anhydre. Il se colore en rouge en présence des aldéhydes, qui apparaissent lorsque les sucres sont attaqués par l'acide périodique.

#### A.3. Mise en évidence de l'amidon (amyloplastés):

Pour révéler la présence de l'amidon dans les tissus végétaux, nous avons utilisé le Lugol qui fourni aux amyloplastés une coloration bleu violacée.

#### A.4. Mise en évidence des réserves protéiques:

Nous avons utilisé exclusivement des coupes histologiques réalisées au niveau des graines et des feuilles, ces dernières ont été colorées par le bleu de toluidine à 1%, pour la mise en évidence des réserves protéiques et des graines d'aleurone.

#### A.5. Mise en évidence de la cutine:

La recherche de la cutine a été effectuée au niveau des feuilles par le vert de méthyle, qui lui confère une coloration verte.

### II.5.4. Observation

Une fois que les colorations spécifiques sont réalisées sur les coupes préparées, nous avons procédé à l'étape de préparation des lames pour la lecture, qui consiste à couvrir l'étalement avec une lamelle en utilisant 2 gouttes d'Eukit. Les coupes sont ainsi prêtes à l'observation au microscope photonique.

Pour établir un examen microscopique complet, certaines coupes ont été soumises à un examen vital ou a une double coloration (Vert de Méthyle/Rouge Congo ; bleu de méthylène/éosine).

### II.6. Partie culture *in vitro*

#### II.6.1. Milieux de culture

Afin de déterminer les conditions nutritives les plus favorables à la croissance des explants, nous avons choisi le milieu MS (**Murashige et Skoog, 1962**).



Les principaux constituants de ces milieux sont l'eau distillée et les sels minéraux qui se répartissent en deux groupes : les macroéléments et les microéléments (**Appendice F**).

Dans ces milieux, la source de carbone est le saccharose (30g/l), on y trouve également les vitamines (**Appendice F**) et les régulateurs de croissance. La solidification des milieux de culture est réalisée à l'aide de l'Agar-Agar (gélose) à raison de 8g/l.

Le pH est ajusté entre 5,7 et 5,8 avant l'addition de la gélose. Les milieux sont répartis dans des tubes à essais (2,5 x 20 cm) à raison de 15 ml par tube, puis stérilisés par autoclavage à 120°C, sous une pression de 1 bar pendant 20 min.

### II.6.2. Stérilisation des instruments utilisés

Tous les instruments métalliques (pinces, ciseaux et scalpels) ainsi que la verrerie utilisée (Béchers, tubes de culture, pipettes) sont enveloppés dans du papier aluminium, et stérilisés à l'étuve à une température de 170° à 200°C pendant deux heures. Au cours des manipulations, les pinces et les scalpels utilisés sont périodiquement plongés dans l'alcool à 70%, puis passés à la flamme du bec Benzen.

### II.6.3. Désinfection du matériel végétal

#### II.6.3.1. Désinfection des boutures

Les boutures prélevées à partir de rameaux feuillés récoltés, sont enveloppées dans du papier imbibé d'eau, puis mises dans des sacs en papier, afin d'éviter leur dessèchement au cours du voyage. Une fois au laboratoire, ces boutures sont conservées au réfrigérateur. Au moment de la mise en culture, les tiges feuillées sont d'abord lavées à l'eau courante, puis coupées en petites boutures de deux à trois nœuds pour faciliter leur désinfection.

La difficulté rapportée par **Zryd et al. (1988)** pour la désinfection du matériel végétal ligneux, nous a mené à expérimenter plusieurs modes de désinfection, en faisant varier différentes concentrations d'hypochlorite de calcium (tableau 8). Les étapes de désinfection que nous avons adopté consistent en:

- Un rinçage abondant à l'eau de robinet.
- Un traitement fongicide avec une solution de benlate® (0,5g/l) durant 10 min.
- Un rinçage à l'alcool (éthanol 70% : EtOH).
- Une désinfection au Ca(ClO)<sub>2</sub> avec 3 différentes concentrations (4%,8%,16%).
- Trois rinçages de 10 min à l'eau distillée stérilisée.

Tableau 8 : Mode de désinfection des boutures prélevées *in situ*.

	Concentration du désinfectant	Temps de trempage (min)
<b>Hypochlorite de calcium Ca(ClO)<sub>2</sub></b>	16%	20
	8%	
	4%	

Sous une hotte à flux laminaire, les fragments désinfectés sont ensuite débités au scalpel en micro-boutures de 0,5 à 1 cm, comportant au moins un bourgeon, puis introduites verticalement et individuellement dans les tubes sur milieu MS contenant 1,5 mg/l BA et 0,5mg/l ANA, avec 100 mg/l d'acide ascorbique. **Touaibia et al. (2012)** ont rapporté que l'addition de l'acide ascorbique prévient l'oxydation des phénols et le noircissement du milieu. Les tubes sont ensuite transférés dans une chambre de culture.

### II.6.3.2. Désinfection des graines

La désinfection est réalisée en utilisant deux types de désinfectants: l'hypochlorique de sodium **Na(ClO)<sub>2</sub>** et l'hypochlorite de calcium **Ca(ClO)<sub>2</sub>**, avec une gamme de concentrations et des temps de trempage variables (tableau 9)

Tableau 9: Mode de désinfection des graines.

	Concentrations	Temps de trempage (min)
Lavage à l'eau du robinet		
	Ethanol 70°(EtOH)	02
Hypochlorite de calcium <b>Ca(ClO)<sub>2</sub></b>	16%	10
		20
		30
	8%	10
		20
		30
	4%	10
		20
		30
Hypochlorite de sodium <b>Na(ClO)<sub>2</sub></b>	16°	10
		20
		30
	8°	10
		20
		30
Rinçage à l'eau distillée stérile		

### II.6.4. Multiplication à partir de vitro-semis

#### II.6.4.1. Essai préliminaire sur boîtes de Pétri

Un essai préliminaire de germination a été réalisé sur des boîtes de Pétri, à raison de 50 graines par boîte.

Deux lots de graines ont été ensemencés pour chaque espèce: le premier lot renferme des graines entières (témoins) et le deuxième renferme des graines auxquelles nous avons enlevé une partie du péricarpe.

Au laboratoire, les graines entières et scarifiées sont trempées d'abord dans de l'eau pendant 24h, qu'on renouvelle fréquemment, pour ramollir les téguments. A travers ce traitement, on élimine les graines qui flottent à la surface, ce tri densimétrique par flottaison est d'usage fréquent (**Khelifi, 1986**). Une désinfection rapide des graines est préconisée avant leur ensemencement en boîtes de Pétri.

Chaque lot de graines désinfectées est réparti dans des boîtes de Pétri, préalablement tapissées avec du coton stérile imbibé d'eau distillée stérilisée. Les boîtes sont scellées, étiquetées et placées dans une chambre de culture.

Les observations de l'évolution de la germination sont relevées chaque 24h pendant le premier mois, puis chaque dix jours, jusqu'à la fin de la période d'observation, estimée à 120 jours.

#### II.6.4.2. Essai de germination *in vitro* et étude de la cinétique de croissance

Les graines désinfectées ont été divisées en deux lots égaux, à raison de 100 graines par lot, le premier sert de témoin et le second a été soumis à un pré-traitement par scarification. Sous hotte et à l'aide d'un scalpel et une pince stérilisée, nous avons scarifié les graines en prélevant une partie du tégument. Chaque lot de graines est introduit dans des tubes (à raison de 4 à 6 graines par tube) contenant le milieu de base MS, supplémenté de 100 mg/l d'acide ascorbique. La croissance des vitro-semis obtenus a été suivie durant une période de 160 jours.

#### II.6.5. Multiplication par micro-bouturage

##### II.6.5.1. Phase de multiplication

Les vitro-semis âgés de 16 semaines ont été fragmentés en explants, présentant des bourgeons axillaires ou apicaux. Leurs tailles varient entre 0,5 et 1cm. Les explants sont repiqués sur un milieu de multiplication (tableau 10). Cependant, nous avons agité sur la balance hormonale en utilisant deux hormones de croissance: la benzyladénine BA et l'acide  $\alpha$ -naphtylacétique ANA.

Tableau 10: Combinaisons hormonales des milieux de multiplication.

Milieu MS	Composition du milieu
M <sub>0</sub>	Témoin sans hormones
M <sub>1</sub>	0,5mg/l BA+0,1mg/l ANA
M <sub>2</sub>	1mg/l BA + 0,1 mg/l ANA
M <sub>3</sub>	1,5 mg/l BA+ 0,1 mg/l ANA
M <sub>4</sub>	2 mg/l BA+ 0,1mg/l ANA
M <sub>5</sub>	1mg/l BA + 0 mg/l ANA
M <sub>6</sub>	0,5mg/l BA+0,5mg/l ANA

### II.6.5.2. Phase d'élongation

Nous avons suivi l'allongement des micro-boutures en modifiant la balance hormonale BA/ANA en faveur des cytokinines (tableau 11).

Tableau 11: Combinaisons hormonales des milieux d'élongation.

Milieu MS	BA (mg/l)				
ANA (mg/l)	0	0,5	1	1,5	2
0	+	+	+	+	+
0,1	-	+	+	+	+

Nous avons testé également quelques combinaisons hormonales enrichies par 0,05 mg/l d'acide gibbérellique (AG<sub>3</sub>), car ce dernier a une influence sur l'allongement des pousses et des entre-nœuds (tableau 12). Une meilleure élongation de ces derniers permet une bonne fragmentation des vitro-plants issus de l'introduction primaire.

Tableau 12: Combinaisons hormonales des milieux d'élongation supplémentés d'acide gibbérellique (AG<sub>3</sub>).

Milieu MS	BA mg/l	ANA mg/l	AG <sub>3</sub> mg/l
M <sub>0</sub>	-	-	-
M <sub>1</sub>	1	0,1	0,05
M <sub>2</sub>	1,5	0,1	0,05
M <sub>3</sub>	2	0,1	0,05

### II.6.5.3. Phase d'enracinement

Cette phase est caractérisée par la formation de racines sur les tiges feuillées (obtenues à la fin de la phase d'élongation). L'induction de l'enracinement est testée sur différents milieux contenant des concentrations variables en ANA (tableau 13).

Tableau 13: Différentes concentrations hormonales des milieux d'enracinement.

Milieu MS	Composition du milieu
M <sub>0</sub>	Sans hormones
M <sub>1</sub>	0,1mg/l ANA
M <sub>2</sub>	0,5mg/l ANA
M <sub>3</sub>	1 mg/l ANA

### II.6.6. Induction de la callogenèse à partir des vitro-plants (culture de tissus)

Pour l'induction de la callogenèse chez les deux espèces étudiées, nous avons utilisé des vitro-semis obtenus après 16 semaines de culture. Ce choix a été motivé par les travaux de **Auge et al. (1989)**, qui ont rapporté que les tissus jeunes sont plus aptes à régénérer des tissus indifférenciés, par rapport aux tissus adultes. Pour cette fin, nous avons utilisé des fragments de feuilles, d'entre-nœuds et de racines. Sous hotte à flux laminaire, le vitro-plant est délicatement retiré du tube et débarrassé du milieu gélosé, puis à l'aide d'une pince et d'un scalpel, on le découpe en petits fragments d'environ 0,25 cm<sup>2</sup>, ne comportant aucun bourgeon.

On obtient ainsi des explants de racines, d'entre-nœuds et de feuilles, chaque type d'explants est placé ensuite sur un milieu MS enrichi en hormones de croissance (tableau 14).

Tableau 14: Combinaisons hormonales utilisées pour l'évaluation de la callogenèse

Milieu MS	Auxines (mg/l)		Cytokinine (mg/l)
	ANA	2,4-D	KIN
M <sub>0</sub>	-	-	-
M <sub>1</sub>	0,5	-	0,5
M <sub>2</sub>	-	0,5	0,5
M <sub>3</sub>	1	-	1
M <sub>4</sub>	-	1	1

### II.6.7. Conditions de culture

Les tubes contenant chacun un explant (graine, micro-bouture avec au moins un bourgeon axillaire ou apical, ou bien fragment de tissu végétal), sont placés par paniers de 24, dans une chambre de culture, sous des conditions contrôlées :

- Photopériode : 16 heures lumière / 8 heures obscurité.
- Température : 26±1°C.
- Eclairage horizontal assuré par une série de 16 néons, d'une intensité de 25000 lux.

### II.7. Partie étude phytochimique

#### II.7.1. Caractérisation physico-chimique des poudres végétales

La caractérisation physico-chimique constitue une étape importante dans la validation de la bonne qualité de la poudre végétale étudiée (feuille/fruit).

##### II.7.1.1. Détermination du potentiel hydrogène (pH)

Dans une fiole de 100 ml, on disperse 2 g de poudre végétale (feuilles/fruits/cals) dans de l'eau chaude.

Après refroidissement, la fiole est complétée jusqu'au trait de Jauge avec de l'eau distillée, on détermine ensuite le pH de cette solution en utilisant un pH-mètre (Type *Hanna*) (**Dowson et Aten, 1963**).

##### II.7.1.2. Détermination du taux d'humidité dans la poudre végétale

Le taux d'humidité dans la poudre végétale est l'un des indices importants qui caractérisent la bonne qualité de celle-ci.

Les plantes médicinales ne doivent pas contenir une quantité d'humidité dépassant la norme décrite par la **pharmacopée européenne (2002)**.

On met 1 g de poudre végétale dans un creuset en porcelaine préalablement séché et pesé. L'ensemble est placé dans une étuve réglée entre 100 et 105°C durant 2 heures. Après avoir obtenu un poids constant, on calcule le pourcentage d'eau contenue dans la poudre par la formule (**Pharmacopée européenne, 2005**):

$$X\%=(PE-M_1)/PE \times 100$$

X%: Taux d'humidité de la poudre.

PE : Masse de la prise d'essai en gramme.

M<sub>1</sub> : Masse de l'échantillon après séchage en gramme.

### II.7.1.3. Détermination de la teneur des substances extractibles

Les substances extractibles sont des substances organiques et inorganiques extraites à partir des matières végétales par un solvant.

#### A.1. Substances extractibles par l'éthanol 80%

La poudre végétale (1g) est Introduite dans un erlenmeyer avec 40 ml d'éthanol 80%, ce mélange est macéré pendant 24 heures à la température ambiante, puis filtré avec du papier filtre. On pèse le bêcher vide avant d'y mettre le filtrat, on laisse évaporer à sec et on repèse le bêcher avec le résidu. La teneur des substances extractibles par l'éthanol est calculée par la formule (**Togola, 2002**):

$$\text{Substances extractibles par l'éthanol à 80\%}=(M'-M)/PE \times 100$$

PE: Masse de la prise d'essai en gramme.

M: Masse du bêcher vide en gramme.

M': Masse du bêcher avec le résidu en gramme.

#### A.2. Substances extractibles par l'eau

On Introduit dans un ballon un gramme de poudre et 20 ml d'eau distillée, qu'on porte à ébullition pendant 15 min. On laisse refroidir pendant 20 min et on filtre. Le filtrat est mis dans un bêcher préalablement pesé, après évaporation à sec, on pèse à nouveau le bêcher avec le résidu. La teneur des substances extractibles par l'eau, exprimée en pourcentage, est calculée par la formule (**Diarra, 2003**) :

$$\text{Substances extractibles par l'eau}=(M'-M)/PE \times 100$$

PE: Masse de la prise d'essai en gramme.

M : Masse du bêcher vide en gramme.

M': Masse du bêcher avec le résidu en gramme.

#### II.7.1.4. Détermination des cendres totales

La détermination des cendres est une méthode utilisée pour mesurer la quantité des substances résiduelles non volatiles, contenues dans une plante lorsque l'échantillon est complètement calciné.

On pèse 1 g de poudre végétale, qu'on distribue uniformément dans un creuset préalablement taré. La température est augmentée progressivement au cours de l'incinération au four à moufle durant les deux premières heures, puis elle est maintenue à 800°C pendant 4 heures. L'échantillon est refroidi durant 1 nuit, une fois sortie du four, la capsule est placée dans un dessiccateur pendant 15 min puis pesée. Le calcul du pourcentage des cendres totales par gramme de poids sec se fait selon la formule décrite par la **pharmacopée européenne (2002)**:

$$\%_C = (M - M_C) / PE \times 100$$

$\%_C$  : Pourcentage des cendres.

M : Masse du creuset après calcination en gramme.

$M_C$  : Masse du creuset vide en gramme.

PE : Masse de la prise d'essai en gramme.

#### II.7.2. Screening phytochimique des métabolites

Le screening phytochimique est un ensemble de réactions chimiques simples, permettant d'orienter rapidement vers l'étude détaillée de quelques types de constituants chimiques (**Girre, 1980**).

Ces tests sont effectués, soit sur la poudre végétale des organes aériens [Tiges (Ti) / Feuilles (Fe) / Fruits (Fr)] et sous-terrains [Racines (Ra)] de chaque plante, soit sur leurs infusés respectifs. Le but est donc de connaître les principales familles de métabolites de chaque espèce.

- **Solution à analyser: (préparation de l'infusé à 5%)**

On introduit 5 g de la poudre sèche dans un erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml d'eau distillée bouillante. Ce mélange est recouvert avec un verre de montre, après infusion pendant 15 min, on filtre et on réajuste le volume avec de l'eau chaude de manière à obtenir 100 ml de filtrat (**Diallo, 2005**).

#### A.1. Recherche des alcaloïdes

On fait humecter 5 g de poudre végétale avec 20 ml d'ammoniaque (NH<sub>4</sub>OH 1M), qu'on laisse macérer pendant 24 h dans 50 ml d'un mélange éther/chloroforme (3v/1v), le filtrat est épuisé par de l'acide chlorhydrique (HCl 2N). A 1 ml du filtrat, on ajoute quelques gouttes du réactif de Valser-Mayer, l'apparition d'un précipité blanc jaunâtre, indique la présence d'alcaloïdes (**Pharmacopée URSS, 1991**).

## A.2. Recherche de sennosides

On introduit 2,5 g de poudre dans une fiole conique, à laquelle on ajoute 50 ml d'eau distillée et 2 ml d'acide chlorhydrique concentré, ensuite on chauffe dans un bain Marie pendant 15 min. Après refroidissement, on lui ajoute 40 ml d'éther puis on filtre.

Le filtrat est placé dans une ampoule à décanter, on sépare la couche étherée, qu'on sèche sur du sulfate de sodium anhydre. Au résidu obtenu, on ajoute 5 ml d'ammoniaque (NH<sub>4</sub>OH 1M), il se développe une coloration jaune-orangée, en présence des sennosides (**Pharmacopée URSS, 1991**).

## A.3. Recherche des substances polyphénoliques

### • Les anthocyanes

On prend 5 ml d'infusé auquel on ajoute 5 ml d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M), puis 5 ml d'ammoniaque (NH<sub>4</sub>OH 1M). Si la coloration s'accroît par acidification, puis vire au bleu-violet en milieu basique, on peut confirmer la présence d'anthocyanes (**Diallo, 2005**).

### • Les leuco-anthocyanes (pro-anthocyanidols)

On additionne 2 g de poudre végétale à 20 ml d'un mélange propanol/acide chlorhydrique (v/v), qu'on porte à ébullition dans un bain Marie pendant 3 min. La réaction donne une coloration rouge, en présence des leuco-anthocyanes (**Pharmacopée URSS, 1991**).

### • Les tanins

Les tanins sont des polyphénols polaires, ils existent dans les écorces d'arbres, les feuilles, les fruits et les racines (**Berthod et al., 1999 ; Cowan, 1999**). Ils sont divisés en deux groupes, qui peuvent être révélés séparément:

- On ajoute 15 ml de réactif de Stiasny à 30 ml d'infusé. Ce mélange est chauffé au bain-marie à 90°C pendant 15 min. L'apparition d'un précipité confirme la présence de tanins catéchiques (**Judith, 2005**).
- Pour rechercher les tanins galliques, il faut saturer 10 ml de l'infusé avec l'acétate de sodium pulvérisé. On y ajoute goutte à goutte 1 ml d'une solution de FeCl<sub>3</sub> (1%). L'obtention d'une couleur bleu-noirâtre indique la présence de tanins galliques (**Judith, 2005 ; Diallo, 2005**).

### • Les flavonoïdes

On introduit dans un tube à essai 5 ml d'infusé, auquel on ajoute 5 ml d'acide chlorhydrique, 1ml d'alcool iso-amylque, puis quelques copeaux de magnésium.

Il se produit une réaction de crépitation durant quelques minutes (**Diallo, 2005**). L'apparition d'une coloration rouge-orangée indique la présence des flavonoïdes. Pour rechercher les flavanes, on ajoute quelques gouttes d'une solution de vanilline (2%) à 2 ml d'infusé. L'apparition d'une couleur rouge indique leur présence (**Sanhaji, 2005**).



- **Recherche des coumarines**

On fait bouillir 2 g de poudre végétale dans 20 ml d'alcool éthylique pendant 15 min dans un bain Marie. Après refroidissement, on filtre ensuite on prend 5 ml de ce filtrat auquel on ajoute 10 gouttes de KOH (10%) et quelques gouttes d'HCl (10%), l'apparition d'un trouble indique la présence des coumarines (**Diallo, 2005**).

#### A.4. Recherche de saponosides

A deux millilitres d'infusé, on ajoute quelques gouttes d'une solution saturée d'acétate de plomb, la formation d'un précipité blanc, indique la présence des saponosides (**Pharmacopée URSS, 1991**).

#### A.5. Recherche de mucilages

On introduit 1 ml de l'infusé dans un tube à essai, et on lui ajoute 5 ml d'éthanol absolu, après 10 min, la formation d'un précipité floconneux indique la présence des mucilages (**Diallo, 2005**).

#### A.6. Recherche des anthraquinones

- **Dérivés anthracéniques libres**

A un gramme de poudre végétale, on ajoute 10 ml de chloroforme, ce mélange est chauffé au bain Marie, pendant 3 min puis filtré. On introduit 1ml de ce filtrat dans un tube à essai et on lui ajoute 1ml d'ammoniaque (NH<sub>4</sub>OH 1M). L'apparition d'une coloration rouge indique leur présence (**Togola, 2002 ; Diallo, 2005**).

- **Dérivés anthracéniques combinés**

Deux grammes de poudre végétale sont additionnés à 5 ml d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M), puis portés à reflux pendant 2 heures. Le produit d'extraction est filtré, puis épuisé par 20 ml de chloroforme. La solution chloroformique est évaporée à sec, puis reprise par le NH<sub>4</sub>OH. L'apparition d'une couleur rouge foncée, indique la présence des quinones combinées (**Pharmacopée URSS, 1991**).

#### A.7. Recherche de glucosides

A deux grammes de poudre végétale, on ajoute quelques gouttes d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M), la formation d'une coloration rouge brique, ensuite violette indique la présence des glucosides (**Pharmacopée URSS, 1991**).

#### A.8. Recherche de l'amidon

A deux grammes de poudre végétale, on ajoute quelques gouttes d'iode, la formation d'une coloration bleu-violacée, indique la présence de l'amidon (**Pharmacopée URSS, 1991**).

#### A.9. Recherche des composés réducteurs

On introduit 5 ml de l'infusé dans une capsule, puis on laisse évaporer au bain Marie jusqu'au séchage. Au résidu obtenu, on ajoute 1ml de réactif de Fehling.

L'obtention d'un précipité rouge brique indique la présence de composés réducteurs (**Diallo, 2005**).

#### A.10. Recherche des stéroïdes et terpènes

Un milligramme de la poudre végétale est mélangé avec 1ml d'anhydride acétique, auquel on ajoute 1ml de chloroforme, puis 1ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré. L'apparition d'un anneau brun à la zone de contact des deux liquides et une coloration violette de la couche surnageante, signifie la présence des stéroïdes et des terpènes (**Makhloufi, 2011**).

#### II.7.3. Etude des composés volatils (les huiles essentielles)

##### II.7.3.1. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

Pour extraire les huiles essentielles (HE) des feuilles et des baies des plantes étudiées, nous avons opté pour l'hydrodistillation. C'est une méthode préconisée par la **pharmacopée Européenne (2002)**.

Le montage de l'hydrodistillation est composé de deux parties (figure 2.3):

- Le ballon : sert à contenir la matière végétale émergée dans l'eau distillée.
- Le réfrigérant : c'est un échangeur de chaleur servant à convertir toute la vapeur provenant du ballon, en liquide.

#### Mode opératoire

L'hydrodistillation des feuilles et des baies de *M. communis* et *M. nivellei*, est réalisée à l'aide d'un dispositif de type Clevenger (**Clevenger, 1928**).

La matière végétale fraîche (250g de baies ou de feuilles fraîches) est placée dans un ballon de 1 litre, ce dernier est rempli au 3/4 d'eau distillée. On fait ensuite adapter l'appareil de condensation au ballon. L'eau du ballon est portée à ébullition par un chauffe-ballon électrique. Les vapeurs chargées d'HE se condensent à leur arrivée au niveau du réfrigérant. Le distillat (huile essentielle au dessus, et l'eau aromatique au dessous) est recueilli dans le tube gradué qui se termine par une ampoule.

Cette dernière est munie, à sa base, d'un robinet à partir duquel on peut récupérer la fraction d'HE, en ouvrant le robinet pour récupérer l'eau aromatique (l'hydrolat) dans un erlenmeyer, donc l'HE est directement récolté dans un flacon.

L'extraction dure environ 3 heures, on commence à compter le temps, après l'apparition des premières gouttes de l'hydrolat dans le tube gradué.

La vapeur condensée obtenue conduit à deux phases :

- **Une phase organique** (HE) qui est séparée de l'eau par simple décantation. La quantité de l'HE obtenue est pesée pour calculer son rendement.

- **Une phase aqueuse** (eau aromatique ou hydrolat) qui est saturée par une quantité non négligeable d'essences sous forme solubilisée.

La récupération des HE est réalisée par simple décantation.

#### II.7.3.1.1. Etude cinétique de l'hydrodistillation et optimisation de l'extraction

Pour optimiser les conditions d'extraction de l'HE des feuilles et des baies des deux espèces de myrte étudiées, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'influence de trois paramètres, accessibles expérimentalement, sur le rendement en HE, il s'agit de :

- La température d'extraction.
- La masse de la matière végétale.
- La durée d'extraction.

Après plusieurs essais préliminaires, nous avons établis des repères relatifs aux différents paramètres testés, dans le but de mettre en évidence la meilleure température d'extraction, pour laquelle on obtient un meilleur rendement et une bonne qualité de l'HE. Ces repères ont été adoptés dans toutes les extractions réalisées. Les expérimentations des facteurs influençant l'extraction ont été menées dans un ballon à capacité de 500 ml, sauf pour l'étude de l'influence de la durée de l'extraction, où nous avons utilisé un ballon ayant une capacité de 2 litres.

##### A.1. Influence de la température d'extraction sur le rendement

Les paramètres d'extraction sont:

- Le volume d'eau : 250 ml.
- La durée d'extraction : 3h.
- La température d'extraction : 100°C, 120°C, 140°C, 160°C, 180°C, 200°C.
- La masse de la matière végétale: 20 g.

##### A.2. Influence de la masse de la matière végétale sur le rendement

Les paramètres d'extraction adoptés sont:

- Le volume d'eau : 250 ml.
- La durée d'extraction : 3h.
- La température d'extraction : 160 C°.
- La masse de la matière végétale variable : 10, 15, 20, 25, 30 g.

##### A.3. Influence de la durée d'extraction sur le rendement

Le rendement est évalué toutes les 30 minutes pendant quatre heures, pour cela, nous avons ajusté la proportion l'eau/matière végétale (25g x4 ; 250ml x4), les paramètres d'extraction adoptés sont :

- Le volume d'eau : 1l.
- La température d'extraction : 160 C°.
- Le temps d'extraction variable : chaque 30 min jusqu'à 4 h.
- La masse de matière végétale : 100 g.

### II.7.3.1.2. Conservation des huiles essentielles

Pour éliminer toute trace d'eau dans chaque HE extraite, nous avons utilisé une petite quantité de sulfate de sodium anhydre, suivie par une filtration. Le sulfate de sodium anhydre a la capacité d'absorber l'humidité et d'éliminer toutes les traces résiduelles d'eau. Les HE récupérées sont conservées à 4°C pendant un mois, dans des flacons stériles en verre brun, hermétiquement fermés.

### II.7.3.1.3. Détermination du rendement des huiles essentielles

Le rendement de l'HE est défini comme étant le rapport entre la masse de l'HE obtenue après extraction et la masse de la matière végétale utilisée (**Kaid-Slimane, 2004**). On utilise une balance de précision, pour estimer le rendement par la formule:

$$R_{HE} = (M_{HE} / M_{MV}) \times 100$$

$R_{HE}$  : Rendement de l'huile essentielle en pourcentage.

$M_{HE}$  : Masse de l'huile essentielle en gramme.

$M_{MV}$  : Masse de la matière végétale en gramme.

### II.7.3.2. Evaluation des propriétés organoleptiques des huiles essentielles

Les HE extraites sont soumises à des tests, pour évaluer leurs caractères organoleptiques (aspect, couleur et odeur).

Les propriétés organoleptiques sont l'ensemble des paramètres, que l'on peut remarquer à l'œil nu, donc elles regroupent tout ce qui est perceptible par les sens : aspect, couleur, et odeur. L'examen macroscopique concerne également la recherche d'une opacité ou d'une texture particulière (**AFNOR, 2000**)

### II.7.3.3. Evaluation des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

Pour obtenir des données sur la qualité et le degré de pureté des HE extraites, on procède à l'étude de leurs propriétés physiques et chimiques (**AFNOR, 2000**).

#### A.1. Mesure des indices physiques

- **Détermination de la densité relative: AFNOR NFT 75.111.2000 (AFNOR, 2000)**

La densité d'un corps est égale au rapport de sa masse spécifique, à celle de l'eau distillée mesurée, dans les mêmes conditions, à l'aide d'un pycnomètre en verre (**Rodier, 2005**). Autrement dit, c'est le rapport d'un volume d'HE à 20°C et la masse d'un volume égal d'eau distillée à 20°C.

#### Mode opératoire

Un pycnomètre de 2 ml de capacité est soigneusement lavé et séché, puis pesé avec son bouchon à l'aide d'une balance de précision à 0,0001 g près, afin de déterminer son poids vide.

On remplit le pycnomètre avec de l'eau distillée, et on le pèse pour déterminer la masse apparente de son contenu en eau. Ensuite on vide le pycnomètre pour le sécher à nouveau. On remplit ce dernier avec l'HE, et de la même manière, on détermine la masse de son contenu en produit. La densité est déterminée par la formule:

$$d^{20} = \frac{M_1 - M}{M_2 - M}$$

$d^{20}$  : Densité de l'HE.

$M_1$  : Masse en gramme du bêcher avec l' HE.

$M_2$  : Masse en gramme du même bêcher avec l'eau distillé à 20°C.

$M$  : Masse en gramme du même bêcher vide.

Si on desire obtenir la masse volumique de l'HE, il faut multiplier la densité relative par la masse volumique de l'eau (qui est égale à 0,99823 g/ml) (**AFNOR, 2000**).

- **Détermination de l'indice de réfraction: AFNOR NFT 75.112.2000 (AFNOR, 2000)**

L'indice de réfraction est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'HE maintenue à une température constante.

#### Mode opératoire

La longueur d'onde spécifique est de  $589 \pm 30$  nm, correspondant aux radiations D1 et D2 du spectre de sodium. La température de référence est de 20°C. On utilise un réfractomètre (type *Schmidt*), munit d'un thermostat permettant la stabilisation de la température, d'une source lumineuse (lampe à vapeur de Sodium) et d'une lame en verre. On place une goutte d'HE sur le prisme du réfractomètre. La lecture de la mesure s'effectue à une température stable. L'indice de réfraction IR, à la température de référence  $t$ , est donné par la formule:

$$(IR) = nt' + 0,0004 (t' - t)$$

$nt'$  : Valeur de lecture obtenue à la température  $t'$ .

$t$  : Température au moment de la mesure.

$t'$  : Température de référence qui est égale à 20°C.

- **Détermination du pouvoir rotatoire: AFNOR NFT 75.113.2000 (AFNOR, 2000)**

Le pouvoir rotatoire d'une HE est un critère important de la pureté de cette dernière, et permet d'indiquer, si elle possède une activité optique dextrogyre ou lévogyre

#### Mode opératoire

On remplit le tube polarimétrique par l'HE dissoute dans l'éthanol (à raison de 0,2 g d'HE dans 100 ml d'éthanol), puis l'angle de rotation est lu directement sur l'appareil. Le pouvoir rotatoire est donné par la formule:

$$[\alpha]^{20}_d = \alpha / L.C$$

$\alpha$  : Valeur de l'angle de déviation lue sur l'appareil en degré.

L : Longueur du trajet optique en dm.

C : Concentration de l'HE en g/100ml.

## A.2. Mesure des indices chimiques

### • **Détermination du potentiel hydrogène**

Le potentiel hydrogène "pH" correspond à la concentration en ions  $H_3O^+$  dans la solution, sa détermination est basée sur la différence de potentiel existant entre les deux électrodes plongées dans le produit à analyser à l'aide d'un pH-mètre (**Le hir et Cohen, 2001**).

#### Mode opératoire

On étalonne le pH-mètre avec deux solutions tampon, la première à pH=4, et la deuxième pH=7. A chaque fois, on rince les électrodes à l'eau distillée.

On verse une quantité suffisante de l'HE dans le récipient de mesure, puis on introduit l'électrode dans la solution et on rapporte la valeur du pH, qui s'affiche sur l'écran du pH-mètre (Type *Hanna*).

### • **Détermination de l'indice acide (IA): NF ISO 1242 : 1982 (AFNOR, 2000)**

La détermination de l'indice d'acide ( $I_A$ ) renseigne généralement sur le degré d'hydrolyse. Les HE ne contiennent pas ou très peu d'acides gras libres, à courte chaîne carbonique. Ce paramètre est une variable, qui dépend essentiellement des conditions de conservation et surtout des conditions d'extraction.

L'indice d'acide correspond au nombre de mg d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'HE.

#### Mode opératoire

On pèse 2g d'HE qu'on introduit dans une fiole, et on lui ajoute 5ml d'éthanol à 95%. Après agitation, on procède au titrage avec une solution d'hydroxyde de potassium (KOH 0,02 mole/l ; 1,12g/l), en présence de phénolphthaléine (indicateur coloré), à une température ordinaire de 25°C. La couleur de l'HE vire à la neutralisation, vers une couleur rose, qui persiste quelques minutes avant de reprendre la couleur initiale. Le volume de KOH, qui a servi à la neutralisation est lu directement sur la burette (**AFNOR, 2000**). L' $I_A$  est donnée par la formule:

$$IA = \frac{V \times C \times 56,11}{M}$$

V : Volume de KOH utilisé pour le titrage en ml

C : Concentration de KOH en mole/l

M : Masse de l'HE en gramme

- **Détermination de l'indice de saponification (IS): AN ISO 3637.1999 (AFNOR, 2000)**

L'indice de saponification est obtenu par ébullition à reflux d'un échantillon, avec une solution éthnolique d'hydroxyde de potassium, et titré par une solution d'acide chlorhydrique.

#### Mode opératoire

On pèse 1,7g d'HE, à laquelle on ajoute 25ml de KOH alcoolique (0,5M). on adapte le réfrigérant, et on chauffe à reflux pendant 60mn. On ajoute à la solution chaude 1ml de la solution de phénolphtaléine et on titre avec l'HCl (0,5M) jusqu'à disparition de la couleur rose de l'indicateur. On prépare un essai à blanc (essai témoin) dans les même conditions opératoires. L'indice de saponification est donné par la formule:

$$IS = \frac{(V0 - V1) \times C \times 56,1}{M}$$

V0 : Volume de HCl utilisé pour essai à blanc en ml.

V1 : Volume de HCl utilisé pour la mesure de l'IS de l'HE en ml.

C : Concentration du HCl en mole/l.

M : Masse de l'HE à analyser en gramme.

- **Détermination de l'indice d'ester (IE): AFNOR NFT 75.104.1994 (AFNOR, 2000)**

L'indice d'ester est le nombre qui exprime en mg la quantité d'hydroxyde de potassium (KOH), nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters, contenues dans 1g d'HE. Il est calculé à partir de la formule:

$$IE = IS - IA$$

IS : Indice de saponification

IA : Indice d'acide

#### II.7.3.4. Analyse des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse CG/SM

L'analyse par couplage CG/SM, des HE extraites à partir des feuilles (HEFe) et à partir des baies (HEFr) des deux espèces a été réalisé afin d'identifier et de quantifier leurs différents constituants volatils.

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) est une technique de séparation chromatographique et d'identification, qui résulte de l'alliance entre la chromatographie en phase gazeuse (CG) et la spectrométrie de masse (SM). Il s'agit d'une technique dans laquelle les constituants d'un mélange se séparent, en fonction des vitesses auxquelles ils sont entraînés à travers une phase stationnaire, par une phase mobile gazeuse (**Aprino, 1985**)

### Principe

Un spectre de masse est représenté suite à la fragmentation des molécules, lorsqu'elles sont bombardées à la sortie en phase gazeuse, par un faisceau d'électrons. Ces molécules sont d'abord ionisées, puis elles sont plus ou moins fragmentées. Ce système est piloté par un logiciel, qui peut prendre en charge la comparaison automatique des spectres obtenus avec des bibliothèques de spectres, contenant des informations sur des milliers de composés. Il est donc théoriquement possible de déterminer la nature des fragments, et en déduire la structure de la molécule originale (**Aprino, 1985**).

- **Partie chromatographie phase gazeuse (CG)**

L'échantillon analysé est injecté dans le chromatographe à l'aide d'une micro-seringue, puis mélangé au gaz vecteur. Ce dernier classiquement l'hélium, constitue la phase dite mobile, il a pour rôle de véhiculer les analytes, depuis l'injecteur jusqu'au détecteur via la colonne capillaire.

La colonne capillaire est située à l'intérieur du four, où souvent la programmation de la température varie entre 40 et 350°C. Cette colonne capillaire est constituée d'un tube de silice fondue très long, dont la paroi interne est recouverte d'un film chimique nommé la phase stationnaire.

Les constituants d'un mélange sont alors séparés en fonction de leur polarité. Les différences des propriétés physico-chimiques, leur confèrent des vitesses d'élution différentes. Ainsi ils seront séparés en fonction du temps de rétention (**Bouchonnet, 1999**).

- **Partie spectrométrie de masse (SM)**

Les sources utilisées sont dites à ionisation électronique. Leur usage est réservé à l'analyse des composés gazeux ou très volatiles. L'analyse par spectrométrie de masse soumet les molécules à une série de tests:

- L'ionisation électronique qui consiste à bombarder les molécules par un faisceau d'électron de haute énergie. L'impact de cette ionisation est d'arracher un électron à la molécule, conduisant ainsi à la formation d'un ion radicalaire  $M^+$ .
- La séparation des ions produits en fonction du rapport de masse et de charge ( $M/Z$ )
- La détection des ions proportionnellement à leur nombre et amplification du courant correspondant pour les rendre détectables par l'appareil (**Bouchonnet, 1999**).



L'identification des constituants de chaque HE analysée par CG/SM est faite, par comparaison des spectres de masse obtenus, avec ceux des bibliothèques informatisées *Nist*, *NBS*, *Wiley*, *75K*, liés au spectromètre.

- **Préparation des échantillons à analyser**

Un volume de 0,5µl d'HE diluée dans le dichlorométhane, est prélevé et injecté dans l'appareil de CG/SM pour déclencher les procédures d'analyse Ce dernier est soumis à des réglages précis, qui contrôlent les conditions opératoires avant l'analyse des HE (tableau 15).

Tableau 15 : Conditions opératoires d'analyse des HE par CG/SM

Chromatographe phase gazeuse	
Type de détecteur	Hewlett Packard 6890
Type d'injecteur	Avec diviseur (split)
Colonne capillaire	HP5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)
Température de l'injecteur	250°C
Volume d'injection	0,5 µl en mode split (1/50)
Programmation de la température durant l'analyse	
Température initiale du four	60°C pendant 1min
Vitesse de chauffage	2°C/min jusqu'à 130°C
Température finale du four	250°C
Gaz vecteur	Hélium
Débit du gaz vecteur	1 ml/min
Spectrophotomètre de masse	
Type de détecteur	MS Model 5973
Température Interface	280°C
Température Source	230°C
Température Quadripôle	150°C
Energie d'ionisation	70eV

#### II.7.4. Etude des composés non volatils polaires

##### II.7.4.1. Extraction par solvant (solide-liquide)

L'extraction de la fraction polaire des feuilles, ainsi que celle des fruits, est réalisée par épuisement de la poudre végétale, à l'aide d'un solvant, à froid et à chaud. Les solvants utilisés sont le méthanol (MeOH) et l'éthanol (EtOH). Le choix de ces solvants est justifié par de nombreux travaux publiés (**Justesen et al., 1998; Escarpa et Gonzalez, 1998; Careri et al., 2001**).

L'extraction des composés polaires non volatils, est effectuée avec du matériel végétal réduit en poudre fine (tableau 16). L'usage de la poudre offre une plus grande surface de contact de la plante, avec les solvants extracteurs, permettant ainsi d'améliorer le rendement des extractions.

Tableau 16: Conditions des extractions solide-liquide effectuées.

Plante étudiée		Solvant	Extrait obtenu	Polarité / Température
<i>M communis</i>	Feuilles (Fe)	MeOH	EMFeMC	<b>MeOH</b> : 0,995 à 65°C <b>EtOH</b> : 0,980 à température ambiante
		EtOH	EEFeMC	
	Fruits (Fr)	MeOH	EMFrMC	
		EtOH	EEFrMC	
	Cals (Ca)	MeOH	EMCaMC	
	<i>M nivellei</i>	Feuilles (Fe)	MeOH	
EtOH			EEFeMN	
Fruits (Fr)		MeOH	EMFrMN	
		EtOH	EEFrMN	
Cals (Ca)		MeOH	EMCaMN	

#### II.7.4.1.1. Extraction à chaud par soxhlet au méthanol

L'extracteur de Soxhlet est un appareil spécifique conçu pour l'extraction continue solide-liquide. Le solvant (équivalent de 10 fois la quantité de la poudre végétale à extraire) est porté à ébullition. Ensuite, les vapeurs sont condensées à l'intérieur de l'extracteur, contenant le solide à extraire dans une cartouche de papier épais.

Le contact entre le solvant et la poudre à extraire dure pendant l'accumulation du solvant dans le réservoir, puis quand le solvant atteint un certain niveau, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant les substances dissoutes. Ce cycle peut être répété plusieurs fois, jusqu'à l'épuisement complet du solide (**William, 2007**).

#### Mode opératoire

- **Pour le matériel végétal récoltés *in situ* (feuilles/ fruits)**

On introduit 100 g de poudre végétale (poudre des feuilles/fruits) dans une cartouche confectionnée avec du papier filtre, adapté aux dimensions de l'appareillage (figure 2.5). Le ballon contient 1000 ml de solvant. Le chauffe-ballon est réglé à la température d'ébullition du méthanol (65°C).

Au cours de l'extraction, la coloration du solvant s'intensifie graduellement suite au contact avec la poudre végétale contenue dans la cartouche. On considère que l'extraction est complète lorsque la couleur du solvant mis en contact avec le contenu de la cartouche devient très dense (au terme du 10<sup>ème</sup> siphonage, l'équivalent de six heures d'extraction continue).

Un siphon permet de vider périodiquement l'extracteur de la solution obtenue. La solution retombe alors dans le ballon où se concentrent les extraits.

Par ce procédé, la poudre végétale est successivement épuisée, à l'aide du méthanol (MeOH). L'extrait brut issu de l'extraction précédente est soumis à une double filtration, puis concentré à l'évaporateur rotatif (type *Stuart RE300* à 60°C) et enfin séché à température ambiante.

Au total, quatre concrètes (EMFeMC, EMFeMN, EMFrMC, EMFrMN) sont obtenues et pesées pour déterminer leur rendement, puis conservées au frais (à +4°C), dans des flacons sombres bien fermés, afin d'effectuer ultérieurement les tests phytochimiques. La formule utilisée pour calculer le rendement est:

$$R = (\text{Masse d'extrait sec} / \text{Masse de la prise d'essai}) \times 100$$

- **Pour les calcs obtenus *in vitro***

Deux grammes de la poudre des calcs sont extraits avec du méthanol (50ml x 2), à chaud pendant deux heures à 65°C, l'extrait obtenu est filtré deux fois. Le filtrat obtenu est concentré à l'évaporateur rotatif à 60° pour l'élimination du solvant (**Grzegorzcyk et al., 2007**).

Les deux concrètes des calcs (EMCaMC, EMCaMN) obtenues sont pesées pour évaluer leur rendement, elles sont ensuite conservées au frais (+4°C), dans des flacons sombres bien fermés jusqu'à leur usage.

#### II.7.4.1.2. Extraction à froid par macération dans l'éthanol

Elle consiste à mettre en contact direct le solvant avec la poudre végétale, durant un temps déterminé à température ambiante. Cette extraction concerne uniquement la poudre des feuilles et des fruits des deux espèces étudiées.

##### Mode opératoire

On verse 100 ml d'éthanol sur 10 g de poudre végétale contenue dans un bécher, ce mélange est maintenu sous agitation magnétique pendant 24 heures, ensuite filtré deux fois. Le filtrat obtenu est concentré à l'évaporateur rotatif (55°C).

#### II.7.4.1.3. Calcul du rendement des extraits secs obtenus

Les résidus secs des quatre extraits obtenus (EEFeMC, EEFeMN, EEFrMC, EEFrMN) sont pesés pour déterminer leur rendement, puis conservés au frais (+4°C), dans des flacons sombres bien fermés, afin d'éviter tout éventuel risque d'oxydation de leurs constituants. Le rendement est calculé par la formule:

$$R = (\text{Masse d'extrait sec} / \text{Masse de la prise d'essai}) \times 100$$

#### II.7.4.2. Analyse spectrophotométrique

##### II.7.4.2.1. Spectrophotométrie UV-visible

L'absorption moléculaire, dans le spectre UV-visible, dépend de la structure de la molécule. L'absorption d'énergie est quantifiée et résulte du passage des électrons d'orbitales de l'état fondamental, vers des orbitales d'un état excité d'énergie supérieure.

L'absorption dans le domaine du visible est courante et se traduit par une coloration de l'échantillon, alors que la spectrométrie UV se limite généralement aux systèmes conjugués (**Hennebelle, 2006**). La spectrophotométrie UV-visible permettra donc:

- De reconnaître des groupements chimiques particuliers. L'interprétation d'un spectre est plus aisée en présence d'étalons.
- En mesurant, à une longueur d'onde précise (la longueur d'onde d'absorption maximale du complexe formé avec un réactif,  $\lambda_{\max}$ ), l'intensité de cette absorption par rapport à un témoin de concentration connue, on peut déterminer la quantité de la molécule présente dans un échantillon.

### Principe

En faisant traverser une cuve contenant une solution, par un faisceau lumineux monochromatique (lumière à longueur d'onde fixe et définie), une partie de cette lumière incidente va être absorbée par les molécules de la substance dissoute (figure 14). Si l'énergie lumineuse de la lumière incidente est  $I_0$  et celle de la lumière transmise est  $I_t$ , la loi de Beer-Lambert indique que:  $I = I_0 e^{-\epsilon \cdot c \cdot l}$

L'absorbance ( $A$ ) d'une solution est le logarithme décimal de l'inverse de la transmittance ( $T$ ) pour un rayonnement monochromatique. Elle s'exprime par l'équation (**Garvilovie et al., 1996**):

$$A = \log_{10} \left( \frac{1}{T} \right) = \log_{10} \left( \frac{I_0}{I_t} \right)$$

$I_0$  : Intensité du rayonnement monochromatique incident.

$I_t$  : Intensité du rayonnement monochromatique émergent.

$T$ :  $I_t / I_0$ .

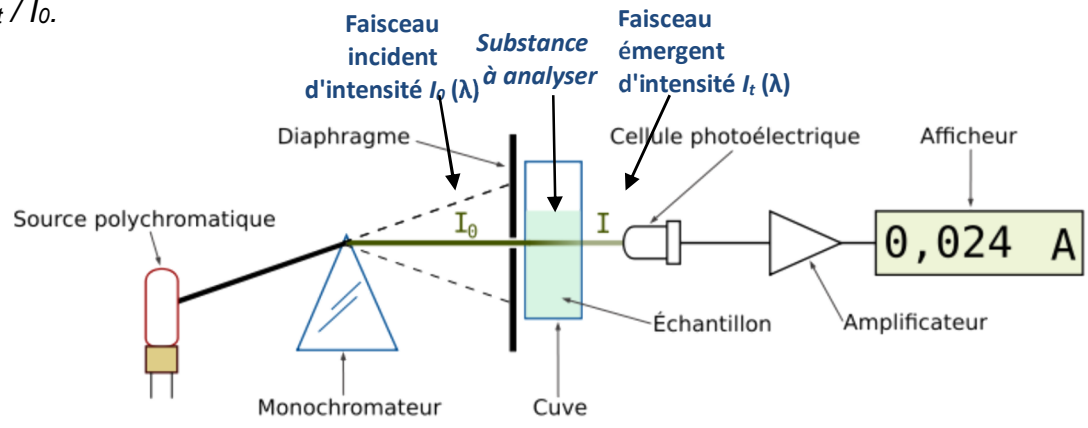


Figure 14: Principe de la spectrophotométrie UV-visible (**Hannebelle, 2006**)

#### II.7.4.2.2. Balayage des extraits obtenus au spectrophotomètre UV-visible

Le spectre d'absorption UV-visible d'un composé est relativement très simple caractérisé habituellement par une ou deux bandes d'absorption maximum. Cette opération est réalisée en comparant le tracé d'un spectre d'absorption d'une solution à tester, de composition inconnue, avec le tracé d'une solution du composé pur de référence.

### Mode opératoire

Les résidus secs obtenus après extraction des fractions polaires, ont servi à la préparation de dix solutions à analyser par balayage spectral en mode séquentiel (cinq extraits par plante). Ces solutions sont préparées en dissolvant chaque extrait sec dans du méthanol absolu à raison de 1mg/ml. Le spectre d'absorption de chaque extrait est obtenu dans le domaine UV-visible. L'acide gallique a été soumis à un balayage dans les mêmes conditions, pour servir de référence à l'interprétation des tracés des spectres obtenus.

Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé un spectrophotomètre UV-visible (Type *SHIMADZU UV-1601*), afin de déterminer les spectres d'absorption des différents extraits, selon les conditions:

Measuring mode	ABS
Scanning range	190-800 nm
Scan speed	Fast
Display mode	sequential

### II.7.4.2.3. Dosages biochimiques

#### II.7.4.2.3.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols, contenus dans les extraits alcooliques secs, est réalisé selon le protocole décrit par **Singleton et Rossi (1965)**.

Le réactif de Folin-Ciocalteu (FCR) est un acide de couleur jaune, constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleu de tungstène et de molybdène (**Ribereau, 1968**).

### Mode opératoire

Un volume de 200 $\mu$ l de chaque extrait (1mg/ml) est mélangé avec 1ml du réactif de Folin–Ciocalteu et 0,8ml de carbonate de sodium à 7,5%. L'ensemble est bien mélangé et incubé à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 765nm. On utilise une gamme-étalon établie dans les mêmes conditions avec de l'acide gallique. L'indice de Folin-Ciocalteu est exprimé en microgramme équivalent acide gallique par milligramme d'extrait sec ( $\mu$ g eq ac gal/mg ES).

La concentration des composés phénoliques est calculée selon une équation de type  $y=ax+b$ , obtenue à partir de la courbe d'étalonnage.

#### II.7.4.2.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits est déterminée par la méthode colorimétrique décrite par **Kim et al. (2003)**.

### Mode opératoire

Une quantité de 100µl de chaque extrait (1mg/ml) est mélangée avec 0,4ml d'eau distillée puis avec 0,03ml d'une solution de nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$  5%). Après 5min, 0,02ml d'une solution de trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$  10%) est ajoutée. On additionne à ce mélange 0,2ml de solution de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M) et 0,25ml d'eau distillée, ce mélange est maintenu sous agitation à l'aide d'un vortex, pendant 5 minutes, à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 510 nm. Une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant la quercétine à différentes concentrations, pratiquée dans les mêmes conditions opératoires. La concentration des flavonoïdes est exprimée en microgramme équivalent quercétine par milligramme d'extrait sec ( $\mu\text{g eq quer/mg ES}$ ).

### II.7.4.2.3.3. Dosage des flavonols

La teneur en flavonols est déterminée par la méthode de **Yermakov et al. (2004)**.

### Mode opératoire

On mélange 2 ml de l'extrait sec avec 2 ml d'une solution de trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$  20 g/l) et 6 ml d'une solution d'acétate de sodium (50 g/l). Après 2 heures et demi d'incubation à 20°C, la lecture de l'absorbance est réalisée à 440 nm. La courbe d'étalonnage est réalisée avec des concentrations allant de 0,0166 à 0,5 mg/ml de solution méthanolique de rutine. Le taux des flavonols est déterminé en microgramme équivalent rutine par milligramme d'extrait sec ( $\mu\text{g eq rut/mg ES}$ ).

### II.7.4.2.3.4. Dosage des tanins

Les tanins sont dosés selon la méthode colorimétrique Folin-Denis, décrite par **Joslyn (1970)**. Son principe est basé sur la réduction de l'acide phosphomolybdique et tungstique en milieu alcalin, qui en présence des tanins donne une coloration bleue, dont l'intensité est mesurée à 760 nm.

### Mode opératoire

Dans une fiole de 100 ml, on introduit 75 ml d'eau distillée, 1 ml de la solution à tester (1mg/ml), 5 ml de réactif de Folin-Denis et 10 ml d'une solution saturée de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (10%). Après agitation mécanique, la préparation est incubée pendant 30 min, la mesure de la densité optique est faite à 760 nm. Une gamme étalon d'acide tannique est préparée dans les mêmes conditions avec des concentrations allant de 0,022 à 0,1 mg/l. Les résultats sont exprimés en microgramme équivalent acide tannique par milligramme d'extrait sec ( $\mu\text{g eq ac tan/mg ES}$ ).

### II.7.4.2.3.5. Dosage des anthocyanes

Les anthocyanes sont déterminés par la méthode de décoloration proposée par **Jur (1967)**. Son principe est basé sur la décoloration des solutions d'anthocyanes en utilisant une solution de bisulfite de sodium.

Cet auteur a montré que ce phénomène était dû à l'existence d'une réaction entre le cation flavylum et l'hydrogénosulfite ( $\text{HSO}_3$ ). Cette réaction est équilibrée, elle conduit à la formation d'un produit d'addition incolore, plus ou moins stable selon le pigment.

### Mode opératoire

Dans un bécher de 80 ml, on introduit 1 ml de la solution à tester (contenant 1mg d'extrait sec), 1 ml d'éthanol et 20 ml d'une solution aqueuse d'HCl 2%. L'ensemble est bien homogénéisé (on l'appellera solution S).

- On met dans un 1<sup>er</sup> tube à essai 10 ml de la solution S, et on lui ajoute 4ml d'eau distillée.
- Dans un 2<sup>eme</sup> tube, on met 10 ml de la solution S et 4ml de bisulfite de sodium (15%).

Après une incubation de 20 min, on procède à la mesure de la densité optique à 520 nm. On calcule la  $\Delta\text{DO}$  pour chaque extrait. Les résultats sont exprimés en microgramme équivalent cyanidine par milligramme d'extrait sec ( $\mu\text{g eq cyan/mg ES}$ ), après extrapolation des absorbances sur la courbe d'étalonnage de la cyanidine.

## II.8. Activités pharmaco-toxicologiques sur model animal (*in vivo*)

### II.8.1. Préparations des solutions à tester

La mise en évidence des activités biologiques des HE ainsi que des extraits préparés, a été réalisée au niveau des laboratoires de pharmaco/toxicologique et de bactériologie du groupe Antibiotical.

#### A.1. Huiles essentielles

Les HE des feuilles et des baies, des deux espèces, utilisées pour l'évaluation des propriétés biologiques, ont été émulsionnées dans une solution solubilisante. Cette dernière est préparée en mélangeant 100 ml d'eau physiologique dans une fiole avec 0,1ml d'une solution Tween 80. Ce mélange est maintenu à l'étuve pendant quelques minutes, afin de faciliter la dissolution du Tween 80 dans l'eau. Le choix de cette solution solubilisante neutre a été recommandé par plusieurs travaux de recherches antérieurs (**Mekhloufi, 2011; Lahlou, 2004**), pour éviter tout risque de toxicité susceptible de perturber les résultats des tests pratiqués, d'autant plus que le caractère hydrophobe des HE impose l'utilisation d'un agent émulsionnant.

#### A.2. Extraits testés

Pour évaluer les effets biologiques des concrètes obtenus sur un model animal, nous avons émulsionné les concrètes dans de l'eau physiologique contenant 0,1% de Tween 80 (v/v). Le Tween 80 est un stabilisateur d'émulsions sans toxicité significative sur l'animal. On chauffe le mélange quelques minutes, pour obtenir un bon effet émulsifiant et une meilleure dispersion des particules de la concrète dans la phase aqueuse.

Pour les activités biologiques testées *in vitro*, on a solubilisé les concrètes dans du Myristate d'isopropyl, pour la mise en évidence des effets anti-microbiens. Cependant, on a solubilisé les concrètes dans du méthanol, pour l'évaluation de l'effet anti-oxydant en fonction des recommandations relatives aux protocoles suivis.

Les différentes solutions à analyser ont été stérilisés à froid, à travers une membrane de microfiltration ayant une porosité de 0.2 $\mu$  (**Appendice G**)

Les extraits des cals multipliés *in vitro* n'ont pas pu faire l'objet d'une évaluation biologique complète, notamment en raison des quantités obtenues. Le choix des activités biologiques à évaluer pour ces derniers, a été restreint aux tests pratiqués *in vitro*.

### II.8.2. Etude de la toxicité aiguë par voie orale

Comme tout produit actif, les HE et les extraits des plantes étudiées peuvent donner lieu à des effets plus ou moins indésirables ou nocifs. Les modes d'administration traditionnels sont la voie orale et l'application cutanée. La toxicité aiguë est une toxicité violente et d'évolution rapide, contrairement à la toxicité chronique qui évolue lentement, et qui n'apparaît qu'après une exposition à de faibles doses ayant un effet cumulatif (**Wepierre, 1981**). Selon **Stelljes (2008)**, les effets rencontrés avec la toxicité aiguë, induisent généralement la mort des animaux expérimentés.

#### Principe

Le principe de ce test, décrit par **Behrens et Karber (1949)**, consiste à déterminer la dose capable de tuer l'animal, par la voie d'administration orale. L'observation des effets toxiques et la détermination du nombre d'animaux morts, se font quotidiennement durant les 14 jours qui suivent l'administration.

Le but de ce test consiste à déterminer la dose moyenne qui provoque la mortalité de la moitié des animaux testés (DL<sub>50</sub>), en administrant des doses qui se suivent dans un ordre croissant à plusieurs groupes (lots) de souris. Après la période d'observation, les différents taux de mortalité pour chaque dose sont analysés pour donner une valeur statistique, qui correspond à la DL<sub>50</sub>.

En plus de la mortalité, d'autres signes de toxicité, tel que le vomissement, la diarrhée, et l'affaiblissement, sont notés. Le résultat obtenu ne permet pas de faire une extrapolation directe sur l'Homme, mais donne une orientation sur la suite des essais à réaliser pour l'ajustement des doses à tester.

#### Mode opératoire

Les souris Albinos, de souche *NMRI*, ont été maintenues à jeun la veille du test, avant le début de chaque expérimentation, un lot constitué de 6 souris (3 mâles et 3 femelles), n'ayant reçu que l'eau physiologique + Tween 80 (0,1%), a servi comme témoin.



- **Huiles essentielles :**

Pour évaluer la toxicité de l'HE des feuilles de *M. communis* (HEFeMC), on a utilisé 4 lots contenant chacun 6 souris (3 mâles et 3 femelles), chaque lot a reçu une dose spécifique de cette HE, dont: 0,5 ; 1 ; 2 ; 4 g/kg de poids corporel. Le choix de ces dernières a été orienté en se basant sur le protocole de **Behrens et Kraber (1949)**.

L'administration de l'HE est réalisée par gavage à l'aide d'une sonde gastrique (**Appendice G**). Les souris ont été privées de nourriture uniquement, durant les deux heures ayant suivis l'administration (maintenus *ad libitum*).

Les trois autres HE (HEFeMN, HEFrMC, HEFrMN) ont également fait l'objet d'un test similaire en suivant la même répartition des lots, et en testant les mêmes doses.

- **Extraits aqueux des concrètes**

Pour évaluer la toxicité de l'extrait méthanolique des feuilles de *M. communis*, nous avons utilisé 3 lots contenant chacun 6 souris (3 mâles et 3 femelles). Chaque lot a reçu, par gavage à l'aide d'une sonde gastrique (**Appendice G**). Les doses testées de l'extrait méthanolique (prealablement emulsionnée dans de l'eau physiologique contenant 0,1% Tween 80) sont : 0,5 ; 0,75 et 1 g d'extrait/kg de poids de l'animal.

Tous les essais ont été initiés avec le même matériel et dans les mêmes conditions opératoires. Les souris sont privées de nourriture mais pas d'eau, pendant les deux heures qui suivent le gavage. Les animaux sont maintenus sous observation pendant 14 jours (tableau 17) .

Tableau 17 : Répartition des lots pour l'évaluation de la toxicité aigüe par voie orale des extraits étudiés.

Nombre de souris/lot	Administration	
6	Solution solubilisante (eau physiologique + Tween 80)	
6 x 3 lots (0,5/0,75/1g/kg)	Extrait méthanolique des feuilles (EMFeMC)	Extraits de <i>M. communis</i>
6 x 3lots (0,5/0,75/1 g/kg)	Extrait méthanolique des fruits (EMFrMC)	
6 x 3 lots (0,5/0,75/1 g/kg)	Extrait éthanolique des feuilles (EEFeMC)	
6 x 3 lots (0,5/0,75/1 g/kg)	Extrait éthanolique des fruits (EEFrMC)	
6 x 3 lots (0,5/0,75/1 g/kg)	Extrait méthanolique des feuilles (EMFeMN)	Extraits de <i>M. nivellei</i>
6 x 3 lots (0,5/0,75/1 g/kg)	Extrait méthanolique des fruits de (EMFrMN)	
6 x 3 lots (0,5/0,75/1 g/kg)	Extrait éthanolique des feuilles (EEFeMN)	
6 x 3 lots (0,5/0,75/1 g/kg)	Extrait éthanolique des fruits (EEFrMN)	

- Détermination de la DL<sub>50</sub>

Dans la mesure où une des doses administrée montre un effet toxique suite à une administration unique, déclarée par la mort de plusieurs souris d'un même lot, on procède à la détermination de la DL<sub>50</sub>, qui est la dose susceptible de tuer 50% des animaux testés.

Le calcul de la DL<sub>50</sub> se fait selon la formule décrite par **Behrens et Karber (1949)**.

$$DL50 = DL100 - \frac{\sum A \times B}{n}$$

n : Nombre moyen d'animaux par lot (n=6).

B : Nombre des morts de deux doses successives.

A : Difference entre deux doses successives.

Les résultats obtenus sont comparés avec ceux fournis dans le tableau 18, correspondant à l'échelle de Hodge et Sterner (**O'Hare et Atterwill, 1995**).

Tableau 18 : Classes de toxicité : échelle de Hodge et Sterner

DL50 (orale)	Indice de toxicité	Interpretation
Jusqu'à 1 mg / kg	1	Extrêmement toxique
De 1 à 50 mg / kg	2	Hautement toxique
De 50 à 500 mg / kg	3	Modérément toxique
De 500 à 5000 mg / kg	4	Légèrement toxique
De 5000 à 15000 mg / kg	5	Presque pas toxique
Plus de 15000 mg / kg	6	Relativement toxique

### II.8.3. Etude de la toxicité cutanée des HE et des concrètes *in vivo*

Les tradi-praticiens utilisent le myrte soit par voie orale (Extrait et HE) soit par voie cutanée (plante entière). Pour cela, il est nécessaire d'estimer le degré d'irritation cutanée des HE et des extraits des deux espèces de Myrte étudiées.

Les HE pures et les concrètes (100mg/ml dans de l'eau physiologique contenant 0.1% de Tween 80) ont été soumises à un test de tolérance cutanée, afin de vérifier s'ils expriment un éventuel effet irritant sur la peau.

Nous avons mené ces essais afin de mettre en évidence les limites de toxicité cutanée des HE et des concrètes suite à une application topique sur des lapins en déterminant l'indice d'irritation cutanée primaire. Dans une perspective de formuler des crèmes à base de ces substances actives, afin de tester leur éventuel effet cicatrisant.

#### **A.1. Détermination de l'indice d'irritation primaire cutanée**

Selon **Pradeau (1992)**, le test de la tolérance cutanée, permet de prédire l'éventuel effet irritant, qu'exerce un produit topique suite à une application unique sur la peau.

L'irritation correspond à l'effet, qui peut survenir après une projection unique ou une exposition forte, mais de courte durée. Les effets s'échelonnent d'une légère rougeur (érythème) à des modifications sévères: œdème (accumulation d'une quantité excessive d'eau dans les tissus ou les cavités séreuses), escarre ou nécrose (dégénérescence et mort du tissu), hyperplasie, effet corrosif (destruction tissulaire irréversible de la peau traitée).

### Mode opératoire

- La veille du test, les lapins sont tondus au niveau des flancs sur une surface de 14x14cm à l'aide de ciseaux et une lame (**Appendice G**).
- On effectue sur le flanc droit à l'aide d'une lame d'un vaccinostyle stérile, trois scarifications espacées de 0,5 cm et longues de 2 cm, le flanc gauche restant tel quel, les scarifications doivent abraser la couche cornée sans provoquer de saignements. L'intérêt de ces scarifications est d'augmenter la perméabilité de la peau à l'HE, car cette dernière diffuse très rapidement dans une peau altérée par rapport à sa diffusion dans une peau saine.
- La substance à analyser (volume de 0,5 ml) est appliquée sur une compresse stérile de 2,5 x 2,5cm sur le flanc droit. Le flanc gauche servira de témoin. la gaze ainsi imbibée est recouverte par une bande de sparadrap perforée. Les lapins sont ensuite remis dans leurs cages.
- Les pansements sont enlevés 24 h plus tard pour faire une première lecture. Une seconde lecture est faite 72 h après l'application du produit. Les lectures consistent à apprécier l'érythème et l'œdème sur chaque flanc selon l'échelle numérique de Draize (**Vogel et Vogel, 2006**), décrite dans le tableau 19.

Tableau 19: Classification des érythèmes et des œdèmes (**Vogel et Vogel, 2006**).

ERYTHEME	Pas d'érythème	0
	Léger érythème (à peine visible)	1
	Erythème bien visible	2
	Erythème important	3
	Erythème grave (rouge pourpre) avec ou sans escarres (lésions profondes)	4
OEDEME	Pas d'œdème	0
	Très léger œdème (à peine visible)	1
	Léger œdème (contours bien définis, gonflement apparent).	2
	Œdème moyen (épaisseur environ 1 mm).	3
	Œdème grave (épaisseur supérieure à 1 mm et surface supérieure à la zone d'application).	4

- Pour calculer l'indice d'irritation primaire cutanée (IPC), on additionne les chiffres relevés pour l'érythème et l'œdème, à chaque temps de lecture (24h et 72h après l'application), pour chaque substance testée, sur les zones scarifiées d'une part et les zones non scarifiées d'autre part, puis on calcule la moyenne des résultats observés selon la formule (**Garreta, 2007**):

$$\text{IPC} = \text{Somme des valeurs de l'érythème et de l'œdème} / 6 \text{ (2 flancs pour 3 lapins)}$$

L'interprétation des différents types de réponses est effectuée à la base de l'échelle de **Pourrat (1993)** représentée dans le tableau 20.

Tableau 20: Interprétation des différents types de réponses cutanées.

Types de réponses	Indice d'irritation primaire cutanée
Non irritant	$IP \leq 0.5$
Légèrement irritant	$0.5 \leq IP \leq 2$
Irritant	$2 \leq IP \leq 5$
Très irritant	$5 < IP \leq 8$

#### II.8.4. Etude de l'activité anti-inflammatoire

L'inflammation est une réaction de défense de l'organisme à diverses agressions, qui peuvent être d'origine physique (chaleur), chimique (toxines), biologique (réponse immunitaire) ou infectieuse due aux micro-organismes pathogènes (**Gaziano et Gibson, 2006**). L'objectif de cette étude, consiste à évaluer l'activité anti-inflammatoire des HE et des extraits, préparés à partir des concrètes alcooliques des feuilles et des baies de *M. communis* et *M. nivellei*, dans un test discriminatoire pour une éventuelle utilisation en thérapeutique.

##### Principe

Le protocole adopté est celui décrit par **Berkan et al. (1991)**, il consiste en une injection de la carragénine sous l'aponévrose plantaire de la patte de la souris, provoquant une réaction inflammatoire (gonflement aigu par formation d'un œdème local), qui peut être réduite par un produit ayant un effet anti-inflammatoire. Cette étude permet de comparer la réduction de l'œdème plantaire après administration des doses du produit de référence et du produit anti-inflammatoire à tester.

##### • **Choix des doses**

A la lumière des résultats fournis par le test de toxicité aigue des concrètes alcooliques, nous avons fait un choix arbitraire d'une dose, qui doit être obligatoirement inférieure à 0,5g/kg, pour cela nous avons opté pour une dose de 100mg/kg, afin d'avoir une marge de sécurité. Concernant les HE, nous avons utilisé la dose de 100mg/kg de poids corporel, rappelant que des doses plus élevées n'ont provoqué aucune mortalité et aucun signe de toxicité sévère lors de la mise en évidence de la toxicité aigue par voie orale.

##### Mode opératoire

Afin de mettre en évidence l'effet anti-inflammatoire, les souris sont réparties en 14 lots de 6 souris chacun, dont 12 lots traités, un lot de référence et un lot témoin (tableau 21). On a utilisé des souris albinos de souche *NMRI*, qui ont été privées d'alimentation la veille de l'expérimentation (une période de jeun approximativement de 18 heures).

- Dans un premier temps, on procède à l'administration des différentes solutions à analyser par gavage à l'aide d'une sonde gastrique (la solution solubilisante, le produit de référence (acide acétylsalicylique), les HE à la dose de 100mg/kg ou l'équivalent d'une dose de 100mg/kg de poids corporel de chaque extrait).

- Après 30 minutes de la prise de la dose indiquée, l'inflammation est provoquée en injectant un volume de 0,025ml d'une solution de carragénine 1% (dans de l'eau physiologique 0,9%) sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche de chaque souris (**Appendice G**).

Tableau 21 : Répartition des lots utilisés pour l'évaluation de l'effet anti-inflammatoire

	N° du lot	Nombre de souris/lot	Administration
	Lot témoin	6	Solution solubilisante (eau physiologique + Tween 80)
	Lot référence (100mg/kg)	6	Substance anti-inflammatoire (acide acétylsalicylique à une dose de 100mg/kg).
Huiles Essentielles (100mg/kg)	Lot 1	6	HEFeMC.
	Lot 2	6	HEFeMN.
	Lot 3	6	HEFrMC.
	Lot 4	6	HEFrMN.
Extraits méthanoliques (100mg/kg)	Lot 5	6	EMFeMC.
	Lot 6	6	EEFeMN.
	Lot 7	6	EMFrMC.
	Lot 8	6	EMFrMN.
Extraits éthanoliques (100mg/kg)	Lot 9	6	EEFeMC.
	Lot 10	6	EEFeMN.
	Lot 11	6	EEFrMC.
	Lot 12	6	EEFrMN.

- Quatre heures après l'induction de l'inflammation, l'activité anti-inflammatoire est évaluée en sacrifiant les souris par l'éther, puis en coupant leurs pattes postérieures au niveau de l'articulation, afin de les peser à l'aide d'une balance analytique (**Appendice G**). Les mesures effectuées serviront à la détermination de deux paramètres clés du processus inflammatoire qui sont : le pourcentage d'augmentation de l'œdème (% AUG: pourcentage d'augmentation du volume de la patte postérieure gauche "PPG", enflée par rapport à la patte postérieure droite "PPD" saine de l'animal) et le pourcentage de réduction de l'œdème (chez les souris traitées par rapport au témoin) selon les formules:

$$\% \text{ AUG} = \frac{\text{Moyenne des poids des PPG} - \text{Moyenne des poids des PPD}}{\text{Moyenne des poids des PPD}} \times 100$$

$$\% \text{ RED} = \frac{\% \text{ AUG de l'œdème témoin} - \% \text{ AUG de l'œdème essai}}{\% \text{ AUG de l'œdème témoin}} \times 100$$

#### II.8.5. Etude de l'effet cicatrisant des huiles essentielles

Afin d'évaluer l'effet cicatrisant des HE, nous avons faits une série de tests, pour établir une formule standard, dans laquelle on incorpore chacune des HE à étudier. Les concrètes ont été exclues de ce test, à cause de leur caractère irritant (IPC>0,5).

### II.8.5.1. Formulation des crèmes dermiques

- **Choix du type d'émulsion et des principes actifs (HE)**

L'objectif assigné à cette étude est la mise au point d'une formule galénique topique adaptée aux principes actifs isolés, n'ayant exprimé aucun effet irritant sur la peau. La forme pharmaceutique choisie est celle d'une émulsion hydrophobe (H/E), qui trouve un large usage pour le traitement local des plaies et des dermatoses (**Lis-balchin et al., 2005 ; Duraffourd et Lapraz, 2002 ; Goetz et Bussier, 2007**). Elle permet également une bonne distribution des principes actifs utilisés. Suite au test de tolérance cutané effectué, nous avons retenu seulement les HE (HEFeMC, HEFeMN, HEFrMC, HEFrMN) comme principes actifs pour la formulation. Ces dernières ont témoigné d'une bonne tolérance cutanée (IPC<0,5).

- **Choix des excipients**

Le choix des excipients a été motivé par des critères standardisés (nature physico-chimique, tolérance cutanée). Plusieurs ingrédients sont utilisés lors de la formulation des crèmes (tableau 22). Ce choix a été fondé sur la simplicité des excipients.

Tableau 22 : Excipients de base des crèmes dermiques

Nom chimique	Caractères	Point de fusion	Usages
Ingrédients de la phase huileuse (lipophile)			
Huile de vaseline	Liquide huileux, incolore, transparent	-	Utilisée dans les pommades pour traiter les brûlures et adoucir la peau.
Acide stéarique	Paillettes blanches, onctueuses au toucher.	70°C	Émulsifiant L/H avec un alcalin. Excellent facteur de consistance : apporte douceur et onctuosité.
Lanoline	Cire onctueuse, de couleur blanche à jaune, très hygrométrique,	40°C	Utilisée comme agent émollient et hydratant de la peau
Alcool cétylique	Écailles blanches et inodores.	55°C	Agent épaississant augmentant la consistance d'une émulsion. C'est un émulsifiant hydro-dispersible.
Alcool benzylique	Liquide incolore d'odeur caractéristique	-15°C	Utilisé pour son effet antiseptique
Propylène glycol	Morceaux blancs, translucides en sections minces.	65°C	Utilisé comme agent de consistance dans les pommades en donnant une texture onctueuse.
Montanox®	Liquide huileux clair de couleur jaune, miscible dans l'eau et à odeur caractéristique	20°C	Utilisé comme émulsifiant et agent solubilisant
Ingrédients de la phase aqueuse (hydrophile)			
Glycérine	Liquide sirupeux, onctueux, incolore, limpide et très hygroscopique, miscible à l'eau	18°C	Utilisée comme additif pour prolonger le pouvoir hydratant d'une crème. C'est un excellent adoucissant.
Triéthanolamine	Liquide transparent et incolore ou jaune, pâle, visqueux, hygroscopique	21°C	Compensateur de pH. Légèrement alcalin, il donne des savons très stables avec l'acide stéarique.

- **Formulation et conditionnement des crèmes**

Nous avons développé une formule d'une crème classique et simple, en s'inspirant d'une préparation indexée dans le formulaire thérapeutique magistral (**Fonteneau et klusiewicz, 2008**), à laquelle nous avons apporté quelques modifications, afin de l'adapter aux principes actifs faisant l'objet de ce travail (tableau 23).

Pour cela, une dizaine d'essais préliminaires ont été effectués, pour trouver les proportions adéquates de chaque excipient, et les caractères organoleptiques et physico-chimiques désirés.

Tableau 23 : Formule adoptée pour la préparation des crèmes.

Composants de la crème	Marges
Phase Huileuse (40%)	
- Huile de vaseline	5-10
- Propylène glycol	1-10
- Acide stéarique	5-15
- Alcool cetylique	5-10
- Alcool benzylique	3-5
- Montanox	8-10
- Lanoline	3-10
- Huile essentielle (PA)	-
Phase Aqueuse (60%)	
- Eau purifiée	-
- Glycérine	3-6
- Triethanolamine	En fonction du pH

#### Mode opératoire (figure 15)

- On effectue une pesée initiale de tous les ingrédients requis pour la formulation.
- Préparation de la phase huileuse : On dépose dans un bécher les quantités appropriées des excipients de la phase huileuse (à l'exception du principe actif) et on le maintient au bain marie à 70°C jusqu'à fusion totale des ingrédients.
- Préparation de la phase aqueuse : On mélange les composants de cette phase dans un deuxième bécher et on le porte au bain Marie à 70°C.
- Le contenu de chaque bécher est homogénéisé.
- La phase aqueuse est versée dans la phase huileuse par petites fractions, sous une agitation manuelle rapide, ensuite le bécher contenant les deux phases est maintenu sous agitation magnétique continue (allant jusqu'à 100 tours/min) jusqu'à refroidissement.
- A température ambiante (25-30°C), nous ajoutons le principe actif, petit à petit, et sous une agitation continue.

Une crème placebo est préparée dans les mêmes conditions et avec les mêmes ingrédients, sauf que l'HE est remplacée par de l'eau purifié. Nous avons utilisé comme conservateur "la vitamine C" à 0,005%.

Ce choix a été motivé par des critères législatifs, physico-chimiques, microbiologiques et toxicologiques dont la tolérance cutanée (**Martini, 2006**). Le conditionnement est fait dans des petits pots stériles en plastique (**Appendice G**).

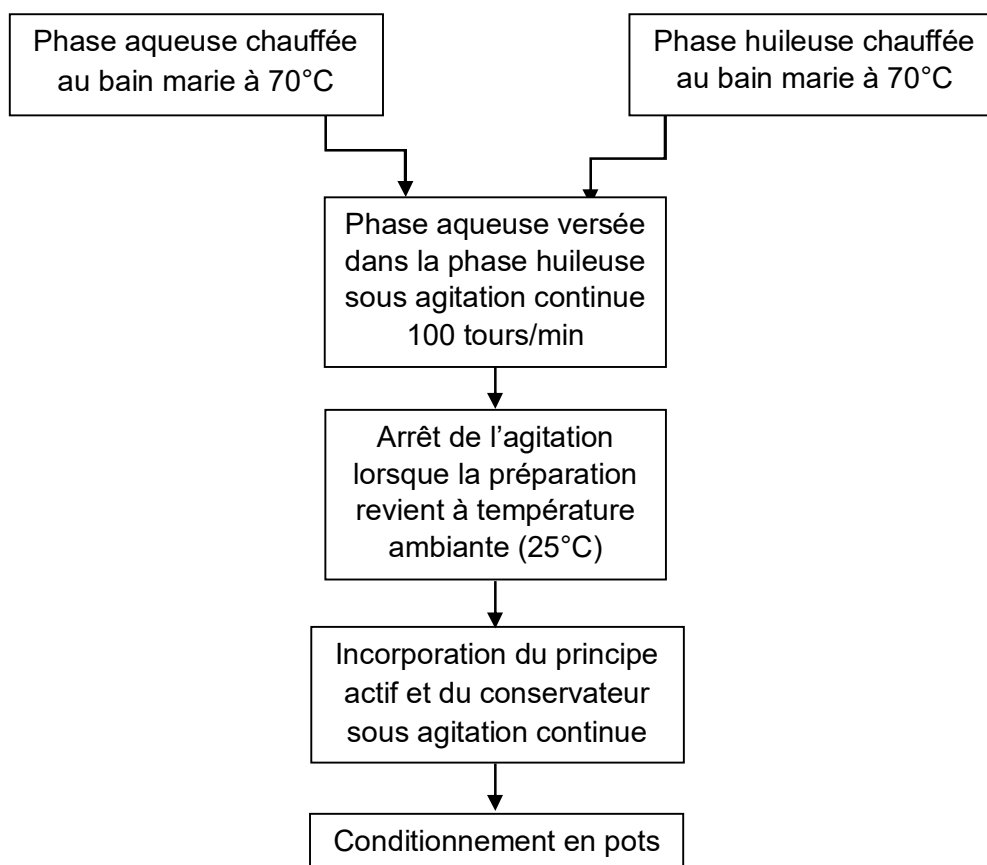


Figure 15 : récapitulatif du procédé de formulation de la crème dermique

#### II.8.5.2. Contrôles organoleptique, physico-chimique et microbiologique des crèmes formulées

Une grande variété de contrôles a été nécessaire, pour définir les caractéristiques des préparations topiques obtenues selon des protocoles standardisés (**Pharmacopée européenne, 2005; Brochette, 2006 ; Wehler, 2007**).

##### A.1. Contrôle des caractères organoleptiques

Les propriétés organoleptiques regroupent tout ce qui est perceptible par les sens: aspect, couleur, odeur et texture (**Brochette, 2006**). L'examen macroscopique concerne également la recherche d'une opacité ou d'une texture particulière.

##### A.2. Contrôle de l'homogénéité

Une certaine quantité de crème est étalée sur une lame, puis recouverte d'une lamelle pour une observation microscopique. Ce test permet d'apprécier l'homogénéité de la crème formulée.

##### A.3. Evaluation de la stabilité et du vieillissement accéléré

Les principaux phénomènes d'instabilité sont appréciés dans une éprouvette graduée par l'observation à intervalle de temps régulier. La coalescence des gouttes ou le déphasage ont été recherchés par centrifugation, à vitesse constante (4500 tr/mn pendant 30 min).



Pour évaluer l'influence de l'air, nous avons exposé un échantillon de chaque crème, à l'air libre pendant une semaine. Afin de déterminer l'influence de la température, nous avons soumis un échantillon de chaque crème à la température ambiante, sous la lumière du jour, pendant une semaine.

#### A.4. Contrôle des caractères physico-chimiques

##### - **Détermination du pH**

Cette mesure est effectuée à l'aide d'un pH-mètre (Type *Hanna*) équipé d'une électrode, après dilution à 1/10 de chaque crème dans de l'eau distillée.

Nous avons également évalué la variation du pH de chaque crème par une mesure directe à l'aide d'un pH-mètre, durant les cinq jours qui suivent la formulation.

Cette mesure est nécessaire, car le pH peut avoir une influence sur la stabilité physique d'une crème, ainsi que sur son aspect thérapeutique.

##### - **Détermination de la viscosité**

Elle est mesurée à l'aide d'un viscosimètre (Type *Brookfield*), elle correspond à la résistance d'un fluide à l'écoulement.

#### A.5. Contrôle de la qualité microbienne des crèmes

L'objectif de ce contrôle est de vérifier si les crèmes préparées répondent aux exigences microbiologiques, spécifiées dans les monographies de la **pharmacopée européenne (2005)**. Les analyses à effectuer consistent à rechercher et à dénombrer des germes aérobies viables totaux.

##### • Dénombrement des germes viables totaux (mésophiles et champignons)

L'essai est effectué dans des conditions d'asepsie, dans un endroit exempt de contamination. L'analyse des crèmes s'articule en deux étapes :

- **Echantillonnage et hydratation de la crème:** La préparation des dilutions (1/10) s'effectue par dissolution de 10 g de l'échantillon à analyser dans 90 ml de la solution tampon peptonée au chlorure de sodium pH 7,0.

##### - **Evaluation des populations microbiennes présentes dans l'échantillon :**

- **Dénombrement des germes aérobies viables totaux:** Le milieu utilisé pour le dénombrement des germes viables totaux est la gélose aux peptones de caséine et de soja, elle permet le développement de toutes les bactéries qui peuvent se multiplier à 30°C.

##### Mode opératoire

- On introduit, avec une pipette stérile, dans une boîte de Pétri 1 ml de la crème diluée et 15-20 ml de milieu gélosé aux peptones de caséines et de soja liquéfié, dont la température est inférieure ou égale à 45°C.

- On mélange le contenu de la boîte de Pétri en la faisant pivoter dans le sens circulaire à gauche, puis à droite et on laisse reposer jusqu'à solidification.
  - Les boîtes sont incubées à 30-35°C pendant 72 heures.
  - On dénombre les colonies qui se développent, puis on calcule le nombre de colonies par millilitre de produit.
- **Dénombrement des levures et moisissures** : Le dénombrement des levures et des moisissures est effectué sur un milieu Sabouraud, supplémenté de chloramphénicol.

#### Mode opératoire

- On introduit dans une boîte de pétri 1 ml de la crème diluée avec une pipette stérile et 15-20 ml de milieu Sabouraud liquéfié, additionné de quelques gouttes d'antibiotique stérile.
- Le contenu de la boîte de Pétri est homogénéisé, en la faisant pivoter dans le sens circulaire à gauche puis à droite, puis on laisse reposer les boîtes jusqu'à solidification.
- Les boîtes sont incubées à 20-25°C pendant 5 jours.
- On dénombre les colonies qui se développent, puis on calcule le nombre de colonies par millilitre de produit. Le nombre de germes aérobies viables totaux est la somme du nombre de bactéries et du nombre de moisissures et levures trouvées dans les deux boîtes des milieux : Soja et Sabouraud.

#### II.8.5.3. Evaluation de l'activité cicatrisante des crèmes

La mise en évidence des effets cicatrisants des crèmes formulées, a été évaluée par le test de cicatrisation sur des plaies en spots, inspiré du protocole décrit par **Arunachalam et Parimelazhagan (2013)**.

##### A.1. Répartition des lots

Cette étude permet de comparer les différentes cicatrices en spot et leur évolution sur la base de la modification de la surface de la cicatrice. Pour cela, 30 rats de race Albinos, sont répartis en 06 lots, à raison de 5 rats par lot (tableau 24), dont quatre lots traités, un lot placebo et un lot référence. Le placebo contient les mêmes composants de la crème formulée, mais il est dépourvu de PA.

Tableau 24: Répartition des rats selon les lots ainsi que leurs traitements appropriés.

Lots	Traitements
Lot E1 (placebo)	Plaies traitées par le placebo
Lot E2 (référence)	Plaies traitées par le produit de référence Madécassol®
Lot C1	Plaies traitées par la crème à base de l'HE des feuilles de <i>M. communis</i>
Lot C2	Plaies traitées par la crème à base de l'HE des feuilles de <i>M. nivellei</i>
Lot C3	Plaies traitées par la crème à base de l'HE des fruits de <i>M. communis</i>
Lot C4	Plaie traitée par la crème à base de l'HE des fruits de <i>M. nivellei</i>

## A.2. Préparation des animaux

La veille de l'expérimentation, les animaux sont pesés, marqués au niveau de leur queue et repartis en 6 lots.

La première étape de l'expérimentation consiste à l'épilation de la région dorsolombaire des rats, ayant reçu préalablement une injection intra-péritonéale, à l'aide d'un anesthésiant : la Kétamine, la dose administrée est estimée à 0,5 ml/kg de poids corporel.

## A.3. Provocation des blessures

On réalise deux incisions circulaires de 1 cm de diamètre (une incision pour l'essai et l'autre servira comme témoin), dans la partie dorso-lombaire préalablement rasée de la peau de l'animal anesthésié, avec un ciseau et une pince stériles, utilisés pour enlever la partie de la peau à éliminée.

Deux heures après la réalisation des incisions en spot (figure 16), on prend les empreintes des surfaces des plaies (essai et témoin) sur papier transparent à l'aide d'un feutre indélébile dès le jour J<sub>0</sub> et durant la période du traitement au J<sub>3</sub>, J<sub>7</sub> et J<sub>9</sub>.

## A.4. Application des traitements

Les applications des produits à tester (crèmes formulées, produit de référence, placebo) se font quotidiennement sur la plaie essai, jusqu'au terme de période d'expérimentation (09 jours). Dès le premier jour d'essai, les rats sont transférés dans des cages individuelles et sont maintenus *Ad libitum*.

La plaie témoin reste sans traitement. Il est a noter qu'à chaque prélèvement d'empreintes (J<sub>0</sub>,J<sub>3</sub>,J<sub>7</sub>,J<sub>9</sub>), s'il y a apparition de croûte, il est indispensable de bien décoller celle-ci à l'aide d'une gaze imbibée d'eau physiologique (0,9%), pour une bonne prise d'empreinte de la surface des plaies. Après l'acquisition des données, on calcule la surface des plaies à l'aide du logiciel d'architecture AutoCAD 2010.

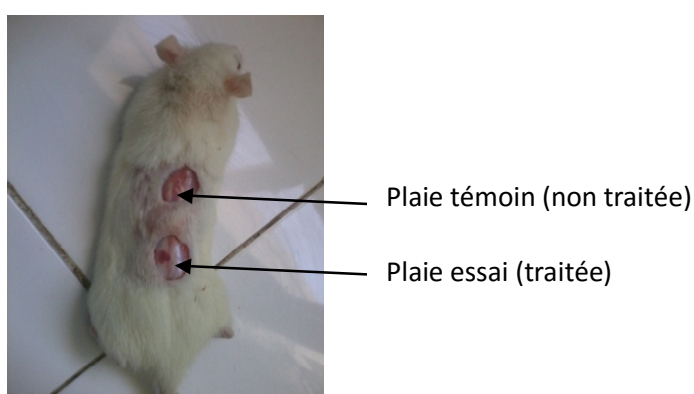


Figure 16: Incision en spot dans la région dorsolombaire du rat

L'efficacité de la cicatrisation est évaluée en calculant le pourcentage de réduction des spots pou chaque essai, qui est calculé à l'aide de la formule:

$$\%Reduction = \frac{SExJ0 - SExJn}{SExj0} \times 100$$

SExJ<sub>0</sub> : Moyenne de superficies des plaies traitées par le produit à tester au J<sub>0</sub> (avant le traitement).

