

# UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA

Faculté des Sciences Agronomiques, Vétérinaires et Biologiques

Département de Biologie

## MEMOIRE DE MAGISTER

en Biologie

Spécialité : Biotechnologie Végétale

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE DEUX PLANTES

MEDICINALES : *Myrtus communis* L. et *Myrtus nivellei* Batt et

Trab. OBTENUES *In Situ* ET *In Vitro*

Par

**TOUAIBIA Meriem**

Devant le jury composé de

F. SAIDI	Professeur, U de Blida	Présidente
M. BENCHAAABANE	Maitre de Conference A, U de Blida	Examineur
A. BERBER	Maitre de Conference A, U de Blida	Examineur
F.Z. CHAOUCH	Maître de Conférence A, U de Blida	Promotrice
H.S. CHERIF	Maitre assistante, U de Blida	Co-Promotrice

Blida, Avril 2011

## RESUME

Notre travail porte sur l'extraction, la caractérisation et la quantification de quelques métabolites secondaires de l'espèce méditerranéenne *M communis* L. (*Rihan*). et l'espèce saharo-endémique *M nivellei* Batt et Trab. (*Tafeltest*).

Les essais d'introduction in vitro, nous ont permis de mettre en place un protocole pour la désinfection des graines. La micro-propagation à partir de vitro-semis a montré que le milieu de base MS complété avec 1.5 mg/l BA+0.5 mg/l ANA+0.05mg/l GA<sub>3</sub>, a permis un très bon allongement caulinaire. L'induction des racines est plus efficace sur le milieu contenant 1mg/l ANA. Les essais de callogénèse ont révélé que les milieux contenant une balance hormonale équilibrée auxine/cytokinine ont fourni des cals volumineux. Cependant, les explants de feuilles et d'entre-nœuds sont plus callogènes que les racines.

L'analyse de la fraction volatile par CG/SM a permis d'identifier les composés majoritaires des huiles essentielles des plantes récoltées, grâce à laquelle nous avons attribué le chémotype Limonène/ $\alpha$ -pinène à *M communis*, et le chémotype  $\delta$ -elemène/ $\alpha$ -Terpinéol à *M nivellei*. Le dosage par spectrophotométrie UV-visible de quelques groupes de polyphénols a révélé leur présence en concentrations élevées dans les extraits polaires des plantes, alors que les extraits des cals sont pauvres en polyphénols mais riches en sucres. L'étude de l'activité anti-microbienne des huiles essentielles et des extraits a montré que les souches *E coli*, *S aureus* et *S epidermidis* sont les plus sensibles. Un important pouvoir anti-oxydant a été observé pour les extraits des deux plantes, alors que les huiles essentielles et les extraits des cals ont présenté un excellent pouvoir chélateur du fer.

Mots clefs: *Myrtus communis* L., *Myrtus nivellei* Batt et Trab., micro-propagation, huiles essentielles, extraits.

## ABSTRACT

Our work concerns the extraction, the characterization and the quantification of some active secondary metabolites of the mediterranean specie *Myrtus communis* L. and the saharo-endemic specie *Myrtus nivellei* Batt and Trab.

The *in vitro* assay leads to the determination of the best protocol for the seed's disinfection. The *in vitro* shoot's culture from seedling plantlets show that the basic medium MS supplemented with 1.5mg/l BAP+0.5mg/l ANA+ 0.05mg/l GA<sub>3</sub>, is the best medium for the buds' elongation. The rooting induction is more efficient on MS medium containing 1mg/l ANA. The callus culture assays reveal that the media containing an equilibrated balance auxin/cytokinin allow the growth of big callus. However, explants taken from leaves or hypocotyles are more callogenuous than roots.

The analysis of the volatile fraction by GC/MS permits the identification of the major components of the essential oils. We give the chemotype *Limonene/α-pinene* to *M communis* and the chemotype *δ-elemene/α-terpineol* to *M nivellei*. The quantification of some scales of polyphenols by UV-vis spectrophotometry shows high concentrations of these metabolites in the polar extracts. Whereas, the callus extracts are poor on polyphenols but very rich on sugar. The antimicrobial activity of the essential oils and the extracts shows a high sensitivity of some strains like: *E coli*, *S aureus*, *S epidermidis*. An important free-radical scavenging activity is observed with the different extracts of these two species. Whereas, essential oils and callus extracts have an excellent iron chelating ability.

Keywords: *Myrtus communis* L., *Myrtus nivellei* Batt et Trab., micro-propagation, essential oils, extracts.

## ملخص

يتمحور عملنا هذا حول استخلاص, وصف و قياس بعض المركبات الفعالة الموجودة في النبتة المتوسطة *Myrtus communis L.* (ربحان) و النبتة الصحراوية *Myrtus nivellei Batt et Trab.* (تافلنست) .

أدى تحليل النتائج الأولية للاستنبات المخبري إلى الوصول إلى الطريقة المثلى لتعقيم و البذور المستنبطة مخبريا. كما تبين أن الهرمونات النباتية تلعب دورا أساسيا في جميع مراحل تطور الزراعة النسيجية حيث تم تطاول الفسائل بشكل جيد في وسط الزرع MS الذي يحتوي على 1.5مغ/ل BA و 0.5 مغ/ل ANA و 0.05 مغ/ل GA<sub>3</sub>. أما النمو الجذري فهو افضل في الوسط الذي به 1 مغ/ل ANA. الدراسات العملية حول التكاثر الخضري للأنسجة أظهرت 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.

من خلال دراسة الزيوت الأساسية بطريقة الكروماتوغرافيا الغازية المقرونة بطيف الكتلة (CG/SM) تمكنا من منح التصنيف Limonène/α pinène للنبتة *M communi* والتصنيف δ elemene/α terpinéol للنبتة *M nivellei*.

تحديد مقدار بعض انواع مركبات متعددة الفينول بتقنية الكروماتوغرافيا الضوئية و الفوق بنفسجية اظهر وجود كميات عالية لهذه المركبات في المستخلصات الكحولية. بينما تميزت مستخلصات الأنسجة المخبرية بنسب اضعف من المركبات الفينولية و نسبة جد مرتفعة من السكريات. دراسة اثر المستخلصات و الزيوت الأساسية ضد الجراثيم أظهرت أن الجذوات (souches) المختبرة الأكثر حساسية هي *S aureus* , *E coli* و *S epidermidis* . نلاحظ فعالية كبيرة ضد التاكسد بالنسبة الى كل المستخلصات. بينما اظهرت الزيوت الأساسية و مستخلصات الأنسجة الخلوية فعالية كبيرة لاستقطاب ايونات الحديد.

الكلمات المفتاح : *Myrtus nivellei Batt et Trab.*, *Myrtus communis L.*, الافتسال الدقيق, الزيوت الأساسية, المستخلصات.

## *Dédicace*

### *Je dédie ce travail à mes parents*

*« Jamais je n'oublierai vos sacrifices pour moi, vous étiez toujours avec moi par vos encouragements et vos conseils. Que vous trouviez dans ce travail une expression de mon grand amour envers vous et de ma grande reconnaissance ! Que dieu tout puissant vous protège et vous offre la santé et une longue vie ! »*

### *A mes sœurs et mon frère*

*« Que dieu vous garde, vous protège et vous offre une vie pleine de bonheur et de succès ! Que vous trouviez dans ce travail mes vifs sentiments d'amour et d'affection ! »*

### *A tous mes collègues et amies*

*« Vous êtes toujours dans mon cœur. Je ne vous oublierai jamais. Veuillez trouver dans ce travail mon expression d'amour et d'amitié ! »*

*Meriem* 

## *Remerciements*

*Je tiens tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant de m'avoir accordé courage et volonté pour accomplir ce modeste travail.*

*J'exprime mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance à Mme CHAOUCH Fatma Zohra qui a bien voulu diriger ce mémoire et qui m'a guidé avec ses précieux conseils tout au long de son élaboration, qu'elle trouve ici mes sentiments de gratitude.*

*J'adresse mes vifs remerciements à Mme CHERIF Hamida qui a accepté de co-diriger ce travail, ainsi que pour les précieux conseils qu'elle m'a prodigués.*

*Avec une immense joie, j'ai l'honneur d'exprimer ma profonde reconnaissance à Mme SAIDI Fairouz 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.*

*Mes remerciements vont également à Monsieur BENCHAAABANE Mohamed et Monsieur BERBER Ali qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail*

*Ma sincère gratitude est transmise à Monsieur CHELHA Directeur du laboratoire de culture in vitro de l'ENARP et tout le personnel de cet établissement, qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance.*

*Un grand merci est adressé à toute l'équipe du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida qui m'ont accueilli dans une ambiance sympathique et chaleureuse et qui sont désormais mes amis. Merci à tous pour leur assistance et leurs discussions scientifiques.*

*Je ne voudrais pas omettre de remercier mes camarades de promotion pour l'agréable ambiance qui a régné entre nous tout au long de la préparation du magister, et auxquels je souhaite beaucoup de succès et de bonheur.*

*Je ne saurais oublier de remercier chaleureusement toutes les personnes qui m'ont aidé pour la réalisation de ce projet, un grand merci s'adresse en particulier à tous les ingénieurs des laboratoires du département de Biologie et d'Agronomie qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à l'aboutissement de ce travail. Je remercie également tous les étudiants que j'ai eu l'occasion de côtoyer ainsi que tous ceux qui ont contribué de pré ou de loin pour la réalisation de ce mémoire.*

*Merci, à tous*

## TABLE DES MATIERES

RESUME

ABSTRACT

ملخص

TABLE DES MATIERES

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

INTRODUCTION	14
1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	16
1.1. Les plantes médicinales et la phytothérapie	16
1.2. Les substances actives	20
1.3. Culture <i>in vitro</i>	28
1.4. Les plantes médicinales étudiées	32
1.4.1. Historique	32
1.4.2. La famille des myrtaceae	32
1.4.3. L'espece <i>Myrtus communis</i> L.	33
1.4.4. L'espece <i>Myrtus nivellei</i> Batt et Trab.	40
2. EXPERIMENTATION ET METHODES D'ANALYSES	44
2.1. Présentation des zones de prélèvement	44
2.1.1. Le Tassili n'Ajjer	44
2.1.2. Zaccar	45
2.2. Matériels	47
2.2.1. Instruments et réactifs	47
2.2.2. Matériel biologique	47
2.2.3. Conservation	48
2.3. Méthodes	48
2.3.1. Etude botanique de la plante	50
2.3.2. Partie culture <i>in vitro</i>	53
2.3.3. Partie étude phytochimique	59
3. RESULTATS ET DISCUSSION	85
3.1. Etude botanique des plantes	85
3.1.1. Etude morphologique	85
3.1.2. Etude histo-anatomique	94
3.2. Résultats des essais <i>in vitro</i>	102
3.2.1. Résultats de la désinfection des micro-boutures obtenus <i>in situ</i>	102
3.2.2. Résultats de la désinfection des graines	104
3.2.3. Résultats de la multiplication par graines sur boîtes de pétri	105

3.2.4. Résultats des essais de multiplication <i>in vitro</i>	107
3.3. Résultats de l'étude phytochimique des plantes étudiées	125
3.3.1. Résultats de la caractérisation physicochimique	125
3.3.2. Résultats du Screening phytochimique	130
3.3.3. Résultats de l'étude des principes actifs	132
CONCLUSION	173
APPENDICES	176
A. Liste des abreviations, symboles et conventions	176
B. Structure de quelques composés phénoliques	177
C. Structures chimiques de quelques régulateurs de croissance	178
D. Instruments, appareillages et réactifs utilisés	179
E. Composition des solutions minérales et vitaminiques utilisées	181
F. Principales étapes de l'extraction liquide-liquide des flavonoïdes	182
G. Identification des champignons phytopathogènes utilisés	183
H. Etude statistique	184
I. Aspect des cals obtenus <i>in vitro</i>	186
J. Développement de bourgeons néoformés sur cals d'origine foliaire	187
GLOSSAIRE	188
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	



## LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

Tableau 1.1	Bioactivité de quelques composés des huiles essentielles.	25
Tableau 1.2	Bioactivité de certains composés phénoliques.	27
Tableau 1.3	Principaux chémotypes de <i>M communis</i> L. selon l'origine géographique	37
Tableau 2.1	Coordonnées géographiques du site de récolte de <i>M nivellei</i> .	44
Tableau 2.2	Coordonnées géographiques du site de récolte de <i>M communis</i> L.	45
Tableau 2.3	Les parties récoltées de chaque espèce étudiée.	47
Tableau 2.4	Mode de désinfection des boutures prélevées <i>in situ</i> .	54
Tableau 2.5	Mode de désinfection des graines.	55
Tableau 2.6	Combinaisons hormonales des milieux de multiplication.	56
Tableau 2.7	Combinaisons hormonales des milieux d'élongation.	57
Tableau 2.8	Combinaisons hormonales des milieux d'élongation additionnées de GA <sub>3</sub> .	57
Tableau 2.9	Combinaisons hormonales des milieux d'enracinement.	57
Tableau 2.10	Combinaisons hormonales utilisées pour l'évaluation de la callogenèse	58
Tableau 2.11	Conditions d'analyse du CG/SM.	68
Tableau 2.12	Conditions des extractions solide-liquide effectuées.	69
Tableau 2.13	Origine des souches microbiennes testées.	79
Tableau 3.1	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> L. (MC) et <i>M nivellei</i> Batt et Trab. (MN).	104
Tableau 3.2	Effet de la balance hormonale BA/ANA sur l'allongement moyen des tiges et le nombre moyen des feuilles chez <i>M communis</i> L.	112
Tableau 3.3	Effet de la balance hormonale BA/ANA sur l'allongement moyen des tiges et le nombre moyen des feuilles chez <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	113
Tableau 3.4	Aspect et couleur des cals obtenus à partir des explants de feuilles.	122
Tableau 3.5	Aspect et couleur des cals obtenus à partir des explants d'entre-nœuds.	123
Tableau 3.6	Taux d'humidité chez <i>M communis</i> L. et <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	125
Tableau 3.7	Résultats du Screening phytochimique de <i>M communis</i> L.	130
Tableau 3.8	Résultats du Screening phytochimique de <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	131
Tableau 3.9	Caractères organoleptiques des huiles essentielles étudiées.	132
Tableau 3.10	Rendement des huiles essentielles étudiées .	133
Tableau 3.11	Densité relative des huiles essentielles étudiées.	133
Tableau 3.12	Composés majoritaires de l'huile essentielle de <i>M communis</i> L.	134
Tableau 3.13	Composés majoritaires de l'huile essentielle de <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	136
Tableau 3.14	Aspects, couleurs et rendements des extraits obtenus.	140
Tableau 3.15	Principaux étalons sélectionnés pour les dosages et leurs longueurs d'ondes	144
Tableau 3.16	Effets de la nystatine sur les souches fongiques testées.	152
Tableau 3.17	Effets de l'amoxicilline sur les souches bactériennes testées.	152
Tableau 3.18	Effet anti-oxydant des huiles essentielles et des extraits de <i>M communis</i> L. et <i>M nivellei</i> Batt et Trab. par le test DPPH.	158
Tableau 3.19	Pourcentages d'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique (J <sub>5</sub> )	168

Figure 1.1	Structure de l'unité isoprène (C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> ).	22
Figure 1.2	Structure de quelques composés des huiles essentielles.	23
Figure 1.3	Arbuste de <i>M communis</i> L. (photo originale).	35
Figure 1.4	Fleurs de <i>M communis</i> L.	35
Figure 1.5	Description des différentes parties de <i>M communis</i> L.	35
Figure 1.6	Répartition géographique de <i>M communis</i> L. et <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	41
Figure 1.7	Arbuste de <i>M nivellei</i> Batt et Trab. au bord d'un oued (photo originale).	43
Figure 1.8	Rameau portant une baie de <i>M nivellei</i> Batt et Trab.(photo originale).	43
Figure 1.9	Rameau de <i>Myrtus nivellei</i> Batt et Trab.	43
Figure 2.1	Carte géographique de la région du Tassili n'Ajjer (Djanet) montrant le site de récolte de l'espèce <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	46
Figure 2.2	Carte géographique de la région de Zaccar (Ain Defla) montrant le site de récolte de l'espèce <i>M communis</i> L.	46
Figure 2.3	Diagramme descriptif des principales méthodes et tests effectués.	49
Figure 2.4	Différentes étapes de réalisation de la technique de double coloration	52
Figure 2.5	Montage de l'entraînement à la vapeur.	65
Figure 2.6	Montage de l'extraction par soxhlet.	70
Figure 2.7	Schéma du protocole d'extraction des flavonoïdes.	72
Figure 2.8	Principe de la spectrophotométrie UV-visible.	74
Figure 3.1	Fleur de <i>M communis</i> L.	86
Figure 3.2	Sépale vu de face ( G:x4).	86
Figure 3.3	Pétale vue de face (G: x2,5).	86
Figure 3.4	Etamine vue de profil (G: x 4,5).	86
Figure 3.5	Face externe de l'ovaire (G:x4).	86
Figure 3.6	Ovaire en coupe transversale (G: x4,5).	86
Figure 3.7	Style vu de profil (G: x2,5).	86
Figure 3.8	Fleur de <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	88
Figure 3.9	Sépale vu de face (G: x4,5).	88
Figure 3.10	Pétale vue de face (G: x2,5).	88
Figure 3.11	Etamine vue de profil (G: x4,5).	88
Figure 3.12	Face externe de l'ovaire (G: x4,5).	88
Figure 3.13	Ovaire en coupe transversale (G: x4).	88
Figure 3.14	Ovaire en coupe longitudinale (G: x4).	88
Figure 3.15	Style vu de profil (G: x4).	88
Figure 3.16	Disposition des feuilles sur la tige de <i>M communis</i> L.	90
Figure 3.17	Feuilles de <i>M communis</i> L.	90
Figure 3.18	Jeune feuille poilue ( G: x4).	90
Figure 3.19	Face supérieure de la feuille montrant des poils tecteurs et des glandes oléifères (G: x4)	90
Figure 3.20	Disposition des feuilles sur la tige de <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	90
Figure 3.21	Feuilles de <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	90
Figure 3.22	Jeune feuille poilue (G: x4).	90
Figure 3.23	Face supérieure de la feuille montrant les glandes oléifères et l'extrémité pointue pigmentée du limbe (G: x2).	90
Figure 3.24	Rameau ligneux de <i>M communis</i> L.(G: x2) .	91
Figure 3.25	Rameau ligneux de <i>M nivellei</i> Batt et Trab. (G: x2).	91
Figure 3.26	Tige herbacée et poilue de <i>M communis</i> L. (G: x4).	91
Figure 3.27	Tige herbacée et poilue de <i>M nivellei</i> Batt et Trab. (G: x4).	91
Figure 3.28	Disposition des baies sur le rameau de <i>M communis</i> L.	93
Figure 3.29	Taille et diamètre de la baie de <i>M communis</i> L.	93
Figure 3.30	Fruit de <i>M communis</i> L. vu de profil.	93
Figure 3.31	Taille de la graine de <i>M communis</i> L.(G: x 4)	93