SExJ<sub>n</sub> : Moyenne de superficies des plaies traitées par le produit à tester au dernier jour de traitement (9<sup>ème</sup> jour).

#### II.8.6. Etude du pouvoir anti-microbien des huiles essentielles et des extraits

L'évaluation du pouvoir anti-microbien est réalisée par la technique de diffusion des disques sur milieu gélosé (**Gullüce et al., 2006**). Dès l'application des disques imbibés par les substances actives à analyser, ces dernières diffusent uniformément. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires, correspondant à une absence de culture (**Fauchère, 1997**). Le concept de ce test est inspiré de l'antibiogramme qui teste l'effet des antibiotiques sur les micro-organismes en mesurant leurs zones d'inhibition. En 1970, cette pratique a été adoptée par des aroma-thérapeutes, qui la baptisent "Aromatogramme" (**Valnet, 1983**).

##### II.8.6.1. Les substances testées

Les HE des feuilles et des fruits des deux espèces, recueillies par simple décantation, ainsi que les concrètes méthanoliques et éthanoliques des feuilles, des fruits et des cals ont été testées. Généralement, les HE sont peu solubles dans l'eau. Ceci pose un grand problème dans l'étude de leurs propriétés anti-microbiennes. Pour cela de nombreux auteurs ont recommandé l'utilisation de solvants ou de substances émulsifiantes (**Pellucuer et al., 1976; Benjilali et al., 1986; Lahlou, 2004**).

Un essai préliminaire pour la sélection du solvant approprié pour la solubilisation des HE et des concrètes a été effectué. A cette fin, nous avons testé la toxicité du Myristate d'isopropyle, du méthanol et de l'éthanol, vis-à-vis des souches microbiennes sélectionnées: le solvant doit présenter un grand pouvoir solubilisant et la moindre toxicité sur les micro-organismes, afin d'être sélectionné comme excipient, pour la préparation des solutions à tester. Ces dernières sont préparées à raison de 2 mg/ml, soit une charge de 50 µg/ disque.

##### II.8.6.2. Les milieux de culture utilisés

Les levures et les champignons sont repiqués sur le milieu Sabouraud, c'est un milieu très recommandé et commode pour la culture de champignons saprophytes et pathogènes. Le milieu pomme de terre dextrose agar (PDA), préparé au laboratoire, a servi pour la culture des champignons phytopathogènes. Cependant, les bactéries sont repiquées sur gélose nutritive et/ou gélose Muller-Hinton. Ces milieux de culture ont été préalablement coulées et séchées sur des boîtes de Pétri stériles.

### II.8.6.3. Souches microbiennes

Les souches utilisées pour l'évaluation du pouvoir anti-microbien proviennent de l'institut Pasteur d'Alger, elles regroupent quatorze souches bactériennes, deux levures et quatre souches fongiques phytopathogènes (tableau 25)

Tableau 25: Liste des souches microbiennes utilisées.

	Souche	ATCC	Souche	ATCC
<b>Bactéries</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	19002
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	<i>Enterobacter aerogenes</i>	13043
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	49619	<i>Escherichia coli</i>	25922
	<i>Moraxella catarrhalis</i>	49143	<i>Salmonella typhi</i>	4404540
	<i>Bacillus cereus</i>	11778	<i>Shigella flexneri</i>	25936
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883	<i>Proteus mirabilis</i>	7002
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	<i>Enterococcus faecalis</i>	237013
<b>Levures</b>	<i>Candida albicans</i>	10239	<i>Candida krusei</i>	6258
<b>Champignons</b>	<i>Alternaria sp</i>	-	<i>Fusarium oxysporum ssp lycopersici</i>	-
	<i>Penicillium sp</i>	-	<i>Fusarium oxysporum ssp albidinis</i>	-

Ces micro-organismes ont été choisis pour leurs fréquences élevées dans les contaminations humaines et végétales.

### II.8.6.4. Contrôle microbiologique des micro-organismes

Avant la réalisation des tests microbiologiques, toutes les souches bactériennes ont subi une série de repiquages, pour s'assurer de leur pureté associés à un examen microscopique et une coloration de Gram. Les champignons phytopathogènes ont été soumis à un exam macro et microscopique afin de confirmer leur identité.

#### A.1. Préparation des précultures microbiennes

- Précultures bactériennes

Les souches bactériennes ont été ensemencées dans des tubes à essai, contenant un bouillon nutritif puis incubées à 37°C, pendant 24 heures, afin de stimuler leur développement. Après croissance bactérienne, ces souches ont été repiquées sur une gélose nutritive coulée en boîte de Pétri, puis incubées à 37°C, pendant 24 heures.

- Précultures fongiques

Des implants (carrés de 5mm de côté) sont prélevés à partir des cultures mères des souches fongiques filamenteuses, ensemencées sur milieu PDA en boîtes de Pétri et incubées à 25°C, pendant 7 jours.

Les levures sont ensemencées par la méthode de stries, sur milieu Sabouraud, en boîtes de Pétri. Ces dernières sont incubées à 25°C, pendant 48 heures

### II.8.6.5. Réalisation du test anti-microbien

Des disques stériles de papier buvard, imprégnés par la substance active à tester, sont déposés sur le milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture jeune de la souche à étudier. Dès l'application des disques, les substances actives diffusent de manière uniforme. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires, correspondant à une absence de culture (**Guérin-Faublée et Carret, 1999; Fauchère, 2002**).

#### Mode opératoire

1. Préparation des boîtes de culture : On fait fondre, dans un bain Marie à 95°C, le milieu de culture approprié, ensuite on le verse aseptiquement dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre, à raison de 10ml/boîte, l'épaisseur du milieu doit être de 4mm (**Veličković, 2003**). On laisse solidifier les milieux de culture dans les boîtes de Pétri sur la paillasse, à température ambiante.
2. Préparation de l'inoculum : On prépare plusieurs suspensions, selon la souche microbienne choisie:
  - **Préparation des suspensions bactériennes** : On prépare une suspension bactérienne (inoculum), à partir d'une jeune culture réactivée de 18 heures pour les bactéries. On réalise une suspension trouble pour chaque germe, en prélevant 3 à 5 colonies bien distinctes, à l'aide d'une anse de platine stérile, que l'on introduit dans 10ml d'eau physiologique stérile (0,9%), ensuite la suspension est bien homogénéisée au vortex. La densité optique de chaque suspension doit être comprise entre 0,08 et 0,1 à une longueur d'onde de 625 nm, qui correspond environ à  $10^8$  UFC par ml pour les bactéries. Elle peut être ajustée en ajoutant des colonies bactériennes s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologie stérile s'il est trop concentré. L'inoculum ainsi préparé doit être ensemencé dans les 15 min qui suivent sa préparation.
  - **Préparation des suspensions de levures**: Chaque souche de levures est ensemencée par la méthode des stries sur le milieu Sabouraud. Après 24 à 48 h d'incubation à 25°C, 4 à 5 colonies bien isolées sont prélevées et émulsionnées dans 10ml d'eau physiologique stérile (0,9%), la densité optique de la suspension fongique est mesurée au spectrophotomètre à 625nm (elle doit avoisiner 0,3)
  - **Préparation des suspensions sporales (champignons phytopathogènes)**: Des implants (carrés de 5mm de côté) de la souche fongique à tester sont prélevés à partir de précultures âgées de 7 jours, et introduits dans 10ml d'eau physiologique stérile. Après agitation au vortex, on obtient une suspension sporale. La densité optique de cette suspension mesurée à 625nm, doit être égale à 0,3.
3. Ensemencement des boîtes : On imbibe un écouvillon stérile avec la suspension trouble, et on l'ensemence en stries serrées sur la gélose en faisant pivoter la boîte de pétri horizontalement à 60°, pour couvrir toute sa surface.

Des disques stériles normalisés de 9 mm de diamètre sont imbibés avec 25µl de la substance à tester, puis à l'aide d'une pince stérile, on les dépose soigneusement sur la surface de la gélose ensemencée, au préalable, par la suspension microbienne (3 boîtes pour chaque espèce microbienne). On doit également établir des repères pour reconnaître la correspondance de chaque disque. Les boîtes sont ensuite scellées avec un ruban adhésif. Des témoins sans extraits ont été réalisés :

- Un contrôle négatif sur Mueller-Hinton imprégné uniquement avec le solvant solubilisant (Myristate d'isopropyle), et un contrôle positif avec un antibiotique de référence: l'Amoxicilline pour les souches bactériennes pathogènes (Ø:9mm, 50µg/disque).

- Un contrôle négatif sur les milieux Sabouraud et PDA avec le solvant solubilisant (Myristate d'isopropyle), et un contrôle positif avec un fongicide de référence: la Nystatine pour les levures et les champignons (Ø:9mm, 50µg/disque).

4. Incubation : On laisse les disques diffuser sur la paillasse pendant 30 min, puis on transfère les boîtes pour incubation dans une étuve bactériologique, en les renversant sur leur couvercle (37°C pendant 24h pour les bactéries et à 25°C pendant 48h pour les levures et 4 jours pour les champignons).
5. Lecture : Après l'écoulement du temps d'incubation requis, la sensibilité des souches testées est déterminée, en mesurant les diamètres des zones d'inhibition développée autour du disque, à l'aide d'un pied à coulisse (exprimé en mm). La zone d'inhibition est définie comme étant une auréole formée autour du disque, où aucune croissance n'est observée (**Ponce et al., 2003**).

Les résultats peuvent être classés, d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des substances testées :

Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 10mm.

Moyennement sensible : diamètre compris entre 10 à 14 mm.

Très sensible : diamètre compris entre 15 à 19 mm.

Extrêmement sensible : diamètre ≥ 20 mm

- **Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de contact direct en milieu liquide**

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration de la substance à tester, où aucune croissance bactérienne n'est observée en 24 h (**Makhloufi, 2011**). Elle est pratiquée sur les souches qui ont présenté une nette sensibilité à l'égard des HE/extraits testés (Zone d'inhibition ≥15mm).

Pour chaque gamme de dilutions des substances à tester (36 mg/ml, 18 mg/ml, 9 mg/ml, 4,5 mg/ml et 2,25 mg/ml, 1,125 mg/ml, 0,563 mg/ml), on prépare une série de tubes contenant chacun 1ml du milieu de culture liquide approprié et un millilitre de l'inoculum microbien.

Après une bonne homogénéisation, on ajoute 1ml de la substance diluée dans son tube approprié, l'ensemble est incubé à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries, 25°C pour les levures et pendant 4 jours pour les champignons phyto-pathogènes. Tous les essais sont réalisés en triplicata.

L'interprétation correspond à la plus faible concentration de la substance à tester, pour laquelle le milieu de culture ne devient pas trouble, déclarant l'absence de toute croissance bactérienne.

## II.8.7. Etude de l'activité anti-oxydante des huiles essentielles et des extraits

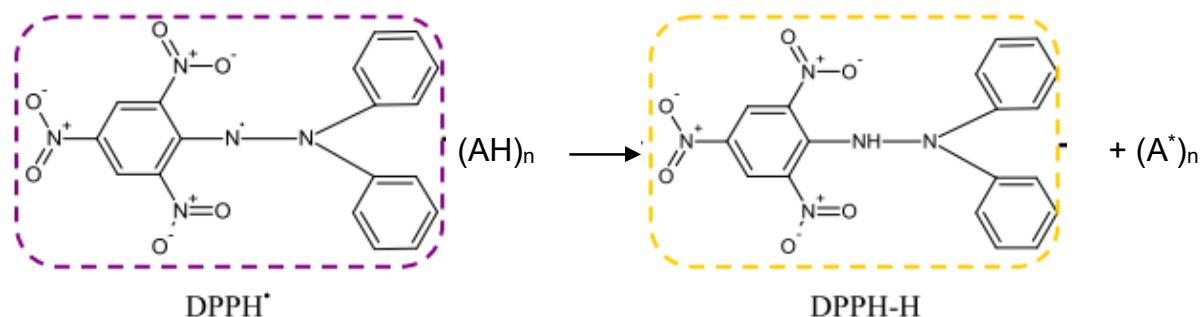
### II.8.7.1 Pouvoir réducteur des radicaux libres par le test DPPH

Le pouvoir anti-oxydant des HE et des extraits a été évalué par le test DPPH (**Sanchez-Moreno et al., 1998**).

#### Principe

Le 1,1-DiPhényl-1,2PicrylHydrazyle ou DPPH est un radical libre, il présente une absorption spécifique à 515 nm, qui lui confère une couleur violette.

Lorsqu'il est piégé par des substances anti-oxydantes, la forme réduite confère à la solution une coloration jaune pâle, l'intensité de la décoloration du réactif en solution dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance anti-radicalaire (**Dong-Sun et al., 2001**). On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation :



(AH)<sub>n</sub> représente un composé anti-oxydant capable de céder un hydrogène au radical DPPH<sup>•</sup> (violet) pour le transformer en molécule DPPH-H de couleur jaune.

- **Préparation de la solution DPPH**

On prépare une solution de DPPH 0.025 g/l en dissolvant 25 mg de DPPH (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>; M:394,33), dans 1000 ml de méthanol, ce réactif doit être fraîchement préparé et maintenu à l'abri de la lumière.



- **Préparation des échantillons**

On prépare pour chaque extrait à tester trois dilutions (0,25 ; 0,5 et 1mg/ml de méthanol), afin de pouvoir tracer une droite à partir de laquelle, on déduit le pourcentage de réduction des radicaux libres.

#### Mode opératoire

Un volume de 50 µl de chaque substance à tester (0,25 ; 0,5 et 1mg/ml) est ajouté à 1,95 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,025 g/l). Parallèlement, un blanc est préparé en mélangeant 50 µl de méthanol avec 1,95 ml de la solution méthanolique de DPPH. Après 30 min d'incubation à l'obscurité, et à température ambiante, la lecture de l'absorbance (Abs) est faite à 515 nm. Les contrôles positifs utilisés sont: l'acide ascorbique, la quercétine et l'α-tocophérol, dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions.

Pour chaque concentration, le test est répété trois fois. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition des radicaux libres (I%), qui est déterminé par la formule de **Wang et al. (1998)**:

$$I\% = [(Abs\ blanc - Abs\ \acute{e}chantillon) / Abs\ blanc] \times 100$$

La valeur EC<sub>50</sub> a été déterminée pour chaque extrait, elle correspond à la concentration du substrat, qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH (**Wang et al., 1998**). Les valeurs moyennes des EC<sub>50</sub> ont été calculées par les régressions linéaires des trois essais séparés pour chaque substance étudiée, où l'abscisse représente la concentration des composés testés et l'ordonnée représente l'activité anti-oxydante en pourcentage.

#### II.8.7.2. Pouvoir réducteur du fer par le test FRAP

Le pouvoir chélateur des ions Fe<sup>2+</sup> est mesuré selon la méthode FRAP (**Ferric Reducing Antioxidant Power**) rapportée par **Oyaizu (1986)**.

#### Principe

Le principe de ce test est basé sur la réduction des ions ferriques (Fe<sup>3+</sup>), présents dans le complexe K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> en ions ferreux (Fe<sup>2+</sup>), l'extrait à tester fournit les électrons stabilisateurs (réducteurs), s'il exerce un effet anti-oxydant (**Chung et al., 2002**). C'est un test universel qui peut être appliqué chez les plantes, les plasmas ainsi que les extraits organiques et aqueux (**Li et al., 2008**). Plus la couleur bleue est intense, plus l'échantillon analysé est considéré comme un bon réducteur.

#### Mode opératoire

Un millilitre de chaque extrait à tester (0,25/ 0,5 et 1mg/ml) est mélangé avec 2,5 ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (1%).

L'ensemble est vigoureusement agité puis incubé au bain Marie à 50°C, pendant 20 min, ensuite 2,5ml d'acide trichloroacétique (TCA 10%) sont ajoutés. Les tubes sont ensuite centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min. Un aliquote (2,5ml) de surnageant est combiné avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution aqueuse de FeCl<sub>3</sub> (0,1%).

La lecture de l'absorbance est réalisée à 700 nm, contre un blanc préparé dans les mêmes conditions, mais en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée. L'acide ascorbique et la quercétine sont utilisés comme contrôles positifs, dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions opératoires.

Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Hubert, 2006**). Les résultats sont exprimés en pourcentage de réduction selon la formule:

$$\% \text{ Réduction} = [ (\text{Abs blanc} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs blanc} ] \times 100$$

Abs : Absorbance à la longueur d'onde de 700 nm.

## II.9. Analyse statistique

Tous les essais (24 tubes par essai) ont été répétés trois fois, et réalisés dans les mêmes conditions, pour l'ensemble des mesures de la cinétique de croissance des vitro-semis et des micro-boutures, ainsi que la détermination des pourcentages de germination, de débourrement et de callogenèse. Il en est de même pour les paramètres phytochimiques et physico-chimiques analysés chez les espèces étudiées. Les calculs ont été vérifiés par le logiciel SPSS. De même, des tests d'analyse de la variance à un seul facteur et des corrélations ont été établis entre les différentes variables. Les différences ont été considérées significatives à  $p < 0,05$ .

## RESULTATS ET DISCUSSION

### III.1. Etude botanique des plantes

Etant donné que les deux espèces étudiées appartiennent au même genre, elles partagent en commun un grand nombre de critères macro et microscopiques.

#### III.1.1. Etude morphologique

##### III.1.1.1. Examen macroscopique des feuilles

- *M. communis*

Les feuilles sont très aromatiques, d'un vert brillant persistant, opposées décussées (figure 17). Chaque feuille est caractérisée par un limbe simple et entier, à contour lisse, avec une forme ovale lancéolée, de 15 à 45 mm de long sur 10 à 30 mm de large (valeurs extrêmes), et présentant une nervation pennée. Les feuilles se raccordent avec l'axe principal de la plante par un pétiole rougeâtre très court de 1 à 2 mm, le stipule est absent (figure 18).



Figure 17 : Disposition opposée décussée des feuilles sur la tige de *M. communis*.

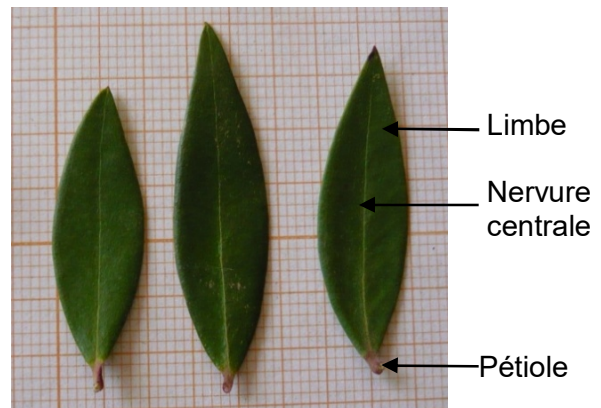


Figure 18: Feuilles simples à limbe entier de *M. communis*.

A l'éclatement des bourgeons, les jeunes feuilles sont très tendres, pubescentes avec une teinte pourpre, qui persiste durant le premier mois de croissance. Ensuite le limbe devient de plus en plus cutinisé, coloré en vert foncé et dépourvu de poils. Il faut noter que, durant toute la vie de la feuille, la teinte du limbe reste homogène. De petites glandes sécrétrices translucides, à localisation sub-épidermiques sur ses deux faces, sont visibles sous loupe binoculaire.

Les feuilles du myrte qui poussent dans les endroits très ensoleillés, présentent une taille plus petite que celles poussant dans les zones ombrées. Cela est justifié par le fait que les feuilles poussant à l'ombre, ont besoin d'élargir leur surface foliaire, afin d'intercepter le maximum de lumière indispensable pour la photosynthèse.

- *M. nivellei*

Le feuillage est d'un vert sombre, persistant et luisant, caractérisé par une phyllotaxie opposée décussée (figure 19), avec des entre-nœuds courts. Chaque feuille est caractérisée par un limbe entier, à nervation pennée, munie d'un contour lisse et une forme allongée à extrémité pointue, de 20 à 50 mm de long sur 5 à 10 mm de large (valeurs extrêmes). Le limbe foliaire peut être qualifié de sub-sessile, parce qu'il est raccordé à la tige par un pétiole très court rougeâtre et poilu ne dépassant pas 1mm, le stipule est absent (figure 20).



Figure 19: Disposition des feuilles sur la tige

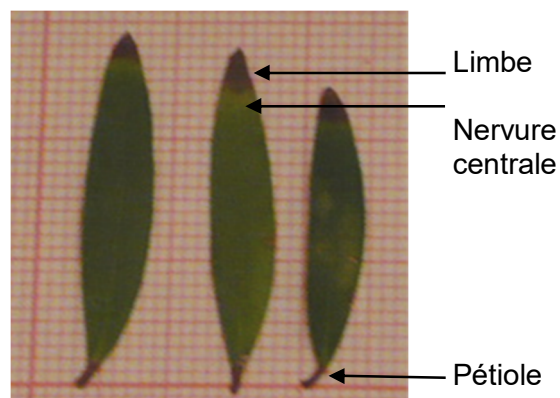


Figure 20: Feuilles de *M. nivellei*

A l'éclatement des bourgeons, les jeunes feuilles sont tendres et pubescentes, présentant une pigmentation rouge foncée, qui vire au pourpre. Cette teinte persiste durant le premier mois de croissance. Ensuite le limbe devient progressivement glabre, plus brillant et coriace, l'ensemble évolue rapidement vers le vert clair puis devient vert foncé. La pigmentation persiste chez les feuilles adultes, en se localisant exclusivement au niveau du pétiole et à la pointe du limbe foliaire. Les deux faces renferment un nombre important de petites glandes sécrétrices translucides sub-épidermiques, visibles sous loupe.

Les feuilles des deux espèces étudiées présentent une odeur caractéristique et très agréable, avec un aspect parfaitement lisse. Cependant, elles présentent une saveur très astringente ainsi que d'autres caractéristiques morphologiques et organoleptiques communes (tableau 26).

Tableau 26: Caractéristiques morphologiques et organoleptiques des feuilles.

Caractéristiques morphologiques	Feuilles de <i>M. communis</i>	Feuilles de <i>M. nivellei</i>
Forme de la feuille	Limbe lancéolé à symétrie bilatérale et à contour lisse	Fusiforme à limbe lancéolé et à symétrie bilatérale et à contour lisse
Couleur	Vert foncé luisant	Vert foncé avec une extrémité pigmentée en violet
Aspect de la feuille	Lisse	Lisse
Phyllotaxie	Feuilles opposées décussées	
Glandes sécrétrices	Nombreuses sur les deux faces, clairement visibles sous loupe binoculaire, à localisation sub-épidermique	
Goût	Parfumé, astringent, amer	
Taille moyenne	15-45mm x 10-30 mm	20-50 mm x 5-10 mm

### III.1.1.2. Examen macroscopique et organoleptiques des fruits

Les fruits des deux espèces étudiées sont des baies polyspermes peu charnues, couronnées par le calice, de forme ellipsoïde ou sub-globulaire. Elles sont disposées à l'aisselle des feuilles et renferment un nombre important de graines.

- *M. communis*

Chez *M. communis*, les baies sont sub-globulaires (figure 21) et présentent en moyenne une dimension qui est de 10-12 x 7-9 mm (figure 22). Elles sont portées par un pédoncule fin, légèrement poilu, pouvant atteindre 20 mm de long (figure 23).

A la fin de la saison estivale, les baies commencent à se développer, elles sont d'abord vertes et très astringentes. A maturité, elles acquièrent une couleur bleue noirâtre et deviennent sucrées, avec une légère saveur astringente, ces baies sont très appréciées par les oiseaux et les insectes.

Les graines sont dicotylédones, réniformes, de couleur jaune avec un tégument externe lisse et très dur et un élaïosome central brun. Le nombre moyen des graines est de  $9,05 \pm 0,66$  graines/baie, elles mesurent en moyenne 4 x 2 mm (figure 24). Le poids du péricarpe représente 46,95% du poids total du fruit.



Figure 21 : Disposition des baies à l'aisselle des feuilles

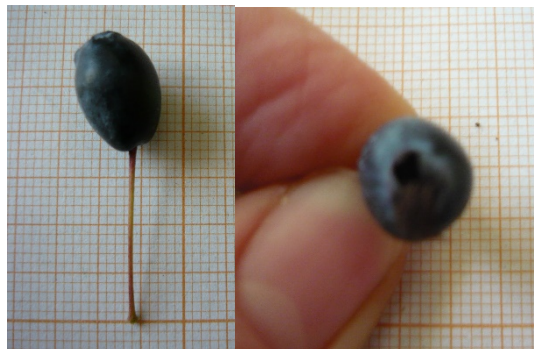


Figure 22 : Taille et calibre de la baie

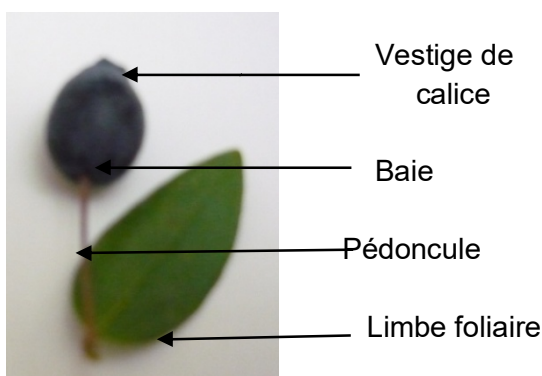


Figure 23: Fruit de *M. communis* vu de profil

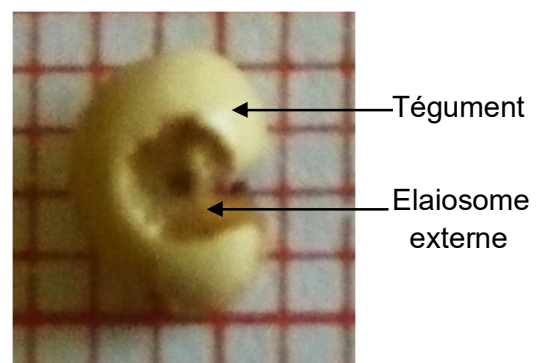


Figure 24 : Taille de la graine (G:x4)



- *M. nivellei*

Les baies de *M. nivellei* ont une dimension plus petite que celle de l'espèce *M. communis*, elle est de l'ordre de 5-8 x 4-6 mm, leur couleur est plus sombre et de forme plutôt ovoïde (figure 25), elles sont portées par un pédoncule de 5 à 8 mm de long (figure 26 et figure 27). A maturité, elles deviennent sucrées et acquièrent une couleur violet foncée.

Les graines sont dicotylédones et morphologiquement similaires à celle de l'espèce *M. communis*. Cependant, elles sont très petites et plus nombreuses, avec une taille moyenne qui avoisine 3 x 2 mm (figure 28). Le nombre moyen des graines est de  $8,34 \pm 1,2$  graines/baie. Le poids du péricarpe représente 39,53% du poids total du fruit.



Figure 25: Disposition des baies sur le rameau



Figure 26: Taille et diamètre de la baie

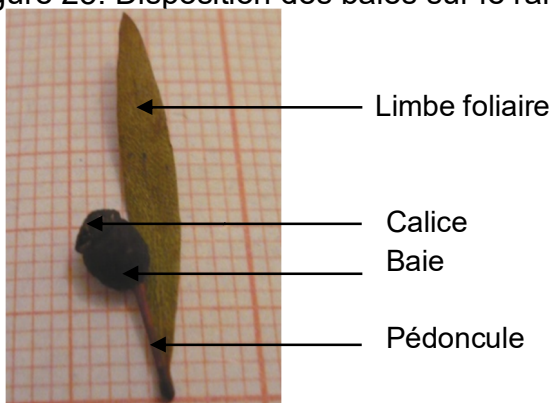


Figure 27: Fruit de *M nivellei* vu de profil

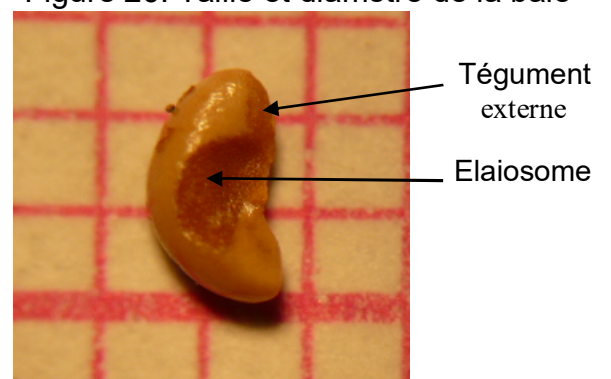


Figure 28: Taille de la graine (G : x6)

Nous avons constaté que les baies des deux plantes étudiées, partagent en commun certaines caractéristiques morphologiques et organoleptiques, notamment concernant l'aspect et l'épaisseur de l'épicarpe, l'aspect et la texture du mésocarpe, ainsi que la consistance du fruit (tableau 27).

Tableau 27: Caractéristiques morphologiques et organoleptiques des fruits étudiées

Caractéristiques morphologiques	Fruits de <i>M. communis</i>	Fruits de <i>M. nivellei</i>
Forme du fruit	Arrondis/sub-globulaire	Ovoïde
Couleur a maturité	Bleu noirâtre	Violet foncé
Aspect de l'épicarpe	Lisse	
Epaisseur de l'épicarpe	Fin	
Couleur de la pulpe (mésocarpe)	Blanchâtre	
Texture	Fibreuse	
Consistance	Molle	
Goût	Parfumé, légèrement amer	Parfumé et sucré
Dimensions du fruit (mm)*	10-12 x 7-9	5-8 x 4-6
Nombre moyen des graines /baie*	9,05±0,66	8,34±1,2
Taille de la graine (mm)*	4x2	3x2
Poids du péricarpe/poids du fruit frais)x100*	46,95%	39,53%
Poids des graines/poids du fruit frais)x100*	53,05%	60,47%

\* Ces résultats sont obtenus sur un échantillon de 1000 baies.

**Traveset et al. (2001)** ont rapporté que le fruit de *M. communis* présente des dimensions de 11,3 x 10,21 mm, et renferme en moyenne 12 graines. Cependant, les travaux de **Aronne et Rossu (1997)** ont rapporté qu'il renferme 3 à 3,5 graines/baie. Dans ce même contexte, **Aydin et Ozcan (2007)**, ont démontré que les baies du myrte commun, poussant spontanément au sud de la Turquie, présente une taille estimée à 13,75±1,9 mm de long et 7,57±1,14 mm de large, ils ont également constaté que la taille des baies est fortement influencée, par la fréquence de la pluviométrie typique de la région de récolte des spécimens étudiés. Les faibles dimensions des baies que nous avons étudié, semblent être également en corrélation avec les critères climatologiques de chaque site de récolte.

### III.1.2. Etude histo-anatomique

Nous avons procédé à la réalisation de coupes histologiques dans les structures callogènes obtenus *in vitro*, ainsi que dans les feuilles et les tiges des plantes récoltées *in situ*, afin d'étudier qualitativement la répartition histologique de certains constituants cellulaires après coloration histochimique.

#### III.1.2.1. Etude histologique des cals

Pour les cals âgés de six semaines, l'observation des coupes a révélé la présence de cellules larges, comportant ou non des noyaux dans la partie centrale du cal. Elles résultent d'une différenciation des cellules des explants de feuilles ou d'hypocotyles, pour la régénération d'un méristème primaire. Cependant les cellules situées à la périphérie du cal sont très petites, témoignant d'une intense division mitotique (figure 29 et figure 30).

Il est à noter également que le tissu, occupant le centre du cal, est plus lâche avec des cellules larges à contours irrégulier. On note la présence de très jeunes méristèmes dont le point végétatif est identifiable. Cet ensemble très dense est intensément coloré.

L'apparition des masses de cellules dédifférenciées se fait de façon progressive. Néanmoins, il a été possible de distinguer deux situations. D'une part, un certain nombre d'explants édifient des cals très rapidement (5 à 6 semaines). D'autre part, des dédifférenciations ne se forment qu'après un temps de culture plus important (12 semaines). Ceci dépend essentiellement de la nature de l'explant: les explants de feuilles et d'hypocotyles sont mieux callogènes que ceux des racines.

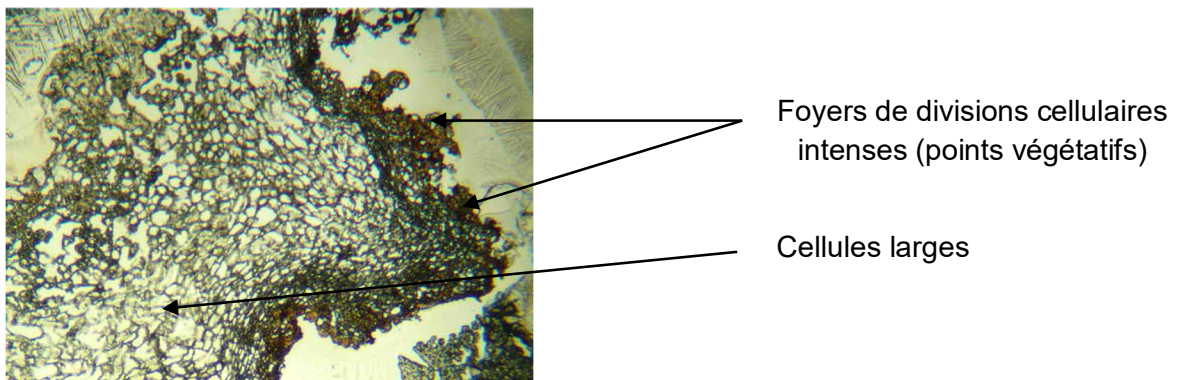


Figure 29 : Coupe transversale dans un cal de *M. communis* (G: x40)

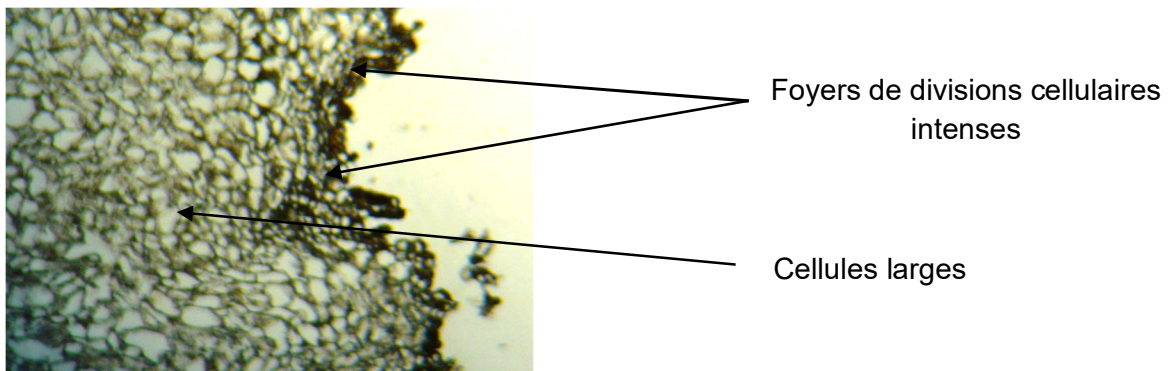


Figure 30: Coupe transversale dans un cal de *M. nivellei* (G: x40)

### III.1.2.2. Etude histologique des feuilles

L'observation microscopique de coupes transversales des feuilles fraîches et de celles incluses dans la paraffine, nous a permis de mettre en évidence une structure foliaire à symétrie bilatérale. La feuille présente une nervure principale saillante à la face inférieure, et une légère dépression à la face supérieure (figure 31). La face supérieure de la feuille est recouverte par un épiderme supérieur cutinisé, uni-stratifié et pigmenté naturellement en pourpre au stade juvénile (figure 32). On note la présence en surface de quelques rares poils tecteurs unicellulaires, pourvus d'une paroi très fine, qui sont plutôt apparents aux stades juvéniles du développement foliaire. La face inférieure est protégée par un épiderme inférieur, elle est caractérisée par la présence de nombreux stomates, dispersés entre les cellules épidermiques. La surface de l'épiderme inférieur comporte des poils tecteurs peu nombreux.



Selon **Ciccareli et al. (2008)**, les poils tecteurs sont particulièrement distribués dans les feuilles jeunes, les tiges herbacées, les pétales et les calices des fleurs. Cependant, ces poils épidermiques disparaissent complètement avec le temps. Ces structures se brisent souvent au cours du traitement d'inclusion dans la paraffine et le sectionnement.

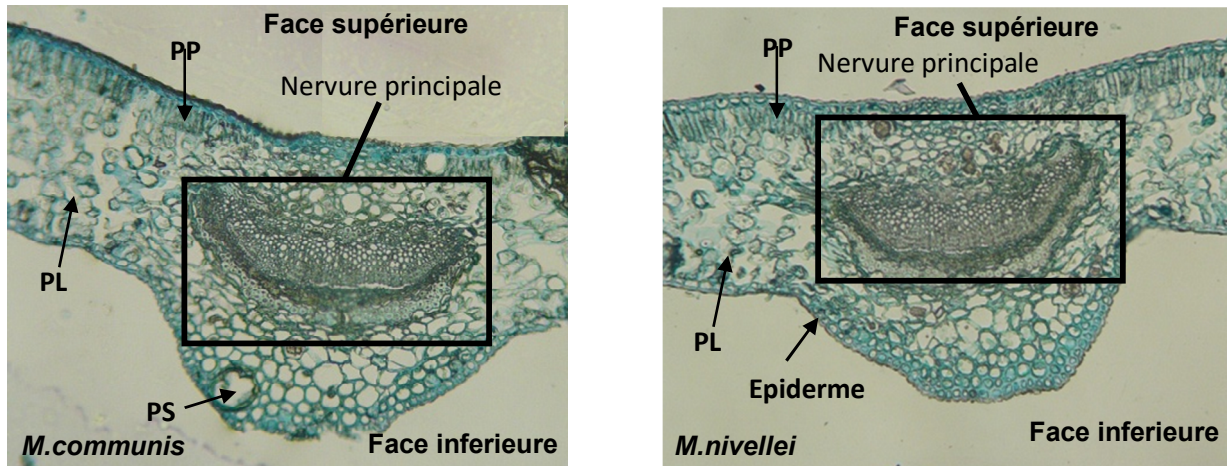


Figure 31: Coupe transversale de la feuille au niveau de la nervure centrale (G: x40)

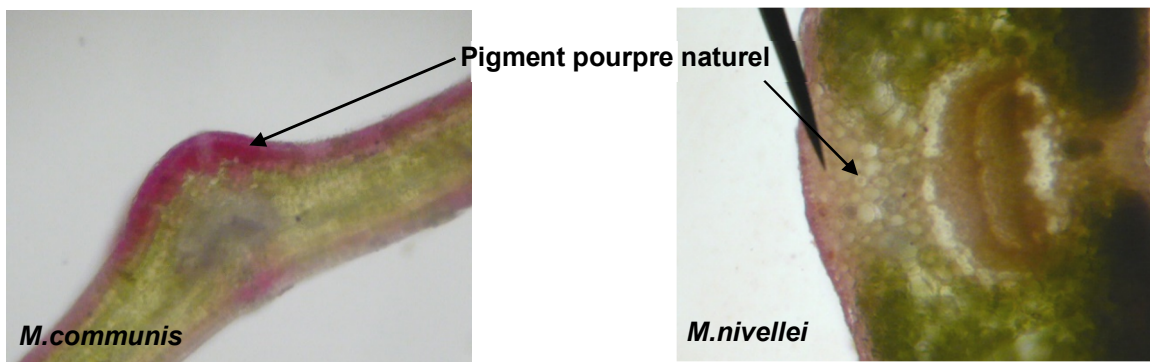


Figure 32: Pigmentation naturelle de la feuille jeune à l'état vital (G: x10)

Le mésophile est hétérogène, il comprend le parenchyme palissadique (PP) et le parenchyme lacuneux (PL) dans lequel se trouvent les nervures (figure 33 et figure 34). Celles-ci sont constituées de faisceaux libéro-ligneux collatéraux, avec le liber du côté abaxial (face inférieure de la feuille) et le bois du côté adaxial (face supérieure), les faisceaux cribro-vasculaires sont entourés par une gaine de sclérenchyme.

Les nervures secondaires sont de diamètre plus petit et ne comportent que le xylème. On peut observer, dans le mésophile, des cavités ou poches sécrétrices (PS), qui prennent naissance par écartement des cellules du parenchyme sub-épidermique. On note également la présence des macles (M) (cristaux d'oxalate de calcium), dans quelques cellules du parenchyme (figure 34).

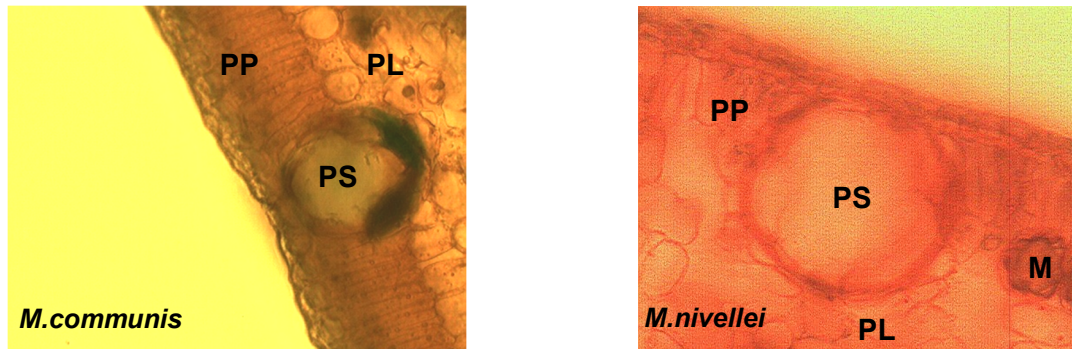


Figure 33: Poche sécrétrice dans la feuille (G: x 40)

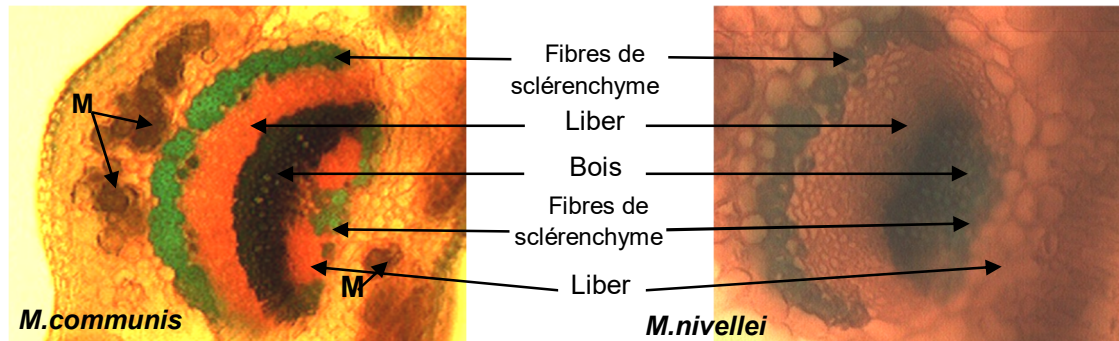


Figure 34 : Coupe transversale dans la nervure centrale de la feuille (G: x 40)

### III.1.2.3. Etude histo-anatomique des tiges

L'organisation anatomique de la tige chez les deux espèces est pratiquement identique. Cependant, des différences structurales sont observées chez les tiges adultes par rapport aux tiges jeunes.

- Tige ligneuse

La coupe transversale présente un contour subérifié, plus ou moins sub-circulaire, disposé en file radiales, formant la couche externe rugueuse qui couvre la tige (figure 35).

Ce tissu, d'origine secondaire, prend naissance à partir de l'assise génératrice subero-phéllodermique. Cependant, le phelloderme n'est pas perçu. Au dessous du suber, un parenchyme à méat occupe la partie corticale, qui est très étroite, il est parfois creusé de cavités sécrétrices. A ce tissu, font suite quelques amas isolés de fibres de sclérenchyme, à parois épaisses, formant un tissu de soutien.

Le liber, chez le genre *Myrtus*, présente la particularité d'être situé au dessus et au dessous du bois, dont on observe les cellules (à parois pécto-cellulosiques), et les rayons libériens intensément riches en macles d'oxalates de calcium.

Le système libéro-ligneux forme une pachyte continue (figure 35), l'assise cambiale fonctionne très peu vers le liber, par contre le bois est en général bien développé. La moelle est formée par des cellules parenchymateuses larges.



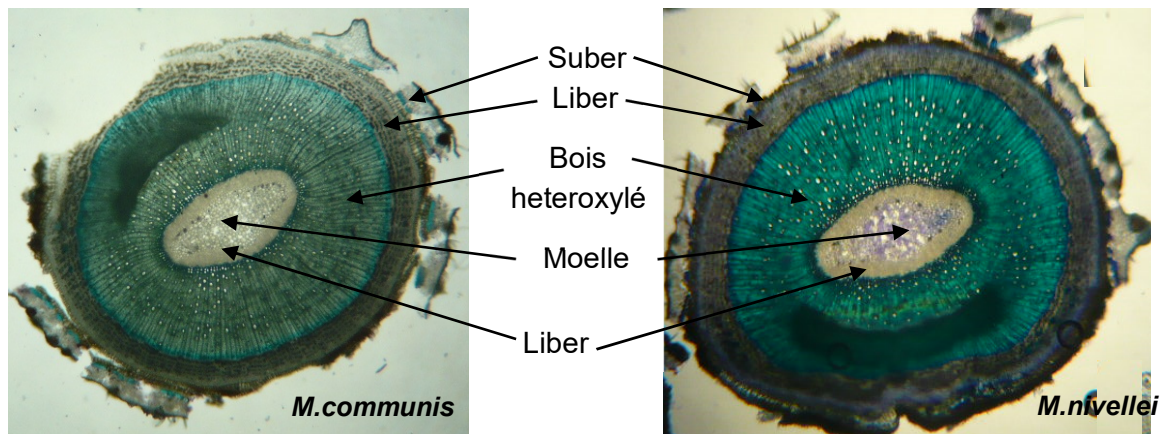


Figure 35: Coupe transversale au niveau de la tige ligneuse (G:x40)

L'oxalate de calcium est la forme insoluble de l'acide oxalique, ayant un rôle répulsif pour les insectes et les herbivores (**Nultschm, 1998**). La densité des macles d'oxalate de calcium est parmi les caractéristiques les plus importantes de ces deux plantes, leur permettant une adaptation aux milieux arides et une meilleure protection contre les prédateurs.

Au dessous de la zone cambiale, on trouve le bois hétéroxylé, qui est constitué par:

- Des vaisseaux représentés par de grandes cellules à lumière importante, avec des diamètres variables (figure 36), il s'agit des vaisseaux de grand calibre (bois de printemps) et des vaisseaux de petit calibre (bois d'automne).
- Un parenchyme ligneux vertical formé par un ensemble de cellules, dont certaines sont lignifiées et un parenchyme ligneux horizontal, formé par une file unisériée de cellules allongées dans le sens radial.
- Des fibres de sclérenchyme: à paroi lignifiée et à lumière réduite.

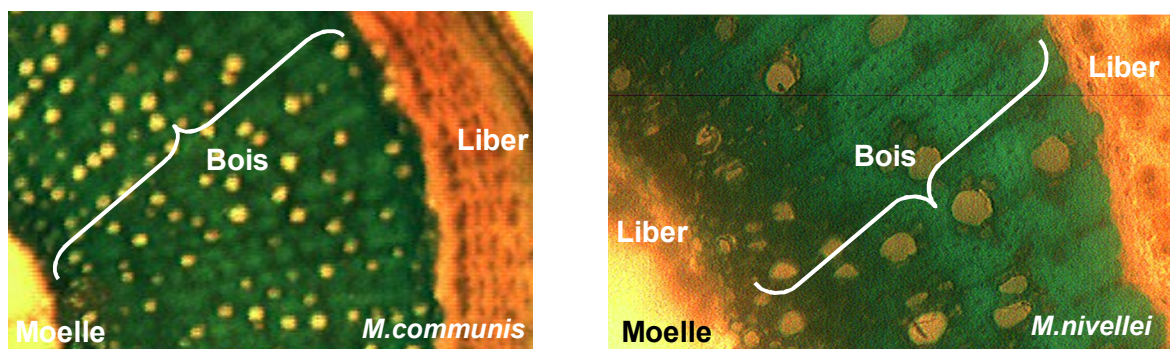


Figure 36 : Bois hétéroxylé de la tige (G :x40)

Le liber, situé de part et d'autre du bois, est formé par de petites cellules regroupées en quatre amas ou arcs. La partie centrale de cet organe est constituée par un parenchyme médullaire (moelle), formé par de larges cellules à parois pécto-cellulosiques, séparées par de larges lacunes, donnant l'apparence d'un tissu spongieux chez l'espèce *M. communis* (figure 37).

Cependant, l'espèce *M. nivellei* est caractérisée par un parenchyme médullaire, formé par des cellules larges, à parois fines pécto-cellulosiques (dont certaines sont pourvues de macles) et de quelques cellules à tanins (figure 38).

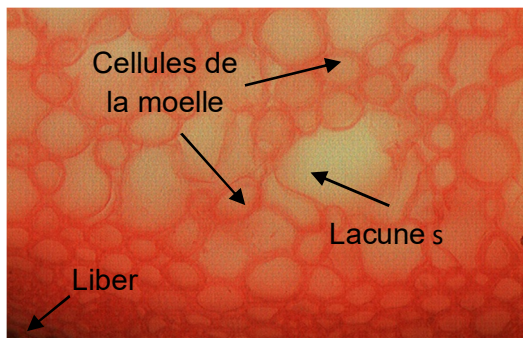


Figure 37: Parenchyme médullaire de la tige de *M. communis* (G: x 40)

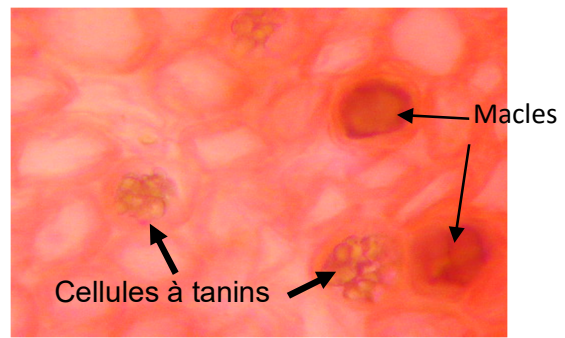


Figure 38: Parenchyme médullaire de la tige de *M. nivellei* (G: x 40)

- Tige herbacée

Les tiges herbacées présentent une structure quadrangulaire en section transversale, qui a tendance à disparaître dès l'installation du suber (figure 39). L'épiderme est représenté par une seule assise de cellules épidermiques, à parois pécto-cellulosiques. On note la présence de poils unicellulaires, correspondant à un prolongement d'une cellule épidermique vers l'extérieur de l'organe, ces poils sont typiques des tiges jeunes, car au fil du temps, dès que le suber s'installe, les poils disparaissent. Il s'agit là de poils técteurs unicellulaires à rôle protecteur.

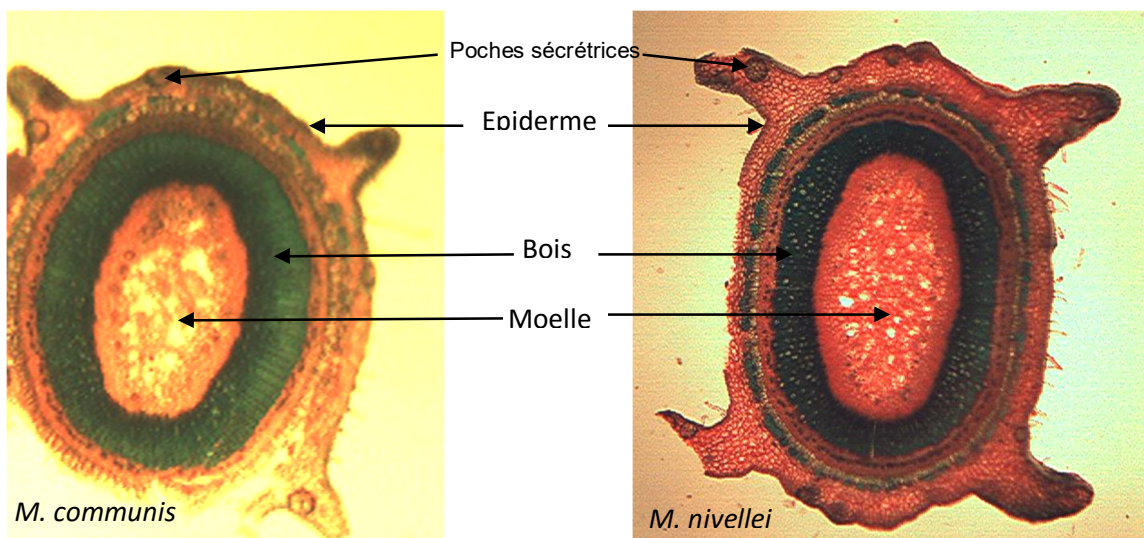


Figure 39 : Coupe transversale d'une jeune tige (G: x 10)

Le parenchyme cortical est localisé juste sous l'épiderme, il est formé par 5 à 6 assises de petites cellules arrondies à parois pécto-cellulosiques, laissant entre elles des méats. Les cavités sécrétrices endogènes, appelées également poches sécrétrices, sont clairement visibles en coupe transversale (figure 40).



Elles sont enfoncées dans le parenchyme cortical et étroitement accolées à l'épiderme par deux petites cellules appelées "cap cells" (CC).

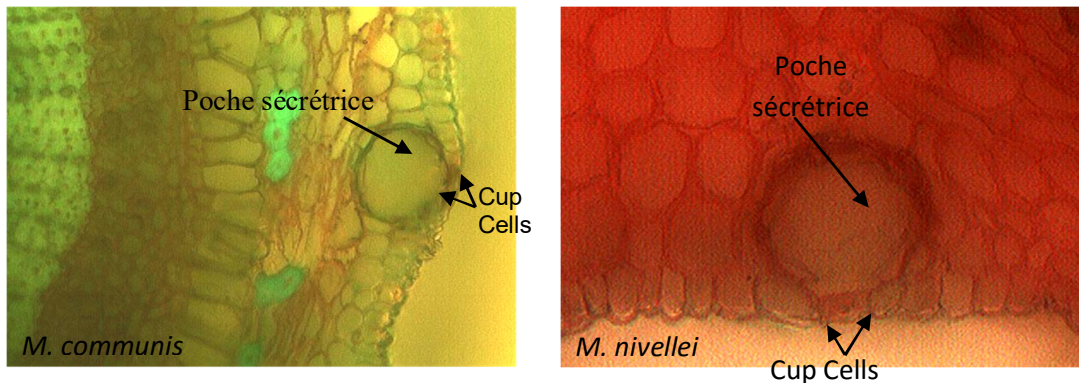


Figure 40 : Poche sécrétrice au niveau d'une jeune tige (G: x 40)

Les tissus conducteurs secondaires, naissant à partir de la zone cambiale, sont représentés par un bois hétéroxylé, délimité de part et d'autre par du liber.

Le liber orienté vers l'extérieur, est couronné par des amas de fibres de sclérenchyme, qui sont séparés par le prolongement des rayons libériens dans l'écorce, alors que le liber orienté vers le centre, semble s'organiser en quatre amas libériens, interrompus par les rayons libériens, qui s'enfoncent jusqu'à la moelle. Les fibres de sclérenchyme, disposées en amas, sont caractérisées par une paroi lignifiée, épaisse et rigide, délimitant une lumière réduite. Le parenchyme médullaire est constitué par des cellules larges, à parois pécto-cellulosiques contenant des macles et de larges lacunes inter-cellulaires. Cet aspect persiste chez l'espèce *M. communis*, alors qu'il change pour *M. nivellei* (en fonction de l'âge de la plante)

- La fonction sécrétoire

Les structures sécrétrices sont inégalement distribuées sur tous les organes aériens, et sont localisées à proximité de l'épiderme chez ces deux espèces.

Selon **Ciccareli et al. (2008)**, l'activité sécrétrice des HE chez l'espèce *M. communis*, s'exerce dans un ordre décroissant des feuilles, aux tiges, aux sépales puis aux pétales. Il s'agit de glandes ou poches sécrétrices, ayant la forme de cavités sub-épidermiques sphériques ou oblongues, insérées dans le mésophile, à proximité étroite de la surface.

Les poches sécrétrices sont délimitées par deux rangées de cellules, la rangée la plus interne, en contact avec le lumen de la poche sécrétrice, est formée par des cellules sécrétrices aplaties, à parois très fines, ces dernières dégèrent à maturité. La deuxième rangée est formée par des cellules parenchymateuses à parois épaisses. Les poches sécrétrices persistent uniquement au niveau des feuilles et ont tendance à disparaître progressivement dans les organes qui vont se lignifier.

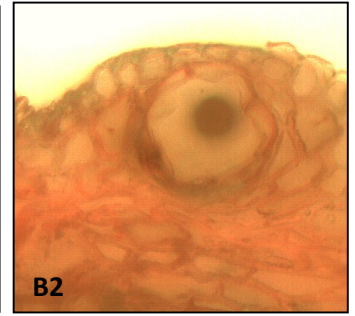
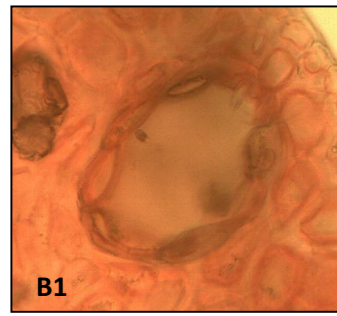
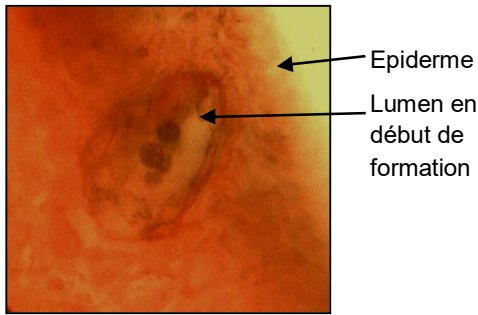
On suppose que ces poches sécrétrices naissent au dépend d'une cellule quelconque du tissu cortical ou du parenchyme foliaire, cette cellule se divise en quatre par deux parois perpendiculaires l'une à l'autre. Au point de jonction, il se forme un méat (figure 41.A).

Cet écartement intercellulaire est le point de départ de la cavité centrale appelée : lumen, qui recevra les produits sécrétés par les cellules qui l'entourent (figure 41. B1.B2). ce lumen est entouré d'un certain nombre de cellules sécrétrices; qui constituent l'assise sécrétrice bordant toute cette cavité centrale, quelquefois, on peut mettre en évidence, deux assises de cellules sécrétrices (figure 41.C1-C6).

Le sommet de la poche (ou cavité) est délimité par 2 à 4 cellules appelées cap cells ou cellules chapeau (**Ciccarelli et al., 2008**). Ces structures disparaissent lorsque l'écorce desquame en plaques (figure 41.D1.D2), laissant apparaître une écorce interne lisse et colorée (virant vers le gris).

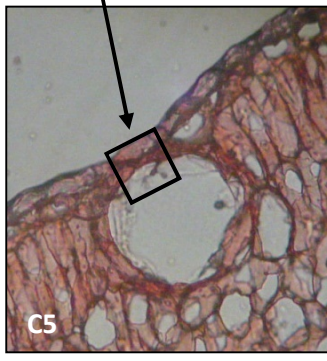
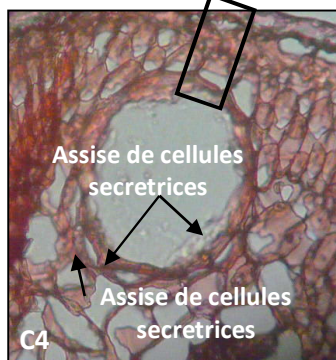
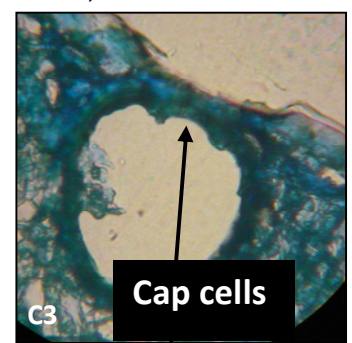
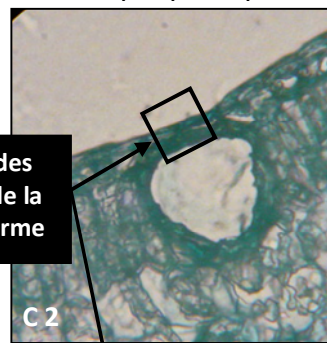
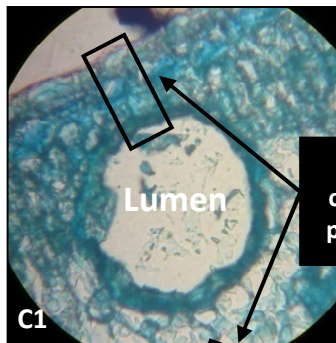
L'évolution complète de la poche sécrétrice est atteinte suite à une lyse partielle de quelques cellules du parenchyme cortical, permettant ainsi la fusion de la poche avec l'épiderme. Ainsi on peut admettre que l'ontogénie de ces cavités semble suivre un développement schizolysogène.

L'espèce saharo-endémique *M. nivellei* se dénote par la présence de poches sécrétrices schizolysogènes, visibles par transparence, très nombreuses sur les deux faces du limbe foliaire. Ces points translucides appelés également glandes aux huiles essentielles, produisent des composés terpéniques et autres molécules aromatiques. **Ciccarelli et al. (2008)**,



A : Début de formation de la cavité résultant de la séparation des cellules du parenchyme (G : x 40)

B1, B2 : Elargissement graduel du lumen avec lyse des cellules qui séparent la cavité sécrétrice de l'épiderme périphérique de la tige (G : x 40)



Lyse progressive des cellules et fusion de la poche avec l'épiderme

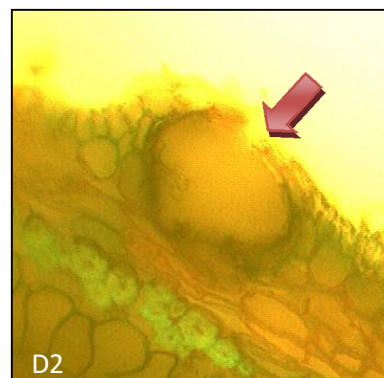
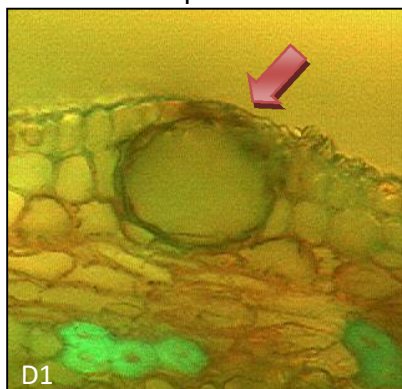
Cap cells

Assise de cellules sécrétrices  
Assise de cellules sécrétrices

C : Elargissement apparent du lumen délimité par une couche de cellules sécrétrices et une rangée de cellules parenchymateuses. Le point de fusion de la cavité avec l'épiderme est marqué par deux petites cellules "cap cells" (G : x 40)

C1,C2,C3 : Dans une coupe transversale d'une feuille de *M. communis*

C4,C5,C6 : Dans une coupe transversale d'une feuille de *M. nivellei*



D : Dégénérescence des poches sécrétrices dans une tige de *M. nivellei* (G : x 40).

D1 : Dégénérescence de la rangée de cellules sécrétrices au niveau de la cavité sécrétrice mature.

D2 : Début de dégénérescence de la cavité sécrétrice associé à un début de lignification de la tige

Figure 41: Différents stades de formation des glandes sécrétrices



**Luckow et Grimes (1997)** ont proposé quatre hypothèses, démontrant le rôle des cavités sécrétrices :

- Elles représentent un aliment pour les pollinisateurs.
- Elles secrètent une substance collante, qui facilite l'attachement des grains de pollen au corps du pollinisateur.
- Elles protègent contre les insectes prédateurs et les herbivores.
- Elles attirent les pollinisateurs.

### III.1.3. Etude histochimique des métabolites

Après la coloration histochimique, l'aspect des lames traitées est défini par observation microscopique. Aucune altération du tissu n'a été observée, et les éléments histologiques ont bien été conservés.

- Les polyphénols

Les coupes histologiques, réalisées sur les cals et colorées au  $\text{FeCl}_3$ , n'ont pas montré des zones spécifiques, contenant les polyphénols. Il s'agit de quelques cellules isolées ayant réagi avec le  $\text{FeCl}_3$ , situées au centre et à la périphérie du cal. Il est à signaler que des plages de cellules périphériques gardent une coloration plus intense (figure 42).

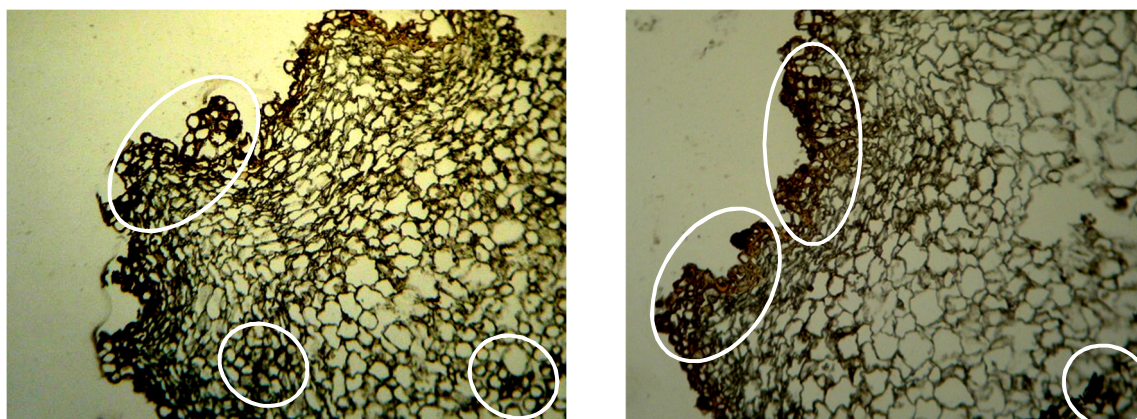


Figure 42: Distribution des composés phénoliques au niveau d'une coupe transversale d'un cal de *M communis* (à gauche) et *M nivellei* (à droite) (G: x40)

Ceci n'est pas surprenant, vu qu'il s'agit bien d'une structure non différenciée, et qui n'a pas encore développé son métabolisme secondaire. Cette réponse positive peut s'expliquer par la persistance de traces des hormones de croissances utilisées pour l'induction de la calogénèse, et qui sont porteuses de noyaux aromatiques.

Cependant, les feuilles sont caractérisées par la présence de composés phénoliques à différents niveaux, L'intensité de la coloration est marquée dans les cellules du parenchyme palissadique, et également dans certaines cellules du parenchyme lacuneux, les tissus conducteurs de type secondaire sont intensément colorés (figure 43).



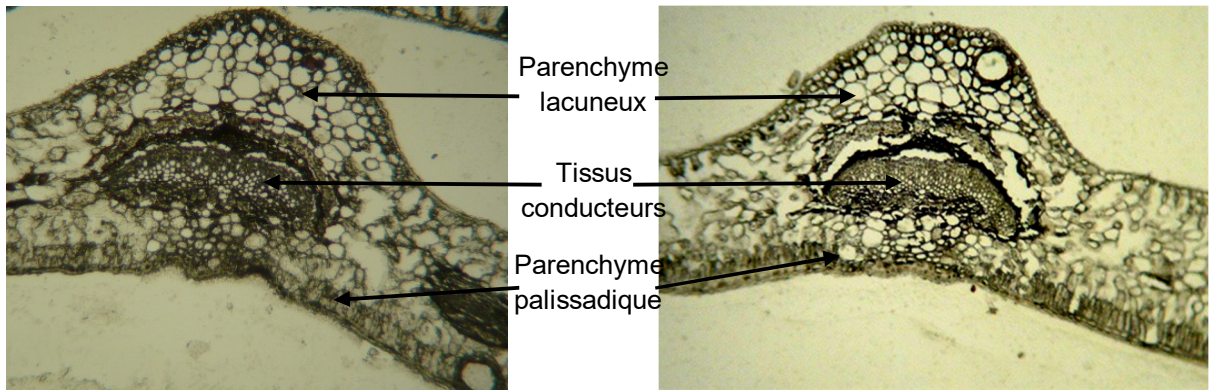


Figure 43: Répartition tissulaire des polyphenols dans une coupe transversale d'une feuille de *M. communis* (à gauche) et *M. nivellei* (à droite) (G: x40)

Dans les tiges, les composés phénoliques sont présents au niveau du bois, du liber et éventuellement dans quelques cellules du parenchyme médullaire (cellules à tanins). Les fibres du sclérenchyme, à parois épaisses et lignifiées, acquièrent également cette coloration (Figure 44)

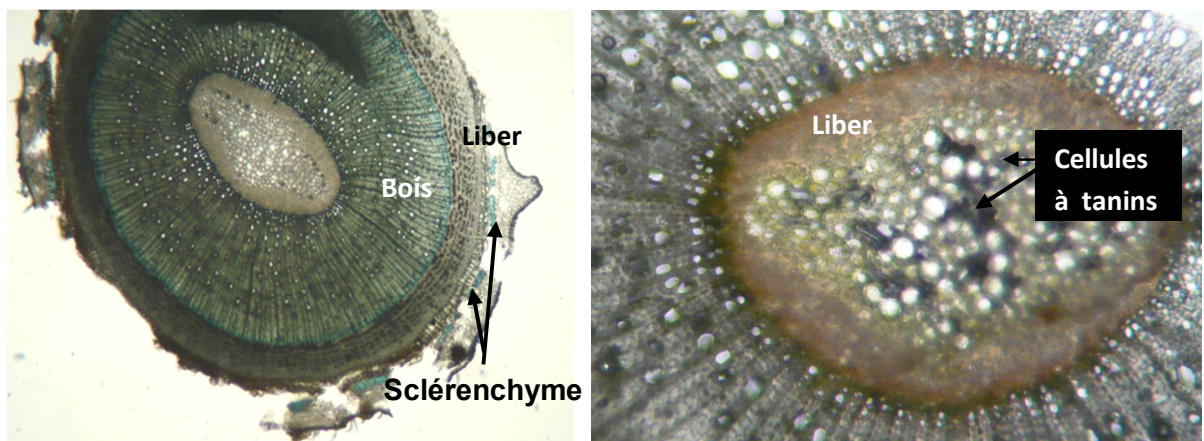


Figure 44: Répartition tissulaire des polyphenols dans une coupe transversale d'une tige de *M. communis* (à gauche) et *M. nivellei* (à droite) (G: x40)

Selon **Macheix et al. (2005)**, on observe une compartimentation nette des composés phénoliques, avec deux localisations principales bien distinctes:

- D'une part, la vacuole où sont présents tous les composés ayant un caractère hydrophile plus ou moins marqué, ils correspondent à des formes simples ou polymérisées comme les tanins ou les anthocyanes.
- D'autre part, la paroi où est retrouvée la lignine, typique des tissus constitués de cellules mortes, les composés phénoliques et en particulier les flavonoïdes sont adsorbés sur les structures pariétales.

Ces mêmes auteurs rapportent également que d'autres compartiments cytoplasmiques (réticulum endoplasmique, chloroplastes, vésicules golgiennes, ...etc), participent à la biosynthèse des phénols dans la cellule, mais ils ne représentent pas des zones d'importante accumulation.

Ceci nous laisse suggérer qu'il y a un transfert des molécules phénoliques entre les compartiments de biosynthèse et ceux d'accumulation.

La répartition des composés phénoliques montre également des accumulations très localisées, généralement en relation avec une fonction physiologique, ou avec l'interaction de la plante avec son environnement. Ainsi, les composés phénoliques des feuilles présentent généralement une répartition très caractéristique, avec de fortes teneurs en anthocyanes et en flavonols dans les épidermes. A titre d'exemple, plus de 80% de la quercétine et des anthocyanes sont présents dans l'épiderme de la moutarde blanche (**Jaquemin, 1970**). Les conséquences technologiques de ces faits sont très importantes, car une extraction courte et douce permet de les récupérer, sans qu'ils soient dénaturés.

La lignine est un composé phénolique (polymère de phenylpropanoïdes), ayant un rôle structural dans les parois cellulaires, elle est accumulée dans les structures de conduction et de soutien structural. Cette rigidité permet la croissance verticale des plantes et un degré de ramification souvent élevé, permettant d'accroître les surfaces photosynthétiques et le transport de la sève brute via les vaisseaux conducteurs (**Gayal et Vindit, 1991**). Selon **Macheix et al. (2005)**, le bois renferme un pourcentage élevé de lignine allant de 15 à 35%

A l'échelle de la plante entière, il faut signaler que certains composés phénoliques ne sont accumulés que dans des organes bien définis. Ainsi, les anthocyanes sont accumulés dans les fruits mûrs, alors qu'elles n'apparaissent qu'exceptionnellement dans les autres organes de la plante (**Macheix et al., 2005**).

Cependant, les feuilles jeunes des plantes étudiées, observés au microscope, à l'état frais, présentent un épiderme fortement pigmenté (pourpre à violet), cette coloration est due à la synthèse d'un pigment anthocyanique, qui joue le rôle d'un écran protecteur du limbe foliaire contre les rayons UV, ainsi que contre les prédateurs, en apportant une certaine astringence au goût des feuilles.

Les flavonoïdes, dont les anthocyanes, sont localisés dans les vacuoles des cellules corticales et épidermiques des tiges et des feuilles, ils ont un rôle important dans les interactions plante-animal (attirent les insectes pollinisateurs par la couleur des fleurs ainsi que les insectes qui participent dans le transport des graines contenus dans les fruits) et offrent une excellente protection contre les UV (**Montoro et al., 2006**)

De nombreuses études ont montré que les composés phénoliques sont responsables des arômes, ainsi que de l'astringence et de la couleur. Le rôle bénéfique de ces substances est avéré positif dans de nombreux cas. Il faut rappeler que l'environnement et les techniques culturales agissent sur l'accumulation de ces métabolites. Notamment, il a été montré que même si la teneur en polyphénols est élevée lors des analyses biochimiques, il est par contre difficile de les localiser avec précision dans les tissus (**Macheix et al., 2005**).

- Les polysaccharides

La coloration pourpre est le résultat de deux réactions chimiques, dues à l'action de l'acide périodique et du réactif de Schiff. L'acide périodique dont la formule est  $\text{HIO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  va permettre l'oxydation des groupements glycols ( $\text{CHOH-CHOH}$ ), car cet acide est capable de rompre les liaisons entre deux carbones. Cette oxydation permettra la libération de groupes aldéhydes ( $\text{HC=O}$ ). C'est sur ces derniers groupements que viendra se fixer le réactif de Schiff, qui pourra alors exprimer sa couleur rouge pourpre. Donc ce mécanisme d'action histochimique qui comprend deux étapes :

- L'oxydation périodique.
- La détection des aldéhydes par le réactif de Schiff.

Un dépôt de substances polysacchariques a été mis en évidence par ce réactif. Seuls les polysaccharides des parois (cellulose) et les polysaccharides de réserve (amidon des amyloplastes), sont colorés spécifiquement en rouge pourpre. Au niveau des cals, les cellules apparaissent très riches en substances polysaccharidiques (figure 45). Ce caractère est nettement typique de toutes les cellules meristematiques sans exception, compte tenu de leur intense activité biologique.

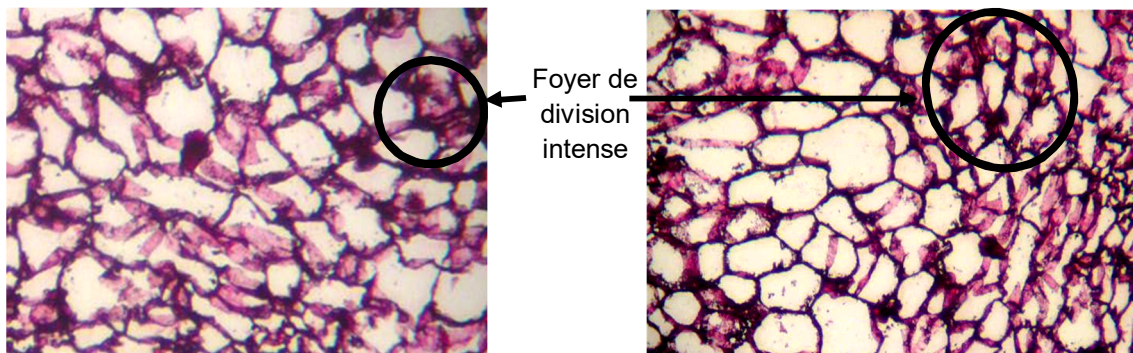


Figure 45: Coupes histologiques montrant la présence de polysaccharides dans les foyers de divisions cellulaires intensives dans les cals de *M. communis* (à gauche) et *M. nivellei* (à droite) (G: x40)

Au niveau des feuilles, les polysaccharides sont présents dans l'ensemble des cellules des parenchymes lacuneux et palissadiques, offrant un contour très net aux cellules concernées, en plus de sa présence intracellulaire (figure 46). Dans les tiges, la distribution des polysaccharides est éventuellement très large, englobant l'ensemble des cellules des tiges jeunes de *M. communis* et *M. nivellei* (figure 47).



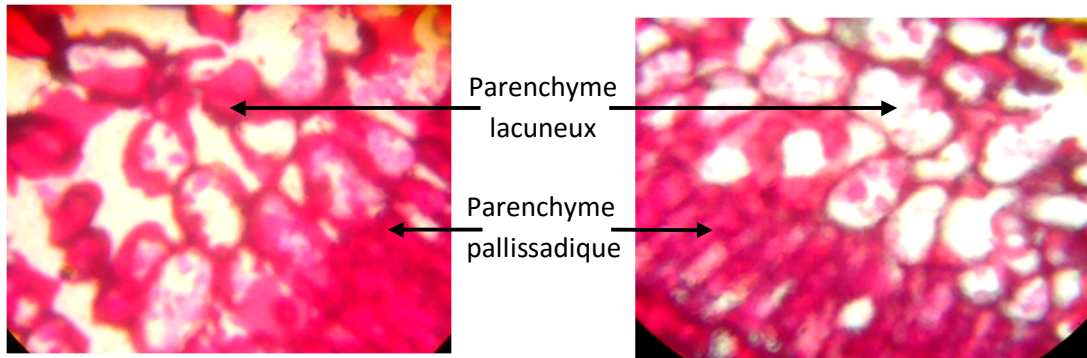


Figure 46: Distribution des composés polysaccharidiques dans les feuilles de *M. communis* (à gauche) et *M. nivellei* (à droite) (G:x100)

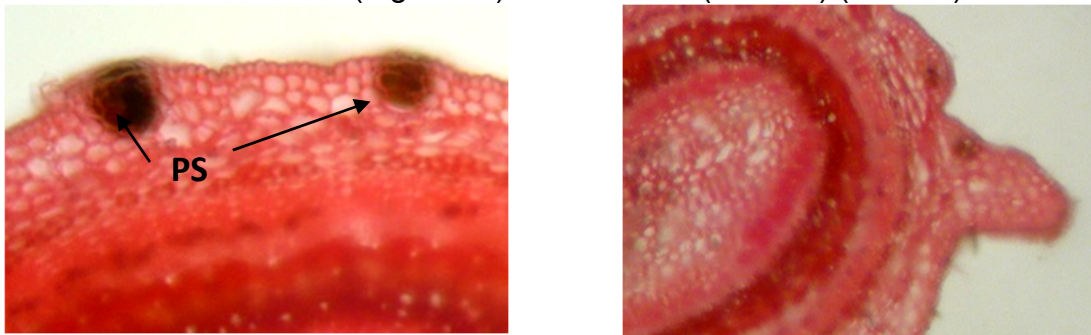


Figure 47: Distribution des composés polysaccharidiques dans les tiges de *M. communis* (à gauche) et *M. nivellei* (à droite) (G:x40)

- L'amidon

Les coupes colorées par le lugol, révèlent la présence des amyloplastes, exclusivement dans les cellules du parenchyme médullaire, au niveau des tiges jeunes. Cependant dans les tiges lignifiées, leur présence devient moins marquée, surtout avec l'apparition des cristaux d'oxalate de calcium, qui occupe pratiquement toute la surface cellulaire (figure 48).

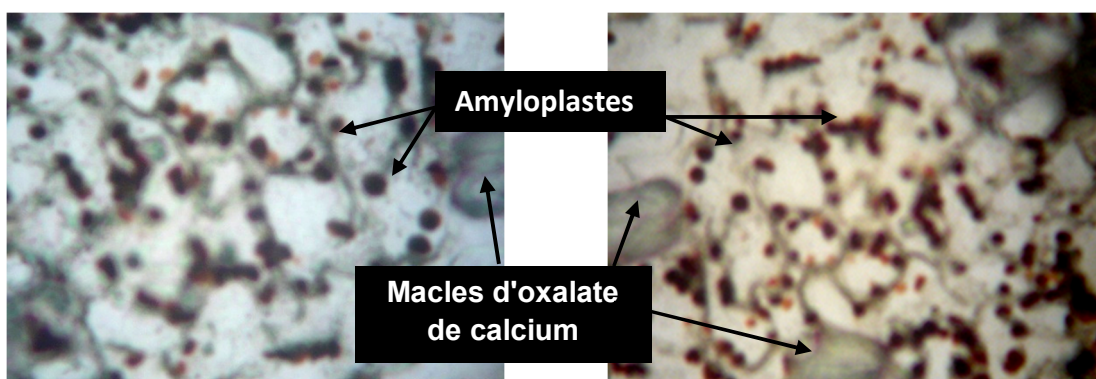


Figure 48: Distribution des amyloplastes au niveau du parenchyme médullaire de la tige de *M. communis* (à gauche) et *M. nivellei* (à droite) (G: x40)

Quant aux cals, ils sont extrêmement riches en amyloplastes, très visiblement colorés en violet, ceci témoigne encore une fois de l'intensité du métabolisme cellulaire qu'exercent ces cellules meristématiques (figure 49)

**Fischer (1980)** et **Jadin (1974)** ont rapporté que pour une plante donnée, on trouvait des quantités maximales d'amidon au printemps, avant le débourrement des bourgeons, c'est-à-dire au moment où la plante est en pleine activité et a besoin d'employer ses réserves. A la fin de du mois d Mai, quand elle aura fini de se couvrir de feuilles, la quantité d'amidon contenue dans cette plante atteint son minimum.

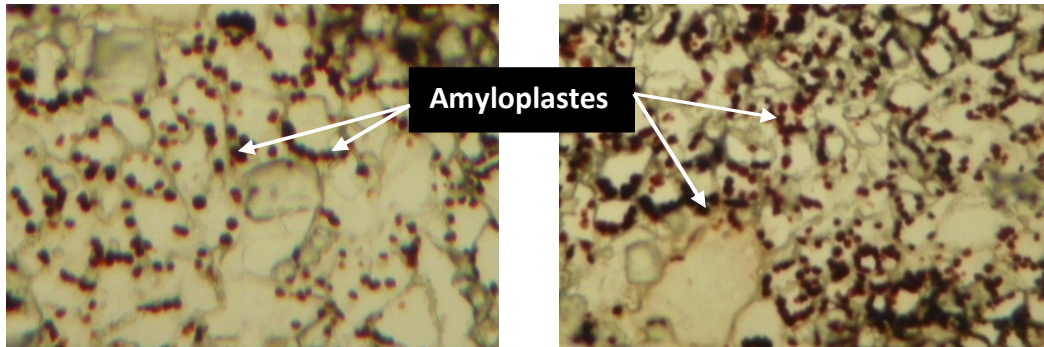


Figure 49: Distribution des amyloplastes dans les cellules des cals de *M. communis* (à droite) et *M. nivellei* (à gauche) (G:x40)

- Les réserves protéiques

Au niveau des feuilles, la coloration bleue des parois cellulaires révèlent que ces dernières renferment des structures de base, de nature protéique simple ou conjuguées à d'autres sucres ou lipides: il s'agit des protéines transmembranaires et des glycoprotéines ou lipoprotéiques intra-membranaires (figure 50 et figure 51). Dans le compartiment intracellulaire, de nombreuses structures sont colorées au bleu de Toluidine, à aspect réfringent : se sont des protéoplastes.

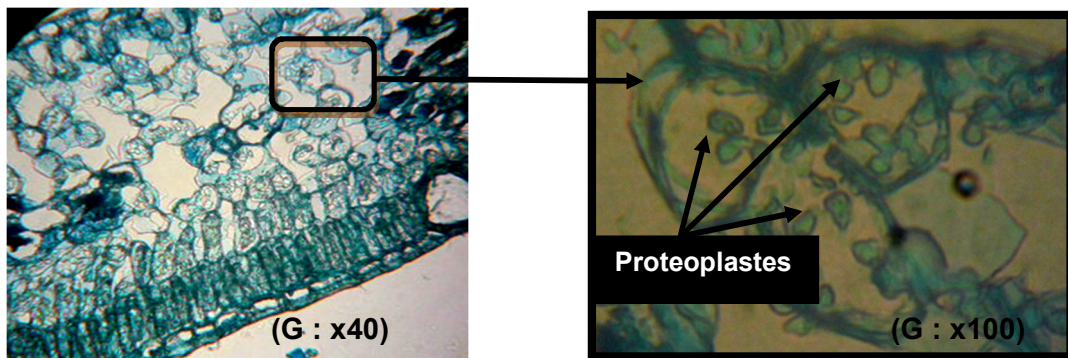


Figure 50: Distribution des substances de nature protéique dans la feuille de *M. communis*

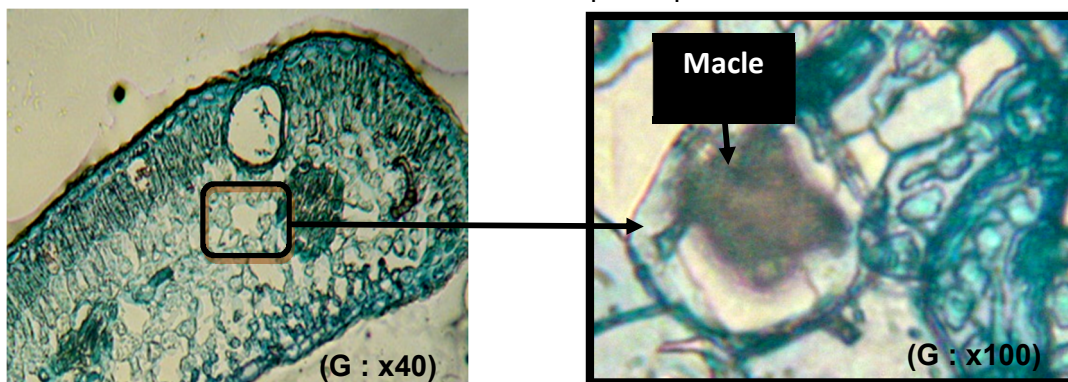


Figure 51: Distribution des substances de nature protéique dans la feuille de *M. nivellei*



Nous avons pu visualiser, au plus fort grossissement dans l'albumen des graines, des cellules remplies de grains d'aleurone (figure 52), leur nombre est beaucoup plus important dans les cellules de l'albumen de *M. communis*, par rapport à l'espèce *M. nivellei*.

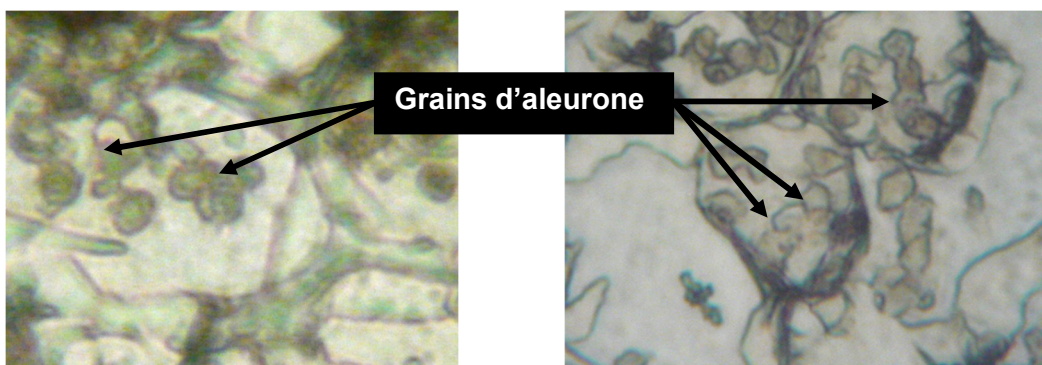


Figure 52: Graines d'aleurone dans une cellule de l'albumen de la graine de *M. communis* (à gauche) et *M. nivellei* (à droite) ( G:x100)

La maturation de la graine correspond à une période d'élaboration très intense de réserve dans l'albumen et/ou dans les cotylédons. Les cellules de la graine ont connu une compartimentation active du protoplasme: ses vacuoles sont partagées en éléments plus petits, qui se fragmentent à leur tour en vacuoles plus petites encore, en même temps, des substances protéiques, élaborées par la cellule, s'accumulent à l'intérieur de ces vacuoles.

Ce double processus de déshydratation des vacuoles et des dépôts protéiques se poursuit peu à peu et s'achève par leur solidification. Chaque cellule de l'albumen et de l'embryon, d'une graine mûre, contient ainsi plusieurs vacuoles déshydratées, offrant l'aspect de cristaalloïdes réfringents appelés "grains d'aleurone".

La teneur en eau des tissus chutent en moyenne de 90% à 10%. La déshydratation s'accompagne d'un très fort ralentissement de l'activité physiologique, c'est le mode de vie au ralenti (**Langeron, 1949**).

- La cutine

Nous avons remarqué que les feuilles sont particulièrement caractérisées par la présence de la cuticule, colorée avec le vert de méthyle, constituant un revêtement continu, soudé étroitement à l'assise des cellules épidermiques (figure 53, figure 54). La cuticule est composée par une substance imperméable appelée la cutine. Cette cuticule à tendance à s'estamper au niveau des stomates uniquement, afin de permettre les échanges gazeux avec l'extérieur sur les deux faces de la feuille. Cependant, chez *M. nivellei*, elle est plus épaisse du coté de la face supérieure par rapport à la face inférieure, constituant ainsi un film protecteur, permettant à la plante de s'adapter au climat aride. Selon **Bruneton (1993)**, les flavonoïdes s'intègrent dans la cuticule foliaire, sous forme de génines libres.