Figure 3.32	Disposition des baies sur le rameau de <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	93
Figure 3.33	Taille et diamètre de la baie de <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	93
Figure 3.34	Fruit de <i>M nivellei</i> Batt et Trab vu de profil	93
Figure 3.35	Taille de la graine de <i>M nivellei</i> Batt et Trab. (G:x6).	93
Figure 3.36	Coupe transversale d'une tige ligneuse de <i>M communis</i> L. (G: x 10).	96
Figure 3.37	Coupe transversale d'une jeune tige (G: x 10).	96
Figure 3.38	Le suber d'une tige ligneuse (G: x 40).	96
Figure 3.39	Macule d'oxalate de calcium (G: x 100).	96
Figure 3.40	Bois hétéroxylé (G: x 40).	96
Figure 3.41	Poils tecteurs (G: x 40).	96
Figure 3.42	Poche sécrétrice (G: x 40).	96
Figure 3.43	Parenchyme médullaire (G: x 40).	96
Figure 3.44	Coupe transversale d'une tige ligneuse de <i>M nivellei</i> Batt et Trab. (G:x10)	97
Figure 3.45	Coupe transversale d'une jeune tige (G: x 10).	97
Figure 3.46	Le suber d'une tige ligneuse (G: x 40).	97
Figure 3.47	Macule d'oxalate de calcium (G: x 40).	97
Figure 3.48	Bois hétéroxylé (G: x 40).	97
Figure 3.49	Poils tecteurs (G: x 10).	97
Figure 3.50	Poche sécrétrice (G: x 40).	97
Figure 3.51	Parenchyme modulaire (G: x 40).	97
Figure 3.52	Poche sécrétrice dans une feuille de <i>M communis</i> L. (G: x 40).	100
Figure 3.53	Coupe transversale dans la nervure centrale d'une feuille de <i>M communis</i> L. (G: x 40).	100
Figure 3.54	Coupe transversale dans une jeune feuille de <i>M communis</i> L. (G: x 4).	100
Figure 3.55	Pigmentation naturelle de la feuille de <i>M communis</i> à l'état vital (G:x10)	100
Figure 3.56	Poche sécrétrice dans une feuille de <i>M nivellei</i> Batt et Trab. (G: x 40).	100
Figure 3.57	Coupe transversale dans la nervure centrale d'une feuille de <i>M nivellei</i> .	100
Figure 3.58	Coupe transversale dans une jeune feuille de <i>M nivellei</i> (G:x4).	100
Figure 3.59	Pigmentation naturelle de la feuille de <i>M nivellei</i> à l'état vital (G: x 10).	100
Figure 3.60	Début de formation de la cavité résultant de la séparation des cellules sécrétrices (G: x 40).	101
Figure 3.61	Elargissement graduel du lumen avec lyse des cellules séparant la cavité de l'épiderme (G :x 40).	101
Figure 3.62	Elargissement apparent du lumen délimité par une couche de cellules sécrétrices et une rangée de cellules parenchymateuses (G: x 40)	101
Figure 3.63	Dégénérescence des poches sécrétrices (G : x 40).	101
Figure 3.64	Effet de Ca(ClO) <sub>2</sub> sur le taux de contamination des micro-boutures de <i>M communis</i> L.	102
Figure 3.65	Différents stades d'évolution des micro-boutures de <i>M communis</i> L.	103
Figure 3.66	Evaluation de la cinétique de germination des graines entières de <i>M communis</i> L. et <i>M nivellei</i> Batt et Trab. sur boîtes de pétri.	105
Figure 3.67	Evaluation de la cinétique de germination des graines <i>M communis</i> et <i>M nivellei</i> pré-traitées par scarification.	106
Figure 3.68	Vitro-semis de <i>M communis</i> L. âgé de 8 semaines.	107
Figure 3.69	Vitro-semis de <i>M nivellei</i> Batt et Trab. âgé de 8 semaines.	107
Figure 3.70	Evaluation de la cinétique d'allongement des hypocotyles chez les vitro-semis de <i>M communis</i> L. et <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	108
Figure 3.71	Evaluation de la cinétique d'apparition des feuilles chez les vitro-semis de <i>M communis</i> L. et <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	109
Figure 3.72	Evaluation du développement racinaire de <i>M communis</i> et <i>M nivellei</i> .	109
Figure 3.73	Developpement de racines adventives chez <i>M communis</i> L.	110

Figure 3.74	Pourcentage de débourrement des bourgeons chez <i>M communis</i> L. et <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	111
Figure 3.75	Micro-bouture de <i>M communis</i> en début de différenciation callogène.	111
Figure 3.76	Micro-bouture de <i>M nivellei</i> en début de différenciation callogène.	111
Figure 3.77	Croissance des micro-boutures de <i>M communis</i> selon la balance hormonale	112
Figure 3.78	Croissance des microboutures de <i>M nivellei</i> selon la balance hormonale	113
Figure 3.79	Vitro-plant de <i>M communis</i> L. à entre-nœuds très courts.	115
Figure 3.80	Vitro-plant de <i>M nivellei</i> Batt et Trab. à entre-nœuds très courts.	115
Figure 3.81	Vitro-plant de <i>M communis</i> L. après un mois sur milieu M <sub>2</sub> .	115
Figure 3.82	Vitro-plant de <i>M nivellei</i> Batt et Trab. après un mois sur milieu M <sub>2</sub> .	115
Figure 3.83	Effet de la GA <sub>3</sub> sur l'allongement moyen des vitro-plants de <i>M communis</i> L et <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	115
Figure 3.84	Effet de la variation de la concentration en ANA sur l'enracinement des vitro-plants de <i>M communis</i> L. et <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	117
Figure 3.85	Développement de racines sur un vitro-plant de <i>M communis</i> L.	117
Figure 3.86	Développement de racines sur un vitro-plant de <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	117
Figure 3.87	Vitro-plant de <i>M communis</i> L. sans racines.	117
Figure 3.88	Vitro-plant de <i>M nivellei</i> Batt et Trab. sans racines.	117
Figure 3.89	Effet des balances hormonales auxine/cytokinine (1/1) sur le pourcentage d'induction de la callogenèse chez <i>M communis</i> L.	121
Figure 3.90	Effet des balances hormonales auxine/cytokinine (1/1) sur le pourcentage d'induction de callogenèse chez <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	121
Figure 3.91	Valeurs du pH de <i>M communis</i> L. et <i>M nivellei</i> Batt et Trab..	125
Figure 3.92	Teneur en eau chez l'espèce <i>M communis</i> L.	126
Figure 3.93	Teneur en eau chez l'espèce <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	126
Figure 3.94	Teneur en eau des cals de <i>M communis</i> L.	127
Figure 3.95	Teneur en eau des cals de <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	127
Figure 3.96	Taux des substances extractibles par l'eau et par l'éthanol 80%.	128
Figure 3.97	Taux des cendres chez <i>M communis</i> L. et <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	129
Figure 3.98	Profil chromatographique de l'huile essentielle de <i>M communis</i> L. extraite par entraînement à la vapeur et analysée par CG/SM.	135
Figure 3.99	Profil chromatographique de l'huile essentielle de <i>M nivellei</i> Batt et Trab. extraite par entraînement a la vapeur et analysée par CG/SM.	137
Figure 3.100	Rendement des extraits flavonoïdiques de <i>M communis</i> et <i>M nivellei</i> .	140
Figure 3.101	Spectre UV-visible de l'acide gallique.	141
Figure 3.102	Spectre UV-visible de l'extrait MeOH de <i>M communis</i> L. ( <i>in situ</i> )	142
Figure 3.103	Spectre UV-visible de l'extrait MeOH de <i>M nivellei</i> Batt et Trab. ( <i>in situ</i> )	142
Figure 3.104	Spectre UV-visible de l'extrait MeOH de <i>M communis</i> L. ( <i>in vitro</i> )	142
Figure 3.105	Spectre UV-visible de l'extrait MeOH de <i>M nivellei</i> Batt et Trab ( <i>in vitro</i> )	142
Figure 3.106	Spectre UV-visible de l'extrait EtOH de <i>M communis</i> L. ( <i>in situ</i> )	142
Figure 3.107	Spectre UV-visible de l'extrait EtOH de <i>M nivellei</i> Batt et Trab. ( <i>In situ</i> )	142
Figure 3.108	Spectre UV-visible de la quercetine.	143
Figure 3.109	Spectre UV-visible de l'extrait flavonoïdique de <i>M communis</i> L.	143
Figure 3.110	Spectre UV-visible de l'extrait flavonoïdique de <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	143
Figure 3.111	Concentrations en polyphenols des différents extraits de <i>M communis</i> L. et <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	145
Figure 3.112	Concentrations en flavonoïdes des différents extraits de <i>M communis</i> L. et <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	146
Figure 3.113	Concentrations en flavonols des différents extraits de <i>M communis</i> L. et <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	147
Figure 3.114	Concentrations en sucres des différents extraits de <i>M communis</i> L. et <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	148

Figure 3.115	Concentrations en tanins des différents extraits de <i>M communis</i> L. et <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	149
Figure 3.116	Concentrations en anthocyanes des différents extraits de <i>M communis</i> L. et <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	151
Figure 3.117	Activité des huiles essentielles et des extraits de <i>M communis</i> L. et <i>M nivellei</i> Batt et Trab. sur la croissance des différentes souches étudiées (exprimée en diamètre de la zone d'inhibition)	153
Figure 3.118	Effets des huiles essentielles de <i>M communis</i> L. et <i>M nivellei</i> Batt et Trab. sur quelques souches testées.	155
Figure 3.119	Effets de certains extraits alcooliques et flavonoïdiques de <i>M communis</i> L et <i>M nivellei</i> Batt et Trab. sur quelques souches testées.	157
Figure 3.120	Pouvoir antioxydant de l'huile essentielle de <i>M communis</i> L.	160
Figure 3.121	Pouvoir antioxydant de l'huile essentielle de <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	160
Figure 3.122	Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'huile essentielle de <i>M communis</i> L. à différentes concentrations.	160
Figure 3.123	Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'huile essentielle de <i>M nivellei</i> Batt et Trab. à différentes concentrations.	160
Figure 3.124	Pouvoir antioxydant de l'extrait éthanolique de <i>M communis</i> ( <i>in situ</i> )	162
Figure 3.125	Pouvoir antioxydant de l'extrait éthanolique de <i>M nivellei</i> ( <i>in situ</i> )	162
Figure 3.126	Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait éthanolique de <i>M communis</i> L. à différentes concentrations	162
Figure 3.127	Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait éthanolique de <i>M nivellei</i> Batt et Trab. à différentes concentrations	162
Figure 3.128	Pouvoir anti-oxydant de l'extrait méthanolique de <i>M communis</i> ( <i>in situ</i> )	164
Figure 3.129	Pouvoir anti-oxydant de l'extrait méthanolique de <i>M nivellei</i> ( <i>in situ</i> )	164
Figure 3.130	Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait méthanolique de <i>M communis</i> L. à différentes concentrations.	164
Figure 3.131	Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait méthanolique de <i>M nivellei</i> Batt et Trab. à différentes concentrations.	164
Figure 3.132	Pouvoir anti-oxydant de l'extrait méthanolique de <i>M communis</i> ( <i>in vitro</i> )	165
Figure 3.133	Pouvoir anti-oxydant de l'extrait méthanolique de <i>M nivellei</i> ( <i>in vitro</i> ).	165
Figure 3.134	Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait méthanolique des cals de <i>M communis</i> L. à différentes concentrations.	165
Figure 3.135	Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait méthanolique des cals de <i>M communis</i> L. à différentes concentrations.	165
Figure 3.136	Pouvoir anti-oxydant de l'extrait flavonoïdique de <i>M communis</i> L ( <i>in situ</i> )	167
Figure 3.137	Pouvoir anti-oxydant de l'extrait flavonoïdique de <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	167
Figure 3.138	Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait flavonoïdique de <i>M communis</i> L. à différentes concentrations.	167
Figure 3.139	Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait flavonoïdique de <i>M nivellei</i> Batt et Trab. à différentes concentrations.	167
Figure 3.140a	Effet de l'huile essentielle et des extraits de <i>M communis</i> L. sur l'évolution de la peroxydation de l'acide linoléique.	169
Figure 3.140b	Effet de l'huile essentielle et des extraits de <i>M nivellei</i> Batt et Trab. sur l'évolution de la peroxydation de l'acide linoléique.	169
Figure 3.141	Pouvoir chélateur du fer exercé par les huiles essentielles et les extraits de <i>M communis</i> L. et <i>M nivellei</i> Batt et Trab.	172

## INTRODUCTION

Les plantes ont été longtemps employé comme remèdes traditionnels sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. Cependant, l'évaluation de leurs propriétés phyto-thérapeutiques demeure une tâche très intéressante et utile [1], en particulier pour les plantes d'utilisation rare ou moins fréquente dans la médecine et les traditions médicinales.

Malheureusement, la récolte et l'utilisation intensive par l'Homme ont provoqué la disparition de certaines espèces [2]. Pour pallier à ce problème, de nombreux chercheurs font appel aux techniques de culture *in vitro*, qui sont de plus en plus employées pour assurer la propagation clonale des géotypes élites, afin de satisfaire les besoins en agriculture, en industrie et en horticulture. Elles demeurent un outil très efficace au service de la recherche biologique et physiologique [3].

L'organisation mondiale de la santé OMS a estimé que près de 80% de la population mondiale utilisait principalement des remèdes à base de plantes [4]. Parallèlement on estime l'utilisation de plusieurs huiles essentielles et extraites de plantes dans le domaine thérapeutique, pharmaceutique et agro-alimentaire [5].

Les composés anti-oxydants naturels font actuellement l'objet de nombreuses études, car, en plus de leur rôle dans la conservation des denrées en industrie alimentaire, ils pourraient s'avérer utiles dans la prophylaxie ou le traitement de nombreuses pathologies.

L'Algérie de par son aire géographique et sa diversité climatique riche en flore naturelle, recèle d'une gamme importante de plantes médicinales et aromatiques, faisant partie du grand patrimoine végétal de notre pays. L'intérêt porté aux principes actifs d'origine végétale, nous a conduit à axer nos recherches sur deux espèces appartenant au genre *Myrtus*: l'espèce méditerranéenne *Myrtus communis* L. et l'espèce saharo-endémique *Myrtus nivellei* Batt et Trab.

Ce travail apporte une nouvelle contribution à l'étude du myrte algérien, ayant pour but d'isoler et d'étudier l'activité anti-microbienne et anti-oxydante de certains métabolites obtenus à partir des plantes récoltées *in situ* d'une part et celles développées *in vitro* d'autre part.

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 en voie de disparition du Sahara central.

Notre problématique a pour objectif de déterminer, pour la première fois en Algérie, la composition chimique de *Myrtus communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab. d'en connaître éventuellement les principes actifs qui lui confèrent ses propriétés thérapeutiques. Elle vise aussi à répondre à deux interrogations majeures :

- Est-ce que ces plantes contiennent réellement des substances bioactives ?
- Ont-elles vraiment des effets biologiques?

Afin de trouver des réponses à ces questions, notre expérimentation a porté sur les points suivants:

- Une description botanique détaillée de la partie aérienne de chaque espèce basée sur des observations macro et microscopiques.
- Un essai de callogenèse et de micro-bouturage des deux espèces.
- Une extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur et détermination de leur composition chimique par CG/SM.
- Une extraction des composés polaires non volatils par solvant.
- Une détermination de la sensibilité des bactéries et des champignons vis-à-vis des extraits naturels obtenus.
- Une évaluation de la capacité des extraits naturels à piéger les radicaux libres.

## CHAPITRE 1 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1.1. Les plantes médicinales et la phytothérapie

#### 1.1.1. Historique

Depuis l'antiquité, les Hommes ont apprécié les plantes médicinales pour leurs effets bénéfiques sur le corps et l'esprit, liés essentiellement aux principes actifs qu'elles contiennent et qui agissent directement sur l'organisme [6].

Cependant, l'Homme n'a découvert les vertus bénéfiques des plantes que par une approche progressive, facilitée par l'organisation des rapports sociaux, en particulier à partir du néolithique (8000 ans avt.J.C). L'observation liée à l'expérience et la transmission des informations glanées au cours du temps, font que certains guérisseurs deviennent capables de poser un diagnostic, de retrouver la plante qui soigne et finalement de guérir le malade [7]. Cependant, l'utilisation des plantes n'était pas sans danger, parce qu'ils n'avaient pas la notion des dosages efficaces pour traiter telle ou telle affection, et ne distinguaient pas encore les plantes toxiques des plantes thérapeutiques [8].

En chine, il y a 5000 ans, l'empereur *Chen Nong* passionné par la phytothérapie répertorie plus de 365 plantes médicinales, on lui attribue également les premiers traitements par l'acupuncture [9]. Quatre milles (4000) ans avant la naissance du Christ, les populations babyloniennes et sumériennes utilisaient les plantes pour se soigner. Dans les civilisations indienne et aztèque, on trouve aussi la trace d'utilisations médicinales très anciennes [7]. Le soin de la peau a commencé 3000 ans avt.J.C, les égyptiens l'ont enregistré en forme hiéroglyphique sur les peintures murales des temples [10].

Les grands médecins grecs, dont le plus célèbre est Hippocrate (5<sup>e</sup> siècle avt. J.C.), utilisaient les narcotiques, les laxatifs ou les émétiques, et Théophraste (370-285 avt. J.C.) a classé les plantes dans son ouvrage "Historia plantarum" [7].