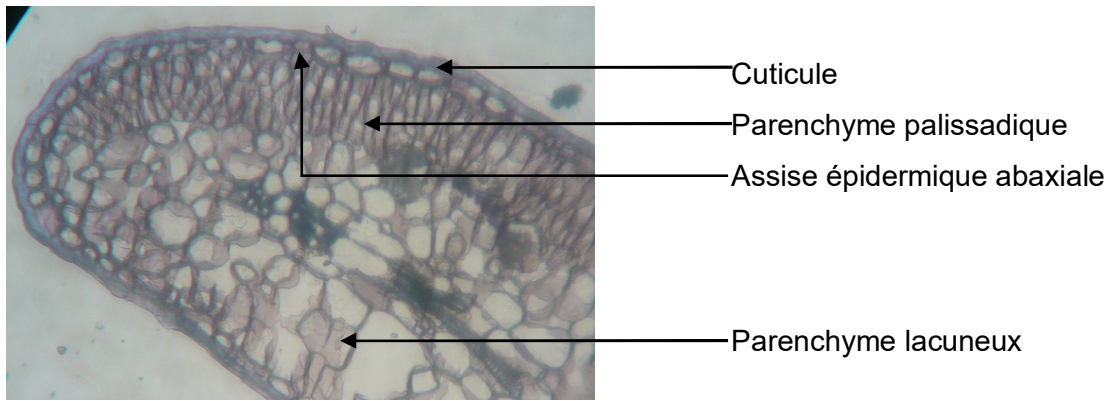


Figure 53: Coupe histologique représentant la cuticule dans une feuille de *M communis* (G: x40)

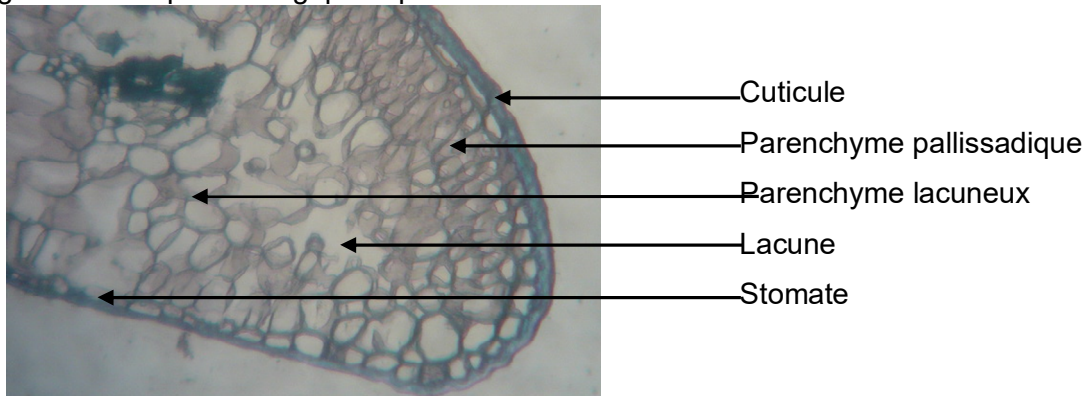


Figure 54: Coupe histologique représentant la cuticule dans une feuille de *M nivellei* (G: x40)

Les poils épidermiques observés sont de type tecteur, ils sont unicellulaires courts, particulièrement fréquents au niveau des tiges et des feuilles jeunes (figure 55). Leur présence est restreinte aux premières phases de la croissance de la plante, pour exercer une fonction protectrice uniquement, ils disparaissent plus tard pour céder la place à des structures protectrices plus évoluées, comme la cuticule dans les feuilles et le suber dans les tiges.

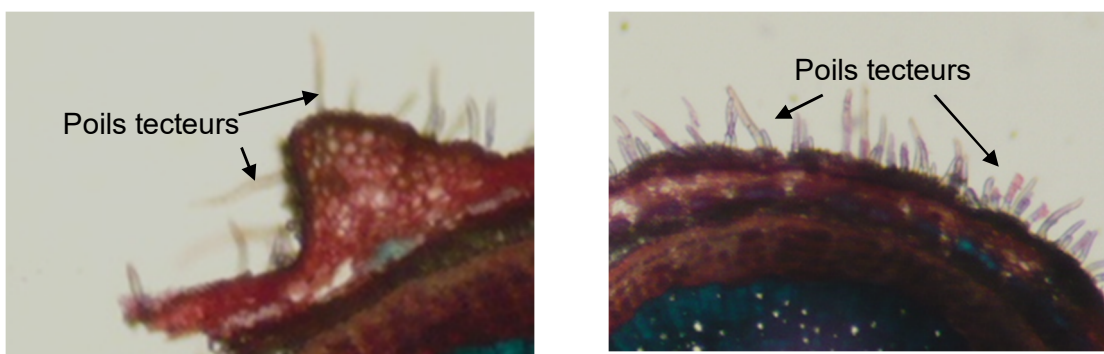


Figure 55: Aspect des poils tecteurs au niveau des tiges jeunes de *M. communis* (à gauche) et *M. nivellei* (à droite) (G: x 40)

Une série combinée de traitements pour la recherche des alcaloïdes, des lipides, des mucilages et des flavonoïdes, ont fait ressortir un manque d'affinité pour les colorants utilisés. On ignore dans quelles limites la concentration de ces composants est détectable dans le tissu, cette dernière étant influencée par les conditions physiologiques, pathologiques ou expérimentales, auxquels les pièces végétales à étudier, ont été soumises. Dans de telles situations, le screening phytochimique devient indispensable pour compléter les données. La mise en évidence des sites sécréteurs situés à localisation sub-épidermiques, nous a permis d'orienter notre choix vers la méthode d'hydrodistillation pour l'extraction des HE. Pour les coupes incluses dans la paraffine, il n'a pas été possible de mettre en évidence l'affinité pour les colorants de lipides et des flavonoïdes, en raison de l'impact des solvants et de la température lors du traitement des explants, leur présence a été vérifiée à l'état vital.

Il ressort de cette étude histochimique, qu'il est parfaitement possible de s'appuyer sur les observations microscopiques, comme étape préliminaire afin d'orienter les recherches des métabolites, mais elles manquent toutefois de précision, et mérite d'être confirmé par des tests biochimiques. La localisation exacte de certains métabolites, nous permet également d'établir des rapprochements morphologiques entre ces deux espèces, et en outre, de les différencier : comme le cas de la présence des cellules à tanins dans le parenchyme médullaire de la tige de *M. nivellei*.

Nos observations microscopiques, relatives à l'anatomie et à la morphologie ainsi que les réactions histochimiques, nous ont tout d'abord permis de mettre en évidence et de confirmer les caractéristiques des structures anatomiques des feuilles, et de localiser ensuite, dans les sites de sécrétion, des HE au niveau des feuilles des plantes étudiées. Les composés phénoliques ont une large répartition à travers les tissus. Les poils tecteurs semblent avoir un rôle exclusivement protecteur.

En général, il n'existe pas des différences majeures entre *M. communis* et *M. nivellei*, ni au niveau anatomique, ni dans les formations épidermiques (poils de recouvrement) et sub épidermiques (poches sécrétrices).



## III.2. Résultats des essais *in vitro*

### III.2.1. Résultats de la désinfection des micro-boutures récoltées *in situ*

Chez l'espèce *M. communis*, nous avons constaté que l'utilisation de l'hypochlorite de calcium à une concentration de 8%, pendant 20 minutes, a donné le plus faible taux de contamination pour les micro-boutures herbacées, puisque le pourcentage de contamination est de 10,66% seulement, notant qu'il était de 100% au départ. Cependant, les micro-boutures semi-ligneuses répondent très mal aux différentes concentrations utilisées, avec des pourcentages de contamination supérieures à 70% (figure 56). On suppose que cela revient à la nature de l'agent mouillant utilisé.

L'augmentation de la concentration du désinfectant à 16% ne semble pas résoudre le problème, au contraire, elle provoque des nécroses sur la quasi-totalité des micro-boutures herbacées et sur 90% des boutures semi-ligneuses désinfectées. Toutefois, les résultats obtenus montrent que les micro-boutures herbacées sont les moins infectées.

Pour l'espèce *M. nivellei*, les rameaux prélevés étaient tous lignifiés, et les essais de désinfection des micro-boutures ont tous échoués.

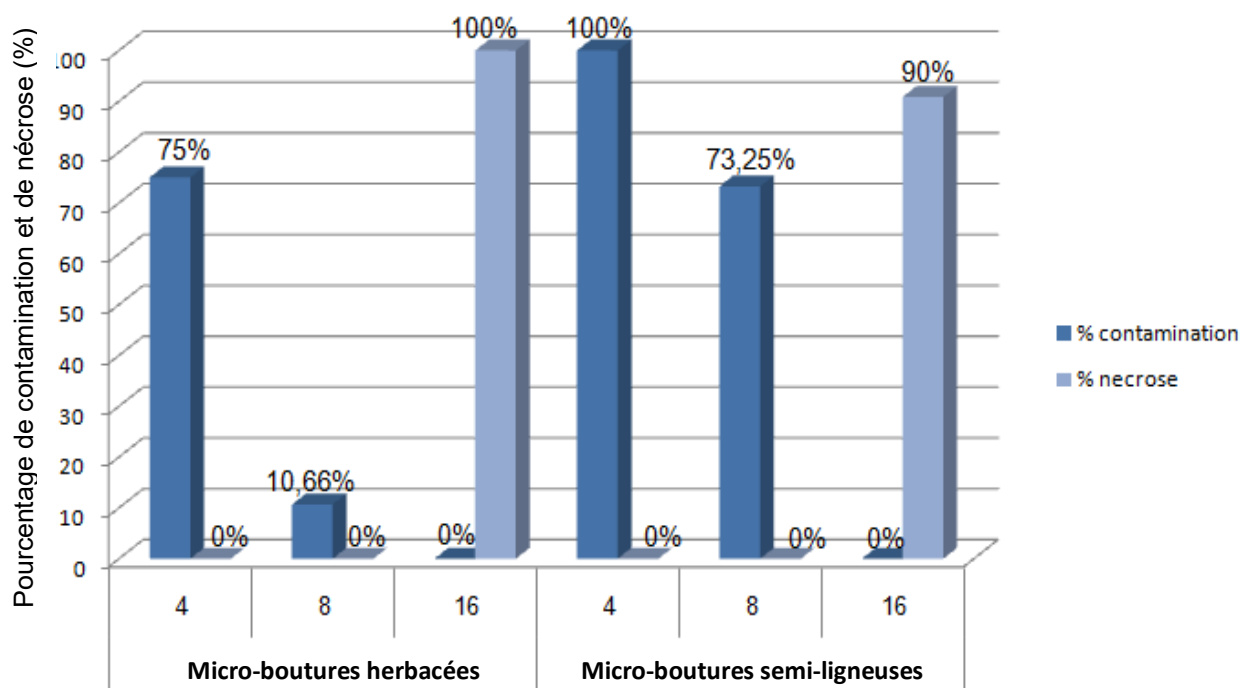


Figure 56 : Effet des différentes concentrations de  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  sur le taux de contaminations des micro-boutures de *M. communis*.

**Zryd (1988)** rapporte que chez beaucoup d'espèces ligneuses, les tissus peuvent renfermer certains agents infectieux, à localisation endogène (endophytes), et qui ne sont pas éliminés par les méthodes de désinfection classique. C'est ainsi que certains contaminants peuvent se manifester ultérieurement.

Selon **Seznec (1986)**, pour s'assurer de l'état sanitaire du matériel végétal, il est préférable de traiter la plante mère, sur terrain avec un fongicide systémique, au moins un mois, avant la date prévue pour la récolte.

En effet, les micro-boutures ligneuses sont difficiles à aseptiser. La méthode de désinfection dépend de l'époque de prélèvement et du degré de lignification du matériel végétal (**Boulay, 1979**). Cependant, **Bouderrah (1988)** suggère que les produits désinfectants utilisés doivent avoir un double effet: éviter les infections dues à la propagation des bactéries et des champignons d'une part, et éviter le traumatisme des tissus pouvant conduire à la nécrose cellulaire d'autre part.

Les micro-boutures sont mises en culture sur un milieu MS, contenant 1,5mg/l BA et 0,5mg/l ANA avec 100mg/l d'acide ascorbique. La richesse du milieu MS en macro-éléments et en saccharose (20g/l), explique le bon comportement des micro-boutures, marqué par un début de débourrement des bourgeons, à croissance très lente. Cependant, au-delà de la dixième semaine de culture, les micro-boutures se nécrosent (figure 57)

Les nécroses observées sont marquées par un noircissement total ou partiel de la micro-bouture. Des observations similaires sur le comportement des ligneux vis-à-vis du milieu MS ont été rapportées par de nombreux travaux (**Letouze et Daguin, 1983 ; Seznec, 1986**). Ces derniers suggèrent que la concentration importante en éléments minéraux et en particulier en ions ammonium  $\text{NH}_4^+$ , devient toxique et serait responsable du dépérissement des micro-boutures.

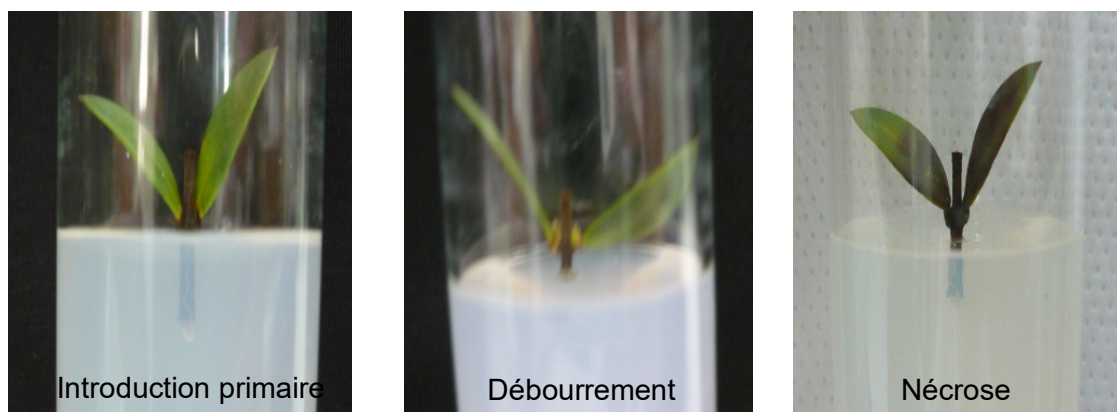


Figure 57: Différents stades d'évolution des micro-boutures de *M. communis*.

### III.2.2. Résultats de la désinfection des graines

L'utilisation de l'hypochlorite de calcium à 8%, pendant 30 min, peut abaisser le taux de contamination jusqu'à 11 %, pour les graines de *M. communis*, et ne dépasse pas 16% pour *M. nivellei* (tableau 28). Nous avons remarqué aussi que toutes les contaminations, d'origine fongique, ont pu être maîtrisées au fur et à mesure de l'expérimentation.

Quant à l'utilisation de l'hypochlorite de sodium, les résultats montrent une détérioration de l'état des graines, qui est d'autant plus accentuée que la dose du désinfectant est élevée, engendrant la libération continue des phénols, qui en s'oxydant, deviennent toxiques et entraînent la mort des cellules. Les phénols peuvent diminuer ou annuler les échanges entre l'explant et le milieu de culture (**Margara, 1989 ; Touaibia et al., 2012**).

Tableau 28: Effet de  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  et  $\text{Na}(\text{ClO})_2$  sur le taux de contamination des graines de *M. communis* (MC) et *M. nivellei* (MN).

	Concentrations	Temps de trempage (min)	Pourcentage de contamination %		Pourcentage de nécrose %	
			MC	MN	MC	MN
Hypochlorite de calcium $\text{Ca}(\text{ClO})_2$	16%	10	0	64	49	36
		20	0	51	50	38
		30	0	0	100	100
	8%	10	76	81	0	0
		20	34	40	0	0
		30	11	16	2	5
	4%	10	96	100	0	0
		20	67	80	0	0
		30	50	66	0	0
Hypochlorite de sodium $\text{Na}(\text{ClO})_2$	16°	10	52	76	10	20
		20	44	64	40	30
		30	0	0	100	100
	8°	10	38	40	0	0
		20	30	32	0	0
		30	16	20	0	0

Les travaux menés par **Auge et al. (1989)** sur la stérilisation du matériel végétal, ont montré que l'hypochlorite de calcium est un produit stérilisant très efficace pour la destruction des micro-organismes, car il ne pénètre pratiquement pas dans les tissus. Par contre, l'hypochlorite de sodium a la possibilité de pénétrer dans les tissus et de provoquer leur détérioration, qui se manifeste par une nécrose et l'arrêt ultérieur de la croissance.

### III.2.3. Résultats de la germination des graines sur boîtes de Pétri

#### III.2.3.1. Graines entières

Au laboratoire, à 26°C, le début de la germination des graines sur boîtes de Pétri se manifeste à partir du 20<sup>ème</sup> jour pour l'espèce *M. communis*, et au-delà du 30<sup>ème</sup> jour pour *M. nivellei*. Le taux de germination du départ a été de 10% pour *M. communis* et de 8% pour l'espèce *M. nivellei* (figure 58).

La cinétique de l'évolution du taux de germination a été suivie sur une durée de 120 jours, marquée par une croissance exponentielle à partir de la 3<sup>ème</sup> semaine. Elle a tendance à ralentir au delà du 90<sup>ème</sup> jour, où elle avoisine un seuil stable estimé à 46% pour *M. communis* et ne dépasse pas 39% pour l'espèce *M. nivellei*. Ces faibles résultats de germination obtenus nous ont incités à prévoir la réalisation d'un prétraitement des graines par scarification à l'aide d'un instrument tranchant, pour tenter de faire face à l'inhibition tégumentaire des graines semées.

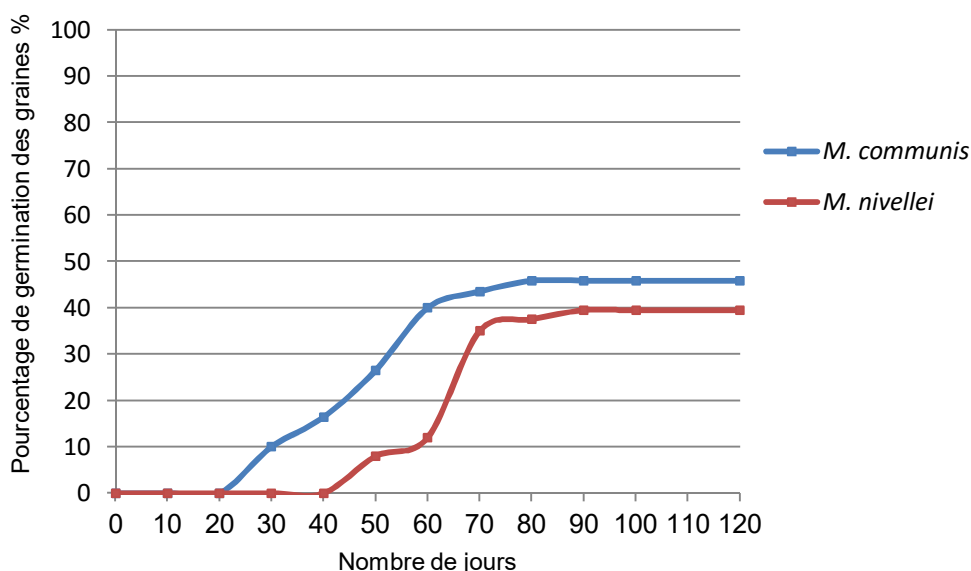


Figure 58: Evaluation de la cinétique de germination des graines entières de *M. communis* et *M. nivellei* sur boîtes de Pétri.

### III.2.3.2. Graines scarifiées

Nous constatons que la scarification mécanique influe de façon remarquable sur la germination, surtout lorsqu'elle est associée à une immersion des graines dans de l'eau distillée, pendant 24 heures avant le semis.

Pour l'espèce *M. communis*, la germination des graines scarifiées débute après le deuxième jour, avec un taux de 75%, elle évolue ensuite jusqu'à 100% après un mois.

Des résultats similaires ont été obtenus pour l'espèce *M. nivellei*, chez laquelle la germination débute à partir du deuxième jour avec un taux de 86% chez les graines scarifiées, pour atteindre après 70 jours, un seuil maximal de 98% (figure 59). D'après ces essais, on constate que les graines scarifiées ont germé dix fois mieux que les graines entières (témoins) en boîtes de Pétri.

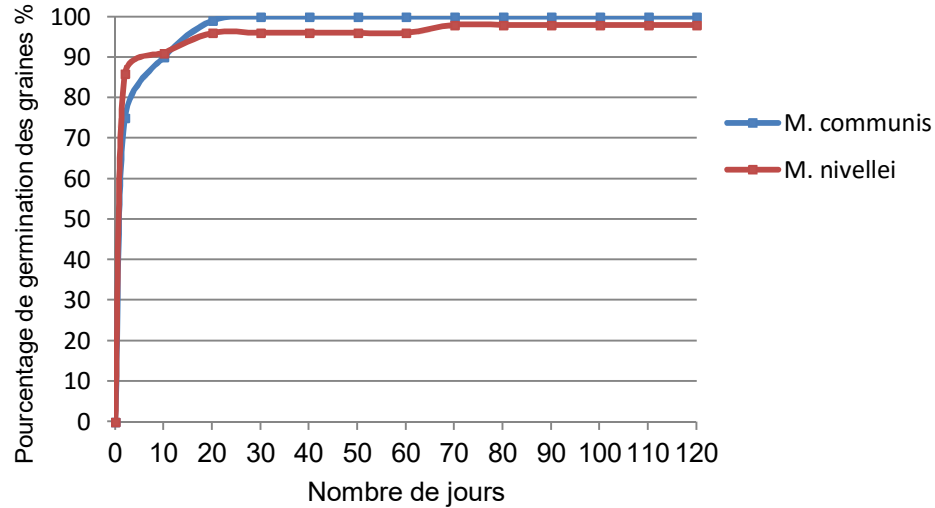


Figure 59: Evaluation de la cinétique de germination des graines de *M. communis* et *M. nivellei* scarifiées.

On peut expliquer cette différence dans les taux de germination entre les graines entières et scarifiées, par la dureté du tégument externe de la graine qui protège l'embryon, induisant ainsi une dormance de type tégumentaire. Celle-ci peut être rompue par simple scarification mécanique, sans risque pour la détérioration de l'embryon, ce qui facilite la pénétration de l'eau et le déclenchement du processus physiologique de germination. Cette explication est fort similaire à celle décrite par **Berrie (1985)**, **Hartmann et al. (1990)** ainsi que les travaux de **Bani Ameer et Alouani (1998)**.

Des essais antérieurs ont été effectués en réalisant des prétraitements des graines par l'acide sulfurique ainsi que par le froid (à 0°C pendant un mois) n'ont amélioré la germination que très faiblement, car les téguments des graines sont très épais (**Touaibia, 2011**).

#### III.2.4. Résultats des essais de multiplication *in vitro*

##### III.2.4.1. Résultats de la cinétique de croissance des vitro-semis

La croissance des vitro-semis a été suivie durant une période de 160 jours, vu que ces plantes présentent un rythme de croissance très lent.

On constate que la croissance des vitro-semis chez les deux espèces suit une progression lente, mais avec un développement plus important de l'espèce *M. communis* par rapport à *M. nivellei* (figure 60 et figure 61). Après 8 semaines de développement, leur appareil végétatif est constitué par deux feuilles cotylédonaires, un hypocotyle et une petite racine.

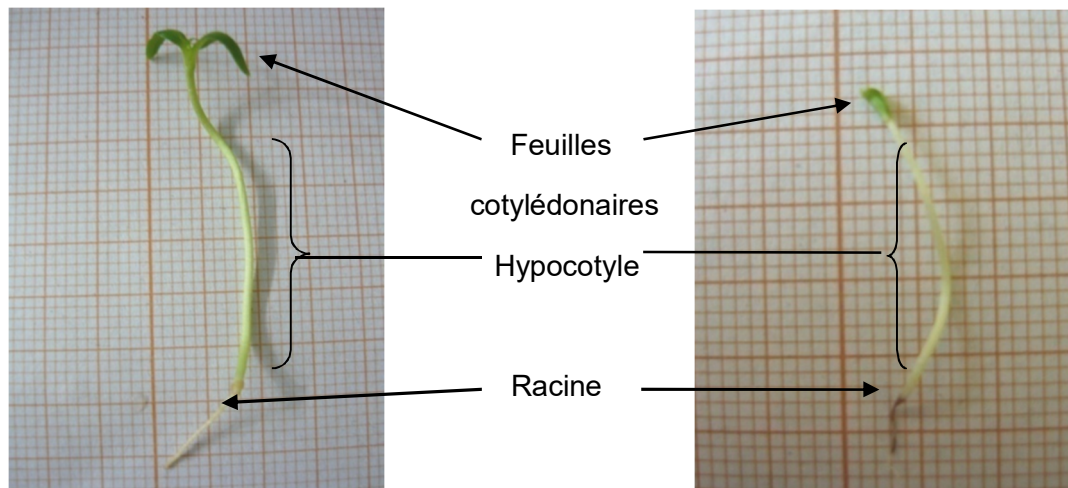


Figure 60: Vitro-semis de *M. communis* âgé de 8 semaines.

Figure 61: Vitro-semis de *M. nivellei* âgé de 8 semaines.

### III.2.4.1.1. Elongation de l'hypocotyle

La cinétique de croissance des vitro-semis sur un milieu MS dépourvu d'hormones, chez les deux espèces, montre un début de germination durant les dix premiers jours, marqué par l'apparition d'une fine racine blanchâtre.

L'hypocotyle suit une évolution exponentielle chez l'espèce *M. communis*, marquée par une progression lente durant le premier mois, mais connaît une accélération importante au-delà, et atteint après 160 jours, une longueur moyenne de 57,75 mm (figure 62).

Quant à l'axe aérien de l'espèce *M. nivellei*, il suit une évolution lente observée pendant les deux premiers mois, et ne s'épanouit qu'au-delà du 60<sup>ème</sup> jour, pour atteindre 38,45 mm en moyenne après 160 jours (figure 62).

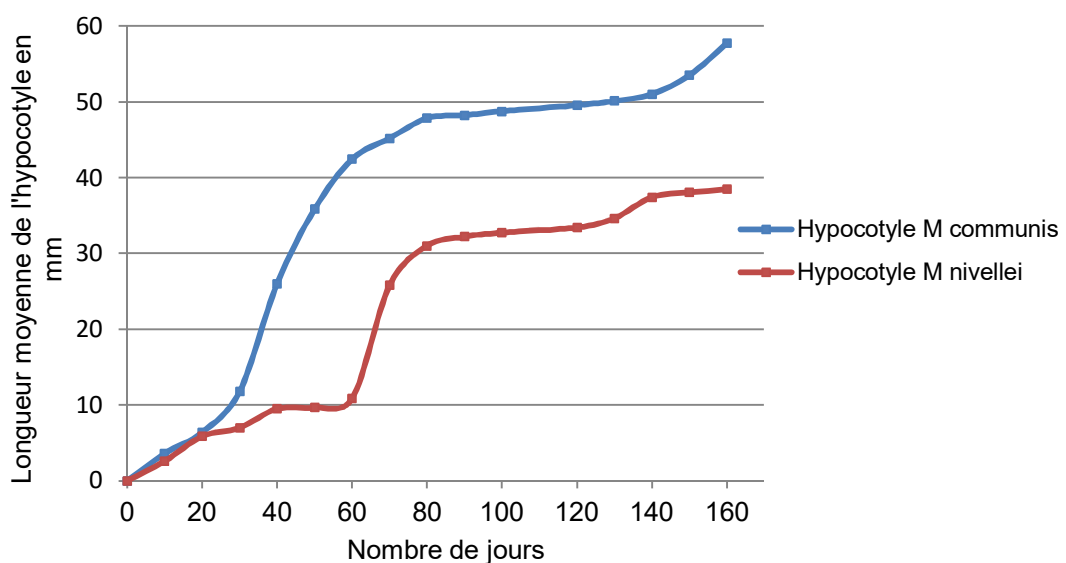


Figure 62: Evaluation de la cinétique d'allongement des hypocotyles chez les vitro-semis de *M. communis* et *M. nivellei*.

### III.2.4.1.2. Production foliaire

Nous avons remarqué que la production foliaire est presque similaire pour les deux espèces, pendant les trois premières semaines de culture, marquée par l'apparition des deux feuilles cotylédonaire. Le développement des feuilles se fait par paire, car ces plantes sont caractérisées par des feuilles opposées décussées par rapport à l'axe caulinaire.

Ainsi, le développement foliaire paraît plus important chez l'espèce méditerranéenne *M. communis*, où nous enregistrons l'apparition des deux premières feuilles cotylédonaire à partir du 20<sup>ème</sup> jour. Ce n'est qu'à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine que l'on commence à observer l'apparition des feuilles proprement dites. Le vitro-semis de *M. communis* peut donner entre 16 et 18 feuilles (en moyenne 16,25 feuilles/vitro-semis) au terme du 160<sup>ème</sup> jour d'observation (figure 63).

L'espèce saharo-endémique a donné les plus faibles résultats de croissance, l'apparition des feuilles ne débute qu'à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine sur l'ensemble des vitro-semis, cette différence va s'accroître au-delà du 60<sup>ème</sup> jour, pour atteindre en moyenne 10,36 feuilles/vitro-semis après 160 jours d'observation (figure 63).

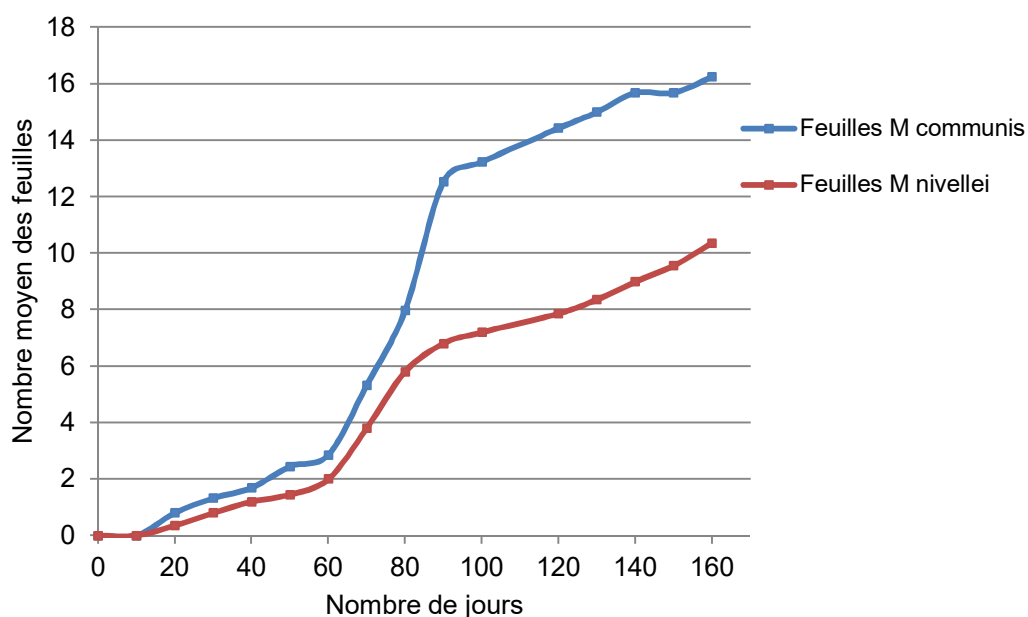


Figure 63: Evaluation de la cinétique d'apparition des feuilles chez les vitro-semis de *M. communis* et *M. nivellei*.



### III.2.4.1.3. Développement de la racine

L'évolution de la croissance racinaire a été lente durant les trois premières semaines, suivie par une croissance exponentielle entre la 4<sup>ème</sup> et la 5<sup>ème</sup> semaine. Au terme de la période d'observation, la longueur moyenne de la racine principale avoisine 19,01mm pour *M. communis* et 14,14 mm pour l'espèce *M. nivellei* (figure 64).

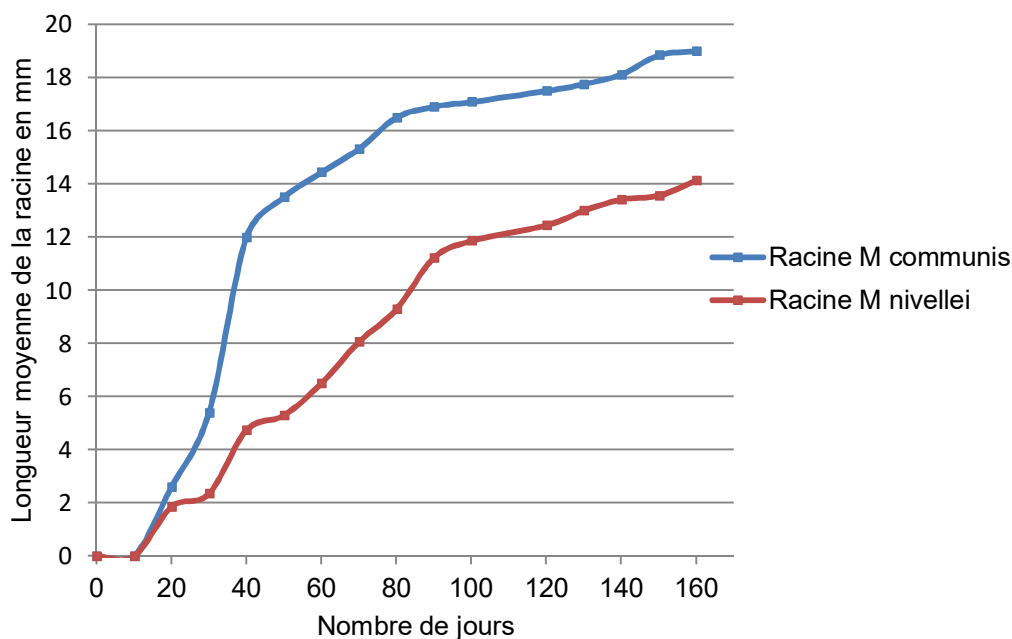


Figure 64: Evaluation du développement racinaire de *M. communis* et *M. nivellei*

Un rare développement des racines adventives, à partir des feuilles cotylédonaires, a été observé chez *M. communis* au cours des essais de germination effectués sur boîtes de Pétri (7%), ainsi que ceux réalisés *in vitro*. On suppose que ce comportement est induit par la production d'auxines endogènes qui sont susceptibles de provoquer le développement de racines adventives, pour subvenir aux besoins de la plantule (figure 65).

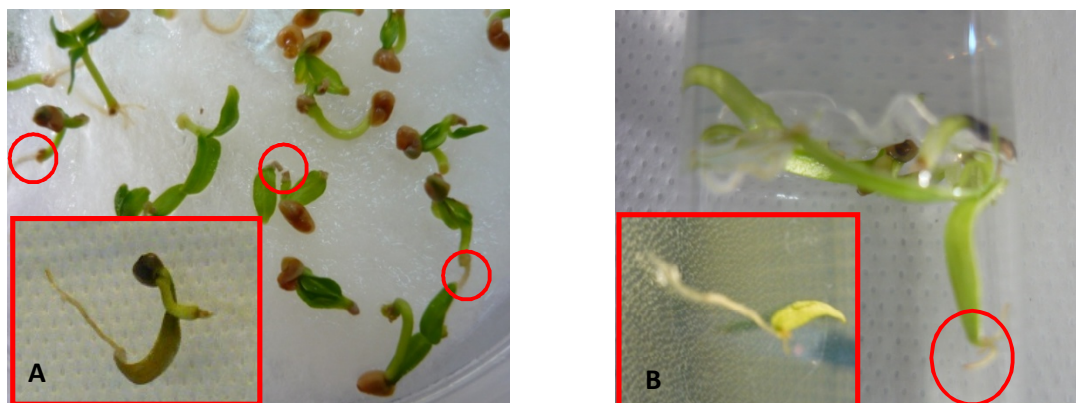


Figure 65: Développement des racines adventives chez *M. communis*.

A: Racines adventives chez *M. communis* cultivée en boîtes de pétri

B: Racines adventives chez *M. communis* cultivée en *in vitro*.



### III.2.4.2. Résultats de la multiplication par micro-bouturage des vitro-semis

#### III.2.4.2.1. Phase de multiplication

A partir des vitro-semis âgés de 16 semaines, nous avons procédé à leur fragmentation en micro-boutures de 0,5 à 1 cm, portant au moins deux nœuds opposés par micro-bouture. Nous avons utilisé un milieu de base MS, supplémenté par 100 mg/l d'acide ascorbique, afin de palier au problème des substances phénoliques secrétées par le myrte. Cependant, plusieurs balances hormonales ont été testées en utilisant la BA et l'ANA.

##### III.2.4.2.1.1. Effet de la balance hormonale ( BA/ANA)

Nous avons constaté que la plupart des combinaisons hormonales testées donnent un bon taux de débourrement des micro-boutures, avec des pourcentages dépassant 60% sur les milieux M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub> et M<sub>5</sub>. Le témoin présente un pourcentage inférieur à 20%.

Les résultats obtenus après sept semaines de culture montrent que la meilleure combinaison hormonale pour le développement caulinaire est celle représentée par le milieu M<sub>3</sub> et le milieu M<sub>4</sub> respectivement (figure 66). Le taux de débourrement, sur le milieu M<sub>3</sub>, est plus important pour *M. communis* (92,12%), par rapport à *M. nivellei* (90,13%).

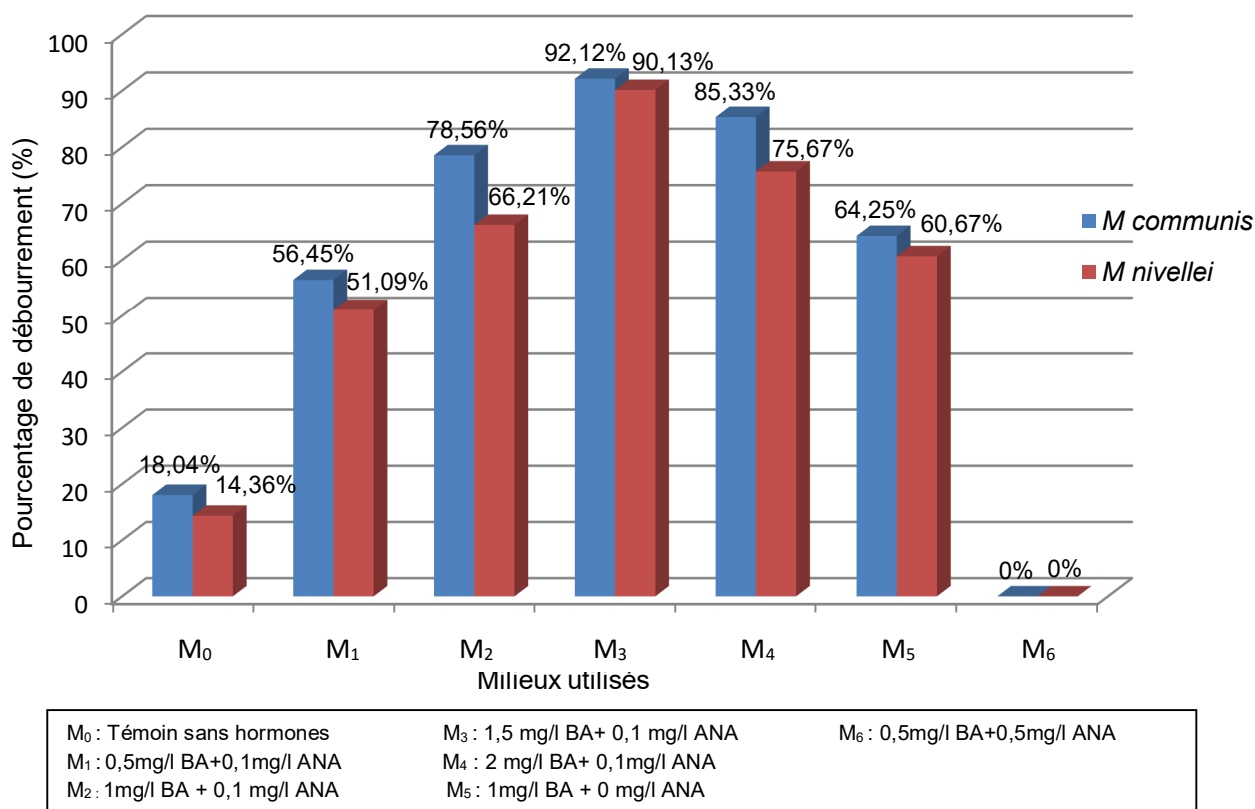


Figure 66: Taux de débourrement des bourgeons chez *M. communis* et *M. nivellei*.

Le milieu témoin présente un faible pourcentage de débourrement des bourgeons évalué à 18,04% pour *M. communis* et 14,36% pour *M. nivellei*, mais qui n'est toutefois pas négligeable. Alors que le milieu M<sub>6</sub> n'a présenté aucun débourrement visible, mais plutôt une dédifférenciation cellulaire, marquée par l'apparition d'un cal à la base de la micro-bouture, ainsi qu'au point de contact des feuilles avec la surface du milieu de culture (figure 67).

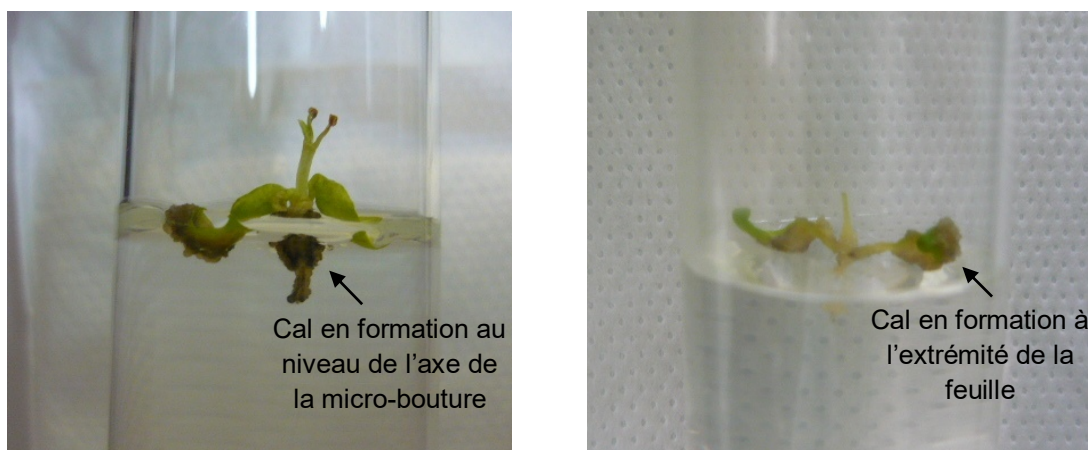


Figure 67: Micro-boutures de *M. communis* (à gauche) et *M. nivellei* (à droite) en début de dédifférenciation sur le milieu M<sub>6</sub>

### III.2.4.2.2. Phase d'élongation

#### III.2.4.2.2.1. Effet de la balance hormonale auxine/cytokinine

- Chez *M. communis*

Le milieu de base MS contenant 1,5mg/l BA et 0,1mg/l ANA a donné le meilleur allongement de l'axe caulinaire, avec une moyenne de  $5,81 \pm 0,23$  cm, et le plus grand nombre de feuilles développées avec  $20,00 \pm 0,77$  feuilles/micro-bouture (tableau 29 et figure 68).

Le milieu contenant 2mg/l BA et 0,1mg/l ANA arrive en deuxième position avec un allongement moyen de  $5,40 \pm 0,25$  cm et un nombre moyen de feuilles variant entre 16 et 20 ( $17,12 \pm 0,67$  feuilles/micro-bouture).

Tableau 29: Effet de la balance hormonale BA/ANA sur l'allongement moyen des tiges et le nombre moyen des feuilles chez *M. communis*.

<i>M. communis</i>	ANA (mg/l)	BA (mg/l)				
		0	0,5	1	1,5	2
Longueur moyenne de la tige (cm)	0	$1,55 \pm 0,45$	$1,85 \pm 0,11$	$2,21 \pm 0,05$	$3,30 \pm 0,67$	$3,46 \pm 0,37$
	0,1	-	$2,28 \pm 0,33$	$4,21 \pm 0,69$	<b><math>5,81 \pm 0,23</math></b>	$5,40 \pm 0,25$
Nombre moyen de feuilles	0	$3,00 \pm 0,21$	$11,00 \pm 1,20$	$13,08 \pm 0,42$	$16,39 \pm 0,25$	$14,54 \pm 1,20$
	0,1	-	$12,50 \pm 2,06$	$16,50 \pm 0,33$	<b><math>20,00 \pm 0,77</math></b>	$17,12 \pm 0,67$

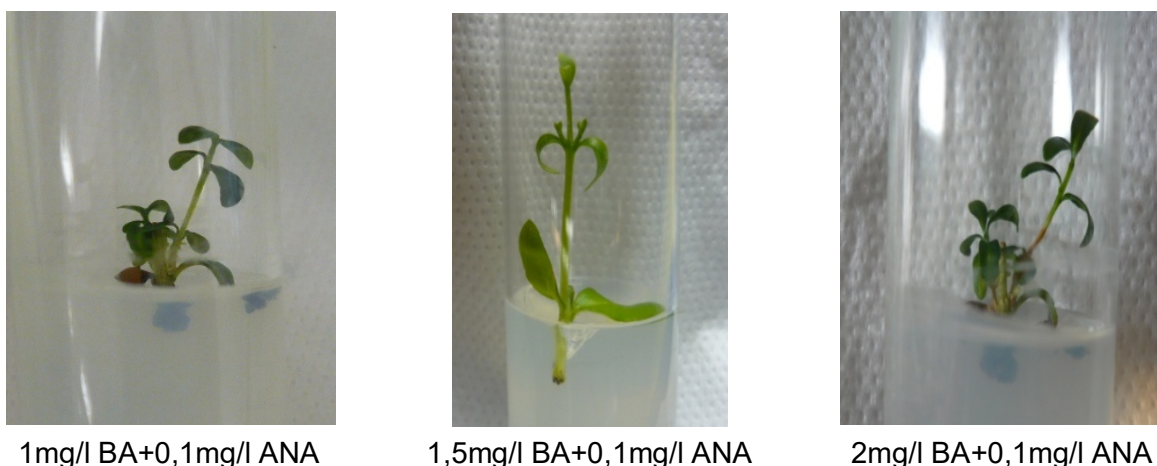


Figure 68: Croissance des micro-boutures de *M. communis* selon la balance hormonale

- Chez *M. nivellei*

On observe un bon allongement de l'axe caulinaire sur le milieu de culture contenant 1,5mg/l BA et 0,1mg/l ANA, où il atteint en moyenne  $5,63 \pm 0,48$  cm, associé à un grand nombre de feuilles développées estimé à  $25,00 \pm 0,89$  feuilles/micro-bouture (tableau 30 et figure 69). Cependant, tout comme pour *M. communis*, l'augmentation de la concentration en BA n'apporte pas d'amélioration.

On remarque également qu'au delà de la huitième semaine, les nouvelles feuilles se développent lentement, et la sénescence des anciennes s'accélère. Ce qui nous a poussé à repiquer les explants sur un milieu neuf de même combinaison hormonale (après chaque 60 jours). Nous supposons que cela pourrait être dû à l'épuisement du milieu de culture, des observations similaires ont été rapportées par **Harouni et al. (1995)**.

Tableau 30: Effet de la balance hormonale BA/ANA sur l'allongement moyen des tiges et le nombre moyen des feuilles chez *M. nivellei*.

<i>M. nivellei</i>	ANA (mg/l)	BA (mg/l)				
		0	0,5	1	1,5	2
Longueur moyenne de la tige (cm)	0	1,33±0,25	1,65±0,06	2,11±0,95	2,56±0,36	3,02±0,55
	0,1	-	1,98±0,08	3,42±0,19	<b>5,63±0,48</b>	5,16±0,33
Nombre moyen de feuilles	0	3,44±0,67	6,12±1,24	10,23±1,12	15,46±2,45	15,78±0,39
	0,1	-	10,25±0,34	18,50±0,32	<b>25,00±0,89</b>	23,22±0,33



1mg/l BA+0,1mg/l ANA



1,5mg/l BA+0,1mg/l ANA



2mg/l BA+0,1mg/l ANA

Figure 69: Croissance des micro-boutures de *M. nivellei* selon la balance hormonale.

La différence dans la longueur des tiges de la même espèce dans ces trois milieux de prolifération semble être stimulée également par leur richesse en éléments minéraux. Cette différence est expliquée par **Brhadha et al. (2003)**, qui renvoient cet effet à la richesse du milieu de base en azote et en potassium. Il est également probable que l'hétérogénéité des semis en soit responsable (**Margara, 1988**).

#### III.2.4.2.2.2. Effet de l'acide gibbérellique (AG<sub>3</sub>)

Certaines plantules obtenues après induction du bourgeonnement axillaire, se sont développées en rosettes avec des entre-nœuds très courts, particulièrement sur le milieu contenant 0,1 mg/ml ANA et 0,5 mg/ml BA, rendant ainsi leur séparation difficile (figure 70).



Figure 70: Vitro-plant à entre-nœuds très courts de *M. communis* (à gauche) et *M. nivellei* (à droite)

A cet effet, nous avons tenté de reprendre les combinaisons hormonales (1mg/l BA+0,1mg/l ANA ; 1,5mg/l BA+0,1mg/l ANA ; 2mg/lBA+0,1mg/l ANA) avec l'addition de l'AG<sub>3</sub> à raison de 0,05mg/l (M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> et M<sub>3</sub>). Après un mois, l'axe caulinaire a connu un allongement important, et une bonne séparation inter-nodale chez *M. communis* et *M. nivellei*, par rapport aux témoins (figure 71).

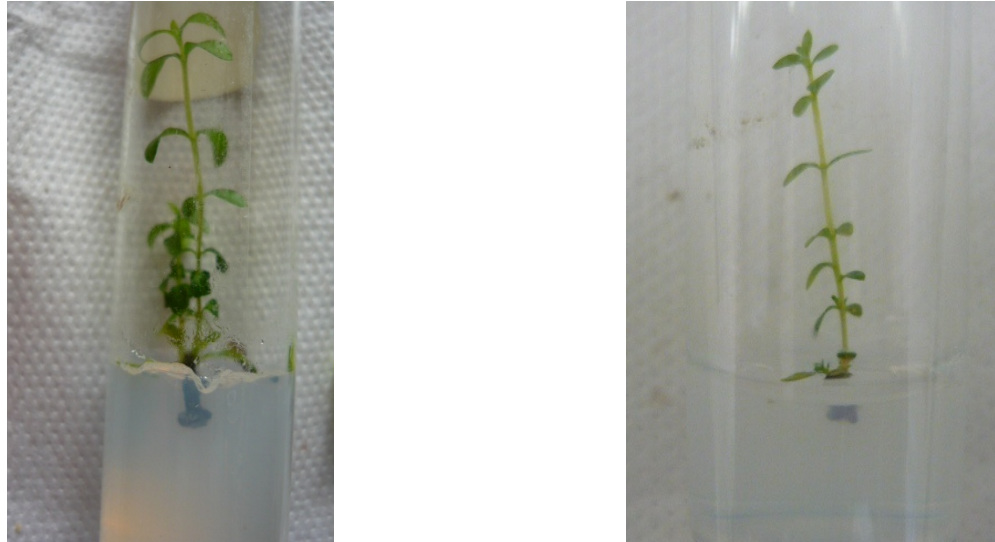


Figure 71: Allongement des vitro-plants de *M. communis* (à gauche) et *M. nivellei* (à droite) après un mois sur milieu M<sub>2</sub> (0,1 mg/ml ANA+1,5 mg/ml BA+0,05 mg/ml AG<sub>3</sub>).

La réponse aux régulateurs de croissance est variable (figure 72). Le milieu M<sub>2</sub> (0,1 mg/ml ANA+1,5 mg/ml BA+0,05 mg/ml AG<sub>3</sub>) a fourni le meilleur allongement caulinaire, aussi bien pour *M. communis* ( $7,8 \pm 0,23$ cm) que pour l'espèce *M. nivellei* ( $6,63 \pm 0,48$ cm). Le milieu M<sub>3</sub> (0,1 mg/ml ANA+2 mg/ml BA+0,05 mg/ml AG<sub>3</sub>) vient en 2<sup>ème</sup> position et le milieu M<sub>1</sub> en 3<sup>ème</sup> position, ce dernier n'a pas fourni un bon allongement pour *M. nivellei* ( $4,10 \pm 0,56$ cm).

L'analyse de la variance (au risque  $\alpha=0,05$ ) révèle que la composition en hormones du milieu influe de façon significative sur l'allongement moyen des vitro-plants.

Les travaux de **Druart et al. (1983)**, ainsi que ceux de **Morel et Muller (1964)** ont montré que, dans de nombreux cas, si la séparation des vitro-plants est difficile, il suffit de les introduire sur un milieu additionné de AG<sub>3</sub>. Son action s'exerce au niveau de la zone méristématique sub-apicale, en favorisant l'élongation des entre-nœuds de la tige.

**Mata et Kongjika (2010)** ont rapporté que le milieu MS contenant 0,65mg/l BAP+ 0,01mg/l ANA+0,1mg/l AG<sub>3</sub>, offre un substrat favorable pour l'élongation des explants de *M. communis*.

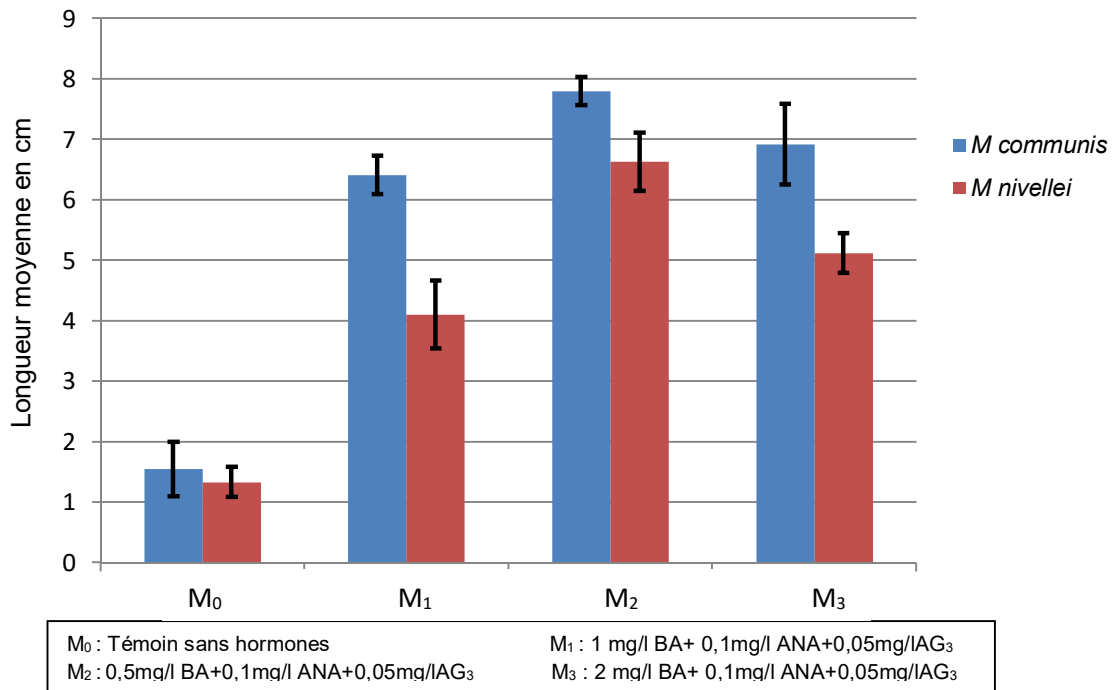


Figure 72: Effet de AG<sub>3</sub> sur l'allongement moyen des vitro-plants de *M. communis* et *M. nivellei*.

#### III.2.4.2.3. Phase d'enracinement

L'enracinement des vitro-plants est obtenu après douze semaines sur le milieu de base MS additionné d'ANA, à des concentrations allant de 0,1 à 1mg/l. Nous avons constaté que seuls les vitro-plants développés sur le milieu d'élongation, contenant 1mg/l BA et 0,5mg/l ANA, ont pu développer des racines (figure 73, figure 74).

Le milieu MS supplémenté par 0,5 mg/l ANA a pu initier la rhizogenèse, la concentration de 1mg/l (M<sub>3</sub>) a donné le meilleur résultat (figure 3.64), aussi bien pour *M. communis* (3,98±0,23 cm) que pour l'espèce *M. nivellei* (2,69±0,33 cm).



Figure 73: Développement de racines sur des vitro-plants de *M. communis* (à gauche) et *M. nivellei* (à droite)



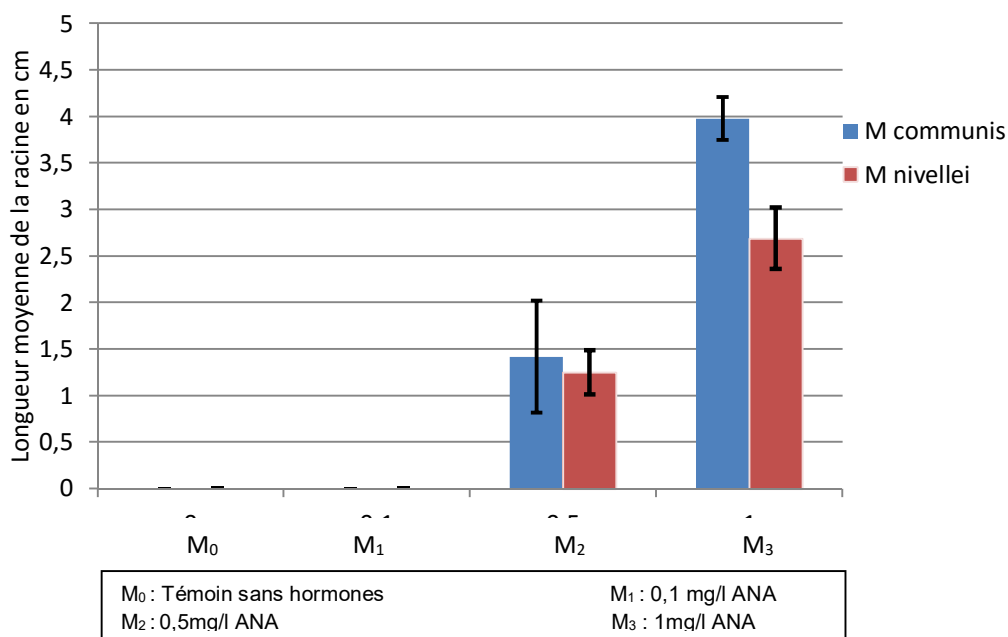


Figure 74: Effet de la variation de la concentration en ANA sur l'enracinement des vitro-plants de *M. communis* et *M. nivellei*.

Après trois mois d'observation, les plantules cultivées sur le milieu d'élongation contenant 1,5mg/l BA+0,1mg/l ANA, et celui contenant 2mg/l BA+0,1mg/l ANA, n'ont pas développé de racines (figure 75), mais nous avons constaté une dédifférenciation des cellules situées à la base de ces plantules.



Figure 75: Vitro-plant de *M. communis* (à gauche) et *M. nivellei* (à droite) dépourvus de racines.

En culture *in vitro*, la phase d'enracinement est généralement favorisée par l'addition d'auxines aux milieux de culture. Selon **Viana et al. (1997)**, les tiges prélevées sur des végétaux jeunes fournissent des vitro-plants dont les potentialités rhizogènes sont les meilleures.

Le phénomène de la rhizogenèse est expliqué par **Leifert (1991)**, rapportant que l'auxine joue un rôle prépondérant dans le mécanisme de l'enracinement adventif, c'est cependant, la blessure de la tige au moment du micro-bouturage, qui donne le signal initial. Celui-ci peut ensuite être amplifié par l'apport d'auxine exogène ou par l'activité des néophytes rhizogènes qui secrètent des auxines.

Selon **Favre (1977)**, la néoformation des racines est déclenchée par l'action d'une substance mobile synthétisée par les feuilles adultes, celle-ci migre vers la base de la tige, cette substance hypothétique spécifique de la rhizogenèse avait été appelée la *Rhizocaline*, considérée comme auxine endogène, celle-ci fonctionne en association avec les auxines exogènes.

Par ailleurs, **Hartmann et al. (1990)** ont démontré, que dans la plupart du temps, la présence des bourgeons et des feuilles, est nécessaire à la rhizogenèse, rappelant que la synthèse des auxines endogènes se fait au niveau des bourgeons. par contre, un excès de cytokinine peut exercer un effet antagoniste sur le développement rhizogène

### III.2.4.3. Résultats de la callogenèse

Les résultats des expériences préliminaires, nous ont permis de mettre en exergue, l'influence de l'âge de l'explant et de sa provenance. Ainsi, les explants provenant des plantules cultivées *in vitro* réagissent mieux que ceux prélevés à partir des plantes récoltées *in situ*.

L'utilisation des explants de feuilles, obtenus en *in situ*, n'a pas fourni de résultats satisfaisants, d'autant plus que ces derniers sont très riches en polyphénols et se nécrosent au bout de 15 jours de culture. Les explants de feuilles, d'entre-nœuds et de racines prélevés des vitro-semis sont mis en culture sur le milieu de base MS, avec différentes combinaisons hormonales.

#### III.2.4.3.1. Effet de la balance cytokinine/auxine (1/1) sur la callogenèse

Les pourcentages de callogenèse ont été déterminés après 60 jours de leur première induction, sur les explants de feuilles, d'entre-nœuds et de racines. Nous constatons que les milieux contenant une teneur élevée en régulateurs de croissance sont les moins callogènes. De plus, le milieu contenant l'ANA et la kinetine est significativement plus callogène que le milieu contenant le 2,4-D et la kinetine. Ceci se répercute sur la surface totale des cals, qui est nettement plus importante pour le premier.

Le brunissement des milieux est significativement plus important sur les milieux contenant le 2,4-D comme auxine. Des constatations similaires ont été rapportées par les travaux de **Seznec (1986)** sur le comportement callogène de l'espèce *Bremontiera amoxylon*, appartenant à la famille des Myrtaceae.

Par ailleurs, si aucune relation n'apparaît entre le brunissement et la nature des fragments callogènes, on suppose que ces nécroses observées sont dues à la production de composés, de nature phénolique, ayant une action inhibitrice sur l'activité des tissus et la croissance des cals.



### III.2.4.3.2. Effet de la nature des explants sur le développement des cals

Les résultats obtenus ont montré que le milieu M<sub>0</sub> est le seul n'ayant fourni aucune réponse pour l'ensemble des explants étudiés.

#### A.1. L'espèce *M. communis*

- Explants de feuilles

Les feuilles ont exprimé une excellente aptitude à la callogenèse sur le milieu M<sub>1</sub> (0,5mg/l ANA+0,5mg/l Kin), 96,04% des explants ont donné des cals, après quatre semaines de culture, suivi en deuxième position par le milieu M<sub>2</sub> (0,5mg/l 2,4-D+0,5mg/l Kin) avec un pourcentage de callogenèse de 70,75%.

Les pourcentages de callogenèse sur les milieux M<sub>3</sub> (1mg/l ANA+1mg/l Kin) et M<sub>4</sub> (1mg/l 2,4-D+1mg/l Kin), sont estimés respectivement à 54,16% et 48,30%. Les concentrations en hormones de ces derniers sont deux fois plus faibles que celles des milieux M<sub>1</sub> et M<sub>2</sub> (figure 76).

- Explants d'entre-nœuds

Les milieux M<sub>1</sub> et M<sub>2</sub> ont fourni les pourcentages les plus élevés pour la callogenèse des explants d'entre-nœuds, avec une prédominance du premier qui a exprimé un taux de callogenèse estimé à 89,17%. Les milieux M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> et M<sub>4</sub> ont donné des pourcentages respectivement décroissants (figure 76).

- Explants de racines

Pour les explants issus des racines, les observations ont été prolongées pour une durée de 20 semaines. Ces derniers ont présenté les plus faibles pourcentages de callogenèse, sur la quasi-totalité des milieux testés, seuls les milieux M<sub>1</sub> et M<sub>2</sub> ont fourni des résultats plus ou moins satisfaisants, mais ne dépassant pas le seuil de 25% (figure 76). Cependant, trois explants cultivés sur M<sub>2</sub>, ont exprimé une activité callogène accentuée à partir de la 18<sup>ème</sup> semaine, mais ils se sont complètement nécrosés après leur repiquage sur un milieu neuf de même composition.

#### A.2. L'espèce *M. nivellei*

D'après les résultats obtenus, les quatre milieux testés (M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> et M<sub>4</sub>) ont tous répondu favorablement à la callogenèse, mais avec des proportions variables.

- Explants de feuilles

Le milieu M<sub>1</sub> a pu fournir le meilleur pourcentage d'apparition de cals, estimé à 82,14%, alors que le milieu M<sub>2</sub> a présenté 60,05%. Les milieux M<sub>3</sub> et M<sub>4</sub> sont peu callogènes, ainsi des cals sont apparus sur la moitié des explants testés. Par contre, le milieu témoin dépourvu d'hormones n'a aucun effet (figure 77).

- Explants d'entre-nœuds

La callogenèse des fragments d'entre-nœuds ne débute jamais avant la septième semaines de culture, les cals se sont bien développés sur les milieux M<sub>1</sub>(78,22%) et M<sub>2</sub> (68%). Ces cals connaissent une croissance très active, au delà de la 12<sup>ème</sup> semaine, et aboutissent presque toujours à la formation de cals compactes callogènes de couleur vert-clair (figure 77).

- Explants de racines

Sur l'ensemble des milieux testés, aucune manifestation callogène n'a pas été observée sur tous les milieux, de rares formations callogènes commencent a se développer au delà de la 16<sup>ème</sup> semaine, leur taux ne dépasse pas 21% au terme de la 18eme semaine (figure 77).

Les interactions de type nature de l'explant/développement callogène, nous ont permis de dévoiler le comportement de chaque explant étudié :

- Les tissus foliaires constituent un matériel de choix pour l'obtention rapide de cals. Les fragments de feuilles sont tous callogènes, après seulement 4 à 5 semaines de culture et donnent naissance à des cals volumieux de couleur verte.
- La callogenèse des explants d'entre-nœuds commence au-delà de la 7<sup>ème</sup> semaine, la prolifération des tissus est souvent lente au départ, mais aboutit presque toujours à la formation de cals compactes de couleur vert-clair.
- Pour les explants de racines, la callogenèse n'a été observée que chez *M. communis*, où elle ne débute jamais avant la 10<sup>ème</sup> semaine, et ne concerne qu'un nombre très restreint d'explants. Quelques rares cals obtenus pour *M. nivellei* ont connu une croissance au delà de la 16<sup>ème</sup> semaine.

L'action combinée des différents milieux et la nature de l'explant montrent un effet hautement significatif dont on peut tirer les observations:

- Effet des différentes concentrations de l'ANA et la kinetine combinées sur le développement callogène: le développement callogène est meilleur pour les feuilles, bon pour les entre-nœuds et très faible voir nul pour les racines.
- Effet des milieux témoins sur le développement des cals: le milieu MS sans hormones ne stimule aucune aptitude des explants à la callogenèse, quelque soit leur nature.

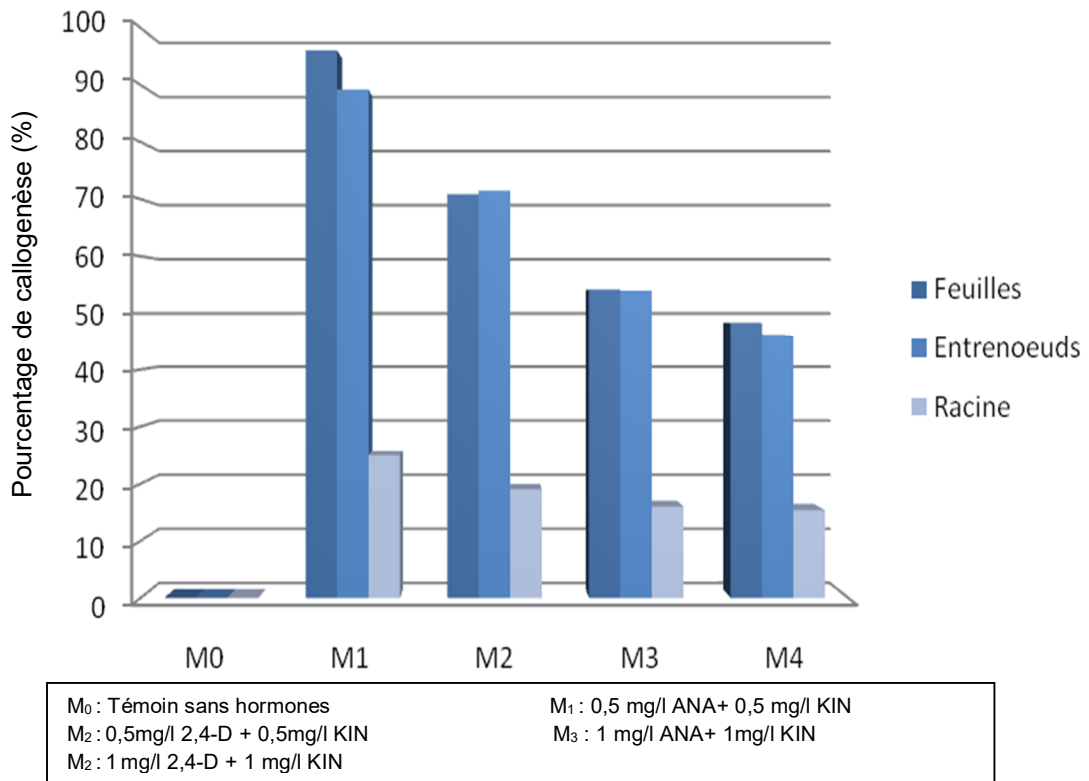


Figure 76 : Effet des balances hormonales auxine/cytokinine sur le pourcentage d'induction de callogenèse chez *M. communis*

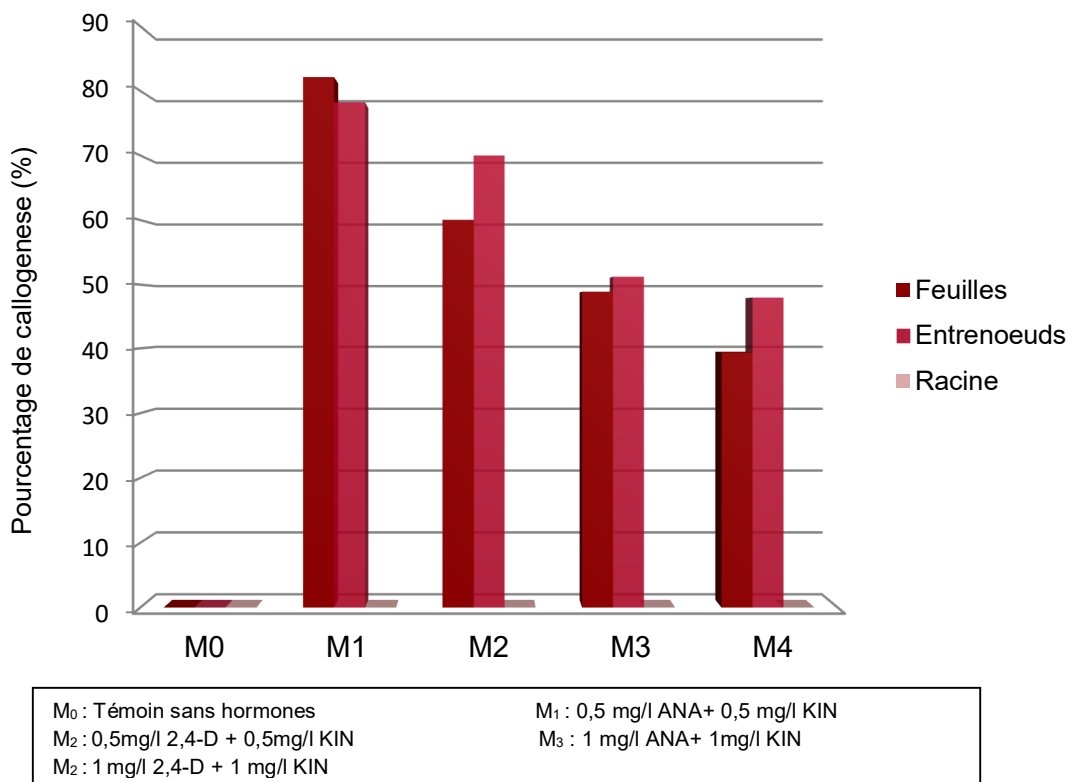


Figure 77: Effet des balances hormonales auxine/cytokinine sur le pourcentage d'induction de la callogenèse chez *M. nivellei*.

### III.2.4.3.3. Effet des différentes combinaisons hormonales sur la texture et la couleur des cals

#### III.2.4.3.3.1. Aspect et texture des cals issus d'explants de feuilles

Le développement du cal commence au niveau de la nervure principale, et parfois sur les marges du limbe foliaire chez les deux espèces étudiées (**Appendice H**).

En présence de la kinetine à 0,5 mg/l, les cals sont de forme régulière et de texture friable, ils passent progressivement d'une couleur initiale jaune-vert clair au vert (chlorophylliens).

Nous remarquons que les cals des feuilles, développés sur les milieux M<sub>1</sub> et M<sub>2</sub>, présentent une couleur verte à vert claire, avec une texture friable à consistance molle, caractéristique morphologique des cals non embryogènes (tableau 31). Ces derniers sont aptes à être conduit vers une organogenèse, car la couleur verte indique la présence d'une initiation de bourgeonnement (cals caulogènes).

Cependant, les milieux M<sub>3</sub> et M<sub>4</sub> fournissent des cals, dont la couleur est initialement vert à jaune claire, caractérisés par un développement réduit, mais finissent par se dessécher au bout de 8 semaines et deviennent brunâtres.

Tableau 31: Aspect et couleur des cals obtenus à partir des explants de feuilles.

Milieu	Composition (mg/l)	Aspect des cals obtenus	Couleur des cals
M <sub>0</sub>	Témoin sans hormones	Explant nécrosé après 1 mois	-
M <sub>1</sub>	0,5mg/l ANA + 0,5mg/l Kin	Cals friables bien développés	Vert
M <sub>2</sub>	0,5mg/l 2,4-D + 0,5mg/l Kin	Cals friables bien développés	Vert clair, vert
M <sub>3</sub>	1mg/l ANA + 1mg/l Kin	Cals compacts très petits	Brunâtre
M <sub>4</sub>	1mg/l 2,4-D + 1mg/l Kin	Cals compacts très petits	Brunâtre

#### III.2.4.3.3.2. Aspect et texture des cals issus d'explants d'entre-nœuds

La callogénèse commence au niveau des sections des deux extrémités de l'explant d'entre-nœuds (**Appendice H**). Les différents milieux de cultures utilisés au cours de cet essai donnent des cals de couleur et de texture variées (tableau 32).

Nous remarquons que les cals issus d'entre-nœuds diffèrent par leur couleur et leur texture, selon la composition du milieu en hormones de croissance. La plupart des milieux ont donné des cals de couleur vert clair, beige à jaune, de texture friable à consistance molle, caractéristique morphologique des cals embryogènes d'après **Piatti (1988)**. Le milieu témoin, quant à lui, ne donne aucune structure indifférenciée et les explants ont fini par se nécroser.

Tableau 32: Aspect et couleur des cals obtenus à partir des explants d'entre-nœuds.

Milieu	Composition (mg/l)	Aspect des cals obtenus	Couleur des cals
M <sub>0</sub>	Témoin sans hormones	Explant nécrosé après 1 mois	-
M <sub>1</sub>	0,5mg/l ANA + 0,5mg/l Kin	Cals friables bien développés	Vert clair, jaune
M <sub>2</sub>	0,5mg/l 2,4-D + 0,5mg/l Kin	Cals friables bien développés	Vert clair, beige
M <sub>3</sub>	1mg/l ANA + 1mg/l Kin	Cals friables très petits	Brunâtre
M <sub>4</sub>	1mg/l 2,4-D + 1mg/l Kin	Cals friables très petits	Brunâtre

#### III.2.4.3.3. Aspect et texture des cals issus d'explants de racines

Quant aux explants de racines chez *M. communis*, on note le développement de cals très petits, avec une texture noduleuse, à consistance molle, caractéristique morphologique des cals embryogènes (**Appendice H**). Cependant, aucun développement callogène n'a été observé sur les explants des racines de *M. nivellei*.

Selon **Boxus et al. (1995)**, les fragments prélevés à différents niveaux de la plante ne donnent pas les mêmes résultats. Cela est dû à l'état physiologique interne des cellules de l'explant. En outre, **Chaussat et al. (1980)** confirment que le milieu MS sans hormones, ne manifeste aucune réaction callogène, et la plupart des explants se nécrosent. Chose que nous avons constaté éventuellement au cours de nos essais.

#### III.2.4.3.4. Développement de bourgeons néoformés sur cals

Quelques cals issus des explants de feuilles, sur le milieu M<sub>1</sub>, comportant une balance hormonale 0,5 mg/l ANA/0,5 mg/l Kin, ont présenté, sur des zones vertes finement granuleuses, des points végétatifs (bourgeons néoformés). Ces derniers ont été transférés sur un milieu d'élongation contenant 1 mg/l BAP+0,05 mg/l ANA+0,05 mg/l GA<sub>3</sub>.

Un mois et demi plus tard, les bourgeons néoformés sur les cals ont évolué en de minuscules pousses feuillées, avec une longueur moyenne de 14±0,67mm pour *M. communis* et 15,23±0,45mm pour *M. nivellei* (**Appendice I**).

Certains cals développés sur le milieu M<sub>1</sub> ont été transférés sur le même milieu de base frais (milieu de callogenèse) et ont été régulièrement repiqués pour tenter de stimuler le développement des bourgeons restants. Bien que le volume des cals a légèrement augmenté, mais les bourgeons néoformés n'ont pas bien évolué, et ont gardé une teinte beige (vitrifiés), surtout chez l'espèce *M. nivellei* (**Appendice I**).

Après sept semaines, les bourgeons se sont desséchés. Ces mêmes constatations ont été obtenues lorsque nous avons tenté de transférer des cals organogènes sur un milieu dépourvu de régulateurs de croissance (**Appendice I**).

Le rapport de concentrations en cytokinine et en auxines joue un rôle essentiel dans le déclenchement ou la stimulation du bourgeonnement en culture *in vitro* (Skoog et Miller, 1957).

Au cours de nos essais, l'apparition sporadique des bourgeons sans développement, suggère bien que les cals issus des feuilles possèdent un potentiel caulogène, dont l'expression est limitée par des conditions de culture non optimales. Le transfert des cals sur un milieu riche en BAP pourrait, probablement, stimuler le bourgeonnement et accentuer le développement de l'axe aérien.

Mais au delà du bourgeonnement lui-même, et des facteurs qui le contrôlent, se pose également le problème d'obtention de pousses feuillées bien développées. En effet, contrairement au micro-bouturage, nous avons remarqué que le développement des bourgeons reste dans le meilleur des cas limité à quelques feuilles.

### III.3. Résultats de l'étude phytochimique

#### III.3.1. Caractérisation physico-chimiques des parties étudiées

Les résultats de la caractérisation physico-chimique, des parties étudiées de chaque plante, ont été déterminés en comparaison aux normes standardisées relatives au pH et au taux d'humidité (tableau 33).

Tableau 33: Paramètres physico-chimiques des organes étudiés de chaque plante.

Paramètres physico-chimiques	<i>M. communis</i> (MC)			<i>M. nivellei</i> (MN)			Normes
	Fe	Fr	Cals	Fe	Fr	Cals	
pH à 22°C	5,48	5,87	5,45	5,66	5,97	5,57	5-7(AFNOR, 2005)
Taux d'humidité %	6,93	12,66	6,55	6,77	13,0	6,7	<15% (Pharmacopée européenne, 2002)
Taux de cendres %	6,31	9,8	5,35	6,11	7,60	5,20	-
Taux des substances extractibles dans l'éthanol %	16,44	35,33	-	11,11	36,66	-	-
Taux des substances extractibles dans l'eau %	12,33	44,67	-	13,41	40,15	-	-

- Le pH

Les poudres des feuilles, des baies et des cals de l'espèce *M. communis* ont donné respectivement des pH de 5,48 ; 5,87 et 5,45 , qui se montrent plutôt acides par rapport à leur homologues de l'espèce *M. nivellei* (5,66 ; 5,98 ; 5,57), bien qu'ils ne franchissent pas le pH 6 dans l'ensemble. On constate ainsi que chaque organe végétal (feuilles/fruits/cals) présente une valeur de pH qui lui est spécifique.

Le test d'homogénéité ( $\alpha=5\%$ ,  $t=1,96$ ) montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les valeurs de pH relatives aux organes étudiés des deux espèces (Appendice J III).

Le pH légèrement acide, est défavorable à la croissance des bactéries, des levures et des moisissures. Rappelons que les altérations provoquées par les levures et les moisissures affectent surtout la qualité organoleptique, et peuvent, dans certaines conditions, provoquer une production de mycotoxines, ce qui rend dangereuse leur consommation (**Bourgeois et al., 1988**).

**Heller (1990)** a indiqué que plusieurs facteurs peuvent influencer le pH, dont : l'état physiologique de la plante, les variations climatiques, les conditions de stockage et les pratiques culturales appliquées.

- Taux d'humidité

Les taux d'humidité dans les poudres végétales des feuilles et les baies de *M. communis*, avoisinent 6,93% et 12,66% respectivement, alors qu'ils correspondent à 6,77% et 13% pour l'espèce *M. nivellei*. Il en est de même pour les deux poudres de cals étudiées, qui ont présenté des taux d'humidité très proches (6,5 et 6,7%) (tableau 33).

Nous avons trouvé un pourcentage d'humidité avoisinant 6,7% en moyenne, dans les poudres des feuilles de ces espèces, alors qu'il représente 12,83% en moyenne pour les baies, et 6,74% en moyenne pour la poudre des cals, indépendamment de leur origine. Ceci montre que les échantillons sur lesquels nous avons travaillé ont été soumis à de bonnes conditions de conservation. De plus, ces taux d'humidité obtenus répondent à la norme décrite par la **pharmacopée européenne (2002)**. Les poudres obtenues sont donc de bonne qualité.

Il est à noter qu'un pourcentage d'eau trop élevé, dans la poudre végétale, permet à un certain nombre de réactions enzymatiques de se développer, entraînant des conséquences néfastes sur leur aspect, leurs caractères organoleptiques ainsi que sur leurs propriétés thérapeutiques, par dégradation des principes actifs dans le temps. En outre, une humidité résiduelle favorise la prolifération de micro-organismes (bactéries, levures, moisissures).

- Taux des cendres

Le taux moyen des cendres de la poudre végétale des feuilles de *M. communis* est estimé à 6,31%, alors qu'il avoisine 6,11% pour l'espèce *M. nivellei*. Il est encore plus important dans les baies, qui ont exprimé respectivement 9,8% et 7,60%. Ces résultats indiquent la présence d'une forte teneur en minéraux chez la plante méditerranéenne, par rapport à l'espèce saharienne (tableau 33). Ce qui nous laisse suggérer que l'espèce *M. communis* peut avoir une action diurétique (**Sallé, 1991**).

Le taux de cendres moyen dans les cals de *M. communis* est égal à 5,35%, et avoisine 5,20% pour l'espèce saharienne *M. nivellei* (tableau 33).

**Ammar et al. (2005)** rapportent que la matière organique représente 957 g/kg dans les rameaux feuillés de l'espèce *M. communis*, soit un taux de cendres égal à 4,3%, ce taux se montre faible par rapport à celui que nous avons enregistré.

La totalité des matières organiques de la plante est éliminée après incinération (carbonisation) et le résidu restant est constitué uniquement de matières minérales, l'évaluation de la composition de la fraction minérale permet de déterminer son degré de propreté (en cas d'absence de traces de métaux lourds).

Dans ce même contexte, **Ozkan et Akbulut (2007)** ont rapporté que le myrte est riche en nitrates avec un très faible taux en nitrites, associé à 18 types de molécules minérales dont : l'aluminium, le bore, le fer, le manganèse et le zinc.

Certaines plantes, riches en minéraux, présentent un taux de cendres naturellement élevé. C'est le cas de certaines *Solanaceae*, qui contiennent de l'oxalate de calcium, ou de certaines plantes médicinales connues pour leur effet diurétique (**Pantoja et al., 1995**).

Selon **Laurant (1991)**, la différence dans le taux de cendres d'un organe végétal à l'autre pourrait s'expliquer par la présence de la silice, ce qui gêne la calcination, engendrant ainsi, un taux de cendres élevé. On pense que c'est le cas pour les baies des deux plantes étudiées, qui ont présenté un taux de cendre élevé, par rapport aux feuilles et aux cals, car la silice peut rentrer dans la constitution des téguments coriaces des graines, contenues à l'intérieur du fruit.

Un rapport a été établi sur la teneur des rameaux feuillés en cendres, montrant la présence d'un taux de 6,109% pour l'espèce saharo-endémique *M. nivellei* (**Touaibia et al., 2014a**)

Les variations rencontrées dans le taux de cendres de nos échantillons, comparés à certains travaux antérieurs, peuvent éventuellement avoir plusieurs causes. Selon **Acquarone et al. (2007)**, ces variations sont dues à certains facteurs pédo-climatiques, l'âge de la plante, la période du cycle végétatif, ou même à des facteurs génétiques.

- Taux des substances extractibles

Le taux du résidu sec extrait par l'eau (infusion) représente 12,33% pour les feuilles de *M. communis*, il est légèrement plus élevé chez l'espèce *M. nivellei*, où il avoisine 13,41%.

L'extrait sec obtenu par macération dans l'éthanol affiche un taux de 16,44% dans les feuilles de *M. communis*, contre 11,11% seulement chez *M. nivellei*. Cependant, les substances extractibles des baies dans l'éthanol ont exprimé un taux qui dépasse 30%, chez les deux espèces (tableau 33). On remarque que le taux des substances extraites par l'éthanol à partir des baies est deux fois plus important, que celles extraites à partir des feuilles, chez les deux plantes étudiées.

Dans un travail antérieur, portant sur la mise en évidence de certaines propriétés phytochimiques de l'espèce *M. nivellei*, nous avons enregistré que les feuilles de cette plante, présentent un taux de substances extractibles dans l'eau avoisinant 16,5%, cependant le taux des substances extractibles dans l'éthanol était estimé à 11,12% (**Touaibia et al., 2014a**).



### III.3.2. Résultats du Screening phytochimique

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés existants dans les organes végétaux de chaque plante, par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de métabolites.

- *Myrtus communis* L.

Les réactions du criblage phytochimique des parties aériennes et des racines de la plante [les tiges(Ti), les feuilles(Fe) et les fruits (Fr)], ont révélé leur richesse en composés phénoliques (flavonoïdes, flavanes, tanins catéchiques et galliques, coumarines, anthocyanes), en quinones, en sucres réducteurs, en terpènes et en sennosides.

Cependant la partie sous-terreine [racines (Ra)] s'est montrée moins riche en métabolites, où on a recensé seulement la présence des tanins, des coumarines ainsi que des sucres et des sennosides (tableau 34).

Tableau 34: Résultats du Screening phytochimique de *M. communis* (MC)

Métabolites recherchés		Réaction	Résultats			
			Ra	Ti	Fe	Fr
Alcaloïdes		Précipité blanc jaunâtre	-	-	-	-
Flavonoïdes		Rouge orange	-	+	+	+
Flavanes		Rouge	-	+	+	+
Tanins	Galliques	Précipité	+	+	+	+
	Catéchiques	Bleu noire	+	+	+	+
Saponosides		Précipité blanc	-	+	+	+
Coumarines		Trouble	+	+	+	+
Mucilages		Précipité floconneux	-	+	+	+
Anthocyanes		Rouge puis bleu	-	+	+	+
Leucoanthocyanes		Rouge	-	+	+	+
Anthraquinones	Libres	Rouge	-	+	+	+
	Combinés	Rouge foncé	-	+	-	+
Glucosides		Rouge brique puis violet	-	+	+	+
Sucres réducteurs		Rouge brique	+	+	+	+
Amidon		Bleu violet	+	-	-	-
Sennosides		Rouge violet	+	+	+	+
Stérols et terpènes		Anneau brun	-	+	+	+

-: Test négatif

+ : Test positif

- *Myrtus nivellei* Batt & Trab.

Pour l'espèce saharienne *M. nivellei*, on constate qu'elle est très riche en flavonoïdes, sennosides, tanins galliques, leuco-anthocyanes, terpènes et en saponosides. La présence des coumarines, des mucilages et des glucosides demeure, toutefois, non négligeable. Les tests de caractérisation des alcaloïdes, des quinones et de l'amidon ont donné des réactions négatives, témoignant de l'absence de ces métabolites dans les organes aériens de la plante étudiée (tableau 35).

Les composés les plus abondants dans les organes aériens de *M. nivellei* sont essentiellement: les tanins, les flavonoïdes, les sennosides, les coumarines, les saponosides et les leuco-anthocyanes. Cette plante est également riche en anthocyanes, en glucosides et en mucilages. L'iode a donné une réaction négative par la technique de caractérisation que nous avons utilisée, indiquant l'absence d'amidon. Dans la partie sous-terrainne, seuls les tanins, les coumarines ainsi que les sucres et les sennosides, ont pu être mis en évidence (tableau 35).