A l'apogée de l'empire arabe, les Arabes avaient aussi leurs spécialistes en médecine et en pharmacie: *Abu Bakr al-Razi* ou *Rhazès* (865-925) qui fut l'un des



grands médecins de son temps et le précurseur de la psychothérapie. Il fut suivi par *Ibn Sina* ou *Avicenne* (980-1037), qui écrivit le “Canon de la médecine”. Ce livre servira de base à l’enseignement de la médecine dans les universités de Louvain et de Montpellier jusqu’à 1650. *Ibn al Baytar* (1197-1248) rédigea “ Le très complet Somme des Simples” qui contenait une liste de 1400 plantes médicinales, dont un millier, étaient connues par des auteurs grecs [7].

Récemment, l’acceptation de la médecine traditionnelle comme forme alternative de soin et le développement de la résistance des germes aux antibiotiques disponibles, a mené les chercheurs à étudier l’activité antimicrobienne des plantes médicinales [11, 12]. A cet égard, l’utilisation de ces substances naturelles présente un avantage certain sur les produits de synthèse, qui se révèlent toxiques et parfois même cancérigènes, aussi bien pour les cellules animales que végétales [13].

#### 1.1.2. Les plantes à caractère médicinale

Les plantes sont dites médicinales lorsqu’un de leurs organes, possède des activités pharmacologiques pouvant conduire à des emplois thérapeutiques [14, 15, 16, 17]. Cependant, de nombreuses plantes sont toxiques et ne doivent être utilisées que sous forme de principes actifs comme précurseurs pour l’obtention de médicaments [18, 19]. L’emploi incontrôlé de plantes cueillies dans la nature peut aboutir à des intoxications graves, voir mortelles [20].

#### 1.1.3. La phytothérapie

D’après DEBUIGNEG [21], la phytothérapie est étymologiquement le traitement par les plantes ou leurs formes dérivées, dont on distingue deux types :

- Une pratique traditionnelle, très ancienne basée sur l’utilisation de plantes réputées médicinales, qui est encore massivement employée. C’est une médecine parallèle du fait de l’absence d’études cliniques [22].
- Une pratique basée sur les avancées scientifiques et la recherche des principes actifs des plantes. Cette phytothérapie est assimilée aux médicaments: c’est la pharmacognosie [22].

#### 1.1.4. La récolte des plantes médicinales

Les organes d'une plante médicinale ne sont pas forcément tous actifs: selon l'espèce on utilise les fleurs, les feuilles, les fruits, l'écorce ou les racines. L'époque et le moment de la cueillette ont une grande influence sur l'activité thérapeutique, car les phénomènes physiologiques et biochimiques, qui ont lieu dans les cellules végétales, dépendent de la photosynthèse [23]. Selon VALNET [24], plusieurs règles doivent être respectées:

- Les racines, les tubercules, les rhizomes et les bulbes se récoltent en automne, avant que leurs réserves se mobilisent.
- Les tiges se récoltent en automne lorsque les feuilles ne sont pas en activité.
- Les feuilles se récoltent au moment de leurs développement mais avant la formation des boutons floraux, qui diminueraient la teneur en principes actifs.
- Les fleurs doivent être ramassées avant leur épanouissement et avant la fécondation.
- Les fruits charnus doivent être cueillis dès qu'ils sont mûrs.
- Les semences doivent être récoltées en pleine maturité.

#### 1.1.5. La conservation des plantes médicinales

La récolte et le séchage des plantes médicinales demandent beaucoup de soins, afin qu'elles gardent leurs qualités thérapeutiques. Le séchage se fait à l'abri de la poussière et de l'humidité, dans un endroit ombré et bien aéré, car les rayons solaires causent une altération des matières actives. Après séchage, elles doivent être conservées à sec et à l'obscurité, dans des récipients fermés, des boîtes en carton ou des sacs en papier [15].

#### 1.1.6. Domaines d'application des plantes médicinales

Les substances contenues dans les plantes sont de nature chimique variée, certaines sont solubles dans l'eau, dans l'alcool, ou bien dans l'huile. On peut utiliser une plante seule ou en mélange avec plusieurs drogues, parfois même combinée avec d'autres préparations naturelles ou synthétiques [15]. Elles ont des intérêts multiples en industrie et en pharmacie, qui utilisent une forte proportion de plantes comme source de molécules actives nouvelles, ou comme matières premières pour la semi-synthèse [25].

### 1.1.7. Place des plantes médicinales

Durant cette dernière décennie, le recours à la médecine traditionnelle a connu un regain d'attention et d'intérêt à travers le monde. En Chine, 40% environ de l'ensemble des soins s'inspirent de la médecine populaire. En Amérique latine plus de 50% de la population ont recours à cette thérapie [26].

Par ailleurs, selon l'organisation mondiale de la santé OMS, près de 6377 plantes sont utilisées en Afrique. En 2004, près de 75% de la population africaine ont eu recours aux plantes pour se soigner. Car, dans certains pays d'Afrique centrale, le savoir faire des guérisseurs traditionnels représente le seul moyen de traitement des maladies, surtout celles qui ont une grande ampleur comme le malaria et le syndrome d'immunodéficience acquise (Sida) [27].

Dans les pays développés, la médecine traditionnelle connaît toutefois un succès croissant, surtout qu'elle peut être acquise à moindre coût sans effets secondaires [28]. Ainsi, le pourcentage des populations ayant eu recours à cette pratique au moins une fois est de: 48% en Australie, 70% au Canada, 49% en France et 42% aux Etats-Unis [26].

De nos jours, l'usage des plantes médicinales est fréquent sur toutes les zones rurales des pays du Maghreb, notamment au Maroc où le recours à ces plantes atteint jusqu'à 70% de la population [29]. Les pharmacopées régionales s'inspirent de la médecine arabe classique et de l'expérience locale des populations en matière de soins. Elles reflètent à la fois l'histoire des magrébins et les spécificités de leur environnement naturel.

C'est dans ce contexte international marqué par le sommet de Rio et les recommandations de l'OMS, que des stratégies de conservation des plantes médicinales sont en cours d'élaboration, par l'ensemble des pays de l'Afrique du nord, particulièrement l'Algérie qui présente une richesse floristique inestimable, aussi bien pour l'économie du pays que pour le maintien de l'équilibre écologique de la région. Parmi ces ressources naturelles, il existe au moins 500 espèces de plantes médicinales utilisables par les phytothérapeutes, dont 100 espèces se vendent au marché chez les herboristes [30].

## 1.2. Les substances actives

Une des originalités majeures des végétaux, réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques, ils accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires. Ces derniers appartiennent à des groupes chimiques variés, qui sont très inégalement répartis chez les végétaux, mais dont le niveau d'accumulation peut quelquefois atteindre des valeurs élevées.

### 1.2.1. Les huiles essentielles

#### 1.2.1.1. Définition

Les huiles essentielles (HE) sont des mélanges de composés aromatiques, issues du métabolisme secondaire de la plante, certaines essences ont jusqu'à 250 molécules dans des proportions parfaitement adaptées les unes aux autres [16]. Se sont des molécules volatiles, réfringentes, optiquement actives et d'odeur tout à fait caractéristique [8]. 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 [31]. Mais contrairement aux huiles végétales, les huiles essentielles ne contiennent pas de corps gras [32].

#### 1.2.1.2. Localisation et lieu de synthèse

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les plantes supérieures [33]. La synthèse et l'accumulation de ce métabolite est associée à des structures histologiques spécialisées, situés sur ou à proximité de la surface des organes de la plante [34, 33]. Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une même espèce, voire dans un même organe [35, 36, 37].

Les huiles essentielles se forment dans le cytosol où elles s'accumulent dans les vacuoles du mésophile ou les glandes oléifères [36]. L'excrétion dans les cavités des poches ou des canaux est réalisée par exocytose ou par lyse des cellules bordant la cavité [38]. Dans une même espèce, la composition de l'huile essentielle peut différer d'un organe à un autre [39].

### 1.2.1.3. Rôles physiologiques des huiles essentielles

#### 1.2.1.3.1. Pour la plante

Beaucoup de plantes produisent des huiles essentielles, leur mode d'action exact demeure encore obscure [40], mais de nombreux travaux tentent de dévoiler leur rôle dans la vie d'une plante, il semble qu'elles:

- Favorisent la pollinisation en attirant les insectes pollinisateurs [41].
- Représentent une source énergétique facilitant certaines réactions chimiques et conservent l'humidité des plantes poussant dans les régions arides [42].
- Protègent la plante contre la flore microbienne par leurs propriétés fongicides et bactéricides, et contre les herbivores par leur goût amer et leurs effets défavorables sur leur système nerveux [43].
- Responsables du parfum des fleurs et jouent parfois le rôle d'insecticide [44].

#### 1.2.1.3.2. Pour l'Homme

De par la diversité de leur composition, les huiles essentielles trouvent des emplois dans différents domaines:

- En pharmacie, elles sont utilisées pour la préparation des médicaments, infusion ou dans l'aromatisation des formes médicamenteuses par voie orale, elles sont parfois utilisées comme suppléments diététiques [45]. Sans oublier qu'elles constituent le support de l'Aromathérapie [33].
- En parfumerie, c'est le débouché principal des huiles essentielles, la cosmétologie et le secteur des produits d'hygiène sont également des consommateurs, mais vu que les produits naturels sont souvent très chers, certaines industries privilégient les produits synthétiques [43].
- En industrie alimentaire, elles sont responsables de l'amélioration de la saveur et de la couleur de nombreux produits de consommation (produits laitiers, boissons, soupes, confiserie et boulangerie) [46, 47, 48, 49].
- Dans diverses industries, surtout chimiques, qui utilisent des isolats pour la synthèse des vitamines et des substances odorantes [33].

### 1.2.1.3.3. Pour la nature

Les fonctions écologiques des huiles essentielles demeurent le plus souvent mal connues [16], il est parfois vraisemblable qu'elles aient un rôle aussi bien dans le domaine des interactions végétal-végétal en tant qu'agents allélopathiques [43], que dans celui des interactions végétal-animal [33].

Le rôle attractif ou répulsif des huiles essentielles, vis-à-vis des prédateurs, les conduits à une localisation épidermique, soit sous forme de cellules isolées sécrétrices, soit le plus souvent sous forme de poils sécréteurs. Les essences ont fréquemment un effet télétoxique sur la germination des graines. Par leur odeur, elles interviennent dans la pollinisation et dans la dispersion des diaspores [49].

### 1.2.1.4. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes renfermant des constituants très variables, 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 [50].

- 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 ( $C_5H_8$ ) reconnue par WALLACH dès 1887 (figure 1.1). 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) [29].

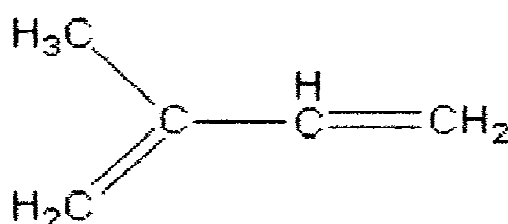


Figure 1.1: Structure de l'unité isoprène ( $C_5H_8$ ) [29].

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 [29]. Dans le cas des huiles essentielles, seuls seront rencontrés les terpènes les plus volatils, comme les monoterpènes, les sesquiterpènes et leurs dérivés oxygénés [16]. Mais selon RICHTER [51], 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 huiles essentielles (figure 1.2).

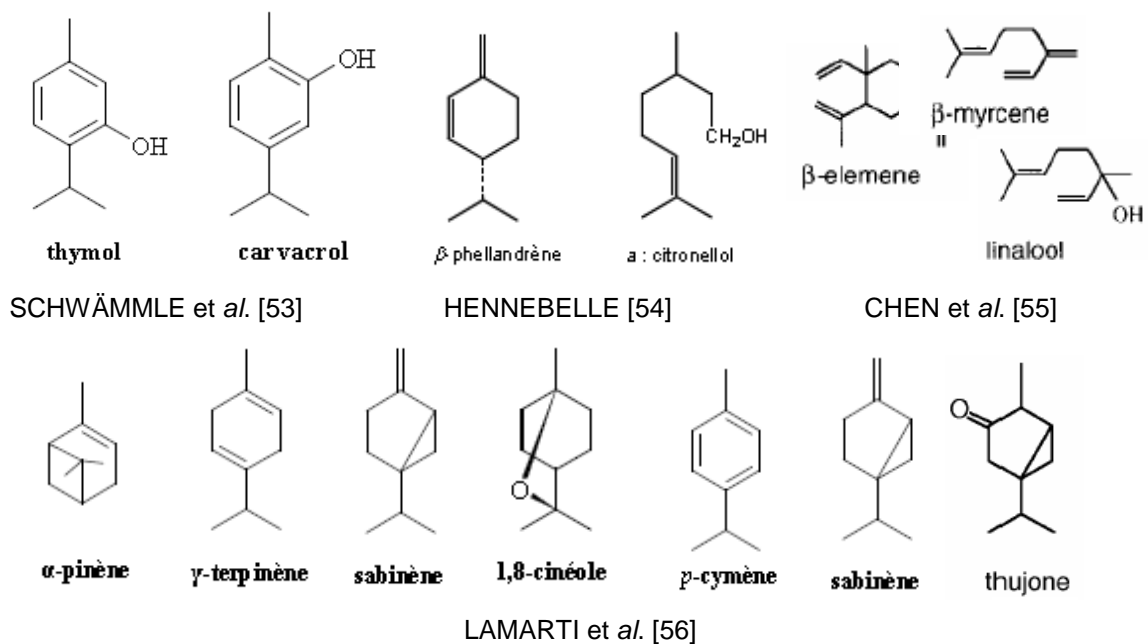


Figure 1.2: Structure de quelques composés des huiles essentielles.

- Composés aromatiques

Les dérivés du phénylpropane ( $C_6-C_3$ ) sont beaucoup moins fréquents que les terpènes. On peut également rencontrer dans les huiles essentielles des composés ( $C_6-C_1$ ) comme la vanilline ou les lactones dérivées des acides cinnamiques [52]. Ils sont entraînés par la vapeur d'eau [16].

- Composés d'origines diverses

Selon BRUNETON [16] les huiles essentielles 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.

### 1.2.1.5. Procédés d'obtention des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles est une opération très ancienne. Cependant, le choix de la méthode d'extraction dépend des propriétés de l'huile essentielle [57, 58]. L'extraction par la vapeur d'eau est la méthode la plus largement utilisée [59, 60, 61]. D'autre part, il est bien connu que les rendements d'extraction et la qualité finale de l'huile sont affectés principalement par la méthode d'extraction, le type et la quantité du solvant, la température, le temps d'opération ainsi que la taille des particules [47, 33, 58].

De nouvelles méthodes plus selectives, ont été développées à petite et grande échelle, afin de maximiser le rendement et réduire le temps d'extraction, comme:

- L'extraction par sonication [62, 16].
- L'extraction aux solvants volatils [57].
- L'extraction par expression des épicarpes de citrus [34, 16].
- L'extraction par enfleurage [57].
- L'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique [57].

### 1.2.1.6. Activités biologiques des huiles essentielles

- **Activités spasmolytiques et sédatives**

De nombreuses huiles essentielles sont réputées efficaces pour supprimer les spasmes gastro-intestinaux, ou pour stimuler la sécrétion gastrique, d'où le nom stomachique et gastrique [33]. D'autres sont utilisées pour traiter les insomnies, l'anorexie nerveuse, la fatigue et les divers troubles psycho-somatiques [63].

- **Activités antalgiques et anti-inflammatoires**

Certaines huiles essentielles sont utilisées comme anesthésiants, antalgiques, détoxifiants ou encore analgésiques [53].

- **Activités cicatrisantes et régénératrices**

L'huile essentielle du romarin et de la lavande présentent un pouvoir cicatrisant très avancé, aussi bien sur la peau que sur les tissus profonds dont les muqueuses [67, 68].



- **Activités anti-septiques, anti-microbiennes et anti-parasitaires**

Selon SALLE [41], le pouvoir anti-septique des huiles essentielles s'exerce à l'encontre de bactéries pathogènes variées, y compris les souches habituellement antibiorésistantes (tableau1.1). Leur mécanisme d'action n'est pas entièrement compris, mais on pense qu'elles provoquent la rupture de la membrane du micro-organisme [64]. Le nérolidol de l'espèce *Viola surinamensis* possède une activité anti-malariale [65]. L'alantolactone et son isomère ont des propriétés antibactériennes contre *Mycobacterium tuberculosis* et anti-fongiques contre des pathogènes opportunistes [66].

- **Activité irritante**

Les huiles essentielles utilisées en usage externe peuvent augmenter la micro-circulation et donner une sensation de chaleur. Actuellement, des gels, des crèmes et des pommades à base d'huiles essentielles sont destinées pour soulager les entorses et les courbatures, mais en usage interne, elles déclenchent 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 [33].

- **Activité anti-oxydante**

La capacité anti-oxydante des huiles essentielles est étroitement liée à leur contenu en phénol [69]. Le carvacrol est un anti-oxydant puissant des huiles essentielles chez les labiaceae [53]. JUKIE et MILO [70] ont montré que l'huile essentielle de *Thymus vulgarae* est capable de réduire le radical 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

Tableau 1.1: Bioactivité de quelques composés des huiles essentielles.

Composés	Bioactivités	Références
Acétate de bornyl	Anti-bactérien, anti-spasmodique, anti-viral, expectorant,	TEIXEIRA DA SILVA [5]
Camphre	Analgésique, anesthésique, anti-oxydant, anti-septique anti-diabétique, anti-dysentérique, anti-spasmodique	
$\alpha$ - thujone	Anti-bactérienne, insecticide, larvicide, pesticide	
1,8- cineole	Anti-microbien	SVOBODA et HAMPSON [71]
Linalool	Anti-microbien, hypnotique, hypothermique	
$\beta$ - asarone	Sédatif, hypnotique	

### 1.2.2. Les composés phénoliques

Les polyphénols constituent un des groupes les plus largement distribués dans le règne végétal, avec plus de 8000 structures phénoliques connues (appendice B). Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, présents dans tous les organes de la plante. Ils résultent biogénétiquement de deux voies de synthèse principales: la voie shikimate et la voie acétate [72].

#### 1.2.2.1. Définition

Les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, et un ou plusieurs groupes hydroxyle, en plus d'autres constituants [73]. Ils forment un groupe de composés très importants, englobant de nombreuses classes dont: les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins [74, 75].

De nombreux facteurs tels que la germination, le degré de maturité, la variété, le traitement et le stockage ont une influence sur le taux des polyphénols dans les plantes [72]

#### 1.2.2.2. Rôles des composés phénoliques

##### 1.2.2.2.1. Rôle nutritionnel et thérapeutique

Les polyphénols sont probablement les composés naturels les plus répandus dans la nature et jouent un grand rôle dans la qualité nutritive et hygiénique des aliments, certain d'entre eux ont des propriétés vitaminiques, utilisées par l'industrie pharmaceutique (tableau 1.2). On estime que la prise moyenne des polyphénols par l'Homme s'étend de 25 mg/jour à 1 g/jour [76].