Tableau 35: Résultats du Screening phytochimique de *M nivellei* (MN)

Métabolites recherchés		Réaction	Résultats			
			Ra	Ti	Fe	Fr
Alcaloïdes		Précipité blanc jaunâtre	-	-	-	-
Flavonoïdes		Rouge orange	-	+	+	+
Flavanes		Rouge	-	+	+	+
Tanins	Galliques	Précipité	+	+	-	+
	Catéchiques	Bleu noire	+	+	+	+
Saponosides		Précipité blanc	-	+	+	+
Coumarines		Trouble	+	+	+	+
Mucilages		Précipité floconneux	-	+	+	+
Anthocyanes		Rouge puis bleu	-	-	+	+
Leucoanthocyanes		Rouge	-	+	+	+
Anthraquinones	libres	Rouge	-	-	-	-
	combinés	Rouge foncé	-	-	-	-
Glucosides		Rouge brique puis violet	-	+	+	+
Sucres réducteurs		Rouge brique	+	+	+	+
Amidon		Bleu violet	+	-	-	-
Sennosides		Rouge violet	+	+	+	+
Stérois et terpènes		Anneau brun	-	+	+	+

-: Test négatif

+ : Test positif

Les différentes familles de métabolites qui existent dans les feuilles et les fruits des deux espèces étudiées (MC et MN), justifient leurs utilisations par les tradi-praticiens. En effet, nous pouvons suggérer que la présence des tanins catéchiques, confirmée par la réaction positive avec le chlorure ferrique (donnant une coloration verte foncée), justifie l'utilisation, en médecine traditionnelle, de l'espèce Saharo-endémique *M. nivellei* pour le traitement des mycoses, ainsi que pour le tannage des peaux d'animaux.

D'autre part, la présence des saponines, confirmée par la formation d'un précipité blanc, explique l'utilisation de *M. nivellei* par les nomades Touaregs, pour la cicatrisation des plaies, ainsi que pour calmer les douleurs dentaires d'après l'enquête ethnobotanique réalisée par **Hammiche et Maiza (2006)**.

Les racines s'avèrent moins riches en métabolites secondaires (anthraquinones, flavonoïdes, alcaloïdes, anthocyanes, saponosides et mucilages). Par contre ces substances sont très présentes dans les organes aériens des deux plantes étudiées, dont la synthèse est fortement stimulée.

Cependant, les organes sous-terrains semblent jouer le rôle de tissus de réserves d'une partie: des tanins, pour lesquels nous avons déjà dévoilé la présence sous forme de vésicules tannifères, logées entre les cellules du parenchyme médullaire des racines. Le deuxième parenchyme de réserve mis en évidence est de type amylofère, compte tenu de la présence remarquable de l'amidon dans cet organe sous-terrain.

**Roux et Catier (2007)** ont rapporté que les sennosides des plantes exercent une action diurétique sur les reins, par amélioration du débit sanguin. Cette action augmente la filtration glomérulaire, qui aboutit par conséquent à accroître la sécrétion urinaire. D'autre part, les anthracénosides ont un effet irritant et laxatif sur le gros intestin, en provoquant des contractions des parois intestinales, simulant les évacuations et facilitant ainsi le transit intestinal (**Bellakhdar, 1997**).

Les plantes étudiées sont très riches en saponosides, ces molécules ont des propriétés analgésiques, anti-inflammatoires et anti-œdémateuse (**Roux et al., 2007**). Ce qui justifie leur utilisation dans les traitements traditionnels des signes fonctionnels de la crise hémorroïdaire et des troubles liés à la fragilité capillaire (**Marchini et Maccioni, 2004**).

### III.3.3. Résultats de l'étude des fractions volatiles et polaires

#### III.3.3.1. Etude des fractions volatiles (huiles essentielles)

L'étude faite par **Touaibia (2011)** sur la cinétique et le rendement de l'extraction des huiles essentielles (HE) de *Myrtus communis*, obtenues par entraînement à la vapeur, a montré que 70% du rendement global de l'HE est obtenu durant les 90 premières minutes. Le rendement cumulatif se stabilise au bout de deux heures. Ceci nous a orienté vers le choix d'une autre méthode d'extraction : l'hydrodistillation, pour tenter d'optimiser le rendement.

D'autre part, la récupération des HE est effectuée par simple décantation. Le distillat est recueilli dans le tube gradué qui se termine par une ampoule, cette dernière est munie à la base d'un robinet, à partir duquel on pourra récupérer la fraction d'HE, tandis que la fraction aqueuse retourne automatiquement dans le ballon générateur de vapeur. Donc la séparation des deux phases non miscibles se fait, dans l'appareil, en même temps que la distillation.

Le matériel végétal frais destiné à l'extraction (feuilles, baies) a été soumis à une étape de broyage et de laminage en prétraitement. Cette opérations de fragmentation des tissus cellulaires de la matière végétale, permet une meilleure diffusion du solvant au sein de celle-ci, et un accroissement de la vitesse d'extraction (**Kumar et al., 2000**).

### III.3.3.1.1. Rendement des huiles essentielles

Les HE ont été extraites par hydrodistillation, à partir de feuilles et de baies fraîches (avec une fréquence de trois répétitions par extraction), en utilisant un dispositif adapté de type *Clevenger* (tableau 36).

Tableau 36: Rendement des huiles essentielles étudiées.

	Rendement (%)	Travaux antérieurs		
		Rendement (%) /organe	Pays	Références
<i>M. communis</i>	0,335 (Fe) 0,183(Fr)	0,1 (Ti+Fe)	Turquie	<b>Aydin et Ozcan (2007)</b>
		0,1 (Ti+Fe)	France	<b>AFNOR (2000)</b> .
		1,45 (Ti+Fe)	Grèce	<b>Gardeli et al. (2008)</b>
		0,6-1 (Fe+Fl)	Algérie	<b>Bouzabata et al. (2015)</b>
		0,3/0,1 (Fe/Fr)	Algérie	<b>Brada et al. (2012)</b>
		0,47 (Fe)	Iran	<b>Ghasemi et al. (2011)</b>
		0,195 (Ti+Fe)	Algérie	<b>Touaibia (2011)</b>
		0,08/0,61/0,30 (Ti/Fe/Fl)	Tunisie	<b>Aidi-Wannes et al. (2010)</b>
		0,11 à 0,23 (Fr)	Portugal	<b>Paula et al. (2009)</b>
		0,03 à 0,04 (Fr)	Corse	<b>Nicolas (2012)</b>
		0,06 à 0,45 (Ti+Fe)	Sardaigne	<b>Dell'Agli et al. (2012)</b>
		0,16 (Fr)	Turquie	<b>Kefkas et al. (2013)</b>
		0,17	Turquie	<b>Agkul et Bayrak (1989)</b>
<i>M. nivellei</i>	1,85 (Fe) 0,098 (Fr)	0,291 (Ti+Fe)	Algérie	<b>Touaibia et al. (2014a)</b>
		1,4 à 2 (Ti+Fe)	Algérie	<b>Bouzabata et al. (2013)</b>

(Ti) : Tiges ; (Fe) : Feuilles, (Fl) : Fleurs ; (Fr) : Fruits

- ***M. communis***

L'HE extraite à partir des feuilles fraîches et laminées de l'espèce *M. communis* (HEFeMC) a présenté un rendement de 0,335% (Altitude : 522m). Ce dernier est meilleur que celui décrit par la norme **AFNOR (2000)** et les travaux de **Aydin et Ozcan (2007)** qui ont enregistré un taux très faible estimé à 0,1% (tableau 36).

Cependant, les travaux de **Gardeli et al. (2008)** ont rapporté que *M. communis*, originaire de la Grèce, présente un rendement relativement élevé de 1,45%; ils ont également constaté que les variations saisonnières n'influent pas sur le rendement, contrairement à l'altitude qui semble avoir un rôle déterminant.

Les travaux effectués par **Bouzabata et al. (2015)** ont rapporté que le rendement des feuilles et des fleurs sèches de *M. communis*, récoltés dans quatre régions situées au Nord de l'Algérie se situe entre 0,6 et 1%. La teneur en HE du Myrte poussant spontanément en Serbie dépasse rarement 1% (**Hrubik et al., 2012**).

Dans ce même contexte, **Aidi-Wannes et al. (2010)** ont rapporté que le rendement de feuilles, des tiges et des fleurs du Myrte commun en Tunisie correspond à 0,61% ; 0,08% et 0,30% respectivement. **Berka-Zougali et al. (2010)** ont rapporté que le rendement de l'HE de *M. communis*, extraite par hydrodistillation, est de l'ordre de 0,50±0,04

De nombreux travaux antérieurs se sont intéressés à l'étude des HE extraites à partir des feuilles et des tiges de *Myrtus communis* (**Agkul et Bayrak, 1989**; **Messaoud et al., 2005**; **Rapparini et al., 2005**; **Yadergarinia et al., 2006**; **Dell'Agli et al., 2012**).

D'après notre recherche bibliographique, très peu de travaux se sont penché à l'étude de l'HE des baies de cette plante. **Brada et al. (2012)** se sont intéressé à l'extraction de l'HE des baies de la région de Miliana, ils ont rapporté que le rendement ne dépasse pas 0,1%, qui s'est avéré trois fois plus faible que celui des feuilles. Les résultats que nous avons obtenus, sont très proches de ceux de cette dernière référence, en raison de la proximité de nos deux sites de récolte (environ 10-12 km). Dans ce même contexte, **Aidi-Wannes et al. (2009)** ont rapporté que le rendement de l'HE des baies, poussant spontanément en Tunisie, est très faible (0,003-0,01%).

Le rendement en l'HE des baies (HEFrMC), que nous avons obtenu (0,183%) est proche de celui trouvé par **Paula et al. (2009)**, ces auteurs ont rapporté que les fruits du Myrte commun, poussant spontanément au Portugal, présentent un rendement allant de 0,11% à 0,23%. Cependant, il reste toutefois plus important que celui des baies du Myrte de la Corse, dont le rendement est compris entre 0,03% et 0,04% (**Venturini, 2012**).

- ***M. nivellei***

L'HE des feuilles de *M. nivellei* (HEFeMN) présente un rendement égale à 1,85% (Altitude : 2018m). La fraction volatile des fruits (HEFrMN) a exprimé un rendement relativement très faible de 0,098% (tableau 36).

**Touaibia et al. (2014a)** ont rapporté que les HE extraites à partir des rameaux feuillés de *M. nivellei*, récoltée dans la région du Tassili n'Ajjer, par entrainement à la vapeur, présentent un rendement de 0,291%.

Il semblerait que le biotope aride et la nature de l'organe végétale étudié, influent sur sa richesse en essences. Dans ce même contexte, **Belaiche (1979)** rapporte que les HE conservent l'humidité des plantes qui poussent dans les climats arides, comme c'est le cas pour notre espèce saharo-endémique.

Selon les travaux entrepris par **Bouzabata et al. (2013)**, le rendement de l'HE de l'espèce *M. nivellei* est fortement influencé par l'origine géographique, ces mêmes auteurs ont constaté que les échantillons récoltés dans le massif du Hoggar algérien (altitude:1900m) présentent un rendement allant de 0,5 à 0,9%, alors que les spécimens récoltés dans la région du Tassili N'Ajjer (altitude:1710m), avaient plutôt exprimé un rendement meilleur qui va de 1,4 à 2%. D'après ces travaux, il semble que l'altitude n'a pas une influence directe sur le rendement en HE, chez cette plante. Cependant, il semble qu'il serait modulé par d'autres paramètres pédo-géo-climatiques.

Les rendements les plus importants en HE sont obtenus à partir des feuilles, qui peuvent constituer une source potentielle, vue la pérennité de l'espèce.

Selon **Lawrence (1993); Lawrence (1996); Gardeli et al. (2008)**, plusieurs facteurs comme l'ensoleillement, la nature du sol, la période de récolte, l'origine géographique et le climat, ainsi que la méthode d'extraction, peuvent avoir une influence considérable sur le rendement en HE de l'espèce *Myrtus communis*.

Plusieurs travaux relatifs au séchage des plantes aromatiques et médicinales indiquent des modifications considérables dans la composition des HE, particulièrement sur le plan quantitatif (**Lawrence, 1996; Rapparini et al., 2005; Messaoud et al., 2005; Yadergarinia et al., 2006; Gardeli et al., 2008**). En effet, une plante séchée dans de mauvaises conditions, risque de se dégrader et par la suite, perdre la totalité de ses HE (**Smallfield, 2001**).

#### III.3.3.1.2. Influence des paramètres d'extraction sur le rendement en huiles essentielles (Etude d'optimisation)

Afin d'optimiser le rendement d'extraction du protocole d'hydrodistillation, nous avons étudié l'influence de trois facteurs sur l'extraction des HE, à partir des feuilles et des baies de *M. communis* et *M. nivellei*, à savoir :

- La température d'extraction.
- La masse de la matière végétale.
- La durée d'extraction.

##### III.3.3.1.2.1. Influence de la température d'extraction

On constate qu'aux températures : 100 °C, 120°C et 130 °C, les rendements sont très faibles. Ces derniers s'améliorent en élevant la température jusqu'à 160°C, où un seuil maximal est atteint. Au-delà de cette température, les rendements ont tendance à décliner légèrement (figure 78 et figure 79). On suppose que cela revient à la réduction des vapeurs au cours du processus d'extraction (les vapeurs s'échappent partiellement de l'extracteur pour soulager la pression et éviter l'éclatement du dispositif).

Cependant, on remarque que les propriétés organoleptiques des HE changent en fonction de l'augmentation de la température d'extraction, marqués par une variation de la couleur, qui devient de plus en plus foncée, virant vers le marron, et son odeur qui devient très forte, ne révélant pas l'odeur caractéristique des *Myrtaceae*. Ceci pourrait être expliqué par l'oxydation et la rupture de liaisons des composés complexes de l'HE, causée par l'élévation importante de la température.

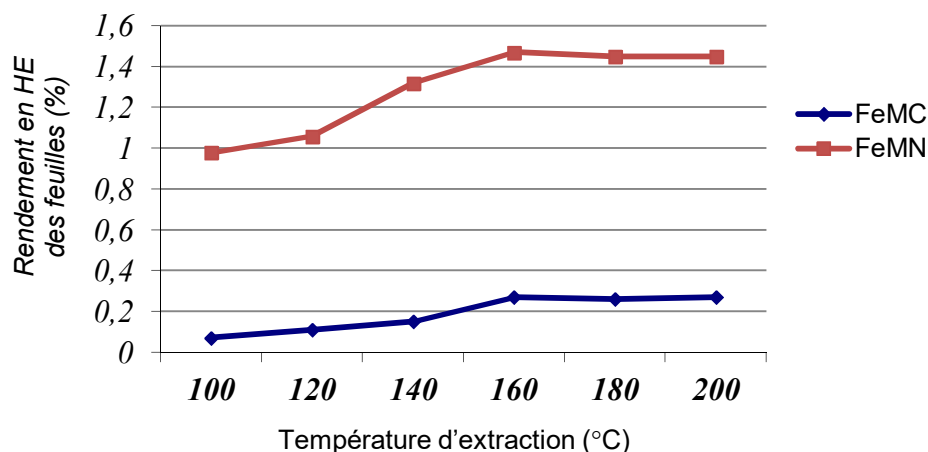


Figure 78: Evolution du rendement en HE des feuilles en fonction de la température d'extraction par hydrodistillation.

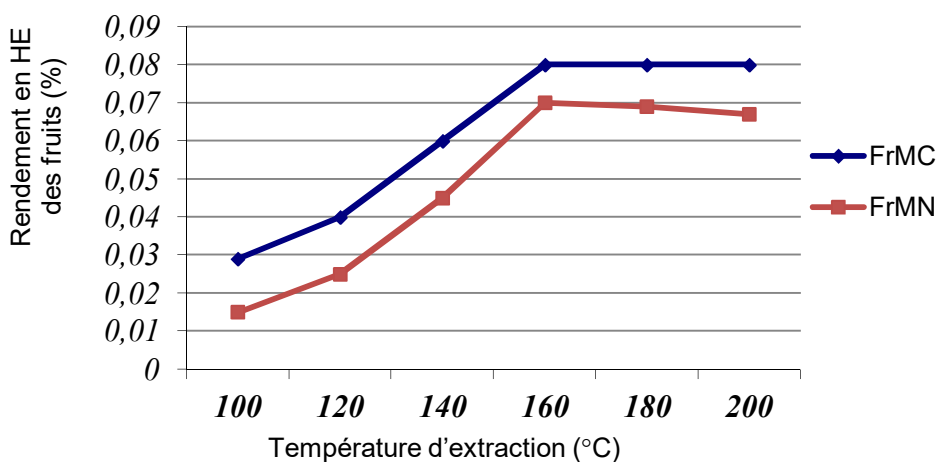


Figure 79: Evolution du rendement en HE des fruits en fonction de la température d'extraction par hydrodistillation.

#### III.3.4.1.2.2. Influence de la masse végétale

Les résultats obtenus montrent que le rendement en HE augmente respectivement pour les masses de 10, 15, 20 g, et atteint une valeur maximale pour une masse de 25 g. Ce rendement diminue pour la masse de 30 g, cela est dû à la quantité de la matière végétale qui est plus importante que le volume d'eau (Le mélange matière végétale-eau est très dense, ne permettant pas un contact homogène, donc l'accessibilité de l'eau aux sites de stockage de l'HE), par conséquent, le volume d'eau ne peut pas entraîner la totalité des HE (figure 80 et figure 81).

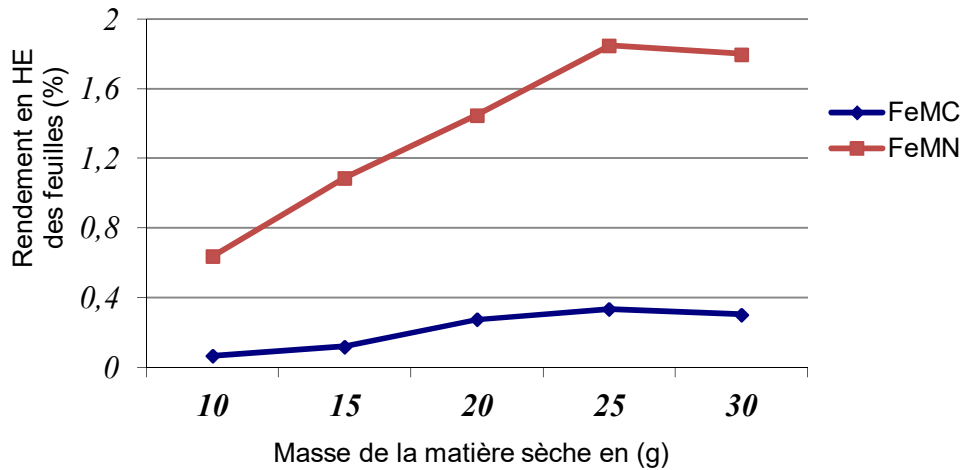


Figure 80: Evolution du rendement en HE des feuilles en fonction de la masse végétale de *M. communis* et *M. nivellei*

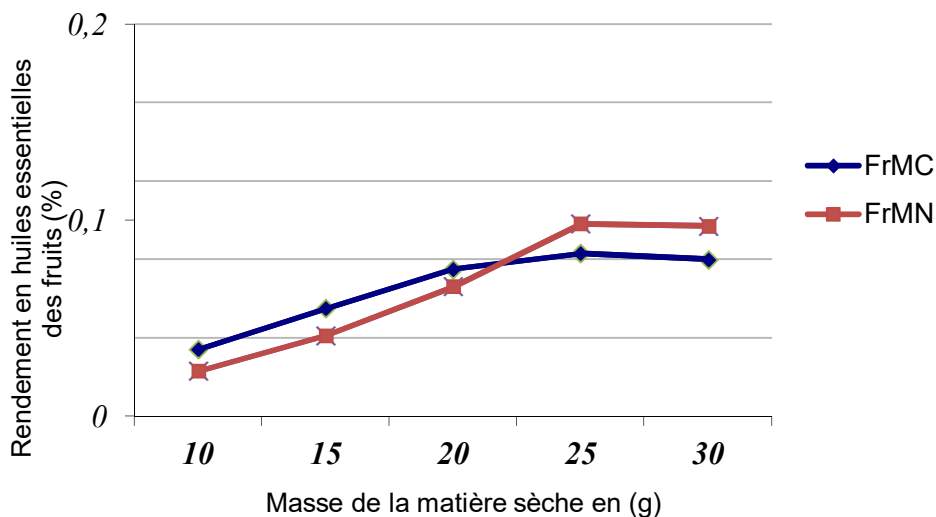


Figure 81: Evolution du rendement en HE des fruits en fonction de la masse végétale de *M. communis* et *M. nivellei*

#### III.3.4.1.2.3. Influence de la durée d'extraction

Le rendement en HE augmente de façon proportionnelle à la durée d'extraction, jusqu'à un maximum après 180 min d'hydrodistillation, ensuite ce rendement continu à croître très faiblement, il se stabilise après trois heures et demi d'extraction (figure 82 et figure 83).

La cinétique d'évolution permet de tracer une courbe constituée de deux phases : Une première phase rapide, correspondant à une augmentation nette du rendement, ceci est probablement dû à la localisation superficielle des poches sécrétrices qui occupent une localisation sub-épidermique au niveau des feuilles.



La deuxième phase est plus ou moins stable, à évolution continue, mais extrêmement lente pour les baies, qui correspond à la libération du contenu des cellules internes du mésocarpe et des graines pouvant stocker l'HE dans les baies. Nous avons arrêté le temps d'extraction maximal à 4 heures, par crainte d'altérer les propriétés physico-chimiques des HE extraites.

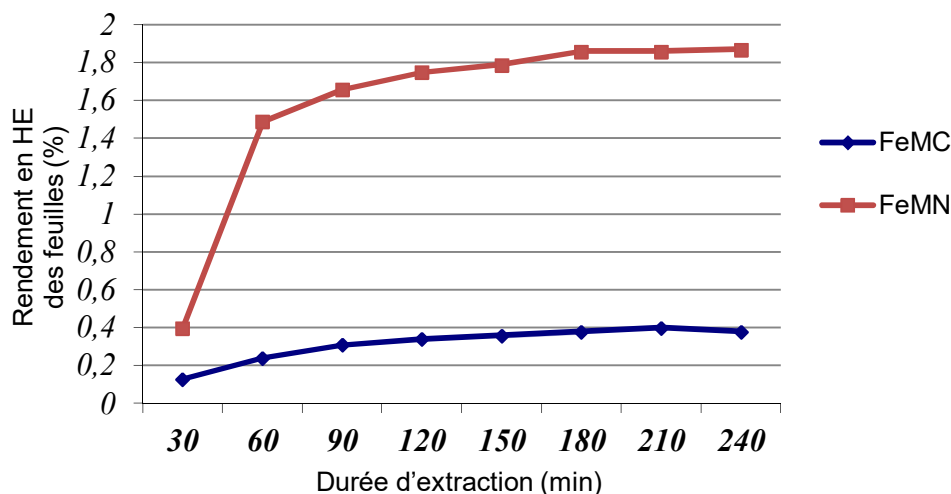


Figure 82: Evolution du rendement en HE des feuilles en fonction du temps d'extraction par hydrodistillation de *M. communis* et *M. nivellei*

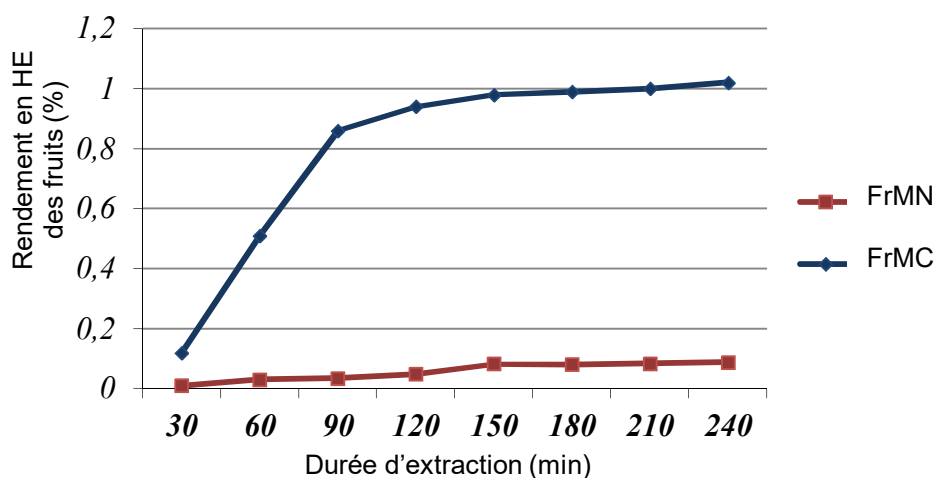


Figure 83: Evolution du rendement en huiles essentielles des fruits en fonction du temps d'extraction par hydrodistillation de *M. communis* et *M. nivellei*.

Les résultats de l'étude de la cinétique d'extraction des HE, de ces deux *Myrtaceae*, nous permettent d'admettre qu'un bon rendement exige :

- Un rapport masse végétale/volume de l'eau distillée : 25g/250ml (1/10)
- Une température d'extraction de 160°C
- Une durée d'extraction de 3 heures, pouvant aller jusqu'à 3 heures et demi pour les baies.

### III.3.3.1.3. Résultats des propriétés organoleptiques

Les HE des deux plantes étudiées ont un aspect liquide et translucide, dont chacune possède une odeur prononcée, rappelant celle des feuilles. Les HE des feuilles et des baies de *M. communis*, obtenues par hydrodistillation, sont de couleur jaune claire. Cependant, celles de *M. nivellei* sont plutôt d'une couleur jaune foncée (tableau 37). Nous pouvons distinguer à l'œil, de très petites gouttelettes bleuâtres, dispersées dans les HE de cette espèce saharienne

Les paramètres organoleptiques des HE de l'espèce méditerranéenne *M. communis* sont en accord avec ceux répertoriés dans la norme **AFNOR (2000)**, ainsi que ceux rapportés par **Gardelli et al. (2008)**. En revanche, les HE de l'espèce *M. nivellei* n'ont pas fait l'objet de normalisation.

Tableau 37: Caractères organoleptiques des huiles essentielles étudiées.

	Norme AFNOR (2000)	HE étudiées
<i>M. communis</i> HEFe / HEFr	Couleur: Jaune claire Aspect : Liquide, limpide et mobile Odeur : caractéristique, rappelant celle des feuilles	<b>Couleur:</b> Jaune claire <b>Aspect :</b> Liquide <b>Odeur :</b> agréable, rappelant celle de l'eucalyptol
<i>M. nivellei</i> HEFe / HEFr	-	<b>Couleur:</b> Jaune foncé avec quelques petites gouttelettes bleuâtres dispersées <b>Aspect :</b> Liquide <b>Odeur :</b> agréable, rappelant celle de l'eucalyptol

**Angioni et al. (2006)** rapportent que la couleur de l'HE du myrte dépend essentiellement de sa composition, d'après ces auteurs, L'HE riche en composés monoterpéniques, avec prédominance de l' $\alpha$ -pinène, présente une coloration jaune orangée.

**Vausslin (2004)** rapporte que l'HE des feuilles de *M. communis* poussant en Tunisie présente une couleur jaune ambrée, avec une odeur cineolée et fruitée, cependant, celle poussant au Maroc, présente plutôt une couleur jaune claire avec une odeur mentholée et camphrée très prononcée. Cette différence d'odeur peut être attribuée à la variation quantitative des composés aromatique de l'HE, en effet, il s'est avéré que l'HE d'origine Tunisienne est très riche en esters, d'où la note fruitée caractéristique de cette HE.

Les HE de *M. communis* présentent une très légère miscibilité dans l'eau, mais sont toutefois très solubles dans les alcools ainsi que dans les solvants apolaires, les huiles ou les solvants faiblement polaires. Elles sont souvent incolores ou virant vers le jaune clair, avec un aspect liquide et une densité plus faible que celle de l'eau (**Martin et al., 2010**).

#### III.3.3.1.4. Résultats de la caractérisation physico-chimiques des HE étudiées

Les constantes physico-chimiques des HE étudiées ont été déterminées, selon des méthodes normalisées, grâce auxquels, il sera possible de définir si elles sont de qualité adéquate.

Selon les propriétés physico-chimiques, plus la qualité de l'HE est élevée, plus son indice d'ester est aussi élevé. Par contre, l'indice de réfraction et le pouvoir rotatoire doivent être petits. Quant à l'indice d'acide, il doit toujours être inférieur à 2 (**AFNOR, 2005**).

- Densité relative ( $d^{20}$ )

Les mesures de la densité ( $d^{20}$ ) des HE de *M. communis* et *M. nivellei* effectuées à 20°C, montrent qu'elles appartiennent à un intervalle étroit entre 0,80 et 0,91, les résultats de l'HE de *M. communis* s'intègrent parfaitement dans l'intervalle décrit par **la pharmacopée européenne (2002)** (tableau 38).

Tableau 38: Densité relative des huiles essentielles étudiées.

		Densité relative (Moyenne±IC)	Masse volumique	Normes
<i>M. communis</i>	HEFe	0,81±0,0407	0,8085	0,80-0,95 ( <b>Pharmacopée européenne,2002</b> )
	HEFr	0,83±0,1241	0,8285	0,872-0,92 ( <b>Pharmacopée Française,2012</b> )
<i>M. nivellei</i>	HEFe	0,84±0,5666	0,8385	-
	HEFr	0,90±0,6777	0,8984	

Les densités des HE des feuilles et des baies de *M. communis*, à 20°C, sont légèrement inférieures à celles décrites par la **pharmacopée française (2012)**. Selon **Bendahou (2007)**, les HE présentant une densité inférieure à 0,85, peuvent être qualifiés d'essences légères.

L'HE des feuilles de *M. nivellei* présentent une densité de 0,84±0,5666. Cependant, celle des fruits est encore plus importante, elle correspond en moyenne à 0,90±0,6777 (tableau 38).

Dans ce même contexte, la densité relative des baies de *M. communis* décrite par **Tabti (2011)**, récoltées dans la région de Miliana (W. Ain-Defla) est de 0,90.

Cependant, La densité relativement importante de l'HE des baies de *M. nivellei* ( $d=0,90±0,6777$ ), nous permet de lui attribuer le caractère d'essence lourde, ceci lui offre une certaine miscibilité dans l'eau, ce qui explique le faible rendement obtenu lors de l'extraction, au cours de laquelle nous avons recueilli un très faible volume de l'HE par simple décantation. La densité de l'HE des feuilles de l'espèce *M. nivellei* est très proche de celle de l'HE des rameaux feuillés (0,8501±0,1471) décrite par **Touaibia et al. (2014a)**.

Selon **Sallé (1991)**, l'augmentation de la densité relative s'explique par la présence de certains composés caractérisés par de grandes masses moléculaires (limonène:C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>, camphre:C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O, citronellol:C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O). Ces HE sont solubles dans l'éthanol, et cette solubilité facilite leur utilisation pour différents usages.

- Indice de réfraction à 20°C (IR)

En général, la norme **AFNOR (2005)** prévoit un indice de réfraction (IR), compris entre 1,450 et 1,513 pour les HE de haute qualité, et considère que celles dont l'IR dépasse le seuil de 1,513 sont de qualité moindre. En faisant référence à cet intervalle, on peut considérer que les indices de réfraction des HE étudiées comme étant de très bonne qualité.

Cependant, la **pharmacopée française (2012)** a établi un intervalle plus restreint spécifique à l'HE de la partie aérienne de l'espèce *M. communis*, pour lequel les HE étudiées semblent se rapprocher de la limite maximale (tableau 39).

Les HE de *M. nivellei* présentent des indices de réfraction plus faibles que ceux de l'espèce méditerranéenne, et rejoignent pratiquement la limite minimale de l'intervalle décrit par la norme **AFNOR (2005)**. L'indice de réfraction varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés.

Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé (**Boukhatem et al., 2010**). Cependant, selon **Kanko et al. (2004)**, le faible indice de réfraction des HE pourrait favoriser leur utilisation dans les produits cosmétiques.

Tableau 39: Indices de réfraction (IR) des huiles essentielles étudiées.

		Indice de réfraction (Moyenne±IC)	Normes
<i>M. communis</i>	HEFe	1,475±0,003	1,463-1,470 ( <b>Pharmacopée Française, 2012</b> ) 1,45-1,513 ( <b>AFNOR, 2005</b> )
	HEFr	1,470±0,128	-
<i>M. nivellei</i>	HEFe	1,452±0,056	-
	HEFr	1,434±0,033	

- Pouvoir rotatoire

Les résultats du pouvoir rotatoire des HE étudiées (tableau 40), sont tous inclus dans l'intervalle décrit par la **pharmacopée française (2012)**.

Ainsi, les HE étudiées possèdent une activité optique dextrogyre et sont capables de dévier le plan de la lumière polarisée. Par conséquent, elles sont optiquement actives.

Tableau 40: Pouvoir rotatoire des huiles essentielles étudiées.

		Pouvoir rotatoire	Normes
<i>M. communis</i>	HEFe	+25°	+15,0° à +28,0° ( <b>Pharmacopée Française, 2012</b> )
	HEFr	+22°	-
<i>M. nivellei</i>	HEFe	+18°	-
	HEFr	+20°	-

- Indice d'acide (IA)

La norme **AFNOR (2005)** et la **pharmacopée française (2012)** valident la conformité des HE ayant un indice d'acide inférieur à 2. Alors que la **pharmacopée européenne (2002)** élargit cette marge jusqu'à 10 (tableau 41)

Les quatre HE étudiées ont présenté des indices inférieures au seuil maximal défini par la **pharmacopée française (2012)**. Cet indice est un paramètre qui permet de garantir les bonnes pratiques de conservation des HE, qui s'oxydent très facilement en présence d'air, de lumière, de température élevée et de traces d'eau, ce qui engendre une altération de leurs composants et favorise la formation des acides. En réalité, une huile essentielle fraîche contient très peu d'acides libres.

Il convient ici de rappeler qu'après l'extraction, nous avons déshydraté nos HE avec du sulfate de sodium anhydre, avant de les conserver dans des flacons en verre teinté, hermétiquement fermés, ils ont été conservés au frais à 4°C, afin d'éviter tout risque d'une éventuelle oxydation.

Cependant, la valeur de l'IA de l'HE des baies de *M. communis* se montre légèrement élevée, par rapport à celle décrite par **Tabti (2011)** (IA=1,6028).

Tableau 41: Indices d'acides (IA) des huiles essentielles étudiées.

		Indice d'acide (Moyenne±IC)	Normes
<i>M. communis</i>	HEFe	1,816±0,546	<2 ( <b>Pharmacopée Française, 2012</b> ) <2 ( <b>AFNOR, 2005</b> ) <10 ( <b>Pharmacopée européenne, 2002</b> )
	HEFr	1,908±0,010	
<i>M. nivellei</i>	HEFe	1,681±0,066	
	HEFr	1,923±0,547	

La matière végétale est l'objet de réactions chimiques diverses, dont l'hydrolyse, l'oxydation et la cyclisation (**Morin et Richard, 1985**), pouvant être catalysées par des métaux, présents à l'état de traces dans la plante, ou provenant des équipements de récolte et d'extraction, provoquant des transformations chimiques des constituants.

L'hydrolyse d'esters est souvent la première réaction qui se produit (**Bruneton, 1993**). Elle conduit à la formation d'acides organiques qui, à leur tour, catalysent les réactions de cyclisation et de déshydratation (**Rivera, 2006**).

En effet, une HE fraîche ne contient que très peu d'acides libres. C'est pendant la période de stockage qu'elle peut subir des dégradations telle l'hydrolyse des esters. **Lazouni et al. (2007)**, ont constaté des variations des indices d'acide et d'ester au cours du temps et en fonction de la température.

- Indice d'ester (IE)

La différence entre l'indice de saponification IS et l'indice d'acide IA, nous permet d'obtenir l'indice d'ester (IE), qui donne des informations sur le degré de dégradation de l'HE (hydrolyse des esters) durant sa conservation (**Pharmacopée européenne, 2002**). Plus l'indice d'ester est élevé, mieux est la qualité d'une HE (**AFNOR, 2005**). Les quatre HE étudiées ont révélé des indices (IE) allant de 43 à 52, parfaitement conformes aux normes standardisées (tableau 42)

Tableau 42: Indices d'ester (IE) des huiles essentielles étudiées.

		Indice d'ester (Moyenne±IC)	Normes
<i>M. communis</i>	<i>EHFe</i>	45±1,320	<76 ( <b>Pharmacopée Française, 2012</b> ) <76 ( <b>Pharmacopée européenne, 2002</b> )
	<i>HEFr</i>	52±0,566	
<i>M. nivellei</i>	<i>HEFe</i>	44±0,687	
	<i>HEFr</i>	43±0,021	

- Potentiel hydrogène (pH)

Selon la **pharmacopée européenne (2002)**, les HE de bonne qualité, constituent des solutions acides, ayant un pH au voisinage de 5. L'HE des feuilles de *M. communis* a présenté un pH égal à 5,24. Cette valeur est légèrement inférieure à la norme de la **pharmacopée française (2012)**. Par contre, les pH des HE des baies touchent la limite maximale normalisée (tableau 43).

Tableau 43: Potentiel hydrogène (pH) des huiles essentielles étudiées.

		pH (Moyenne±IC)	Normes
<i>M. communis</i>	<i>HEFe</i>	5,24±0,452	5,26-5,5 ( <b>Pharmacopée Française, 2012</b> )
	<i>HEFr</i>	5,50±0,563	-
<i>M. nivellei</i>	<i>HEFe</i>	5,28±1,015	-
	<i>HEFr</i>	5,56±1,882	-

Nous avons remarqué également que les valeurs du pH des HE extraites à partir des feuilles de ces deux espèces sont très proches, il en est de même pour ce qui est des HE extraites à partir des baies.

Selon **Touaibia et al. (2014a)**, le pH de l'HE des rameaux feuillés de l'espèce saharo-endémique *M. nivellei*, extraite par entraînement à la vapeur d'eau, a présenté un pH estimé à 5,66. Ce paramètre est d'une grande importance dans l'étude de l'activité anti-microbienne.

### III.3.3.1.5. Analyse et identification des huiles essentielles par CG/SM

Les chromatogrammes obtenus par CG/SM des HE étudiées donnent une distribution des différents composés identifiés et non identifiés (**Appendice K**). Selon les proportions obtenues, nous pouvons distinguer les composés majoritaires, à partir desquels nous pourrions déterminer le chémotype de chaque HE.

L'identification des différents constituants des HE étudiées est réalisée à l'aide des temps de rétention déterminés, une confirmation est apportée à l'aide des spectres de masse en comparaison avec ceux des composés de référence de la base de données des bibliothèques informatisées *Nist*, *NBS*, *Wiley*, *75K* et ceux de la littérature.

Les résultats de l'identification des constituants des quatre HE étudiées regroupent des données expérimentales dont :

- Le nom de la molécule identifiée.
  - Le temps de rétention (TR).
  - Les concentrations relatives des différentes molécules exprimées en %.
- 
- Composition des HE de *M. communis* (tableau 3.19).

- Les feuilles

L'analyse de la composition chimique de l'HE des feuilles de *M. communis*, par CG/SM, nous a permis d'identifier plusieurs composants, caractérisée par cinq pics majoritaires, et un pourcentage de reconnaissance de 91,31% (tableau 3.19).

On note la présence d'une forte proportion en monoterpènes hydrocarbonés avec deux fractions majoritaires: le limonène et l'alpha pinène, ayant des valeurs respectives de 16,22% et 15,93%. Un autre composé majoritaire est observé, appartenant à la famille des alcools, il s'agit de l'octadiénol (15,04%) suivi par le linalyl acetate (9,26%), l'eucalyptol (9,12%), le linalool (7,49%) et l' $\alpha$ -terpinéol (4,3%). Trois sesquiterpènes hydrocarbonés: le bornylène, l'alpha caryophyllène et l'alpha patcoulène ont été identifiés avec des valeurs respectives de 4,64 %, 4,14% et 1,38 %. Auxquels s'ajoute un sesquiterpène oxygéné, qui est le  $\delta$ -elemene (0,17%). Les composés non identifiés représentent un taux inférieur à 10% (tableau 44).

La composition des HE de *Myrtus communis* a fait l'objet de nombreuses études; la grande majorité de celles-ci concernent l'analyse des HE obtenues par hydrodistillation des feuilles, dans la perspective de mettre en évidence de nouveaux chemotypes. La quasi-totalité de ces travaux attestent la richesse des HE de *M. communis* en alpha pinène, en limonène, en eucalyptol et en acétate de myrtenyl (**Tateo et Picci, 1982 ; Boelens et Jimenez, 1991 ; Garry et Chalchat, 1992 ; Garry et Chalchat, 1992 ; Weyerstahl et al., 1994 ; Bradesi et al., 1997 ; Angioni et al., 2006 ; Gardeli et al., 2008 ; Aidi-Wannes et al., 2010** )

Tableau 44: Composés majoritaires des HE de *M. communis*.

TR* (min)	Composé identifié	Pourcentage (%)	
		Feuilles (Fe)	Fruits (Fr)
6,75	Alpha pinène	<b>15,93</b>	10,01
7.79	Alpha phellandrene	n.d	3,96
9.83	Propionic acid, 2-methyl-2-methylpropyl	n.d	1,95
11,04	Limonène	<b>16,22</b>	<b>12,93</b>
11.55	δ-3-carene	n.d	2,40
12.34	Terpinolene	4.13	3,62
12.89	1,4-cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	1.04	n.d
13.07	Eucalyptol	9,12	1,37
14.40	Linalyl acetate	9.26	n.d
14.69	γ-terpinene	n.d	2,87
15.41	ρ-Cymene	1,27	3,09
15.80	4-Carene	1,96	3,33
17.48	Trans-verbenol	0.38	n.d
20,63	Bornylène	4,64	n.d
21,40	α-terpineol	4,30	3,71
24.13	β- Germacrene	n.d	1,73
24,97	Linalool	7,49	n.d
25.87	Estragole	n.d	2,27
25.99	1,4,7,-cycloundecatriee, 1,5,9,9-tetramethyl	n.d	4,14
26.56	3-cyclohexene-1-methanol,4-trimethyl	n.d	2,92
27.24	Naphthalene, 1,2,3,4,5,6,8-octahydroxyl	n.d	3,80
27.89	Octadienol	15,04	<b>12,85</b>
27.95	Geranyl acetate	3,6	0,97
29.63	Alpha terpinene	3.95	n.d
29.74	Geraniol	n.d	1,68
33.15	Methyleugenol	n.d	3,15
33,71	Benzen,1,2dimethoxy-4-(2propenyl)	5,06	n.d
34.44	δ-elemene	0.17	n.d
35,88	Alpha caryophyllène	4,14	n.d
37.14	β-Selinene	1.21	n.d
38.03	Ermophilene	0.22	n.d
38.26	α-farnesene	0.18	n.d
43,55	Alpha patcoulene	1,38	n.d
49.62	isophytol	0.015	n.d
51.58	Larixol	0.07	n.d
<b>Total</b>		<b>91,31</b>	<b>82,75</b>

TR : temps de rétention exprimé en minutes

n.d : non détecté.

En comparant la composition de cette HE avec celles de travaux antérieurs, on constate qu'elle appartient au chémotype: *Limonène/Alpha pinène*, avec une présence marquée de l'octadiénol et de l'eucalyptol (tableau 45). Cette composition se rapproche des résultats établis par **Yadergarinia et al. (2006)** ainsi que **Dell'Agli et al. (2012)**.

Les résultats obtenus nous renseignent sur la présence d'un sesquiterpène hydrocarboné appelé Bornylene (4.64%), qui n'a pas été recensé auparavant dans les



HE des feuilles de *M. communis*, en plus de sa richesse en octadienol et en terpinéol, qui sont des alcools très appréciées en cosmétologie.

Tableau 45: Composition chimique de l'HE des feuilles de *M. communis* (HEFeMC) par rapport à d'autres références bibliographiques

Composés	HEFeMC étudiée	Dell'Agli et al.(2012) Sardaigne	Brada et al. (2012) Algérie	Gardeli et al. (2008) Grèce	Bajalan et al. (2012) Iran	Benghnaya et al. (2013) Tunisie	Chalchat et al.(2010) Turquie	Yadegarinia et al.(2006) Grèce
Alpha pinène	15.93	54.77	46.9	10.10	27.87	30.0	22.99	29.1
limonène	16.22	6.53	-	tr	-	17.78	4.87	21.5
p-Cymene	1.27	1.27	0.6	-	-	0.95	0.29	0.3
Eucalyptol	9.12	-	25.2	12.7	20.15	20.9	14.95	17.9
$\alpha$ - terpinéol	4.30	3.40	1.3	1.8	7.64	0.29	4.48	3.17
Bornylene	4,64	-	-	-	-	-	-	-
Linalyl acetate	9,26	-	-	2.5	6.17	-	9.36	4.8
Alpha terpinene	3.95	0.19	-	-	0.13	-	-	-
$\beta$ - caryophyllene	4.14	1.23	0.2	-	1.57	0.39	0.18	0.2
Octadienol	15.04	-	-	-	0.13	-	-	-
Linalool	7.49	0.2	5.6	7.0	10.26	10.1	28.28	10.4
Geranyl acetate	3.6	2.23	4.2	0.4	-	-	3.64	-

- Les baies

L'analyse par CG/SM nous a permis également d'identifier les constituants de l'HE extraites à partir des fruits de *M. communis*, avec un taux de reconnaissance de 82,75% (tableau 44). Cette dernière s'est avérée particulièrement riche en monoterpènes hydrocarbonés et en alcools terpéniques, dont les composants majoritaires sont le limonène (12,93%) et l'octadienol (12,85%), avec une présence non négligeable de l' $\alpha$ -pinène (10,01%), du camphre (Naphtalène : 3.80%) et du terpinéol (3,71%).

Malgré la présence d'un nombre important de monoterpènes hydrocarbonés ( $\alpha$ -pinène, limonène, p-cymène,  $\alpha$ -terpinéol,...), l'eucalyptol apporte une contribution modeste avec une teneur de 1,37%. Concernant les sesquiterpènes, leur présence est nettement moins importante que les monoterpènes hydrocarbonés, dont le seul représentant est le  $\beta$ -germacrène avec un taux de 1,73%

A la lumière de ces résultats, nous pouvons déduire que l'HE extraite à partir des baies de *M. communis* (HEFrMC) appartient au chémotype: *Limonène/Octadienol* avec une présence remarquable de l' $\alpha$ -pinène. Ce chémotype ne ressemble à aucun travail publié (tableau 46).

En ce qui concerne les baies de *M. communis*, la bibliographie sur la composition volatile est nettement moins abondante. La première étude a été réalisée par **Mazza (1983)** à partir des fruits poussant en Italie.

Ce même auteur a noté sa richesse en monoterpènes hydrocarbonés. Plus récemment, **Flamini et al. (2004)** ainsi que **Tuberoso et al. (2006)** ont étudié la fraction volatile des baies récoltées et ont rapporté qu'elle est particulièrement riche en monoterpènes oxygénés.

**Aidi-Wannes et al. (2009)** ont réalisé un suivi de la composition chimique de l'HE de baies de myrte de Tunisie, en fonction du stade végétatif. Ils ont constaté que les teneurs en acétate de géranyle, en  $\alpha$ -pinène et en  $\beta$ -caryophyllène diminuent au fil des mois, pour atteindre des taux très bas au mois de Janvier (2,1% ; 1,2% et 1,0%, respectivement). Au contraire, l'eucalyptol et le linalool augmentent en période hivernale (allant de 7,3% et 0,7%, respectivement en Août, pour atteindre 34,6% et 9,5% en janvier).

Tableau 46: Composition chimique de l'HE des baies de *M. communis* (HEFrMC) par rapport à d'autres références bibliographiques.

Composés	HEFr étudiée	Kefkas et al. (2013) Turquie	Brada et al. (2012) Algérie	Aidi wannes et al. (2009) Tunisie	Flamini et al. (2004) Italie
Alpha pinene	10.01	15.16	1.7	12.64	47.2
Limonene	12.93	-	-	0.03	-
p-Cimene	3.09	2.56	tr	0.01	-
Eucalyptol	1.37	33.66	11.4	7.31	14.6
$\alpha$ -terpineol	3.71	-	1.6	4.10	-
$\beta$ -pinene	-	3.35	tr	3.20	-
Linalool	-	8.96	36.2	0.74	-
Phenol	-	13.99	-	-	-
Octadienol	12.85	-	-	-	-
B-caryophyllene	-	-	-	10.8	7.9
Hexanal	-	16.64	-	1.27	-
Estragol	-	-	18.4	-	-
Nerol	-	-	-	6.13	-
Geranyl acétate	-	-	-	20.54	-

- Composition des HE de *M. nivellei* (tableau 47).

- Les feuilles

L'analyse de la composition chimique par CG/SM de l'HE extraite à partir des feuilles (HEFeMN), a permis la révélation de 87,62% des composants.

Cette HE est caractérisée par la présence de trois pics majoritaires, avec une prédominance des sesquiterpènes hydrocarbonés: le  $\delta$ -elemene (15,69%), l'alpha terpinéol (13,01%) et l'eucalyptol (12,06%). On note la présence d'un sesquiterpène hydrocarboné très intéressant: il s'agit de l'azulène avec une teneur de 6,18%. Un autre composé majoritaire appartient à la famille des alcools : le 1,2-benzenediol, avec un taux de 5,36%. L' $\alpha$ -patcouleène présente un taux égal à 2,87%. Les autres composés non identifiés représentent un taux inférieur à 13% (tableau 47).

Tableau 47: Composés majoritaires des HE de *M. nivellei*.

TR* (min)	Composé identifié	Pourcentage %	
		Feuilles (Fe)	Fruits (Fr)
6,75	$\delta$ elemene	<b>15,69</b>	n.d
9.96	$\alpha$ - pinene	1.27	3.25
10.13	$\alpha$ -thujene	n.d	0.15
11,07	Eucalyptol	12,06	<b>37.5</b>
11.14	$\beta$ - pinene	n.d	0.38
11.86	$\alpha$ - phellandrene	n.d	1.20
11.63	Myrcene	1.23	0.25
12.04	Limonene	n.d	<b>22.85</b>
12.35	$\beta$ - Ocimene	n.d	0.33
12.73	$\rho$ - Cymene	n.d	0.6
12.85	Terpinolene	0.64	0.21
14,16	Terpinène	2,42	1.7
15.56	Linalyl acetate	n.d	4.22
16.01	Terpinen-4-ol	0.52	0.57
16.04	Terpenyl acetate	2.41	1.80
16.13	Carene	0.34	n.d
16.65	$\alpha$ - Humulene	n.d	0.46
17.25	Neryl acetate	0.7	nd
20,34	Alpha Terpinéol	<b>13,01</b>	3.27
27.55	Geranyl acetate	1.20	5.10
27.78	Linalool	1.69	n.d
28.29	Geraniol	2.50	0.19
32,53	$\beta$ -Citral	7.76	1.28
33.31	$\alpha$ -Citral	3.90	1.36
37.13	Ermophilene	0.46	0.10
38,66	1,2-benzenediol,3,5-bis	5,36	2.3
40.99	Nerolidol	0.93	n.d
41,43	Quinoline 2,3,4-hexahydro-7-methyl	2,29	n.d
43,16	Azulène	6,18	4.20
43,57	Alpha patcoulène	2,87	1.37
44.58	Bulnesol	0.53	nd
49.50	Isophytol	1.45	0.07
50.03	n-hexadecanoic acid	0.21	nd
<b>Total</b>		87.62	94.71

Selon ces résultats (tableau 47), on peut déduire que l'HE des feuilles de *M nivellei* (HEFeMN) appartient au chémotype  $\delta$ -Elemene/ $\alpha$ -Terpinéol, avec une présence non négligeable du cinéol et du citral.

Très peu sont les données bibliographiques concernant la composition de l'HE de *M. nivellei*. **Bouzabata et al. (2013)** ont rapporté que l'HE de la partie aérienne appartient au chemotype Eucalyptol/Limonène avec des proportions respectives de 37,5% et 25%, associés a des teneurs appréciables en acétate de geranyl (5,1%),  $\alpha$ -terpinéol (5,0%), Linalyl acetate (4,2%), terpenyl acétate (3,8%) et en linalool (1,7%).

En effet, ces huiles ont été récoltées dans des régions différentes, dont chacune présente ses propres caractéristiques pluviométriques et édaphiques. La divergence observée au niveau de la composition chimique des HE, peut être la résultante d'une différence des niveaux de biosynthèse des enzymes intervenant dans la formation des monoterpènes. L'implication de facteurs héréditaires dans ce processus n'est pas à exclure, sachant que la composition des HE est généralement influencée par des facteurs génétiques.

La connaissance de la composition chimique des HE, que ce soit majoritaires ou minoritaires, est d'un intérêt capital pour la suite de notre travail, dans la mesure où elle nous permettra de justifier l'efficacité antimicrobienne de nos produits testés et de comparer leur potentiel thérapeutique en fonction de leur profil chimique.

- Les baies

Concernant la composition de l'HE des fruits de *M. nivellei*, nous avons remarqué que l'eucalyptol et le limonène représentent les monoterpènes les plus abondants. Ce qui nous permet de lui attribuer le chémotype *Eucalyptol/ Limonène*. L'azulène est également présent dans l'HE des fruits, avec une teneur estimée à 4,20%

Globalement, les quatre HE étudiées sont très riches en monoterpènes et en sesquiterpènes, qui représentent les deux principaux groupes de terpènes. En revanche, certains aldéhydes et alcools identifiés occupent une position secondaire. Les acides et les cétones sont minoritaires.

Cependant, nous remarquons la présence de quatre composés communs chez les deux espèces (eucalyptol, alpha terpinéol, octadienol et alpha patcouène) avec des proportions variables. L'effet combiné de ces composés est responsable de l'odeur caractéristique de l'HE de chaque plante. L'alpha terpinéol est responsable de l'odeur florale sucrée exhalée par le végétal (**Lawrence, 1993**).

Néanmoins l'azulène, composé très utilisé en cosmétologie et connu pour ses propriétés anti-inflammatoires, donne l'aspect de très petites gouttelettes bleuâtres dispersées dans les HE de *M. nivellei*.

Le chémotype Limonène/Alpha pinène de l'HE de l'espèce *M communis*, que nous avons détecté, concorde avec les résultats de l'analyse chimique de l'HE du myrte en Turquie (**Agkul et Bayrak (1989)**), en Tunisie (**Messaoud et al., 2005**), et en Suède (**Shikhiev et al., 1978**), qui ont tous révélé la présence de cette race chimique.

**Bradesi et al. (1997)** ont révélé la présence de deux chémotypes d'HE de *M. communis*, il s'agit du chémotype Acétate de myrtenyl/Eucalyptol et le chémotype Eucalyptol/Acétate de myrtenyl, ce même auteur a constaté que chacun de ces deux chémotypes se divise à son tour, en deux sous-groupes, selon le rapport relatif:  $\alpha$  pinène/ acétate de myrtenyl ou  $\alpha$  pinène/ eucalyptol.

De nombreux travaux ont rapporté que l'un des principaux constituants de l'HE de *M. communis* est l'eucalyptol, auquel peuvent s'ajouter le linalool, le myrténol, l' $\alpha$ -pinène et l'acétate de myrtenyl comme composés majoritaires (**Sallé, 1991; Bradesi et al., 1997; Ozek et al., 2000**).

Cependant, plusieurs facteurs environnementaux comme l'ensoleillement, la nature du sol, la période de récolte, l'origine géographique et le climat en sont responsables (**Lawrance, 1996; Gardeli et al., 2008**). Ces facteurs influent sur les voies de biosynthèse de l'HE, provoquant l'apparition de chémotypes avec des réponses thérapeutiques spécifiques (**Chalchat et al., 1998 ; Flamini et al., 2004**).

### III.3.3.2. Résultats de l'étude de la fraction non volatile polaire (analyse des extraits)

#### III.3.3.2.1. Rendement des extraits méthanoliques et éthanoliques

Les extraits méthanoliques sont quantitativement les plus importants. Cela voudrait dire que les poudres végétales utilisées (celles des feuilles, des fruits et des cals) contiennent beaucoup de composés solubles dans le méthanol. D'autant plus que l'extraction au méthanol a duré six heures, alors que la macération éthanolique s'est déroulée à froid, et a été étendue sur 24 heures seulement, ce qui explique le faible rendement de cette dernière.

Les extraits méthanoliques des feuilles et des fruits sont d'un marron très foncé, légèrement gras, tandis que les extraits éthanoliques sont poudreux et friables, de couleur vert claire. Quant aux extraits des cals, ils ont un aspect collant, pâteux de couleur vert foncé (tableau 48).

Les rendements sont variables, ils dépendent de la méthode et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée. La méthode d'extraction affecte également le contenu total en polyphénols ainsi que les propriétés biologiques attendues (**Lee et al., 2003; Yrjonen, 2004**).

Tableau 48: Rendement, aspect et couleur des extraits obtenus.

		Nature de l'extrait	Rendement de l'extrait (%)	Aspect de l'extrait	Couleur de l'extrait
<i>M. communis</i>	cals	Extrait MeOH	35,56	Collant pâteux	Vert foncé
	Fe	Extrait MeOH	22,30		Marron foncé
	Fr		45,53		
	Fe	Extrait EtOH	14,41	Friable	Vert claire
	Fr		36,25		
<i>M. nivellei</i>	Cals	Extrait MeOH	40,45	Collant pâteux	Vert foncé
	Fe	Extrait MeOH	59,15		Marron foncé
	Fr		49,89		
	Fe	Extrait EtOH	15,12	Friable	Vert claire
	Fr		38,67		

*Fe* : feuilles, *Fr* : fruits, *MeOH* : extrait méthanolique, *EtOH* : extrait éthanolique

Les extraits alcooliques des feuilles et des baies de *M. nivellei* sont plus rentables que ceux de l'espèce méditerranéenne *M. communis* (tableau 48). Quant aux extraits des cals, nous avons enregistré un rendement moyen estimé à 35,56% pour *M. communis* et 40,45% pour l'espèce *M. nivellei*.

**Gardeli et al. (2008)** ont montré que le rendement de l'extrait méthanolique de *M. communis* va de 43,4 à 59,5 % et atteint son maximum, lorsque la plante est récoltée en pleine floraison. Dans ce même contexte, **Hayder et al. (2008)**, ont rapporté que le rendement de l'extrait méthanolique de *M. communis* est égal à 28,66%, signalant qu'il est très riche en tanins, en flavonoïdes et en coumarines.

**Husseinzadah et al. (2011)** ont rapporté que le rendement des extraits éthanoliques de l'espèce *M. communis*, poussant spontanément en Iran, réalisé à l'aide d'un montage Soxhlet, ne dépassait pas 7,09%

**Yadergarinia et al. (2006)** ont rapporté que pour chaque espèce végétale et au sein de la même espèce, la nature des composants phytochimiques est à l'origine des activités biologiques de chaque extrait ou fraction. Ces activités sont aussi en dépendance de la teneur de la substance ou l'ensemble des substances biologiquement actives.

L'extraction de la fraction polaire d'une matière végétale, est une étape très importante dans l'isolement aussi bien que dans l'identification des composés phénoliques. Les matières végétales peuvent contenir des quantités variables d'acides phénoliques, phénylpropanoïdes, anthocyanines, et tanins (**Garcia-Salas et al., 2010**). Cette diversité structurale est responsable de la grande variabilité des propriétés physico-chimiques, influençant l'extraction des polyphénols (**Savova et al., 2007 ; Koffi et al., 2010**).

Les travaux conduits par **Katalinic et al. (2010)**, **Koffi et al., (2010)**, **Bonnaillie et al. (2012)** et **Mahmoudi et al. (2013)** ont indiqué que l'éthanol solubilise correctement des composés phénoliques fortement et moyennement polaires, la solubilité des polyphénols dépend principalement du nombre de groupements hydroxyles, du poids moléculaire et de la longueur de la chaîne carbonique du squelette de base.

L'éthanol et l'eau sont les meilleurs solvants d'extraction recommandés, car ils ont l'avantage d'être non polluants, moins chers et non toxiques par rapport à d'autres solvants comme le méthanol (**Jokiæ et al., 2007**).

Dans ce même contexte, **Mahmoudi et al. (2013)** ont remarqué que la macération par l'éthanol est considérée comme étant la meilleure technique d'extraction des biomolécules thermosensibles comme les polyphénols totaux et des flavonoïdes. Car bien que l'augmentation de la température, au cours de l'extraction, favorise d'une part la diffusion et la solubilité des substances extraites, surtout des tanins, ce qui augmente le rendement, mais d'autre part, elle détruit certaines substances fragiles.

### III.3.3.2.2. Analyse des extraits par spectrophotométrie UV- visible

L'analyse qualitative par balayage spectral des extraits, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (Type *SHIMADZU UV-1601*), a été effectuée sur des solutions homogènes, en dissolvant 1mg de chaque résidu sec dans 1ml de méthanol absolu. Nous avons comparé le spectre de l'acide gallique (étalon) avec ceux des extraits alcooliques, afin de confirmer ou d'infirmer la présence des polyphénols (**Appendice L**).

L'acide gallique, utilisé comme étalon, a présenté un pic majoritaire unique, correspondant à une longueur d'onde de 266 nm (figure 84).

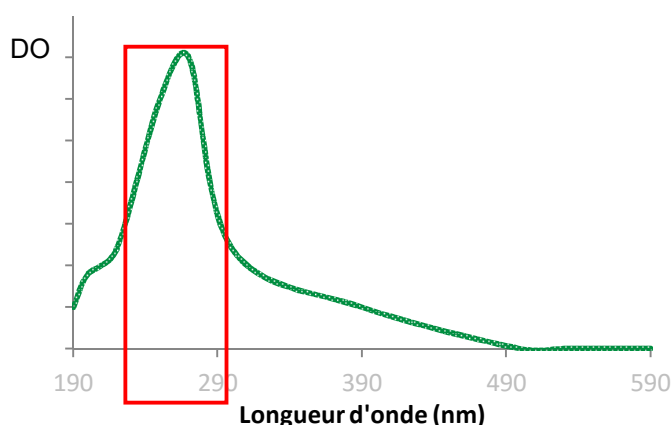


Figure 84 : Spectre UV-visible de l'acide gallique

- Extraits méthanoliques

Selon **Markham (1982)**, les longueurs d'ondes allant de 260 à 360 nm, présentent deux pics importants, correspondant au domaine d'absorbance des flavonoïdes. Cependant, les six extraits méthanoliques provenant des feuilles, des fruits et des cals, présentent deux pics majoritaires, tous inclus dans cet intervalle.

Les longueurs d'ondes 536,5 et 537 nm correspondent au domaine d'absorbance de la chlorophylle, dont la présence est sous forme de traces dans les extraits (figure 85, figure 86, figure 87, figure 88, figure 89, figure 90).

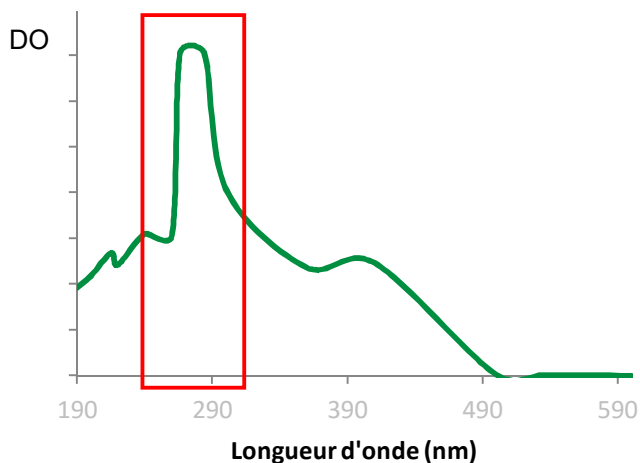


Figure 85 : Spectre UV-visible de l'extrait méthanolique des feuilles de *M. communis* (EMFeMC)

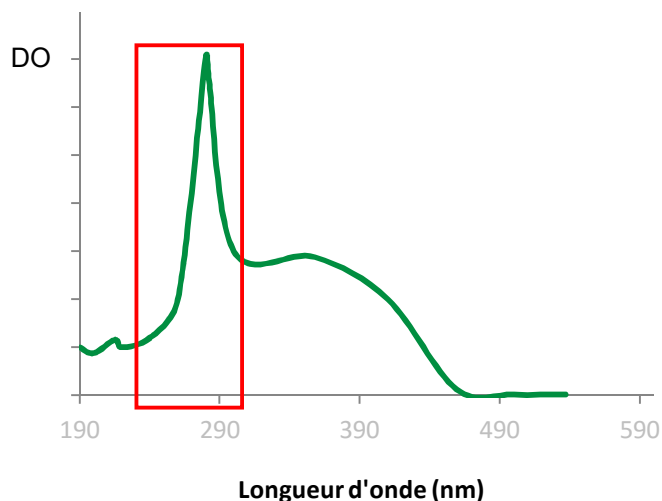


Figure 86 : Spectre UV-visible de l'extrait méthanolique des feuilles de *M. nivellei* (EMFeMN)

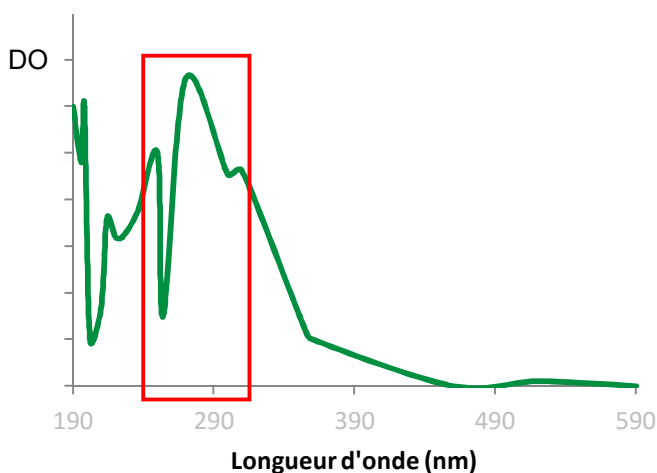


Figure 87 : Spectre UV-visible de l'extrait méthanolique des fruits de *M. communis* (EMFrMC)

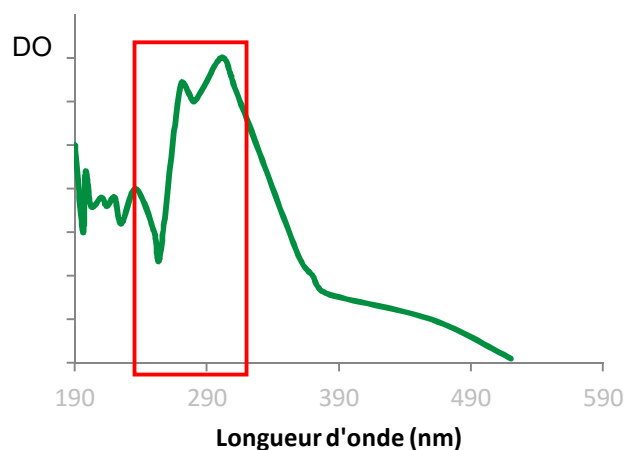


Figure 88 : Spectre UV-visible de l'extrait méthanolique des fruits de *M. nivellei* (EMFrMN)

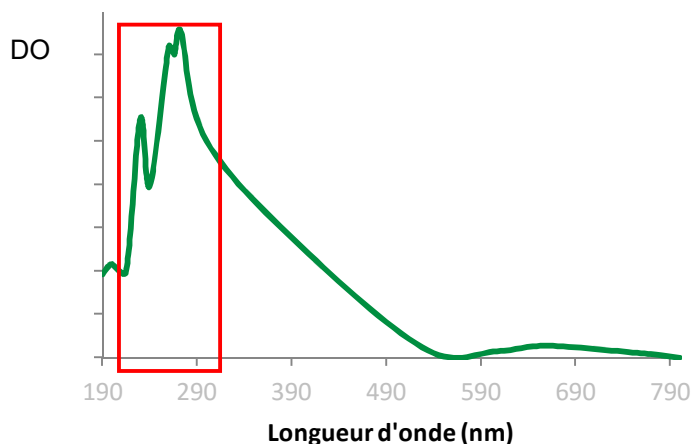


Figure 89 : Spectre UV-visible de l'extrait méthanolique des Cals de *M. communis* (EMCaMC)

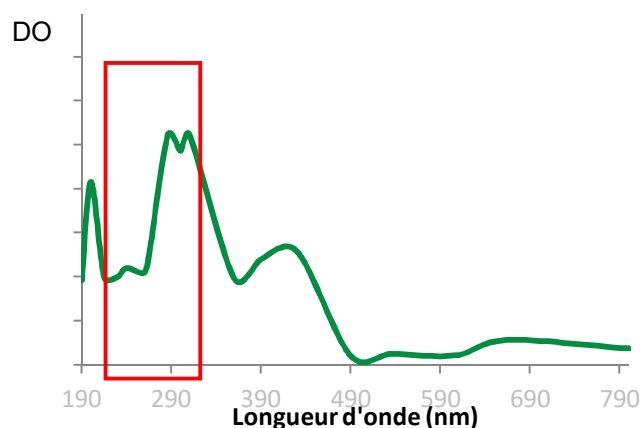


Figure 90 : Spectre UV-visible de l'extrait méthanolique des Cals de *M. nivellei* (EMCaMN)



Des pics correspondant à la longueur d'onde 266nm, typique de l'acide gallique, ont été obtenus dans les profils spectraux des extraits méthanoliques des fruits (EMFrMC et EMFrMN) et des cals (EMCaMC et EMCaMN) des deux espèces étudiées, témoignant de la présence de cette molécule, à l'état libre, dans ces extraits (**Appendice L**). Quant aux extraits méthanoliques des feuilles (EMFeMC et EMFeMN), l'absence d'un pic représentatif de cette molécule, peut avoir deux éventualités : soit l'acide gallique est absent, soit il est conjugué avec d'autres biomolécules.

- Extraits éthanoliques

Selon **Markham (1982)**, les pics d'absorbance situés entre 247 et 339 nm, correspondent à des polyphénols de type flavonols. Nos extraits présentent des domaines d'absorbance dans ce même intervalle, ce qui confirme la présence de ce type de composés phénoliques (figure 91, figure 92, figure 93, figure 94).

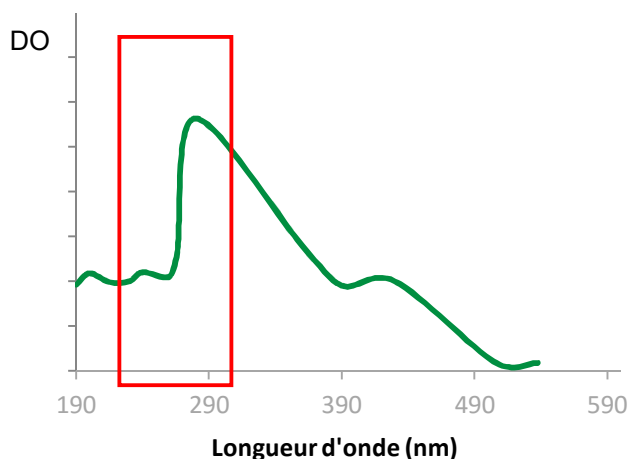


Figure 91: Spectre UV-visible de l'extrait éthanolique des feuilles de *M. communis* (EEFeMC)

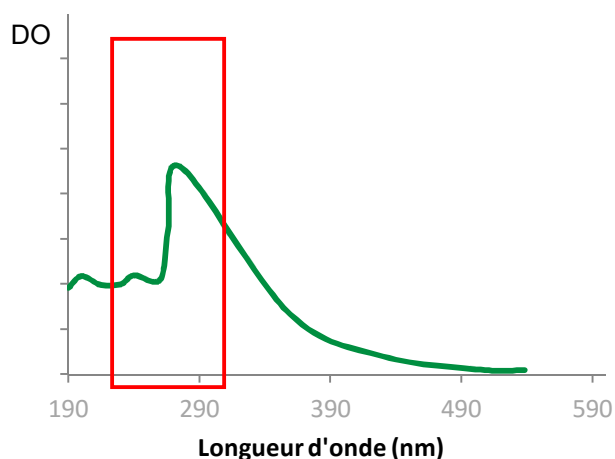


Figure 92 : Spectre UV-visible de l'extrait éthanolique des feuilles de *M nivellei* (EEFeMN)

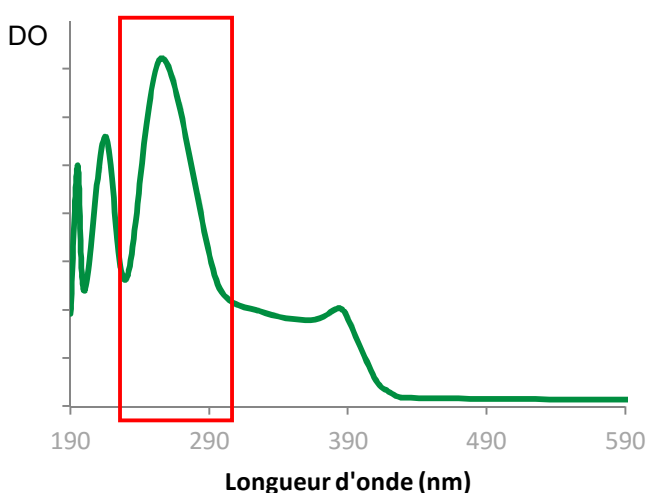


Figure 93: Spectre UV-visible de l'extrait éthanolique des fruits de *M communis* (EEFrMC)

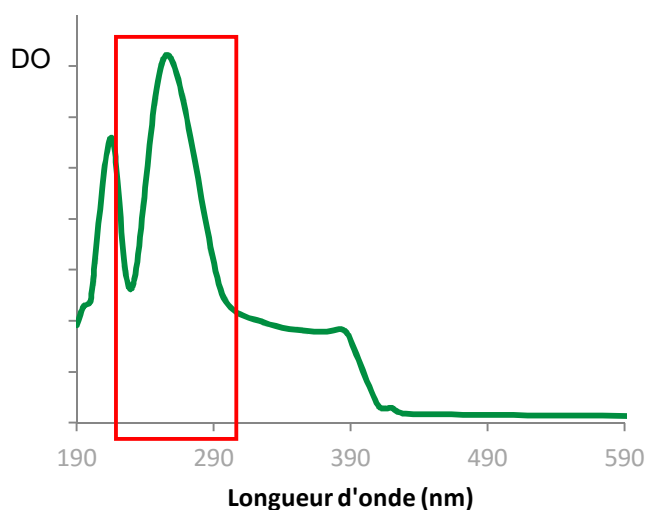


Figure 94: Spectre UV-visible de l'extrait éthanolique des fruits de *M nivellei* (EEFrMN)

D'après les spectres obtenus, nous avons constaté que les différents extraits comportent en commun des pics majoritaires, relatifs aux molécules qui absorbent dans le domaine des polyphénols.

#### III.3.3.2.3. Dosages biochimiques de quelques métabolites par spectrophotométrie UV-visible)

L'étude quantitative des extraits par des dosages spectrophotométriques, avaient pour objectif la détermination de la teneur de quelques métabolites. Pour chaque dosage, nous avons réalisé une courbe d'étalonnage à différentes concentrations d'étalon. Le choix de l'étalon dépend étroitement de la nature du métabolite à analyser (tableau 49).

Tableau 49: Etalons sélectionnés pour les dosages et leurs longueurs d'ondes.

Paramètre de dosage	Etalon sélectionné	Longueur d'onde (nm)
Polyphénols	Acide gallique	760
Flavonoïdes	Quercetine	415
Flavonols	Rutine	440
Tannins	Acide tannique	760
Anthocyanes	Cyanidine	520

#### III.3.3.2.3.1. Dosage des composés phénoliques

L'analyse quantitative des polyphénols totaux a été réalisée par la méthode *Folin Ciocalteu*. La teneur en composés phénoliques des extraits a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**Appendice M**).

Nous avons constaté que les extraits obtenus par macération dans l'éthanol sont plus riches en composés phénoliques, que ceux obtenus par extraction à chaud avec du méthanol chez les deux espèces, aussi bien pour les extraits des baies que ceux des feuilles, avec des taux dépassant largement 700 µg ac gallique/mg ES (figure 95).

Cependant, indépendamment du mode d'extraction effectué, les extraits de la plante *M. communis* sont toujours plus riches en polyphénols par rapport à ceux de *M. nivellei*, qu'ils soient obtenus à partir des feuilles, des baies ou même à partir des cals (figure 95).

Les extraits méthanoliques des feuilles et des fruits de ces deux plantes, présentent également des concentrations rapprochées, ne dépassant pas 500 µg eq acide gallique/mg ES. Ces résultats s'avèrent meilleurs que ceux décrit en bibliographie.

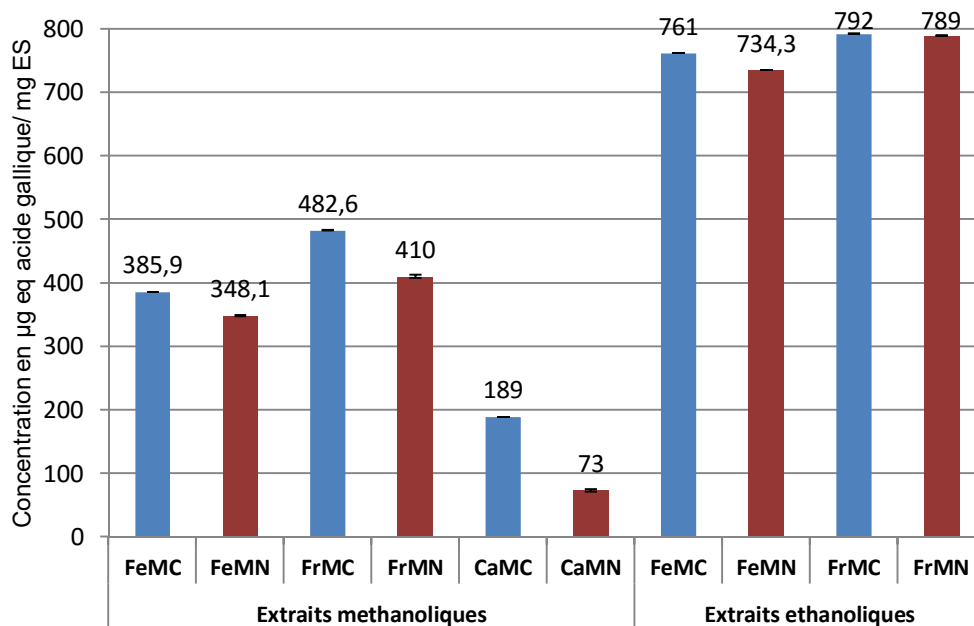


Figure 95: Concentrations en polyphénols des différents extraits de *M. communis* et *M. nivellei*

Selon **Gardeli et al. (2008)**, la teneur des extraits méthanoliques en polyphénols chez *M. communis*, varie entre 352 et 373 µg eq ac gal/mg ES, et atteint un maximum durant la période de pleine floraison. Cependant, **Ammar et al. (2005)** rapportent que sa teneur avoisine 227 µg eq ac gal/mg ES.

Par ailleurs, si on compare les teneurs en polyphénols des extraits issus des feuilles et des fruits de ces deux espèces, par rapport à ceux des cals, on peut dire que ces derniers ne sont pas très riches en composés phénoliques. Il conviendrait de jouer sur certaines conditions de culture, afin d'optimiser la synthèse de ces métabolites, ou bien de soumettre les explants à un stress salin ou hydrique, pour les inciter à synthétiser ces métabolites secondaires. Dans ce même contexte, une série de travaux portant sur l'optimisation des conditions de culture de colonies tissulaires de *Fagopyrum esculentum* ont permis d'obtenir des quantités intéressantes en polyphénols, mais qui suggèrent l'exposition des cals à un éclairage permanent 24h/24h (**Moumou et al., 1992**).

**Bahorun et al. (1995)** ont rapporté que l'introduction de l'acide shikimique au milieu de culture augmente le rendement en polyphénols, ces résultats rejoignent aussi les observations faites par **Shah et Mehta (1978)**, qui ont amélioré la production des colonies tissulaires de *Crotalaria* en présence de différents acides phénoliques.

**Aidi-Wannes et al. (2010)** ont analysé les extraits méthanoliques, obtenus séparément à partir des feuilles, des tiges et des fleurs du myrte, ils ont constaté que les feuilles sont les organes les plus riches en composés phénoliques (11,21 µg/mg ES), suivies des fleurs (6,02 µg/mg ES) et des tiges (3,03 µg/mg ES).

**Kanoun et al. (2014)** ont rapporté que les extraits méthanoliques des feuilles (119,23 mg eq ac gal/g ES) et des tiges (112,96 µg eq ac gal/mg ES) de *M. communis* sont plus riches en polyphénols par rapport aux fruits (70,26 µg eq ac gal/mg ES)

**Amenour et al. (2009)** ont également démontré que les feuilles du myrte, poussant spontanément au Portugal, contiennent de très faible taux de polyphénols (31,2 µg eq ac gal/mg ES)

### III.3.3.2.3.2. Dosage des flavonoïdes

L'analyse quantitative des flavonoïdes, dans les extraits méthanoliques et éthanoliques, a été effectuée par une méthode adoptée par **Park et al. (1997)**. Les teneurs en flavonoïdes ont été alors calculées à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine (**Appendice M**).

Pour les deux espèces étudiées, la concentration en flavonoïdes est très importante dans les extraits éthanoliques et méthanoliques des baies, avec des teneurs qui dépassent 250 µg eq quer /mg ES, suivis par les extraits alcooliques des feuilles. Concernant les cals, ils sont moins riches en flavonoïdes, avec une concentration qui ne dépasse pas 91µg eq quer/mg ES (figure 96).

D'après les résultats obtenus, on remarque que le taux des flavonoïdes dans les extraits éthanoliques, demeure plus important, que celui des extraits méthanoliques mais avec des concentrations plus élevées dans les baies par rapport aux feuilles et aux cals.

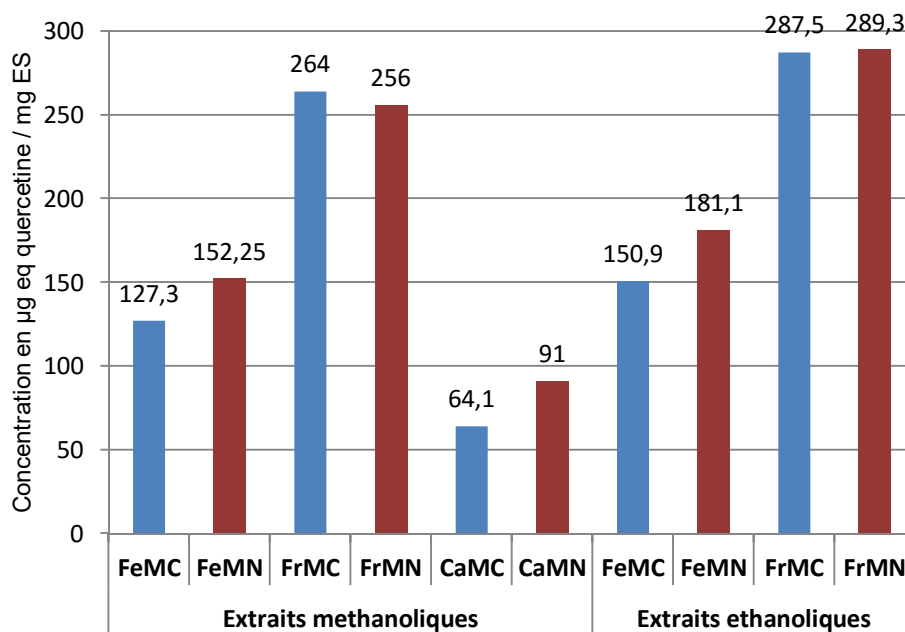


Figure 96: Concentrations en flavonoïdes des différents extraits de *M. communis* et *M. nivellei*.

Selon **Aidi-Wannes et al. (2010)**, les flavonoïdes exhibent une concentration de 0,91mg/g, avec la quercétine-3-D-rahmnoside et la myricétine-3-D-galactoside comme composés majoritaires.

**Kanoun et al. (2014)** rapportent que les feuilles et les tiges de *M. communis* présentent des teneurs en flavonoïdes (6,56 µg eq catechine/mg ES et 6,11 µg/mg ES respectivement) plus importantes par rapport aux baies (3,87 µg/mg ES).

### III.3.3.2.3.3. Dosage des flavonols

La quantification des flavonols contenus dans les extraits a été faite conformément au protocole décrit par **Yermakov et al. (2004)**. La teneur en flavonols de chaque extrait a été évaluée à partir de la courbe d'étalonnage de la rutine (**Appendice M**).

Il paraît clairement que les extraits éthanoliques des baies et des feuilles fournissent respectivement les taux les plus élevés en flavonols, qui dépassent 700 µg eq rut /mg ES chez les deux espèces (figure 97).

La concentration en flavonols dans les extraits méthanoliques des plantes récoltées *in situ*, est moins importante. Quant aux extraits méthanoliques des cals, le taux varie entre 100 et 111 µg eq rut/mg ES, mais demeure toutefois non négligeable (figure 97).

Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la littérature, car le taux n'est que relatif, et semble être influencé non seulement par la méthode appliquée dans l'extraction, mais aussi par la nature chimique des composés à extraire et le solvant à utiliser. Car ce taux est lié surtout aux génotypes des plantes ainsi qu'à l'origine géographique qui contribuent aux différences de rendement enregistrées d'une plante à une autre et même au sein de la même espèce (**Kordali et al., 2003; Kivkac et Akay, 2005**).

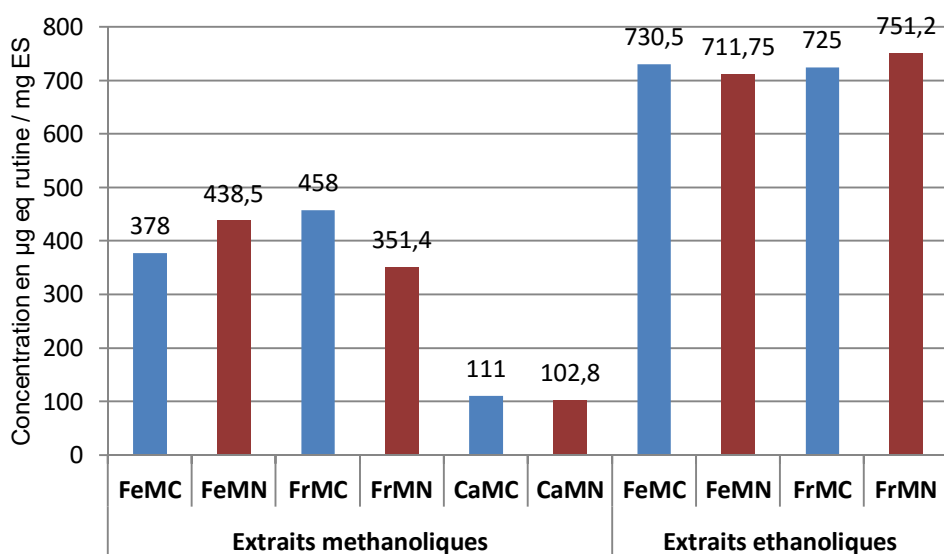


Figure 97: Concentrations en flavonols des différents extraits de *M. communis* et *M. nivellei*.

#### III.3.3.2.3.4. Dosage des tanins

Après extrapolation des résultats de l'absorbance mesurée au spectrophotomètre, sur la courbe d'étalonnage de l'acide tannique (**Appendice M**), nous avons constaté une forte présence de tanins dans les extraits éthanoliques et méthanoliques des baies, chez les deux espèces étudiées (figure 98).

Les extraits éthanoliques et méthanoliques des baies renferment des concentrations très importantes en tanins, qui sont trois fois plus élevés que ceux des extraits de feuilles. Quant aux extraits des cals, ils ont fourni de très faibles concentrations, nous pensons que l'état juvénile de ces tissus en est la cause principale (figure 98).

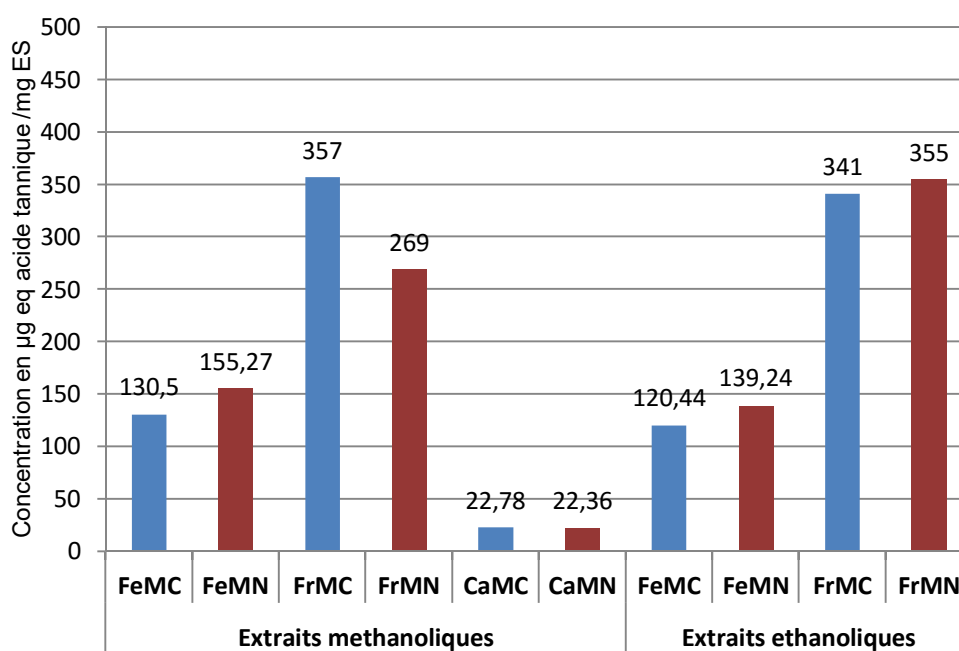


Figure 98: Concentrations en tanins des différents extraits de *M. communis* et *M. nivellei*

Les travaux de **Gasmi-Boubaker et al. (2006)** rapportent que la concentration des tanins, dans l'extrait méthanolique des feuilles de *M. communis*, avoisine 104 µg eq ac tan/mg ES. Alors que **Ammar et al. (2005)** ont confirmé la présence d'un taux de tanins estimé à 282 µg eq ac tan/mg ES chez cette même espèce.

Selon **Kanoun et al. (2014)**, les fruits représentent les organes les plus riches en tanins, les teneurs détectées dans les extraits méthanoliques sont de  $27,20 \pm 1,09$  µg/mg ES chez *M. communis*. Cependant, les tiges et les feuilles présentent des taux estimés à 22,47 et 13,78 µg/mg ES. Ces résultats se montrent dix fois plus faibles par rapport à ceux que nous avons détectés dans les extraits testés.