De nombreuses études ont montré que les polyphénols inhibent l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose [77], ils agissent également comme agents suppresseurs des tumeurs [78]. SCALBERT et WILLIAMSON [79] rapportent qu'ils peuvent exercer un effet protecteur contre l'ostéoporose, en modulant la réponse aux œstrogènes endogènes.

Tableau 1.2: Bioactivité de certains composés phénoliques.

Polyphénols	Activités	Auteurs
Acides phénoliques	Anti-bactérienne Anti-fongique Anti-oxydante Antalgique	DIDRY et <i>al.</i> [80] RAVN et <i>al.</i> [81] HAYASE et KATO [82] RIBEREAU [83]
Flavonoïdes	Anti-carcinogène Anti-inflammatoire Anti-oxydante Anti-allergique	DAS et <i>al.</i> [84] BIDET et <i>al.</i> [85] ARUOMA et <i>al.</i> [86] MIDDLETON et KARDASNAMI [87]
Anthocyanes	Anti-oxydante Anti-tumorale Anti-fongique Anti-inflammatoire	BAHORUN et <i>al.</i> [88] DE OLIVEIRA et <i>al.</i> [89] BROWNLEE et <i>al.</i> [90] KREOFISKY et <i>al.</i> [91]
Tanins	Anti-oxydante Anti-bactérienne Vasoconstrictrice	OKUDA et <i>al.</i> [92] CAVIN [93] PARIS et MOYSE [94]

#### 1.2.2.2.2. Rôle physiologique et écologique

Plusieurs travaux ont montré que les polyphénols sont associés à de nombreux processus physiologiques: croissance cellulaire, différenciation, organogenèse, dormance des bourgeons, floraison et tubérisation [95, 96].

Les flavonoïdes sont responsables de la coloration des fleurs et représentent des signaux visuels qui attirent les animaux pollinisateurs. D'autres polyphénols incolores interagissent avec les anthocyanes pour altérer, par co-pigmentation, la couleur des fleurs et des fruits [97]. Certains flavonoïdes et surtout les tanins sont des anti-appétants protégeant les plantes de la prédation [98]. Ils agissent aussi comme écran-protecteur contre les effets nocifs du rayonnement UV [99, 100]. La capacité d'une plante à résister à l'attaque des insectes et des micro-organismes est souvent corrélée avec sa teneur en polyphénols [101, 102, 103].

ZIOUTI et *al.* [104], ont étudié l'implication des polyphénols du palmier dattier dans la réaction de défense de cette plante contre le bayoud: maladie infectieuse due à un champignon tellurique *Fusarium oxysporum fsp albidinis*. Ces métabolites participent au renforcement des parois cellulaires de la plante, qui deviennent moins dégradables par les parasites [105].

Le monde animal est aussi concerné par les composés phénoliques et en particulier les flavonoïdes. On trouve par exemple la chrysin et la quercétine dans la propolis des abeilles. Ces insectes les fabriquent à partir des sécrétions des bourgeons d'arbres, les modifient par leurs enzymes salivaires, et mettent instinctivement en œuvre les propriétés anti-microbiennes de ces polyphénols pour aseptiser leur ruche et colmater les fentes [106].

Les cellules végétales répondent au stimulus environnemental en synthétisant les métabolites secondaires qui les protègent contre les agressions [107]. Lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques, des polyphénols sont synthétisés et l'activité peroxydasique caractéristique des tissus en voie de lignification est stimulée, ce qui aboutit à la formation au niveau de la blessure, d'un tissu cicatriciel résistant aux infections [108].

#### 1.2.2.2.3. Rôle technologique

Les polyphénols sont partiellement responsables de nombreux caractères organoleptiques en industrie agroalimentaire, comme le goût, l'odeur et la couleur [83, 72]. L'astringence est la capacité des tanins à former des complexes stables avec les protéines et les sucres qui leur confère leurs propriétés gustatives, car ils précipitent les protéines salivaires, entraînant avec elles un cortège de molécules d'eau, qui lubrifient alors la muqueuse et créent une sensation d'assèchement buccal [109, 110, 111].

### 1.3. Culture *in vitro*

#### 1.3.1. Définition

Le principe de la culture *in vitro* consiste à reproduire des plantes semblables à la plante mère, appelées "des clones", par la stimulation des capacités naturelles de multiplication végétative, ou par l'induction d'une nouvelle organogenèse des bourgeons ou des racines dans un milieu de culture approprié. Ces techniques font intervenir, d'une part des pratiques d'asepsie et d'autre part, la mise en place d'un environnement parfaitement contrôlé [112], et peuvent s'appliquer sur des plantes entières, des fragments de plants ou bien des cellules isolées [113, 114, 115].

### 1.3.2. Principales techniques de culture *in vitro*

La régénération de plantes entières, à partir d'un fragment d'organe, voire même d'une seule cellule est basée sur le passage d'un état différencié à l'état de cellule méristématique totipotente, favorisant la dédifférenciation cellulaire, puis elle retrouve sa spécialisation par une autre différenciation [116, 117].

#### 1.3.2.1. Micro-propagation

Le principe de la micro-propagation consiste à prélever un explant, à partir d'une plante et à le mettre en culture. Elle est réalisée dans des conditions aseptiques et sur un milieu synthétique capable d'induire rapidement une forte prolifération cellulaire [3, 118]. Les techniques de micro-propagation empruntent essentiellement deux voies:

- L'une qui utilise des tissus indifférenciés [119]. Cette technique est appelée multiplication conforme, elle part de méristèmes pré-existants dans lesquels les cellules sont génétiquement très stables [120].
- L'autre voie, utilise toute sorte de tissus différenciés pour aboutir à la néoformation soit de bourgeons ou de racines, soit des embryons somatiques [121, 122, 123, 124, 125, 126].

#### 1.3.2.2. Embryogenèse somatique

Elle consiste à la formation d'embryons à partir de cellules somatiques. Cependant, cette forme de régénération n'implique aucune des structures qui participent à la naissance d'un embryon issu de la voie sexuée [127, 128, 129, 130, 131]. Ils ont une structure chromosomique identique à celle de leur plante mère [132, 133]. L'embryon somatique est reconnu par sa structure bipolaire développant simultanément un méristème caulinaire et un méristème racinaire [134, 135, 136, 137, 138, 139].

#### 1.3.2.3. Culture de méristème

Les méristèmes sont des tissus en expansion continue et confèrent à la plante une organogenèse permanente [140, 121]. Ils sont constitués de petits massifs de cellules indifférenciées, qui conservent la capacité de se diviser activement. Cette particularité illustre la totipotence des cellules végétales [116, 141, 142].

#### 1.3.2.4. Culture des protoplastes

Le terme protoplaste désigne une cellule végétale débarrassée de sa paroi squelettique, elle apparaît alors sous forme d'une cellule sphérique, limitée par une membrane plasmique [3, 143]. Une fois les protoplastes obtenus, il faut les mettre en culture afin qu'ils puissent commencer leurs divisions cellulaires et former de nouveaux plants [114].

#### 1.3.2.5. Culture des suspensions cellulaires

La méthode qui permet d'obtenir des cultures de cellules isolées consiste à utiliser des cals friables, dont les cellules périphériques se détachent facilement en culture agitée. Ces cellules restent en suspension dans des densités compatibles avec le maintien de leur capacité prolifératrice [144, 145, 146].

#### 1.3.3. Les régulateurs de croissance

Un régulateur de croissance est défini comme étant une substance, qui selon sa concentration dans le milieu, peut modifier ou supprimer sous certaines conditions, les processus de cyto-différenciation [147]. Les phyto-hormones les plus utilisées *in vitro* sont:

- Auxines: Les auxines sont des composés à noyau indole dont la formule brute est  $C_{10}H_9O_2N$  (appendice C). Leur synthèse s'effectue dans l'apex des tiges, dans les bourgeons et les embryons [128]. Elles assurent plusieurs rôles dont on cite:
  - Stimulation de l'action mitotique sur les cellules méristématiques d'origine cambiale. Elle conduit aussi à la formation d'amas cellulaires qui forment un cal.
  - Organogénèse: Une action nette sur la rhizogénèse [148, 149, 150, 151].
- Cytokinines: Les cytokinines sont des adénines substituées synthétisées dans la racine [126]. Les cytokinines les plus utilisées sont la kinétine, la benzyladénine et la 6-benzyl aminopurine (BAP) [152]. Elles ont un rôle dans:
  - La multiplication cellulaire: elles s'utilisent conjointement avec les auxines; et permet la séparation chromosomique [143].
  - L'organogénèse: les cytokinines stimulent la néoformation des bourgeons [153, 154, 150, 151], mais s'opposent à la rhizogénèse et à la dormance apicale.
  - La stimulation du métabolisme: elles favorisent la synthèse protéique et protègent les métabolites contre l'hydrolyse enzymatique [155].

- Gibbérellines: C'est une famille de composés diterpéniques tétracycliques, à noyau gibbane. La synthèse a lieu au niveau des bourgeons terminaux racinaires et caulinaires, des jeunes feuilles et de l'embryon. Elle provoque plusieurs effets:
  - Allongement des entre-nœuds en stimulant le méristème intercalaire
  - Germination et levée de la dormance par stimulation de la synthèse de l' $\alpha$ -amylase dans les semences.
- Acide abscissique: L'ABA est synthétisé dans la coiffe radiculaire et les feuilles sénescents [156, 3]. Cependant, il empêche le transport de l'auxine, entraîne des retards dans la croissance des rameaux, stimule la tubérisation et contrôle l'ouverture et la fermeture des stomates [157, 158].
- Ethylène: C'est un composé gazeux de formule développée  $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ . Il est synthétisé par toutes les parties de la plante [143]. Il intervient dans le déclenchement du processus de maturation des fruits, Inhibe la mitose et réprime la production d'auxine, il induit la floraison précoce chez certaines espèces [128].

#### 1.3.4. Conditions de culture

Les conditions de culture jouent un rôle primordial et doivent être contrôlées, pour éviter toute dérive néfaste au développement des explants [159, 160].

#### 1.3.5. Les facteurs de régénéralité

Les facteurs influant sur la régénéralité *in vitro* peuvent être répartis en deux groupes: Le premier représente les facteurs internes liés à la plante, qui concerne d'une part le génotype, la nature et l'âge ontogénique de l'explant et d'autre part, l'état physiologique de la plante mère sur laquelle l'explant a été prélevé [161, 162, 164]. Le second réunit les différents facteurs externes liés aux milieux et aux conditions de culture [163, 3, 126].

#### 1.3.6. La culture *in vitro* et les 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 [112].

## 1.4. Les plantes médicinales étudiées

### 1.4.1. 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, le myrte est le symbole de la déesse Venus [165]

En Rome antique, le myrte était un arbuste sacré utilisé pour célébrer les mariages, les jeunes épouses se ceignaient la tête avec ses branches considéré comme le symbole d'amour, de beauté et de pureté. Bien que le myrte occupait une grande place dans les mythes et les cérémonies religieuses, il n'était pas entré dans la pratique médicale [165].

La médecine égyptienne est très riche en prescriptions des plantes, on utilisait le myrte pour l'embaumement des morts [41].

Cette plante jouissait autrefois d'un grand prestige, elle est le symbole de la paix pour les hébreux, considérée comme l'une des quatre plantes sacrées, les feuilles sont également utilisées pour célébrer leurs prières [166].

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 vertues thérapeutiques [167, 168, 169].

### 1.4.2. La famille des myrtaceae

La famille des myrtaceae renferme des plantes dicotylédones, appartenant à l'ordre des myrtales, elle présente environ 3800 espèces, appartenant à 130 genres [170]. L'*Eucalyptus sp* est l'espèce arborescente la plus fréquente qui appartient à cette famille. Les genres *Heteropyxis* et *Psiloxylon* ont été transférés vers d'autres familles, en raison de la divergence dans l'origine de leurs ancêtres communs avec les myrtaceae [171]. Les myrtaceae sont caractérisés par leurs poches sécrétrices d'essences, ces organes de sécrétion se localisent sous l'épiderme foliaire et dans l'écorce des tiges, mais n'ont jamais été signalés au niveau des racines [171]. Cependant, cette famille présente la particularité d'avoir du phloème qui est situé au dessus et au dessous du xylème.



#### 1.4.2.1. Le genre *Myrtus*

Le genre *Myrtus* comporte deux espèces spermaphytes, il s'agit d'arbustes caractérisés par une huile essentielle très aromatique dans leurs feuilles. 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 bleu-noirâtres [165].

#### 1.4.2.2. Systématique du genre *Myrtus*

La classification retenue est celle de Paris et Moysse [172]:

**Règne** : PLANTAE.

**Phylum** : Phanerogames ou spermaphytes.

**Sous phylum** : Angiospermes.

**Classe** : Dicotyledones.

**Sous classe**: Dialypetales.

**Ordre** : Myrtales.

**Famille** : Myrtaceae.

**Sous famille** : Myrtoideae.

**Genre** : *Myrtus*.

**Espèce 1** : *Myrtus communis* L.

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

#### 1.4.3. L'espèce *Myrtus communis* L.

##### 1.4.3.1. 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 [173]. L'existence du nom de cette plante dans la langue parlée de différentes cultures lui a fourni plusieurs noms vernaculaires:

Nom latin: *Myrtus communis*.

Nom français: *Myrte commun*, *Herbe du lagui*.

Nom arabe: *Rihan* (ريحان), *Hadas*, *Mersin*, *Henblass*, *As* [174].

Nom berbère: *Chelmoun*, *Halmouch*.

Nom tamahaq: *Tarihane*, *Tchlmoun* [175].

#### 1.4.3.2. Origine et répartition géographique

C'est une espèce méditerranéenne [41], elle pousse spontanément dans les maquis, les bois humides, le bords des routes ainsi qu'à proximité du littoral [176].

- Dans le monde: L'espèce *M communis* L. pousse dans différentes régions du monde [177, 178, 179]. On la trouve à l'est de l'Amérique et dans les régions tempérées chaudes de l'hémisphère boréal [180, 181], son aire de diffusion s'étend en Asie et jusqu'en Perse [165, 182, 183]. Cette plante rentre dans l'ethno-pharmacopée de nombreux pays méditerranéens: Chypre, Ethiopie, Iran, Irak, Italie, Maroc, Palestine, Tunisie, Turquie, Yemen [184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 169,194, 195].
- En Algérie: *M communis* L. habite les forêts de chêne et le Tell littoral algéro-constantinois [196, 174], le mot Tell utilisé désigne le nord de l'Algérie.

#### 1.4.3.3. Description botanique

C'est un arbuste annuel ramifié, très odorant d'environ 1 à 3 mètres de haut (figure 1.3), le myrte pousse très lentement et peut vivre plus de 100 ans. Sur le plan génétique, il est constitué de 22 paires de chromosomes [197].

- Les tiges: Elles sont très ramifiées, glabres, l'écorce est rougeâtre, utilisé en marqueterie [165]. Avec le temps, l'écorce devient grisâtre [198]
- Les feuilles: Elles sont opposées, persistantes et coriaces, de couleur vert foncé, munies d'un court pétiole. Les feuilles présentent de petites glandes oléifères, contenant une huile essentielle caractéristique [165, 175].
- Les fleurs: Elles sont axillaires, solitaires et très parfumées [199]. Chaque fleur renferme une touffe d'étamines (figure 1.4). Le gynécée est constitué d'un ovaire infère [175, 198]. Elles sont pollinisées par les insectes [200].
- Les fruits: Se sont des baies preneuses sucrées, à peine charnues (figure 1.5). Elles deviennent noire bleuâtres en automne et persistent assez longtemps sur la plante, elles sont comestibles [199, 201, 198].
- Les graines: Elles sont réniformes de couleur jaune, leur nombre est de 3 à 8 par baie [175, 198]. Elles sont disséminées par les merles [202], les mammifères [203] et les fourmis [204]. Les graines sont riches en acides gras insaturés [191].



Figure 1.3: Arbuste de *M communis* L. (photo originale)



Figure 1.4: Fleurs de *M communis* L. [165]



Figure 1.5: Description des différentes parties de *M communis* L. [197]  
 a). Rameau en floraison; b). Rameau fructifié; c). Détail de la partie basale du limbe foliaire; d). Fleur; e). Calice; f). Fruit; g). Section longitudinale dans un fruit immature; h).Section longitudinale dans un fruit mur; i). Graine.

#### 1.4.3.4. Ecologie et régénération de la plante

Le myrte pousse en plein soleil ou en mi-ombre et préfère un sol argilo-siliceux. Il résiste au gel à -10°C et s'adapte très bien aux conditions d'aridité, pouvant tolérer des températures avoisinant 45°C. Les pieds cultivés ont besoin d'un arrosage régulier mais pas trop fréquent. En raison de sa localisation géographique, cette plante bénéficie d'une humidité importante tout au long de l'année [205].

La multiplication du myrte se fait, soit par bouturage en Juin avec des rameaux semi-lignifiés [206], 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 [182, 207, 208], sa récolte s'étale de Septembre jusqu'au mois de Décembre. Cependant, les feuilles sont récoltées selon le besoin tout au long de l'année [205]. Pour l'entretenir, il suffit de le tailler au mois de Mai [182].

Le myrte est traditionnellement propagé à partir des graines [209] et des boutures [210]. Cependant, la première dépend de la viabilité des graines et la deuxième peut disséminer les maladies, ces problèmes peuvent être résolus par les méthode de multiplication *in vitro* qui permettent d'accentuer le cycle de reproduction et d'obtenir des clones indemnes de virus [211].

#### 1.4.3.5. Composition chimique

Les études réalisées sur l'espèce *Myrtus communis* L. ont révélé qu'elle comporte plusieurs composés dont:

- Les huiles essentielles

La recherche des constituants volatiles de l'huile essentielle de *Myrtus communis* L. a fait l'objet de nombreuses études [212, 213, 214, 179, 215]. Elle est très riche en monoterpènes oxygénés surtout en période estivale (1,8 cinéole, myrténol et  $\alpha$ -pinène) [43, 213]. Cependant, plusieurs facteurs environnementaux comme l'ensoleillement, la nature du sol, la période de récolte, l'origine géographique (Tableau 1.3) et le climat sont responsables de l'apparition de chémotypes différents, avec des réponses thérapeutiques spécifiques [216, 217, 218, 219, 213, 214, 220, 221].

Tableau 1.3: Principaux chémotypes de *M communis* L. selon l'origine géographique

Chemotype	Origine	Parties utilisées	Références
Alpha pinène/Limonene	Italie	Feuilles	FLAMINI et al. [220]
Acétate de myrtenyl/Alpha pinène	Grèce Maroc Croatie	Rameaux feuillés	GARDELI et al. [221] FARAH et al. [222] JERKOVIC et al. [223]
Alpha pinène/Limonène	Iran Grèce Italie	Feuilles	YADEGARINIA et al. [224] KOUKOS et al. [215] RAPPARINI et al. [225]
1,8 cinéole/Alpha pinène	Tunisie	Feuilles	MESSAOUD et al. [226]
Limonène/Alpha pinène	Turquie Tunisie Suède	Feuilles	AGKUL et BAYRAK [227] MESSAOUD et al. [226] SHIKHIEV et al. [228]

- Les polyphenols

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 [229, 230, 231, 232, 233, 234]. La teneur la plus élevée en polyphenols a été observée en période de pleine floraison [221].

- Les minéraux

Selon OZKAN et AKBULUT [235], le myrte est très riche en nitrate avec un très faible taux en nitrite, ce même travail a révélé la présence de 18 minéraux avec des teneurs notables en Al, B, Fe, Mn et Zn.

- Les acides gras

Selon CAKIR [191], les fruits du myrte sont riches en acide oléique, linoléique et palmitique, la quantité des acides gras saturés est plus faible que les acides gras poly-insaturés, dont la carence peut provoquer de sérieux problèmes dermatiques [236]. La richesse de ses graines en lipides (acides gras poly-insaturés) leur ouvre de larges perspectives en cosmétologie [237]

- Autres

Les fruits sont comestibles et de saveur remarquablement sucrée en pleine fructification [173]. Les feuilles contiennent de la vitamine C en faibles teneurs, ainsi que des substances résineuses et des acides organiques comme l'acide malique et l'acide citrique [172].

#### 1.4.3.6. Propriétés thérapeutiques

- Propriétés digestives et anti-spasmodiques

Toutes les parties du myrte présentent des propriétés stomachiques [201, 174, 238], cette plante a le pouvoir de contracter les tissus [2].

- Propriétés anti-septiques et anti-microbiennes

Ces deux propriétés sont dûes à la présence des terpènes (cinéole, myrténol) et des phloroglucinols complexes, qui auraient le même effet que la pénicilline et la streptomycine sur les bactéries Gram+ [239, 240, 2]. Ces constituants justifient l'utilisation du myrte dans les affections de la sphère bronco-pulmonaire et des voies urinaires [240, 43, 238]. Il est préconisé en gargarisme pour traiter les aphtes et les gingivites, généralement d'origine fongique [201, 241]. Les myrtucomulones et la quercétine des feuilles du myrte montrent une forte action anti-virale contre trois taxons de virus: Retroviridae [242], Picornaviridae [243, 244] et Herpesviridae [245].

- Propriétés astringentes, tonifiantes et stimulantes

Le myrte est très riche en tanins, auxquels il doit son action astringente [240]. Il a le pouvoir de tonifier les tissus [41]. C'est un immuno-stimulant, il augmente le taux des globules blancs et stimule la fabrication des plaquettes [246].

- Propriétés anti-parasitaires

La toxicité du myrte sur de nombreux parasites a été démontrée par de nombreux travaux contre: *Plasmodium falciparum* [247, 248], *Trichomonas vaginalis* [249] et *Leishmania donovani* [241]. Cette plante possède également des propriétés:

- Anti-helminthique: réputée contre *Peduculus humanus* (pediculidae) [250], *Meloidogyne javanica* (tylenchidae) [251], *Culex pipiens* (culicidae) [252].
- Insecticide: les recherches menées par BARDEAU [253] sur le pouvoir insecticide de l'huile essentielle du myrte sur les cafards, montrent que la fraction de distillation la plus active est le cinéole.
- Anti-mollucide: les extraits hydro-alcooliques des feuilles de myrte ont un effet remarquable contre le genre *Schistosoma* [254].

- Autres propriétés

Le myrte est très connu pour ses propriétés anti-radicalaires et anti-génotoxiques [255, 256, 232], en plus de son pouvoir hemagglutinant du sang [257], anti-hyperglycémiant [258, 230, 259, 260], hypo-cholesterolemiant [261, 255] et anti-inflammatoire [185].

Sur le plan écologique, MORENO-JIMENEZ et *al.* [262], ont rapporté que le myrte est très 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 polyéthylène glycol, qui augmente sa valeur nutritive et facilite sa digestibilité [263].

#### 1.4.3.7. Usages en médecine traditionnelle

Tous les organes de cette plante sont utilisés comme remède populaire et se sont avérés utiles pour lutter contre 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 [41], elle est également recommandée contre les maladies des voies respiratoires, l'otite, la diarrhée ainsi que les hémorroïdes [264, 265].

- Les feuilles en décoction sont utiles pour traiter les troubles gastriques, c'est un excellent anti-hémorragique, anti-septique et anti-malariale [266, 267, 268, 269].

- Les fleurs en décoction sont utiles contre les affections hépatiques [174] et pour remédier aux troubles de la circulation sanguine [238].

- Les fruits sont soit consommés frais ou séchés pour fortifier le cœur, soit préparés en infusion comme hypoglycémiant [205]. Ils sont utilisés contre la variole et la diarrhée [238]. Leur décocté est préconisé pour soulager l'ulcère et les douleurs gastriques [270].

- Usage externe

Les feuilles et les fruits en décoction sont utiles en gargarisme désinfectant, en compresses sur les plaies suppurantes et les blessures, ainsi que les affections cutanées en raison de leur action cicatrisante, anti-septique et hémostatique [165, 174]. Les feuilles broyées sont employées dans le traitement des cheveux en association avec le henné pour les noircir et contre les piqûres des scorpions [205]. L'huile essentielle est utilisée en inhalation et massage des plexus, elle est très bien tolérée par la peau [41, 246].

- Autres usages

L'huile essentielle de *Myrtus communis* L. est très utilisée en cosmétologie, parfumerie, confiserie et dans le breuvage industriel [271, 272, 227, 212, 269, 214, 179]. Les baies sèches sont utilisées comme condiment culinaire substitué du poivre [273]. En Russie et en Turquie, les tiges et les racines du myrte sont utilisées pour tanner le cuir [274].

#### 1.4.4. L'espèce *Myrtus nivellei* Batt et Trab.

##### 1.4.4.1. Nomenclature

C'est une plante endémique du Sahara central, appartenant à la famille des myrtaceae [275, 276]. 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* [277], *Tafiltast* [278].

Nom français : *Myrte de nivelles*, *Myrte du sahara*.

Nom anglais: *Saharian myrtle*.

##### 1.4.4.2. Origine et répartition géographique

*Myrtus nivellei* Batt et Trab. est une espèce saharo-endémique, restreinte aux montagnes du Tassili n'Ajjer (figure 1.6), Tassili n'Immidir, Tefedest et des massifs de l'Ahaggar ainsi que les montagnes du Tibesti tchadien, où elle couvre des zones très réduites [279, 280, 281]. 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).





Figure 1.6: Répartition géographique de *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab. [286].

Au Tassili, plusieurs plantes reliques de souches méditerranéennes se rencontrent, dont la variabilité croît avec l'altitude, l'espèce *M nivellei* Batt et Trab. apparaît au delà de 1400 à 2000 mètres d'altitude [282, 283]. Les buissons de cette espèce sont toujours localisés à proximité des oueds, où se développent une belle végétation ligneuse comprenant: *Nerium oleander*, *Pistacia atlantica*, *Lavandula antinea* et quelques fougères [284, 285].

#### 1.4.4.3. Description botanique

*Myrtus nivellei* Batt et Trab. est un arbuste de 0,5 à 2 mètres de hauteur (figure 1.7), poussant spontanément. Il s'adapte très bien à la sécheresse, pouvant tolérer des températures estivales avoisinant 48°C.

- Les tiges: Elles sont ramifiées, ligneuses, à écorce rugueuse et rougeâtre [275].

- Les feuilles: Elles sont opposées, lancéolées et sessiles (figure 1.8 et figure 1.9) comportant des glandes oléifères minuscules sur les deux faces, responsables de la sécrétion d'une huile essentielle à odeur agréable et insectifuge [282, 275].
- Les fleurs: Elles sont blanches, isolées à l'aisselle des feuilles, chaque fleur est constituée par un ovaire infère, surmenté de cinq dents courtes, de cinq pétales blanches et de nombreuses étamines, et un style long et fin [275]. Les fleurs sont pollinisées par les insectes [287].
- Les fruits: Les fruits sont des baies noires [275], dont la taille est plus petite en comparaison avec les fruits de *Myrtus communis* L (figure 1.8).

#### 1.4.4.4. Utilisation en médecine traditionnelle

*M nivellei* Batt et Trab. est très réputée au sud algérien pour ses vertues thérapeutiques en médecine populaire [276, 275]. Pour traiter le mal de gorge et la fièvre, les feuilles de cette plante sont préparées en décoction avec des figues et des raisins secs. 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 [270].

Les feuilles sont utilisées comme produit de beauté en macération dans du beurre fondu. Cette préparation (brillantane) est nécessaire à la coiffure des femmes et parfume agréablement le corps [288].

Les touaregs l'utilisent aussi comme ressource pastorale pour la faune sauvage et 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, 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.



Figure 1.7 : Arbuste de *M nivellei* Batt et Trab. au bord d'un oued (Photo originale)



Figure 1.8: Rameau portant une baie de *M nivellei* Batt et Trab. (Photo originale).



Figure 1.9: Rameau de *Myrtus nivellei* Batt et Trab. [275].

## CHAPITRE 2

### EXPERIMENTATION ET METHODES D'ANALYSES

#### 2.1. Présentation des zones de prélèvement

##### 2.1.1. Le Tassili n'Ajjer

Le Tassili n'Ajjer, vaste massif montagneux, longeant le nord-est du Hoggar, sur une aire de 7.200.000 hectares, ses grands plateaux rocheux se caractérisent par de hautes falaises qui culminent à plus de 1 800 mètres d'altitude dans la région de Djanet [289]. Ce vaste plateau, présente un taux d'endémisme proche de 50 % [290].

Le Tassili est caractérisé par un climat désertique aride dont le taux hygrométrique est inférieur à 26 %, soit environ 50 à 100 millimètres par an [291]. Les précipitations sont caractérisées par une répartition particulière, liée au fait que le Sahara central est soumis à l'influence de deux régimes climatiques: le régime méditerranéen au nord et le régime tropical au sud [292].

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 [284].

L'espèce *M nivellei* Batt et 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 2.1 et figure 2.1).

Tableau 2.1: Coordonnées géographiques du site de récolte de *M nivellei* Batt et Trab.

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)

### 2.1.2. Zaccar

Le mont de Zaccar, longeant le massif du Dhahra raccordé au massif de l'Ouarsenis au sud, 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.

Elles présentent une proportion élevée de peuplements dégradés et ouverts dont le volume sur pied est généralement faible. Mais elles constituent néanmoins un capital, qu'il convient de protéger en le préservant des dégradations naturelles, humaines et animales.

Le matériel végétal à été récolté à 32 km du chef lieu de la wilaya de Ain Defla, à proximité de la commune de Ain Turki (tableau 2.2 et figure 2.2).

Tableau 2.2: Coordonnées géographiques du site de récolte de *M communis* L.

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)

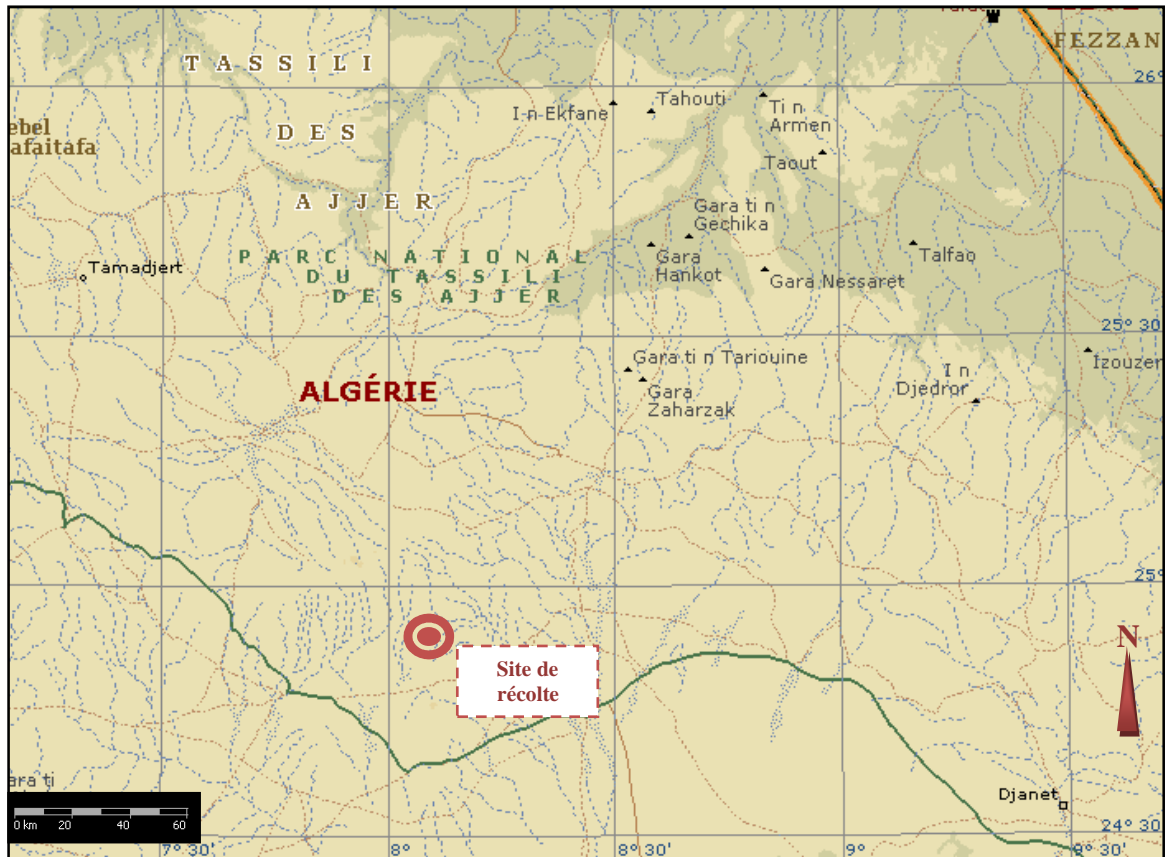


Figure 2.1: Carte géographique de la région du Tassili n'Ajjer (Djanet) montrant le site de récolte de l'espèce *M nivellei* Batt et Trab.[293].



Figure 2.2 : Carte géographique de la région de Zaccar (Ain Defla) montrant le site de récolte de l'espèce *M communis* L. [293].

## 2.2. Matériels

### 2.2.1. Instruments et réactifs

Le détail des instruments et des réactifs utilisés est représenté sur l'appendice D

### 2.2.2. Matériel biologique

#### 2.2.2.1. Matériel végétal

Les rameaux feuillés et les fruits mûrs ont été récoltés sur des pieds adultes de *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab., respectivement dans la région de Zaccar (Ain Defla) et du Tassili n'Ajjer (Djanet) au cours de l'année 2008 (tableau 2.3). Les échantillons ont été identifiés au niveau du laboratoire de botanique de l'Institut National d'Agronomie – El Harrach (Alger).

Tableau 2.3 : Les parties récoltées de chaque espèce étudiée.

Nom botanique	Organes récoltés	Date de récolte	Usage
<i>M communis</i> L.	Rameaux feuillés	05/2008	Extraction des huiles essentielles et des concrètes
	Fruits et Graines	10/2008	Etude botanique et culture <i>in vitro</i>
<i>M nivellei</i> Batt et Trab.	Rameaux feuillés	05/2008	Extraction des huiles essentielles et concrètes
	Fruits et Graines	10/2008	Etude botanique et culture <i>in vitro</i>

#### 2.2.2.2. 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 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 66 jours.

#### 2.2.2.3. Souches microbiennes

Les souches utilisées pour l'évaluation du pouvoir anti-microbien regroupent huit souches bactériennes, une levure et quatre souches fongiques.

### 2.2.3. Conservation

Une partie des plantes fraîchement récoltées du terrain a été directement destinée à l'extraction des huiles essentielles (tableau 4.3), et également pour l'étude anatomique et la détermination de la teneur en eau. Le reste a été lavé et séché à température ambiante et à l'abri de la lumière, afin d'éviter la photo-oxydation, et dans un endroit bien aéré, pour éviter les moisissures. Après séchage, chaque plante a été broyée en poudre fine et conservée dans des boîtes hermétiquement fermées pour la suite des travaux.

Les graines ont été conservées dans leurs baies et stockées au frais (à 16°C) jusqu'à leur utilisation.

Quant aux cals obtenus par culture *in vitro*, une partie a été conditionnée pour la détermination du contenu en eau, le reste a été séché à l'étuve à 25°C pendant trois semaines dans des boîtes de pétri en verre, fermées pour éviter les contaminations, puis réduits en poudre fine et conservés dans des boîtes hermétiquement fermées jusqu'à leur utilisation.

Les souches microbiennes ont été conservées comme suit:

- Les souches bactériennes sur des milieux de conservation.
- Les champignons phytopathogènes sur milieu PDA (conservés au frais à 5°).
- *Candida albicans* sur gélose Sabouraud additionnée de chloramphénicol (conservée à température ambiante).

### 2.3. Méthodes

Le matériel végétal utilisé pour les différentes expérimentations a été divisé en trois parties: la première partie sert à l'analyse phytochimique, la seconde partie aux coupes histo-anatomiques, et la troisième partie à l'introduction *in vitro* (figure 2.3).