### III.3.3.2.3.5. Dosage des anthocyanes

La teneur en anthocyanes de chaque extrait est calculée à partir de la courbe d'étalonnage de la cyanidine (**Appendice M**). Les extraits éthanoliques ont enregistré des teneurs estimées à 21,3  $\mu\text{g}$  et 25,5  $\mu\text{g}$  eq cyan/mg ES respectivement pour *M. communis* et *M. nivellei*. Cependant, nous avons enregistré, dans les extraits des baies, des teneurs cinq fois plus importantes. Un écart relativement important a été observé, pour les extraits des baies et des feuilles, traités à chaud avec du méthanol. Pour les cals obtenus en *in vitro*, ces taux demeurent très faibles et ne dépassent pas 5,20  $\mu\text{g}$  eq cyan/mg ES (figure 99).

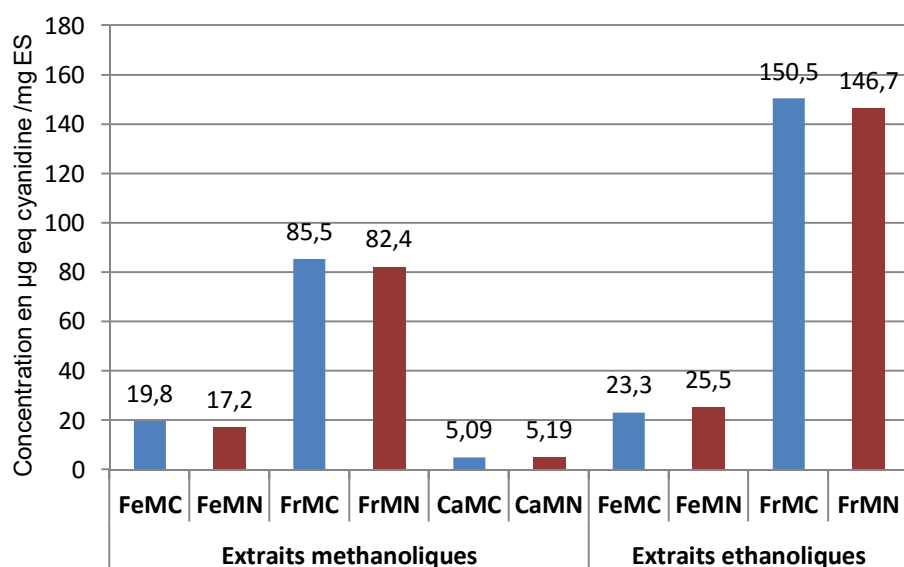


Figure 99: Concentrations en anthocyanes des différents extraits de *M. communis* et *M. nivellei*

D'après les travaux de **Ishikura et Teramoto (1983)**, les cultures en suspensions des cals de *Cryptomeria japonica* produisent jusqu'à 26  $\mu\text{g}$  eq cyan/mg ES. Des résultats impressionnants ont été également obtenus à partir des suspensions cellulaires de *Pseudotsuga menziesii*, avec un rendement en anthocyanes allant jusqu'à 40  $\mu\text{g}/\text{mg}$  ES (**Stafford et cheng, 1980**). Alors que *Ginkgo biloba* peut accumuler jusqu'à 60  $\mu\text{g}$  eq cyan/mg ES (**Stafford et al., 1986**).

Il est important de signaler que les anthocyanes, sur le plan théorique augmentent avec la maturation des fruits, atteignant un maximum puis diminuent. Par ailleurs, **Bakker et al. (1997)** ont rapporté que les différentes réactions provoquant la diminution des anthocyanes sont :

- Les réactions de condensation des anthocyanes et/ou flavanols avec d'autres molécules inférieures comme l'acide puracique ou l'acide glycoxylique.
- La combinaison des anthocyanes avec les tanins pour donner des polymères, qui possèdent des propriétés différentes de celles des anthocyanes.
- Le procédé d'extraction adopté, vu que les anthocyanes sont très sensibles au traitement thermique.

### III.3.4. Résultats des essais pharmaco-toxicologiques

#### III.3.4.1. Evaluation de la toxicité aigue

Lorsqu'une plante médicinale fait l'objet d'une étude pharmacologique, il est indispensable d'évaluer sa toxicité potentielle. Pour cela, nous avons choisi d'effectuer un test de toxicité aigüe, en l'occurrence la détermination de la dose létale 50 (DL<sub>50</sub>) chez les souris, des HE et des extraits aqueux préparés à partir des concrètes alcooliques des deux plantes étudiées (l'extrait aqueux étant la forme de préparation la plus utilisée dans les tests pharmacologiques).

##### III.3.4.1.1. Détermination de la toxicité aigue par voie orale

L'évaluation de la toxicité des HE et des extraits, par voie orale, est une étape nécessaire pour étudier leurs propriétés thérapeutiques. Les observations sont faites quotidiennement pendant une période de 14 jours. En vue d'enregistrer tout signe de perturbation du comportement ou de mortalité (tableau 50). Aucun signe de mortalité n'a été observé pour le lot témoin (ayant reçu seulement l'eau physiologique + Tween 80).

- Huiles essentielles

Deux heures après l'administration des différentes doses des HE (0,5/1/2/4g/kg), aucune mortalité immédiate n'a été observée, pour toutes les souris des 16 lots testées (quatre lots pour chaque HE). Durant les 14 jours ayant suivi le gavage, aucun signe de perturbation n'a été enregistré pour l'intégralité des lots. Cependant, chez les lots qui ont reçu une dose de 4g/kg, nous avons remarqué un affaiblissement des souris durant les 2 heures ayant suivi l'administration de la dose.

Vu l'absence de mortalité enregistrée pour les différentes doses testées, nous avons opté pour l'évaluation de la toxicité aigüe des HE pures, administrées à de nouveaux lots de souris. (Chaque lot reçoit 0,5 ml de l'HE pure). Là encore, durant la période d'observation (14 jours), aucune mortalité n'a été enregistrée. Cependant, nous avons remarqué un affaiblissement général et une importante réduction de la motricité chez les souris traitées, durant les premières 24 heures ayant suivi l'administration des HE.

A la base de ces données, nous pouvons admettre que les HE, extraites à partir des feuilles et des baies de *M. communis* et *M. nivellei*, n'expriment aucune toxicité orale, suite à une administration unique, même si elles sont avalées à l'état pur.

Cependant, l'HE des feuilles de *M. communis*, du Nord hollandais, a provoqué la mort de la moitié des rats femelles de souche N.M.R.I, pour une dose de 2,5ml/kg (**Hartmut et Maria, 1979**). Dans ce même contexte, selon les travaux de **Muhaned et al. (1989)**, l'HE des rameaux feuillés de *M. communis*, poussant spontanément en Iraq, est toxique pour les rats de souche *Wistar*, à la dose de 444mg/kg.



Les essais de toxicité aigüe des HE extraites à partir des plantes, appartenant à la famille des *Myrtaceae* sont très peu évalués. Au Brésil, les HE de la partie aérienne d'*Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus tereticornis*, et *Eucalyptus globulus*, n'ont exprimé aucune toxicité pour les doses allant de 0,1 à 100mg/kg (**Jeane et al., 2003**). Cependant, en France, ces trois espèces de *Myrtaceae*, ainsi que le Girofle, ont une toxicité aigüe faible à très faible, pour les doses allant de 2 à 5 g/kg (**Bruneton, 1999**).

- Extraits aqueux des concrètes

Les taux de mortalité, enregistrés sur les 24 lots testés, ont été mis en évidence (tableau 50).

En se référant à l'échelle de Hodge et Sterner (tableau 18 dans le chapitre: Matériel et méthodes), on déduit que les extraits méthanoliques des feuilles et des fruits de *M. communis*, ainsi que l'extrait méthanolique des fruits de *M. nivellei* sont considérés comme légèrement toxiques, auxquels on attribue l'indice de toxicité : **4**, car ces dernières ont présenté des DL<sub>50</sub> comprises entre 500 et 5000mg/kg.

Pour les autres extraits étudiés, nous n'avons pas pu déterminer la DL<sub>50</sub>, car la dose qui tue l'intégralité des animaux du lot n'a pas été déterminée (DL<sub>100</sub>), ce qui nous permet de déduire que la DL<sub>50</sub> est certainement plus élevée que la plus forte dose testée (1g/kg). Cependant de nombreux symptômes de toxicité ont été enregistrés (troubles nerveux, troubles respiratoires et de motricité).

**Hrubik et al. (2012)** ont rapporté que les extraits alcooliques de *M. communis* et *Eucalyptus camaldulensis* exercent un effet toxique, évalué *in vitro* sur des cellules cancéreuses, témoignant de leur effet cytotoxique pour des doses allant de 7 à 138 µg/ml pour *M. communis* et de 3 à 250 µg/ml pour *E. camaldulensis*. Dans ce même contexte, **Husseinzadah et al. (2011)** ont réalisé le test de toxicité aigüe sur des souris ayant reçu une injection intra-péritonéale d'extrait éthanolique de *M. communis*, ils ont déduits que cet extrait présente une DL<sub>50</sub> estimée à 0,473 g/kg de poids corporel.

La toxicité chronique des HE est assez mal connue; on manque aussi des données sur leurs éventuelles propriétés mutagènes, tératogènes ou cancérigènes. On connaît, par contre, beaucoup mieux le risque de toxicité aigüe liée à une ingestion massive, en particulier la neurotoxicité des HE à thuyone ( thuya, absinthe, tanaisie, sauge) ou à pino-comphone (hysope): ces cétones induisent des crises épileptiformes et tétaniformes, des troubles psychiques et sensoriels nécessitant l'hospitalisation (**Hameuralaine, 2009**).

Bien que les HE étudiées n'aient présenté aucun signe de morbidité, leur usage impose, toutefois, l'adoption d'une attitude prudente face à l'usage de ces dernières à l'état pur et à doses fortes et/ou prolongées par voie orale et, a fortiori, en mélange.

Tableau 50 : Relation entre le taux de mortalité et la dose d'extrait administré.

	Extraits aqueux préparés a partir des concrètes méthanoliques MeOH												Extraits aqueux préparés a partir des concrètes éthanoliques EtOH											
	FeMC			FeMN			FrMC			FrMN			FeMC			FeMN			FrMC			FrMN		
	Lot 1	Lot 2	Lot3	Lot 4	Lot 5	Lot 6	Lot 7	Lot 8	Lot 9	Lot10	Lot11	Lot12	Lot 13	Lot 14	Lot 15	Lot 16	Lot 17	Lot 18	Lot 19	Lot 20	Lot 21	Lot 22	Lot 23	Lot 24
Dose (g / kg)	0.5	0.75	1	0.5	0.75	1	0.5	0.75	1	0.5	0.75	1	0.5	0.75	1	0.5	0.75	1	0.5	0.75	1	0.5	0.75	1
Nombre d'animaux utilisés	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Nombre d'animaux morts	1	3	6	1	2	5	1	4	6	2	3	6	1	2	4	1	3	4	1	2	4	0	1	2
Taux de mortalité (%)	16.67	50	100	16.67	33.33	83.33	16.67	66.67	100	33.33	50	100	16.67	33.33	66.67	16.67	50	66.67	16.67	33.33	66.67	0	16.67	33.33
A : différence entre deux doses successives	/	0.25	0.25	/	0.25	0.25	/	0.25	0.25	/	0.25	0.25	/	0.25	0.25	/	0.25	0.25	/	0.25	0.25	/	0.25	0.25
B : moyenne des nombres de morts de deux doses successives	2	4.5	/	1.5	3.5	/	2.5	5	/	2.5	4.5	/	1.5	3	/	2	3.5	/	1.5	3	/	0.5	1.5	/
A x B	0.5	1.125	/	0.375	0.875	/	0.625	1.25	/	0.625	1.125	/	0.375	0.75	/	0.5	0.875	/	0.375	0.75	/	0.125	0.375	/
Σ(A x B)	1.625	/	/	1.25	/	/	1.875	/	/	1.75	/	/	1.125	/	/	1.375	/	/	1.125	/	/	0.5	/	/

$$DL_{50} = DL_{100} - \frac{\sum A \times B}{n} \quad (N=6)$$

Ainsi par application numérique:

Calcul de la DL<sub>50</sub>

$$DL_{50} (EMFeMC) = 1 - (1,625 / 6) = 0,7291 \text{ g / kg} = 729,1 \text{ mg / Kg}$$

$$DL_{50} (EMFrMC) = 1 - (1,875 / 6) = 0,6875 \text{ g / kg} = 687,5 \text{ mg / Kg}$$

$$DL_{50} (EMFrMN) = 1 - (1,75 / 6) = 0,7083 \text{ g / kg} = 708,3 \text{ mg / Kg}$$

Dans notre étude, il a pu être démontré que les extraits aqueux préparés à partir des concrètes, qui sont éventuellement riches en polyphénols, dont les flavonoïdes et les tanins, présentaient une toxicité aux doses supérieures ou égales à 0,5 g/kg de poids corporel. Les travaux de **Matsuo et al. (2005)** ont démontré que certains flavonoïdes étaient cytotoxiques à des concentrations élevées sur des cellules humaines saines. Il sera donc judicieux de rechercher ultérieurement la concentration minimale, à partir de laquelle, les extraits pourraient être utilisés, sans effet néfastes sur un model animal ou des cellules saines *in vitro*.

### III.3.4.1.2. Détermination de l'indice d'irritation primaire cutanée (IPC)

Les valeurs numériques de cotation des lésions érythémateuses et œdémateuses, ont permis de déterminer l'indice d'irritation primaire cutané (IPC) des HE et des extraits (**Appendice N**). Cliniquement, aucun signe de rougeur ou de gonflement n'a été enregistré pour les HE. Néanmoins, un effet contraire a été observé et rapporté lors des tests pratiqués avec les concrètes émulsionnées dans un mélange d'eau physiologique + Tween 80, où nous avons noté une rougeur discrète sur le flanc traité, qui a persisté environ 8 heures avant de disparaître (érythème transitoire et pleinement réversible).

D'après les résultats obtenus (tableau 51), nous pouvons admettre que les HE de feuilles et des baies de l'espèce méditerranéenne *M. communis* (IPC égal a 0,166 et 0,33 respectivement), ainsi que celles de l'espèce saharo-endémique *M. nivellei* (IPC égal à 0,33 et 0,166 respectivement), peuvent être considérées comme non irritantes pour la peau, selon le barème de classification établis par **Pourrat (1993)**.

Tableau 51 : Valeurs des IPC pour les HE et les concrètes testés sur des lapins

		IPC	Interprétation	Normes ( <b>Pourrat, 1993</b> )
Huiles essentielles	FeMC	0,166	Non irritant	Non irritant : $IP \leq 0,5$ Légèrement irritant : $0,5 \leq IP \leq 2$ Irritant : $2 \leq IP \leq 5$ Très irritant : $5 < IP \leq 8$
	FeMN	0,33		
	FrMC	0,166		
	FrMN	0,166		
Extraits méthanoliques (100mg/ml)	FeMC	0,833	Légèrement Irritant	
	FeMN	0,833		
	FrMC	0,667		
	FrMN	0,833		
Extraits éthanoliques (100mg/ml)	FeMC	0,667		
	FeMN	0,667		
	FrMC	0,667		
	FrMN	0,667		

Au cours de ce test, les rougeurs et les œdèmes apparues provisoirement, peuvent trouver une explication dans le pouvoir allergène de certains constituants des concrètes. Quelque auteurs ont rapporté que certains composés phénoliques, dont les acides phénols et les flavonoïdes, peuvent provoquer des dermatites de contact, caractérisées par des œdèmes et des érythèmes passagers (**Geraut et Tripodi, 2007 ; Lalko et Api, 2006**).

### III.3.4.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

Parmi les vertus traditionnelles attribuées au Myrte (*M. communis*), certains auteurs font référence à ses propriétés anti-inflammatoires. Selon **Bionchini et Corbetta (1975)**, les feuilles de cette plante, sont appliquées en compresse, pour réduire les affections cutanées et les œdèmes. Dans ce même contexte, l'espèce *M. nivellei* est également efficace contre les inflammations de la sphère bucco-dentaire ainsi que les dermatoses (**Hammiche et Maiza, 2006**), dont on peut suspecter une origine inflammatoire. Ces indications traditionnelles, nous ont incités à tester les HE et les extraits des deux espèces étudiées, sur un modèle animal, adapté à l'étude des propriétés anti-inflammatoires.

Nous avons choisi comme protocole expérimental, un modèle d'inflammation aiguë: le test de l'œdème à la carragénine, qui est injectée dans la région plantaire d'une des deux pattes postérieures de la souris. A la base des résultats obtenus lors des essais de toxicité orale, nous avons choisi la dose de 100mg/kg de poids corporel pour les HE, et éventuellement 100mg/kg pour les autres extraits. Cette technique a été sélectionnée en raison de sa simplicité d'exécution, de la rapidité d'apparition des effets (développement de l'œdème dans les trente minutes qui suivent l'injection, avec un effet maximal au bout de 3 ou 4 heures) et aussi en raison de sa reproductibilité.

Chez le lot témoin, l'injection de la carraghénine à 1%, dans la patte postérieure gauche des souris, provoque une inflammation visible dans les 30 minutes suivant l'injection. L'œdème augmente progressivement et atteint une intensité maximale, au bout de quatre heures (% AUG : 48,557%).

Chez le lot de référence, l'acide acétylsalicylique réduit l'œdème de façon très importante (% de RED : 62,3642%), l'effet inflammatoire maximal, observé après 4h, a significativement diminué chez le lot référence par rapport aux témoins (% d'AUG d'œdème de 17,543% et 48,557% respectivement). Cet effet inhibiteur du produit de référence (acide acétylsalicylique 100mg/kg) se manifeste dès la première demi-heure, qui suit l'injection de carraghénine 1% (tableau 52).

Selon **Otterness et Gans (1988)**, dans ce modèle expérimental, la distribution et le mécanisme d'action des anti-inflammatoires seraient proches des phénomènes observés chez l'Homme. L'œdème plantaire induit par la carragénine, est dû à la libération initiale d'histamine et de sérotonine, suite à une augmentation de la perméabilité vasculaire.

Après la première heure, les kinines agissent de manière continue et après 6 heures, les prostaglandines se montrent comme d'importants médiateurs: cette libération des prostaglandines est associée à la migration leucocytaire vers la zone enflammée. L'œdème à la carragénine est une des méthodes les plus utilisées, pour l'étude des potentialités anti-inflammatoires de substances et des biomolécules (**Martin-Pares, 1990, Keville et Green, 1995**).

Tableau 52 : Evaluation de l'effet anti-inflammatoire des HE et des extraits de *M. communis* et *M. nivellei*

	Les lots (n=6 souris/lot)	Pattes postérieures des souris	Poids moyen en gramme ± IC	% AUG	% RED
Témoin	Lot témoin (eau/ tween80) + carragénine)	Patte gauche	0,2368 ± 0,0804	48,5571	-
		Patte droite	0,1594 ± 0,0364		
Référence	Lot référence (Acide acétylsalicylique 100mg/Kg + carragénine)	Patte gauche	0,1608 ± 0,0101	17,5439	63,8696
		Patte droite	0,1368 ± 0,0114		
HE	Lot 01 (HEFeMC 100mg/kg + carragénine)	Patte gauche	0,1414 ± 0,0019	5,8383	87,9764
		Patte droite	0,1336 ± 0,0011		
	Lot 02 (HEFeMN 100mg/kg + carragénine)	Patte gauche	0,2172 ± 0,0682	15,7783	67,5058
		Patte droite	0,1876 ± 0,0319		
	Lot 03 (HEFrMC 100mg/kg + carragénine)	Patte gauche	0,2132 ± 0,0380	18,7744	61,3355
		Patte droite	0,1795 ± 0,0170		
	Lot 04 (HEFrMN 100mg/kg + carragénine)	Patte gauche	0,2203 ± 0,0241	20,7785	57,2081
		Patte droite	0,1824 ± 0,0186		
EM	Lot 05 (EMFeMC 100mg/kg + carragénine)	Patte gauche	0,2026 ± 0,0194	19,2466	60,3629
		Patte droite	0,1699 ± 0,0181		
	Lot 06 (EMFeMN 100mg/kg + carragénine)	Patte gauche	0,2182 ± 0,0683	40,1455	17,3231
		Patte droite	0,1463 ± 0,0305		
	Lot 07 (EMFrMC 100mg /kg + carragénine)	Patte gauche	0,1605 ± 0,0113	19,6868	59,4564
		Patte droite	0,1341 ± 0,0072		
	Lot 08 (EMFrMN 100mg /kg + carragénine)	Patte gauche	0,2254 ± 0,0728	31,1991	35,7477
		Patte droite	0,1518 ± 0,0332		
EE	Lot 09 (EEFeMC 100mg /kg + carragénine)	Patte gauche	0,2408 ± 0,0227	20,3116	58,1697
		Patte droite	0,1669 ± 0,1639		
	Lot 10 (EEFeMN 100mg /kg + carragénine)	Patte gauche	0,2459 ± 0,0438	23,9615	50,6530
		Patte droite	0,1561 ± 0,0339		
	Lot 11 (EEFrMC 100mg /kg + carragénine)	Patte gauche	0,2110 ± 0,0138	20,4531	57,8783
		Patte droite	0,1545 ± 0,0157		
	Lot 12 (EEFrMN 100mg /kg + carragénine)	Patte gauche	0,2187 ± 0,0145	28,9864	40,3045
		Patte droite	0,1518 ± 0,0157		

- Effet anti-inflammatoire des HE

D'après les résultats obtenus (tableau 52), nous observons que, dans le lot témoin, la carraghénine entraîne une augmentation significative du poids moyen des pattes postérieures gauches ( $0,2368 \pm 0,0804$ ), par rapport à celui des pattes postérieures droites ( $0,1594 \pm 0,0364$ ).

Par voie orale, les HE des feuilles ont provoqué une baisse importante du pourcentage moyen de l'œdème des pattes, surtout pour l'HE des feuilles de *M. communis* à la dose de 100mg/kg, qui s'est avérée plus efficace que le produit de référence, en induisant une réduction de l'œdème aigu de 87,976%. Par contre, les HE extraites à partir des fruits, ont présenté de faibles pourcentages de réduction des œdèmes provoqués par l'injection de la carraghénine, par rapport à celui du produit de référence (figure 100).

Les quatre lots (01, 02, 03 et 04), traités par les HE, ont réagi plus rapidement et de façon plus importante au traitement, par rapport à ceux ayant reçu les extraits préparés à base des concrètes. Ceci est dû probablement à la rapidité et la facilité de diffusion des HE à travers la muqueuse digestive, en raison de la nature lipophile de leurs composants chimiques, et également à leur effet inhibiteur de la migration leucocytaire ce qui empêche la formation de l'œdème.

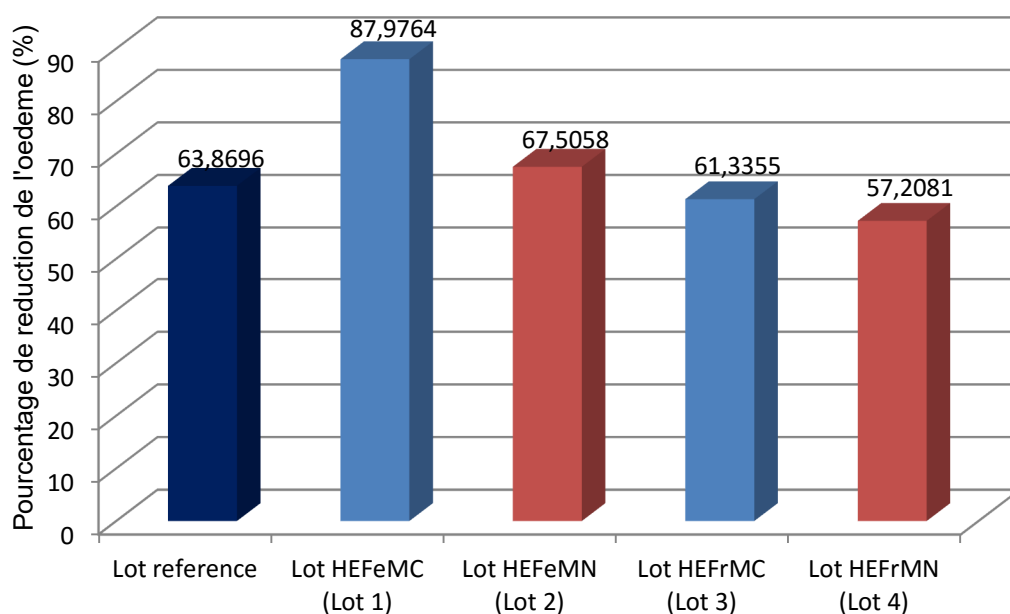


Figure 100: Evaluation des pourcentages de réduction de l'œdème par les HE testées.

On peut admettre que les HE des baies et des feuilles, des deux espèces étudiées, exercent un très bon effet anti-inflammatoire à visée préventive, puisqu'elles ont été administrées aux souris avant d'induire l'inflammation par la carraghénine, il est également fort probable que des doses plus élevées puissent empêcher complètement la formation de l'œdème et le déclenchement du processus inflammatoire.

Cependant, en Iraq, l'HE de la partie aérienne de *M communis* à la dose 44,4mg/kg, présente un pourcentage de réduction de 34,7%, contre l'œdème inflammatoire provoqué par la carraghénine à 1% (**Muhaned et al., 1989**).

**Jeane et al. (2003)** rapportent que, les HE de la partie aérienne d'*Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus tereticornis*, et *Eucalyptus globulus*, à la dose de 100mg/kg, présentent un pourcentage de réduction d'œdème aigu, induit par la carraghénine, chez les rats de souche *Wistar*, respectivement de: 70%, 80% et 76%.

D'après les résultats de la toxicité aiguë et de l'activité anti-inflammatoire obtenus, nous pouvons admettre que des espèces appartenant au même genre, botaniquement définie, synthétisent des métabolites biochimiquement différents en fonction du biotope dans lequel elles se développent, et présentent par conséquent, des activités thérapeutiques différentes, mais aussi des toxicités très variables. Cependant, la méconnaissance de cette notion capitale et le manque de précision laissent la porte ouverte aux échecs thérapeutiques et à la toxicité de certaines d'entre elles. En l'occurrence, ce test a permis de déceler une activité anti-inflammatoire des HE de ces deux espèces, validant les indications traditionnelles de ces plantes.

- Effet anti-inflammatoire des extraits

L'effet le plus rapide et le plus intense a été observé chez les lots traités par les extraits des fruits et des feuilles de *M. communis* (lots 05, 07, 09, et 11), comparé aux lots traités par les extraits de *M. nivellei* (lots 06, 08, 10 et 12), pour lesquels l'effet anti-inflammatoire ne s'est manifesté que de façon modérée (figure 101).

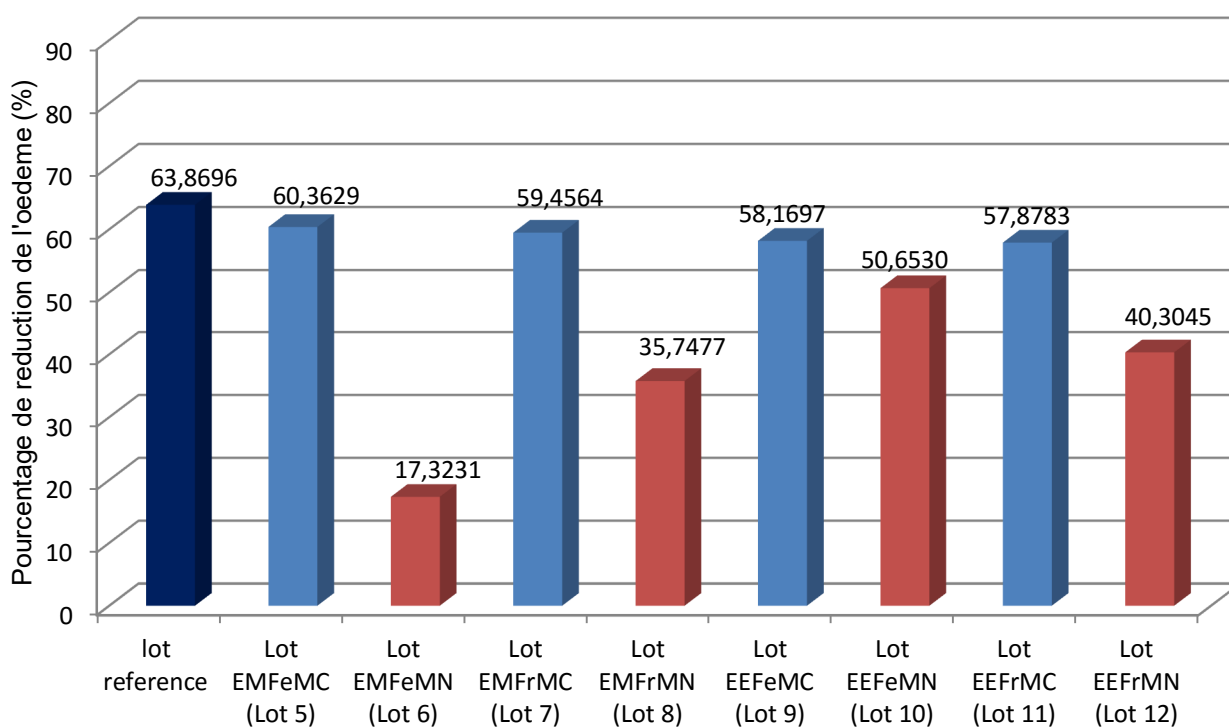


Figure 101: Evaluation du pourcentage de réduction de l'œdème par les extraits préparés à partir des concrètes

L'effet des extraits éthanoliques et aqueux, des parties aériennes de *M. communis* contre les processus inflammatoire, a été déjà démontré par les travaux de **Husseinzadah et al. (2011)**, qui ont induit l'inflammation par trois méthodes, en utilisant des inducteurs chimiques différents: test à la carraghénine, test au xylène, et le test à l'huile de croton, ils ont constaté que ces extraits exercent un excellent effet anti-inflammatoire, en réduisant la perméabilité membranaire des capillaires, ce qui inhibe de la libération des médiateurs de l'inflammation au cours du processus inflammatoire, cette hypothèse est également rapportée par **Vogel et Vogel (1997)**.

L'effet anti-inflammatoire exercé par les extraits, que nous avons étudié, semble être lié à la richesse de ces derniers en composés phénoliques, en l'occurrence : les flavonoïdes et les tanins (validés par le screening phytochimique et les dosages spectrophotométriques réalisés précédemment). L'effet anti-inflammatoires de ces deux métabolites a fait l'objet de nombreux travaux (**Picq et al., 1991; Mota et al., 1985 ; Da Silva et al., 1994; Galati et al., 1994; Read, 1995**).

Ces composés phénoliques sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (**Middleton, 1996**). Se sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T (**Mookerjee et al., 1986; Namgoong et al., 1994**). L'explication demeure encore mal-connue. Sous l'action de la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase, l'acide arachidonique se métabolise en prostaglandines, induisant ainsi des phénomènes inflammatoires. **Landolfi et al. (1984)** ont montré que certains composés phénoliques sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes. Ils ont même rapporté que les effets de la quercétine et la myricétine (Flavonoïdes) sont dose-dépendants. A de fortes concentrations, ils inhibent la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase. Cependant à de faibles concentrations, seule la lipo-oxygénase est affectée.

D'autre part, certains auteurs ont démontrés que les composés aromatiques, comme l'eucalyptol, l' $\alpha$ -pinène et le limonène, sont susceptibles d'exercer un bon effet anti-inflammatoire, chez les souris et les rats (**Santos et al., 2004**). Ces trois monoterpènes ont été inventoriés avec des teneurs remarquables dans les quatre HE que nous avons analysé ce qui justifie l'effet anti-inflammatoire obtenu.

L'effet irritant des extraits préparés à partir des concrètes sur la peau des lapins, peut s'expliquer par la présence de nombreux métabolites secondaires qui font partie de la fraction polaire de ces plantes, à savoir les phénols, les tanins, les coumarines et les flavonoïdes. Ces derniers expriment un excellent effet anti-inflammatoire suite à une administration orale, alors qu'ils peuvent exercer une action allergène suite à une application directe sur une peau lésée (**Yang et Kallio, 2003**).

Au niveau d'une plaie cutanée, la présence de tels composés favorise l'agrégation plaquettaire, qui provoque une vaso-constriction, Cette dernière se manifeste par une rougeur locale, donnant un signe d'érythème positif lors du test d'évaluation de l'IPC, à la base duquel nous avons qualifié ces substances comme étant légèrement irritantes ( $0,667 < IPC < 0,833$ ).



- Analyse de la variance

L'étude comparative entre les lots traités (par les HE/extraits) et le lot de référence, a été réalisée à l'aide du test ANOVA I (analyse de la variance à un seul facteur) (tableau 53)

Cette étude statistique consiste à comparer les résultats du facteur calculé ( $F_c$ ) des pattes gauches par rapport au facteur théorique ( $F_t$ ) de la table de Fisher-snedecor, pour le risque  $\alpha = 5\%$ . On admet l'hypothèse nulle ( $H_0$ ) suivante :

$H_0$  : l'HE/extrait testé et le produit de référence exercent un effet anti-inflammatoire similaire.

A l'instar de ces résultats (tableau 53), nous avons trouvé que la valeur du F calculé est inférieure au F théorique ( $F_c < F_t$ ), donc l'hypothèse  $H_0$  est retenue (pas de différence entre l'effet de l'acide acétylsalicylique et l'HE/extrait testé des feuilles/baies), ainsi nous pouvons admettre que les HE ainsi que les extraits (des feuilles et des baies) exercent une action anti-inflammatoire comparable à celle du produit de référence, mais qui se montrent encore plus efficace pour les HE.

On suppose que ces résultats sont liés à la richesse de ces extraits en composés phénoliques qui sont connus pour leurs effets anti-inflammatoires, d'autant plus que la présence simultanée de plusieurs métabolites secondaires naturels chez ces deux espèces, peut les rendre plus performantes que les anti-inflammatoires de synthèse largement utilisés en thérapeutique. De plus, la consommation de produits riches en polyphénols naturels, semble avoir un effet curatif, voir même prophylactique, contre les inflammations (**Bidet et al., 1987**)

Tableau 53 : Analyse de variance (comparaison lots traités/lot référence)

SCE : somme des carrés des écarts, DNS : différence non significative

	Source des variations		SCE	F calculé	F théorique	Signification	
Huiles essentielles	FeMC/référence	Intergroupe (factorielle)	0,00452	0,04	4,96	DNS	
		Intragroupe (résiduelle)	0,113				
	FeMC/référence	Intergroupe (factorielle)	0,4412	0,98	4,96	DNS	
		Intragroupe (résiduelle)	0,4502				
	FeMC/référence	Intergroupe (factorielle)	0,0001	0,016	4,96	DNS	
		Intragroupe (résiduelle)	0,0063				
	FeMC/référence	Intergroupe (factorielle)	0,0156	3,12	4,96	DNS	
		Intragroupe (résiduelle)	0,005				
	Extraits méthanoliques	FeMC/référence	Intergroupe (factorielle)	0,00556	0,094	4,96	DNS
			Intragroupe (résiduelle)	0,05914			
FeMC/référence		Intergroupe (factorielle)	0,005252	2,02	4,96	DNS	
		Intragroupe (résiduelle)	0,0026				
FrMC/référence		Intergroupe (factorielle)	0,00027	0,4	4,96	DNS	
		Intragroupe (résiduelle)	0,0067				
FrMC/référence		Intergroupe (factorielle)	0,0582	0,75	4,96	DNS	
		Intragroupe (résiduelle)	0,0776				
Extraits éthanoliques		FeMC/référence	Intergroupe (factorielle)	0,0602	2,35	4,96	DNS
			Intragroupe (résiduelle)	0,0256			
	FeMC/référence	Intergroupe (factorielle)	0,0516	3,56	4,96	DNS	
		Intragroupe (résiduelle)	0,0145				
	FeMC/référence	Intergroupe (factorielle)	0,2622	3,10	4,96	DNS	
		Intragroupe (résiduelle)	0,0846				
	FeMC/référence	Intergroupe (factorielle)	0,0045	2,26	4,96	DNS	
		Intragroupe (résiduelle)	0,0019				

### III.3.4.3. Evaluation de l'effet cicatrisant

A la lumière des résultats obtenus lors de l'évaluation de l'indice d'irritation primaire cutané (IPC), au terme duquel nous avons déduit que les extraits préparés à base des concrètes, avaient présenté des signes variables d'œdèmes et/ou d'érythèmes, témoignant de leur caractère légèrement irritant, nous nous sommes intéressées uniquement à l'évaluation de l'effet cicatrisant des HE, extraites à partir des feuilles et celles extraites à partir des baies des deux espèces étudiées. Chacun de ces principes actifs ont été incorporés dans une émulsion adaptée à l'application topique.

#### III.3.4.3.1. Préparation et contrôle physico-chimique des crèmes

La formulation des crèmes dermiques (Figure 102), à base des HE étudiées (0,3%) a été accomplie, en respectant le protocole décrit dans le formulaire thérapeutique magistral (**Fonteneau et klusiewicz, 2008**) auquel quelques modifications ont été apportées.

Lors de la formulation de ces crèmes, nous avons opté pour la mise en évidence d'une émulsion hydrophobe, à texture légère, afin qu'elle puisse être appliquée facilement et absorbée rapidement par la peau.

- Détermination des caractères organoleptiques

Chacune des quatre crèmes formulées (C1, C2, C3 et C4) se présente sous forme d'une émulsion de couleur blanche, avec un aspect lisse et brillant. Ces préparations topiques ont une texture veloutée, et s'étalent facilement sur la surface de la peau.



Figure 102: Aspect de l'une des crèmes dermiques formulées (0,3 %).

- Contrôle de l'homogénéité :

L'observation de la granulométrie des quatre crèmes au microscope photonique, a révélé la présence d'un aspect homogène de particules qui ont présenté des formes sphériques, dont la taille avoisine 8 $\mu$ m de diamètre (figure 103).

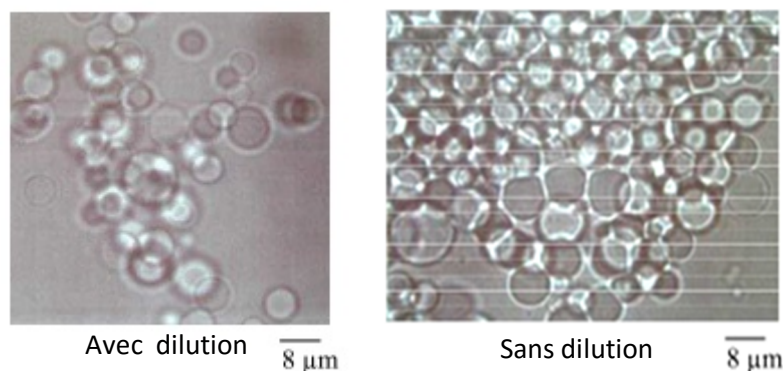


Figure 103: Aspect granulométrique de l'une des crèmes formulées.

- Contrôle de la stabilité et vieillissement accéléré

La centrifugation d'un échantillon de chaque crème formulée (ou émulsion), à vitesse constante (4500 tours/mn), n'a révélé aucun signe de coalescence ou de déphasage. Ce qui nous permet de valider leur stabilité.

L'exposition d'une quantité de 5g de chaque émulsion, à l'air pendant une semaine, n'a manifesté aucun changement de l'aspect, de la couleur ou de la texture des crèmes. La lumière du jour ainsi que la température ambiante ne semblent exercer aucune action perturbant l'homogénéité et la texture des crèmes formulées.

On suppose que la stabilité d'une crème dépend de plusieurs paramètres dont :

- Le respect des consignes de formulation (succession d'étapes, proportions).
- Le choix d'excipients de bonne qualité.
- L'usage d'un conservateur.
- L'hygiène de la plateforme de travail.

- Contrôle des caractères physico-chimiques

D'après les résultats obtenus pour les crèmes formulées (tableau 54), nous constatons que la viscosité fluctue entre 730000 et 750000 m.pa.s (millipascal seconde). Il n'y a pas de différence significative entre les valeurs de pH des crèmes C1, C3 et C4. Cependant, la crème C2 a présenté un pH légèrement plus bas par rapport aux autres. On suppose que cela revient probablement à la composition propre de l'HE des feuilles de *M. nivellei*. La gamme de pH des préparations est ajustée aux alentours de pH 7, à l'aide du triethanolamine (ajustateur de pH).

Tableau 54 : Paramètres physico-chimiques des crèmes formulées

Les paramètres	Crème C1 (HEFeMC)	Crème C2 (HEFeMN)	Crème C3 (HEFrMC)	Crème C4 (HEFrMN)
pH	5,46*	5,31	5,44*	5,5*
La viscosité à 27C° (mpa.s)	730000	725000	736000	750000

\* Pas de différence significative pour  $p < 0,05\%$

### III.3.4.3.2. Contrôle microbiologique des crèmes préparées

L'analyse microbiologique a révélé un taux de contamination bactérienne et fongique nulle, et a permis aussi de démontrer l'absence totale de germes pathogènes (tableau 55).

Au vu des normes en vigueur (**Pharmacopée européenne, 2005**), les lots des crèmes analysés sont exempts de toutes contaminations microbiennes. Ils sont ainsi déclarés conformes. L'innocuité de ces crèmes en germes contaminants, peut être due à la protection assurée par le conservateur utilisé (Vitamine C), bien que sa teneur est très faible. Cela nous amène à supposer un éventuel effet anti-microbien exercé par les HE elles-mêmes. Plusieurs HE avaient fait preuve d'un excellent effet conservateur (**Touaibia, 2015 ; Sallé, 1991 ; Kim et al., 1995 ; Mejholm & Dalgaard, 2002 ; Mahadevan, 1982**).

Tableau 55 : Résultats de l'analyse microbiologique des crèmes

	Normes UFC/ml				Résultats de la crème UFC/ml			
	Crème C1	Crème C2	Crème C3	Crème C4	Crème C1	Crème C2	Crème C3	Crème C4
Germes aérobies viables totaux	≤ 200				0			
Levures et moisissures	≤ 20				0			

### III.3.4.3.3. Test de cicatrisation

L'évaluation de la cicatrisation d'une plaie incisionnelle en spot, repose sur deux points primordiaux:

- ✓ Le calcul des superficies des plaies à l'aide de logiciel AutoCAD 2010.
- ✓ Le calcul du pourcentage de réduction des superficies des plaies traitées par le placebo (E1), le produit de référence Madécassol® (E2), la crème à base de l'HE des feuilles de *M. communis* (C1), la crème à base de l'HE des feuilles de *M. nivellei* (C2), la crème à base de l'HE des fruits de *M. communis* (C3), et la crème à base de l'HE des fruits de *M. nivellei* (C4)

#### - Evolution des superficies des plaies traitées/non traitées

Les empreintes des plaies traitées et témoins, pour chaque rat, ont été scannées, puis intégrées dans le logiciel AutoCAD 2010, pour le calcul des surfaces correspondantes pour chaque lot [lot placebo (E1), lot référence (E2) et les lots traitées par les crèmes (C1, C2, C3, C4)]. Les résultats sont exprimés en surface moyenne ± écart type (tableau 56).

Tableau 56: Evolution des superficies des plaies traitées/non traitées pour les 6 lots testés

	Surface des plaies (cm <sup>2</sup> ) (moyenne±δ)	J <sub>0</sub>	J <sub>3</sub>	J <sub>7</sub>	J <sub>9</sub>
Lot E1 placebo	Surface de la plaie traitée	1,66±0,240	1,26±0,140	0,53±0,036	0,40±0,027
	Surface de la plaie témoin	1,66±0,459	1,39±0,250	0,68± 0,080	0,55±0,04
Lot E2 référence	Surface de la plaie traitée	1,64±0,272	0,75±0,17	0,19±0,042	0,03±0,034
	Surface de la plaie témoin	1,62±0,550	1,34±0,223	0,66±0,070	0,55±0,048
Lot C1 (crème à base de HEFeMC)	Surface de la plaie traitée	1,69±0,178	0,76±0,08	0,24±0,071	0,06±0,063
	Surface de la plaie témoin	1,73±0,252	1,53±0,161	0,74±0,137	0,52±0,096
Lot C2 (crème à base de HEFeMN)	Surface de la plaie traitée	1,66±0,132	0,8±0,245	0,3±0,201	0,08±0,746
	Surface de la plaie témoin	1,7±0,665	1,61±0,750	0,7±0,032	0,5±0,426
Lot C3 (crème à base de HEFrMC)	Surface de la plaie traitée	1,7±0,067	1,3±0,411	0,56±0,789	0,45±0,015
	Surface de la plaie témoin	1,66±0,998	1,5±0,013	0,7±0,628	0,55±0,098
Lot C4 (crème à base de HEFrMN)	Surface de la plaie traitée	1,6±0,985	1,32±0,148	0,5±0,669	0,44±0,198
	Surface de la plaie témoin	1,62±0,233	1,55±0,954	0,6±0,334	0,52±0,014

δ: écart-type

On remarque que pour le placebo (figure 104), la cicatrisation n'est que partielle, au terme du 9<sup>ème</sup> jour. Cependant, il n'y a pas de différence significative entre la réduction de la superficie moyenne des plaies témoins, et celles traitées avec le placebo (crème exempte de PA). Toutefois, une légère réduction de la taille des spots et remarquée avec le placebo, on suppose que cela est lié au processus cicatriciel naturel du corps de l'animal.

La cicatrisation est progressive, aussi bien en ce qui concerne le lot référence (figure 105) traité par le Madécassol® (E2), ainsi que pour les lots traités par les crèmes à base des HE des feuilles (C1 et C2). 24 heures après la première application, les parois des plaies commençaient à adhérer, alors que les plaies témoins n'adhèrent qu'à partir du 3<sup>ème</sup> jour. Entre le 3<sup>ème</sup> et le 7<sup>ème</sup> jour, nous avons observé une très bonne cicatrisation dans le lot référence ainsi que les lots traitées par les crèmes formulées, à base des HE extraites à partir des feuilles (figures 106 et 107).

Les lots traités par les crèmes formulées avec les HE des baies (C3 et C4), ont présenté un comportement similaire à celui du lot placebo (E1), ainsi nous pouvons admettre que les HE des baies incorporées dans les crèmes (figures 108 et 109) n'exercent aucune action cicatrisante (pas de différence significative entre les lots E1, C3 et C4). Cela revient probablement à la présence de très faibles teneurs en Géraniol et en  $\alpha$ -terpinéol dans les HE de ces baies, auxquels on attribue la fonction de réparation cutanée (**Martini, 2006**). Cependant, puisque ces deux HE (HEFrMC et HEFrMN) sont particulièrement riches en limonène et en Eucalyptol, nous pourrions supposer que ces dernières exerceront un très bon effet antiseptique local sur les plaies traitées, ce qui les épargnerait de tout risque de sur-infections susceptibles de ralentir le processus de cicatrisation classique. Or, aucune sur-infection des incisions n'a été observée au cours de la période de traitement.

Ces expérimentations confirment le rôle spécifique de la fraction aromatique des feuilles sur la régénération du tissu cutané. Ces nouvelles propriétés pharmacologiques permettent de faire de ces HE, d'authentiques médicaments.

Sur le plan cellulaire, cette activité curative est liée à la suppression de l'adhérence de la réponse des neutrophiles *in vitro*. Ainsi, l'application cutanée supprime l'inflammation cellulaire et l'accumulation des neutrophiles dans ces sites (**Maruyama et al., 2005**)

La cicatrisation des plaies est un processus qui se déroule en plusieurs phases : l'hémostase, l'inflammation, la prolifération et le remodelage ou la maturation (**Charles et al., 1995**).

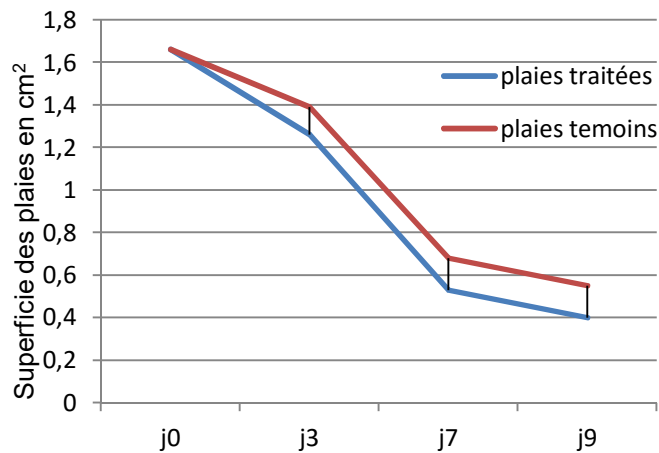


Figure 104 : Courbe représentant l'évolution des moyennes des superficies des plaies traitées /non traitées par le placebo (E1)

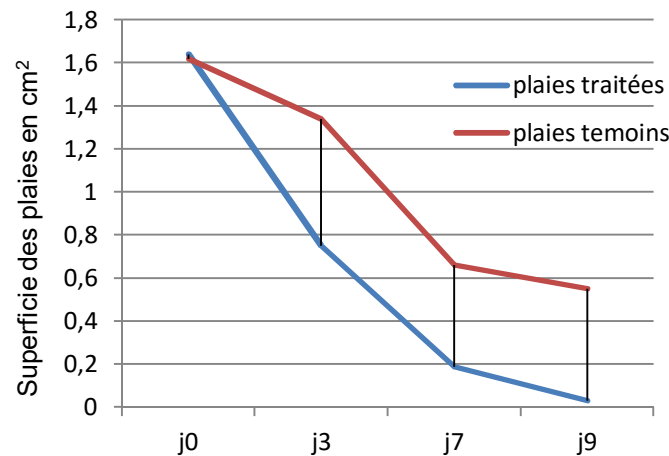


Figure 105 : Courbe représentant l'évolution des moyennes des superficies des plaies traitées /non traitées par la crème de référence Madecassol® (E2)

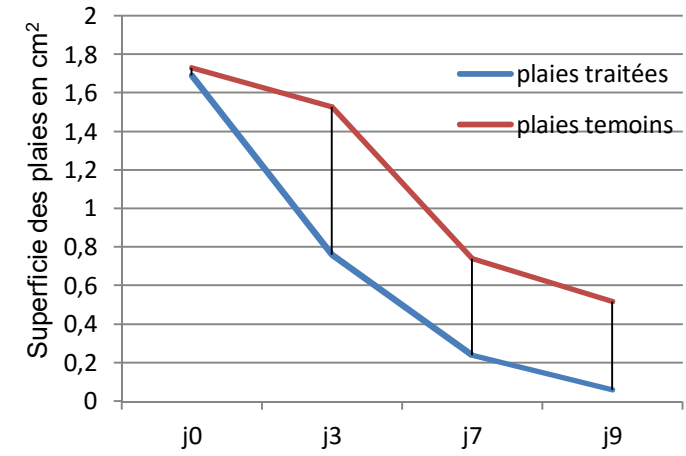


Figure 106 : Courbe représentant l'évolution des moyennes des superficies des plaies traitées /non traitées par la crème à base de l'HE des feuilles de *M. communis* (C1)

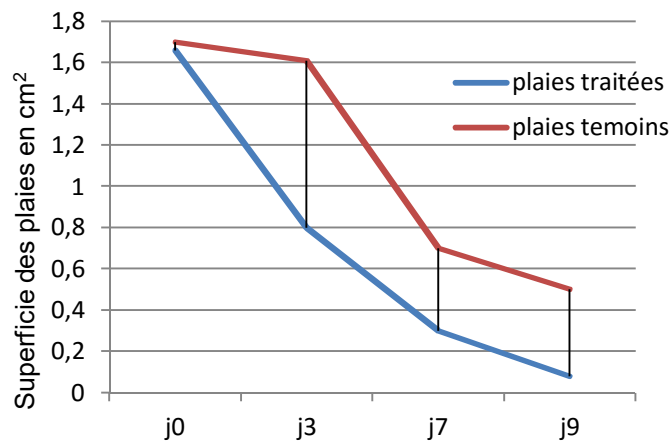


Figure 107 : Courbe représentant l'évolution des moyennes des superficies des plaies traitées /non traitées par la crème à base de l'HE des feuilles de *M. nivellei* (C2)

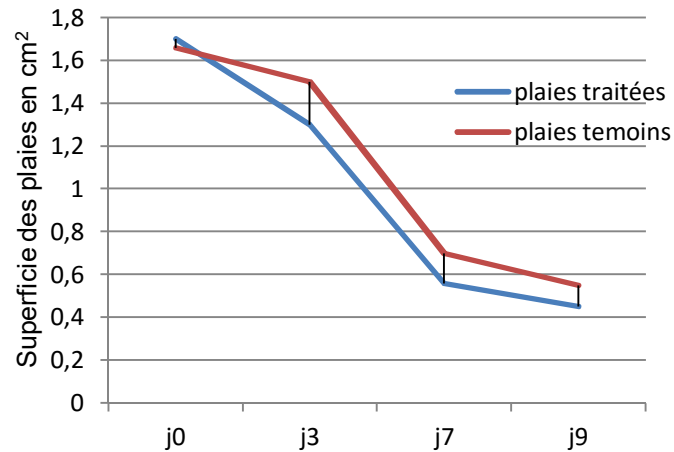


Figure 108 : Courbe représentant l'évolution des moyenne des superficies des plaies traitées /non traitées par la crème à base de l'HE des fruits de *M. communis* (C3)

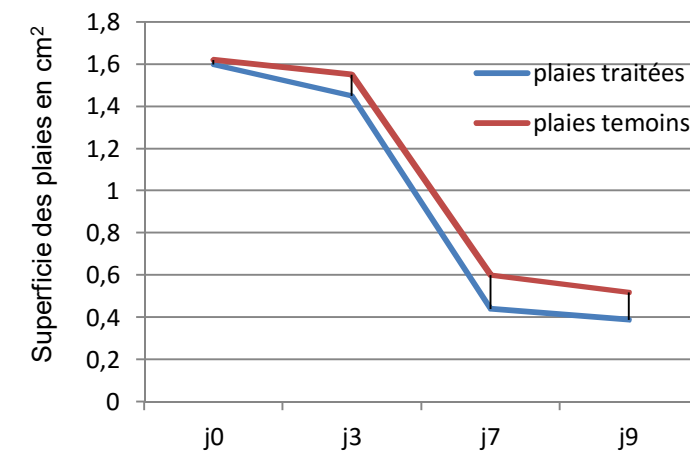


Figure 109 : Courbe représentant l'évolution des moyenne des superficies des plaies traitées /non traitées par la crème à base de l'HE des fruits de *M. nivellei* (C4)



Par conséquent, dans la présente étude, les plaies en spots pratiqués dans la partie dorso-lombaire des animaux traités avec les crèmes formulées à base des HE, ont présenté une bonne cicatrisation par rapport aux plaies témoins et aux plaies traitées par le placebo (de la figure 104 jusqu'à la figure 109).

D'après **Moyer et al. (2002)** rapportent que les HE peuvent provoquer une stimulation de l'interleukine-8 : une chimiokine qui affecte la fonction et le recrutement de différents lymphocytes dans les cellules inflammatoires, les fibroblastes et les kératinocytes, ce qui augmente la communication au niveau des jonctions intercellulaires en culture des fibroblastes et induit une maturation plus rapide du tissu de granulation. D'autre part, **Bayliss (1984)** rapporte que l'interleukine 8 répare les dommages occasionnés par les radicaux libres cytotoxique, résultant du processus inflammatoire, ce qui stimule la cicatrisation des plaies.

**Arunachalam et Parimelazhagan (2013)** ont rapporté que le processus de cicatrisation des plaies en spot, traitées par *Ficus amplissima*, augmente la prolifération cellulaire et la synthèse de collagène dans la plaie, associé a une augmentation des protéines de liaison, qui apportent une visco-élasticité remarquable et des propriétés régénératrices au tissu dermique.

Ainsi l'usage de biomolécules à effet anti-oxydant pourrait être une stratégie importante dans la guérison des plaies (**Dissemond et al., 2002 ; Gupta et al., 2002**).

Bien que de nombreuses tentatives aient été faites pour identifier des biomarqueurs pronostiques de la cicatrisation de la peau, ceux-ci ont rencontré un succès limité. En l'occurrence, ce test reste préliminaire, et plusieurs tests de tolérance locale après application cutanée itérative doivent être particulièrement évalués, pour la mise en évidence de tout éventuel effet allergène, suite à une application prolongée. Des contrôles histologiques et des recherches sur la possibilité de sensibilisation doivent être également envisagés.

- Etude du pourcentage de réduction des superficies des plaies

Au terme de la période d'expérimentation, nous avons calculé les pourcentages de réduction des surfaces des plaies traitées par le placebo, la référence et par les crèmes formulées à base des HE étudiées (C1, C2, C3, C4).

Suite à l'analyses des résultats (figure 110), on constate que les rats traités par le produit de référence Madecassol<sup>®</sup>, expriment un pourcentage de réduction (98,17%) très proche de celui observé chez les rats traités par la crème C1 (à base de l'HE des feuilles de *M communis* (96,45%). La crème C2 (à base de l'HE des feuilles de *M. nivellei*) a présenté également un très bon pourcentage de réduction (95,18%). Ces pourcentages de réduction restent toutefois, meilleurs que celui du lot traité par le placebo E1 (75,90%) ainsi que les crèmes formulées à base des HE des fruits de ces deux espèces.

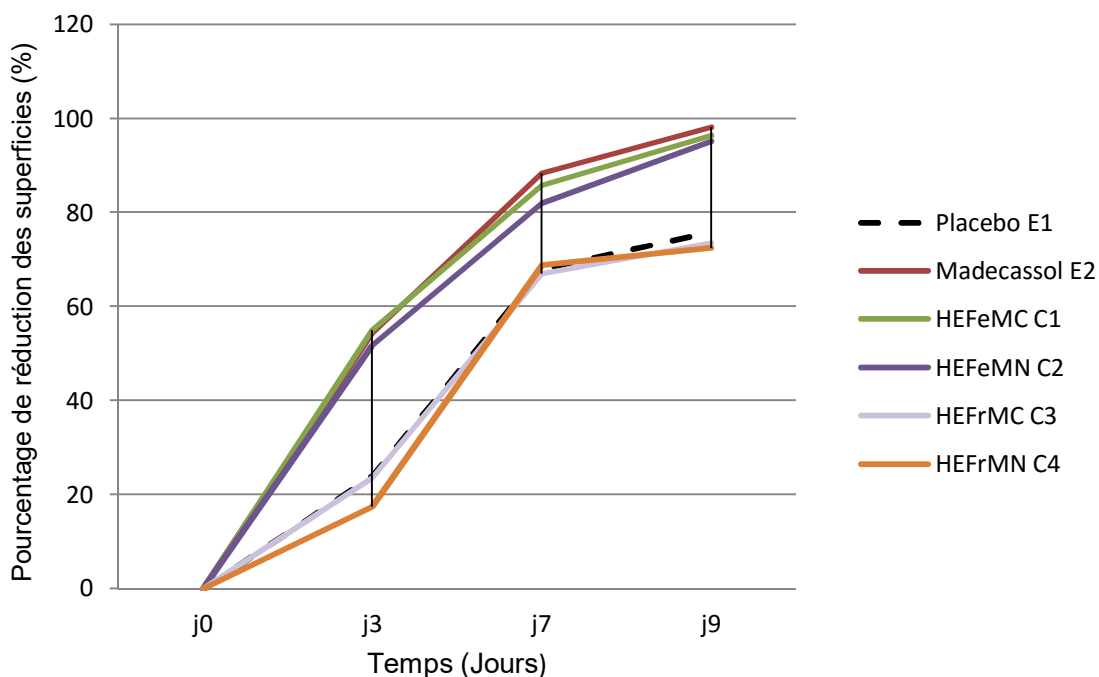


Figure 110: Courbe représentant le pourcentage de réduction des surfaces des plaies traitées chez les lots E1, E2, C1, C2, C3 et C4

En médecine traditionnelle, le myrte est connue comme anti-inflammatoire et anti-septique pour les blessures (**Baba-Aissa, 2000**), et puisque l'inflammation est considérée comme étant la première phase de la cicatrisation, donc l'incorporation de l'HE dans la formulation de la crème dermique, a permis d'une part la protection des tissus et d'autre part, la disparition rapide de l'inflammation et l'accélération de la vitesse de guérison des incisions. On suppose que cet effet est attribué à la richesse de ces HE en composés terpéniques, particulièrement en monoterpènes (Eucalyptol, limonènes et  $\alpha$ -pinène), qui sont connus pour leurs effet régénérateur des peaux et des muqueuses.

- Relation Effet anti-inflammatoire /effet cicatrisant des HE

Nous avons remarqué qu'il y a une relation étroite entre le pourcentage de réduction de l'œdème inflammatoire, induit par l'injection de l'agent phlogistique, dans la patte postérieure gauche de l'animal, et le pourcentage de réduction de la superficie des plaies en spots (figure 111).

Bien que la première expérience apporte une preuve sur l'effet protecteur des HE administrés par voie orale contre l'inflammation ; alors que la seconde expérience démontre l'effet curatif induit par l'application topique des crèmes formulées à base des HE, contre l'inflammation cutanée, qui se développe suite à la réalisation de l'incision en spot. Néanmoins, le processus inflammatoire affectant la peau reste le même (ce dernier a été détaillé précédemment, lors de la présentation des résultats de l'effet anti-inflammatoire).

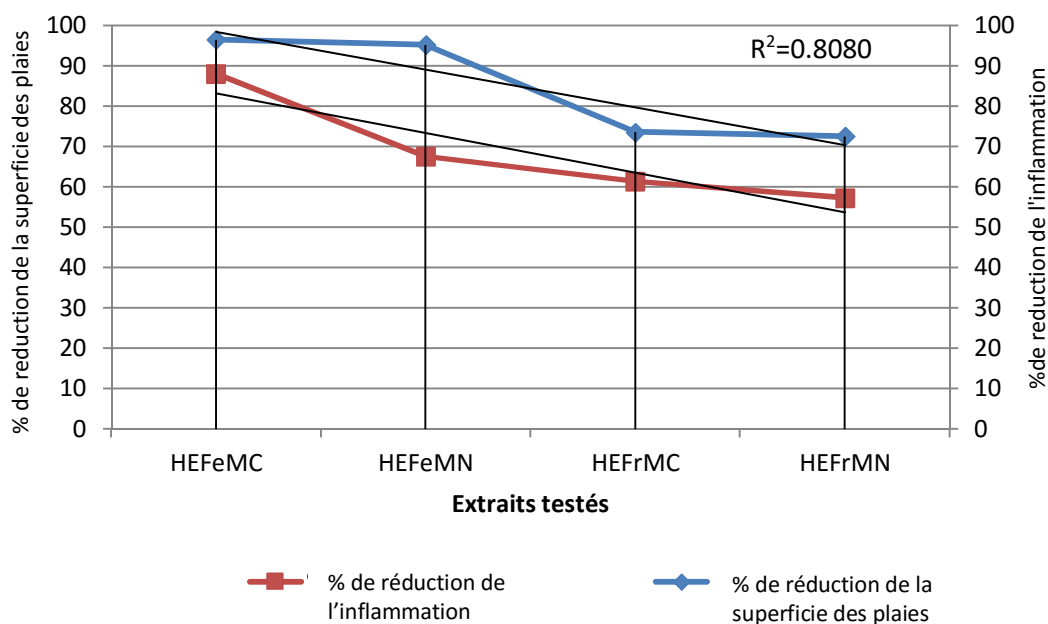


Figure 111 : Relation entre l'effet anti-inflammatoire et l'effet cicatrisant

#### III.3.4.4. Evaluation du pouvoir anti-microbien

##### III.3.4.4.1. Résultats du test préliminaire

Pour évaluer l'activité anti-microbienne des extraits, il fallait s'assurer de la non toxicité des solvants utilisés pour les dissoudre, car même à l'état de traces, un solvant ne devrait pas s'opposer à la croissance normale des souches microbiennes.

Nous avons constaté que le myristate d'isopropyle ne provoque aucune zone d'inhibition autour du disque. En revanche avec l'éthanol absolu et le méthanol, une inhibition de croissance est observée autour du disque. A la lumière de ces résultats, l'utilisation du myristate d'isopropyle est préférée, pour dissoudre les extraits secs plutôt que l'éthanol et le méthanol, qui exercent un effet bactéricide (figure 112).

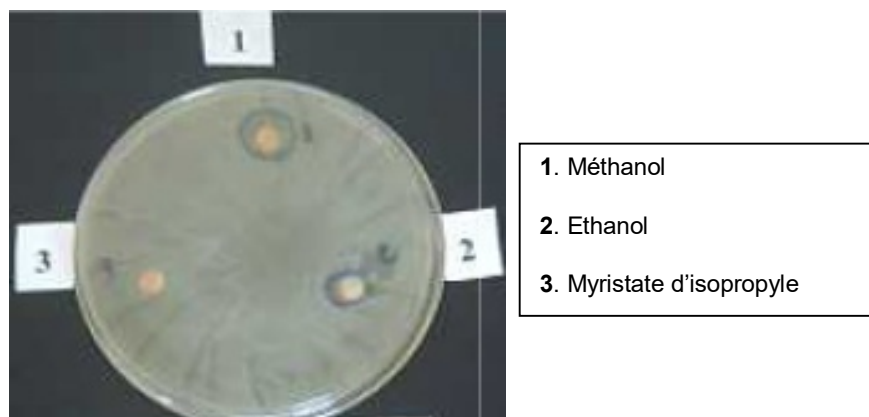


Figure 112 : Effet des trois solvants sélectionnés sur la croissance bactérienne

Nous avons remarqué que les champignons se sont montrés sensibles vis-à-vis de la nystatine, à l'exception du genre *Fusarium* qui a présenté une nette résistance (tableau 57). Pour la souche *Penicillium sp*, une zone moyenne d'inhibition de 22mm a été obtenue sous l'action de la nystatine. Cependant, *C. albicans*, *C. krusei* et *Alternaria sp* ont montré une sensibilité moins importante, avec des zones d'inhibition allant de 10 à 14mm.

Tableau 57: Effets de la nystatine sur les souches fongiques utilisées

Souche	Dose	Diamètre de l'auréole d'inhibition (mm)
<i>Candida albicans</i>	50 µg/disque	14
<i>Candida Krusei</i>		11
<i>Alternaria sp</i>		10
<i>Fusarium oxysporum ssp albidinis</i>		-
<i>Fusarium oxysporum ssp lycopersici</i>		-
<i>Penicillium sp</i>		22

L'amoxicilline a un effet remarquablement positif sur les bactéries testées, avec des zones d'inhibitions variables. Cependant, deux souches bactériennes ont présenté une nette résistance vis-à-vis de cet antibiotique: *Shigella flexineri* et *Acinetobacter Iwoffii* (tableau 58).

Tableau 58 : Effets de l'Amoxicilline sur les souches bactériennes utilisées.

Souches bactériennes utilisées	Dose	Diamètre de l'auréole d'inhibition (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	50 µg/disque	11
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		7
<i>Moraxella catarrhalis</i>		14
<i>Bacillus cereus</i>		16
<i>Acinetobacter Iwoffii</i>		-
<i>Enterobacter aerogenes</i>		18
<i>Escherichia coli</i>		14
<i>Salmonella typhimurium</i>		17
<i>Shigella flexineri</i>		-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		20
<i>Proteus mirabilis</i>		28
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		13
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		22
<i>Enterococcus faecalis</i>		18

#### III.3.4.4.2. Résultat de l'activité anti-microbienne

La méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé a été choisie pour déterminer l'activité anti-microbienne des HE ainsi que les extraits testés, des deux espèces : *M. communis* et *M. nivellei*.

Néanmoins, cette action est effective mais à différents degrés (**Appendice O**). Le diamètre de la zone d'inhibition des cultures microbiennes est exprimé en millimètre (il est à signaler que le diamètre du disque est inclus dans la mesure de la zone d'inhibition). Cette sensibilité est sous la dépendance de la composition chimique en métabolites bioactifs typiques de chaque extrait et chaque HE.

- Les huiles essentielles

Les souches: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. coli*, *S. typhi* et *S. flexineri* ont présenté des zones d'inhibition supérieures à 20mm, témoignant de leur très forte sensibilité vis-à-vis des HEFeMC et HEFeMN (figure 113).

Cependant, ces essences se sont avérées moyennement actives sur les souches bactériennes et fongiques restantes, en exprimant des zones d'inhibition allant de 10 à 14mm de diamètre. La souche bactérienne *E. coli* s'est avérée la plus sensible vis-à-vis de l'HE extraite à partir des feuilles de *M. communis* (HEFeMC), en exprimant une zone d'inhibition de l'ordre de 38mm (figure 113).

Le test réalisé avec l'HE des feuilles de *M. nivellei* (HEFeMN) a révélé une très forte sensibilité de *S. epidermidis*, où nous avons noté une zone d'inhibition de 34mm. Néanmoins, cette souche s'est montrée extrêmement sensibles à toutes les HE testées (figure 113).

Nos résultats concordent avec ceux de **Delarentis et al. (2005)** ainsi que ceux de **Yadegarinia et al. (2006)**, qui parlent d'une très bonne activité anti-microbienne de l'HE de *M. communis* contre: *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis* et *S. flexineri*. Cette activité peut être due à la richesse de cette HE en:  $\alpha$ -pinène, en limonène, en eucalyptol et en  $\alpha$ -terpinéol (**Rasooli et al., 2002 ; Satrani et al., 2001**).

L'action de l'HE des feuilles de *M. communis* (HEFeMC) sur *C. albicans* et *Alternaria sp* est remarquable, où la valeur moyenne de l'auréole d'inhibition a été de 21,33 et 20mm respectivement. Des zones d'inhibitions modérées (< 15 mm) ont été enregistrées avec *F. oxysporum ssp albidinis*, *F. oxysporum ssp lycopersici* et *Penicillium sp*. Des résultats similaires ont été rapportés par **Dominiguez et Ortega (1983)**.

L'HE des feuilles de l'espèce saharienne (HEFeMN) a montré une bonne activité inhibitrice de la croissance de la souche *P. aeruginosa* avec un auréole de  $15,33 \pm 1,65$ mm par rapport à *M. communis*. qui n'a pas dépassé 12mm. Mais ce résultat s'avère moins important par rapport à celui du contrôle positif (23mm).

Les souches phytopathogènes *F. oxysporum ssp lycopersici* et *Penicillium sp* se sont montrés résistants à l'égard des HE testées à l'exception de l'HE des feuilles de *M. communis* (HEFeMC), où nous avons enregistré des zones d'inhibition de 14 et 13mm respectivement (figure 113).

Les HE extraites à partir des fruits, ont présenté également un effet inhibiteur de la croissance de quelques micro-organismes testés, surtout contre les agents responsables d'infections de la sphère respiratoire (*S. pneumoniae*, *K. pneumoniae*), digestive (*S. typhi*, *S. flexneri*) et cutanée (*S. epidermidis*). Cependant, les HE extraites à partir des feuilles, restent toutefois, plus actives que celles des fruits.

Les HE ont un très large spectre d'inhibition, comprenant des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (**Remmal et al., 1993**), des champignons (**Maudsley et Kerr, 1999**), aussi bien que des virus à ADN et à ARN (**Siddiqui et al., 1996**). L'effet synergique des composés aromatiques, contenus dans l'HE du myrte, sont les principaux responsables de cette activité:  $\alpha$ -pinène, limonène, eucalyptol et terpinéol (**Ultee et al., 2000**), leur mécanisme d'action n'est pas clairement élucidé, il semble qu'elles fragilisent les membranes des micro-organismes, ce qui facilite leur lyse et la perte des métabolites intracellulaires (**Juven et al., 1994; Gustafson et al., 1998; Ultee et al., 1999; Cowan, 1999; Cox et al., 2000; Lambert et al., 2001; Oussalah et al., 2006**). Certains auteurs ont rapporté que les HE peuvent provoquer la coagulation du cytoplasme (**Gustafson et al., 1998**), comme ils peuvent endommager les lipides et les protéines membranaires (**Ultee et al., 2002; Burt, 2004**).

L'action anti-fongique des HE 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 (**Mann et al., 2000**). En effet, les composés terpéniques des HE et plus précisément leurs groupements fonctionnels, tels que les phénols et les aldéhydes, réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique des levures (**Giordani et Kaloustian, 2006**).

Selon **Dominiguez et Ortega (1983)**, l'HE extraite à partir des graines de *M. communis* possède une action inhibitrice de la croissance des souches *Alternaria sp*, *Penicilium sp* et *Fusarium sp*.

Selon **Ultee (2000)**, les HE sont considérées comme un moyen de défense endogène, adopté par les plantes qui, en les produisant, cherchent à se prémunir contre les infections et les insectes phytophages.

Dans ce même contexte, **Akin et al. (2010)** ont étudié l'effet anti-bactérien de l'HE de *M. communis*, ils ont conclu que cette plante présente un avenir prometteur en tant que substance anti-septique.

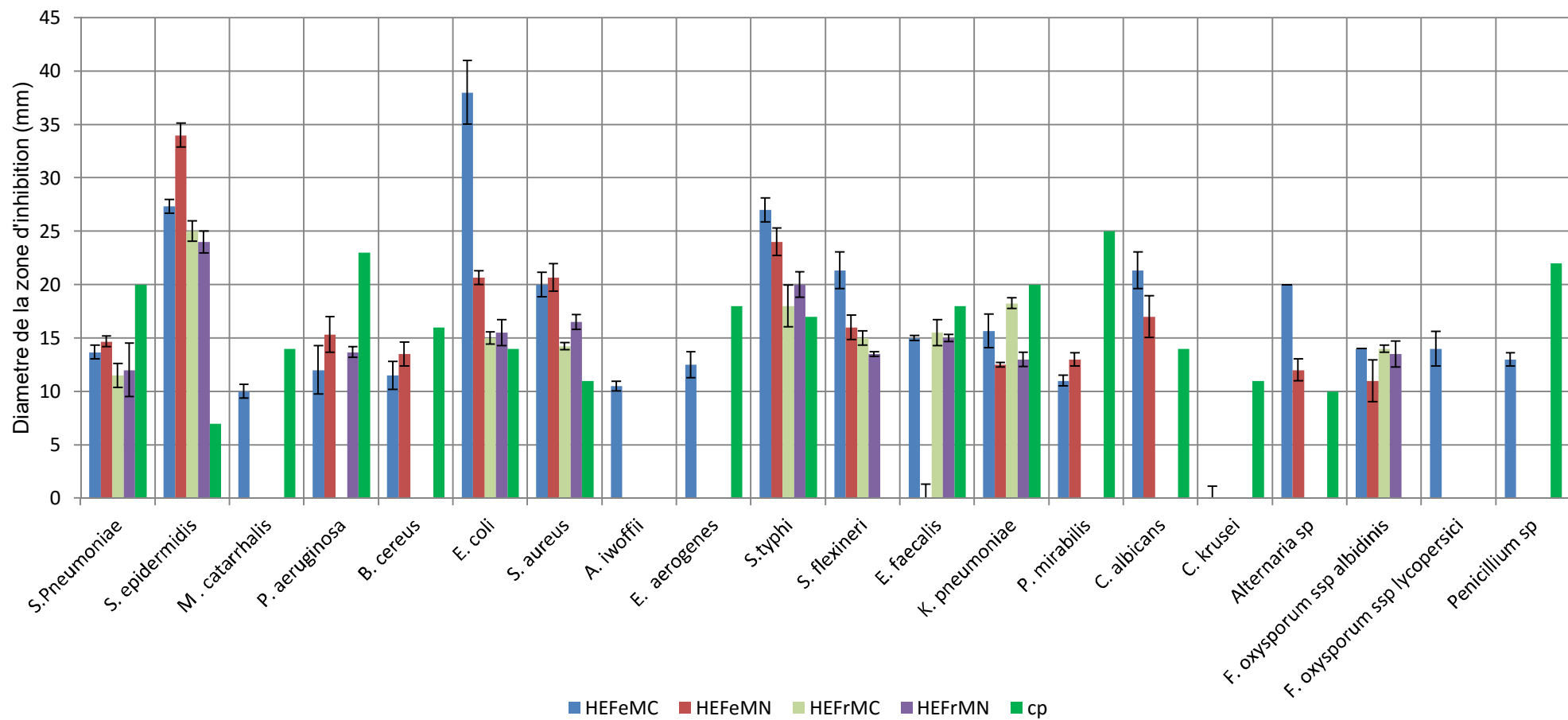


Figure 113: Activité des huiles essentielles de *M. communis* et *M. nivellei* sur la croissance des différentes souches étudiées (exprimée en diamètre de la zone d'inhibition)

- Les extraits préparés à partir des concrètes méthanoliques (EM)

Nous constatons que les extraits méthanoliques des feuilles (EMFeMC et EMFeMN) et ceux des fruits (EMFrMC et EMFrMN) présentent des actions anti-microbiennes à des degrés différents (figure 114).

Les souches: *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. flexineri*, *S. typhi*, *E. coli* et *C. albicans* ont toutes montré une nette sensibilité à l'égard des extraits méthanoliques des feuilles de *M. communis* et *M. nivellei*, avec des zones d'inhibition très proches (entre 15 et 19 mm). Cependant, les extraits méthanoliques des fruits de ces deux plantes se sont avérés inactifs à l'égard de *Candida krusei* ainsi que six souches bactériennes Gram négatif : *M. catarrhalis*, *B. cereus*, *A. iwoffii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* et *P. mirabilis* (figure 114).

De nombreux travaux ont démontré l'effet des extraits méthanoliques du Myrte sur de nombreuses bactéries, cet effet anti-bactérien significatif est attribué particulièrement aux phloroglucinols (**Kashman et al., 1974 ; Appendino et al., 2002**) et à leur richesse en polyphénols (**Mansouri et al., 2001**).

Pour ce qui est des extraits méthanoliques des cals, nous avons noté une grande résistance de toutes les souches testées, où aucune zone d'inhibition n'a été détectée. On peut admettre que cette grande résistance microbienne est liée étroitement au stade de croissance juvénile des cals, n'ayant pas encore développé assez de métabolites secondaires, susceptibles d'avoir un effet anti-microbien.

Tous les extraits méthanoliques des deux espèces ont présenté une action inhibitrice de la croissance des champignons phytopathogènes, ce qui permet de constituer une première contribution à l'usage de ces extraits dans la lutte biologique, en vue de les introduire comme bio-pesticides en agriculture.

Ainsi, les composés phénoliques sont reconnus toxiques pour de nombreuses bactéries et auraient pour cible les enveloppes des micro-organismes telles que la membrane cytoplasmique et la paroi. Cet effet est lié à leur groupement hydroxyle libre, qui permet une bonne solubilisation dans le milieu (**Oussou et al., 2004**). Ainsi, **Rhayour (2002)** a montré que les HE, ou leurs composés majoritaires phénoliques seules ou associés, attaquent directement la bactérie, en se fixant sur son enveloppe cellulaire, entraînant un déséquilibre de la perméabilité membranaire et un blocage de la phosphorylation oxydative, qui représente la source de la vie respiratoire.



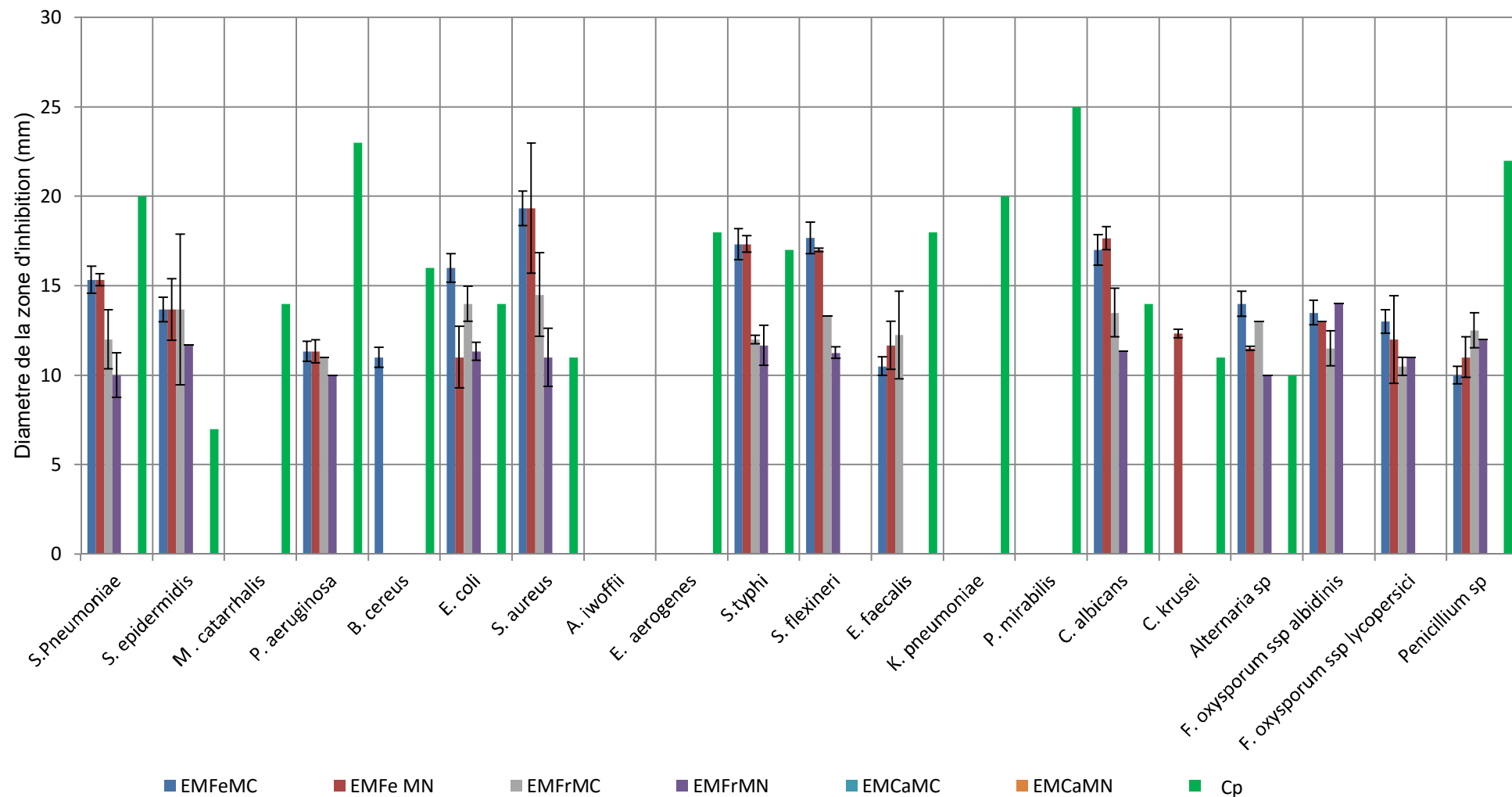


Figure 114: Activité des extraits méthanoliques d *M. communis* et *M. nivellei* sur la croissance des différentes souches étudiées (exprimée en diamètre de la zone d'inhibition)

▪ Les extraits préparés à partir des concrètes éthanoliques

Les souches: *S. epidermidis*, *E. coli*, *S. typhi*, ont toutes présenté une grande sensibilité à l'égard des extraits éthanoliques des feuilles de *M. communis* (EEFeMC), avec des zones d'inhibition supérieures à 15mm, surtout pour les souches : *S. aureus* et *C. albicans*, pour lesquelles nous avons enregistré des zones d'inhibition de 19 et 15mm respectivement. Cependant, les souches restantes présentent une sensibilité modérée (figure 115).

L'extrait éthanolique des feuilles de *M. nivellei* possède un excellent pouvoir antimicrobien, contre *S. aureus* (19,5mm) et *F. oxysporum ssp albidinis* (15mm), rappelant que cette dernière, s'est montrée plus ou moins résistante face aux autres extraits testés.

Les extraits éthanoliques des fruits de *M. communis* et *M. nivellei* se montrent moins actifs que les autres extraits et HE testés, et pratiquement inactifs face aux souches : *P. aeruginosa*, *M. catarrhalis*, *E. ivooffii*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* et *E. aérogènes*, où aucune inhibition n'a été observée. Cette résistance n'est pas surprenante, elle est en relation avec la nature de la membrane externe de ces bactéries Gram négatif, ce qui lui confère une résistance à la plupart des agents biocides (**Mann et al., 2000**).

La souche *Alternaria sp* est remarquablement la plus résistante de tous les champignons testés. **Holetz et al. (2002)** ont rapporté que certains extraits bruts naturels peuvent favoriser la prolifération et l'envahissement du mycélium.

**Azad-Ehyaee et al. (2010)** rapportent que les extraits hydro-alcooliques des feuilles de *M. communis*, présentent un très bon effet anti-fongique, contre les champignons saprophytes et les dermatophytes (*Trichophyton menthagrophaytis*, *Epidermophyton phelokozom* et *Michrosporm kanis*).

On suppose que le mécanisme d'action exercé par ces extraits, sera le même que celui des extraits méthanoliques, précédemment cité.

L'inhibition obtenue contre *P. aeruginosa* peut être considérée comme très faible car elle présente des zones d'inhibitions inférieures aux autres souches, quelque soit l'extrait testé. Cette faible action inhibitrice peut être liée au fait que cette souche est connue par sa capacité à acquérir facilement des résistances par mutation vis-à-vis de divers classes d'antibiotiques (**Livermore, 2002**), ce qui lui permet de développer des mécanismes complexes de résistance. Les extraits étudiés sont actifs à la fois sur des bactéries Gram positif et Gram négatif, mais, dans ce contexte, il semble difficile de corréler l'activité d'un organe à un type de bactéries ou de déterminer si un organe est plus actif qu'un autre. Cette variabilité peut être expliquée par la nature complexe des extraits et par la différence de composition de l'enveloppe bactérienne entre les bactéries Gram positif et négatif, pouvant entraîner une sensibilité extrêmement variable en fonction des extraits et des micro-organismes testés.

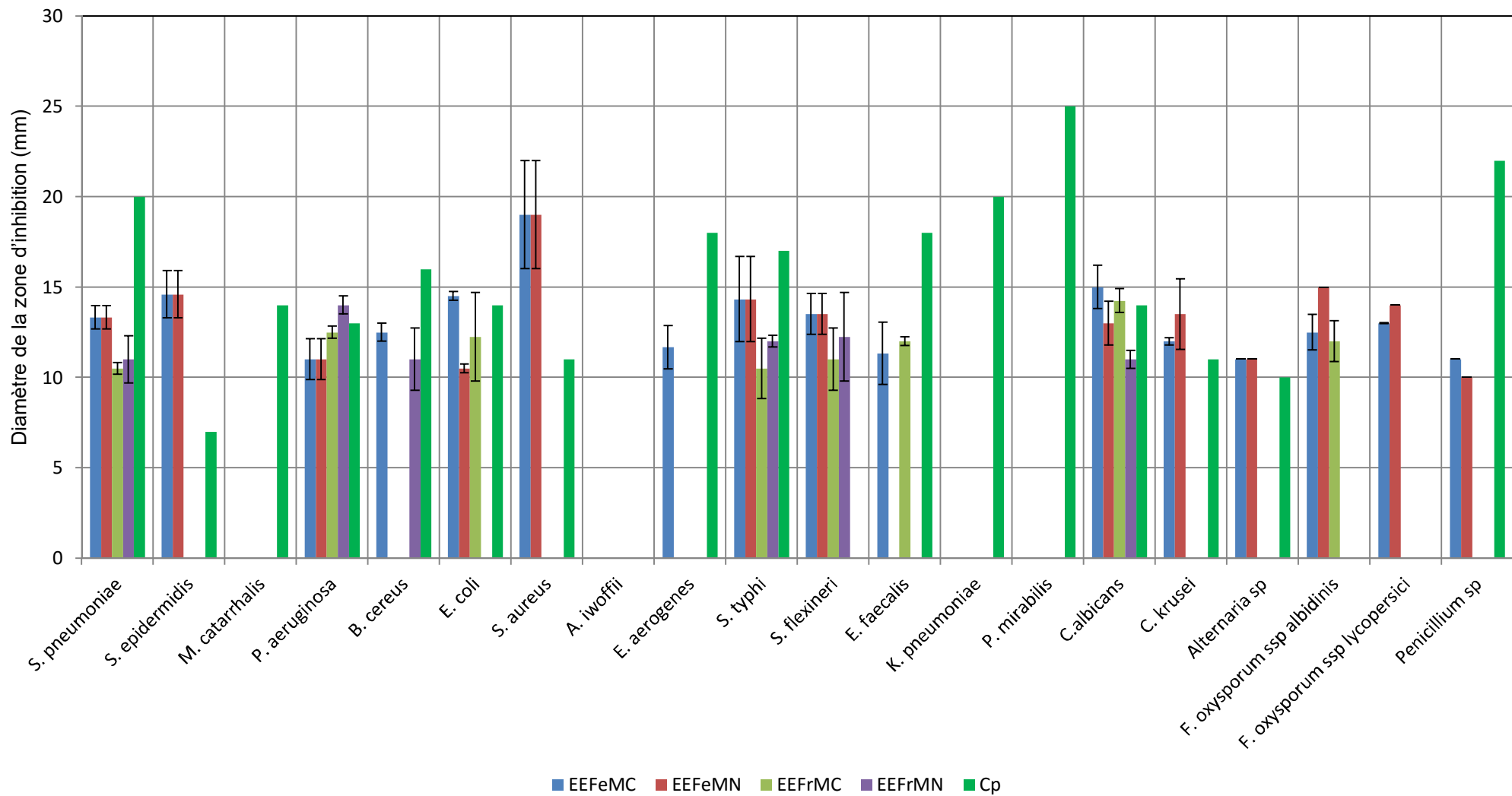


Figure 115: Activité des extraits éthanoliques d *M. communis* et *M. nivellei* sur la croissance des différentes souches étudiées (exprimée en diamètre de la zone d'inhibition)

- Détermination des CMI par la méthode de contact direct

Suite aux résultats obtenus au cours de l'évaluation de l'effet anti-microbien effectué précédemment, nous avons déterminé les concentrations minimales inhibitrices des HE et des extraits qui ont présenté des zones d'inhibitions remarquables à savoir : les quatre HE (HEFeMC, HEFeMN, HEFrMC, HEFrMN) ainsi que les extraits alcooliques des feuilles (EMFeMC, EMFeMN, EEFeMC, EEFeMN) des deux espèces étudiées, grâce à la méthode de contact direct en milieu liquide. Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 59.