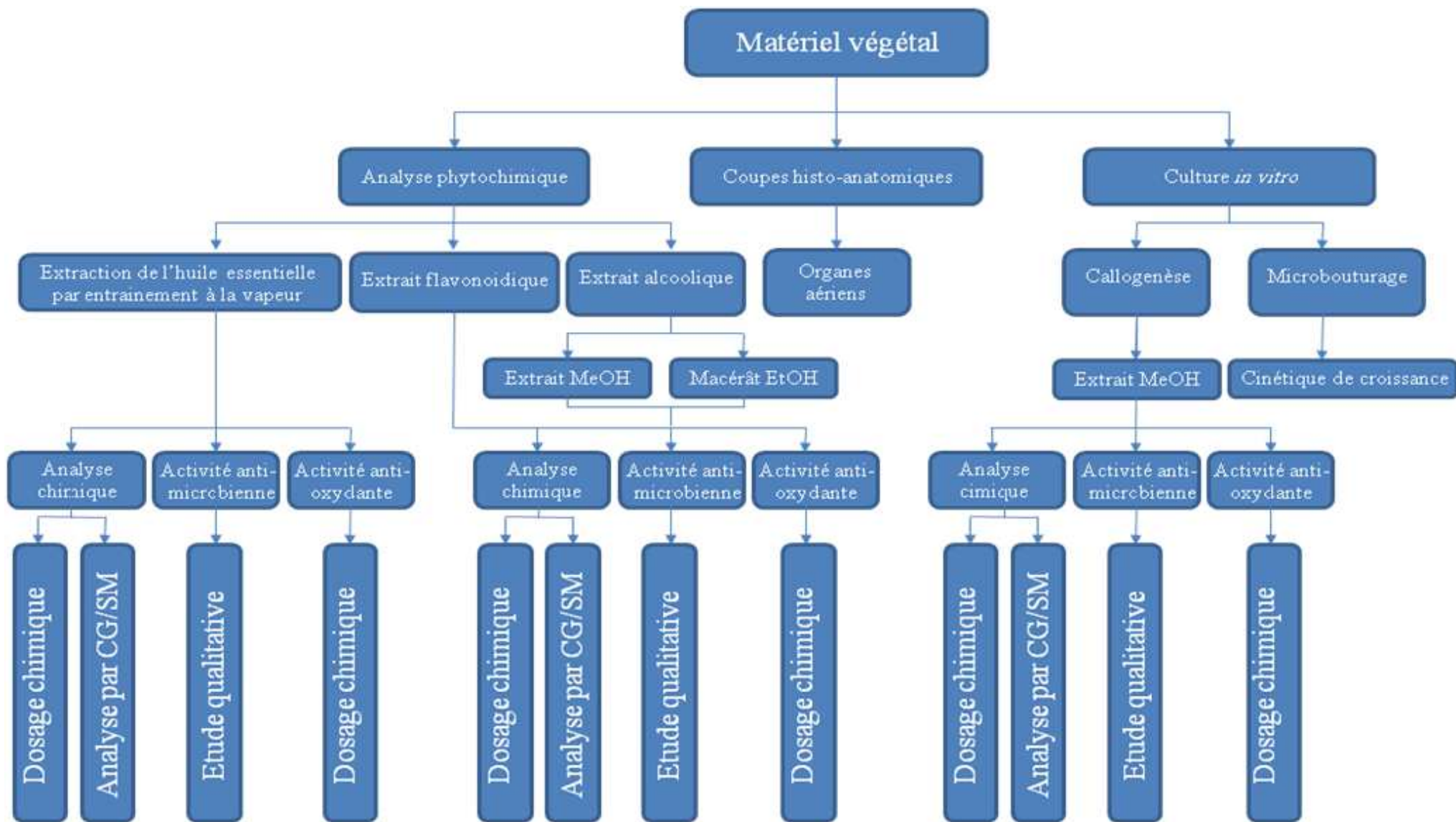


Figure 2.3 : Diagramme descriptif des principales méthodes et tests effectués.

### 2.3.1. Etude botanique des plantes

Le but de cette étude est de dévoiler l'existence des principales différences morphologiques apparentes de ces deux espèces appartenant au genre *Myrtus* et de mettre en évidence les structures cellulaires impliqués dans la sécrétion des huiles essentielles, ces manipulations sont faites au sein du laboratoire de biotechnologie végétale.

#### 2.3.1.1. Etude morphologique

Elle 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 nous sommes basées sur la description de leurs appareils végétatifs:

1- Examen macroscopique des fleurs: Nous avons cherché des spécificités florales communes caractéristiques du genre *Myrtus* (nombre et aspect des étamines, position de l'ovaire, nombre de carpelles et type de placentation).

2- Examen macroscopique des feuilles: Nous avons décrit les caractéristiques foliaires de chaque espèce (type de nervation, taille et aspect des feuilles, phyllotaxie)

3- Examen macroscopique des tiges et de l'écorce: Nous avons abordé l'aspect et l'apparence externe des tiges et des rameaux ligneux de chaque espèce (morphologie des tiges, aspect et couleur de l'écorce).

4- Examen macroscopique des fruits et des graines: Nous nous sommes basées sur la description de la forme des baies et des graines, leur taille, et leur contenu.

#### 2.3.1.2. Étude histo-anatomique

L'espèce *Myrtus communis* L. a fait l'objet de nombreuses études pour évaluer ses activités biologiques. Cependant, du point de vue histologique, une seule étude a été effectuée sur les fleurs par CICCARELI et *al.* [176] , alors que l'espèce *M nivellei* Batt et Trab. n'a fait l'objet d'aucune exploration 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. Pour cette fin, nous avons utilisé la technique de double coloration.

#### 2.3.1.2.1. Préparation des échantillons

Les rameaux feuillés récoltés sont soigneusement nettoyés à l'eau courante, égouttés puis conservés dans des flacons contenant de l'alcool à 70 %, fermés hermétiquement, afin de maintenir les organes prélevés dans un état aussi proche que possible de l'état vital. Les organes étudiés sont : les tiges et les feuilles.

#### 2.3.1.2.2. Réalisation des coupes histologiques

Les coupes ont été réalisées à l'aide d'une lame de rasoir neuve, les organes sélectionnés sont coupés à main levée. Le mouvement doit être rapide et le plan de la coupe doit être perpendiculaire au grand axe de l'organe, pour avoir des sections transversales. Les coupes doivent être aussi fines que possible et sont immédiatement recueillies dans l'eau pour éviter leur dessèchement

#### 2.3.1.2.3. Coloration des parois

Pour la différenciation des tissus, nous avons utilisé la technique classique de double coloration [294], qui comporte les étapes (figure 2.4):

- 1- Un traitement des coupes à l'hypochlorite de sodium pendant 15 minutes, afin de vider le contenu cellulaire, à l'exception des parois qui persistent.
- 2- Un rinçage soigneux des coupes à l'eau de robinet pendant 5 min.
- 3- Un traitement à l'acide acétique à 0.1% pendant 1 min, afin de neutraliser le pH et assurer la fixation des colorants sur les parois.
- 4- Un traitement au vert de méthyle pendant 10min, pour colorer les parois lignifiées.
- 5- Un rinçage soigneux des coupes à l'eau de robinet pendant 5 min.
- 6- Un dernier traitement avec le rouge congo pendant 10 min, pour colorer les parois pectocellulosiques.
- 7- Un dernier rinçage des coupes à l'eau de robinet.

#### 2.3.1.2.4. Observation

Les différents organes aériens de chaque plante ont été observés à la loupe pour l'étude macroscopique. Quant aux coupes histologiques, après coloration, elles ont été placées entre lame et lamelle pour l'observation au microscope photonique.

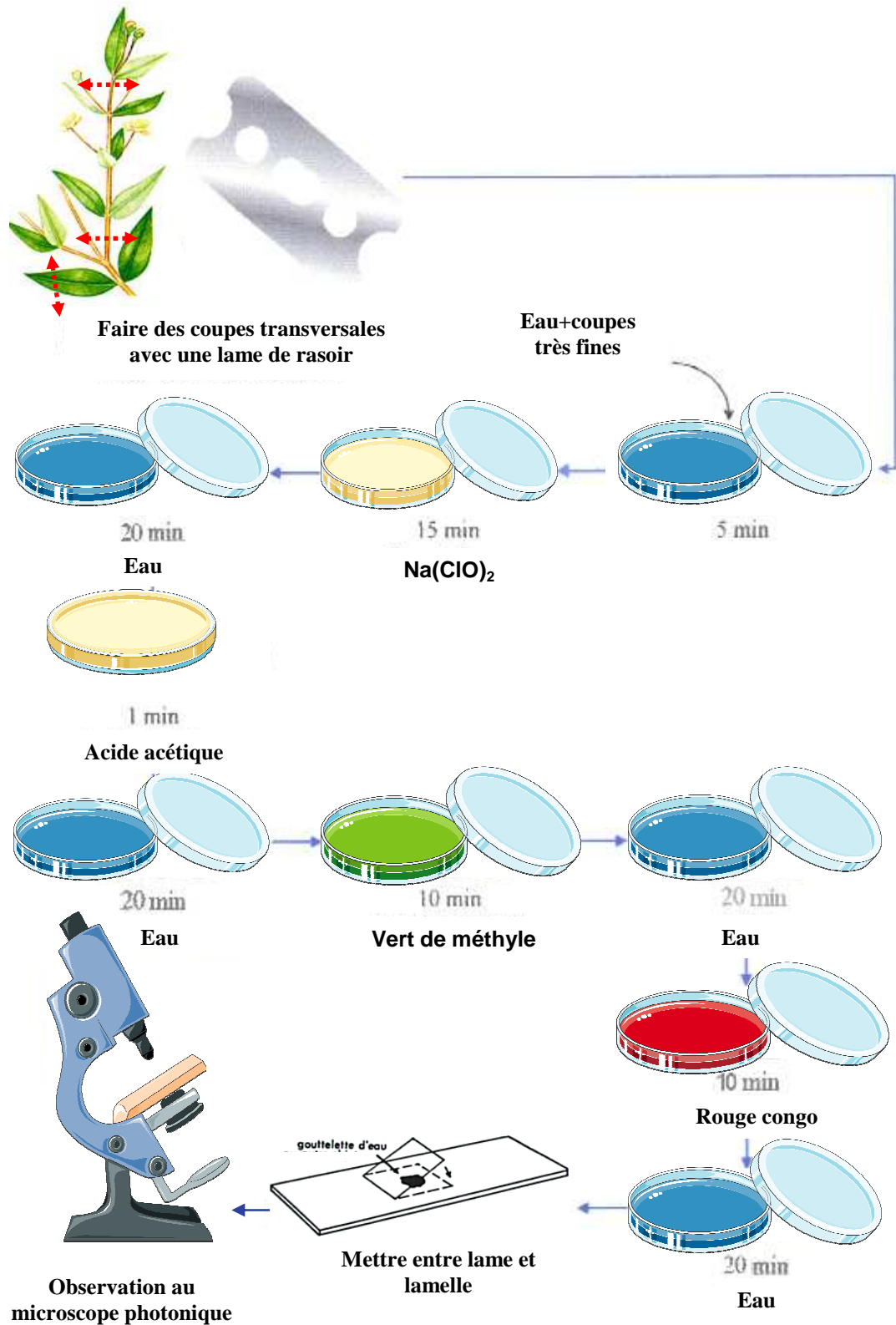


Figure 2.4 : Différentes étapes de la réalisation de la technique de double coloration

### 2.3.2. Partie culture *in vitro*

#### 2.3.2.1. Milieux de culture

En faisant notre bibliographie, nous n'avons rencontré aucun renseignement sur l'espèce saharienne *M nivellei* Batt et Trab., même les travaux concernant l'espèce méditerranéenne, ne s'intéressent globalement qu'à son aspect phytochimique. A cet effet, nous avons tenter d'introduire ces deux espèces en culture *in vitro*.

Le milieu de culture de base utilisé est celui de MURASHIGE et SKOOG (1962) [295] composé de:

- Macroéléments de MURASHIGE et SKOOG (1962). (Appendice E)
- Microéléments de MURASHIGE et SKOOG (1962). (Appendice E)
- Fe EDTA: Na<sub>2</sub>EDTA.....37,25 mg/l.  
                  FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O.....27,85 mg/l.
- Saccharose.....30 g/l.
- Gélose (Agar-agar).....8 g/l.
- Vitamines de Morel (Appendice E).

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 (2,5x20 cm) à raison de 15 ml par tube, puis stérilisés par autoclavage à 120°C sous une pression de 1 bar pendant 20 min.

#### 2.3.2.2. Désinfection des instruments utilisés

Tous les instruments métalliques utilisés (pinces, ciseaux et scalpels) sont enveloppés dans du papier aluminium et stérilisés à l'étuve à 120°C durant 12 h.

#### 2.3.2.3. Désinfection du matériel végétal

##### 2.3.2.3.1. Désinfection des boutures

Les boutures sont prélevées sur terrain à partir de rameaux feuillés récoltés au début du printemps (Mars 2008). Les boutures sont enveloppées dans du papier imbibé d'eau, puis mises dans des sachets en polystyrène, 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.* [112] sur la désinfection du matériel végétal ligneux, nous a mené à expérimenter plusieurs modes de désinfection, en faisant varier différentes concentrations d'hypochlorite de calcium, en relation avec différents temps de trempage (tableau 2.4). La méthode de désinfection que nous avons adopté se résume en:

- Un rinçage abondant à l'eau de robinet.
- Un traitement fongicide dans une solution de benlate (0,5g/l) durant 10 min.
- Un rinçage à l'alcool (éthanol 70%).
- Une désinfection au  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  avec 3 différentes concentrations.
- Trois rinçages de 10 min à l'eau distillée stérilisée.

Tableau 2.4 : Mode de désinfection des boutures prélevées *in situ*.

	Concentration	Temps de trempage (min)
<b>Hypochlorite de calcium <math>\text{Ca}(\text{ClO})_2</math></b>	16%	30
		20
		10
	8%	30
		20
		10
	4%	30
		20
		10

Les fragments sont ensuite débités au scalpel en micro-boutures de 0,5-1 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, afin d'éviter l'oxydation des phénols. Les tubes sont ensuite transférés dans la chambre de culture.

#### 2.3.2.3.2. Désinfection des graines

La désinfection est réalisée en utilisant deux types de désinfectants: l'hypochlorite de sodium  $\text{Na}(\text{ClO})_2$  et l'hypochlorite de calcium  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ , avec une gamme de concentrations et des temps de trempage variables (tableau 2.5)

Tableau 2.5: Mode de désinfection des graines.

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

#### 2.3.2.4. Multiplication à partir de vitro-semis

##### 2.3.2.4.1. 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 (témoin) et le deuxième renferme des graines auxquelles nous avons enlevé une partie du péricarpe (scarification mécanique à l'aide d'un scalpel).

Au laboratoire, les graines entières et scarifiées sont trempées d'abord dans de l'eau pendant 24 h, qu'on renouvelle fréquemment, pour ramollir le péricarpe et favoriser également l'ouverture du mésocarpe. A travers ce traitement, on élimine les graines qui flottent à la surface, ce tri densimétrique par flottaison est d'usage fréquent [296]. Une désinfection rapide des graines est préconisée avant leur introduction en boîtes de pétri.

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

Les observations de l'évolution de la germination sont relevées chaque 24h pendant le 1<sup>er</sup> mois puis chaque 10 jour jusqu'à la fin de la période d'observation estimée à 100 jours.

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

Les graines désinfectées de *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab. 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 péricarpe. Chaque lot de graines est introduit dans des tubes 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. Nous avonsensemencé entre 4 et 6 graines par tube.

#### 2.3.2.5. Multiplication par micro-bouturage

##### 2.3.2.5.1. 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 2.6).

Cependant nous avons joué sur le balance hormonale en utilisant deux hormones de croissance: la benzyladénine BA (cytokinine) et l'acide  $\alpha$ -naphtylacétique ANA (auxine).

Tableau 2.6: 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



### 2.3.2.5.2. Phase d'élongation

Nous avons suivi l'allongement des micro-boutures en modifiant la balance hormonale BA/ANA en faveur des cytokinines (tableau 2.7).

Tableau 2.7: 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 ces mêmes combinaisons hormonales enrichies par 0,05 mg/l d'acide gibbérellique ( $GA_3$ ), car ce dernier a une influence sur l'allongement des pousses et des entre-nœuds (tableau 2.8). Une meilleure élongation de ces derniers permet une bonne fragmentation des vitro-plants issus de l'introduction primaire.

Tableau 2.8: Combinaisons hormonales des milieu d'élongation supplémentés de  $GA_3$ .

Milieu MS	BA mg/l	ANA mg/l	$GA_3$ 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

### 2.3.2.5.3. 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 2.9).

Tableau 2.9: Combinaisons 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

### 2.3.2.6. 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 AUGÉ et *al.* [3], 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  $0,25\text{cm}^2$  ne comportant jamais de bourgeons. 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 2.10).

Tableau 2.10: Combinaisons hormonales utilisées pour l'évaluation de la callogenèse

Milieu MS	Auxines (mg/ml)		Cytokinine (mg/ml)
	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

### 2.3.2.7. 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 le phytotron sous les conditions suivantes :

- Photopériode : 16 heures lumière / 8 heures obscurité.
- Température : constante  $26\pm 1^\circ\text{C}$ .
- L'éclairage horizontal est assuré par une série de 16 néons d'une intensité de 25000 lux.

### 2.3.3. Partie étude phytochimique

#### 2.3.3.1. Caractérisation physico-chimique

##### 2.3.3.1.1. Détermination du potentiel hydrogène (pH)

Dans une fiole de 200 ml, on disperse 4 g de poudre végétale dans de l'eau chaude. Après refroidissement, la fiole est complétée jusqu'au trait de Jauge avec de l'eau distillée. On détermine le pH de cette solution utilisant un pH-mètre [297].

##### 2.3.3.1.2. Détermination de la teneur en eau de la plante

Elle consiste à déterminer la masse de la perte en eau d'une prise d'essai après un séjour de 24 heures à l'étuve [44].

On place des rameaux feuillés de poids frais déterminé dans une étuve portée à 75°C. Les échantillons sont ainsi pesés chaque 24 heures jusqu'à la stabilisation du poids sec de la matière végétale [298]. Son estimation se fait en pourcentage selon la formule :

$$T\% = (MF - MS) \cdot 100 / MF$$

T%: Teneur en eau (%)

MF : Masse fraîche

MS : Masse sèche

##### 2.3.3.1.3. 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 [44].

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 [299]:

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

X%: Taux d'humidité de la poudre

M : Masse de l'échantillon prise en gramme

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

#### 2.3.3.1.4. 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.

##### 2.3.3.1.4.1. Substances extractibles par l'éthanol 80%

On Introduit dans un erlenmeyer 1 g de poudre végétale et 40 ml d'éthanol 80 %, qu'on laisse macérer pendant 24 heures à la température du laboratoire, après l'avoir fermer à l'aide d'un verre de montre. Ce mélange est 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 exprimée en pourcentage, est calculée par la formule [300]:

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

$P_E$ : Masse de la prise d'essai

M: Masse du bêcher vide

M': Masse du bêcher avec le résidu

##### 2.3.3.1.4.2. 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 (masse m), après évaporation à sec, on repèse à nouveau le bêcher avec le résidu (masse m'). La teneur des substances extractibles par l'eau, exprimée en pourcentage, est calculée par la formule [301]:

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

$M_E$ : Masse de la prise d'essai

m : Masse du bêcher vide

m': Masse du bêcher avec le résidu

##### 2.3.3.1.5. 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 15min puis pesée. Le calcul du pourcentage des cendres totales par gramme de poids sec se fait selon la formule [44]:

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

$\%_C$  : Pourcentage des cendres

M : Masse du creuset après calcination

$M_C$  : Masse du creuset vide

$M_E$  : Masse de matière prise

### 2.3.3.2. 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 [11]. Le but est donc de connaître les principales familles de métabolites de chaque espèce.

#### 2.3.3.2.1. Recherche des alcaloïdes

On fait humecter 5 g de poudre végétale avec 20 ml d'ammoniaque 0.5M, qu'on laisse macérer pendant 24 h dans 50 ml d'un mélange éther/chloroforme (3/1), le filtrat est épuisé par de l'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 [302].

#### 2.3.3.2.2. Recherche de sennosides

On introduit 2,5 g de poudre dans une fiole, à laquelle on ajoute 50 ml d'eau distillée et 2 ml d'HCl 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 1M, il se développe une coloration jaune orange en présence des sennosides [302].

### 2.3.3.2.3. Recherche des substances polyphénoliques

#### 2.3.3.2.3.1. Solution à analyser: (préparation de l'infusé 5%)

Nous avons introduit 5 g de la poudre sèche dans un erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml d'eau distillée bouillante. Nous avons arrêté l'ébullition et fermé avec un verre de montre, après infusion pendant 15 min, nous avons filtré et rincé avec un peu d'eau chaude de manière à obtenir 100 ml de filtrat [303].

- Les anthocyanes

On prend 5 ml d'infusé auquel on ajoute 5 ml d'acide sulfurique 1M, puis 5 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  0.5M. Si la coloration s'accroît par acidification puis vire au bleu violacé en milieu basique, on peut confirmer la présence d'anthocyanes [303].

- Les leuco-anthocyanes (pro-anthocyanidols)

On additionne 2 g de poudre végétale à 20 ml d'un mélange propanol/acide chlorhydrique 1M (v/v) et on le porte à ébullition dans un bain marie pendant 3 min. Une coloration rouge indique la présence des leuco-anthocyanes [302].

- Les Tanins

Les tanins sont des polyphénols polaires, ils existent dans les écorces, les feuilles, les fruits et les racines [304]. Ils sont divisés en deux groupes: les tanins condensés et les tanins hydrolysables [64].

On introduit 5 ml d'infusé dans un tube à essai, puis on lui ajoute 1 ml d'une solution aqueuse diluée de  $\text{FeCl}_3$  à 1%. En présence de tanins il se développe une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre [303].

- On ajoute 15 ml de réactif de Stiany à 30 ml d'infusé. Ce mélange est chauffé au bain-marie à 90°C pendant 15 min. L'apparition d'un précipité montre la présence de tanins catéchiques [305].
- Pour révéler 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  $\text{FeCl}_3$  1% jusqu'à l'obtention d'une couleur bleu-noirâtre [305].

- Les Flavonoïdes

On introduit dans un tube à essai 5 ml d'infusé, auquel on ajoute 5 ml d'HCl, 1ml d'alcool iso-amylique puis quelques copeaux de magnésium. Il se produit une réaction de crépitation durant quelques minutes [303].

L'apparition d'une coloration rose orangée indique la présence de flavones, une couleur rose violacée indique la présence des flavanones, alors que le rouge indique la présence de flavanols. Pour rechercher les flavanes, on ajoute quelques gouttes d'une solution de vanilline 2% à 2ml d'infusé. L'apparition d'une couleur rouge indique leur présence [306].

#### 2.3.3.2.4. 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. On prend 5 ml du 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 [303].

#### 2.3.3.2.5. Recherche de saponosides

A 2 ml 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 [302].

#### 2.3.3.2.6. Recherche de mucilages

On introduit 1 ml de l'infusé dans un tube et on lui ajoute 5 ml d'éthanol absolu, l'obtention d'un précipité floconneux indique la présence des mucilages [303].

#### 2.3.3.2.7. Recherche d'antraquinones

- Dérivés anthracéniques libres

A 1g 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' $\text{NH}_4\text{OH}$  0.5M. L'apparition d'une coloration rouge indique leur présence: c'est la réaction de Borntragger [300, 303].

- Dérivés anthracéniques combinés

Deux grammes de poudre végétale sont additionnés à 5 ml d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N, 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  $\text{NH}_4\text{OH}$ , l'apparition d'une couleur rouge foncée indique la présence des quinones combinées [302].

#### 2.3.3.2.8. Recherche de glucosides

A 2 g de poudre végétale, on ajoute quelques gouttes d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M, la formation d'une coloration rouge brique ensuite violette indique la présence des glucosides [302].

#### 2.3.3.2.9. Recherche de l'amidon

A 2g de poudre végétale, on ajoute quelques gouttes d'iode, la formation d'une coloration bleu-violacée indique la présence de l'amidon [302].

#### 2.3.3.2.10. Composés réducteurs

On introduit 5 ml de l'infusé dans une capsule puis on laisse évaporer au bain marie jusqu'à sec. Au résidu obtenu, on ajoute 1ml de réactif de Fehling. L'obtention d'un précipité rouge brique indique la présence de composés réducteurs [303].

#### 2.3.3.3. Etude des composés volatils (les huiles essentielles)

##### 2.3.3.3.1. Extraction de l'huile essentielle par entraînement à la vapeur d'eau

L'extraction des huiles essentielles des deux espèces étudiées a été réalisée au laboratoire d'extraction de l'usine Extral-bio. L'extraction de l'huile essentielle concerne exclusivement les plantes fraîches obtenues *in situ*, car en raison des quantités extrêmement importantes nécessaires pour extraire quelques millilitres de ce principe actif, nous n'avons pas pu la réaliser pour les plantes obtenues *in vitro*, surtout que ces espèces ont une croissance très lente.

##### Principe

Ce procédé consiste à placer la matière végétale dans un extracteur, ce dernier est relié à un ballon rempli au 2/3 d'eau et contenant un agent régulateur d'ébullition, et déposé sur un chauffe ballon. L'ensemble du montage est fixé à des supports. La vapeur envoyée dans l'extracteur, traverse la matière végétale et se charge d'huile essentielle, elle passe ensuite dans le réfrigérant où elle se condense, le distillat est recueilli dans une ampoule à décanter pour séparer les deux phases: l'hydrolat et l'huile essentielle.



### Mode opératoire

L'eau distillée contenue dans l'erlenmeyer en amont du montage est portée à ébullition. Les vapeurs dégagées vont s'accumuler dans le ballon à fond rond, contenant la matière végétale fraîche (200g) et vont entraîner ainsi toutes les substances volatiles par leur parcours (figure 2.5).

Les vapeurs d'eau chargées d'essences vont se condenser au niveau du réfrigérant qui est alimenté par un courant d'eau continu. Celles-ci seront recueillies en aval du montage, ce qui formera le distillat qui est riche en huiles essentielles. La séparation des deux phases (hydrolat et huile essentielle) se fait par une simple décantation grâce à la différence de densité entre les deux liquides. L'extraction dure environs 3h, on commence le comptage du temps avec l'apparition des premières gouttes de l'hydrolat dans l'ampoule à décanter.



Figure 2.5 : Montage de l'entrainement à la vapeur

#### 2.3.3.3.1.1. Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles récupérées sont conservées à 4°C dans des flacons stériles en verre brun, hermétiquement fermés et à l'abri de la lumière.

#### 2.3.3.3.2. Evaluation de quelques propriétés organoleptiques des huiles essentielles

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

#### 2.3.3.3. Détermination du rendement de l'huile essentielle

Le rendement de l'huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction et la masse de la matière végétale utilisée [307].

Après un temps estimé à 3 heures d'extraction, on prélève l'huile essentielle qui est récupérée par une simple décantation et qu'on pèse ensuite dans une balance de précision. Le rendement, est calculé 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

#### 2.3.3.4. Détermination de la densité relative de l'huile essentielle

La densité relative d'une huile essentielle est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile essentielle et un même volume d'eau distillée à 20°C [58]. On pèse dans un bêcher un volume bien déterminé de l'huile essentielle dans une balance de précision et on note la masse trouvée, ensuite on applique la formule:

$$D_{HE} = M_1 / M_2$$

$D_{HE}$  : Densité de l'huile essentielle

$M_1$  : Masse en gramme d'un volume d'huile essentielle

$M_2$  : Masse en gramme d'un même volume d'eau distillée

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

L'analyse des huiles essentielles des deux espèces étudiées par couplage CG/SM a été réalisée au laboratoire de chromatographie du centre de recherche et de développement, de l'entreprise algérienne des aérosols sise à Alger, afin d'identifier et de quantifier leurs différents constituants volatils.

La chromatographie 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 phase gazeuse (CG) et la spectrométrie de masse (SM).

## 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 moderne 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 [308].

### 2.3.3.3.5.1. 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 [309].

### 2.3.3.3.5.2. 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 charge (M/Z)
- La détection des ions proportionnellement à leur nombre et amplification du courant correspondant pour les rendre détectables par l'appareil [309].

L'identification est faite par comparaison des spectres de masse avec la banque de données fournie par le logiciel Chemstation (NIST 2002 et Wiley version 7.0). Ce logiciel, après comparaison des spectres de masse des composés détectés à ceux de la banque de données, propose des structures validées pour des taux de reconnaissance supérieurs à 90 %. L'appareil est soumis à des réglages précis contrôlant les conditions opératoires avant l'analyse des huiles essentielles (tableau 2.11)

Tableau 2.11 : Conditions d'analyse du CG/SM

Chromatographe en 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 final 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

#### 2.3.3.4. Etude des composés non volatils polaires

##### 2.3.3.4.1. Extractions par solvant (solide-liquide)

Elles sont réalisées par épuisements de la poudre végétale à l'aide d'un solvant, à froid ou à chaud. Les solvants utilisés sont le méthanol et l'éthanol (tableau 2.12), afin de libérer les composés non volatils présents dans les structures vacuolaires par rupture du tissu végétal et par diffusion.

On prend le matériel végétal réduit en poudre fine, afin de l'utiliser pour l'extraction des composés polaires non volatils. L'usage de la poudre offre une plus grande surface de contact de la poudre végétale avec les solvants extracteurs, permettant ainsi d'améliorer le rendement des extractions.

Tableau 2.12: Conditions des extractions solide-liquide effectuées.

	Solvant utilisé	Polarité	Température
<i>M communis</i>	Méthanol CH <sub>3</sub> OH	0,995	60°C
	Ethanol C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	0,980	Ambiante
<i>M nivellei</i>	Méthanol CH <sub>3</sub> OH	0,995	60°C
	Ethanol C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	0,980	Ambiante

#### 2.3.3.4.1.1. Extractions à chaud par soxhlet au méthanol

L'extracteur de soxhlet est un appareil spécifique conçu pour l'extraction continue solide-liquide. Le solvant (à raison de 100 ml pour 10 g d'échantillon 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 le produit 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 [310].

#### Mode opératoire

- Pour la plante obtenue *in situ*

Le montage comporte une plaque chauffante, un ballon de 500 ml à col rodé et à fond plat, dans lequel le solvant est chauffé jusqu'à environ 64,9°C (température d'ébullition du méthanol), un réfrigérant qui condense les vapeurs et un extracteur de 250 ml à l'intérieur duquel on introduit, dans une cartouche poreuse, la poudre végétale à extraire et où retombe le solvant condensé par le réfrigérant. 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. L'extrait brut issu de l'extraction précédente est soumis à une double filtration, puis concentré à l'évaporateur rotatif et enfin séché à température ambiante (figue 2.6).

Le résidu sec obtenu est pesé pour déterminer son rendement et conservé au frais, dans un flacon sombre bien fermé, pour effectuer ultérieurement les tests phytochimiques. La formule utilisée pour calculer le rendement est:

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

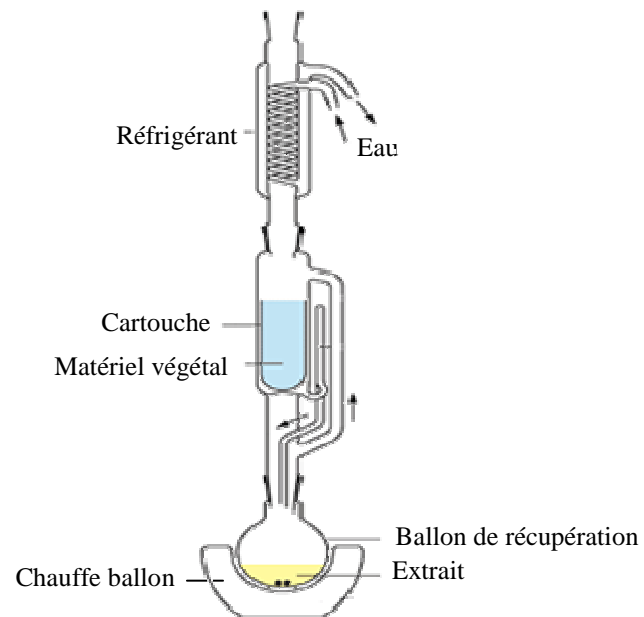
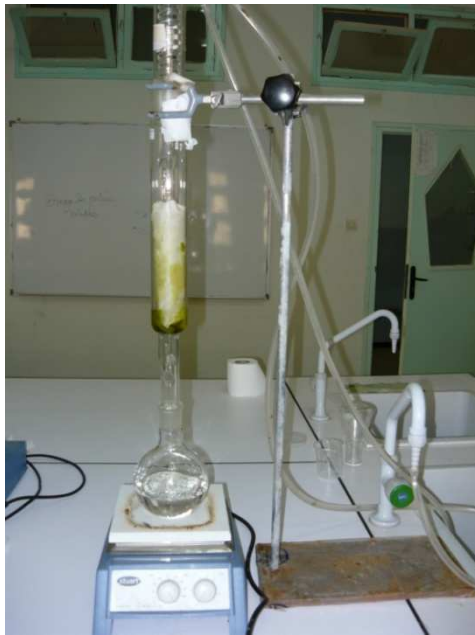


Figure 2.6 : Montage de l'extraction par soxhlet.

- Pour les cals obtenus *in vitro*

Le matériel végétal séché à l'étuve est réduit en poudre fine (2 g) puis extrait avec du méthanol (50 ml x 2) à chaud pendant deux heures jusqu'à épuisement, l'extrait obtenu est filtré deux fois [311]. Le filtrat obtenu est concentré à l'évaporateur rotatif à 60° pour l'élimination du solvant. Le résidu sec obtenu est pesé pour évaluer son rendement, ensuite conservé au frais dans un flacon sombre bien fermé jusqu'à son usage.

#### 2.3.3.4.1.2. 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 ne concerne que les plantes obtenues *in situ*.

#### Mode opératoire

On verse 100 ml d'éthanol sur 10 g de poudre contenue dans un bécher, ce mélange est maintenu sous agitation magnétique pendant 24 h, ensuite filtré deux fois. Le filtrat obtenu est concentré à l'évaporateur rotatif et le résidu obtenu est pesé pour déterminer son rendement puis conservé au réfrigérateur, dans un flacon sombre bien fermé. Le rendement est calculé par la formule:

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

#### 2.3.3.4.1.3. Extraction des flavonoïdes

Pour l'extraction des flavonoïdes, nous avons suivi le protocole décrit par GUIGNARD [49]. Elle se réalise en plusieurs étapes (figure 2.7):

##### 2.3.3.4.1.3.1. Macération et évaporation

- On fait macérer 30 g de poudre végétale avec 100 ml de méthanol pendant 72 h.
- Après filtration, le méthanol est évaporé par un évaporateur rotatif (à 60°C sous vide), on ajoute au résidu sec obtenu 50ml d'eau tiède (extrait aqueux).

##### 2.3.3.4.1.3.2. Extraction liquide-liquide

Cette opération permet la séparation d'un ou de plusieurs constituants par l'utilisation de leur distribution inégale dans deux liquides pratiquement non miscibles (Appendice F).

###### 2.3.3.4.1.3.2.1. Elimination de la chlorophylle et des lipides par le chloroforme

- On verse l'extrait aqueux dans l'ampoule à décanter, auquel on ajoute 30 ml de chloroforme ( $d=1,476$  à  $1,481$ ). La séparation se fait par différence de densité.
- On élimine la phase organique, cette étape est refaite trois fois jusqu'à l'élimination totale de la fraction lipidique et chlorophyllienne, ensuite on récupère la phase aqueuse.

###### 2.3.3.4.1.3.2.2. Elimination des génines libres

- On ajoute à la phase aqueuse récupérée 30 ml d'éther diéthylique.
- Après la formation de deux phases, on récupère la phase inférieure.
- On élimine ensuite la phase supérieure (éther diéthylique + génines libres).
- On refait cette étape plusieurs fois jusqu'à élimination totale des génines.

###### 2.3.3.4.1.3.2.3. Elimination des monosides

- On verse 30 ml d'acétate d'éthyle ( $d= 0,898$  à  $0,901$ ) dans l'ampoule qui contient l'extrait aqueux, après decantation, on suit les mêmes démarches que celles réalisées précédemment, jusqu'à l'élimination totale des monosides.

###### 2.3.3.4.1.3.2.4. Récupération des flavonoïdes et évaporation du butanol

Pour la séparation des flavonoïdes, on ajoute 30 ml de butanol à trois reprises à l'extrait aqueux et on récupère la phase alcoolique qui contient les flavonoïdes.

L'évaporation du butanol (température d'évaporation du butanol est de 55°C) sous vide à l'évaporateur rotatif est indispensable pour l'obtention d'un résidu sec des flavonoïdes.