Tableau 59 : Valeurs des CMI des HE et des extraits sur les souches sensibles

Extrait Souche	CMI (mg/ml)							
	Huiles essentielles				Extraits des feuilles			
	HEFeMC	HEFeMN	HEFrMC	HEFrMN	EMFeMC	EMFeMN	EEFeMC	EEFeMN
<i>S. epidermidis</i>	0,563	0,563	1,125	1,125	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	4,5	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	0,563	2,25	4,5	4,5	4,5	-	-	-
<i>S. aureus</i>	2,25	2,25	-	4,5	2,25	2,25	2,25	2,25
<i>S. typhi</i>	0,563	1,125	4,5	2,25	4,5	4,5	-	-
<i>S. flexineri</i>	2,25	4,5	4,5	-	4,5	4,5	-	-
<i>E. faecalis</i>	4,5	2,25	4,5	4,5	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	4,5	-	4,5	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	1,125	4,5	-	-	4,5	4,5	4,5	-
<i>Alternaria sp</i>	1,125	-	-	-	-	-	-	-
<i>F. oxysporum ssp albidinis</i>	-	-	-	-	-	-	-	4,5

D'après les résultats du tableau 3.34, nous pouvons constater que l'HE des feuilles de *M. communis* a présenté une très faible CMI (0, 563mg/ml) à l'égard des souches : *S. epidermidis*, *S. typhi* et *E. coli*. Cela apporte une justification à l'usage de cette plante dans le traitement des infections cutanées et gastro-intestinales par les tradi-praticiens.

L'HE des feuilles de *M. nivellei* a présenté également une CMI égale à 0,562mg/ml contre la souche *S. epidermidis*.

**Owlia et al. (2009)** ont rapporté que l'HE des tiges feuillées de *M. communis*, poussant spontanément en *Iran*, présente une CMI égale à 64mg/ml contre la souche *P. aeruginosa*

**Taheri et al. (2013)** ont rapporté que les extraits hydro-alcooliques des feuilles de *M. communis* présentent une excellente action contre *S. aureus* (0,2mg/ml) et *E. coli* (8mg/ml).

#### III.3.4.5. Evaluation du pouvoir anti-oxydant *in vitro*

Les anti-oxydants sont des molécules qui, lorsqu'elles sont présentes, même à faible concentration par rapport au substrat oxydable, retardent ou stoppent le processus d'oxydation, et ainsi régulent l'équilibre redox cellulaire (**Aruoma, 1996**).

Selon **Prior et al. (2005)**, les anti-oxydants peuvent agir selon deux mécanismes majeurs: soit par transfert d'atome d'hydrogène, soit par transfert d'électron. Les méthodes basées sur le transfert d'atome d'hydrogène mesurent la capacité globale d'un anti-oxydant à réprimer les radicaux libres par donation d'un atome d'hydrogène, alors que les méthodes basées sur le transfert d'électron mesurent la capacité d'un anti-oxydant à transférer un électron qui réduira n'importe quel composé, incluant les métaux, les carbonyles et les radicaux. Ainsi, compte tenu des différents facteurs impliqués, tels que les propriétés physico-chimiques des substances testées, le type de test employé ou l'état d'oxydation des substrats, il est recommandé d'utiliser au moins deux tests pour confirmer une activité anti-oxydante (**Frankel et Meyer, 2000**).

C'est pourquoi notre choix a porté sur l'utilisation de deux tests chimiques: le test évaluant le piégeage des radicaux libres en employant le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle sous sa forme radicalaire (DPPH\*), qui implique le transfert d'atome d'hydrogène, et le test déterminant le pouvoir réducteur antioxydant (FRAP, Ferric Reducing Antioxydant Power) basé sur le transfert d'électrons.

##### III.3.4.5.1. Résultats du Test DPPH

L'activité anti-oxydante des extraits étudiés vis-à-vis du radical DPPH, a été évaluée en suivant la réduction de ce radical, qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune, mesurable au spectrophotomètre à 515nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti-radicalaires (**Majhenic et al., 2007**).

Les valeurs des EC<sub>50</sub> déterminées en mg/ml expriment la concentration efficace de l'extrait anti-oxydant nécessaire pour le piégeage et la réduction de 50% des molécules de DPPH en dissolution dans du méthanol (**Molyneux, 2004**). Cette dernière est déterminée graphiquement, à partir de trois essais indépendants (0,25/0,5/1mg/ml), dont l'abscisse représente la concentration de la substance à analyser (extrait brut/HE), alors que l'axe des ordonnées représente l'activité anti-oxydante exprimée en pourcentage.

Un autre paramètre exprimant la puissance anti-radicalaire a été calculé, nommé "PAR" qui est égale à 1/EC<sub>50</sub> (Tableau 60). Plus ces valeurs s'éloignent du zéro, plus le pouvoir anti-oxydant augmente.

Une réduction de l'absorbance du DPPH en solution est observée avec l'augmentation de la dose des substances à analyser et les anti-oxydants standards (tableau 60). Les HE et les extraits ont manifesté un pouvoir anti-oxydant en piégeant les molécules du radical libre DPPH, cette capacité est d'une puissance accrue avec l'acide ascorbique, alors que les extraits des cals ont présenté une capacité faible par rapport aux contrôles positifs.

Tableau 60: Pouvoir anti-oxydant des HE et des extraits par le test DPPH

Substances testées (1mg/ml)	I%	EC <sub>50</sub> (mg/ml)	PAR	
Huiles essentielles HE	FeMC	5,38	17,3±0,478	0,06
	FeMN	5,56	15,2±0,897	0,07
	FrMC	2,32	23,12±0,765	0,04
	FrMN	2,18	26,06±0,120	0,04
Extraits méthanoliques EM	FeMC	77,75	0,70±0,133	1,43
	FeMN	52,00	0,98±0,256	1,02
	FrMC	82,45	0,47±0,678	2,12
	FrMN	69,65	0,94±0,680	1,06
	CaMC	47,90	1,01±0,120	0,99
	CaMN	33,49	1,44±0,987	0,69
Extraits éthanoliques EE	FeMC	81,01	0,49±0,524	2,04
	FeMN	78,81	0,59±0,052	1,69
	FrMC	<b>88,55</b>	0,37±0,681	2,70
	FrMN	<b>86,32</b>	0,39±0,863	2,56
Contrôles positifs Cp	Ac Ascorbique	<b>86,62</b>	0,39±0,754	2,56
	Quercétine	85,56	0,43±0,366	2,33
	α-tocophérol	51,27	0,99±0,456	1,01

Pour les contrôles positifs, la réaction de réduction du DPPH en solution est rapide et instantanée, le changement de couleur, exprimant le passage du radical DPPH de la forme oxydée (DPPH\*) à la forme réduite stable (DPPH-H), se fait dans un temps extrêmement court, où l'état d'équilibre est atteint immédiatement et la réduction est presque complète.

Les extraits éthanoliques des feuilles et des fruits de ces deux espèces ont fournis d'excellents effets anti-oxydants, par rapport aux contrôles positifs utilisés. Néanmoins, l'extrait des fruits de *M. communis* (EEFrMC) a exprimé un excellent pouvoir anti-oxydant (EC<sub>50</sub>=0,37mg/ml), qui s'est avéré meilleur que celui de l'acide ascorbique (EC<sub>50</sub>=0,39mg/ml)

Les HE, par contre, ont présenté des pourcentages de réduction des radicaux libres qui sont extrêmement faibles.

En comparant les données obtenues pour les HE, les extraits et les standards, on classe l'activité et la puissance anti-oxydante dans l'ordre suivant:

Extrait éthanolique des fruits de *M. communis* (**EEFrMC**) > Acide ascorbique > extrait éthanolique des fruits de *M. nivellei* (**EEFrMN**) > quercétine > extrait méthanolique des fruits de *M. communis* (**EMFrMC**) > extrait éthanolique des feuilles de *M. communis* (**EEFeMC**) > extrait éthanolique des feuilles de *M. nivellei* (**EEFeMN**) > extrait méthanolique des feuilles de *M. communis* (**EMFeMC**) > extrait méthanolique des fruits de *M. nivellei* (**EMFrMN**) > extrait méthanolique des feuilles de *M. nivellei* (**EMFeMN**) >  $\alpha$ -tocophérol > extrait méthanolique des cals de *M. communis* (**EMCaMC**) > extrait méthanolique des cals de *M. nivellei* (**EMCaMN**) > huile essentielle des feuilles de *M. nivellei* (**HEFeMN**) > huile essentielle des feuilles de *M. communis* (**HEFeMC**) > huile essentielle des fruits de *M. nivellei* (**HEFrMC**) > huile essentielle des fruits de *M. communis* (**HEFrMN**).

L'activité anti-oxydante des extraits dépend essentiellement du taux des polyphénols accumulés durant le cycle végétatif de la plante (**Burda et Olszek, 2001**). La  $EC_{50}$  de *M. communis*, rapportée par les travaux de **Gardeli et al. (2008)** est comprise entre 0,0095 et 0,017mg/ml, ces mêmes auteurs ont également démontré que les extraits de *M. communis*, récoltés en période estivale, sont les plus anti-oxydants.

Selon les résultats enregistrés, les extraits éthanoliques sont dotés d'un très bon pouvoir anti-oxydant, meilleurs que ceux exprimés par les extraits méthanoliques et les HE, mais ils restent d'une efficacité moindre, par rapport à celle exprimée par l'acide ascorbique utilisé comme contrôle positif (figures 116, 117 et 118).

Il a été démontré que les molécules anti-oxydantes, telles que l'acide ascorbique, l' $\alpha$ -tocophérol, les flavonoïdes et les tanins, réduisent et décolorent le radical DPPH, à cause de leur capacité à céder l'hydrogène (**De Pooter et Schamp, 1986**).

La richesse des extraits éthanoliques en composés phénoliques, témoigne de leurs remarquables effets anti-oxydants enregistrés. L'activité anti-oxydante des extraits dépend essentiellement du taux des polyphénols accumulés durant le cycle végétatif de la plante (**Burda et Olszek, 2001**). On peut donc justifier l'intense effet anti-oxydant des extraits éthanoliques et méthanoliques étudiés, par leur richesse en composés phénoliques (tanins, flavonoïdes, flavonols et anthocyanes), qui a été démontrée précédemment par les dosages spectrophotométriques.

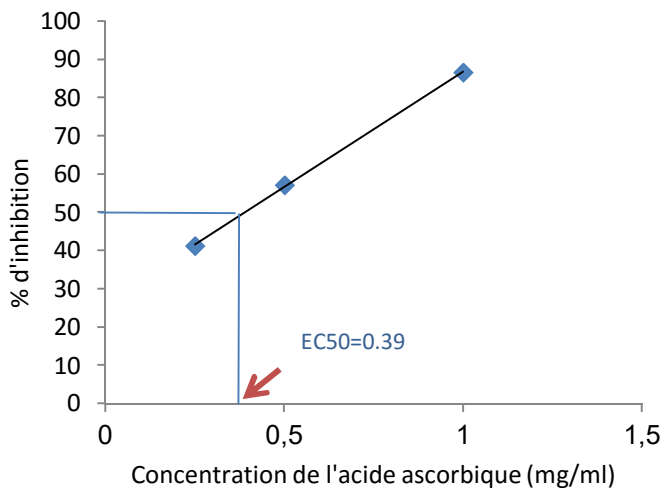


Figure 116 : Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'acide ascorbique

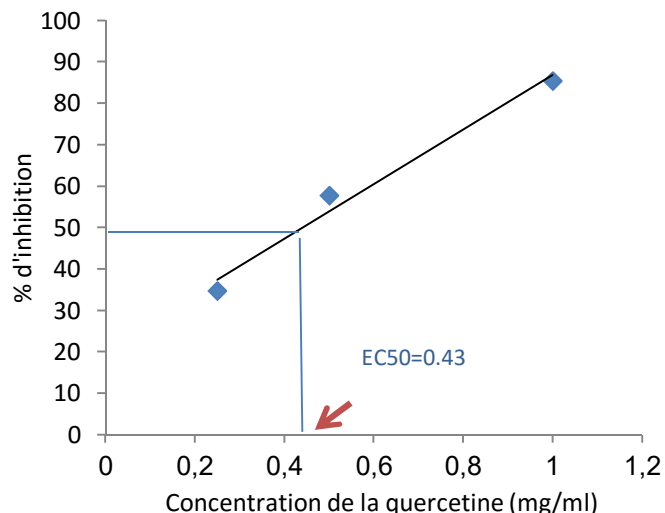


Figure 117: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de la quercétine

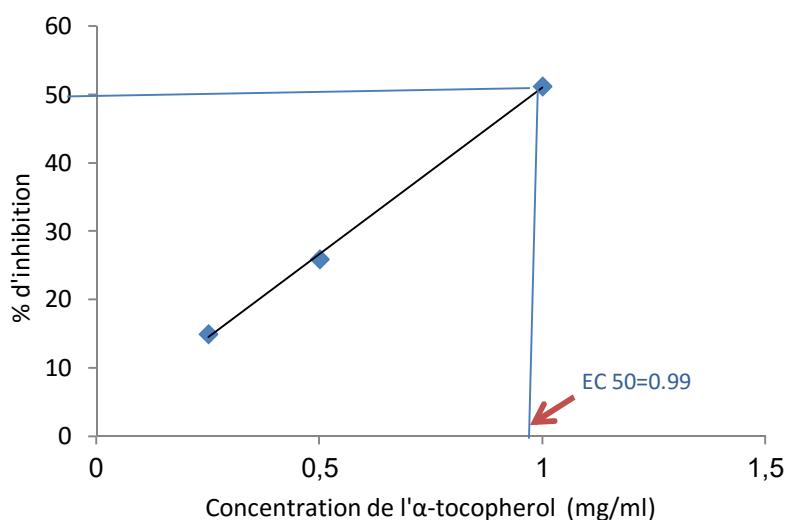


Figure 118 : Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l' $\alpha$ -tocophérol

- Les huiles essentielles

D'après les résultats obtenus, il semble qu'il existe une relation inversement proportionnelle entre la valeur de l'absorbance et la concentration de l'HE testée. Nous avons mesuré l'activité anti-oxydante, de trois concentrations croissantes, pour chaque HE (0,25/0,5 et 1mg/ml), afin de déterminer la  $EC_{50}$ , correspondant à la concentration de l'HE qui est capable d'inhiber 50% des radicaux libres.



Les HE étudiées présentent une activité infiniment faible, par rapport aux contrôles positifs testés. L'HE des fruits de *M. communis* (HEFrMC) présente un pouvoir anti-oxydant égale à 2,32% ( $EC_{50}$ = 23,12mg/ml) alors que celle de *M. nivellei* présente 2,18% ( $EC_{50}$ =26,06mg/ml). Les mêmes constatations ont été observées pour les HE des feuilles, où nous avons enregistré un effet anti-radicalaire estimé à 5,38% pour l'HE des feuilles de *M. communis* (HEFeMC), et 5,56% pour ceux de *M. nivellei*. Les pouvoirs anti-oxydants des trois contrôles positifs, demeurent largement supérieurs à ceux des quatre HE testées (figures 119 et 120).

Les résultats du pouvoir anti-oxydant obtenus pour les HE étudiées concordent avec les travaux effectués par **Yadegarinia et al. (2006)**, qui ont rapporté que l'HE de *M. communis*, présente un très faible pouvoir anti-oxydant de l'ordre de 3,53%, ils ont attribué ce déficit du pouvoir réducteur à la faible quantité de l' $\alpha$ -terpineol présente dans l'HE testée. Néanmoins, le taux de ce monoterpène oxygéné est éventuellement faible dans les HE des fruits de *M. communis* et *M. nivellei*, ayant fait l'objet de ce travail, alors que sa teneur est plus élevée dans les HE des feuilles. Devant cette problématique, il fallait absolument trouver une réponse.

Pour cela, nous avons suggéré que ce faible pourcentage de réduction est en relation directe avec la vitesse de déroulement de la réaction de réduction, rappelant que le protocole que nous avons suivi imposait un temps d'incubation estimé à 30 min, la question que nous nous sommes posé est la suivante :

**Est ce que l'activité anti-oxydante des HE augmente lorsqu'on prolonge le temps d'incubation ?**

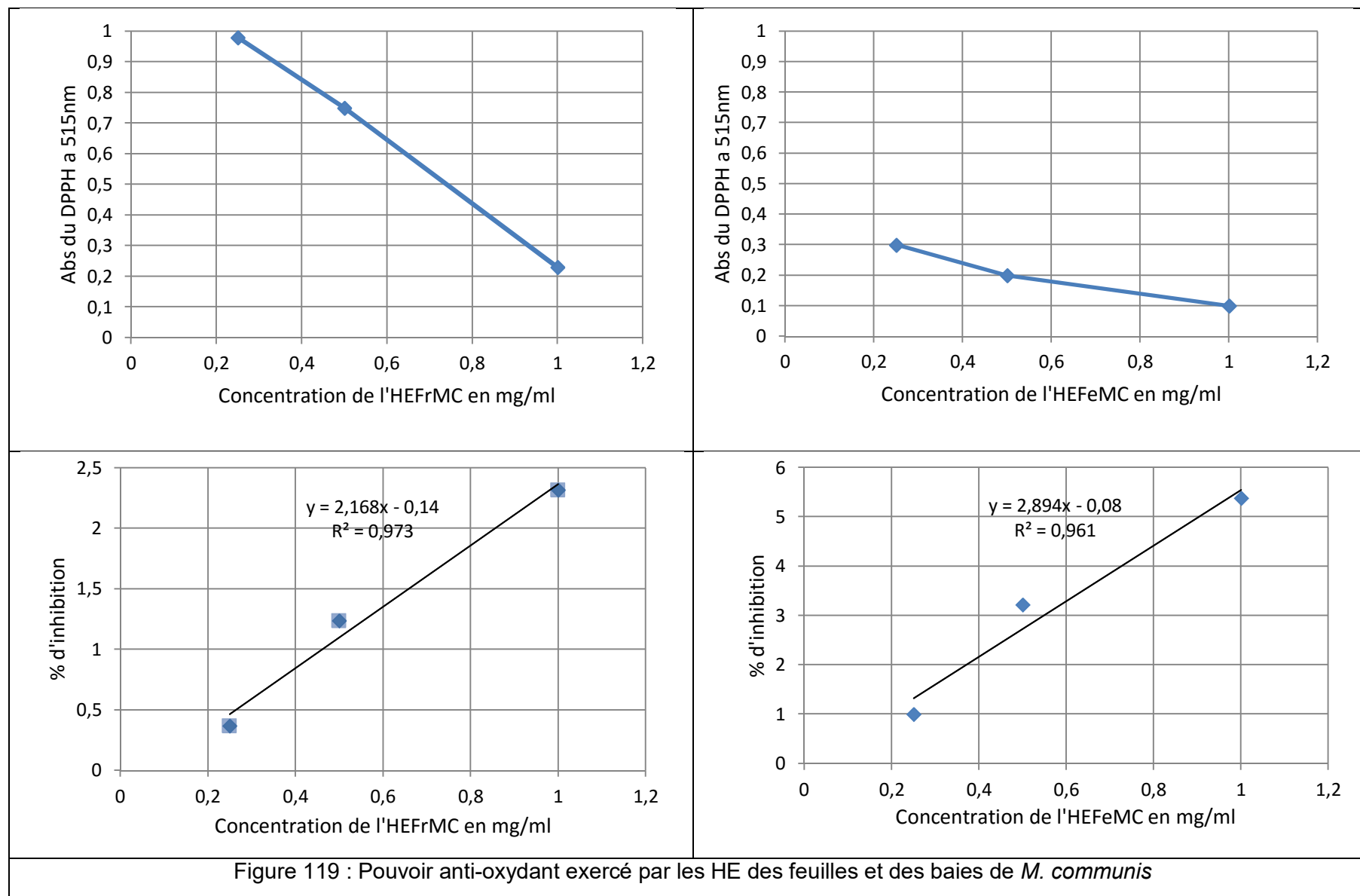


Figure 119 : Pouvoir anti-oxydant exercé par les HE des feuilles et des baies de *M. communis*

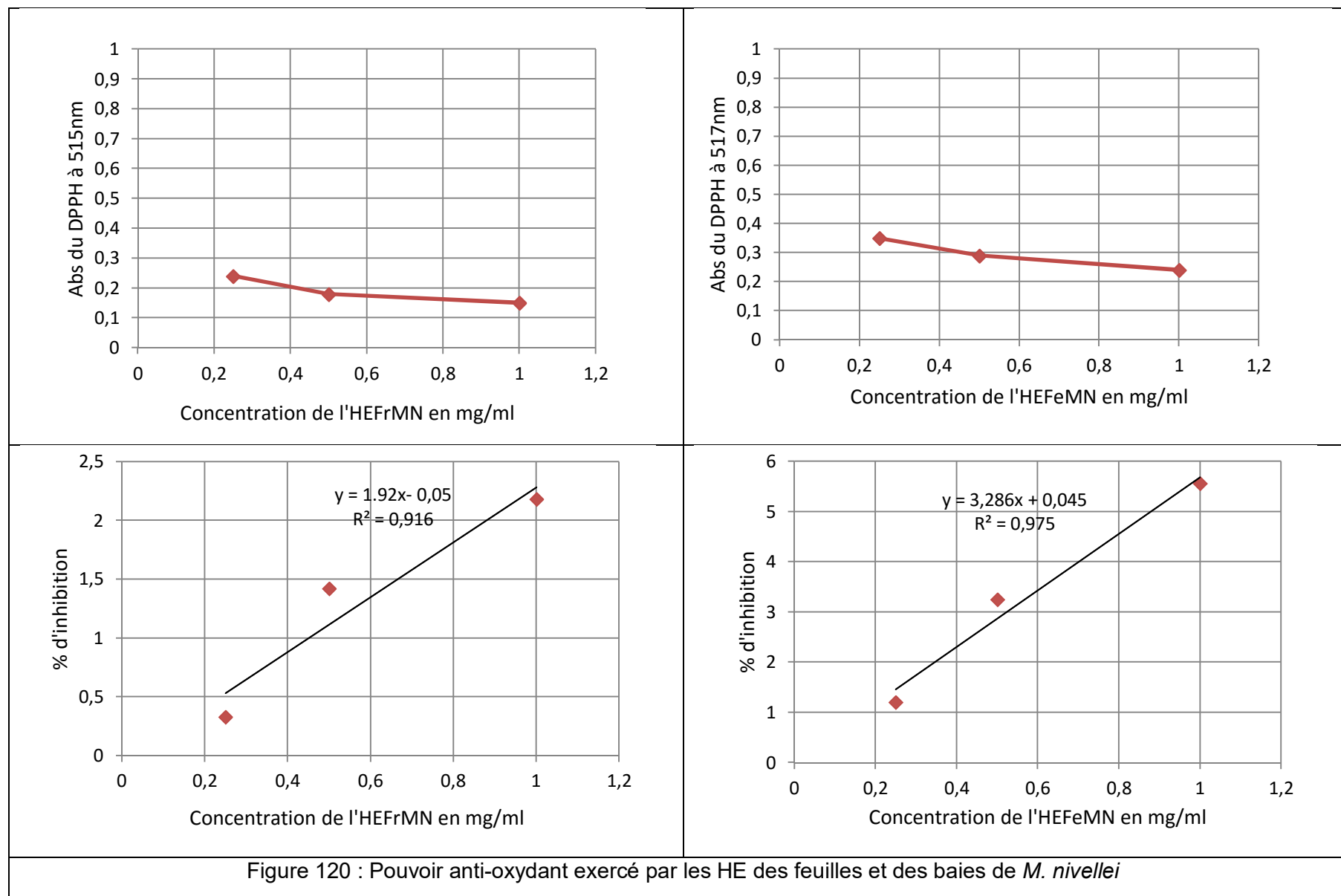


Figure 120 : Pouvoir anti-oxydant exercé par les HE des feuilles et des baies de *M. nivellei*

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié la cinétique d'évolution de l'effet anti-oxydant en effectuant la lecture de la densité optique (DO) pour chaque tube, à des intervalles de temps réguliers (en respectant des écarts de 15 min). Ces données ont été converties en pourcentages d'inhibition des radicaux libres, selon la formule de **Wang et al. (1998)**, afin d'établir la relation qui existe entre ces derniers et le prolongement de la période d'incubation (figure 121)

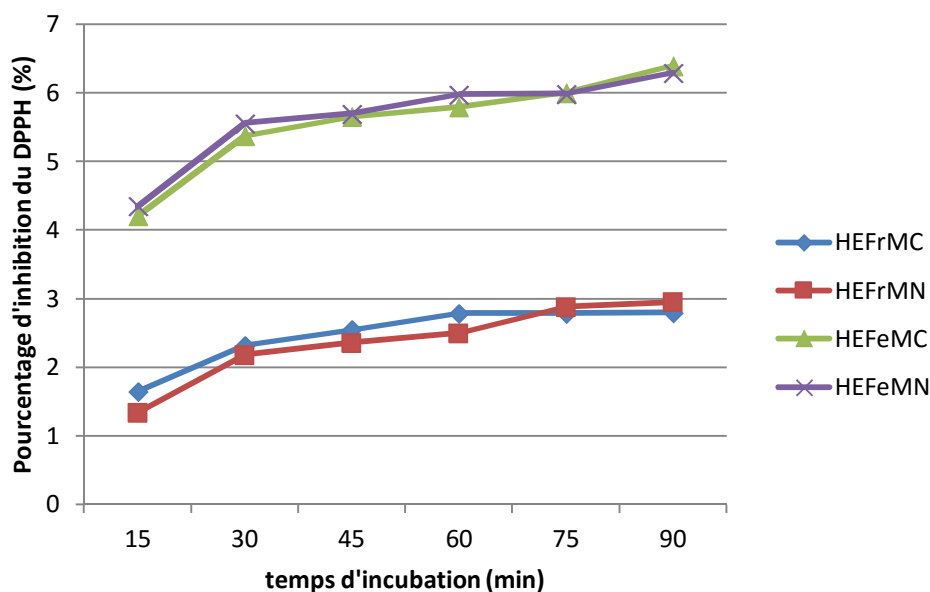


Figure 121 : Variation du pouvoir anti-oxydant des HE en fonction du temps d'incubation

Effectivement, le pourcentage d'inhibition de l'oxydation du radical DPPH augmentait progressivement, lorsqu'on a prolongé le temps d'incubation, la stabilité n'a pas été atteinte au terme de cette expérimentation (90min), cela nous mène à suggérer que ces HE exercent bien des réactions de réduction, qui se déroulent très lentement, afin d'atteindre l'état d'équilibre, qui est le témoin d'une réduction complète du radical libre.

- Les extraits éthanoliques

On note la présence d'une relation inversement proportionnelle entre l'absorbance et la concentration de l'extrait à tester (figure 122 et figure 123). La densité optique diminue remarquablement lorsqu'on augmente la concentration de l'extrait à tester, il s'agit donc d'une relation de type dose-dépendante. D'après les résultats obtenus, on déduit que les extraits éthanolique des feuilles de *M. communis* (EEFeMC) exercent un effet anti-oxydant remarquable, qui est égale à 81,01% ( $EC_{50}=0,49\text{mg/ml}$ ), alors qu'il est de l'ordre de 78,81% ( $EC_{50}=0,59\text{mg/ml}$ ) pour l'espèce *M. nivellei* (EEFeMN).

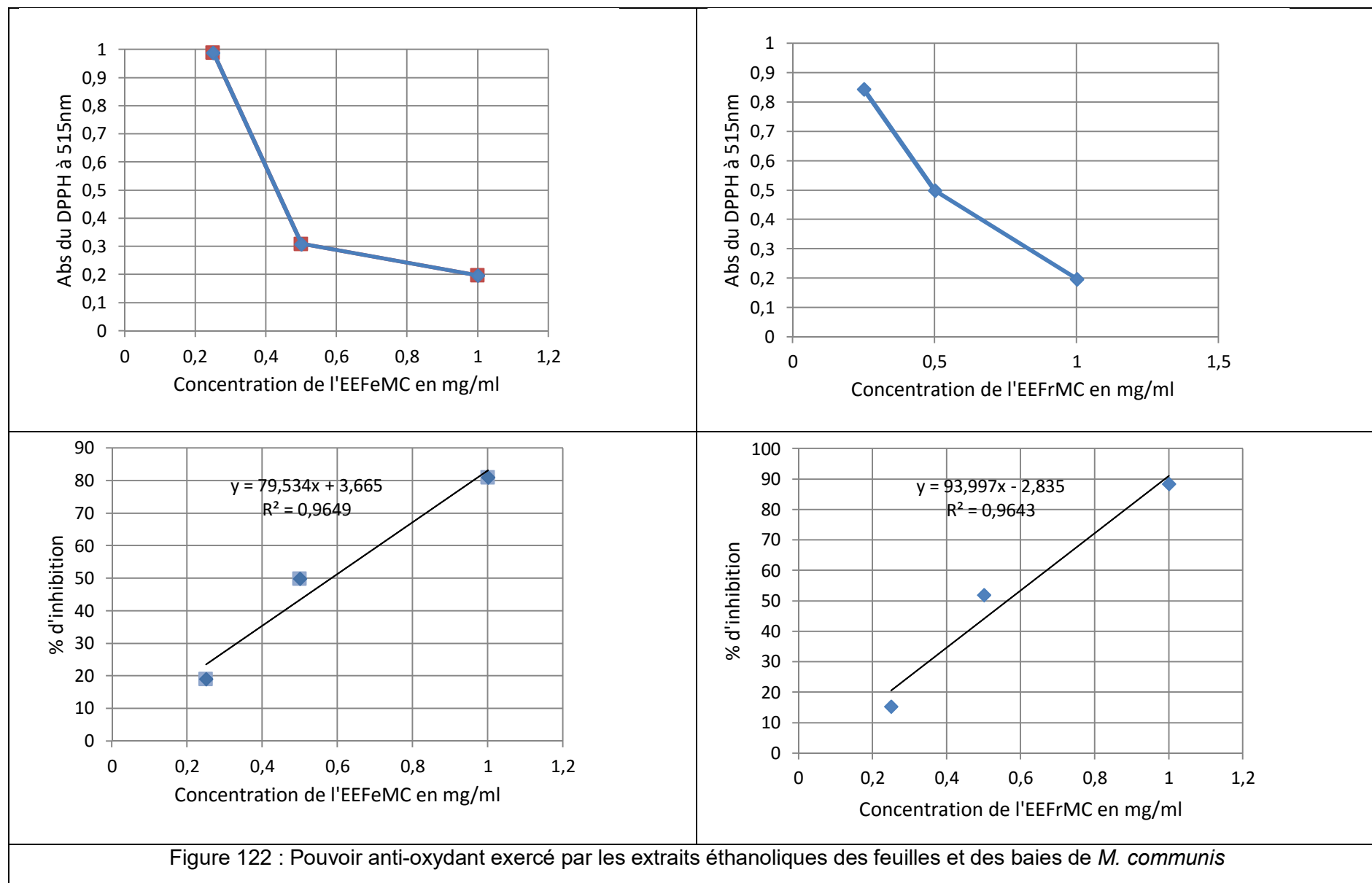


Figure 122 : Pouvoir anti-oxydant exercé par les extraits éthanoliques des feuilles et des baies de *M. communis*

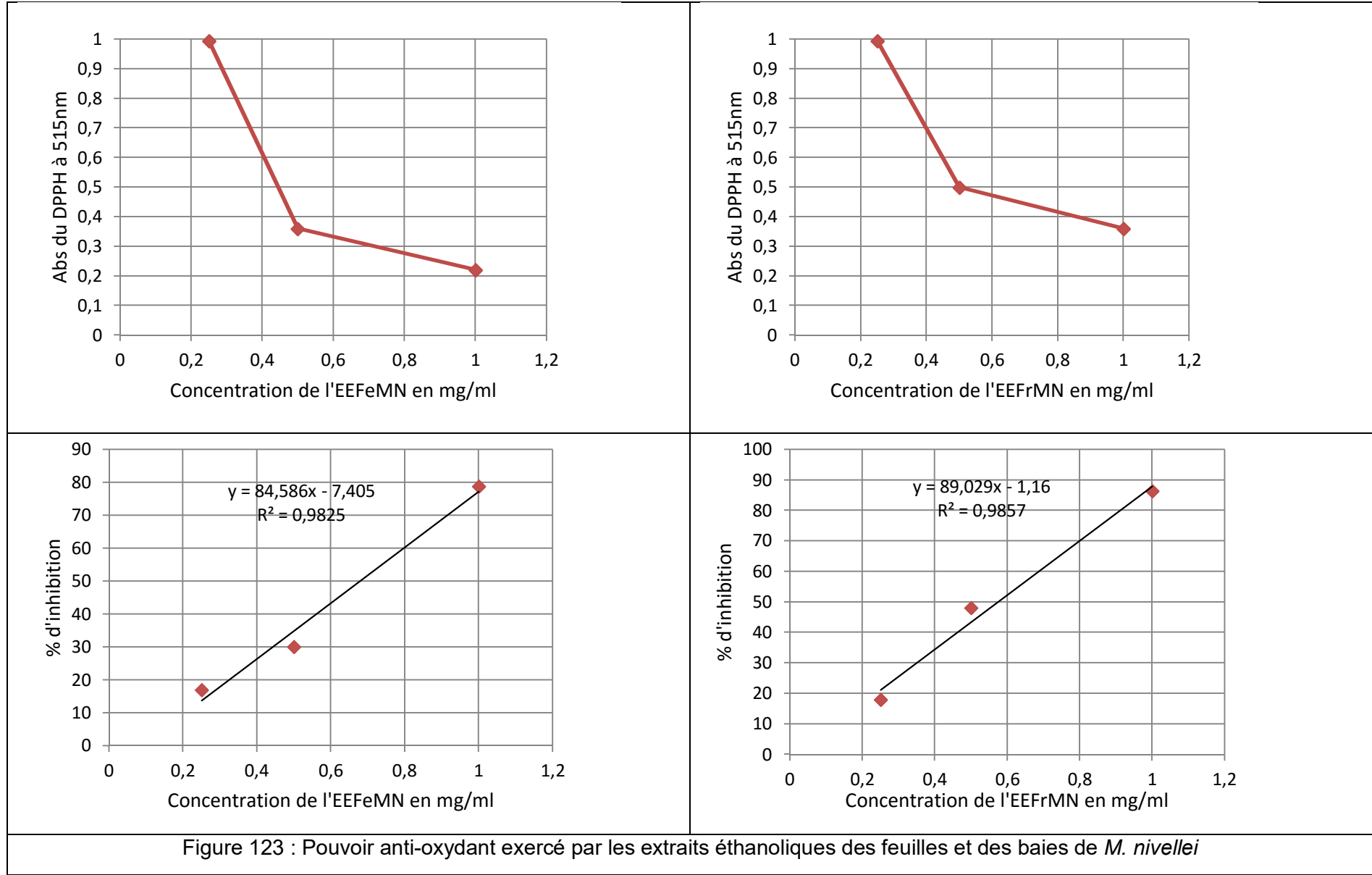


Figure 123 : Pouvoir anti-oxydant exercé par les extraits éthanoliques des feuilles et des baies de *M. nivellei*

Cependant, l'extrait éthanolique des fruits de *M. communis* (EEFrMC) a fournit des résultats très satisfaisants, avec un pourcentage d'inhibition du radical DPPH estimé à 88,55% (EC<sub>50</sub>=0,37mg/ml), qui dépasse légèrement celui de L'acide ascorbique (86,62%, EC<sub>50</sub>=0.9mg/ml), ainsi que l'extrait éthanolique des baies de l'espèce *M. nivellei* (86,32%, EC<sub>50</sub>=0,39mg/ml). Cependant, il n'existe pas de différence significative entre ces trois résultats.

De plus, il n'y a pas de différence significative entre les extraits éthanoliques des baies, la quercétine et l'acide ascorbique au risque  $\alpha=5\%$ . Alors que l' $\alpha$ -tocophérol semble être moins efficace que ces extraits.

- Les extraits méthanoliques

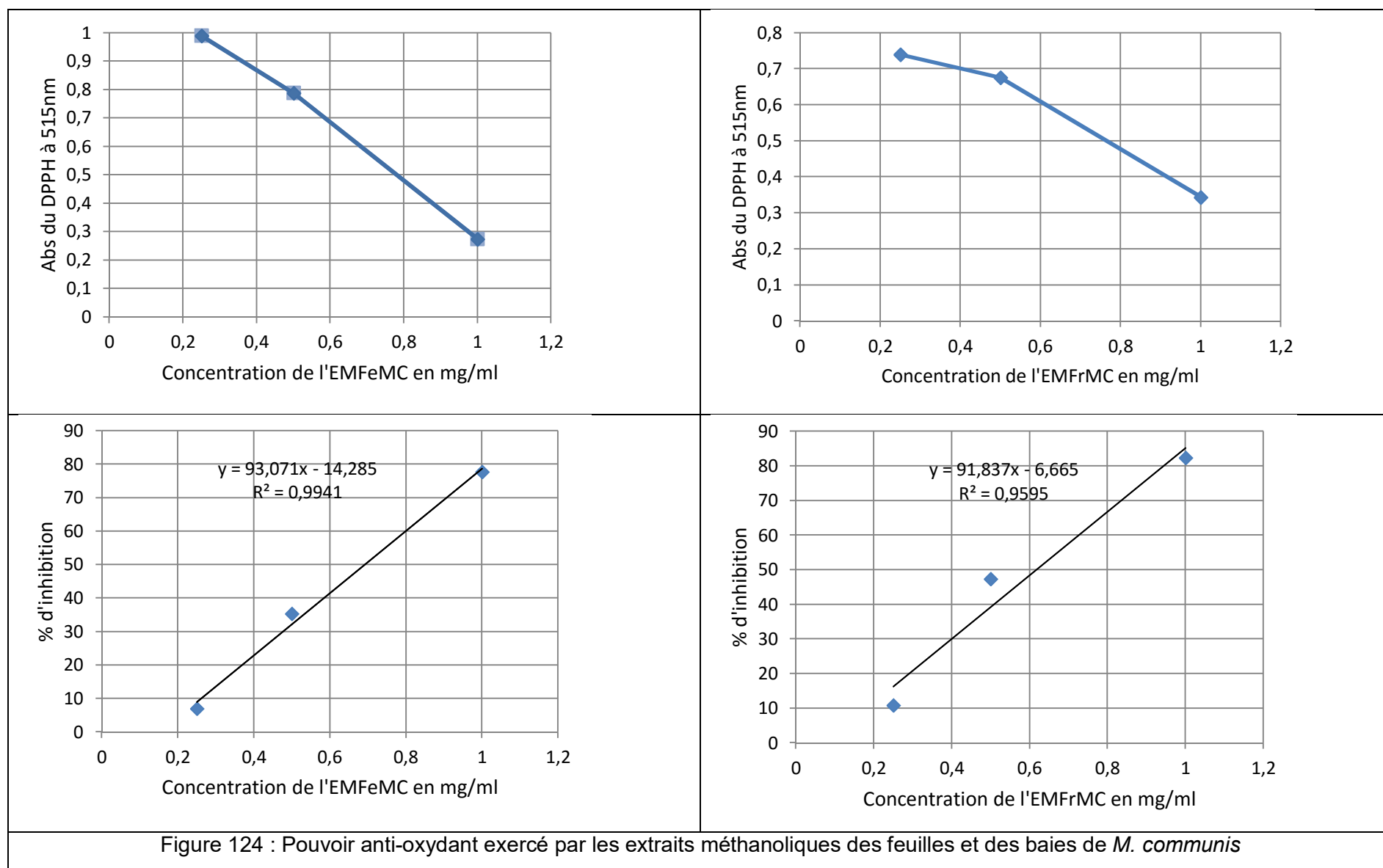
L'absorbance du DPPH mesurée à 517 nm, montre une diminution importante, au fur et à mesure que l'on augmente la concentration de l'extrait testé, ceci plaide en faveur d'une relation proportionnelle dose-dépendante (figures 124, 125 et 126).

Les extraits méthanoliques des feuilles ont présenté des pourcentages d'inhibition de 77,52% (EC<sub>50</sub>=0,69mg/ml) pour *M. communis* (EMFeMC) et 52,0% (EC<sub>50</sub>=0,98mg/ml) pour *M. nivellei* (EMFeMN). Ces résultats sont meilleurs que ceux de l' $\alpha$ -tocophérol, mais demeurent, toutefois, inférieures aux résultats obtenus avec l'acide ascorbique et la quercétine.

Bien que les extraits méthanoliques des cals présentent des pourcentages d'inhibition faibles, par rapport à leurs homologues obtenus *in situ*, leur pouvoir anti-oxydant n'est pas négligeable (figure 3.115). Il côtoie 47,90% (EC<sub>50</sub>=1,01mg/ml) pour *M. communis* et environs 33,49% (EC<sub>50</sub>=1,44mg/ml) pour *M. nivellei*.

Les travaux de **Banerjee et al. (2005)**, sur l'extrait méthanolique de l'espèce *Syzygium cumini* appartenant à la famille des myrtaceae, ont rapporté qu'elle présente un pouvoir anti-radicalaire avec une EC<sub>50</sub> égale à 0,168 mg/ml.

L'activité anti-oxydante des extraits méthanoliques dépend essentiellement du taux de polyphénols accumulés durant le cycle végétatif de la plante (**Burda et Oleszek, 2001 ; Vinson et al., 1995**).





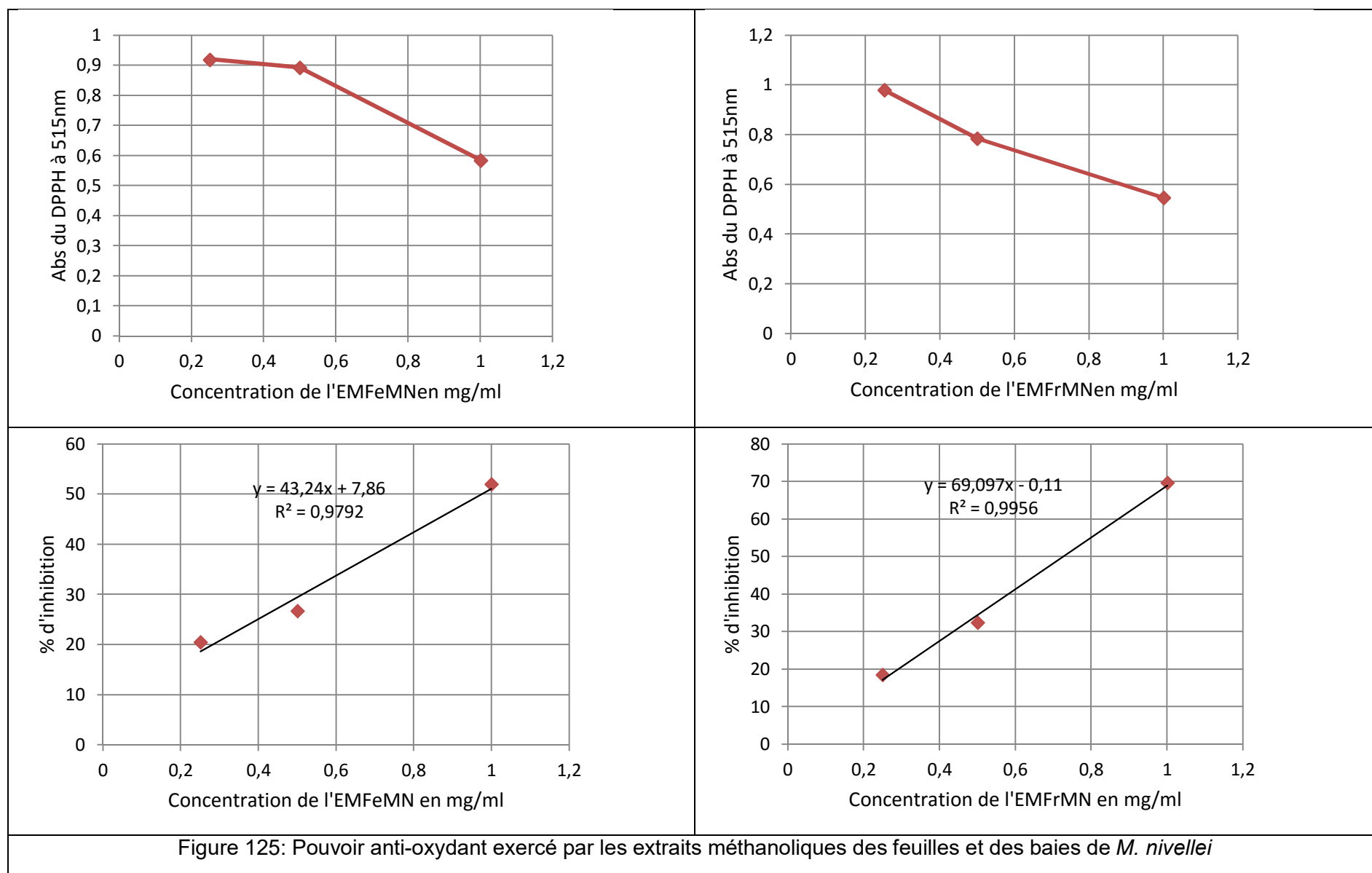


Figure 125: Pouvoir anti-oxydant exercé par les extraits méthanoliques des feuilles et des baies de *M. nivellei*

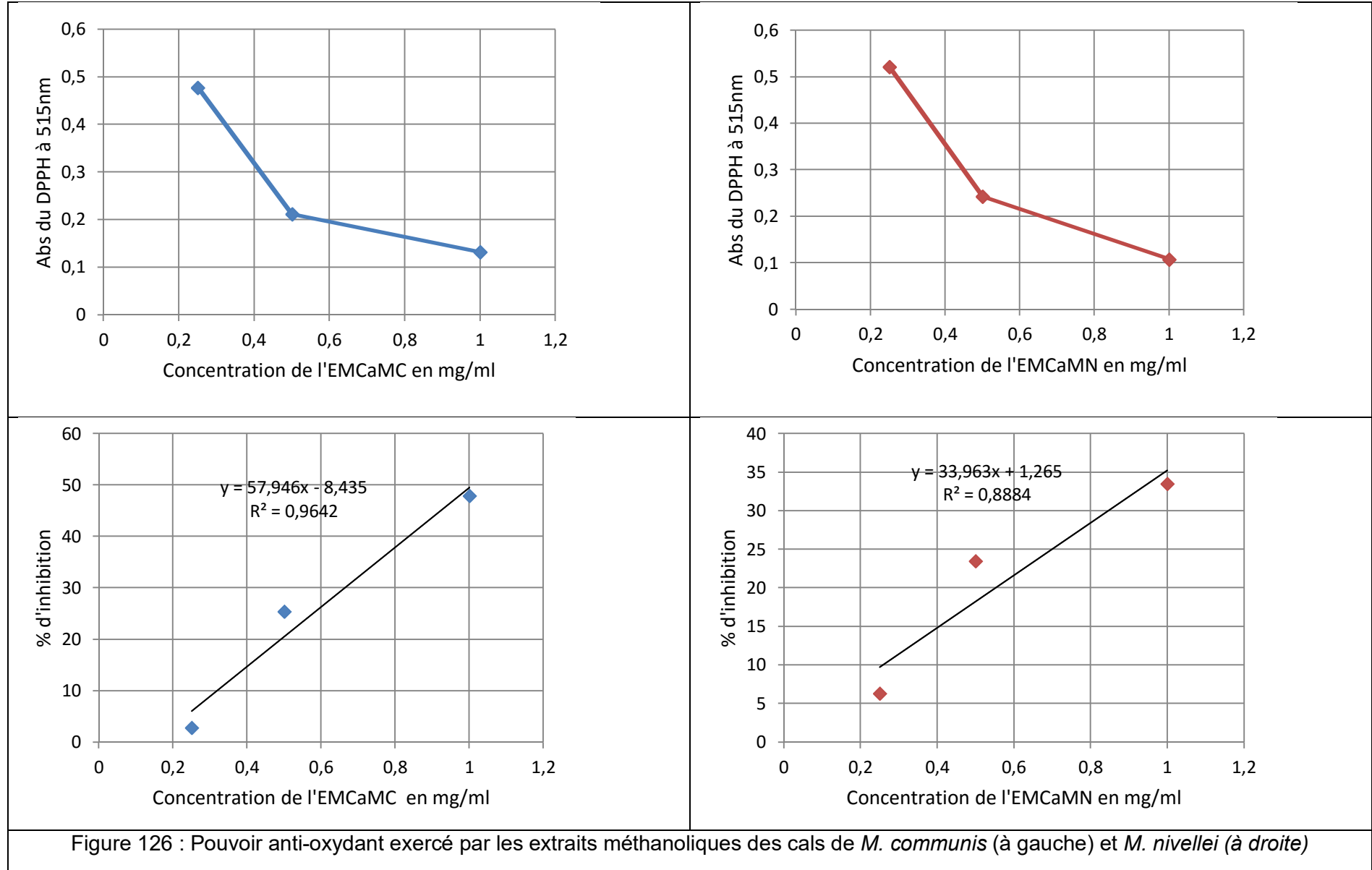


Figure 126 : Pouvoir anti-oxydant exercé par les extraits méthanoliques des cals de *M. communis* (à gauche) et *M. nivellei* (à droite)

Les composés phénoliques sont des molécules connues pour leurs propriétés anti-oxydantes (**Vinson et al., 1995**). L'étude menée par **Tuberoso et al. (2007)** a prouvé l'activité réductrice des baies de *M. communis* et a démontré que leur richesse en anthocyanines, leur procure une protection supplémentaire contre le processus d'oxydation.

D'après les travaux menés par **Mohammedi (2006)** ainsi que **Touaibia (2011)**, les extraits flavonoïdiques présentent toujours un potentiel anti-oxydant très fort, en comparaison avec les huiles essentielles ou les extraits alcooliques.

Selon **Kanoun et al. (2014)**, la EC<sub>50</sub> chez *M. communis* varie en fonction de la nature de l'extrait et de l'organe étudié, elle est estimée à 0,09mg/ml dans les extraits méthanoliques des feuilles, 0,87mg/ml dans les tiges et 0,60mg/ml dans les extraits méthanoliques des baies.

Le pouvoir réducteur des extraits étudiés est lié à la richesse de ces derniers en flavonoïdes et en flavonols, présents en concentrations importantes (**Romani et al., 1999 ; Alamani et Cossu, 2004 ; Park et al., 2004**).

Ces résultats confirment la présence d'une relation étroite entre la richesse des extraits en polyphénols et l'importance de leur pouvoir anti-oxydant. La présence de composés phénoliques anti-oxydants naturels dans ces plantes, les rend plus performants que les anti-oxydants de synthèse largement utilisés en technologie agro-alimentaire (**Potterat, 1997 ; Burda et Olszek, 2001**). De plus, la consommation de produits riches en polyphénols naturels semble prévenir contre les maladies causées par les radicaux libres (**Young et Woodside, 2001**).

- Relation teneur en polyphénols/ test DPPH

Il existe une relation très étroite et parfaitement proportionnelle entre la teneur de l'extrait en polyphénols et l'effet réducteur qu'il exerce sur les radicaux libres du DPPH (figure 127). Cela nous mène à admettre que les différents extraits testés représentent d'excellentes sources de protons H<sup>+</sup>, capables de piéger ou réduire toute structure ou radicale instable. **Pietta (2000)** rapporte que cet effet est notamment dû à leur capacité à inhiber des enzymes responsables de la production des radicaux libres.

Cette activité peut être due éventuellement à la présence des acides gallique et catéchiques, qui possèdent tous les deux un noyau catéchol indispensable pour obtenir une activité anti-oxydante importante (**Thomas, 2011**). Cependant, il nous manque ici des données structurales pour établir une relation entre la forte activité anti-oxydante observée et la structure chimique des composés.

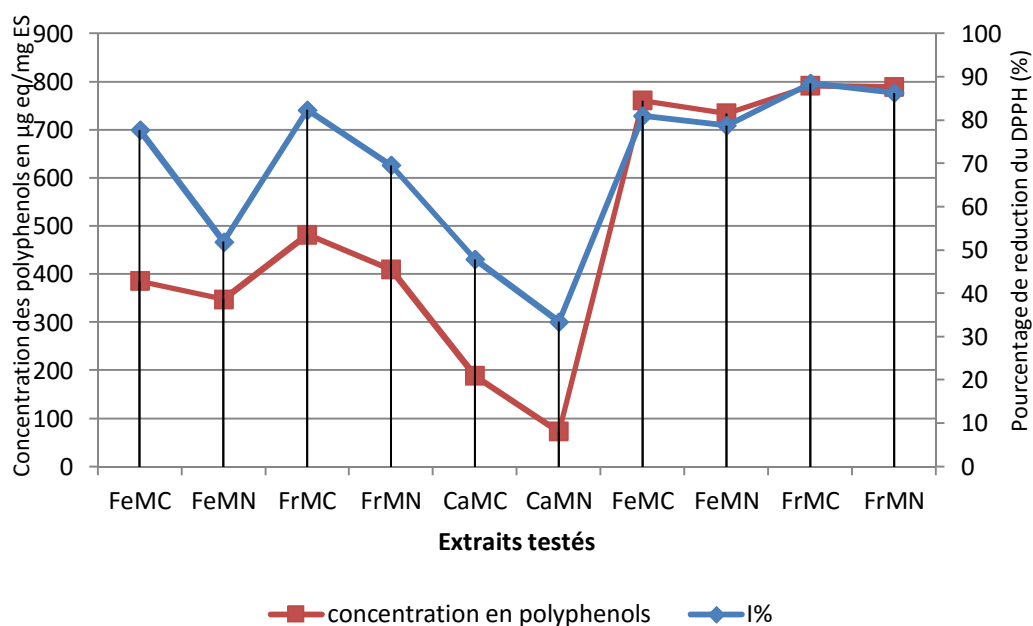


Figure 127 : Relation entre la concentration des extraits en polyphénols et l'effet anti-oxydant.

#### III.3.4.5.2. Résultats du test FRAP

Le pourcentage de réduction des ions du fer ferrique en fer ferreux, exercé par l'acide ascorbique est égale à 43,2164% à la dose de 1mg/ml, il paraît être dix fois plus important, que celui de la quercétine (contrôle positif), n'ayant exprimé que 4,9813% (figure 128). Quant aux autres substances testées, nous pouvons déduire qu'il existe une relation proportionnelle entre la dose testé et l'effet réducteur qui lui est attribué (relation dose-dépendante).

Les extraits méthanoliques des fruits de *M. communis* et *M. nivellei* (EMFrMC, EMFrMN), ont présenté des pouvoirs réducteurs, qui sont largement supérieurs par rapport à ceux exprimé par les extraits méthanoliques de leurs feuilles (EMFeMC et EMFeMN).

Pour ce qui est des extraits méthanoliques des cals (EMCaMC et EMCaMN), le pouvoir chélateur du fer est très remarquablement élevé, ces taux paraissent largement supérieurs à ceux des contrôles positifs utilisés. Cela reflète l'aptitude des structures tissulaires juvéniles, déficientes en métabolites secondaires, à faire face au stress oxydatif, auquel elles peuvent être soumises, en stimulant l'expression des mécanismes enzymatiques endogènes.

Quant aux extraits éthanoliques étudiés (EEFeMC, EEFeMN, EEFrMC et EEFrMN), à la concentration de 1mg/ml, le pouvoir réducteur est également élevé, cela est probablement dû à la présence de groupements hydroxyles, dans les composés phénoliques, qui peuvent assurer une double fonction (d'une part comme donneur de protons H<sup>+</sup> et d'autre part comme donneur d'électrons).

Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité anti-oxydante potentielle (**Kumaran et Karunakaran, 2007 ; Siddhuraju et Becker, 2007**).

Les HE des deux plantes ont exercé le plus fort pouvoir chélateur, où le pourcentage d'inhibition moyen dépasse les 52%, chez les deux espèces étudiées, pour la dose de 1mg/ml.

Selon **Gardeli et al. (2008)**, l'extrait méthanolique des rameaux feuillés de l'espèce *M. communis* exerce un effet chélateur qui varie significativement en fonction des saisons. Les variations de l'activité anti-oxydante sont directement liées aux taux des composés phénoliques présents dans la plante récoltée (**Vinson et al., 1995 ; Yuselyurt et al., 2008**).

L'activité remarquable des extraits alcooliques, riches en composés phénoliques, réside au fait qu'ils sont capables de réduire les radicaux libres comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyde, par transfert d'hydrogène ou par la chélation des ions métalliques impliqués dans la production des espèces oxygénées réactives (**Cook et Samman, 1996 ; Cao et al., 1997**).

D'autres études ont montré que les polyphénols, ainsi que certains dérivés aromatiques comme les monoterpènes, sont des bons inhibiteurs des enzymes responsables de la production des radicaux libres comme : la xanthine oxydase, la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase (**Di Carlo et al., 1999**).

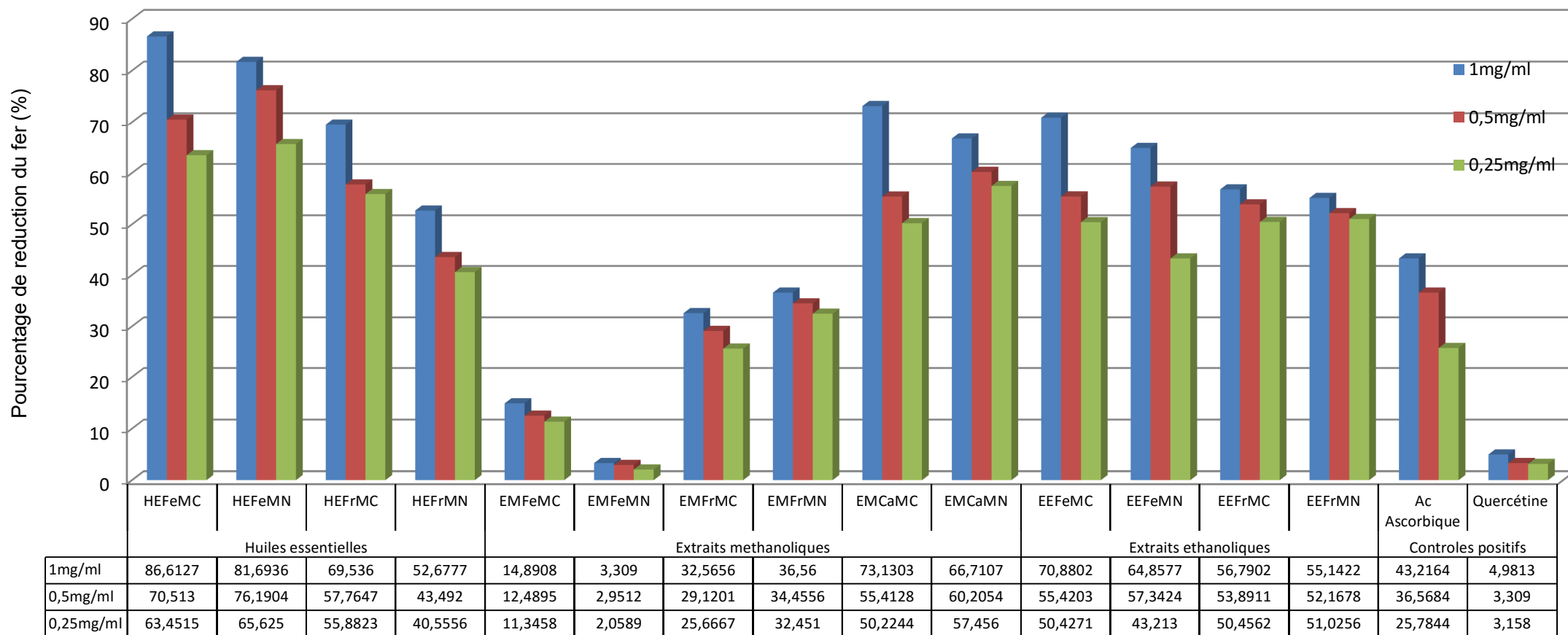


Figure 128 : Pouvoir chélateur du fer exercé par les HE et les extraits de *M. communis* et *M. nivellei*

- Relation test FRAP/ test DPPH

Les résultats du test FRAP sont vraisemblablement opposés par rapport à ceux obtenus avec le test DPPH (Figure 129).

Pour le test FRAP, l'activité de l'acide ascorbique utilisé comme contrôle positif est significativement supérieure à celle des extraits méthanoliques étudiés. Les fractions les plus actives sont respectivement : les fractions volatiles (HEFeMC, HEFeMN, HEFrMC, HEFrMN), les extraits méthanoliques des calcs (EMCaMC, EMCaMN) ainsi que les fractions polaires extraites avec l'éthanol (EEFeMC, EEFeMN, EEFrMC, EEFrMN), tandis que les fractions méthanoliques (EMFeMC, EMFeMN, EMFrMC et EMFrMN) sont les plus faibles, pourtant, ces derniers avaient exprimé une bonne activité anti-oxydante avec le test DPPH.

La même remarque est apportée aux HE, qui avaient exprimé les plus faibles pourcentages d'inhibition du DPPH, par contre elles ont présenté le meilleur pouvoir réducteur des ions  $Fe^{2+}$ .

Ceci tend à indiquer que l'activité anti-oxydante des HE et des extraits méthanoliques des calcs ainsi que des extraits éthanoliques, serait liée de façon privilégiée, à un mécanisme de transfert d'électrons, tandis que pour les extraits méthanoliques et éthanoliques, l'activité serait due principalement à un transfert de protons, renforcé par rapport au transfert d'électrons. Ce model réactionnel s'applique également sur la quercétine, que nous avons utilisé comme contrôle positif, ayant présenté un faible taux de réduction du fer ferrique, alors qu'elle a présenté un excellent effet réducteur du radical DPPH (85,56%). On peut admettre que la relation entre ces deux paramètres est inversement proportionnelle.

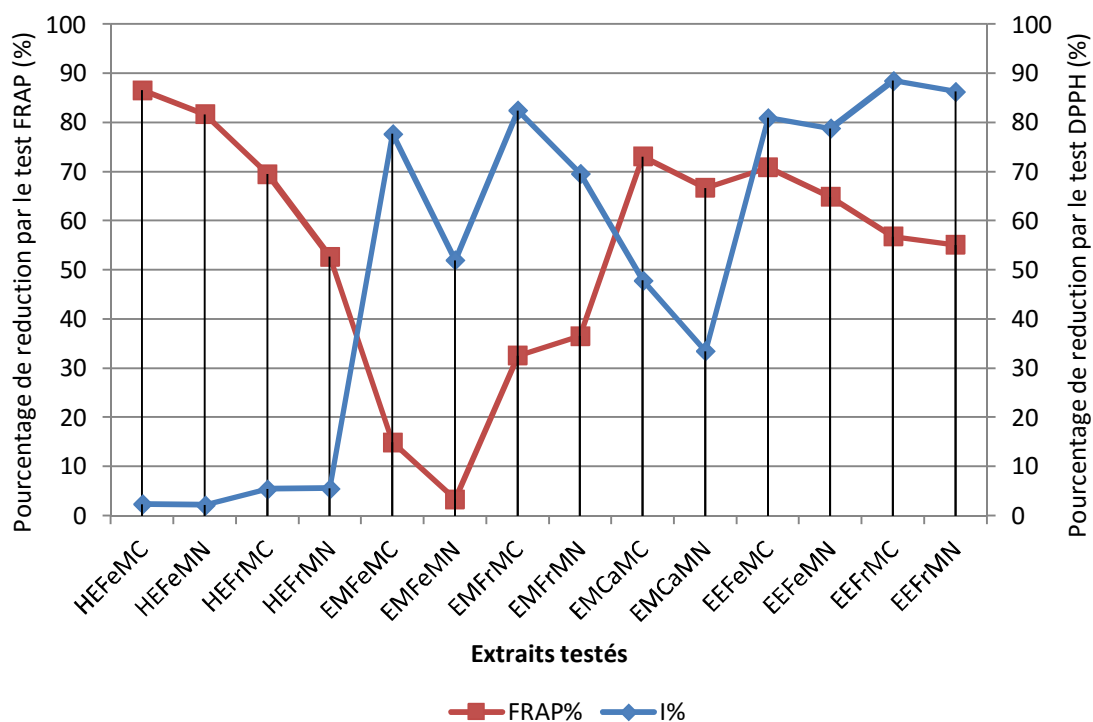


Figure 129 : Relation entre les résultats du test DPPH et ceux du test FRAP réalisés sur les HE et les extraits

## Conclusion-Perspectives

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressé à l'investigation de deux espèces spontanées de myrte algérien, il s'agit de : *Myrtus communis* L et *Myrtus nivellei* Batt & Trab. La valorisation de leurs métabolites secondaires offre de nouvelles perspectives dans l'industrie de phyto-médicaments. Cette stratégie peut contribuer au développement durable de notre pays et apporter des preuves scientifiques sur leurs vertus en médecine traditionnelle d'une part, et s'intègre dans le contexte de la préservation de la flore méditerranéenne et endémique de l'Algérie.

Dans ce cadre, nous avons développé deux axes complémentaires: le premier est articulé sur la multiplication *in vitro* de ces plantes à partir de vitro-semis, afin de comprendre leur comportement callogène et organogène, le deuxième est focalisé sur l'étude histo-anatomique et l'extraction des fractions polaires et volatiles, à partir des baies et des feuilles, afin d'étudier leur aspect phytochimique, et mettre en évidence quelques unes de leurs propriétés biologiques.

La synthèse bibliographique entreprise, au début de ce travail de thèse, a permis de constater que les connaissances sur l'espèce *M. communis* se limitaient principalement à l'étude de la composition chimiques des fractions polaires et apolaires des feuilles, peu nombreux sont les travaux portant sur la mise en évidence de ses activités biologiques et du contenu phytochimique de ses baies. Quand à l'espèce saharo-endémique *M. nivellei*, elle n'a suscité l'intérêt que de très peu de travaux, ce qui constitue une plateforme vierge pour son investigation

Par ailleurs, une demande croissante en molécules d'origine naturelle a été observée ces dernières années favorisant, par conséquent, la recherche de nouveaux composés bioactifs. Cette recherche peut prendre plusieurs formes et avoir plusieurs intérêts, mais trois objectifs majeurs reviennent souvent :

- Trouver de nouvelles molécules anti-microbiennes afin de remplacer les antibiotiques et anti-septiques actuels face auxquels les micro-organismes ont développés des résistances ;
- Remplacer les additifs et conservateurs synthétiques utilisés en agro-alimentaire ou en cosmétique, qui se sont révélés comme nocifs pour la santé humaine ;
- Trouver de nouvelles molécules bioactives à effet cicatrisant et anti-inflammatoire, pour minimiser l'usage des anti-inflammatoires de synthèse (stéroïdiens et non stéroïdiens), réputés pour leurs nombreux effets indésirables.

Une meilleure connaissance de la composition des plantes semble à présent nécessaire, afin d'aider à la pérennisation de cette nouvelle filière, dont les revenus pourraient constituer une autre valeur ajoutée, surtout que ces espèces poussent spontanément et peuvent survivre pendant plus de 100 ans.

Nous avons consacré une partie de ce travail à l'introduction de ces deux espèces en culture *in vitro*, via la technique de micro-propagation et la callogenèse.



Les essais préliminaires ont abouti à la détermination d'une méthodologie pour une meilleure désinfection des graines. Concernant la micro-propagation à partir de vitro-semis, les résultats obtenus ont montré que les hormones de croissance jouent un rôle important dans les différentes étapes de la multiplication. Le milieu ms contenant 1 mg/l ANA a fourni un bon enracinement des vitro-plants après trois mois de culture. Cependant, les micro-boutures développées sur les milieux riches en cytokinine, présentent par contre, un enracinement très faible.

Les essais pratiqués sur la culture de tissus indifférenciés, ont révélé que les cals peuvent apparaître après 70 jours d'introduction sur milieu MS contenant une balance hormonale équilibrée KIN/ANA ou KIN/2,4-D. Se sont les explants de feuilles et d'hypocotyles qui ont exprimé une très bonne aptitude à callogenèse.

Une autre part importante de ce projet de maîtrise est l'étude histo-anatomique et histo-chimique, Pour la première fois, les différents tissus des tiges et des feuilles ont été inventoriés, tout en cherchant d'éventuels différences tissulaires entre ces deux espèces, qui ont su développer des adaptations liées à leur biotopes.

Lors des essais de criblage phytochimique, réalisés sur les différents organes végétaux, nous avons constaté que ceux de la partie aérienne sont les plus riches en composés terpéniques et phénoliques, par rapport aux organes sous-terrains, qui se sont plutôt distingués par la présence de réserves d'amidon.

Les huiles essentielles de *M. nivellei* de la région du Tassili, n'avait auparavant fait l'objet d'aucune étude pharmacologique, et sa composition chimique n'avait pas été clairement établie. La fraction volatile de cette plante, caractérisée par une prédominance des monoterpènes pour les baies, et des sesquiterpènes pour les feuilles. Ces molécules, très connues pour leurs vertus thérapeutiques, existent dans la nature et sont fréquemment extraites à partir des plantes, alors que leur synthèse organique est quasiment inexistante dans la littérature scientifique. À l'avenir, il serait intéressant d'exploiter l'hydrolat et analyser sa composition et son potentiel pharmacologique. Puisque les hydrolats font l'objet de très peu d'études et peuvent notamment constituer un créneau de recherche intéressant.

L'un des objectifs assignés à ce travail était d'optimiser le protocole d'extraction des HE, en établissant un plan d'expérience, sans pour autant affecter leurs propriétés physico-chimiques et organoleptiques, ce qui risque, par conséquent, d'affecter leur action thérapeutique. Nous avons pu démontrer que l'extraction des polyphénols à partir des feuilles et des fruits était également possible, par les protocoles établis, à chaud et à froid, sans dégradation apparente, et se révèlent efficaces, puisque les extraits ainsi obtenus ont présenté une activité anti-oxydante et une teneur en composés phénoliques supérieure à celle des extraits obtenus au moyen des méthodes conventionnelles.

Afin d'étudier les fractions volatiles extraites, nous avons utilisé une méthodologie d'identification de la composition en couplant la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse (CG/SM).

A la base des résultats obtenus, nous avons attribué le chemotype limonène/ $\alpha$ -pinène à l'HEFeMC, le chemotype limonène/octadienol à l'HEFrMC, le chemotype  $\delta$ -elemene/ $\alpha$ -terpinéol pour l'HEFeMN et le chemotype Eucalyptol/limonène à l'HEFrMN.

L'extraction par solvants des fractions polaires, à partir des baies et des feuilles, a été réalisée à chaud avec le méthanol à l'aide d'un montage de type soxhlet, et à froid par macération avec de l'éthanol. Ces derniers ont fait l'objet d'une étude phytochimique complète. Cependant, les extraits éthanoliques des baies ont présenté les teneurs les plus élevées, suivis par ceux des feuilles, ils ont présenté également, les plus fortes teneurs en tanins et en anthocyanes dépassant largement les seuils observés avec leurs homologues méthanoliques. Les extraits préparés à partir des cals, se sont avérés les plus pauvres en polyphénols, en raison de leur stade juvénile de croissance.

La connaissance de la composition chimique des HE de *M. communis* et *M. nivellei* ainsi que les principaux polyphénols contenus dans leurs extraits alcooliques, nous ont permis d'élucider certains effets pharmacologiques intéressants, notamment les effets : anti-inflammatoire, anti-oxydant, anti-microbien et cicatrisant.

Les HE n'ont exprimé aucune toxicité, même après administration à l'état pur. Cependant, les extraits alcooliques ont exercé une toxicité aigüe modérée, pour les doses allant de 0,5 à 1g/kg de poids corporel. Dans ce même contexte les HE ont présenté une excellente tolérance cutanée, contrairement aux extraits alcooliques qui se sont avérés légèrement irritants. Cependant, pour confirmer ces résultats, il s'avère nécessaire de réaliser une autre étude de la toxicité avec un test plus performant, ciblant les fonctions des organes vitaux, et déterminer la concentration minimale à partir de laquelle les extraits pourraient être utilisés sans effets néfastes sur les cellules saines. Afin de vérifier si la toxicité observée, pour nos extraits et HE, dans les conditions testées, est due à un effet retard, la lecture des résultats a été prolongée sur une période de 14 jours.

Nous venons par ce travail, de confirmer l'utilisation traditionnelle de *M. communis* et *M. nivellei* dans le traitement des inflammations. Ainsi, l'administration d'une dose de 100mg/kg d'extrait ou d'HE, induit une protection de l'animal contre l'agent phlogistique injecté. Les HE ont présenté une activité significative similaire à celle du produit de référence utilisé à la dose de 100 mg/kg de poids corporel.

En somme, plusieurs interrogations se posent, notamment sur l'identité des molécules contenues dans les extraits qui étaient à l'origine de l'irritation cutanée observée chez les lapins. Il en est de même pour la toxicité orale induite par les extraits polaires. Des recommandations peuvent être faites :

- Etendre les essais d'innocuité à la mesure de la toxicité subaigüe et chronique, ainsi que la mise en évidence d'un éventuel effet tératogène, mutagène ou carcinogène.
- Effectuer un examen histologique du site inflammatoire et dosage de quelques paramètres sériques liés au test de l'effet anti-inflammatoire.
- Augmenter l'effectif des animaux utilisés par lot pour une meilleure étude statistique

Les différents extraits de plantes ont été testés sur un panel de micro-organismes pathogènes. Cependant, les HE ont exercé le meilleur effet anti-microbien avec des zones d'inhibition pouvant aller jusqu'à 38 mm. Les extraits préparés à partir des concrètes méthanoliques viennent en deuxième position, suivis par leurs homologues éthanoliques, pour lesquels la quasi-totalité des souches se sont avérées moyennement sensibles. Par contre, les extraits préparés à partir des cals, n'avaient approuvé aucune action anti-microbienne.

L'activité anti-oxydante des différents extraits a été évaluée par deux méthodes : la réduction du fer (FRAP) et le piégeage du radical libre DPPH. L'extrait méthanolique des feuilles de *M. communis* (EMFrMC) a présenté un pouvoir réducteur, qui est quatre à cinq fois supérieur à celui exprimé par *M. nivellei*. Mais qui reste très faibles par rapport aux autres extraits et HE testés. Les fractions polaires étudiées ont exprimé un excellent effet en piégeant plus de 80% des radicaux DPPH, L'EEFrMC a présenté une activité anti-oxydante très intéressante ( $IC_{50}=0,37\text{mg/ml}$ ) qui est supérieur à la capacité du piégeage exercée par l'acide ascorbique ( $IC_{50}=0,39\text{mg/ml}$ ). Cette action a été corrélée à la présence de composés phénoliques dans ces organes (feuilles, fruits). Toutefois, une analyse structurale par RMN est nécessaire pour identifier les autres constituants de cette fraction.

Les crèmes formulées à base des huiles essentielles ont présenté une très bonne stabilité physico-chimique et microbiologique. Les crèmes C1 et C2, contenant les HE des feuilles, ont également fait preuve d'une excellente propriété cicatrisante des plaies en spot pratiqués sur la peau des rats.

Ces résultats encourageants nous incite à continuer l'investigation phytochimique des organes souterrains et aériens restants (fleurs, graines), qui ont été très peu étudiés, jusqu'à présent.

On déplore le fait que, malgré la grande richesse de l'huile essentielle du myrte commun, et particulièrement de *M. nivellei*, il est étonnant de constater qu'il n'existe aucun programme d'amélioration de ces espèces aromatiques. Ainsi, la biologie de la multiplication de ces espèces devient nécessaire. Finalement, les objectifs de ce projet de maîtrise ont été atteints, puisque tous les résultats obtenus mettent bien en évidence le potentiel pharmacologique des huiles essentielles et des extraits de *M. communis* et *M. nivellei*, de la flore spontanée de l'Algérie, qui est notamment riche en plantes aromatiques, dont la phytochimie et le potentiel pharmacologique restent encore peu ou pas étudiés, ce qui ouvre d'intéressantes perspectives de recherche pour les années à venir. Ce travail tente éventuellement d'apporter une contribution à l'investigation des myrtes algériens, dans la perspective de leur exploitation dans la formulation de phyto-médicaments.

Enfin, on espère que ce travail soit la première étape de la mise en place d'un programme de protection de l'origine géographique et botanique de ce patrimoine identitaire.

## Propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de *Myrtus nivellei* Batt et Trab. obtenus *in situ* et *in vitro*

### Anti-oxidant and anti-microbial properties of *Myrtus nivellei* Batt & Trab extracts obtained *in situ* and *in vitro*

M. Touaibia · F. Z. Chaouch

© Lavoisier SAS 2015

**Résumé** Ce travail apporte une contribution à l'investigation et la valorisation d'une plante saharo-endémique : *Myrtus nivellei* Batt & Trab (Myrtaceae) et l'évaluation du pouvoir antioxydant et antimicrobien de l'extrait méthanolique de cette espèce récoltée *in situ* ainsi que celui de ses cals multipliés *in vitro*. Une série d'analyses spectrophotométriques ont été effectuées, montrant que l'extrait méthanolique de la plante récoltée *in situ* s'est avéré plus riche en polyphénols par rapport à l'extrait des cals multipliés *in vitro*. Il a éventuellement exprimé un bon pouvoir de capture des radicaux libres ( $EC_{50}=0,98$  mg/ml) et un très bon pouvoir inhibiteur de la peroxydation de l'acide linoléique estimé à 74,01%, qui s'est avéré largement supérieur à celui exprimé par l'acide ascorbique (50,57%) utilisé comme contrôle positif. Néanmoins, les extraits méthanoliques préparés à partir des cals ont exprimé le meilleur pouvoir réducteur du fer estimé à 66,71%. Une très bonne activité antimicrobienne a été enregistrée pour l'extrait de la plante récoltée *in situ*, particulièrement contre *S. aureus* (CMI=2,25 mg/ml), ainsi que *S. pneumoniae*, *S. flexineri*, *S. typhi* et *C. albicans* (CMI=4,5 mg/ml). Cependant, les extraits des cals avaient présenté un effet antimicrobien nul.

**Mots clés** *Myrtus nivellei* Batt & Trab · *in situ* · *in vitro* · Extraits méthanoliques · Antioxydant · Antimicrobien

**Abstract** This work provides a contribution to the investigation and valorization of the Sahara-endemic plant: *Myrtus nivellei* Batt & Trab and the evaluation of the antioxidant effect of methanolic extracts harvested *in situ*, and *in vitro*

M. Touaibia (✉)  
Département de biologie,  
Université Saad Dahleb, Algérie  
e-mail : biomeriem@hotmail.com

F. Z. Chaouch  
Département d'agronomie,  
Université Saad Dahleb, Algérie

propagated calli of this plant. Several spectrophotometric analyzes were performed, showing that the *in situ* methanolic extract was richer in polyphenols than the *in vitro* methanolic extract. Also, It expressed a good power to scavenge free radicals ( $EC_{50} = 0.98$  mg/ml) and a great capacity to inhibit the peroxidation of linoleic acid estimated as 74.01%, largely higher than the ascorbic acid (50.57%) used as a positive control. However, the methanolic extracts of calli expressed the best ferric reducing power estimated as 66.71%. A very good antimicrobial activity was recorded for the extract of the plant harvested *in situ*, particularly against *S. aureus* (MIC=2.25 mg/ml), also against *S. pneumoniae*, *S. flexineri*, *S. typhi* and *C. albicans* (MIC=4.5 mg/ml). However, the calli extracts had presented no anti-microbial effect.

**Keywords** *Myrtus nivellei* Batt & Trab · *in situ* · *in vitro* · Methanolic extracts · Anti-oxidant · Anti-microbial

## Introduction

L'utilisation des plantes pour se soigner date de la préhistoire et tous les peuples sur tous les continents ont cette vieille tradition. Malgré les efforts des chimistes dans le domaine de la synthèse de nouvelles molécules, plus de 25% des médicaments prescrits dans les pays développés dérivent directement ou indirectement des plantes. Cependant, en tant que sources de médicaments, les plantes restent encore sous-exploitées surtout dans le domaine de la recherche de nouveaux antioxydants naturels, surtout que l'utilisation des substituants de synthèse est actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels [1].

En effet, les composés antimicrobiens, extraits à partir des plantes, regagnent une importance croissante grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé. Leur rôle suscite un très grand intérêt, notamment pour la prévention et le traitement

des infections engendrées par des pathogènes antibiorésistants [2].

*Myrtus nivellei* Batt & Trab. est un arbuste de 0,5 à 2 mètres de hauteur, il s'adapte très bien à la sécheresse. Cette plante est une espèce saharo-endémique, restreinte aux montagnes du *Tassili n'Ajjer*, *Tassili n'Immidir*, *Tefedest* et des massifs de l'*Ahaggar* algérien [3]. Elle apparaît au delà de 1400 à 2000 mètres d'altitude [4]. Cette plante est listée parmi les espèces en voie de disparition (d'après le décret exécutif n°93-285 du 23/11/1993 fixant la liste des espèces végétales protégées en Algérie). Les buissons de cette espèce sont toujours localisés à proximité des oueds [5].

Cette plante est très réputée au sud algérien pour ses vertus thérapeutiques en médecine populaire [3]. Cependant, ses usages restent toutefois exclusivement limités au savoir-faire ancestral. Pour traiter le mal de gorge et la fièvre, ses feuilles sont préparées en décoction à avaler le matin à jeun et avant de se coucher avec des figues et des raisins secs en raison de leur richesse en sucres, vu que le décocté des feuilles a un goût très amer. Elles sont utilisées pour traiter les problèmes gastro-intestinaux, les mycoses et le diabète ainsi que les problèmes hépatiques. Les baies très sucrées sont consommées soit fraîches ou séchées pour traiter les aphtes de la sphère bucco-dentaire [6]. Les feuilles sont utilisées également comme produit de beauté en macération dans du beurre fondu. Cette préparation (brillantine) est nécessaire à la coiffure des femmes et parfume agréablement le corps [7].

La population locale l'utilise aussi comme ressource pastorale pour la faune sauvage et domestique, comme aromate ou condiment culinaire, et parfois même comme matériaux de l'artisanat et à la construction d'habitats ou à la production énergétique au même titre que l'acacias, l'olivier, le ficus et bien d'autres espèces encore, ainsi que pour teinter les peaux d'animaux destinées à la fabrication de sacs et des ceintures. De plus, elle joue un rôle d'écran en protégeant les oasis contre les influences désertiques et crée un microclimat favorisant le développement de cultures sous-jacentes.

Dans cet article, nous ferons le point sur la composition en polyphénols des extraits méthanoliques de cette espèce, obtenus *in situ* et *in vitro*, ainsi que leurs éventuels effets anti-oxydants et anti-microbiens. Cette étude s'intègre également dans le contexte plus global de la mise en valeur de la biodiversité des plantes aromatiques algériennes, ainsi que dans le cadre de la préservation des espèces endémiques du Sahara central.

## Matériels et méthodes

### Matériel végétal *in situ*

Les rameaux feuillés de *M nivellei* Batt & Trab ont été récoltés en mai 2012, sur des pieds adultes, à 146 km du chef-lieu de la wilaya de Djanet (Tableau 1). Le séchage est effectué dans une étuve réglée à 75°C durant 72h. La masse foliaire séchée est ensuite réduite en poudre fine et bien conservée jusqu'à son utilisation.

### Mise en place et suivi des cultures *in vitro*

Des cals ont été initiés à partir de limbes foliaires issus de vitro-semis, sur un milieu MS [8], contenant une combinaison hormonale équilibrée (Kinetine/ANA ou Kinetine/2,4-D : 0,5/0,5 mg/l) et additionné de saccharose (30 g/l), de gélose (8 g/l) et des vitamines de Morel. On a noté la formation des cals primaires après 6 semaines, les cultures ont été entretenues par repiquages successifs chaque 21 jours. Les cals sont récupérés après 12 semaines, séchés ensuite broyés en poudre fine et bien conservés pour la suite des travaux.

### Extraction

Elle est réalisée par épuisements de la poudre végétale à chaud par Soxhlet dans le méthanol, l'extrait brut obtenu est soumis à une double filtration, puis concentré à l'évaporateur rotatif [9]. Le résidu sec récupéré est pesé pour déterminer son rendement et conservé au frais, dans un flacon sombre bien fermé, pour effectuer les tests phytochimiques.

### Dosage

Les extraits obtenus ont été soumis à une série de dosages spectrophotométriques afin de quantifier leur teneur en polyphénols totaux [10], en flavonoïdes totaux [11], en tanins [12] et en anthocyanes [13].

### Évaluation du pouvoir antioxydant

Le pouvoir antioxydant des extraits a été évalué par le test DPPH [14]. Le pouvoir inhibiteur de la peroxydation de l'acide linoléique est déterminé par la méthode thiocyanate [15]. Cependant, le pouvoir chélateur des ions  $Fe^{2+}$  est mesuré selon la méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) rapportée par Oyaizu [16].

**Tableau 1** Coordonnées géographiques du site de récolte *M nivellei* Batt & Trab.

Région	Localisation	Altitude	Latitude	Longitude
<i>Tassili n'Ajjer</i> Parc national du Tassili	Djanet	2018 m	24°59' Nord	8°07' Ouest

## Évaluation de l'effet antimicrobien

Les souches utilisées pour la mise en évidence de l'effet antimicrobien regroupent quatorze souches bactériennes, souvent responsables d'infections alimentaires, urinaires ou nosocomiales [*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619), *Moraxella catarrhalis* (ATCC 49143), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Acinetobacter lwoffii* (ATCC 19002), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13043), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhi* (ATCC 4404540), *Shigella flexneri* (ATCC 25936), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Proteus mirabilis* (ATCC 7002), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (ATCC 237013)], et deux levures responsables de candidoses et d'infections cutanées [*Candida albicans* (ATCC 10239), *Candida krusei* (ATCC 6258)] Les souches bactériennes ont été cultivées pendant une nuit à 37°C sur un milieu gélosé Mueller-Hinton (MH), à l'exception de *S. pneumoniae* (milieu MH contenant 50 ml de sang citraté/l). Les levures ont été cultivées pendant une nuit à 30°C sur gélose Sabouraud. Les extraits testés ont été préparés en solubilisant chaque résidu sec dans du myristate d'isopropyle à raison de 2 mg/ml, soit une charge de 50 µg/disque.

### Test de diffusion des disques sur milieu gélosé

La méthode de diffusion sur milieu gélosé a été utilisée pour la détermination de l'effet antimicrobien des extraits [17]. Une suspension du micro-organisme testé (0,1 ml de 10<sup>8</sup> cellules/ml) a été étalée sur le milieu MH. Des disques de papier filtre stérile (de 9 mm de diamètre) ont été imprégnés de 25 µl de l'extrait et placés dans les boîtes de Pétri inoculées.

Ces dernières ont été incubées à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 25 °C pendant 48h, pour les levures. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés en millimètres à l'aide d'un pied à coulisse. Tous les tests ont été effectués en triple.

### Détermination de la concentration minimale inhibitrice par la méthode de contact direct en milieu liquide

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration d'extrait où aucune croissance bactérienne n'est observée en 24h. Elle est pratiquée sur les souches qui ont présenté une nette sensibilité à l'égard des extraits testés (zone d'inhibition ≥15 mm) [18].

Pour chaque gamme de dilutions des extraits à tester (36 mg/ml, 18 mg/ml, 9 mg/ml, 4,5 mg/ml et 2,25 mg/ml, 1,125 mg/ml, 0,563 mg/ml), on prépare une série de tubes contenant chacun 1 ml du milieu de culture approprié (MH/Sabourand préalablement stérilisés) et un millilitre de l'ino-

culum microbien. Après une bonne homogénéisation, on ajoute 1 ml de la substance diluée dans son tube approprié, l'ensemble est incubé à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et 25°C pour les levures).

L'interprétation correspond à la plus faible concentration de l'extrait utilisé, pour laquelle le milieu de culture ne devient pas trouble, déclarant l'absence de toute croissance bactérienne.

### Analyse statistique

Tous les essais ont été répétés six fois et réalisés dans les mêmes conditions. De même, des corrélations ont été établies entre les différentes variables et les comparaisons statistiques ont été faites au moyen du test de Student. Les différences sont considérées significatives à p<0,05.

## Résultats et discussion

### Caractérisation physico-chimiques des extraits obtenus

Les extraits méthanoliques (MeOH) issus de la plante récoltée *in situ*, présentent une couleur marron très foncé avec un rendement de 59,15%, alors que les extraits des cals ont plutôt une couleur vert foncé associée à un rendement de l'ordre de 40,45% (Tableau 2).

### Résultats des analyses spectrophotométriques

Les extraits ont été soumis à une série de dosages spectrophotométriques, afin de déterminer la teneur de quelques composés phénoliques (Tableau 3). Les teneurs moyennes des polyphénols, des flavonoïdes et des anthocyanes dans l'extrait méthanolique de la plante obtenue *in situ* se sont montrés nettement plus élevés que leurs homologues obtenus à partir des cals. Il conviendrait probablement de jouer sur certaines conditions de culture (l'intensité et/ou la durée d'éclairage) afin d'optimiser la synthèse de ces métabolites.

**Tableau 2** Aspects, couleurs et rendements des extraits obtenus.

Nature de l'extrait	Rendement (%)	Aspect de l'extrait	Couleur de l'extrait
Extrait MeOH* <i>In vitro</i>	40.45	Collant pâteux	Vert foncé
Extrait MeOH <i>In situ</i>	59.15	Collant pâteux	Marron foncé
Extrait MeOH* : extrait méthanolique.			

Tableau 3 Dosage des composés phénoliques dans l'extrait méthanolique.				
Paramètre	Etalon sélectionné	Longueur d'onde (nm)	Teneur ( $\mu\text{g eq/mg ES}$ )*	
			In situ	In vitro
Polyphénols totaux	Acide gallique	760	348	73
Flavonoïdes totaux	Quercétine	415	152,25	91
Tanins	Acide tannique	760	155,27	22,36
Anthocyanes	Cyanidine	520	17,2	5,19

\*microgramme équivalent/milligramme d'extrait sec.

Dans ce même contexte, une série de travaux portant sur l'optimisation des conditions de culture de *Fagopyrum esculentum* ont permis d'obtenir des quantités intéressantes en polyphénols, mais qui suggèrent l'exposition des cals à un éclairage permanent 24h/24h [19]. Bahorun et al [20] ont rapporté que l'introduction de l'acide shikimique au milieu de culture augmente le rendement en polyphénols, ces résultats rejoignent aussi les observations faites par Shah et Mehta [21], qui ont amélioré la production de *Crotalaria* sp en introduisant différents acides phénoliques dans le milieu de culture.

Selon Gardeli et al [22], la teneur de l'extrait méthanolique en polyphénols chez l'espèce *Myrtus communis* varie entre 352 et 373  $\mu\text{g eq/mg ES}$ , et atteint son maximum en période de pleine floraison. Cependant, Ammar et al [23] rapportent que sa teneur égale 227  $\mu\text{g eq/mg ES}$ .

Nous avons constaté une faible présence de tanins dans les extraits méthanoliques des cals avec une concentration moyenne de 22,36  $\mu\text{g eq/mg ES}$ . Quant aux extraits préparés à partir de la plante obtenue *in situ*, elle est nettement plus élevée (155,27  $\mu\text{g eq/mg ES}$ ), nous pensons que l'état juvénile des cals en est la cause principale.

Le taux des anthocyanes s'est avéré nettement plus important dans l'extrait méthanolique *in situ* (17,2  $\mu\text{g eq/mg ES}$ ). Il est important de signaler que les anthocyanes, sur le plan théorique augmentent avec la maturation des fruits. Par ailleurs, d'après Bakker et al [24], la diminution du taux des anthocyanes peut être générée suite à des réactions de condensation avec d'autres molécules inférieures comme l'acide puracique, ainsi que par la combinaison des anthocyanes avec les tanins pour donner des polymères ayant des propriétés et des couleurs différentes de celles des anthocyanes, empêchant ainsi leur révélation quantitative.

### Résultats du test DPPH

Une réduction de l'absorbance du DPPH en solution est observée avec l'augmentation de la dose des extraits et les anti-oxydants standards (Figs 1, 2).

Les extraits ont manifesté un pouvoir antioxydant en piégeant les molécules du radical libre DPPH mais cette capacité est d'une puissance accrue avec l'acide ascorbique, alors que l'extrait des cals a présenté une capacité faible en comparaison avec les contrôles positifs.

Les valeurs  $EC_{50}$  déterminées en mg/ml expriment la concentration efficace de l'extrait antioxydant nécessaire

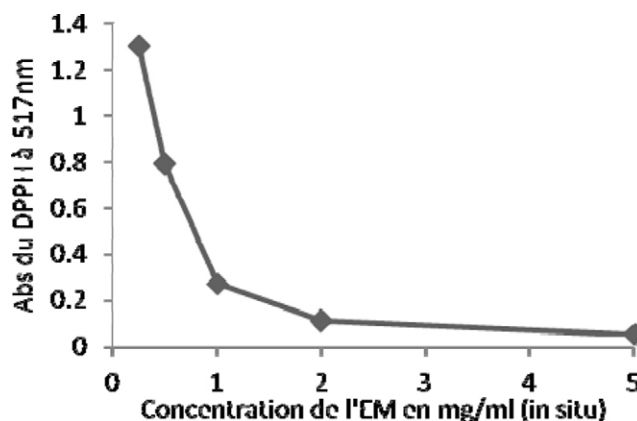


Fig. 1 Réduction de l'absorbance du DPPH en fonction de la dose de l'extrait méthanolique de la plante récoltée *in situ*

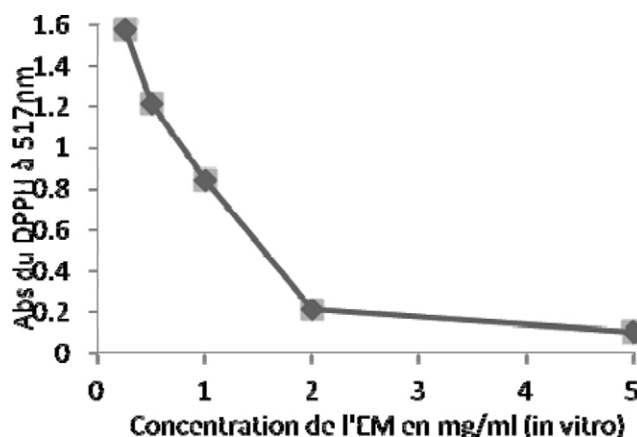


Fig. 2 Réduction de l'absorbance du DPPH en fonction de la dose de l'extrait méthanolique des cals multipliés *in vitro*



	Acide ascorbique (Cp*)	Alpha tocophérol (Cp)	Quercétine (Cp)	Extraits MeOH	
				<i>In situ</i>	<i>In vitro</i>
% d'inhibition	86,62	51,27	85,56	52,00	33,49
EC <sub>50</sub> (mg/ml)	0,39	0,99	0,43	0,98	1,44
Cp* : control positif.					

pour le piégeage et la réduction de 50% de molécules de DPPH mises en solution dans le méthanol (Tableau 4).

Selon les résultats enregistrés, l'extrait de la plante obtenue *in situ* est doté d'un bon pouvoir anti-oxydant (EC<sub>50</sub>=0,69 mg/ml), meilleur que celui exprimé par l' $\alpha$ -tocophérol, mais reste d'une efficacité moindre par rapport à celle exprimée par l'acide ascorbique et la quercétine respectivement.

Pour les contrôles positifs, la réaction de réduction du DPPH en solution est rapide et instantanée, le changement de couleur, exprimant le passage du radical DPPH de la forme oxydée (DPPH<sup>\*</sup>) à la forme réduite stable (DPPH-H), se fait dans un temps extrêmement court où l'état d'équilibre est atteint immédiatement et la réduction est presque complète. En comparant les résultats des extraits de la plante avec ceux des contrôles positifs utilisés, on peut classer l'activité anti-oxydante selon l'ordre suivant :

Acide ascorbique > quercétine > extrait de la plante (*in situ*) >  $\alpha$ -tocophérol > extrait des cals (*in vitro*).

L'activité anti-oxydante des extraits dépend essentiellement du taux de polyphénols accumulés durant le cycle végétatif de la plante [25]. La EC<sub>50</sub> de l'espèce *Myrtus communis*, rapportée par les travaux de Gardeli et al [22], est incluse entre 0,17 et 0,95 mg/ml, ils ont aussi démontré que les extraits récoltés en période estivale étaient les plus anti-oxydants.

### Résultats de l'activité anti-peroxydasique

Pour évaluer l'action des extraits sur l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique, nous avons effectué un test sur une période de sept jours (168h). Les extraits obtenus *in situ* et à partir des cals ont respectivement montré, des pourcentages d'inhibition de la lipo-peroxydation qui se sont avérés largement supérieurs à l'acide ascorbique utilisé comme contrôle positif (Tableau 5).

De façon générale, on peut les classer selon l'ordre décroissant suivant :

Extrait des cals (*in vitro*) > extrait de la plante (*in situ*) > acide ascorbique (Cp)

Les travaux de Banerjee et al [26], sur l'extrait méthanolique de *Syzygium cumini* (appartenant à la famille des Myrtaceae) ont rapporté qu'elle présente un pouvoir inhi-

biteur de la lipo-peroxydation estimé à 0,71% avec une EC<sub>50</sub>=222  $\mu$ g/ml.

Quant à l'aspect biochimique des cals, Thorpe et Gasper [27] ont montré une augmentation de l'activité peroxydasique au cours de la formation de cals issus de différents explants, et ont constaté que la perte de l'activité caulogène d'un cal correspond à une perte graduelle de l'activité peroxydasique. Cet accroissement de l'activité peroxydasique préalable à l'initiation des bourgeons végétatifs pourrait indiquer une réduction du niveau auxinique endogène.

### Résultats du pouvoir réducteur du fer

Le pourcentage de réduction des ions Fe<sup>2+</sup> exercé par l'acide ascorbique est égal à 43,22%, il paraît être dix fois plus important, que celui de la quercétine n'ayant exprimé que 4,98% (Tableau 6). Quant aux extraits testés, nous pouvons déduire que l'extrait de *Myrtus communis* cultivé *in vitro*, présente un pouvoir réducteur de 66,71%, largement supérieur à son homologue *in situ* (3,31%) ainsi qu'à celui des standards (Quercétine : 4.98%, Acide ascorbique : 43,22%).

	Acide ascorbique (Cp*)	Extraits MeOH	
		<i>In situ</i>	<i>In vitro</i>
I%	50.57	74,01	82,88
I% : pourcentage d'inhibition de la peroxydation.			

	Acide ascorbique (Cp*)	Quercétine (Cp)	Extraits MeOH	
			<i>In situ</i>	<i>In vitro</i>
% FRAP*	43.22	4.98	3.04	66.71
% FRAP* : pourcentage de réduction des ions de fer.				



D'après Gardeli et al [22], l'extrait méthanolique de *M. communis* L. exerce un important effet chélateur en pourcentage de réduction des ions  $Fe^{2+}$  estimé entre  $63,4 \pm 0,4$  et  $70,2 \pm 2,3$  mmol  $Fe^{2+}/l$ , il a aussi confirmé qu'il varie significativement selon les saisons.

L'activité la plus remarquable des extraits alcooliques, riches en composés phénoliques, réside au fait qu'ils sont capables de réduire les radicaux libres comme le superoxyde, le peroxyde, l'alcoxyde et l'hydroxyde, par transfert d'hydrogène ou par la chélation des ions métalliques impliqués dans la production des espèces oxygénées réactives [28,29].

D'autres études ont montré que les polyphénols, ainsi que certains dérivés aromatiques comme les monoterpènes, sont des bons inhibiteurs des enzymes responsables de la production des radicaux libres comme : la xanthine oxydase, la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase [30].

### Résultats du test antimicrobien

On constate que les souches : *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. flexneri*, *S. typhi* et *C. albicans* ont toutes montré une nette sensibilité à l'égard de l'extrait méthanolique de la plante obtenue in situ, avec des zones d'inhibition très proches (entre 15 et 19mm). Cette activité semble être due à leur richesse en composés phénoliques. Cependant, ils se sont

avérés inactifs à l'égard de six souches bactériennes Gram négatif : *M. catarrhalis*, *B. cereus*, *A. iwoffii*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae* et *P. mirabilis* (Tableau 7).

Pour ce qui est de l'extrait méthanolique des cals, nous avons noté une grande résistance de toutes les souches testées, où aucune zone d'inhibition n'a été détectée. On peut admettre que cette grande résistance microbienne est liée étroitement au stade de croissance juvénile des cals, n'ayant pas encore développé assez de métabolites secondaires, susceptibles d'avoir un effet antimicrobien.

De nombreux travaux ont démontré l'effet des extraits méthanoliques du myrte sur de nombreuses bactéries, cet effet antibactérien significatif est attribué particulièrement aux phloroglucinols [31,32] et à leur richesse en polyphénols [33].

Ainsi, les composés phénoliques sont reconnus toxiques pour de nombreuses bactéries et auraient pour cible les enveloppes des micro-organismes telles que la membrane cytoplasmique et la paroi. Cet effet est lié à leur groupement hydroxyle libre, qui permet une bonne solubilisation dans le milieu [34]. Ainsi, Rhayour [35] a montré que les HE, ou leurs composés majoritaires phénoliques seules ou associés, attaquent directement la bactérie, en se fixant sur son enveloppe cellulaire, entraînant un déséquilibre de la perméabilité membranaire et un blocage de la phosphorylation oxydative, qui représente la source de la vie respiratoire.

**Tableau 7** Effet antimicrobien des extraits méthanoliques étudiés.

Micro-organismes	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)*			Cp**
	Extraits méthanoliques			
	<i>In situ</i>	MIC***	<i>In vitro</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	19.33±3.63	2.25	0.00	11
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13.67±1.72	-	0.00	07
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	15.33±0.33	4.50	0.00	22
<i>Moraxella catarrhalis</i>	0.00	-	0.00	14
<i>Bacillus cereus</i>	0.00	-	0.00	16
<i>Acinetobacter iwoffii</i>	0.00	-	0.00	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.00	-	0.00	18
<i>Escherichia coli</i>	11.00±1.72	-	0.00	14
<i>Salmonella typhi</i>	17.33±0.47	4.50	0.00	17
<i>Shigella flexneri</i>	17.00±0.10	4.50	0.00	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	11.67±1.35	-	0.00	18
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.00	-	0.00	20
<i>Proteus mirabilis</i>	0.00	-	0.00	28
<i>Pseudomonas aerogenosa</i>	11.33±0.65	-	0.00	13
<i>Candida albicans</i>	17.66±0.65	4.50	-	14
<i>Candida krusei</i>	12.33±0.24	-	-	11

\*mm : millimètre ; \*\*Cp : contrôle positif (50 µg/disque): Amoxicilline pour les bactéries et Nystatine pour les levures ; \*\*\*Concentration minimale inhibitrice.

## Conclusion

Les extraits méthanoliques de *Myrtus nivellei* Batt et Trab. obtenus *in situ* et *in vitro* sont potentiellement riches en composés polyphénoliques et peuvent être considérés comme une source naturelle très importante de constituants phyto-pharmaceutiques utilisés pour éradiquer les radicaux libres ainsi que les souches microbiennes responsables de nombreuses pathologies. De même, il serait intéressant d'envisager l'utilisation de ces ressources naturelles pour remplacer les produits de synthèses, largement utilisés en industrie agro-alimentaire et pharmaceutique.

**Liens d'intérêts :** les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts

## Références

- Tadhani MB, Patel VH, Subhash R (2007) In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *J Food Compos Analysis* 20:323–9
- Essawi T, Srour M (2000) Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 70:343–9
- Ozenda P (1977) Flore du Sahara. Edition CNRS. Paris 623p
- Maka M (2004) Fleurs du Sahara, arbres et arbustes au cœur de leurs usages avec les touareg du Tassili. *Phytotherapia* 2:191–7
- Quezel P (1954) Contribution à l'étude de la flore et de la végétation du Hoggar. Monographies régionales. Travaux de l'institut de recherches sahariennes. 164p
- Hammiche V, Maiza K (2006) Traditional medicine in central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *J Ethnopharmacol* 105:358–67
- Wichens GE (1998) Ecophysiology of economic plants in arid and semi arid lands. Edition Springer. 343p
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plants* 15:473–97
- William B J (2007) The original of the soxhlet extractor. *J Chem Educat* 84:1913–5
- Slinkard K, Singleton VL (1977) Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *Am J Viticult* 28:49–55
- Park YK, Koo MH, Ikegaki M, et al (1997) Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Brazil Arch Biol Technol* 40:97–106
- Joslyn MA (1970) A serie of monography. Food. Sci. techn. Second Edition Board
- Jur P (1967). In: Touaibia M, Chaouch FZ (2014) Composition de l'huile essentielle et des extraits alcooliques de l'espèce saharo-endémique *Myrtus nivellei* Batt et Trab (Myrtaceae). *Bioressources* 4:13–20
- Cuendet M, Hostettmann K, Potterat O (1997) Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta* 80:1144–52
- Jayaprakasha GK, Singh RP, Sakariah KK (2001) Antioxidant activity of *Vitis vinefera* extracts on peroxidation modes in vitro. *Food Chem* 73:285–90
- Oyaizu M (1986) Studies on products of browning reaction-Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr* 44:307–15
- Ponce AG, Fritz R, Delvalle CE, et al (2003) Antimicrobial activity of essential oils on native microbial population of organic Swiss chard, *LWT* 36:679–84
- Senhaji O, Faid M, Elyachioui M, et al (2005) Antifungal activity of different cinnamon extracts. *J Med Mycol* 15:220–9
- Pousset JL (1989) Plantes médicinales africaines: utilisation pratique. Paris. In: Keita Y, Koné O, Ly AK, Häkkinen V (2004) Étude chimique et de l'activité anti-bactérienne des distillats de quelques variétés de mangue de Guinée. *Comptes rendus de chimie*. 1:1095–1100
- Baharun T (1997) Substances naturelles actives: La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Edition Mauritius. 133p
- Shah RR, Mehta AR (1978) Influence of phenolic acids on growth and production of phenolic compounds in *Crotalaria callus* cultures. *Bangl J Bot* 7:51–7
- Gardeli C, Vassiliki P, Athanasios M, et al. (2008) Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. et *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chem* 107:1120–30
- Ammar H, Lopez S, Gonzalez JS (2005). Assessment of the digestibility of some mediterranean shrubs by in vitro techniques. *Anim Feed Sci Technol* 119:323–31
- Bakker J, Bridle P, Honda T, et al (1997) Identification of anthocyanin occurring in some red wines. *Phytochemistry* 4:145–8
- Burda S, Oleszek W (2001) Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Food Chem* 49:2774–9
- Banerjee A, Dasgupta N, De B (2005) In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chem* 90:727–33
- Thorpe TA, Gasper TH (1978) Changes in isoperoxidases during shoot formation in tobacco callus in vitro. *J Physiol* 14:522–6
- Cook NC, Samman S (1996) Flavonoids Chemistry, Metabolism, Cardioprotectives effects and dietary sources, *J Nutr Biochem* 7:66–76
- Cao G, Sofic E, Prior RL (1997) Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships, *Free Radic Biol Med* 22:749–60
- Di Carlo G, Mascojo N, Izzo AA, et al (1999) Flavonoids: new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci* 65:337–53
- Kashman Y, Rotstein A, Lifshitz A (1974) The structure determination of two new acylphloroglucinols from *Myrtus communis*. *Tetrahedron Lett* 30:991–7
- Appendino G, Bianchi F, Minassi A, et al (2002) Oligomeric acylphloroglucinols from *Myrtus communis*. *J Natural Prod* 65:334–8
- Mansouri S, Foroumadi A, Ghanei T, et al (2001) Anti-bacterial activity of the crude extracts and fractionated constituents of *Myrtus communis*. *Pharmaceut Biol* 39:399–401
- Oussou KR, Coffi K, Nathalie G, et al (2004) Activité antibactérienne des huiles essentielles de trois plantes aromatique de la cote d'ivoire. *Comptes rendus de chimie* 7:1081–6
- Rhayour K, Bouchikhib T, Tantaoui-Elaraki A, et al (2003) The Mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Essent Oil Res* 15:286–92

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abrahams I. Festival Studies Being Thoughts on the Jewish Year. Kessinger Publishing. 2004. 225p.
2. Acquarone C, Buera P, Elizalde B. Pattern of pH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys. Food Chemistry. 2007. 101: 695-703.
3. Adrian J, Frangne R. La science alimentaire de A à Z. Ed. Lavoisier. Paris. 1991.600p
4. AFNOR (Association Française de Normalisation), Norme française NF ISO 3063: Huile essentielle d'ylang-ylang *Cananga odorata* (Lamarck). J.D. Hooker et Thomson. Paris. 2005.
5. AFNOR. Recueil de normes : Les huiles essentielles. Tome I. Echantillonnage et méthodes d'analyse. Afnor. Paris, 2000.
6. Agkul A, Bayrak A. The essential oil content and composition of myrtle (*Myrtus communis*) leaves. Doga. Turk. Tram. Ormancik. Dergisi. 1989. 13:143-147.
7. Akgül A. Spice science and technology. Edition Turkish Assoc of Technol. Ankara. 1993.185p
8. Akin M, Aktumsek A, Nostro A. Antibacterial activity and composition of the essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. and *Myrtus communis* L. growing in Northern Cyprus. Afr. J. Biotechnol. 2010. 9: 531–535.
9. Aidi-Wannes WA, Mhamdi B, Marzouk B. Variations in essential oils and fatty acid composition during *Myrtus communis* var. *italica* fruit maturation. Food Chemistry. 2009. 112:621-626.
10. Aidi-Wannes WA, Mhamdi B, Sriti J, Ben Jemia M, Ouchikh O, HamdaouiG, Elyes Kchouk M, Marzouk B. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communnis*) leaf, stem and flower. Food and Chemical Toxicology, 2010. 48:1362-1370.
11. Al-Hindawi MK, Al Deen IHS, Nabi MH, Ismail MA. Anti-inflammatory activity of some Iraqi plants using intact rats. J. Ethnopharmacology. 1989. 26(2):163-168.
12. Alamani MC, Cossu M. Radical scavenging activity and antioxidant activity of liquors of myrtle (*Myrtus communis* L.) berries and leaves. Italian journal of food science. 2004. 2:197-208.
13. Albasini A, Bertelli D. Determinazione della frazione aromatica in frutti di mirto, Atti Giorn.Stu. Mirto. J.Natural production. 1999. 37:287-289.

14. Aleksic V, Knezevic P. Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. Microbiological Research. 2014. 169: 240–254.
15. Ali-Delille L. Plantes medicinales d'algerie. Edition office de publications universitaires. Alger. 2010. 128 p.
16. Alves L. Aromathérapie. Edition Dunod. 2002. 240p.
17. Amensour M, Sendra E, Abrini J, Bouhdid S, Pérez-Alvarez JA, Fernández-López J. Total phenolic content and antioxidant activity of myrtle (*Myrtus communis*) extracts. Natural Product Communications. 2009. 4 (6): 819–824.
18. Ammar H, Lopez S, Gonzalez JS. Assessment of the digestibility of some mediterranean shrubs by in vitro techniques. Animal feed science and technology. 2005.119: 323-331
19. Angioni A, Barra A, Tuberoso C. Chemical composition of volatiles in Sardinian myrtle (*Myrtus communis*) alcoholic extracts and essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006. 54: 1420-1426.
20. APGIII. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants. APGIII botanical journal of the Linnean society. 2009. 161: 105-121.
21. Appendino G, Bianchi F, Minassi A, Sterner O, Ballero M. Oligomeric acylphloroglucinols from *Myrtus communis*. J.Natural.prod. 2002. 65:334-338.
22. Aprino P. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Fiches Techniques d'ingénieur.1985. 1505:130-136.
23. Aronne G, Russo D. Carnivorous mammals as seed dispersers of *Myrtus communis* in the mediterranean shrublands. Plant biosystem. 1997. 131:189-195.
24. Aronne G et Wilcock CC. First evidence of myrmecochoryin fleshy fruited shrubs of the mediterranean region. New phytol. 1994.127:781-788.
25. Arunachalam K, Parimelazhagan T. Anti-inflammatory, wound healing and in-vivo antioxidant properties of the leaves of *Ficus amplissima* Smith, Journal of Ethnopharmacology. 2013. 145:139–145
26. Aruoma OL. Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions. Journal of the American Oil Chemists' Society. 1996. 73:1617-1625.
27. Atefeibu ESI. Contribution à l'étude des tanins et de l'activité antibacterienne de *Acacia nilotica* var *Adansonii*. Thèse de doctorat en pharmacie. Université Cheikh Anta Diop de Dakar. Mali. 2002. 141p.
28. Auge R. La culture *in vitro* et ses applications horticoles.Ed Lavoisier.France. 1982. 180p.

29. Auge R, Beauchesne G, Boccom Gibod J, Decourtye L, Digat B, Jalouzot R, Meynier R, Morand JCL, Reynoird J, Sturullu DG, Vidalie M. La culture in vitro et ses applications horticoles. Edition Lavoisier. 1989. 256p.
30. Aydin C, Ozcan MM. Determination of nutritional and physical properties of myrtle (*Myrtus communis* L.) fruits growing wild in Turkey. Journal of food engineering. 2007. 79:453-458.
31. Aylin S, Ilhan G, Cemal Ç, Yesilada E. Hypoglycaemic effects of myrtle oil in normal and alloxan-diabetic rabbits. Journal of Ethnopharmacology. 2004. 9:311-318
32. Ayvaz A, Sagdic O, Karaborklu S, Ozturk I. Insecticidal activity of the essential oils from different plants against three stored-product insects. J Insect Sci. 2010. 10:21-22.
33. Azad-Ehyaee D, Emami M, Adimi P, Amin GH. Survey on antifungal effect of *Myrtus communis* leave extract on saprophytes and dermatophytes fungi. Journal of microbiology knowledge. 2010. 2(5):27-31.
34. Azadbakht M, Ziai H, Adbollahi F, Shabankhani B. Effect of essential oils of *Artemisia aucheri* Boiss, *Zataria multiflora* Boiss and *Myrtus communis* L on *Trichomonas vaginalis*. J. Med. plant. 2003. 8:35-40.
35. Azaizeh H, Saad B, Khalil K, Said O. The state of art of traditional arab herbal medicine in the eastern region of the mediterranean: a review. E-CAM. 2006. 3:229-235.
36. Baba-Aissa F. Encyclopédie des plantes utiles (Flore d'Algérie et du maghreb, substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident). Edition EDAS-Librairie Moderne-Rouiba.2000. 97p.
37. Bahorun T. Les polyphénols de *Crataegus monogyna* Jacq. *in vivo* et *in vitro* : Analyses et activités anti-oxydantes. Thèse de doctorat en sciences agronomiques. Université de Lille. France.1995. 150 p.
38. Bahorun T. Substances naturelle actives: La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Edition Mauritius, 1997. 133 p.
39. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils. Food and chemical toxicology. 2008. 46:446-475.
40. Bakker J, Bridle P, Honda T, Kuwano H, Saito N, Terahara N, Timberlake CF. Identification of anthocyanin occurring in some red wines. Phytochemistry. 1997. 4:145-148
41. Banerjee A, Dasgupta N, De B. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. Food chemistry. 2005. 90:727-733
42. Bani-Ameur F, Alouani M. Viabilité et dormance des semences d'*Aargania spinosa*. Revue du Laboratoire de variabilité génétique.Univ Agadir. 1998. 1 :31-35.
43. Barboni T. Caractérisation chimique d'un hybride de clémentine et du myrte commun. Etude de cas d'embrassement généralisé éclair par la détermination des COVb. Analyse des fumées

issues de la combustion des végétaux. These de doctorat en Biochimie. Université Pasquale Paoli de Corce.. France. 2010. 256p.

**44.** Barboni T, Venturini N, Paolini J, Desjobert JM, Chiaramonti N, Costa J. Characterisation of volatiles and polyphenols for quality assessment of alcoholic beverages prepared from Corsican *Myrtus communis* berries. Food Chemistry. 2010. 122:1304-1312.

**45.** Bardeau F. La médecine par les fleurs. Edition Robert Laffont. Paris.1978. 440p.

**46.** Bartels A. Guide des plantes du bassin méditerranéen. Edition Eugen Ulmer. France.1998. 400p.

**47.** Battandier JA, Trabut L. Contribution à la flore du pays des Touaregs. Bulletin de la Société Botanique de France 1911. 58: 669-677

**48.** Bayliss MT. Proteoglycans: structure and molecular organisation in cartilage. In: Hukins D.W.L. (Ed.). Connective Tissue Matrix. Macmillan. London, 1984. 55p.

**49.** Baytop T. Therapy with medicinal plants in Turkey, past and present.1999. In: Traveset A, Riera N, Mas R. Ecology of fruit color polymorphism in *Myrtus communis* and differential effects of birds and mammals on seed germination and seedling growth. J. Ecology. 2001. 89:749-760.

**50.** Baytop T. Treatment with plants in Turkey .1984. Istanbul Univ.In: Aydin C, Ozcan MM. determination of nutritional and physical properties of myrtle (*Myrtus communis* L) fruits growing wild in Turkey. Journal of Food Engineering. 2007. 79(2):453-458.

**51.** Behrens B, Kärber UG.Toxicity on mice.Arch. exper. Path. U. Pharmakol, 1949. 379p

**52.** Belaïche P. Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome I. l'aromathérapie. Maloine S.A. Editeur, Paris. 1979. 204p.

**53.** Bellakhdar J. La pharmacognosie marocaine traditionnelle: medecine arabe et savoir populaire.Al Birunia.Rabat. 1997. 2: 337-340.

**54.** Belot A. Dictionnaire des arbres et arbustes du jardin. Edition Bordas. Paris. 1987.383p.

**55.** Beloued A. Les plantes médicinales d'Algérie. Ed office de publications universitaires. Alger. 2001. 277 p

**56.** Bendahou M. Composition chimique et propriétés biologiques des extraits de quelques plantes aromatique et médicinales de l'ouest algérien, these de doctorat en sciences, Université Aboubekr Belkaid. Université de Tlemcen. 2007. 295p.

**57.** Benigni R, Capra C, Cattorini PE. Les plantes medicinales. 1964. In: Flamini G, Luigi Cloni P, Morelli I, Maccioni S, Baldini R. Phytochemical typologies in some populations of *Myrtus communis* L. on Caprione promontory (East Liguria, Italy).Food chemistry. 2004. 85:599-604

**58.** Beniston N. Flore d'Algérie. Ed unité Reghaïa. Alger. 1985. 395 p

- 59.** Benjilali B, Tantaoui-Elaraki A, Ismaili-Alaoui M et Ayadi A. Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact en milieu gélosé. *Plantes médicinales et phytothérapie*. 1986. 20:155-167.
- 60.** Berkan T, Ustunes L, Lermioglu F, Ozer A. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of an aqueous extract of *Erythraea centarium*. *Planta Med*. 1991. 57:7-34.
- 61.** Berka-Zougali B, Hassanib A, Besombes C, Allafa K. Extraction of essential oils from Algerian myrtle leaves using instant controlled pressure drop technology, *Journal of Chromatography A*. 2010. 1217: 6134–6142
- 62.** Berrie AMM. Germination and dormancy. In: Wilkins MB. *Advanced plant*. Pitman Ltd. Melbourne. 1985. 9:44-46.
- 63.** Berthod A, Billardello B, Geoffroy S. Polyphenols in countercurrent chromatography. An example of large scale separation. *Analysis*. EDP Sciences. 1999. 27:750-757.
- 64.** Beylier-Maurel MF. Bacteriostatic activity of some Australian essential oils. *Perfum flavourist*. 1979. 4:23-25.
- 65.** Bezanger B. *Plantes médicinales des régions tempérées*. Edition Maloine. Paris. 1980. 413p.
- 66.** Bharate SB, Khan SI, Yunus NAM, Chauthi SK, Jacob MR, Tekwani BL, Khan IA, Singh IP. Antiprotozoal and antimicrobial activities of O-alkylated and formylated acylphloroglucinols. *Bioorg. Med. Chemistry*. 2007. 15:87-96.
- 67.** Bhavna S, Chandrajeet B, Partha R. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol*. 2008. 46: 2376-2383
- 68.** Bianchini F, Corbetta F. *Atlas des plantes médicinales*. Edition Fernand Nathan. Paris. 1975. 243p.
- 69.** Bidet D, Gagnault JC, Girard P, Trotin F. Inflammation, allergie, douleur et acide arachidonique: du jardin des hespérides à la cascade de l'acide arachidonique: Les flavonoïdes. *L'actualité chimique*. *Planta med*. 1987. 6: 89 - 97.
- 70.** Blakeley WF. *A key to the Eucalyptus*. Edition Commonwealth forestry. Canberra. Sydney. 1959. 228p.
- 71.** Bianchini F, Azzura CP. *Le guide vert des plantes et des fleurs*. SOLAR. Espagne. 1975. 522p
- 72.** Bnouham M, Mekhfi H, Legssyer A, Ziyat A. Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *J. Biabetes Metabolism*. 2002. 10:33-50.
- 73.** Boelens MH, Jimenez R. The chemical composition of Spanish Myrtle oils, Part I, *Journal of Essential Oil Research*. 1991. 3:173-177.

- 74.** Boelens MH, Jimenez R. The chemical composition of Spanish myrtle oils. Part II. Journal of Essential Oil Research. 1992. 4: 349-353.
- 75.** Boizot N, Charpentier JP. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre fougère. Le cahier des techniques de l'INRA. 2006. 3:79-82
- 76.** Bonafé F. Flore de Mallorca. III Editorial Moll Mallorca, Spain. 1979. In: Traveset A, Riera N et Mas R. Ecology of fruit colour polymorphism in *Myrtus communis* and differential effects of birds and mammals on seed germination and seedling growth. J. Ecology. 2001. 89:749-760
- 77.** Bonjar SGH, Nik AK, Haydari MR, Ghasemzadeh MH, Farrokhi PR, Moein MR, Mansouri S, Foroumadi A. Anti-Pseudomonas and anti-bacilli activity of some medicinal plants of Iran . J Pharmacol. 2003. 11:157-163
- 78.** Bonjar SGH. Antibacterial screening of plants used in Iranian folkloric medicine. Fitoterapia. 2004. 75:231-235.
- 79.** Bonnaillie C, Salacs M, Vassilova E, Saykova I. Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.). Revue de génie industriel. 2012. 7: 35-45.
- 80.** Botineau M. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Ed. Tec & Doc, Paris. 2010. 1335p
- 81.** Bouchikhi-Tani Z. Lutte contre la bruche du haricot *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera, *Bruchidae*) et la mite *Tineola bisselliella* (Lepidoptera, *Tineidae*) par des plantes aromatiques et leurs huiles essentielles. Thèse de doctorat en sciences biologiques. Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen. Algérie. 2011.169p.
- 82.** Bouchonnet R. Les différents types de spectromètre de masse utilisés pour l'analyse. Edition Masson. 1999. 356p.
- 83.** Bouderrah M. Comparaison de deux modes de vitro-propagation à partir de vitro-semis d'*Eucalyptus camaldulensis*. J. Plant physiology. 1988. 45:102-106.
- 84.** Bouhadjara K. Contribution à l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes *Oudneya africana* R.Br. et *Aristida pungens* L. Thèse de doctorat en chimie organique appliquée. Université Aboubekr Belkaid. Algérie. 2005. 149p.
- 85.** Boukef MK. Les plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne. Edition Agence de coopération culturelle et technique. Tunisie. 1986. 436p.
- 86.** Boukhatem MN, Hamaidi MS, Saidi F, Hakim Y, Benomier K. Extraction, composition et valorisation de l'eau aromatique de géranium rosat (*Pelargonium graveolens*) dans la dermatopharmacie. Nature et Technologie. 2010. 2(1):59-64
- 87.** Boulay M. Multiplication et clonage rapide de *Séquoia sempervirens* par la culture *in vitro*. Assoc.forêt.cellulose. 1979. 14:49-55.



- 88.** Boullard B. Plantes médicinales du monde: Réalités et croyances. Edition Estem. 2001. 660p
- 89.** Bourgaud F, Gravot A, Gontier E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science*. 2001. 161:839-851
- 90.** Bourgeois CM, Mescle JF, Zucca AJ. Microbiologie alimentaire : aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaire. Tome I. Edition Lavoisier. Paris 1988. 149.
- 91.** Bouzabata A, Bazzali O, Cabral C, Gonçalves MJ, Cruz MT, Bighelli A, Cavaleiro C, Casanova J, Salgueiro L, Tomi F. New compounds, chemical composition, antifungal activity and cytotoxicity of the essential oil from *Myrtus nivellei* Batt & Trab., an endemic species of Central Sahara. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013. 149 :613–620
- 92.** Bouzabata A, Cabral C, Gonçalves MJ, Cruz MT, Bighelli A, Cavaleiro C, Casanova J, Tomi F, Salgueiro L. *Myrtus communis* L as source of a bioactive and safe essential oil. *Food and Chemical Toxicology*. 2015. 75:166–172
- 93.** Boxus P. Multiplication végétative: Micropropagation et embryogenèse somatique en biotechnologies végétales. Edition CNED. 1995. 191p.
- 94.** Brada M, Tabti N, Boutoumi H, Wathelet JP, Lognay G. Composition of the essential oil of leaves and berries of Algerian myrtle (*Myrtus communis* L.), *Journal of Essential Oil Research*. 2012. 24: 1-3.
- 95.** Bradesi J, Casanova J, Costa J, Bernardini AF. Chemical composition of myrtle leaf oil from Corsica. *J. Essential oil research*. 1997. 9:283-288.
- 96.** Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 1998. 56: 317-33.
- 97.** Brhadda N, Abousalim A, Walali Loudiyi D, Benali D. Effet du milieu de culture sur le microbouturage de l'olivier (*Olea europaea* L.). *Picholine Marocaine Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2003. 7 (34):177-182.
- 98.** Bruna S, Mercuri A, Cervelli C, Braglia L, De Benedetti L, Schiva T. Genetic Characterization of *Myrtus communis* Wild Genotypes Using AFLP Markers. *Acta Horticulturae*. 2004. 4:156-160.
- 99.** Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. 2<sup>ème</sup> édition. Tec & Doc. Lavoisier, Paris. 1993. 915 p.
- 100.** Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. 3<sup>ème</sup> édition. Editions Tec & Doc. Lavoisier. Paris. 1999. 1120p.
- 101.** Buccon-Gibod J. La technologie de la culture *in vitro* In: Bailliere, J.B. La culture *in vitro* et ses applications. Edition Tec & Doc. Paris. 1989. 175p

- 102.** Buchbauer G, Jirovetz L. Aromatherapy—use of fragrances and essential oils as medicaments. *Flavour and fragrance journal*. 1994. 9(5) :217-222.
- 103.** Bulletin de la société préhistorique française (N°4). Edition CNRS. Marseille.1963. 151p.
- 104.** Burda S, Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Food chemistry*. 2001. 49:2774-2779.
- 105.** Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. Food Microbiol*. 2004. 94:223–253.
- 106.** Caillard J. Les plantes, des usines chimiques en miniature. *Ressources documentaires*. CRDP Midi-Pyrénées. 2003. 13: 6-9.
- 107.** Cakir A. Essential oil and fatty acid composition of the fruits of *Hippophae rhamnoides* and *Myrtus communis* from Turkey. *Biochem system ecology*. 2004. 32:809-816.
- 108.** Canhoto JM, Lopes ML, Cruz GS. *In vitro* propagation of *Myrtus communis* through somatic embryogenesis and axillary shoot proliferation. 1<sup>st</sup> international meeting of aromatic and medicinal mediterranean plants. Portugal. (24-26/05/1998). Proceeding1: 289-292.
- 109.** Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships, *Free Radic. Biol. Med*. 1997. 22: 749-760.
- 110.** Careri M, Elveri L, Mangia A, Musci M. Spectrophotometric and coulometric detection in the high-performance liquid chromatography of flavonoids and optimization of sample treatment for the determination of quercetin in orange juice, *Journal of Chromatography A*. 2001. 881: 449-460.
- 111.** Cavin A. Investigation phytochimique de trois plantes Indonésiennes aux propriétés antioxydante et antiradicalaire: *Tinospora crispa* (Ménispermacées), *Merremia emarginata* (Convolvulacées) et *Oropea enneandra* (annonacées). Thèse de doctorat en sciences biologiques. Université de Lausanne. Suisse.1999. 241p.
- 112.** Chabert G. Les myrtes et aromathérapie, Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Grenoble, France. 2013. 119p.
- 113.** Chalchat JC, Garry RP, Michet A. Essential oil of Myrtle (*Myrtus communis* L) of the mediterranean littoral. *Journal of essential Oil Research* 1998.10:613-617.
- 114.** Chamouveau A. Les usages externes de la phytothérapie. Edition Maloine.1979. 270p.
- 115.** Chaouche M. Recherche et détermination structurale des composés flavoniques de l'espèce : *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). Mémoire de magister en chimie organique. Université mentouri, Constantine. 2010. 107p

- 116.** Charles VM, Rusell RCG, Williams NS. Short practice of surgery 20<sup>th</sup> edition. Champan and Hall. London. 1995. 92p.
- 117.** Chaussat R, Bigot C, Nozeran R. La multiplication végétative des plantes supérieures. Edition Gauthier-Villars. 1980. 277p
- 118.** Chebil L. Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia*: études cinétique, structurale et conformationnelle. Thèse de Doctorat en sciences biologiques. Institut national polytechnique de Lorraine. Nancy. France. 2006. 236p.
- 119.** Chen CN, Weng MS, Wu CL, Lin JK. Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. *J. Pharmacology*. 2004. 1:175-185.
- 120.** Chun LY, Jian WL, Dong ZW, Yan HL, Feng Q. In vitro anti-tumor activity of 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone against six established human cancer cell lines. *Pharmacological Research*. 2004. 50:505-510
- 121.** Chung KT, Wong TY, Huang YW, Lin Y. Tannins and human health: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 1998. 38:421-464.
- 122.** Chung YC, Chang CT, Chao WW, Lin CF, Chou S.T. Antioxidative activity and safety of the ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002. 50:2454–2458
- 123.** Çıblak N. Anadolu'da Ölüm Sonrası Mezarlıklar Çevresinde Oluşan İnanç ve Pratikler, in *Türk Kültürü Y. XL*. 2002. 474:605-614
- 124.** Ciccarelli D, Garbari F, Pagni AM. The flower of *Myrtus communis*: Secretory structures, unicellular papillae, and their ecological role. *Flora*. 2008. 203:85-93.
- 125.** Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, Bruyne TD, Hermans N, Totté J, Pieters L, Vlietinck AJ. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002. 79:213-220
- 126.** Çınar AA. Muğla ve Çevresi Sözlü Kültürü ve Toplumsal Değerleri, Muğla Belediyesi Yayınları. 2007. 110p.
- 127.** Clevenger JF. Apparatus for volatile oil determination, Description of new type. *American Perfumer & Essential Oil Review*. 1928. 467-503.
- 128.** Code de l'environnement: Principaux textes législatifs et réglementaires relatifs à la protection de l'environnement. Office du ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement 2002. 442p.
- 129.** Cloudsley-thompson JL. *Biology of deserts*. Publié par Institute of biology. 1954. 223p.

- 130.** Compbell MS. *Myrtus L.* 1968. In : Tutin TG, Heywod VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb TG. Structure and development of elaiosome in *Myrtus communis* seeds. *Flora europea.* 1968. 2:303-304.
- 131.** Cook NC, Samman S. Flavonoids Chemistry, Metabolism, Cardioprotectives effects and dietary sources, *J. Nutr. Biochem.* 1996. 7: 66-76.
- 132.** Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews.* 1999. 12 (4):564-582.
- 133.** Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* 2000. 88:170-175
- 134.** Crété P. Précis de botanique, systématique des angiospermes Tome II ; 2<sup>ème</sup> édition révisée. Faculté de Pharmacie de Paris. Ed Masson. 1956. 429p.
- 135.** Cuendet M. Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie: *Fagraea blumei* (Loganiaceae) et de trois plantes d'altitude : *Bartsia alpina* (Scrophulariaceae), *Loiseleuria procumbens* (Ericaceae) et *Campanula persicifolia* L. Thèse de doctorat en pharmacognosie. Université de Geneve. Suisse. 1999. 224p.
- 136.** Dafni A, Lev E, Beckmann S, Eichberger C. Ritual Plants of Muslim Graveyards in Northern Palestine. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine.* 2006. 2:38.
- 137.** Damiano C, Padro MDA, et Fratarelli A, Propagation and establishment *in vitro* of Myrte (*Myrtus communis*) Pomegranate (*Punica granatum*) and mulberry (*Morus alba*), Propagation of ornamental plants. 2008. 8(1):3-8.
- 138.** Da-Silva EJA, Oliveira AB, Lapa AJ. Pharmacological evaluation of the antiinflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and clausenone, in rats and mice. *J Pharm Pharmacol.* 1994. 46:118-122.
- 139.** Davis PH. *Flora of Turkey and the east Aegean Islands.* Univ Press, Edinburgh. 1982. 172p.
- 140.** De Laurentis N, Rosato A, Gallo L, Leone L, Milillo MA. Chemical composition and antimicrobial activity of *Myrtus communis*. *Revue E.P.P.O.S. Italy.* 2005. 39:3-8
- 141.** Deba F, Dang Xuan T, Yasuda M, Shinkichi T. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa var. radiata*. *Food control.* 2008. 19(4):346-352
- 142.** Dell'Agli M, Sanna C, Rubiolo P, Basilico N, Colombo E, Scaltrito MM, Ousmane Ndiath M, Maccarone L, Taramelli D, Bicchi C, Ballero M, Bosisio E. Anti-plasmodial and insecticidal activities of the essential oils of aromatic plants growing in the Mediterranean area. *Malaria J.* 2012.11:219–29.

- 143.** Della A, Hadjichambi DP, Hadjichambi AC. An ethnobotanical survey of wild edible plants of Paphos Larnaca countryside of Cyprus. *J.Ethnobiol.Etnomed.* 2006. 2:125-129.
- 144.** De Pooter HL, Schamp N. Comparaison of the volatils composition of some *Calamintha satureja* species. In: *Progress in essential oil research.* Ed. E-J. Brunk, Walter De Gruyter, Berlin. 1986.150p.
- 145.** Deriu A, Branca G, Mollicoti P, Pintore G, Tirillini B, Paglietti B, Mura A, Sechi LA, Fadda G, Zanetti S. In vitro activity of essential oil of *Myrtus communis* against *Helicobacter pylori*. *J. Antimicrob agents.* 2007. 30:562-565.
- 146.** Deruaz D, Reynaud J. Evaluation of the molluscidicidal properties of *Myrtus communis L.* (Myrtaceae). *J. Phytotherapy research.* 1993. 7:428-430.
- 147.** Diallo A. Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako. Mali. 2005. 99p
- 148.** Diarra MN. Etude phytochimique d'une plante antipaludique: *Spilanthes oleracea*. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako. Mali. 2003. 78p.
- 149.** Diaz AM, Abeger A. A new contribution to the study of polyphenolic compounds in seeds of *Myrtus communis L.* *J. Medicine and phytotherapy.* 1987. 21:317-322
- 150.** Di Carlo G, Mascojo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.* 1999. 65 : 337-353.
- 151.** Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal JM, Van de Vorstenbosch C. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology.* 2001. 21:15–23.
- 152.** Dissemmond J, Goos M, Wagner SN. The role of oxidative stress in the pathogenesis and therapy of chronic wounds. *Hautarzt* 2002. 53:718–723.
- 153.** Djellili H. Effets pharmacologiques pulmonaires des flavonoïdes : Caractérisation *in vitro* des effets de la quercétine et de la génistéine. Doctorat en sciences Biologiques. Université Ferhat ABBAS. Algerie. 2013.160p.
- 154.** Dominioguez E, Ortega MM. The effect of seed extracts of *Myrtus communis* on the growth and germination of filamentous fungi. *Anal.acad.farma.*1983. 49:97-108.
- 155.** Dong-Sun L, Nam-Soon K, Sang-Han L. 2, 2-Diphenyl-1- picrylhydrazyl hydrate, a stable free radical: an  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor. *J. Biological and pharmaceutical research.* 2001. 24:727-728.
- 156.** Doré C, Varoquaux F. Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées. INRA. 2006. 812p

- 157.** Douglas MH, Klink JWV, Smallfield BM, Perry NB, Anderson RE, Johnstone P, Weavers RT. Essential oils from New Zealand manuka: triketone and other chemotypes of *Leptospermum scoparium*. *Phytochemistry*. 2004. 65(9):1255-1264
- 158.** Dowson A, Aten M. Composition, maturation, récolte et conditionnement des dattes. Collection F.A.O. Rome. 1963. 167p.
- 159.** Druart PH, Kevers C, Boxus PH, Gasper TH. In vitro promotion of root formation by apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases. *flanzenphysiol*. 1983. 108: 429-436.
- 160.** Druart PH. *In vitro* culture and micropropagation. Edition Verlag Berlin Heidelberg. 1992. 301p.
- 161.** Dubief J. Le climat du Sahara. Thèse de doctorat de l'Institut de recherches sahariennes. Alger: Université d'Alger. 1959. 586 p
- 162.** Duke JA. Handbook of medicinal herbs. CRC Press, Boca Raton, 1988. 198p.
- 163.** Dung NT, Bajpai VK, Yoon JI, Kang SC. Anti-inflammatory effects of essential oil isolated from the buds of *Cleistocalyx operculatus* Merr & Perry. *Food and Chemical Toxicology*. 2009. 47:449–453
- 164.** Duraffourd C, Lapraz JC. *Traité de phytothérapie clinique*. Elsevier Masson, Paris, 2002. 145p.
- 165.** Duval C, Duval R. *Dictionnaire de la chimie et de ses applications*. Edition Tec & doc. Paris. 1978. 880p.
- 166.** Elfellah MS, Akhter MH, Khan MT. Anti-hyperglycemic effect of an extract of *Myrtus communis* in streptozotocin-induced diabetes in mice. *J. Ethnopharmacol*. 1984. 11:275-281.
- 167.** El-Sissi HI, El-Ansary H. Tannins and polyphenolics of the leaves of *Myrtus communis*. *Planta Medica*. 1967. 15:41-51.
- 168.** Erdman KA, Fung TS, Doyle-Baker PK, Verhoef M, Reimer RA. Dietary supplementation of highperformance Canadian athletes by age and gender. *Clinical Journal of Sport Medicine*, 2007. 17(6):458-464.
- 169.** Ertuğ F. Wild Edible Plants of the Bodrum Area (Muğla, Turkey). *Turkish Journal of Botany*. 2004. 28:161-174
- 170.** Escarpa A, Gonzalez MC, High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties, *Journal of Chromatography A*. 1998. 823: 331-337.
- 171.** Espinoza N, Lizzarraga R, Siguna SC, Brayn J, Dodds H. Tissu culture: Micropropagation. Conservation and export of potato gerplasm. CIP Research Guide. Edition CIP.1992. 190p.

- 172.** Fahim AB, El-Ghaithi M, Amesh S, Dhayabaran D. Biochemical studies on the effect of phenolic compounds extracted from *Myrtus communis* in diabetic rats. *Tamil-nadu J Vet Anim Sci.* 2009. 5(3):87–93.
- 173.** Fahn A. Secretory tissues in vascular plants. *J. Phytol.* 1988. 108:229-257.
- 174.** Farah A, Affifi A, Fechtal M, Chhen A, Satrani B, Talbi M, Chaouch A. Fractional distillation effect on the chemical composition of Moroccan myrtle (*Myrtus communis L.*) essential oil. *Flavour & fragrance J.* 2006. 21:351-354.
- 175.** Farombi EO. African indigenous plants with chemotherapeutic potentials and biotechnological approach to the production of bioactive prophylactic agents. *African Journal of Biotechnology.* 2003. 2(12): 662-671.
- 176.** Fauchere JL. Bactériofiches: Techniques en bactériologie clinique. Edition marketing SA. 1997. 174p.
- 177.** Fauchere JL, Avril JL. Bactériologie générale et Médicale. Edition Ellipse.2002. 395p.
- 178.** Favre JM. La rhizogenèse, aspects divers d'un processus d'organogenèse végétale. *J.Physiol.* 1977. 38:37-52
- 179.** Feisst C, Franke L, Appendino G, Werz O. Identification of molecular targets of the oligomeric nonprenylated acylphloroglucinols from *Myrtus communis* and their implication as anti-inflammatory compounds. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005. 315(1):389–396.
- 180.** Ferber M. Dictionary of Literary Symbols, Edition Cambridge University Press, 2007.978p
- 181.** Fine AM. Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phyto-pharmaceutical applications. *Altern Med Rev.* 2000. 5:144-151.
- 182.** Flamini G, Luigi Cloni P, Morelli I, Maccioni S, Baldini R. Phytochemical typologies in some populations of *Myrtus communis L.* on Caprione promontory (East Liguria, Italy). *Food chemistry.* 2004. 85:599-604.
- 183.** Fonteneau JM, klusiewicz P. Travaux pratiques de préparation et de conditionnement des médicaments. Groupe Liaisons. Bruxelles. 2008. 120p.
- 184.** Franchomme P, Penoël D, Jollois R. L'aromathérapie exactement. Edition Jollois, Bayeux. 2003. 490p
- 185.** Frankel EN, Meyer AS. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2000. 80(13):1925-1941.
- 186.** Fritsch H, Griesbach H. Biosynthesis of cyanidin in cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Phytochem.* 1975. 14: 2437-2442.

- 187.** Gabor JB. Crop productivity. American Society of agronomy.1988. 45:1-27
- 188.** Galati EM, Monforte MT, Kirjavainen S, Forestieri AM, Trovato A, Tripodo MM. Biological effects of hesperidin: A citrus flavonoid.antiinflammatory and analgesicactivity.bJ. Pharmacology. 1994. 40:709-12.
- 189.** Gale EF, Cundliffe E, Reynolds PE, Richmond MH, Warring MJ. Drugs affecting the function of the cytoplasmic membrane. In: The Molecular basis of antibiotic action. Wiley & Sons (ed). London. 1981. 128p.
- 190.** Garcia-Agaez AN, Apan TOR, Delgado HP, Velazquez G, Maetinez-Vazquez M. Anti-Inflammatory activity of coumarins from *Decatropis bicolor* on TPA ear mice model, *Planta Med.* 2000. 66:279-281.
- 191.** Garcia-Salas P, Morales-Soto A, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples.*Molecules.*2010.15:8813-8826.
- 192.** Gardeli C, Vassiliki P, Athanasios M, Kibouris T, Komaltis M. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus L* et *Myrtus communis L*: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. Food chemistry. 2008. 107:1120-1130.
- 193.** Garnéro J. Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. Edition Tech & Doc. 1991. 180p.
- 194.** Garreta R. Des simples à l'essentiel : De l'herboristerie à l'aromathérapie, pratiques et représentations des plantes médicinales. Les anthropologiques, Presses Universitaires du Mirail, Toulouse, 2007. 359p.
- 195.** Garry RP, Chalchat JC. Les huiles essentielles de Myrte du pourtour méditerranéen, 10<sup>ème</sup> Journées Internationales des Huiles Essentielles. Dignes-les-Bains. Actes Rivista Italiana EPPOS. (5-9/1992). N° spécial:524-532.
- 196.** Garvilovie M, Magonot MJ, Walach J. Manipulation d'analyse biochimique. Edition Doin. 3<sup>ème</sup> édition. 1996. 453p.
- 197.** Gautheret RJ. La culture des tissus végétaux, techniques et réalisations. Edition Masson. 1959. 863p.
- 198.** Gauthier R. The essential oils of Myrtle harvested in Morocco. Al-Birunia. Maroc. 1988. 134p.
- 199.** Gauthier R. Activité de l'extrait de *Myrtus communis* contre *Ediulus Hmanus Capitatus*. Brochure Tome III. 1989. pp 93-108.
- 200.** Gayal R, Vindit K. Handbook of botany. Edition Ram. India. 1991. 78p.



- 201.** Gaziano JM, Gibson CM. Potential for drug-drug interactions in patients taking analgesics for mild-to-moderate pain and low-dose aspirin for cardioprotection. *Am. J. Cardiol.* 2006. 97:9-23.
- 202.** Geraut C, tripodi D. Dermatoses professionnelles et aldéhydes. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique.* 2007. 47:144-149.
- 203.** Ghasemi K, Ghasemi Y, Ehteshamnia A, Nabavi SM, Nabavi SF, Ebrahimzadeh MA, Pourmorad F. Influence of environmental factors on antioxidant activity, phenol and flavonoids contents of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *J. Med. Plants Res.* 2011. 5(7):1128-1133
- 204.** Giordani R, Kaloustian J. Action anticandidosique des huiles essentielles: leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques. *J. Phytothérapie.* 2006. 3:121-124
- 205.** Girre L. Connaître et reconnaître les plantes médicinales. Edition Ouest.France.1980. 332p
- 206.** Goetz P, busser C. La phytocosmétologie thérapeutique. Edition Springer. Paris. 2007. 58p.
- 207.** Gortzi O, Lalas S, Chinou I, Tsaknis J. Reevaluation of bioactivity and antioxidant activity of *Myrtus communis* extract before and after encapsulation in liposomes. *Eur Food Res Technol.* 2007. 10: 217-222.
- 208.** Govaerts R, Lucas E. World Checklist of Myrtaceae. Edition Royal Botanic Gardens. Kew. Xv. 2008. 476p.
- 209.** Graves R. The Greek Myths (Volume I). Penguin Books (ed). 1955. 132p.
- 210.** Gravot A. Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Equipe pédagogique Physiologie Végétale, UMR 118 APBV. Université de Rennes. Paris. 2008. 125p.
- 211.** Grigoriado K, Leventakis N. Preliminary study on large scale in vitro propagation of *Myrtus communis* L. *Acta Horticulturae.* 2000. 541:299-303.
- 212.** Grzegorzcyk I, Matkowski A, Wysokinska H. Antioxidant activity of extracts from *in vitro* cultures of *Salvia officinalis* L. *Food chemistry.* 2007. 104:536–541.
- 213.** Guasmi-Boubaker A, Kayouli C, Buldgen A, Boukary A, Ammar H, Lopez S. Effect of feed block supply on the ruminal ecosystem of goats grazing shrub land in Tunisia. *Animal feed science and technology.* 2006. 127:1-12.
- 214.** Guérin-Faublée V, Carret G. L'antibiogramme : principes, méthodologie, intérêt et limites. Journées nationales GTV-INRA. 1999. Proceeding 1: 5-12.
- 215.** Guide des parcs nationaux d'Afrique: Afrique du Nord, Afrique de l'Ouest. Edition Delachaux & Niestlé. Paris. 1992. 368p.
- 216.** Guingard JL. Biochimie végétale. Edition Lavoisier, Paris. 1996. 192p

- 217.** Guignard JL. Biochimie vegetale. 1<sup>ere</sup> edition. Masson. Paris. 1999. 245p.
- 218.** Guignard JL. Botanique systématique moléculaire. Edition Masson. Paris. 2001. 189p
- 219.** Guiraud JP. Microbiologie alimentaire. Edition Dunod. 2003. 653p.
- 220.** Güllüce M, Sökmen M, Daferera D, Açar G , Özkan H, Kartal N, Polissiou M , Sökmen A, Şahin F. In vitro antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis*. J. Agronomic and food chemistry. 2006. 51:3958-3965
- 221.** Gupta A, Singh RL, Raghubir R. Antioxidant status during cutaneous wound healing in immunocompromised rats. Molecular and Cellular Biochemistry 2002. 241: 1-7
- 222.** Gurib-Fakim A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular Aspects of Medicine. 2006. 27: 1-93
- 223.** Gustafson JE, Liew YC, Chew S, Markham JL, Bell HC, Wyllie SG, Warmington JR. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. Lett. Appl. Microbiol. 1998. 26:194-198.
- 224.** Hagerman AE. Chemistry of tannin-protein complexation in chemistry and significance of tannins. In R. W. Hemingway RW, Karchesy JJ. Chemistry and significance of condensed tannins. Ed. Plenum Press, New York, 1989. 323p.
- 225.** Hameuralaine S. Mise en évidence des huiles essentielles contenues chez *Adpressum* de la région de Ghardaïa. Thèse de magister en chimie organique. Université Kasdi Merbah. Ouargla. Algérie. 2009. 186p
- 226.** Hammiche V, Maiza K. Traditional medicine in central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. J. Ethnopharmacol. 2006. 105:358-367.
- 227.** Harborne JB, Mabry TJ, Mabry H. The Flavonoids. London: Chapman and Hall, 1975. 219p.
- 228.** Harborne JB. General procedures and measurement of total phenolics. In: Harborne, J.B. Plant phenolics. Academic Press. Londres. 1989. 128p.
- 229.** Harborne JB, Williams C. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry 2000. 55:481-504
- 230.** Harikrishna D, Appa Rao AVN, Prabhakar MC. Pharmacological investigation of prunin-6-O-p-coumarate: A flavonoid glycoside. Indian J Pharmacol. 2004. 36 (4): 244-250.
- 231.** Harouni MC, Zahri S, El Hamaid A. Transplantation des jeunes plantules d'arganier: effet combiné de techniques culturales et du stress hydrique. Actes du colloque international la forêt face à la désertification. Agadir. 1995. 1:115-123.
- 232.** Hartmann HT, Kester DE, Davies FT. Plant propagation principles and practices. Edition Prentice hall international. Singapore. 1990. 647p.

- 233.** Hartmut U, Maria BF. Oral toxicity of an essential oil from Myrtle and adaptive liver stimulation. *Toxicology*. 1979. 12: 335-342.
- 234.** Hayder N, Kilani S, Abdelwahed A, Mahmoud A, Meftahi K, Ben Chibani J, Ghedira K, Chekir-Ghedira L. Antimutagenic activity of aqueous extracts and essential oil isolated from *Myrtus communis*. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2003. 58: 523–524.
- 235.** Hayder N, Skandrani I, Kilani S, Bouhlel I, Abdelwahed A, Ben Ammar R, Mahmoud A, Ghedira K, Chekir-Ghedira L. Antimutagenic activity of *Myrtus communis* using the *Salmonella* microsome assay. *South african journal of botany*. 2008. 74: 121-125
- 236.** Heller W. Abrégé de physiologie végétale. Tome II. Edition Masson. 1990. 280p.
- 237.** Hemingway RW. Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In: *Plant polyphenols: synthesis, properties, significance*. Laks P.E, Hemingway R.W New York. 1992. 380p.
- 238.** Hennebelle T. Investigation chimique, chimio-taxonomique et pharmacologique de lamiales productrices d'anti-oxydants. Thèse de doctorat en chimie organique et macromoléculaire. Université des sciences et technologies de Lille. France. 2006. 304p.
- 239.** Herrera CM. A study of avian frugivores, birds dispersed plants and their interactions in mediterranean scrublands. *Ecological monography*. 1984. 54:1-23.
- 240.** Hideo O, Akio M, Yasuko Y, Mitsuru N, Yoshimasa T. Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochemistry*. 1993. 33:557-561.
- 241.** Ho SH, Cheng LPL, Sim KY, Tan WTH. Potential of cloves (*Syzygium aromaticum* L) as a grain protectant against *Tribolium castaneum* and *Sitophilus zeamais*. *Postharvest Biology and Technology*. 1994. 4:179-183
- 242.** Holcomb EJ, Michalas PJ. Myrtle as a flowering potted plant. *Bull pennsylvania flower growers*. 1992. 13:5-7.
- 243.** Hosseinzadeh H, Khoshdel M, Ghorbani M. Antinociceptive, Anti-inflammatory Effects and Acute Toxicity of Aqueous and Ethanolic Extracts of *Myrtus communis* L. Aerial Parts in Mice. *J Acupunct Meridian Stud*. 2011. 4(4):242-247
- 244.** Houël E. Etude de substances bioactives issues de la flore amazonienne, these de doctorat en chimie des substances naturelles. Université des Antilles et de la Guyane. Guadeloupe. 2011.285p.
- 245.** Hrubik JD, Kaišarević SN, Glišić BD, Jovin ED, Mimica-Dukić N, Kovačević RZ. *Myrtus communis* and *Eucalyptus camaldulensis* cytotoxicity on breast cancer cells *Proc. Nat. Sci, Matica Srpska Novi Sad*. 2012. 123:65-73.

- 246.** Hubert J. Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micro-nutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines, Thèse de doctorat en sciences écologiques, vétérinaires, agronomiques et bioingénieries. Institut Nationale Polytechnique de Toulouse. France. 2006. 380p.
- 247.** Huq F, Misra LN. An alkenol and C-methylated flavones from *Callistemon lanceolatus* leaves. *Planta Medica*. 1997. 63: 369-370
- 248.** Ishikura N, Teramoto S. Procyanidins and catechins from callus and cell suspension cultures of *Cryptomeria japonica*. *J. Agric. biol. chem.* 1983. 47:421-423.
- 249.** Jacquemin H. Plantes médicinales et phytothérapie. Office de la recherche scientifique et technique outre-mer. 1970. 120p.
- 250.** Jadin F. Siège des principes médicamenteux dans les végétaux. Edition P Klincksieck. 1974. 165p.
- 251.** Jean-Blain C. Aspects nutritionnels et toxicologiques des tanins. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 1998. 149:911-920.
- 252.** Jeane S, Worku A, Sousa SM, Duarte VG, Machadoc MIL, Matos FJA. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003. 89: 277-283.
- 253.** Jeanmonod D, Gamisans J. *Flora Corsica*. Aix-en-Provence : Edisud. 2007. 920p.
- 254.** Jerkovic I, Rodanic A, Borcic I. Comparative study of leaf, fruit and flower essential oils of Croatian *Myrtus communis* L. during one year vegetative cycle, *J. Essential oil. res.* 2002. 14:266-270.
- 255.** Jirovetz L. Aromatherapy: Use of fragrances and essential oils as medicaments. *Flavour and Fragrance Journal*. 1994. 9:217-222
- 256.** Jokias S, Velias D, Bilias M, Bucias-Kojias AM, Plan I, Tomas S. Modelling of the Process of Solid-Liquid Extraction of Total Polyphenols from Soybeans. *J. Food Sci.* 2010. 28: 206- 212.
- 257.** Jones WT, Mangan JL. Complexes of the condensed tannins of sainfoin (*Onobrychis viciaefolia* Scop) with fraction of leaf protein and with submaxillary mucoprotein and their reversal by PEG and pH. *J. Sci. Food Agric.* 1977. 28: 126-136.
- 258.** Joslyn MA. A serie of monography. *Food. Sci. techn.* Second Edition Board. 1970. In: Bessas A, Benmoussa L, Kerarma M. Dosage biochimique des polyphenols dans les dattes et le miel récoltés dans le sud algérien. Mémoire d'ingénieur en biologie. Université Djillali Liabes. Sidi belabbas. Algérie. 2008. 137p
- 259.** Judith MD. Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans* Vahl (Caesalpinaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako. Mali. 2005. 135p.

- 260.** Jukié M, Milo M. Catalytic oxidation and anti-oxidant properties of thyme essential oils (*Thymus vulgarae* L.). *Croatica Chemica Acta*. 2005. 78:105-110.
- 261.** Jur. 1967. In: Bessas A, Benmoussa L, Kerarma M. Dosage biochimique des polyphenols dans les dattes et le miel récoltés dans le sud Algérien. Mémoire d'ingénieur en biologie. Université Djillali Liabes. Sidi belabbas.2008. 137p
- 262.** Justesen U, Knuthsen P, Torben L, Quantitative analysis of flavonoids, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography*.1998. 799:101-110.
- 263.** Juven BJ, Kanner J, Schved F, Weisslowicz H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.* 1994. 76:626-631.
- 264.** Kafkas E, Güney M, Sadighazadi S, Yıldırım H, Kefayati S. Volatile compounds of selected white and black myrtle (*Myrtus communis* L.) types from Mediterranean region of Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2013. 7(18):1244-1248.
- 265.** Kaid-Slimane IL. Contribution à l'étude de la composition chimique et du pouvoir antibactérien des huiles essentielles de *Cistus ladaniferus* de la région de Tlemcen. Thèse d'Ingénieur en biologie. Université Aboubakr Belkaid. Tlemcen. 2004. 117p.
- 266.** Kamarul'Ain M, Nigel BP, Rex TW. Hydroxyflavanones from *Leptospermum polygalifolium* subsp. *polygalifolium* equilibrating sets of hemiacetal isomers. *J. Phytochemistry*. 2003. 64:1285-1293
- 267.** Kanko C, Sawaliho BE, Kone S, Koukoua G, N'Guessan YT. Etude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus* et *Cymbopogon giganteus*. 2004. 7:1039-1042.
- 268.** Kanoun K, Belyagoubi-Benhammou N, Ghembaza N, Atik Bekkara F. Comparative studies on antioxydant activities of extracts from the leaf, stem and berry of *Myrtus communis* L. *International food research Journal*. 2014. 21(5):1957-1962.
- 269.** Kansole MMR. Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de *Leucas martinicensis* Jacquin, *Hoslundia opposita* vahl et *Orthosiphon pallidus* Royle & Benth. Thèse de doctorat en sciences Biologiques Appliquées. Université d'Ouagadougou. Burkina Faso. 2009. 121p
- 270.** Karou D, Savadogo A, Canini A, Yameogo S, Montesano C, Simpore J, Colizzi V, Traore AS. Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. *African journal of biotechnology*. 2005. 5(2):195-200.
- 271.** Kashman Y, Rotstein A, Lifshitz A. The structure determination of two new acylphloroglucinols from *Myrtus communis*. *Tetrahedron lett.* 1974. 30:991-997.
- 272.** Khababee K, Van Ree T. Tannins: Classification and Definition. *Nat. Prod. Rep.*, 2001. 18:641–649

- 273.** Katalinic V, Mozina S, Skroza D, Generalic I, Abramovic H, Milos M, Ljubenkovic I, Piskernik S, Pezo I, Terpinic P, Boban M. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *J. Food. Chem.* 2010.119: 715-723.
- 274.** Khelifi L. Contribution à la mise au point d'une méthode de vitro propagation du mélèze hybride (*Larix eurolepis* henry) à partir des graines. Thèse d'études approfondies de biologie végétale et forestière. Nancy. France.1986. 61p.
- 275.** Keville K, Green M. Aromatherapy: a complete guide to the healing art. The Crossing Press. 1995. 156p.
- 276.** Khosh-Khui M, Bassiri A. Physical dormancy in myrtle seeds. *Science horticulture.* 1976. 5:363-366.
- 277.** Kim J, Marshall MR, Vei C. Antibacterial activity of some essential oil components against five food borne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1995. 43:2839-2845.
- 278.** Kim HM, Lee EH, Hong SH, Song HJ, Shin MK, Kim SH, Shin TY. Effect of *Syzygium aromaticum* extract on immediate hypersensitivity in rats. *J. Ethnopharmacol.*1998. 60: 125-131.
- 279.** Kim DO, Chun OK, Kim YJ, Moon HY, Lee CY. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 2003. 51(22):6509-6515.
- 280.** Klein JD, Cohen S, Hebbe Y. Seasonal variation in rooting ability of myrtle (*Myrtus communis* L) cuttings. *Scientia Horticulturae.* 2000. 83:71-76.
- 281.** Knight RP. The Symbolical Language of Ancient Art and Mythology, Whitefish Ed. Kessinger Publishing. 1993. 132p.
- 282.** Koffi E, Sea T, Dodehe Y, Soro S. Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty three Ivorian plants. *J. Animal & Plant Sci.* 2010. 5: 550-558.
- 283.** Konig M, Seholz E, Hartmann R, Lehmann W, Rimpler H. Ellagitannins and complex tanins from *Quercus patroae* bark. *J. Nat. Prodcut.* 1994. 57: 1411-1415.
- 284.** Kossmann MG. Berber loanwords in Hausa. Edition Köppe. 2005. 228p.
- 285.** Koukos PK, Papadopoulou KI, Papagiannopoulos AD, Patiaka DTh. Chemicals from Greek forestry biomass: constituents of the leaf oil of *Myrtus communis* grown in Greece. *J. Essential oil research.* 2001. 13:245-246
- 286.** Kordali S, Cakir A, Zengin H, Duru ME. Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in Turkey. *Fitoterapia.* 2003. 74: 164-167.
- 287.** Kovacs MG. The epice of Gilgamesh, Stanford University Press. 1989. 238p

- 288.** Kumar S, Srivastava RK, Krishna A, Tomar VK. Cultivation, chemistry, biology and utilization of bach (*Acorus calamus*): a review. J. Medicinal. Aromatic. Plant. Science. 2000. 22:333-348.
- 289.** Kumar S, Gupta SK, Sing P, Bajpai P, Gupta MM, Singh D, Gupta AK, Ram G, Shasany AK, Sharma S. High yeilds of artemisini by multi-harvest of *Artemisia annua* crops. Industrial crops and products. 2004. 19:77-90.
- 290.** Kumaran A, Karunakaran RJ. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie. 2007. 40:344-352.
- 291.** Labieniec M, Gabryelak T Study of interactions between phenolic compounds and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or Cu(II) ions in B14 Chinese hamster cells. Cell. Biol. Int. 2006. 30: 761-768
- 292.** Lahlou M. Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. Phytotherapy Research. 2004. 18:435-448.
- 293.** Lalko J, Api AM. Investigation of the dermal sensitization potential of various essential oils in the local lymph node assay. Food and Chemical Toxicology. 2006. 44: 739-746.
- 294.** Lamarti A, Badoc A, Deffieux G, Carde JP. Biogénèse des monoterpènes. Bull. soc. pharm. 1994. 133 :69-78.
- 295.** Lambert RJW, Skandamis PN, Coote P, Nychas GJE. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of *Oregano* essential oil, thymol and carvacrol. J. Appl. Microbiol. 2001. 91:453-462.
- 296.** Landolfi R, Mower RL et Steiner M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. Biochem Pharmacol. 1984. 33:1525-1530.
- 297.** Langeron M. Précis de microscopie. Edition Masson et Cie. Paris. 1949. 1362p.
- 298.** Larousse Encyclopedie MEMO. Edition Montreal. 1999. 182p.
- 299.** Laurent L. Eléments minéraux. In : Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Volume 4. Edition Lavoisier. Paris. 1991. 98p.
- 300.** Lawrence BM. Essential oils 1976-1977. Carol Stream, Illinois : Allured Publishing, 1978. 175p.
- 301.** Lawrence BM. Progress in essential oils. Myrtle oil. Perfumer and flavorist. 1993. 18:52-55.
- 302.** Lawrence BM. Progress in essential oils. Myrtle oil. Perfumer and flavorist. 1996. 21: 57-58.
- 303.** Lazouni HA, Benmansour A, Taleb-Bendiab SA, Chabane Sari D. Composition des constituants des huiles essentielles et valeurs nutritives du *Foeniculum vulgare* Mill. Sciences & Technologie C. 2007. 25 :7-12.

- 304.** Lě CL, Nowbuth L, Hediger S, Collet GF. Régénération de la pomme de terre cultivée (*Solanum tuberosum* L.). Revue suisse Agric. 1997. 9(3) :143-150.
- 305.** Le Houerou HN. Définition et limites bioclimatiques du Sahara. Sécheresse. 1990. 12:24-26.
- 306.** Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher anti-oxidant capacity than teas and red wine. J. Agric. food. chem. 2003. 51:7292-7295.
- 307.** Leifert C, Ritchie JY, Whites WM. Contaminants of plant tissue and cell cultures. J. Microbial and biotech. 1991. 7:542-459.
- 308.** Leredde C. Etude écologique et phytogéographique du Tassili n'Ajjer. Alger: Travaux de l'Institut de recherches sahariennes, série du Tassili, tome II. 1957. 455 p
- 309.** Letouze R, Daguin F. Manifestation spontanée et aléatoire d'une croissance anormale en culture *in vitro*. Revue canadienne de biologie. 1983. 42: 23-28.
- 310.** Li HB, Wong CC, Cheng KW, Feng C. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. Lebensmittel-Wissenschaft and Technology. 2008. 41(3):385–390.
- 311.** Lis-balchin M, Deans SG, Eaglesham E. Relationship between the bioactivity and chemical composition of commercial plant essential oils. Flav.Fragr.J.2005. 13:98–104.
- 312.** Livermore DM. Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare. Clinical Infectious Diseases. 2002. 34(5): 634-640.
- 313.** Lois R. Accumulation of UV-absorbing flavonoids induced by UV-B radiation in *Arabidopsis thaliana* L. Part I. mechanisms of UV-resistance in Arabidopsis. Planta. 1994. 194: 498-503.
- 314.** Loiseau J, Ferriere NM, Ledeuñef Y. Histology of somatic embryogenesis in pea. Plant physiology and biochemistry. 1998. 36:125-129.
- 315.** Luckow M, Grimes J. A survey of anther glands in the mindmosoid legume tribes Parkieae and Mimoseae. American journal of botany. 1997. 84:285-297.
- 316.** Lugasi A, Hovari J, Sagi KV, Biro L. The role of antioxidant phytonutriments in the prevention of diseases. Acta. Biologica Szegedientis 2003. 1(4):119-125.
- 317.** Luo J, He GY. Optimization of elicitors and precursors for paclitaxel production in cell suspension culture of *Taxus chinensis* in the presence of nutrient feeding. Process Biochemistry. 2004. 39:1073-1079.
- 318.** Maccioni S, Tomei PE, Rizzo A. L'usage médicinal des espèces végétales spontanées et cultivées dans la médecine traditionnelle de Val-di-magra. Mémoire de l'académie lunigianese des sciences. 1995. 135p.



- 319.** Macheix JJ, Fleuriet A, Jay-Allemand C. Les composés phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économique, presses polytechniques et universitaires romandes. 2005. 162p.
- 320.** Mahadevan J. Biochemical aspects of plant disease resistance, Part I: Performed inhibitory substances. Today and Tomorrow Printers and Publishers, New Delhi, India, 1982. 5:425-431.
- 321.** Mahmoudi S, Khali M, Mahmoudi N. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). Nature & Technologie. 2013. 9: 35- 40
- 322.** Maiza K. Pharmacopée traditionnelle saharienne: Sahara algérien. Thèse de doctorat en sciences biologiques. Université Houari Boumediene-Alger. Algerie. 2008. 386p.
- 323.** Makhloufi A. Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de Bechar (*Matricaria pubescens* Desf) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. hese de doctorat en sciences biologiques, Université Aboubekr Belkaid, Univeristé de Tlemcen, Algerie. 2011. 166p
- 324.** Makkar HPS. Quantification of tannins in tree foliage-a laboratory manual. A joint FAO/IAEA working document, Viennne.2000. 4: 5-7.
- 325.** Mann CM, Cox SD, Markham JL. The outer membrane of *Pseudomonas aerogenosa* NCTC 6749 contributes to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. Lett. appl. microbiol. 2000. 30:294-297.
- 326.** Manniche L. An Ancient Egyptian Herbal, Austin. University of Texas Press.1999. 290p.
- 327.** Mansouri S, Foroumadi A, Ghanei T, Gholam-hosseinian Najar A. Anti-bacterial activity of the crude extracts and fractionated constituents of *Myrtus communis*. Pharmaceutical biology. 2001. 39:399-401.
- 328.** Marchini G, Maccioni S. Liguria in parole povere Geneva. 1998. In: Flamini G, Luigi Cloni P, Morelli I, Maccioni S, Baldini R. Phytochemical typologies in some population of *Myrtus communis* L. on Caprione promontory (East Liguria, Italy). Food chemistry. 2004. 85:599-604.
- 329.** Marfak A. Radiolyse Gamma des Flavonoides : Etude de leur Reactivite avec les Radicaux Issus des Alcools : Formation de Depsides. Thèse de doctorat en Biophysique. Université de Limoges. France. 2003. 187p.
- 330.** Mario JS, Seiji A, Satoshi T, Yang H, Kurt AR, Margaret JB, Roberto RG, Bernard IW, Edward JK. Cytotoxic chalcones and antioxidants from the fruits of a *Syzygium samarangense* (Wax Jambu) Food chemistry. 2008. 107: 813-819
- 331.** Markham KR. Techniques of flavonoides identification. Edition CNED. Paris. 1982. 120p.

- 332.** Martin A, Varona S, Navarrete A, Cocero MJ. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: applications with essential oils. *Open Chem Eng Journal*. 2010. 4:31-41.
- 333.** Martin-Pares E. Recherche de l'activité anti-inflammatoire de substances d'origine naturelle. 1990. In : Fleurentin J, Cabalion P, Mazars G, Dos Santos J, Younos C. 1<sup>er</sup> colloque européen d'ethnopharmacologie, Sources, Méthodes, Objectifs, (23-25/03/1990), Paris Metz . Orstom SFE. Proceeding : 270-278.
- 334.** Martin T, Rubio B, Villaescusa L, Fernandez L, Diaz AM. Polyphenolic compounds from pericarps of *Myrtus communis*. *Pharmaceutical Biology*. 1999. 37:28-31.
- 335.** Martini MC. Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie. Éditions Tec & Doc, Paris. 2006. 155p.
- 336.** Maruyama N, Sekimoto Y, Ishibashi H, Inouye S, Oshima H, Abe S. Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of *Geranium* essential oil . *Journal of Inflammation*, 2005. 2:1.
- 337.** Mata V, Kongjika E. *In vitro* conservation of some Albanian populations of *Myrtus communis* L. *Natura Montanegria Podgorica*. 2010. 9(3):553-565.
- 338.** Matsuo M, Sasaki N, Saga K, Kaneko T. Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2005. 28(2):253-259.
- 339.** Maudsley F, Kerr KG. Microbiological safety of essential oil used complementary and the activity of these compounds against bacterial and fungal pathogens. *Support Care Cancer*. 1999. 7(2): 100-102.
- 340.** Mazza G. Gas chromatographic-mass spectrometric investigations of the volatile components of myrtle berries (*Myrtus communis*), *Journal of Chromatography*, 1983. 264:304-311.
- 341.** Mejholm O, Dalgaard P. Antimicrobial effects of essential oils on the seafood spoilage microorganism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products, *Letters in Applied Microbiology*. 2002. 34: 27-31.
- 342.** Mergaert P, Vaubert D, Györgyey J, Jahni G, Maunoury N, Chaparro Egafia C, Villarroel R, Kelemen Z, Kelemen K, Vinardell JM, Kondorosi A, Kondorosi E. Utilisations d'arrays d'ADNc pour l'étude du développement des nodosités symbiotiques chez *Medicago truncatula*. *Rev Ecole thématique Biologie végétale*. 2001. 1:7-14.
- 343.** Messaoud C, Zaoualim Y, Bensalah A, Khoudja ML, Boussaid M. *Myrtus communis* in Tunisia: Variability of the essential oil composition in natural populations. *Flavour fragrance. J*. 2005. 20:577-582.
- 344.** Messaoud C, Laabidi A, Boussaid M. *Myrtus communis* L. infusions: The effect of infusion time on phytochemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Food Science*. 2012. 77(9):941–947.

- 345.** Middleton E, Kardasnam. JC. The Flavonoids, Advances in research since 1986. Ed. Harborne JB, Chapman and Hall London. 1993. 652p.
- 346.** Migliore J, Baumel A, Juin M, Fady B, Roig A. Surviving in Mountain Climate Refugia: New Insights from the Genetic Diversity and Structure of the Relict Shrub *Myrtus nivellei* (Myrtaceae) in the Sahara Desert. Plosone. 2013. 8(9): 737-745.
- 347.** Milane H. La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres, études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat en sciences biologiques. Université Louis Pasteur. Strasbourg. 2004. 200p.
- 348.** Milhau G, Valentin A, Benoit F, Mallie M, Bastide JM, Pellisier Y, Bessiere JM. *In vitro* antimalarial activity of 8 essential oils. J Essent Oil Res. 1997. 9(3):329–33.
- 349.** Mimica-Dukić N, Bugarin D, Grbović S, Mitić-Ćulafić D, Vuković-Gačić B, Orčić D, Jovin E, Couladis M. Essential oil of *Myrtus communis* L. as a potential antioxidant and antimutagenic agents. Molecules. 2010.15:2759-2770.
- 350.** Mohammedi, Z. Etude du pouvoir anti-microbien et anti-oxydant des huiles essentielles et flavonoides de quelques plantes de la region de Tlemcen. Thèse de magister en biologie. Université Abou Bakr Belkaïd. Tlemcen. 2006. 105p
- 351.** Majhenic L, kergel MS, Knez Z. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. Food Chemistry. 2007. 104: 1258-1268.
- 352.** Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J. Sci. Technol. 2004. 26:211-219.
- 353.** Mondelino L. Parades post coloniales. Edition Karthala.2006. 160p.
- 354.** Montoro P, Tuberoso CIG, Piacente S, Perrone A, De Feo V, Cabras P, Pizza C. Stability and antioxidant activity of polyphenols in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur. J Pharm Biomed. 2006. 41:1614–1620.
- 355.** Mookerjee BK, Lee TP, Logue GP, Lippes HA, Middleton M. The effects of flavonoids on human lymphocyte proliferative responses. Prog Clin Biol Res. 1986. 213: 511-520.
- 356.** Morel G, Muller JF. La culture in vitro du méristème apical de la pomme de terre. Comptes rendus. 1964. 258:5250-5252.
- 357.** Moreno-Jimenez E, Penalosa JM, Carpena Ruiz R, Esteban E. Comparison of arsenic resistance in mediterranean woody shrubs used in restoration activities. Chemosphere. 2008. 71:466-473.
- 358.** Morin P, Richard H. Thermal degradation of linalyl acetat during steam distillation in proc, 4<sup>th</sup> Weurman Flav. Res. Symp. Elsevier Science. Publ. B.V. Amsterdam. 1985. 3:563-576.

- 359.** Mota MLR, Thomas G, Barbosa Filho JM. Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. J Ethnopharmacol. 1985.13:289-300.
- 360.** Moumou Y, Trotin F, Vasseur J, Vermeersch G, Guyon R, Dubois J, Pinkas M. Procyanidin production by *Fagopyrum esculentum* callus tissue cultures. J. Plant physiol. 1992. 15:516-519.
- 361.** Moyano K, Jouhikainen K, Tammela P, Palazon J, Cusido RM, Pinol MT, Teeri TH, Oksman-Caldentey KM. Effect of pmt gene over-expression on tropane alkaloid production in transformed root cultures of *Datura metel* and *Hyoscyamus muticus*. Journal of experimental botany. 2003. 54:203-211.
- 362.** Moyer KE, Saggars GC, Ehrlich HP. Effects of interleukin-8 on granulation tissue maturation. Journal of Cellular Physiology. 2002. 193:173-179.
- 363.** Muhaned K, Al-Hindawi IHS, Al-Deen MHA, Mudafar AI. Anti-inflammatory activity of some Iraqi plants using intact rats. Journal of Ethnopharmacology. 1989. 26:163-168.
- 364.** Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology of plants. 1962. 15:473-497.
- 365.** Nadeem M, Rikhari HC, Kumar A, Palni L, Nandi SK. Taxol content in the bark of Himalayan yew in relation to tree age and sex. Phytochemistry J. 2002. 60: 627-631.
- 366.** Namgoong SY, Son KH, Chang HW, Kang SS, Kim HP. Effects of naturally occurring flavonoids on mutagen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture. Life Sci. 1994. 54: 313-320.
- 367.** Narayana KR, Reddy MS, Chaluvadi MR, Krishna DR. Bioflavonoids Classification, Pharmacological, Biochemical Effects and Therapeutic Potential. Indian Journal of Pharmacology. 2001. 33: 2-16.
- 368.** Naves, Y.R. Technologie des parfums naturels. Edition Masson. Paris.1974. 168p.
- 369.** Neil A. Biologie. Edition Boeck Université. 2006. 1482p.
- 370.** Nostro A, Germanò MP, D'Angelo V, Marino A, Cannatelli MA. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant anti-microbial activity. Lettres en microbiologie appliquée. 2000. 30:37-39.
- 371.** O'Hare S, Atterwill CK. Methods in molecular biology: *In vitro* toxicity testing protocols. Humana press INC. New Jersey. USA.1995. 326p.
- 372.** Ogur R. A research about myrtle tree (*Myrtus communis* L.). J. Ecology. 1994.10:21-25
- 373.** Ohnishi E, Bannai H. Quercetin potentiates TNF-induced antiviral activity. Antiviral Research. 1993. 22:327-331.
- 374.** Oka Y, Nacar S, Putievsky E, Ravid U, Yaniv Z, Spiegel Y. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. J. Phytopathology. 2000. 90:710-715.

- 375.** Okafor J, Hum R. Identification, utilization and cultivation of medicinal plants in South-eastern Nigeria. *Iss. Afr. Biochem.* 1999. 3: 1-8.
- 376.** Okuda T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry J.* 2005. 66:2012-2020.
- 377.** Oldrich H, Klejdus B, Ladislav K, Michaela D, Khaled A, Vlastimil K, Richard H. Biochemical systematics and Ecology. International conference on landslide risk management. Vancouver. Canada. 2005. 7p
- 378.** Onal S, Timur S, Okutuku B, Zihnioglu F. Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase by aqueous extracts of some potent antidiabetic medicinal herbs. *Prep.biochem.biotech.* 2005. 35:29-36.
- 379.** Othman A, Ismail A, Ghani NA, Adenan I. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chem.* 2007.100:1523–1530.
- 380.** Otterness G, Gans DJ. Transtéroïdal anti-inflammatoire drugs: an analysis of the relationship between laboratory animal and clinical doses, including species scaling. *J Pharm Sci.* 1988. 77(9):790-795.
- 381.** Oulmouhoub S. Gestion multi-usage et conservation du patrimoine forestier: Cas des subéraies du parc national d'El kala Algérie. Thèse de magister en ecologie. Institut agronomique méditerranéen de Montpellier. France. 2005. 137p.
- 382.** Oussalah M, Caillet S, Lacroix M. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 2006. 69:1046-1055.
- 383.** Oussou KR, Coffi K, Nathalie G, Seriyolo U, Gerard K, Mireille D, Yao TN, Gilles F, Jean-Claude CG. Activité antibactérienne des huiles essentielles de trois plantes aromatique de la cote d'ivoir. *Comptes rendus de chimie.* 2004. 7:1081-1086.
- 384.** Owlia P, Saderi H, Rasooli I, Sefidkon F. Antimicrobial characteristics of some herbal oils on *Pseudomonas aeruginosa* with special reference to their chemical compositions. *Iran J Pharm Res.* 2009. 8(2):107–114.
- 385.** Oyaizu M. Studies on products of browning reaction-Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition,* 1986. 44:307-315
- 386.** Özek T, Demirci I, Baser KHC. Chemical composition of Turkish myrtle oil. *Journal of Essential Oil Research.* 2000.12:541-544
- 387.** Ozenda P. Flore du Sahara. Edition CNRS. Paris. 1977. 623p.
- 388.** Özkan AMG, Güray ÇG. Plants and Culture: seeds of the cultural heritage of Europe: A mediteraneen *Myrtus communis* L. Edipuglia. Italie. 2009.159-168.

- 389.** Ozkan MM, Akbulut M. Estimation of minerals, nitrate and nitrite contents of medicinal and aromatic plants used as spices, condiments and herbal tea. *Food chemistry*. 2007.106:852-858.
- 390.** Padrini F, Lucheroni MT. *Le grand livre des huiles essentielles - guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et l'aromassage energetiques avec plus de 100 photographies*. Edition De Vecchi. Paris. 1996.121p.
- 391.** Pantoja CV, Chiang LCH, Norris BC, Concha JB. Diuretic, natriuretic and hypotensive effects produced by *Allium sativum* (Garlic) in anesthetized dogs. *J of Ethnopharmacology*, 1995. 31:325–331.
- 392.** Paris PP, Harbielle A. *Abrégé de matière médicale: Pharmacognosie. Tome I*. Edition Masson. France. 1981. 183p.
- 393.** Paris RR, Moysé H. *Matière médicale. Tome II*.Ed Masson.Paris. 1967. 447p
- 394.** Paris RR, Moysé H. *Matière médicale. Tome III*.Ed Masson.Paris. 1971.482p
- 395.** Park YK, Koo MH, Ikegaki M, Contado JL. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Brazilian archives of biology and technology*. 1997. 40:97-106
- 396.** Park YK, Koo MH, Ikegaki M, Contado JL. Antimutagenic activity of flavonoids from the heartwood of *Rhus verniciflua*. *J Ethnopharmacol*. 2004. 90: 73-79
- 397.** Paula C, Pereira MJC, Gabriela M, Bernardo G. Evolution of the yields and composition of essential oil from portuguese myrtle (*Myrtus comunis* L.) through the vegetative cycle. *Journal of molecules*. 2009. 14: 3094-3105.
- 398.** Pellecuer J, Allegrini J, Simeon de Bouchberg M. Huiles essentielles bactéricides et fongicides. *Rev. Institut Pasteur*. 1976. 9:135-159.
- 399.** Pereira H, Miranda I, Gominho J, Tavares F, Quilho T, Garça J, Rodrigues J, Shatalov A, Knapic S. Wood chemistry in relation to quality. Instituto superior de agronomia. Universidade tecnica de Lisboa. 2003. In : Miranda I, Gominho J, Pereir H. Incorporation of bark and tops in *Eucalyptus* globules wood pulping. 2012. *Bioressources*. 7(3): 4350-4361.
- 400.** Pharmacopée européenne. 4<sup>ème</sup> édition. Conseil de l'Europe. Strasbourg, 2002. 2060p.
- 401.** Pharmacopée européenne. Tome I. Conseil de l'Europe. Strasbourg. 2005. 3343p
- 402.** Pharmacopée Française. 11eme edition. ANSM. Paris. France. 2012. 55-60.
- 403.** Pharmacopée URSS. Tome II. 11<sup>ème</sup> édition. Moscou. 1991. 250p.
- 404.** Piatti MF. Embryogenèse somatique et synchronisation du développement embryonnaire. Thèse de doctorat en pharmacie. Université Paris VI. France. 1988. 130p.

- 405.** Picq M, Cheav SL, Prigent AF. Effect of two flavonoid compounds on central nervous system. Analgesic activity. *Life Sci.* 1991. 49:1979-1988.
- 406.** Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products.* 2000. 63(7):1035-1042.
- 407.** Poelman MC. *Initiation à la cosmétologie pratique.* Edition Dunod. Paris. 1987. 186p.
- 408.** Poletti A. *Fleurs et plantes médicinales.* Edition Delachaux & Niestlé. 1982. 222p.
- 409.** Ponce AG, Fritz R, Delvalle CE, Roura SI. Antimicrobial activity of essential oils on native microbial population of organic Swiss chard. *LWT.* 2003. 36: 679-684.
- 410.** Porter N. Essential oils and their production. *Crop and food res.* 2001. 39:32-38
- 411.** Potterat O. Antioxidant and free radical scavengers of natural origin. *J. Current organic chemistry.* 1997. 1:415-417.
- 412.** Pourrat A. Etude de la cicatrisation des plaies chez le lapin et le rat. *J. Pharm. Belg.* 1993.178 p.
- 413.** Pradeau D. *L'analyse pratique du médicament.* Ed. Médicales Internationales. Tec & Doc. Paris .1992. 976p.
- 414.** Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2005. 53(10):4290-4302
- 415.** Quezel P, Santa S. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.* Tome II, CNRS. Paris. 1963. 128p.
- 416.** Quezel P. *Contribution à l'étude de la flore et la végétation du Hoggar,* Edition Imber. 1954.164p.
- 417.** Quézel P. *Mission botanique au Tibesti.* Alger: Mémoire de l'Institut de Recherches Sahariennes 1958. 357p
- 418.** Rached W, Benamar H, Bennaceur M, Marouf A. Screening and antioxidant potential of some Algerian indigenous plants. *Journal of biological sciences.*2010. 10(4): 316-324.
- 419.** Rakipov N. *Legumineuses à grains.* Edition Mir. Biochimie des cultures tropicales. Moscou. 1987. 247p.
- 420.** Ramdani I. *Contribution à l'étude de la flore médicinale de la région d'Alger.* Thèse d'ingénieur en agronomie. INA. Alger. 1994. 144p.
- 421.** Rapparini F, Soldo A, Predieri S, Gatti E, Baraldi R. Terpene content and headspace of *in vitro* cultures of *Myrtus communis* L. 17<sup>eme</sup> Congrè botanique international. Italy. (17-23/08/2005). Proceeding 1: 552-554.

- 422.** Rasooli I, Moosavi ML, Rezaee MB, Jaimand K. Susceptibility of microorganisms to *Myrtus communis* L essential oil and its chemical composition. J Agric science technology. 2002. 4:127-133.
- 423.** Read MA. Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents Vascular. Am J Pathol. 1995. 147: 235-237.
- 424.** Remmal A, Bouchikhi T, Rhayour K, Ettayebi M, Tantaoui-Elaraki A. Improved method for determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. J Ess Oil Res. 1993. 5(2):179-184.
- 425.** Resch M, Steigel A, Chem ZL, Bauer R. 5-Lipoxygenase and cyclooxygenase-1 inhibitory active compounds from *Atractylodes lancea*. J. Nat. Prod. 1998. 61:347-350.
- 426.** Rhayour K. Etude du mecanisme d'action des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Thèse de doctorat en biologie cellulaire et moleculaire appliquée à l'environnement et la santé. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah de Fès. Maroc. 2002. 170p.
- 427.** Ribereau P. Les composés phénoliques des végétaux. Ed Gayon Dunod. Paris. 1968. 254p
- 428.** Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic. Biol. Med. 1996. 20: 933-956
- 429.** Richter G. Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie. Pres polytechnique et universitaire. Romande. France. 1993. 515p.
- 430.** Riddle JM. From the Ancient World to Renaissance. Harvard University Press, 1992. 264p
- 431.** Rivera LL. Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe. Thèse de doctorat en genie des procedés. Institut national polytechnique de Toulouse, France. 2006. 230p.
- 432.** Roddier Quefelec C. La région méditerranéenne: Un haut lieu de biodiversité. Revue nouvelles des forêts. 2008. 11:3-6.
- 433.** Rodier J. L'analyse de l'eau : Eaux naturelles, eaux résiduelles, eau de mer. 8<sup>ème</sup> Edition. Tec & Doc. Paris. 2005. 146p.
- 434.** Romani A, Pinelli P, Mulinacci N, Vincierei FF, Tattini M. Identification and quantification of polyphenols in leaves of *Myrtus communis* L. Liquid chromatographia. 1999. 49:17-20.
- 435.** Romani A, Coinu R, Carta S, Pinelli P, Galardi C, Vincieri F. Evaluation of antioxidant effect of different extracts of *Myrtus communis* L. Free radiance research. 2004. 38:97-103.
- 436.** Rosa A, Deiana M, Casu V, Corona G, Appendino G, Bianchi F, Ballero M, Desi MA. Antioxidant activity of oligomeric acylphloroglucinols from *Myrtus communis* L. Free Rad Res. 2003. 37: 1013-1019.



- 437.** Rosa MPG, Sylvia M, Rosario VS. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. J. Ethnopharmacology. 2008. 117(1): 1-27
- 438.** Rossi A, Di Paola P, Mazzon E, Genovese T, Caminiti R, Bramanti P, Pregola C, Koeberle A, Werz O, Sautebin L, Cuzzocrea S. Myrtucommulone from *Myrtus communis* exhibits potent anti-inflammatory effectiveness *in vivo*. J Pharmacol Exp Ther. 2009. 329(1):76-86.
- 439.** Roux D, Catier O. Botanique, pharmacognosie, phytothérapie. 3<sup>ème</sup> édition, Wolters Kluwer. 2007. 141p.
- 440.** Salih FM, Nadir MT. Anti-candidal activity in some Iraqi plants. Fitoterapia. 1984. 55:238-241.
- 441.** Sallé JL. Les huiles essentielles. Edition Frison Roche. Paris.1991. 167p.
- 442.** Sanchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphénols. Journal Science Technology International, 1998. 8:121-137
- 443.** Sanhaji O. Etude de l'activité antifongique des extraits de cannelle. Journal de mycologie médicale. 2005. 15:220-229
- 444.** Santos FA, Silva RM, Campos AR, De Arajo RP, Lima Junior RCP, Rao VSN. 1,8-Cineole (eucalyptol), a monoterpene oxide attenuates the colonic damage in rats on acute TNBS-colitis. Food Chem Toxicol. 2004. 42:579-584.
- 445.** Sarni-Manchado P, Cheynier V. Les polyphenols en agro-alimentaire. Edition Lavoisier. 2006. 398p
- 446.** Satrani B, Farah A, Fechtal M, Talbi M, Blaghen M, Chaouch A. Composition chimique et activité anti-microbienne des huiles essentielles de *Satureja calamintha* et *Satureja alpina* du Maroc. Annales experimentales en chimie. 2001. 94: 241-250.
- 447.** Savova MK, Stourza TA, Seikova I. The use of group contribution method for predicting the solubility of seed polyphenols of *Vitis Vinifera* L. Journal of the UTCM. 2007. 42: 295-300.
- 448.** Scarpa GM, Milia M, Satta M. The influence of growth regulators on proliferation and rooting of *in vitro* parpagated Myrtle. Plant cell, tissus and Organ culture. 2000. 62:175-179
- 449.** Schwimmlé B, Winkeihausen E, Kuzmanovam S, Steiner W. Isolation of carvacrol assimilating microorganisms. J. Biotechnology. 2001. 39:341-345.
- 450.** Selçuk A. Mersin (Myrtle). Edition Yeditepe, 2004. 80p.
- 451.** Sepici DA, Gurbuz I, Çevik C, Yesilada E. Hypoglycaemic effects of myrtle oil in normal and alloxan-diabetic rabbits. J Ethnopharmacology. 2004. 93:311-318

- 452.** Sepici DA, Açıkgöz S, Çevik C, Sengelen M, Yesilada E. Effect of *in vivo* antioxidant enzyme activities of myrtle oil in normoglycaemic and alloxan diabetic rabbits. *J Ethnopharmacol.* 2007. 110:498-503.
- 453.** Serce A, Maiani G, yuzbachi A. Biochemical activities of some turlish plants. *Phytol.* 2010. 3: 45-55.
- 454.** Serio A, Chaves-López C, Martuscelli M, Mazzarrino G, Di Mattia C, Paparella A. Application of Central Composite Design to evaluate the antilisterial activity of hydro-alcohol berry extract of *Myrtus communis* L. *LWT.* 2014. 58:116-123
- 455.** Seznec G. Essai d'application des techniques de culture *in vitro* à la multiplication de deux espèces endémiques rares des Mascareignes: *Gouania mauritiana* et *Bremontiera ammoxylon*. Mémoire de DEA en biologie végétale. Université de Nancy. France. 1986. 84p.
- 456.** Shah RR, Mehta AR. Influence of phenolic acids on growth and production of phenolic compounds in *Crotalaria* callus cultures. *Bangladesh journal of botany.* 1978. 7:51-57.
- 457.** Shan B, Cai YZ, Brooks JD, Corke H. The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *Int J Food Microbiol.* 2007. 117:112–119.
- 458.** Shikhiev AS, Abbasov PM, Mamedova ZA. The composition of *Myrtus communis* essential oil. *Khimiya prirod. Suède.* 1978. 4:529-530.
- 459.** Siddhuraju P, Becker K. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* L) seed extracts. *Food Chemistry.* 2007. 101(1):10-19.
- 460.** Siddiqui YM, Ettayebi M, Haddad AM, Al-Ahdal MN. Effect of essential oils on the enveloped viruses: antiviral activity of oregano and clove oils on herpes simplex virus type 1 and Newcastle disease virus. *Med Sci Res.* 1996. 24: 185-186.
- 461.** Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult.* 1965. 16:144-158.
- 462.** Skoog F, Miller CO. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposium experimental biology.* 1957. Numero special:118-130.
- 463.** Smallfield B. Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop & Food Research.* 2001. 45:4-6.
- 464.** Somon E. Arbres, arbustes et arbrisseaux en Algerie. OPU. Paris. 1987.143p.
- 465.** Song T, Martensson L, Eriksson T, Zheng W, Rasmussen U. Biodiversity and seasonal variation of the cyanobacterial assemblage in rice paddy field in Fujian, China. *FEMS Microbiol Ecol.* 2005. 54:131-140
- 466.** Spedding G, Ratty A, Middleton EJ. Inhibition of reverse transcriptase by flavonoids. *Antiviral Res.* 1989. 12:99-110.

- 467.** Sreevalli Y, Kulkarni RN, Baskaran K, Chandrashekara RS. Increasing the content of leaf and root alkaloids of high alkaloids content mutant of periwinkle through nitrogen fertilization. *Industrial crops & products*. 2004. 19:191-195.
- 468.** Stafford HA, Cheng TY. The procyanidins of Douglas fir seedlings, callus and cell suspension cultures derived from cotyledons. *Phytochemistry*. 1980. 19:131-135.
- 469.** Stafford HA, Kreitlow KS, Lester HH. Comparison of proanthocyanidins and related compounds in leaves and leaf-derived cell cultures of *Ginkgo biloba* L, *Pseudotsuga menziesii* F and *Ribes sanguineum* P. *Plant physiology*. 1986. 82:1132-1138.
- 470.** Stefan M, Mithöfer A. Multifunctional flavonoid dioxygenases: Flavonol and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* L. *Phytochemistry*. 2006. 67:521.
- 471.** Stelljes ME. *Toxicology for Nontoxicologists*. Government Institutes: Edition Scarecrow Press Inc. USA. 2008. 425p.
- 472.** Tabti N. Contribution à l'étude de l'extraction des huiles essentielles de *Myrtus communis* L. Mémoire de magister en chimie industrielle. Université Saad Dahleb de Blida. 2011. 69p.
- 473.** Taheri A, Seyfan A, Jalalinezhad S, Nasery F. Antibacterial effect of *Myrtus communis* hydro-alcoholic extract on pathogenic bacteria. *Zahedan J Res Med Sci*. 2013. 15(6):19-24.
- 474.** Tapandjou AL, Bouda H, Fontem DA, Zapfack L, Lonsi D et Sondengam BL. Local plants used for traditional stored product protection in the Menoua division of the Western highlands of Cameroon. *Integrated Protection of stored Products/ IOBC Bulletin*. 2000. 23: 73-77
- 475.** Tateo F, Picci V. Primo indagini sulla caratterizzazione GLC-MS dell'olio essenziale di mirto di Sardegna (*Myrtus communis* L), *La Rivista della Società di Scienza dell'Alimentario*, 1982. 11:153-158.
- 476.** Taylor P. *Guide des 500 meilleures plantes de jardins*. Edition Egen Ulmer. Paris.1993. 320p.
- 477.** Teixeira da Silva JA. Mining the essential oils of the Antherideae. *African journal of biotechnology*. 2004. 3:706-720.
- 478.** Teklehaymanot T, Giday M. Ethnobotanical study of medicinal plants used by people in Zegie Peninsula, Northwestern Ethiopia. *J Ethnobiol*. 2007. 3:256-258.
- 479.** Terrill TH, Rowan AM, Douglas GB, Barry TN. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *J Sci Food Agric*. 1992. 58(3): 321-329.
- 480.** Thomas M. Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*). Thèse de doctorat en chimie organique. Université d'Orléans. France. 2011. 288p.

- 481.** Togola A. Etude de la phytochimie et de l'activité anti-paludique de *Alchornea cordifolia* Schmach.. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako. Mali. 2002. 100p.
- 482.** Torres-Mendoza D, Gonzalez J, Ortega-Barria E, Heller MV, Capson TL, McPhail K, Gerwick WH, Cubilla-Rios L. Weakly anti-malarial flavonol arabinofuranosides from *Calycolpus warszewiczianus*. J.Natural production. 2006. 69:826-828.
- 483.** Touaibia M. Contribution à l'étude de deux plantes médicinales : *Myrtus communis* L. et *Myrtus nivellei* Batt & Trab. obtenues *in situ* et *in vitro*. Mémoire de magister. Université Saad Dahleb de Blida. Algerie. 2011. 221p.
- 484.** Touaibia M, Chaouch FZ, Cherif HS. Introduction *in vitro* de deux plantes médicinales: *Myrtus communis* L. et *Myrtus nivellei* Batt & Trab. Agrobiologia. 2012. 2:38-43
- 485.** Touaibia M, Chaouch FZ, Chaouia C, Cherif H. Caractérisation phytochimique de l'espèce saharo-endémique *Myrtus nivellei* Batt & Trab (Myrtaceae). Algerian journal of natural products. 2014a. 2(1):27-34
- 486.** Touaibia M, Chaouch FZ. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux, méthanolique et éthanolique de l'espèce saharo-endémique *Myrtus nivellei* Batt & Trab (Myrtaceae). international journal of innovation and applied studies. 2014b. 6(3) :407-413.
- 487.** Touaibia M. Composition chimique et activité anti-fongique de l'huile essentielle de *Myrtus communis* L sur milieu de laboratoire et sur les fruits du fraisier. Nature et Technologie. 2015. 12(1): 66-72
- 488.** Tourte Y, Bordonneau M, Henry M. Le monde des végétaux, organisation, physiologie et génétique. Edition Dunod. 2005. 384p.
- 489.** Traboulsi K, Taoubi K, El Haj S, Bessiere JM, Rammal S. Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). Pest Manag Sci. 2002. 58:491-495.
- 490.** Trabut, L. Répertoire des noms indigènes des plantes spontanées cultivées et utilisées dans le nord de l'Afrique. Collection du centenaire de l'Algérie. Alger. 1955. 355p.
- 491.** Travaux du laboratoire forestier. Université de Toulouse. France. 1954. 221p.
- 492.** Traveset A, Riera N, Mas R. Ecology of fruit colour polymorphism in *Myrtus communis* and differential effects of birds and mammals on seed germination and seedling growth. J Ecology. 2001. 89:749-760
- 493.** Tuberoso CIG, Barra A, Angioni A, Sarritzu E, Pirisi FM. Chemical composition of volatiles in Sardinian myrtle (*Myrtus communis* L) alcoholic extracts and essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006. 54:1420-1426.
- 494.** Tuberoso CIG, Rosa A, Bifulco E, Melis MP, Atzeri A, Pirisi FM, Dessì MA. Chemical composition and antioxidant activities of *Myrtus communis* L berries extracts. Food Chemistry. 2010. 123(4):1242–1251.

- 495.** Twajj HAA, Elisha EE, Khalid RM. Analgesic studies on some Iraqi medicinal plants. J. Crude Drug Research. 1989. 27:109-112.
- 496.** Ultee A, Kets EP, Smid EJ. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. J Appl Microbiol. 1999. 65(10): 4606-4610.
- 497.** Ultee A, Kets EP, Alberda M, Hoekstra FA, Smid EJ. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. Arch microbiol. 2000. 174:233-238.
- 498.** Ultee A, Bennik MH, Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol. 2002. 68:1561–1568.
- 499.** Umadevi I, Daniel M, Sabnis S. Chemotaxonomic studies on some members of Anardiaceae. In Proceeding of the Indian Academy of Science. Plant sciences. 1988. 98:205-208.
- 500.** Valdes B, Talavera S, Ferbabdez Galiano E. Myrto. Flora vascular de Andalucia. 2005. 8:76-77.
- 501.** Valnet J, Duraffourd CH, Duraffourd P, Cilapraz J. L'aromatogramme: nouveaux résultats et essais d'interprétation sur 268 cas cliniques. Plant Med Phytother. 1978. 12: 43-52.
- 502.** Valnet J. Phytothérapie: Traitement des maladies par les plantes. Edition Maloine. Paris. 1983. 568p.
- 503.** Vausselin A. Physico-chemical properties of *Myrtus communis* essential oils. Aroma-zone. 2004. 3: 6-8.
- 504.** Veckenstedt A, Pusztai R. Mechanism of antiviral action of quercetin against cardiovirus infection in mice. Antiviral research. 1981. 1:249-261
- 505.** Veličković DT, Randjelović NV, Ristić MS, Veličković AS et Šmelcerović AA. Chemical constituents and antimicrobial activity of the ethanol extracts obtained from the flower, leaf and stem of *Salvia officinalis* L. J Serb Chem Soc. 2003. 68:17-24.
- 506.** Venturini N. Contribution chimique a la definition de la qualite: exemples des spiritueux de myrte (*myrtus communis* L) et de cedrat (*Citrus medica* L) de Corse. Thèse de doctorat en chimie organique et analytique. Université de Corse-Pascal Paoli. France. 2012. 252p.
- 507.** Verotta L, Appendino G. Acylphloroglucinols from mediterranean plants as potential leads for infectious disease. 11<sup>eme</sup> Symposium National sur les produits de recherches. Network. E.C. Africa 2005. Antananarivo. Madagascar. 2005. Proceeding 1:9-10.
- 508.** Verpoorte R, Van Der Heijden R, Van Gulik WM, Ven Hoopen HJG. Plant biotechnology for the production of alkaloids: present statue and prospects. The alkaloids. Academic Press. San Diego. 1991. 40:1-187.

- 509.** Verschuren J. Plan de gestion du site du patrimoine mondial- parc national du Tassili, Algérie. Rapport de mission UNESCO, In: Mission scientifique au Tassili des Ajjer (Sahara central). Alger. Algérie. 1984. 1:1-9.
- 510.** Viana AM. Recent advances in biotechnology for tree conservation and management. Edition IFS. Brezil. 1997. 251p.
- 511.** Vicidomini S. Uso alternativo delle essenze da fronda recisa: i fitoesteratti di *Myrtus communis* (Myrtaceae): Contributo sulla agro-ecologia delle colture oggetto del progetto Co.Al.Ta. Naturalista Compano. 2007. 7:1-40
- 512.** Viegi L, Pieroni A, Guarrera PM, Vangelisti R. A review of plant used in folk veterinary medicine in Italy. J Ethnopharm. 2003. 89:221-234.
- 513.** Volàk J, Stodola J. Plantes médicinales. Edition Grund. Paris.1984. 319p.
- 514.** Walker KA, Wendel ML, Jawarski EG. Organogenesis in callus tissue of *Medicago sativa* the temporal repartition of induction process from differentiation process. Plant Science Letters. 1979. 16:23-30.
- 515.** Wang M, Li J, Rangarajan M, Shao Y. La Voie EJ, Huang TC, Ho CT. Antioxidant phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). J Agricultural and food chemistry. 1998. 46:4869-4873.
- 516.** Wang J, Mazza G. Effects of Anthocyanins and Other Phenolic Compounds on the Production of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  in LPS/IFN- $\gamma$ -Activated RAW 264.7 Macrophages. J Agricultural and Food Chemistry. 2002. 50:4183-4189.
- 517.** Wepierre J. Abrégé de pharmacologie générale et moléculaire. 2<sup>eme</sup> édition Masson. Paris. 1981. 203p.
- 518.** Wichens GE. Eco-physiology of economic plants in arid and semi arid lands. Edition Springer. 1998. 343p.
- 519.** Willem JP. Les huiles essentielles. Edition Medecine d'avenir. 2004. 318p.
- 520.** William BJ. The original of the soxhlet extractor. Journal of chemical education. 2007. 84:1913-1915.
- 521.** Wojdylo A, Oszmiański J, Czemerys R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chemistry. 2007. 105:940-949
- 522.** Yadegarinia D, Gachkar L, Rezaei M, Taghizadeh M, Astaneh SA, Rasooli I. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L and *Myrtus communis* L essential oils. Phytochemistry. 2006. 67(12):1249-55.
- 523.** Yang B, Kallio H. Composition and physiological effects of buckthorn extracts. Trends in Food Science & Technology. 2003. 13(3):145-157.

- 524.** Yermakov AI, Arasimov VV, Yarosh NP. Methods of biochemical analysis of plants. Agropromizdat. Leningrad. 1987. In: Miliauskasa G, Venskutonis PR, Van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food chemistry. 2004. 85:231-237.
- 525.** Yesilada E. Biodiversity in Turkish folk medicine. 2002. In: Sener B. Biodiversity: biomolecular aspects of biodiversity and innovative utilization. Kluwer academic/Plenum Publishers. 2006. 135p.
- 526.** Yeşilyurt V, Halfon B, Öwtürk M, Topçu G. Antioxidant potential and phenolic constituents of *Salvia cedronella*. Food chemistry. 2008. 108: 31-39.
- 527.** Yılmaz N, Karakuş Boyanması ŞM. Ministère de l'industrie et du commerce; Publications de la Direction des ministères des zones industrielles et des sites, Ankara,1991. 140p.
- 528.** Yoshimura M, Amakura Y, Tokuhara M, Yoshida T. Polyphenolic compounds isolated from the leaves of *Myrtus communis*. Journal of Natural Medicines. 2008. 62:366-368.
- 529.** Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. Journal of Clinical Pathology. 2001. 54:176-186.
- 530.** Yrjönen T. Extraction and chromatographic separation techniques in the analysis of natural products. Thèse de magister en pharmacie. Université de Helsinki. 2004. 64p.
- 531.** Zhu JK, Hasegawa PM, Bressan RA. Molecular aspects of osmotic stress in plants. CRC Crit Rev Plant Sci. 1997. 16: 253–277
- 532.** Zimmer N, Cordesse R. Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. INRA Prod Anim. 1996. 9 (3): 167-179.
- 533.** Ziyat A, Legssyer A, Mekhfi H, Dassouli A, Serhrouchni M, Benjelloun W. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. J Ethnopharmacol. 1997. 58:45-55.
- 534.** Zryd JP. Cultures de cellules, tissus et organes végétaux. Edition Press polytechniques. Romandes. 1988. 308p.

## Appendice A

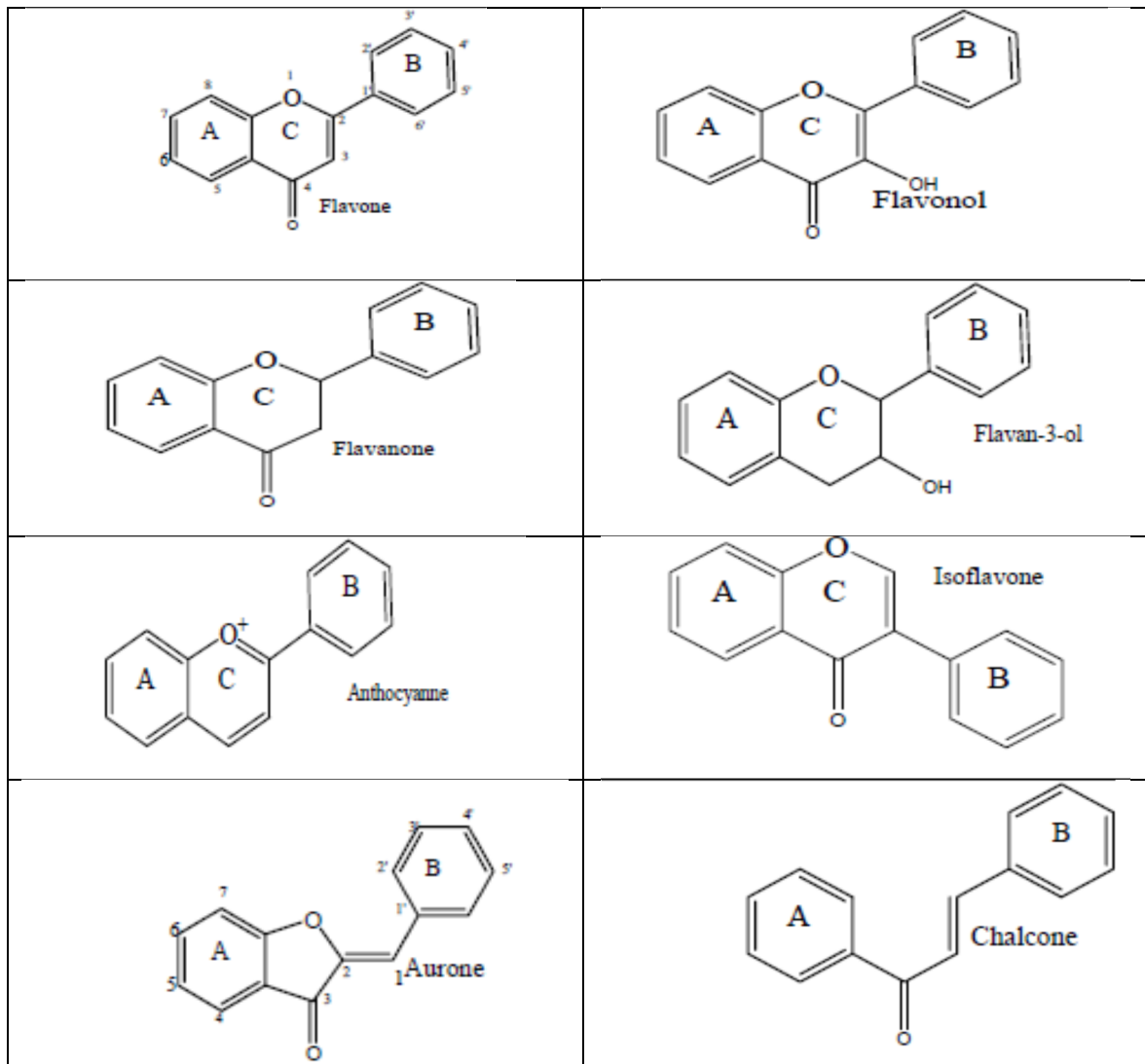


Figure 1 : Structure chimique de quelques classes de flavonoïdes (**Chaouche, 2010**)



## Appendice B

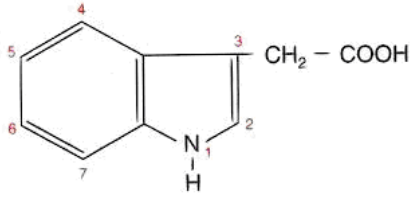
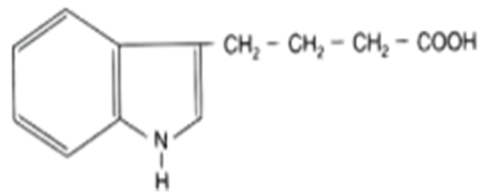
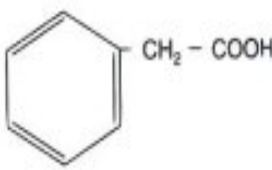
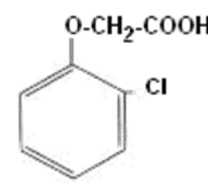
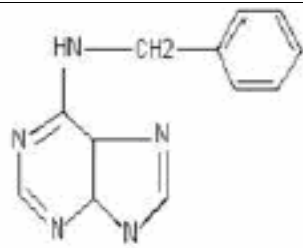
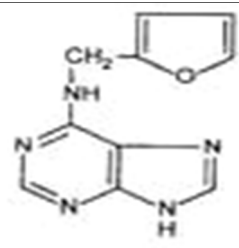
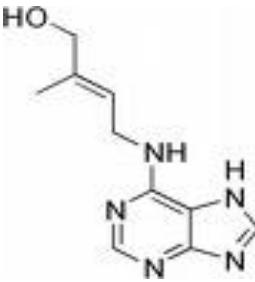
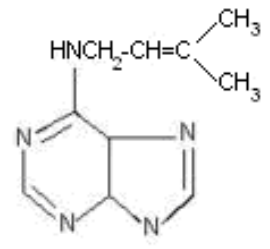
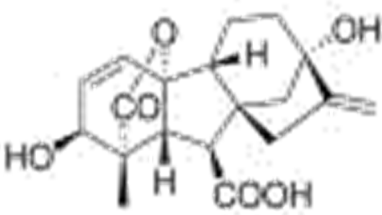
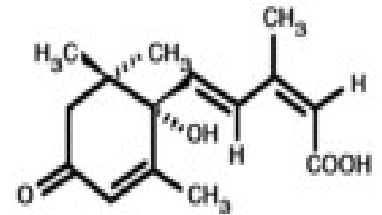
 <p><b>Acide indole 3- acétique (AIA)</b></p>	 <p><b>Acide indole butyrique (AIB)</b></p>
 <p><b>Acide naphtalène acétique (ANA)</b></p>	 <p><b>Acide 2-4 dichlorophénoxyacétique (2-4D)</b></p>
<p><b>Auxines</b></p>	
 <p><b>6-Benzyl aminopurine (BAP)</b></p>	 <p><b>Kinétine</b></p>
 <p><b>Zéatine</b></p>	 <p><b>Isopentenylaminopurine</b></p>
<p><b>Cytokinines</b></p>	
 <p><b>Acide gibbérellique GA3</b></p>	 <p><b>Acide abscissique</b></p>
<p><b>Gibbérelline</b></p>	<p><b>Acide abscissique</b></p>

Figure 2 : Structures chimiques de quelques régulateurs de croissance (Favre, 1977)

## Appendice C

### INSTRUMENTS, APPAREILLAGES ET REACTIFS UTILISES

#### 1. Appareillage:

- Agitateur magnétique (Snijders)	- Dispositif d'extraction (montage de type Clevenger)
- Autoclave (Aesculap)	- Etuve (Nuve EN 500 ; Melag 405)
- Bain marie (Memmert)	- Etuve bactériologique (Nuve EN400)
- Balance analytique (Scaltec SBC 31)	- Evaporateur rotatif (Stuart RE300)
- Balance analytique de précision (Kern)	- Extracteur Soxhlet (250 ml)
- Broyeur	- Réfrigérateur
- Chauffe ballon	- Hotte à flux laminaire
- Four à moufle (Prolabo N° 57018)	- Loupe binoculaire (Motic ST30)
- Microscope photonique binoculaire (Motic BA 200)	- Phytotron
- pH-mètre (Hanna)	- Spectrophotométrie UV-visible (Shimadzu UV-1601)
- Plaque chauffante (Stuart)	- Vortex (Velp HP/MSD Agilent 5890)
- Chromatographe phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse	

#### 2. Verrerie et autres consommables:

- Ampoule à décanter 500 ml	- Compresses stériles
- Anse de platine	- Creusets en platine et en verre
- Ballons: 250, 500 ml	- Cristalliseur : 1000ml
- Bec bunzen	- Disques de papier filtre stérile
- Bêchers: 100,250, 500ml	- Entonnoir en verre
- Boîtes de pétri stériles de 90 mm de diamètre	- Eprovettes: 500,1000ml
- Burette	- Erlenmyers: 500, 1000, 3000ml
- Cages d'expérimentation	- Fioles jaugées: 50ml; 100ml, 100ml
- Flacons en verre sombre	- Gants, gaze chirurgicale
- Lames et lamelles	- Papier aluminium, papier filtre
- Micropipettes	- Pipettes graduées: 1, 5, 10, 25ml
- Pipettes Pasteur	- Portoirs
- Sonde de gavage gastrique	- Vaccinostyle
- Disques d'antibiotiques et antifongiques de référence : Amoxicilline, Nystatine.	
- Scalpels stériles, ciseau, seringues, pinces et spatules	

#### 2. Réactifs, colorants et produits chimiques divers:

-Acétate de plomb	-Acide ascorbique	-Alcool chlorhydrique	-Butanol
-Acétate de potassium	-Acide stéarique	-Alcool cétylique	-Bisulfite de sodium (15%)
-Acide gallique	-Alcool benzylique	-Acide chlorhydrique (HCl)	-Betadermine 10%
Gélose aux peptones de caséine et de soja	-Acide périodique-Schiff (APS)	-Ammoniaque (NH <sub>4</sub> OH) (10%)	-Hypochlorite de calcium Ca(ClO) <sub>2</sub>
-Acétate de sodium (CH <sub>3</sub> -COONa)	-Acide sulfurique (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) concentré	-Ammonium thiocyanate(30%)	-Ethanol ( 95%, 98%, absolu)
-Acide acétique	-Acide tannique	-Agar agar	-Carraghénine 1%
-DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle)	-Carbonate de sodium (NaHCO <sub>3</sub> )	-Cyanidine	-Bleu de méthylène
-Chloroforme (CHCl <sub>3</sub> )	-Diclofenac	-Copeaux de magnésium	-Ether diéthylique
-Eau physiologique	-Eosine	-Alpha tocopherol	-Vert de méthyle
-Eau purifiée	-Formol (10%)	-Glycerine	-Bleu de toluidine 1%
-Férozine	-Kétamine	-Huile de vaseline	-Phenolphtaleine
-Gélose nutritive	-Lanoline	-Madécasol®	-Propanol
-Lugol	-Montanox®	-Nitrate d'aluminium (10%)	-Quercetine
-Méthanol	-Myristate d'isopropyle	-Phénol (5%)	-Propylène glycol
-Milieu Muller Hinton	-Milieu Sabouraud	-Saccharose	-Rutine
-chloramphenicol	-Reactif de fehling	-Réactif de STIASNY	-Rouge Congo
-Rouge de phénol	-Réactif de MAYER	-Réactif Folin Ciocalteu (FCR)	-Réactif Folin Denis (FDR)
-Hypochlorite de sodium Na(ClO) <sub>2</sub>	-Tampon phosphate (0,2M, pH 7,0)	-Trichlorure de fer (FeCl <sub>3</sub> )	-Trichlorure d'aluminium (AlCl <sub>3</sub> )
-Soude (NaOH) (10%)	-Hydroxyde de potassium (KOH)	-Solution tampon peptonée au chlorure de sodium pH 7,0	-Hormones de croissance
-Vanilline (2%)	-Vaseline codex	-Triéthanolamine	-Tween 80

## Appendice D

### Animaux de laboratoire

Les animaux utilisés lors des tests pharmaco-toxicologiques proviennent de l'animalerie du complexe ANTIBIOTICAL de Sidal sise à Médéa

- **Caractéristiques des animaux utilisés :**

- Lapin Albinos: Souche *néo-zélandaise*.

Sexe : mâle

Poids : 1,5-2,3 Kg.

- Souris Albinos: Souche *NMRI*. (Naval Medical Research Institute)

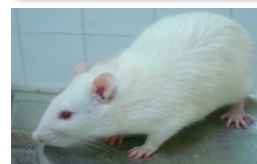
Sexe: mâle et femelle;

Poids: 20-22 g.

- Rats Albinos: Souche *Wistar*

Sexe= male

Poids=200-240g



- **Habitat:**

Les animaux du laboratoire utilisés sont hébergés dans des cages solides en plastiques.

Ils sont soumis aux conditions de stabulation suivantes :

- température : 20-24 °C.
- Humidité : 50-60 %.
- Eclairage : artificiel (12/24 heures).

- **Nourriture :**

Elle est sous forme de granulés originaires de l'O.N.A.B (Office Nationale d'Alimentation du Bétail) dont la composition est la suivante:

Composés	%
Humidité	14
Sub. minérales	5.7
Protéines	23.5
Lipides	5
Glucides	49.80
Vitamine A	12300 ul/Kg
Vitamine B	20 mg/Kg

- **Abreuvement :**

Il se fait par l'eau de robinet fraîche remplie dans des bouteilles en plastiques de 500 ml.

- **Contention:**

Elle doit être ferme pour éviter toute morsure et maîtriser ainsi les réactions, parfois agressives, de l'animal. La souris est prise par la base de sa queue et mise sur un revêtement rugueux puis saisie au niveau de la peau du dos près des oreilles. De ce fait, l'animal sera immobile et incapable de mordre le manipulateur.

- **Marquage:**

Il est nécessaire pour l'identification des animaux. Il se fait par un marqueur coloré sur la queue et/ou le dos.

## Appendice E

### REALISATION DES COUPES HISTO-ANATOMIQUES

#### A. Réalisation de coupes histologiques

##### A.1. Prélèvement et préparation des échantillons

Quelques rameaux feuillés sont soigneusement nettoyés à l'eau courante et bien égouttés sur du papier buvard. Les organes étudiés sont : les tiges, les feuilles et les calcs.

##### A.2. La fixation:

Dans des piluliers, les prélèvements sont immédiatement fixés dans une solution FAA pendant 48 h. La fixation permet de garder les structures tissulaires dans un état aussi proche que possible de l'état vivant.

##### A.3. La déshydratation:

Elle consiste à extraire l'eau et le fixateur du tissu par passage successif dans cinq bains d'alcool éthylique à titrage croissant, allant de 70° à 100° pendant 1h30 chacun

##### A.4. La désalcoolisation:

Toluène + éthanol (v/v).....	30 minutes
Toluène pur.....	30 minutes
Toluène pur.....	30 minutes
Toluène pur.....	01 heure
Toluène + paraffine (v/v).....	30 minutes
Paraffine.....	01 heure
Paraffine.....	01 heure
Paraffine.....	12 heures

##### A.5. L'inclusion:

La paraffine est coulée à chaud, dans des moules métalliques associés à des cassettes en plastique. L'explant est rapidement plongé avec une pince préalablement chauffée, tout en l'orientant dans le sens de la coupe désirée. La polymérisation de la paraffine à température ambiante permet l'obtention de blocs prêts à être coupés.

##### A.6. La confection et l'étalement des coupes:

Avant de passer à la confection des coupes, les blocs démoulés sont taillés à l'aide d'un scalpel jusqu'à l'apparition des organes inclus. La réalisation des coupes est faite à l'aide d'un microtome, en réglant l'épaisseur à 5µm. Les rubans obtenus sont placés sur des lames. L'étalement se fait avec de l'eau gélatineuse filtrée (5%) puis étalés soigneusement. Ils sont ensuite traités à l'étuve pour faire dissoudre la paraffine.

##### A.7. Le déparaffinage et l'hydratation:

Toluène pur	15 à 20 minutes à 50°C
Toluène pur	10 minutes
Toluène pur	10 minutes
Alcool absolu	10 minutes
Alcool absolu	10 minutes
Alcool absolu	10 minutes
Alcool absolu + formol (4v/1v)	05 minutes
Rinçage à l'eau courante	10 minutes

Les coupes sont ensuite placées dans des paniers porte-lames et laissées à la température du laboratoire pour sécher.

## Appendice F

### COMPOSITION DES SOLUTIONS MINÉRALES ET VITAMINIQUES UTILISÉES EN CULTURE IN VITRO (Milieu Murashige et Skoog)

Tableau 2: Compositions de solutions minérales utilisées lors des essais in vitro

Solutions	Composés	Concentrations (mg/l)
Macroéléments MS	$\text{NH}_4 \text{NO}_3$	1650
	$\text{KNO}_3$	1900
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170
	$\text{CaCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
	$\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	370
Microéléments MS	$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	16.9
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
	KI	0.83
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0.025
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Fe EDTA	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85
	$\text{Na}_2\text{EDTA}$	37.25

(Zryd, 1988).

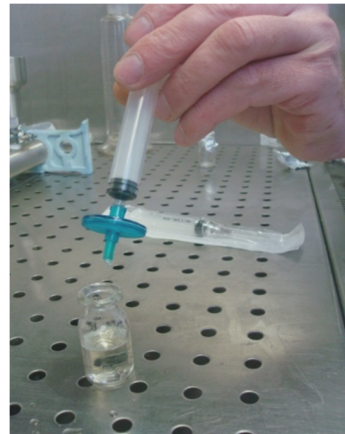
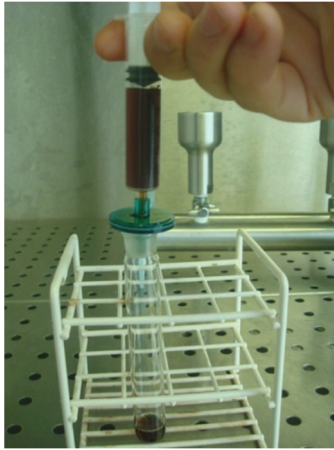
Tableau 3: Solution vitaminique de MOREL (1952) en mg pour 100 ml.

Vitamines	Concentrations (mg/100ml)
Acide nicotinique	1
Thiamine (vitamine B <sub>1</sub> )	1
Pantothénate de Calcium	1
Pyridoxine (vitamine B <sub>6</sub> )	1
Biotine	0.01
Méso-inositol	100

(Zryd, 1988).

## Appendice G

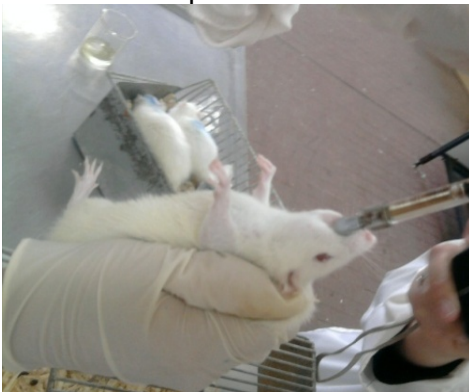
### PHOTOS DE QUELQUES TESTS BIOLOGIQUES



Stérilisation des HE et des extraits à l'aide une seringue munie d'une membrane de microfiltration de 0.2 $\mu$  de porosité



Lapin rasé sur les deux flancs lors du test de tolérance cutanée



Gavage d'une souris à l'aide d'une sonde gastrique



Injection de la carragénine au niveau de la pate de la souris



Sacrifice des animaux et mesure pondérale des pates enflées et des pates témoins

## Appendice H

### ASPECT DES CAL OBTENUS



Cal développé à partir d'un explant de racine



Cal développé a partir d'un explant de feuille



Cal développé à partir d'un explant d'entre-nœuds

Aspect des cals obtenus en *in vitro* à partir de différents explants de *M communis*



Cal développé à partir d'un explant de racine



Cal développé a partir d'un explant de feuille



Cal développé à partir d'un explant d'entre-nœuds

Aspect des cals obtenus en *in vitro* à partir de différents explants de *M nivellei*



## Appendice I

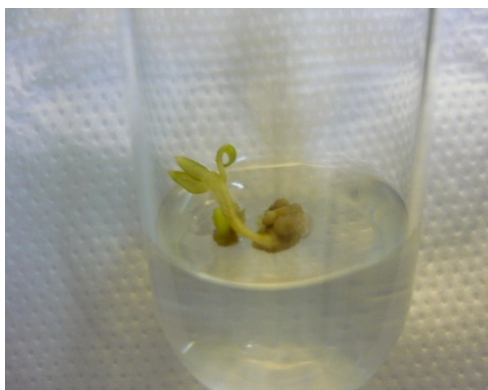
### DEVELOPPEMENT DE BOURGEONS NEOFORMES SUR CALS D'ORIGINE FOLIAIRE



A. Vitro-plant développé à partir d'un cal de *M. communis* sur milieu d'élongation.



B. Vitro-plant développé à partir d'un cal de *M. nivellei* sur milieu d'élongation.



C. Vitro-plant développé à partir d'un cal de *M. communis* sur milieu de callogenèse.



D. Vitro-plant développé à partir d'un cal de *M. nivellei* sur milieu de callogenèse.



E. Vitro-plant développé à partir d'un cal de *M. communis* sur milieu MS sans hormones.



F. Vitro-plant développé à partir d'un cal de *M. nivellei* sur milieu MS sans hormones.



## Appendice J

### ETUDE STATISTIQUE (culture in vitro)

#### I. Caractéristiques des fruits

Tableau I.1: Propriétés des baies typiques de chaque espèce étudiée.

	Nombre moyen des graines/baie	Taille moyenne des graines	Dimensions moyennes des baies
<i>M communis</i>	9,05±0,66	4x2mm	10-12 x 7-9 mm
<i>M nivellei</i>	8,34±1,2	3x2mm	5-8 x 4-6 mm

#### II. Essais in vitro

##### II.1. Etude de la multiplication par graines sur boîtes de petri

Tableau II.1.1: Taux de germination des graines sur boîtes de Pétri.

	Espèce	Nombre des graines	Taux de germination	Développement des vitro semis
Semis des graines scarifiées	<i>M communis</i>	100	100%	Très bonne germination
	<i>M nivellei</i>	100	98%	
Semis des graines non scarifiées	<i>M communis</i>	100	46%	Germination très faible
	<i>M nivellei</i>	100	39%	

Tableau II.1.2a: Effet de la scarification sur la germination in vitro de *M communis* (Test ANOVA)

<i>M communis</i>	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	Facteur F
Inter-groupe	9468	3	3156	252,48
Intra-groupe	100	20	12,5	
Total	9568			

Tableau II.1.2b: Effet de la scarification sur la germination in vitro de *M nivellei* (Test ANOVA)

<i>M nivellei</i>	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	Facteur F
Inter-groupe	2577	3	859	32,7238
Intra-groupe	210	20	26,25	
Total	2787			

## II.2. Cinétique de croissance des vitro-plants issus des vitro-semis (mm)

Données bruts: ces données représentent la moyenne de 6 valeurs pour chaque paramètre.

Tableau 2.1: Taille moyenne des hypocotyles et des racines

Nombre de jours	Taille moyenne en mm			
	Hypocotyle MC	Racine MC	Hypocotyle MN	Racine MN
0	-	-	-	-
10	3,6	0	2,6	0
20	6,4	2,6	5,86	1,86
30	11,8	5,4	7	2,35
40	26	12	9,5	4,74
50	35,83	13,5	9,66	5,3
60	42,44	14,44	10,83	6,5
70	45,2	15,32	25,78	8,06
80	47,85	16,5	31	9,29
90	48,23	16,91	32,2	11,22
100	48,75	17,09	32,75	11,86
120	49,56	17,5	33,42	12,45
130	50,11	17,76	34,64	13
140	51,02	18,12	37,42	13,42
150	53,5	18,85	38,06	13,56
160	57,75	19,01	38,45	14,14

Tableau 2.2: Nombre moyen des feuilles

Nombre de jours	Feuilles MC	Feuilles MN
0	-	-
10	0	0
20	0,8	0,35
30	1,32	0,8
40	1,69	1,2
50	2,45	1,45
60	2,86	2
70	5,33	3,8
80	7,98	5,8
90	12,54	6,8
100	13,23	7,2
120	14,43	7,86
130	15	8,36
140	15,68	8,99
150	15,68	9,56
160	16,25	10,36

## II.3. Multiplication par micro-bouturage des vitro-semis.

Tableau 3.1: Combinaisons hormonales testées (phase d'induction)

Milieu utilisé	Pourcentage d'apparition des bourgeons (%)	
	<i>M communis</i>	<i>M nivellei</i>
M <sub>0</sub> : milieu témoin sans hormones	18,04	14,36
M <sub>1</sub> : 0,5mg/l BA + 0,1mg/l ANA	56,45	51,09
M <sub>2</sub> : 1mg/l BA + 0,1 mg/l ANA	78,56	66,21
M <sub>3</sub> : 1,5 mg/l BA + 0,1 mg/l ANA	92,12	90,13
M <sub>4</sub> : 2 mg/l BA + 0,1 mg/l ANA	85,33	75,67
M <sub>5</sub> : 1 mg/l BA + 0 mg/l ANA	64,25	60,67
M <sub>6</sub> : 0,5 mg/l BA+ 0,5 mg/l ANA	-	-

Tableau 3.2: Relation entre M3 et M2 (comparaison de deux proportions)

H0: Pas de différence significative entre M3 et M2

	$t_c$	$t_t$	H <sub>0</sub>
<i>M communis</i>	1,9152	1,645	$t_c > t_t$ H <sub>0</sub> Rejetée
<i>M nivellei</i>	2,9634		

Tableau 3.3: Influence du milieu additionné de gibbérelline sur l'allongement des tiges (cm)

	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>
<i>M communis</i>	1,55±0,45	6,41±0,32	7,8±0,23	6,92±0,67
<i>M nivellei</i>	1,33±0,25	4,10±0,56	6,63±0,48	5,12±0,33

Tableau 3.4: Effet de l'ANA sur longueur moyenne des racines développées chez *M communis* et *M nivellei*.

	ANA mg/l			
	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>
	0	0,1	0,5	1
Longueur moyenne des racines de <i>M communis</i> (cm)	-	-	1,42±0,6	3,98±0,23
Longueur moyenne des racines de <i>M nivellei</i> (cm)	-	-	1,25±0,24	2,69±0,33

## II.4. Effet de la balance hormonale équilibrée sur la callogenèse

Tableau 4.1: Pourcentage de callogenèse des différents explants étudiés en fonction de la composition du milieu de culture

	<i>M communis</i> L.			<i>M nivellei</i> Batt et Trab.		
	Feuilles	Entre-noeuds	Racines	Feuilles	Entre-noeuds	Racines
M <sub>0</sub>	-	-	-	-	-	-
M <sub>1</sub>	96,04%	89,17%	25%	82,14%	78,22%	20,83%
M <sub>2</sub>	70,85%	71,50%	19%	60,05%	70%	16,67%
M <sub>3</sub>	54,16%	54%	16%	48,91%	51,23%	16,64%
M <sub>4</sub>	48,30%	46%	15,38	39,33%	48%	12,5%

## III. ETUDE STATISTIQUE (phytochimie)

Tableau III.1: pH des différents organes étudiés

pH	Cals	Feuilles	Fruits
<i>M. communis</i>	5.41	5.42	5.90
	5.55	5.39	5.88
	5.39	5.63	5.83
pH moyen	5.45	5.48	5.87
<i>M. nivellei</i>	5.62	5.61	5.99
	5.54	5.59	5.93
	5.55	5.78	5.99
pH moyen	5.57	5.66	5.97
$t_c =$	$t_{th} = 1.96$ ( $\alpha = 5\%$ )	$t_c < t_{th}$ : pas de différence significative (échantillons homogènes)	

Tableau III.2: Taux d'humidité des différents organes étudiés

	Cals	Feuilles	Fruits
<i>M. communis</i>	6.55%	6.93%	12.66%
<i>M. nivellei</i>	6.7%	6.77%	13.00%
Pourcentage moyen	6.74%	6.7%	12.83%

Tableau III.3: Taux des cendres des différents organes étudiés

Cendres	Cals	Feuilles	Fruits
<i>M. communis</i>	5.5445	6.5354	9.8878
	5.0948	6.4741	9.7457
	5.4125	5.9250	9.7719
% moyen	5.3506	6.3115	9.8018
<i>M. nivellei</i>	5.3341	6.4774	7.7844
	5.2886	6.2548	7.5593
	4.9878	5.6056	7.4575
% moyen	5.2035	6.1126	7.6004
$t_c =$	$t_{th} = 1.96$ ( $\alpha = 5\%$ )	$t_c < t_{th}$ : pas de différence significative (échantillons homogènes)	

Tableau III.4: Comparaison entre le volume des pattes Droites et gauches du lot Témoin

ANOVA			Interprétation
<i>Source des variations</i>	<i>F<sub>c</sub></i>	<i>F<sub>t</sub></i>	F calculé > F théorique Différence significative
Lot témoin	35.50	4.96	

Donc : La carraghénine provoque une intense inflammation dans les pattes gauches des souris du lot Témoin.

Tableau III.5: Comparaison entre le volume des pattes gauches du lot Témoin avec le lot référence

ANOVA			Interprétation
<i>Source des variations</i>	<i>F</i>	<i>Valeur critique pour F</i>	F calculé > F théorique. Différence significative.
Lot témoin/lot référence	30.47	4.96	

Donc : L'Acide acétylsalicylique inhibe la réaction inflammatoire provoquée par la carraghénine dans les pattes gauches du lot référence.

Tableau III.6: Comparaison entre le volume des pattes gauches du lot Témoin avec les lots traités par les HE

ANOVA			Interprétation
<i>Source des variations</i>	<i>F</i>	<i>Valeur critique pour F</i>	F calculé > F théorique. Différence significative.
Lot 1	24.71	4.96	
Lot 2	25.36		
Lot 3	22.56		
Lot 4	18.69		

Donc : Les HE participent à la diminution de l'œdème et à la suppression de la réaction inflammatoire induite par la carraghénine dans les pattes gauches.

Tableau III.7: Comparaison entre le volume des pattes gauches du lot Témoin avec les lots traités par les extraits

ANOVA			Interprétation
<i>Source des variations</i>	<i>F</i>	<i>Valeur critique pour F</i>	F calculé > F théorique. Différence significative.
Lot 5	12.86	4.96	
Lot 6	9.87		
Lot 7	10.56		
Lot 8	7.12		
Lot 9	6.98		
Lot 10	6.57		
Lot 11	10.85		
Lot 12	11.36		

Donc : Les extraits participent à la diminution de l'œdème et à la suppression de la réaction inflammatoire induite par la carragénine dans les pattes gauches.

Tableau III.8 : Pourcentage de réduction des surfaces des plaies traitées chez les lots E1, E2, C1, C2, C3 et C4

% RED		J <sub>0</sub>	J <sub>3</sub>	J <sub>7</sub>	J <sub>9</sub>
Placebo	E1	0	24,0963	68,0722	75,9036
Madecassol	E2	0	54,2682	88,4146	98,1707
HEFeMC	C1	0	55,0295	85,7988	96,4497
HEFeMN	C2	0	51,8072	81,9277	95,1807
HEFrMC	C3	0	23,5294	67,0588	73,5294
HEFrMN	C4	0	17,5	68,75	72,5

Tableau III.9 : Variation du pouvoir anti-oxydant des HE en fonction du temps d'incubation

		Temps d'incubation (min)	15	30	45	60	75	90
Pourcentage d'inhibition (%)	HEFrMC		1,65	2,32	2,55	2,79	2,79	2,8
	HEFrMN		1,34	2,18	2,36	2,5	2,88	2,95
	HEFeMC		4,21	5,38	5,66	5,8	6,01	6,4
	HEFeMN		4,35	5,56	5,7	5,98	5,99	6,3

## Appendice K

### Profils chromatographiques des HE analysées par CG/SM

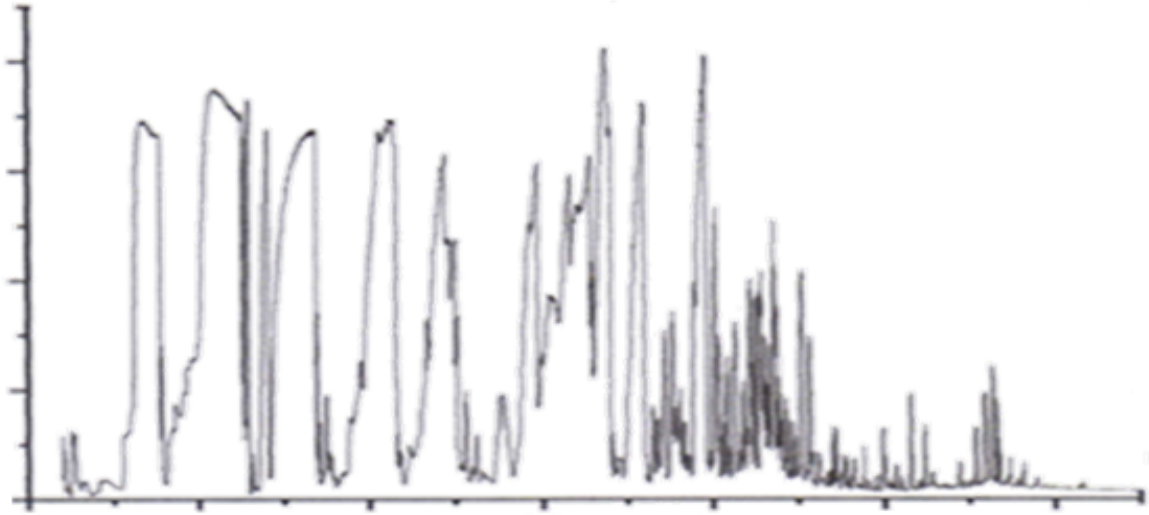


Figure A: Profil chromatographique de HEFeMC. extraite par hydrodistillation et analysée par CG/SM (Chromatogramme 1)

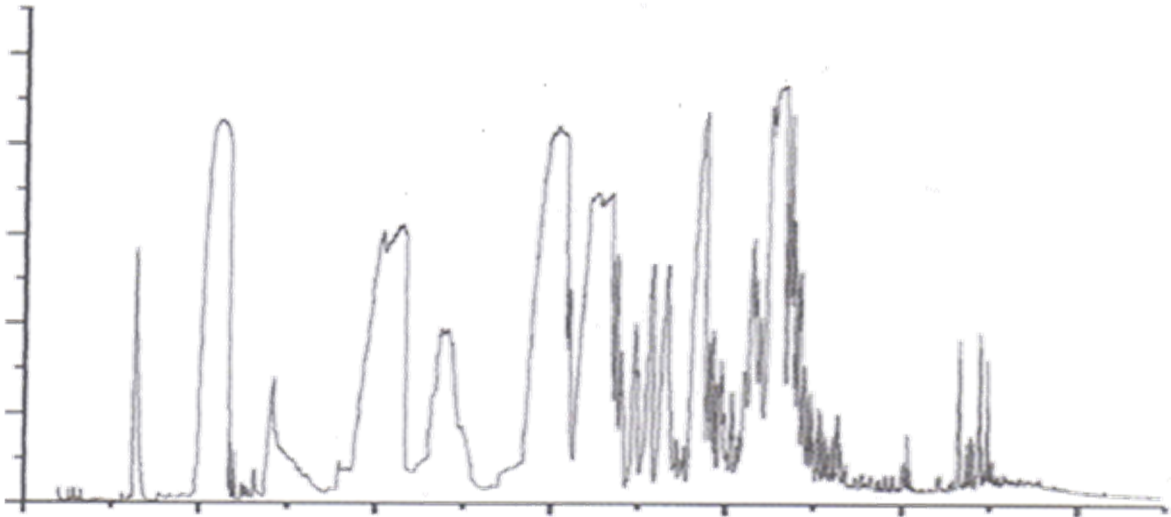


Figure B: Profil chromatographique de HEFeMN extraite par hydrodistillation et analysée par CG/SM (Chromatogramme 2)

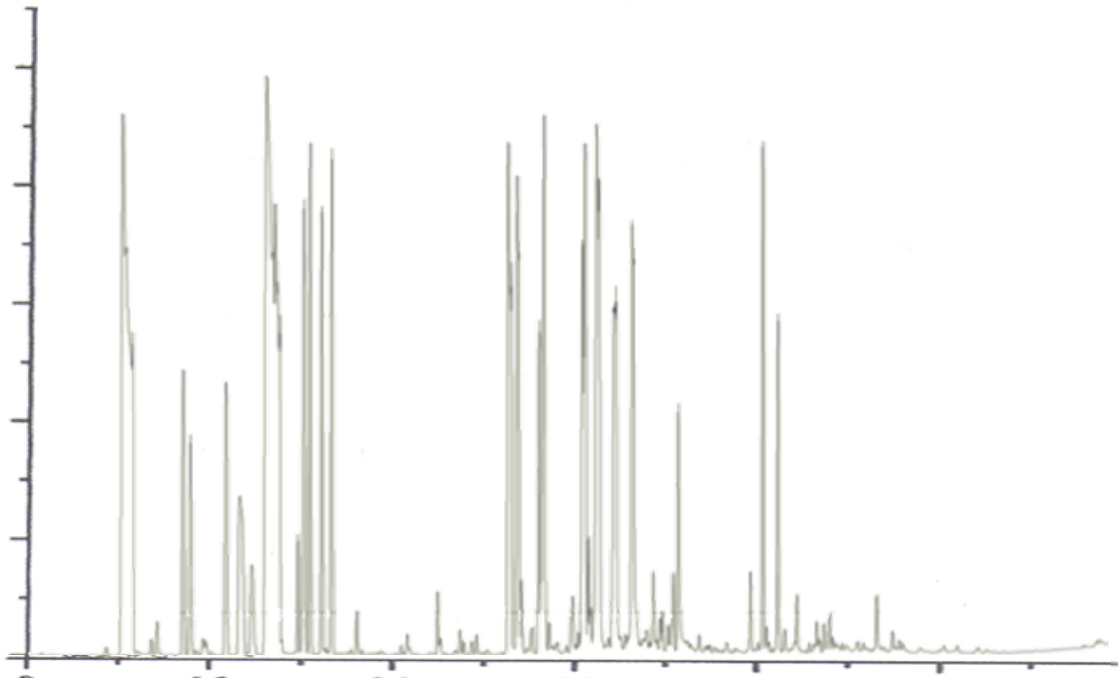


Figure C: Profil chromatographique de HEFrMC extraite par hydrodistillation et analysée par CG/SM (Chromatogramme 3)

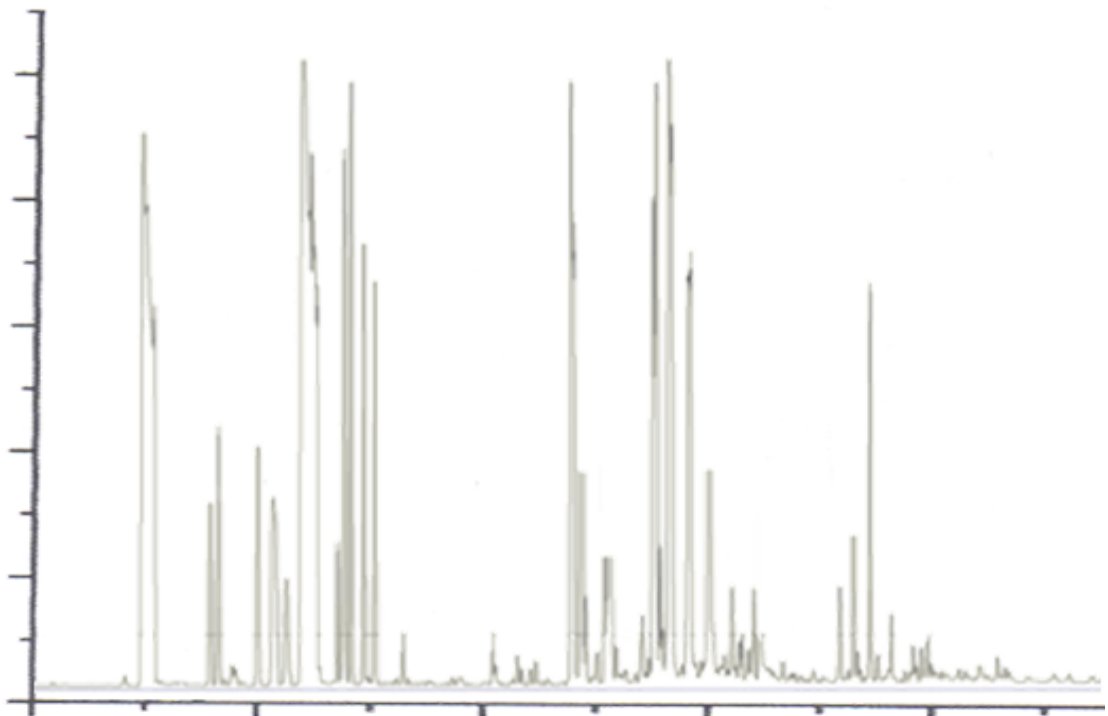


Figure D: Profil chromatographique de HEFrMN extraite par hydrodistillation et analysée par CG/SM (Chromatogramme 4)

## APPENDICE L

### Balayage spectral

Tableau 1 : Longueur d'ondes d'absorption de l'acide gallique.

N° du pic	Longueur d'onde (nm)	Absorbance
<b>1</b>	<b>266</b>	<b>0,724</b>
2	215	0,184

Tableau 2: Longueur d'ondes d'absorption des composés détectés au niveau des extraits méthanoliques de *M communis* et *M nivellei*.

Espèce	N° du pic	Longueur d'onde (nm)	Absorbance
<i>EMFeMC</i>	01	436,5	0,288
	02	359,5	0,253
	<b>03</b>	<b>284,0</b>	<b>0,782</b>
	<b>04</b>	<b>272</b>	<b>0,789</b>
	05	242	0,310
	06	210	0,255
<i>EMFeMN</i>	01	365	0,009
	02	357,5	1,577
	<b>03</b>	<b>282,5</b>	<b>0,733</b>
	04	232	0,145
<i>EMFrMC</i>	01	205	0,210
	02	244	0,335
	03	266	0,520
	<b>04</b>	<b>281</b>	<b>0,721</b>
	<b>05</b>	<b>290</b>	<b>0,763</b>
<i>EMFrMN</i>	01	215	0,440
	02	223	0,389
	03	266	0,404
	04	<b>285</b>	<b>0,651</b>
	05	<b>292</b>	<b>0,606</b>
	07	437	0,248
<i>EMCaMC</i>	01	664	0,082
	02	661	0,055
	03	534	0,081
	04	<b>287</b>	<b>0,778</b>
	05	<b>273</b>	<b>0,763</b>
	<b>06</b>	266	0,570
	07	210	0,209
<i>EMCaMN</i>	01	607	0,106
	02	536	0,123
	03	<b>327</b>	<b>0,528</b>
	<b>04</b>	<b>286</b>	<b>0,524</b>
	05	266	0,224
	06	220	0,412

Tableau 3: Longueur d'ondes d'absorption des composés détectés au niveau des extraits éthanoliques de *M. communis* et *M. nivellei*.

Espèce	N° du pic	Longueur d'onde (nm)	Absorbance
<i>EEFeMC</i>	01	537,5	0,090
	02	506,0	0,090
	03	420	0,233
	<b>04</b>	<b>279,5</b>	<b>0,582</b>
	<b>05</b>	266	0,268
<i>EEFeMN</i>	01	272	<b>0,475</b>
	02	266	0,229
	<b>03</b>	<b>212</b>	0,220
<i>EEFrMC</i>	01	389	0,213
	02	<b>277,5</b>	<b>0,732</b>
	<b>03</b>	266	0,689
	04	235	0,556
	05	208	0,501
<i>EEFrMN</i>	01	240	0,562
	<b>02</b>	<b>263,5</b>	<b>0,721</b>
		<b>266</b>	
	03	380	0,198



## APPENDICE M

### Tracés des courbes d'étalonnages réalisées

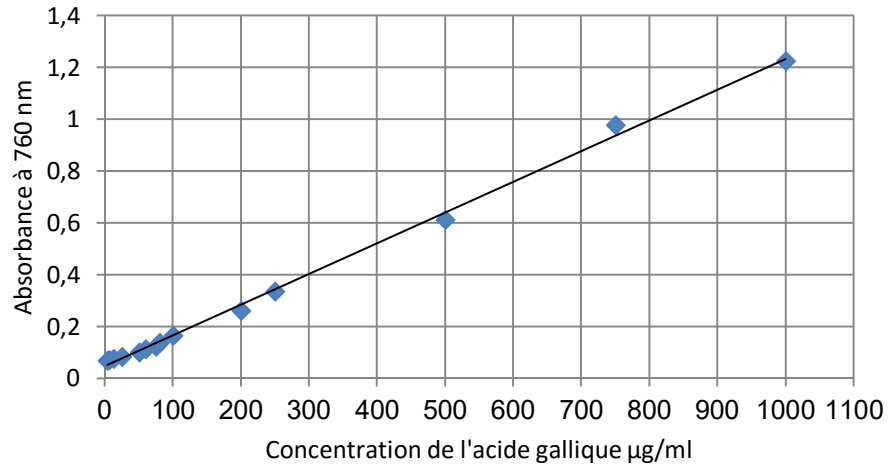


Figure 1: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

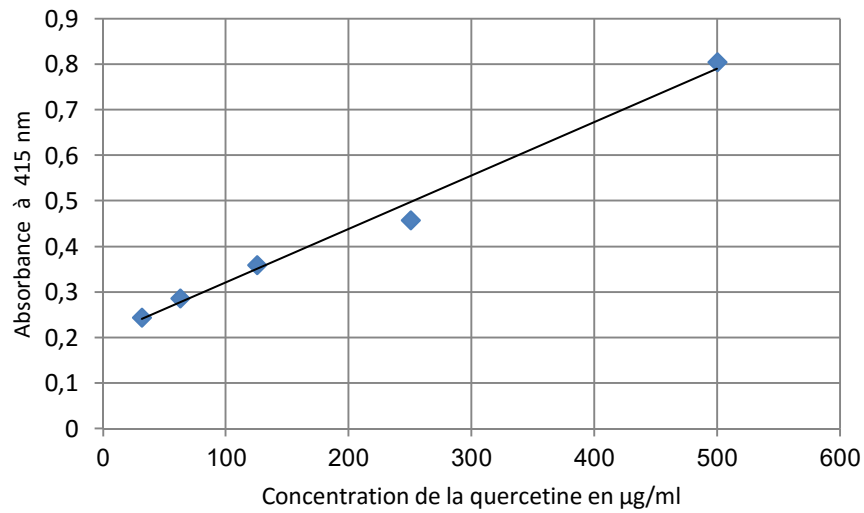


Figure 2: Courbe d'étalonnage de la quercétine

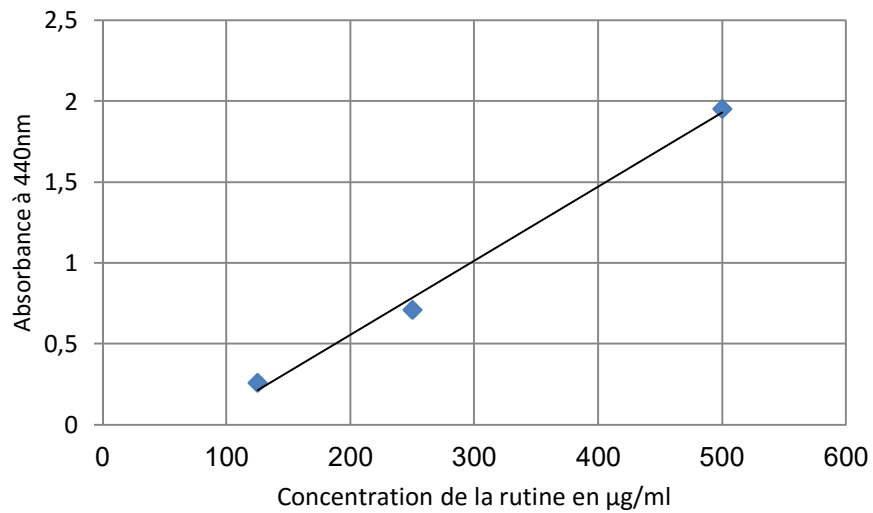


Figure 3: Courbe d'étalonnage de la rutine

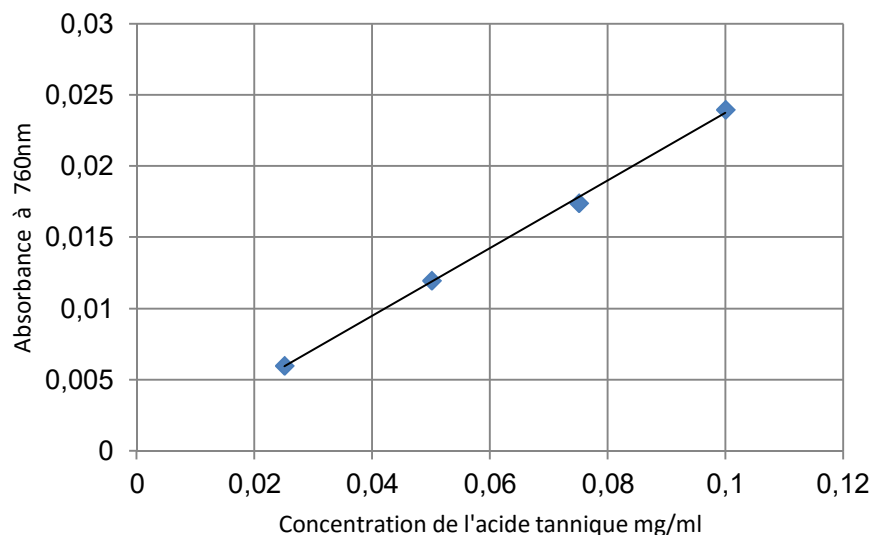


Figure 4: Courbe d'étalonnage de l'acide tannique

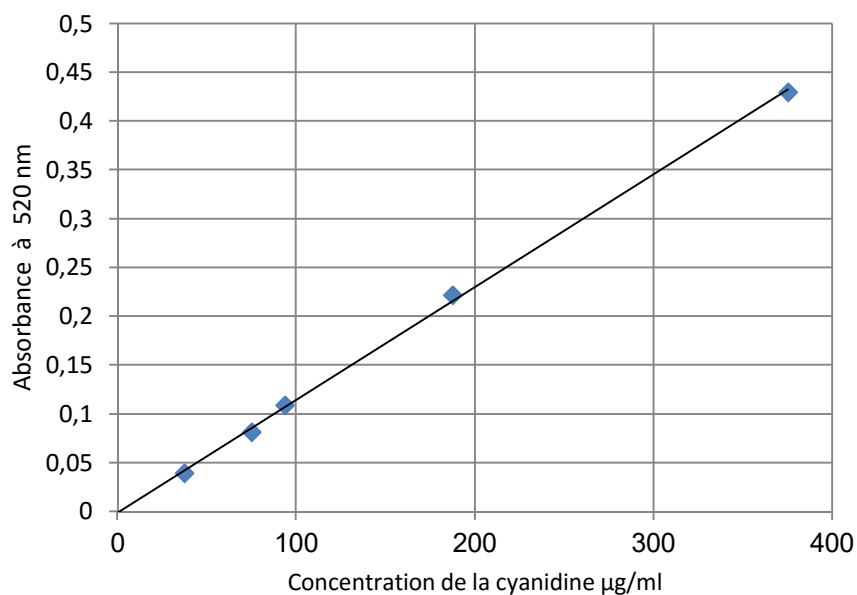


Figure 5: Courbe d'étalonnage de la cyanidine

Tableau 1 : Résultats des différents dosages spectrophotométriques effectués

	Extraits méthanoliques						Extraits éthanoliques			
	FeMC	FeMN	FrMC	FrMN	CaMC	CaMN	FeMC	FeMN	FrMC	FrMN
<b>Polyphenols</b>	385.9±0.016	348.1±0.809	482.6±0.500	410±2.445	189±0.054	73±1.544	761±0.003	734.3±0.145	792±0.610	789±0.440
<b>Flavonoïdes</b>	127.3±0.850	152.25±0.485	264±2.240	256±0.667	64.1±0.223	91±0.045	150.9±0.455	181.1±0.073	287.5±0.562	289.3±1.200
<b>Flavonol</b>	378±1.056	438.5±0.457	458±0.645	351.4±0.854	111±1.425	102.8±0.656	730.5±3.041	711.75±0.456	725±0.100	751.2±0.560
<b>Tanins</b>	130.5±3.550	155.27±1.256	357±0.211	269±2.556	22.78±0.250	22.36±0.115	120.44±1.245	139.24±1.747	341±0.496	355.4±0.401
<b>anthocyanes</b>	19.8±1.562	17.2±1.025	85.5±0.005	82.4±0.452	5.09±0.120	5.19±0.405	23.3±0.456	25.5±1.440	150.5±1.544	146.7±0.500

## Appendice N

### Expérimentation animale

Indices d'irritation primaire cutanée

Tableau I.1. : Résultats des observations du test IPC de l'HE des feuilles de *M communis*

HEFeMC	Lapin 1				Lapin 2				Lapin 3			
	FD		FG		FD		FG		FD		FG	
	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O
24h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72h	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

Tableau I.2 : Résultats des observations du test IPC de l'HE des feuilles de *M nivellei*

HEFeMN	Lapin 1				Lapin 2				Lapin 3			
	FD		FG		FD		FG		FD		FG	
	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O
24h	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
72h	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

Tableau I.3 : Résultats des observations du test IPC de l'HE des fruits de *M communis*

HEFrMC	Lapin 1				Lapin 2				Lapin 3			
	FD		FG		FD		FG		FD		FG	
	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O
24h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72h	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Tableau I.4 : Résultats des observations du test IPC de l'HE des fruits de *M nivellei*

HEFrMN	Lapin 1				Lapin 2				Lapin 3			
	FD		FG		FD		FG		FD		FG	
	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O
24h	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
72h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau I.5 : Résultats des observations du test IPC de l'extrait MeOH des feuilles de *M communis*

EMFeMC	Lapin 1				Lapin 2				Lapin 3			
	FD		FG		FD		FG		FD		FG	
	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O
24h	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
72h	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0

Tableau I.6: Résultats des observations du test IPC de l'extrait MeOH des feuilles de *M nivellei*

EMFeMN	Lapin 1				Lapin 2				Lapin 3			
	FD		FG		FD		FG		FD		FG	
	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O
24h	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
72h	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

Tableau I.7: Résultats des observations du test IPC de l'extrait MeOH des fruits de *M communis*

EMFrMc	Lapin 1				Lapin 2				Lapin 3			
	FD		FG		FD		FG		FD		FG	
	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O
24h	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
72h	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

Tableau I.8: Résultats des observations du test IPC de l'extrait MeOH des fruits de *M nivellei*

EMFrMN	Lapin 1				Lapin 2				Lapin 3			
	FD		FG		FD		FG		FD		FG	
	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O
24h	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
72h	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0

Tableau I.9: Résultats des observations du test IPC de l'extrait EtOH des feuilles de *M communis*

EEFeMC	Lapin 1				Lapin 2				Lapin 3			
	FD		FG		FD		FG		FD		FG	
	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O
24h	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
72h	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

Tableau I.10: Résultats des observations du test IPC de l'extrait EtOH des feuilles de *M nivellei*

EEFeMN	Lapin 1				Lapin 2				Lapin 3			
	FD		FG		FD		FG		FD		FG	
	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O
24h	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
72h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau I.11: Résultats des observations du test IPC de l'extrait EtOH des fruits de *M communis*

EEFrMC	Lapin 1				Lapin 2				Lapin 3			
	FD		FG		FD		FG		FD		FG	
	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O
24h	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
72h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau I.12: Résultats des observations du test IPC de l'extrait EtOH des fruits de *M nivellei*

EEFrMN	Lapin 1				Lapin 2				Lapin 3			
	FD		FG		FD		FG		FD		FG	
	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O
24h	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
72h	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Tableau 1: Effet anti-microbien des HE et des extraits de *M. communis* et *M. nivellei* sur la croissance des différentes souches étudiées (diamètres des zones d'inhibition exprimés en mm).

Extrait Souche	Huiles essentielles				Extraits méthanoliques						Extraits éthanoliques				Témoins	
	HEFeMC	HEFeMN	HEFrMC	HEFrMN	EMFeMC	EMFe MN	EMFrMC	EMFrMN	EMCaMC	EMCaMN	EEFeMC	EEFeMN	EEFrMC	EEFrMN	T+	T-
<i>S pneumoniae</i>	13,67±0,65	14,67±0,50	11,50±1,13	12,00±2,5	15,33±0,11	15,33 0,33	12,00±1,66	10,00±1,24	-	-	13,33±0,65	13,33±0,65	10,50±0,33	11,00±1,30	22	-
<i>S epidermidis</i>	27,33±0,65	34,00±1,13	25,00±0,96	24,00±1,02	13,67±4,57	13,67±1,72	13,67±4,20	11,67±0,00	-	-	14,00±0,30	14,60±1,30	-	-	7	-
<i>M catarrhalis</i>	10,00±0,65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	-
<i>P aeruginosa</i>	12,00±2,26	15,33±1,65	-	13,67±0,50	11,33±0,65	11,33±0,65	11,00±0,00	10,00±0,00	-	-	11,00±0,96	11,00±1,13	12,50±0,33	14,00±0,50	13	-
<i>B. cereus</i>	11,50±1,30	13,50±1,13	-	-	11,00±0,32	-	-	-	-	-	12,50±0,50	-	-	11,00±1,72	16	-
<i>E coli</i>	38,00±2,99	20,66±0,65	15,00±0,56	15,50±1,20	16,00±1,72	11,00±1,72	14,00±0,98	11,33±0,50	-	-	14,50±0,24	10,50±0,24	12,25±2,45	-	14	-
<i>S aureus</i>	20,00±1,13	20,67±1,30	14,25±0,33	16,50±0,67	19,33±3,63	19,33±3,63	14,50±2,33	11,00±1,62	-	-	19,00±0,33	19,50±2,99	-	-	11	-
<i>A iwoffii</i>	10,50±0,45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E aerogenes</i>	12,50±1,20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,67±1,20	-	-	-	18	-
<i>S typhi</i>	27,00±1,13	24,00±1,30	18,00±1,96	20,00±1,20	17,33±0,47	17,33±0,47	12,00±0,24	11,67±1,13	-	-	14,33±2,35	14,33±2,35	10,50±0,66	12,00±0,33	17	-
<i>S flexineri</i>	21,33±1,72	16,00±1,13	15,00±0,66	13,50±0,23	17,67±0,65	17,00±0,10	13,33±0,00	11,25±0,32	-	-	13,50±1,13	13,00±0,00	11,00±1,72	12,25±2,45	-	-
<i>E faecalis</i>	15,00±0,24	19,33±1,30	15,50±1,20	15,00±0,33	10,50±0,33	11,67±1,35	12,25±2,45	-	-	-	11,33±1,72	-	12,00±0,25	-	18	-
<i>K pneumoniae</i>	15,67±1,57	12,50±0,20	18,25±0,50	13,00±0,65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-
<i>P mirabilis</i>	11,00±0,50	13,00±0,62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28	-
<i>C albicans</i>	21,33±1,72	17,00±1,96	-	-	17,00±1,30	17,66±0,65	13,50±1,36	11,33±0,00	-	-	15,00±1,20	13,00±1,20	14,25±0,67	11,00±0,50	14	-
<i>C krusei</i>	12,50±1,12	-	-	-	-	12,33±0,24	-	-	-	-	12,00±0,20	13,50±1,96	-	-	11	-
<i>Alternaria sp</i>	20,00±0,50	12,00±1,03	-	-	14,00±0,00	11,50±0,10	13,00±0,00	10,00±0,00	-	-	11,00±0,00	11,00±0,00	-	-	10	-
<i>F oxysporium ssp albidinis</i>	14,00±0,50	11,00±1,96	14,00±0,33	13,50±1,20	13,50±0,33	13,00±0,00	11,50 ±0,98	14,00±0,00	-	-	12,50±0,98	15,00±0,00	12,00±1,13	-	-	-
<i>F oxysporium ssp lycopersici</i>	14,00±1,62	-	-	-	13,00±0,00	12,00±2,45	10,50±0,50	11,00±0,00	-	-	13,00±0,04	14,00±0,00	-	-	-	-
<i>Penicillium sp</i>	13,00±0,62	-	-	-	10,00±0,65	11,00±1,13	12,50 ±0,98	12,00±0,00	-	-	11,00±0,00b	10,00±0,00	-	-	22	-

Non sensible ou résistante (-): diamètre < 10mm.  
Moyennement sensible: diamètre compris entre 10 à 14 mm.  
Très sensible: diamètre compris entre 15 à 19 mm.  
Extrêmement sensible: diamètre ≥ 20 mm



## GLOSSAIRE

**Anatrophe** Se dit d'un ovule dont le hile et le micropyle sont situés l'un à côté de l'autre, à l'une des extrémités, tandis que la chalaze ou base organique de l'ovule se trouve à l'autre extrémité.

**Androcée** Ensemble des étamines (appareil reproducteur mâle de la fleur).

**Anthère** Partie de l'étamine portée par le filet, contenant le pollen dans les loges polliniques.

**Antalgique** Qui calme la douleur.

**Anti-inflammatoire** Qui calme les inflammations, synonyme d'antiphlogistique.

**Anti-spasmodique** Contre les contractions brusques et violentes des muscles lisses ou striés.

**Astringente** Qui diminue ou arrête les sécrétions et resserre les tissus.

**Bractée** Feuille fréquemment colorée qui accompagne une fleur ou une inflorescence. Les bractées se trouvent souvent à la base du pédoncule.

**Cal** Le cal qui se produit à la suite d'une blessure est un tissu cicatriciel généralement homogène formé de cellule se divisant activement. En culture *in vitro*, le cal est un tissu de néoformation produit par l'explant sous l'effet de régulateurs de croissance.

**Callogenèse** Néoformation ou genèse d'un cal.

**Carpelle** Organe reproducteur femelle de la fleur, formé d'un ovaire contenant le ou les ovules, et d'un stigmate.

**Caulogenèse** C'est la formation d'une tige, ce terme est employé pour désigner la formation des bourgeons à l'origine des tiges feuillées. Dans le cas de l'organogenèse *in vitro*, elle désigne la néoformation de bourgeons.

**Compilotrope** Se dit d'un ovule courbé dont le micropyle et le hile sont éloignés l'un de l'autre et forment une droite parallèle à la paroi de l'ovaire.

**Coriace** Dont on peut difficilement vaincre la résistance.

**Dédifférenciation cellulaire** Retour progressif de cellules différenciées vers l'état meristématique avec apparition des caractères cytologiques embryonnaires suivants: vacuole réduite, rapport nucléoplasmique élevé et des plastes peu différenciés.

**Différenciation cellulaire** Perte progressive des caractères cytologiques et physiologiques des cellules embryonnaires et acquisition des caractéristiques des cellules adultes spécialisées avec une grande vacuole centrale et rapport nucléoplasmique faible.

**Dialystemone** Amas d'étamines non soudées.

**Expectorant** Facilite l'expulsion des mucosités qui obstruent les voies respiratoires.

**Emulsifiants** Substances qui facilitent la dispersion de deux ou de plusieurs phases non miscibles.

**Étamine** Organe reproducteur mâle d'une fleur, elle est composée d'une anthère habituellement à deux loges fixées à un filet.

**Excipient** Partie neutre du médicament, dans laquelle on incorpore les principes actifs.

**Fongicide** Substance qui détruit les champignons.

**Glabre** Dépourvue de poils ou de duvets.

**Galénique** Mode de présentation et de conditionnement d'un principe actif.

**Gingivite** Inflammation de la gencive, causée par la plaque bactérienne dentaire.

**Hémorroïdes** Varices des veines du rectum et de l'anus.

**Immunostimulant** Qui amplifie des réactions de défense de l'organisme.

**Infère** Se dit de l'ovaire quand il est situé sous le plan d'insertion des pièces florales.

**Lancéolé** Feuille rétrécie en pointe à l'extrémité et à base large.

**Multiplication végétative** Synonyme de reproduction asexuée. Elle aboutit à la constitution de clones homogènes.

**Meristemone** Se dit lorsque les étamines d'un androcée sont libres entre elles (Syn. : dialystemone).

**Néoformation** Formation de nouveaux tissus.

**Nucule** Fruit sec indéhiscent de type akène, à péricarpe entièrement ligneux.

**Organogenèse** Formation des organes, l'organogenèse végétative se déroule essentiellement au niveau des méristèmes.

**Pérenne** Plante dont la durée de vie s'étale sur plusieurs années.

**Péricarpe** Ensemble des différentes parties de la paroi du fruit, de l'intérieur vers l'extérieur (Endocarpe, mésocarpe et épicarpe).

**Pistil** Ensemble des pièces fertiles femelles. Il est constitué d'un ou plusieurs carpelles, libres ou soudés entre eux. (Syn. : gynécée).

**Pivotant** Se dit d'une racine issue d'une graine, très grosse par rapport aux racelles et s'enfonce verticalement dans le sol.

**Principe actif** Molécule qui, dans un médicament ou dans une plante, possède un effet thérapeutique. Cette substance est en très faible proportion dans le médicament par rapport aux excipients.

**Prébiotique** Se sont des glucides non assimilables par notre organisme.

**Polyadelphie** Etamines nombreuses réunies ou soudées par leurs filets.

**Rhizogenèse** Formation de racines

**Stigmate** Partie supérieure du pistil sur laquelle se dépose le pollen.

**Tanin** Substance polyphénolique non azotée.