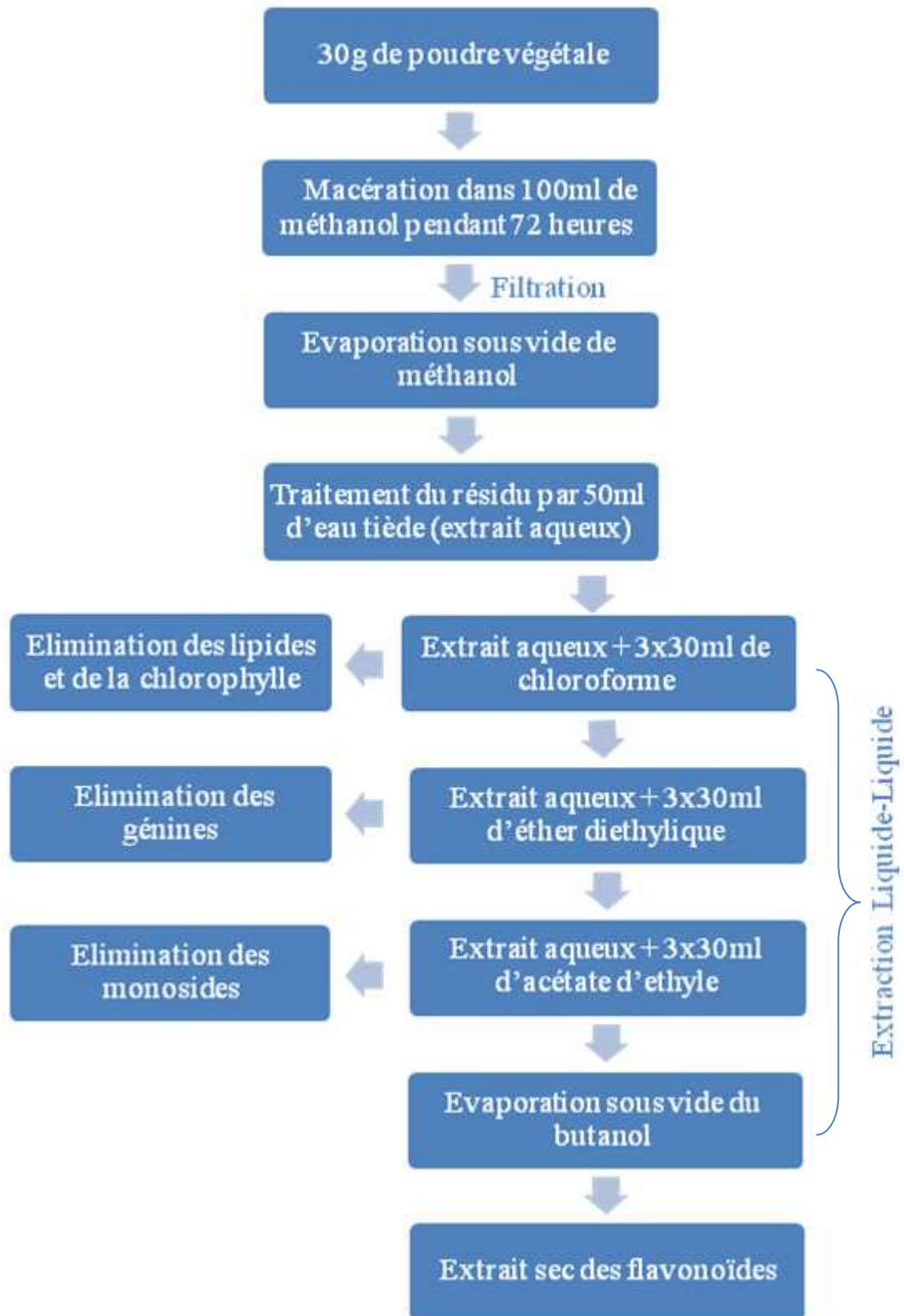


Figure 2.7: Schéma du protocole d'extraction des flavonoïdes



### 2.3.3.4.1.3.3. Détermination du rendement des flavonoïdes

Le rendement des flavonoïdes est évalué après l'obtention du résidu flavonoïdique sec, nous avons procédé comme suit :

1. On calcule le poids des résidus flavonoïdiques avec la formule:

$$M_f = M_2 - M_1$$

$M_f$  : Masse de l'extrait sec des flavonoïdes

$M_2$  : Masse du ballon avec l'extrait sec des flavonoïdes

$M_1$  : Masse du ballon vide

2. On calcule le rendement des flavonoïdes avec l'équation:

$$R_f = M_f / M_{mv} \times 100$$

$R_f$ : Rendement des flavonoïdes

$M_{mv}$ : Masse de la matière végétale initiale

### 2.3.3.4.2. Analyses spectrophotométriques

#### 2.3.3.4.2.1. 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 [54]. La spectrophotométrie UV-visible permettra donc:

- De reconnaître des groupements chimiques particuliers. L'interprétation d'un spectre ultraviolet est plus aisée que celle d'un spectre visible.
- 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.

Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé un appareil SHIMADZU UV-1601 pour déterminer les spectres d'absorption des molécules isolées ainsi que pour mesurer la densité optique, selon les conditions suivantes:

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

### Principe

En faisant traverser par un faisceau lumineux monochromatique (lumière à longueur d'onde fixe et définie) une cuve contenant une solution, une partie de la lumière incidente va être absorbée par les molécules de la substance dissoute (figure 2.8). 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 [312]:

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

$I_0$ : Intensité du rayonnement monochromatique incident.

$I_t$ : Intensité du rayonnement monochromatique émergent.

$T$ :  $I_t / I_0$

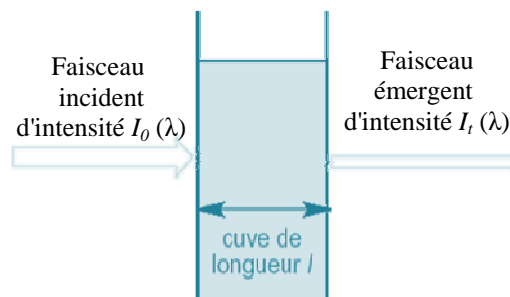


Figure 2.8: Principe de la spectrophotométrie UV-visible

#### 2.3.3.4.2.2. 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

Tous les extraits obtenus ont été analysés par spectrophotométrie UV-visible en mode séquentiel. Pour cela, nous avons préparé des solutions en dissolvant l'extrait sec dans du méthanol absolu à raison de 1mg/ml. Le spectre d'absorption de chaque extrait est obtenu dans le visible. Des étalons ont été soumis à un balayage dans les mêmes conditions, pour servir de référence à l'interprétation des tracés des spectres obtenus.

#### 2.3.3.4.2.3. Dosages biochimiques

##### 2.3.3.4.2.3.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols, contenus dans les extraits alcooliques secs, est réalisé selon le protocole de SLINKARD et SINGLETON [313].

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 [314]. La coloration produite, dont l'absorption maximum à 760 nm, est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans l'extrait végétal.

### Mode opératoire

Un millilitre de la solution, contenant 1mg de l'extrait sec (éthanolique ou méthanolique), est ajouté à 46 ml d'eau distillée et 1 ml de FCR, l'ensemble est bien mélangé. Après trois minutes, 3 ml d'une solution de carbonate de sodium (2%) sont ajoutés au mélange, qui est maintenu en agitation permanente durant 2 heures à température ambiante, l'absorbance est lue à 760 nm.

L'indice de Folin-Ciocalteu est exprimé en microgramme équivalent acide gallique par milligramme d'extrait sec ( $\mu g$  eq Ac gallique/mg ES), on utilise une gamme-étalon établie dans les mêmes conditions avec de l'acide gallique. La concentration des composés phénoliques est calculée selon l'équation obtenue à partir de la courbe d'étalonnage.

#### 2.3.3.4.2.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux

##### Mode opératoire

La mesure des flavonoïdes totaux des extraits est inspirée de la méthode décrite par PARK et *al.* [315].

Un aliquote de 1ml de la solution contenant 1mg d'extrait végétal, est placé dans un tube à essai, auquel on ajoute 0,1 ml de solution de nitrate d'aluminium 10%; 0,1 ml de solution d'acétate de potassium 1 M et 3,8 ml d'éthanol. Après 40 min d'incubation à température ambiante, la lecture de l'absorbance est réalisée à 415 nm.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant la quercetine à différentes concentrations, pratiquée dans les mêmes conditions opératoires. La concentration des flavonoïdes est calculée conformément à l'équation obtenue à partir de la courbe d'étalonnage de la quercetine et exprimée en microgramme équivalent quercetine par milligramme d'extrait sec.

#### 2.3.3.4.2.3.3. Dosage des flavonols

##### Mode opératoire

La teneur en flavonols est déterminée par la méthode de YERMAKOV et *al.* [316]. On mélange 2 ml de l'extrait sec avec 2 ml d'une solution d' $\text{AlCl}_3$  (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. Le taux des flavonols est déterminé en microgramme équivalent rutine par milligramme d'extrait sec. La courbe d'étalonnage est réalisée avec des concentrations allant de 0,0166 à 0,5 mg/ml de solution méthanolique de rutine.

#### 2.3.3.4.2.3.4. Dosage des sucres totaux

Les sucres solubles totaux (saccharose, glucose, fructose, et les polysaccharides) sont dosés par la méthode Phénol-Acide sulfurique [317].

Le principe de la réaction est basé sur la coloration des produits de dégradation des oses neutres par l' $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré. Il transforme à chaud les glucides en dérivés sulfuriques, qui se colorent en jaune orange par le phénol.

#### Préparation de la solution de phénol

On dissout 5 g de phénol dans 100 ml d'eau distillée. Le réactif est fraîchement préparé avant le dosage et doit impérativement être maintenu à l'obscurité.

#### Mode opératoire

On introduit 1ml de la solution contenant 1 mg d'extrait sec dans un tube à essai, auquel on ajoute 5 ml du réactif phénol et 5 ml d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré 96% ( $d=1,86$ ). Le mélange est vigoureusement agité et incubé dans un bain d'eau très froide pendant 30 min, l'absorbance est mesurée à 488 nm. On obtient, une solution jaune orange à la surface, on passe au vortex pour homogénéiser la couleur de la solution. La couleur de la réaction est stable pendant plusieurs heures, les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g eq Glu/ mg ES}$ . En parallèle on trace la courbe d'étalonnage en préparant des solutions de glucose à différentes concentrations. Après incubation, la DO est lue à 488 nm.

#### 2.3.3.4.2.3.5. Dosage des tanins

Les tanins sont dosés selon la méthode colorimétrique Folin Denis, décrite par JOSLYN [318]. 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  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  (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.

#### 2.3.3.4.2.3.6. Dosage des anthocyanes

Les anthocyanes sont déterminés par la méthode de décoloration proposée par JUR [319]. Son principe est basé sur la décoloration des solutions d'anthocyanes en utilisant une solution de bisulfite de sodium. JUR [319] 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 et conduit à la formation d'un produit d'addition incolore, plus ou moins stable selon le pigment. Cette méthode suppose que les autres composés phénoliques n'interfèrent pas sur le dosage.

#### Mode opératoire

Dans un bécher de 80 ml, on introduit 1 ml de l'échantillon (contenant 1mg d'extrait sec), 1 ml d'éthanol et 20 ml d'une solution aqueuse d'HCl 2%. A partir de cette solution S:

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

Après une incubation de 20 min, on procède à la mesure de la densité optique à 520 nm. Les résultats sont exprimés en microgramme équivalent cyanidine par milligramme d'extrait sec, après extrapolation des absorbances obtenues sur la courbe d'étalonnage de la cyanidine.

#### 2.3.3.5. Evaluation 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 [320]. L'antibiogramme teste l'action des antibiotiques sur les micro-organismes en mesurant leurs zones d'inhibition. En 1970, cette pratique a été adoptée par des aromathérapeutes, qui la baptisent "Aromatogramme" [24].

##### 2.3.3.5.1. Les substances testées

- Les huiles essentielles: Les huiles essentielles pures des deux espèces, recueillies par simple décantation, ont été testées sans dilution.

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

#### 2.3.3.5.2. Les milieux de culture utilisés

La gélose nutritive et la gélose Mueller Hinton sont employées pour tester l'activité anti-bactérienne des souches sélectionnées [12]. Le milieu Sabouraud est utilisé pour la levure *Candida albicans*, et le milieu PDA préparé au laboratoire, pour les champignons [29].

#### 2.3.3.5.3. Les souches testées

Pour évaluer le caractère anti-microbien des huiles essentielles et des extraits, nous avons utilisé huit souches bactériennes, une levure et quatre champignons (tableau 2.13).

Tableau 2.13 : Origine des souches microbiennes testées.

Souches	ATCC American Type Culture Collection	Milieu approprié	Source
<b>Moisissures</b>			
<i>Alternaria sp</i>	-	Milieu PDA	Laboratoire de mycologie du département d'Agronomie
<i>Fusarium oxysporum fsp albidinis</i>	-		
<i>Penicillium sp</i>	-		
<i>Fusarium oxysporum fsp lycopersici</i>	-		
<b>Bactéries</b>			
<i>Escherichia coli</i>	25922	Gélose nutritive	Laboratoire de microbiologie du Laboratoire d'Hygiène de Blida
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923		
<i>Staphylococcus epidermes</i>	12228		
<i>Pseudomonas aerogenosa</i>	27853		
<i>Salmonella typhi</i>	4404540		
<i>Shigella flexineri</i>	25936		
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2258		Laboratoire de microbiologie de CHU Frantz Fanon
<i>Enterococcus faecalis</i>	237013		
<b>Levures</b>			
<i>Candida albicans</i>	237062	Gélose Sabouraud	Laboratoire de microbiologie de CHU Frantz Fanon

#### 2.3.3.5.4. Contrôle microbiologique des micro-organismes

Avant la réalisation des tests microbiologiques, toutes les souches ont subi une série de repiquages pour s'assurer de leur pureté. Les champignons phytopathogènes ont été soumis à une identification macro et microscopiques afin de confirmer leur identité (appendice G).

#### 2.3.3.5.5. Réalisation du test anti-microbien

Des disques stériles de papier buvard, imprégnés de 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 [321, 322].

#### Mode opératoire

- On fait fondre, dans un bain-marie à 95°C, le milieu de culture, ensuite on le verse aseptiquement dans des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre à raison de 10ml/boîte [323]. On laisse solidifier les milieux de culture dans les boîtes de pétri sur la paillasse à température ambiante.

- On prépare une suspension microbienne (inoculum), à partir d'une jeune culture réactivée de 18 heures pour les bactéries et 48 heures pour la levure ou d'une culture âgée de 7 jours pour les champignons. 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, qu'on introduit dans 5 ml d'eau physiologique stérile, 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  $10^8$  germes par ml pour les bactéries, et 0,3 pour les champignons et la levure.

- On prélève à l'aide d'un écouvillon une petite quantité de 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 .



- On imbibe un disque stérile avec 25 µl de la substance à tester, puis à l'aide d'une pince stérile, on le dépose sur la surface de la gélose inoculée au préalable par la suspension microbienne. Des témoins sans extraits ont été réalisés:

- Un contrôle négatif sur Mueller Hinton avec l'alcool solubilisant, et un contrôle positif avec un antibiotique de référence: l'amoxicilline pour les souches bactériennes pathogènes.

- Un contrôle négatif sur les milieux Sabouraud et PDA avec l'alcool solubilisant, et un contrôle positif avec un fongicide: la nystatine pour la levure et les champignons.

- On laisse les disques diffuser sur la paillasse pendant 30min 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 la levure et 4 jours pour les champignons).

- La lecture des résultats se fait par la mesure de la zone d'inhibition (en mm), qui est représentée par une auréole formée autour du disque où aucune croissance n'est observée.

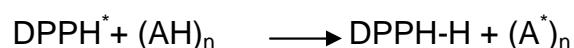
### 2.3.3.6. Evaluation de l'activité anti-oxydante des huiles essentielles et des extraits

#### 2.3.3.6.1. Pouvoir réducteur des radicaux libres par le test DPPH

Le pouvoir anti-oxydant de nos extraits a été évalué par le test DPPH [324].

#### Principe

Le 1,1-diphényl-1,2-picrylhydrazyle ou DPPH est un radical stable, il présente une absorption spécifique à 517 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 [325]. On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation :



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

#### 2.3.3.6.1.1. Préparation de la solution DPPH

On dissout 4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol, ce réactif doit être fraîchement préparé et maintenu à l'abri de la lumière.

#### 2.3.3.6.1.2. Préparation des échantillons

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

#### Mode opératoire

Dans des tubes à essais, on introduit 50 µl de l'extrait à tester auquel on ajoute 5 ml de réactif DPPH. Après agitation, les tubes sont placés à l'obscurité et incubés pendant 30 min à température ambiante. La lecture de l'absorbance se fait contre un blanc à 517 nm. Nous avons utilisé la quercetine, l'α tocophérol et l'acide ascorbique comme contrôles positifs.

#### 2.3.3.6.1.3. Expression des résultats

L'activité anti-oxydante, qui exprime la capacité de piéger le radical libre, est estimée par le pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans le méthanol. Le pourcentage d'inhibition des radicaux libres est déterminé par la formule de WANG et *al.* [327] :

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

Abs : Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm.

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[327]. Les valeurs moyennes de 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.

#### 2.3.3.6.2. Pouvoir inhibiteur de la peroxydation de l'acide linoléique

L'activité anti-oxydante des huiles essentielles et des extraits est déterminée par la méthode thiocyanate décrite par JAYAPRAKASHA et *al.* [329].

## Principe

L'oxydation de l'acide linoléique engendre des hydro-péroxydes d'acide linoléique, se qui génère plusieurs produits d'oxydation [330]. Ces derniers réagissent avec le chlorure de fer pour former le chlorure ferrique puis le thiocyanate ferrique de couleur rouge-sang dont l'intensité de la coloration est proportionnelle à la formation de radicaux libres.

### 2.3.3.6.2.1. Préparation de l'émulsion d'acide linoléique

On homogénéise 0,28g d'acide linoléique avec 0,28g de Tween 40 et 50 ml de tampon phosphate (0,2 M; pH 7,0). L'émulsion doit être bien homogénéisée. Les huiles essentielles ont été utilisées pures, alors que les concretes ont été dissoutes dans le méthanol à raison de 1mg/ml.

### 2.3.3.6.2. 2. Préparation des suspensions à incuber

On met dans chaque tube à essai 500 µl de l'échantillon à analyser, supplémenté de 2,5 ml de l'émulsion d'acide linoléique et 2,5 ml de tampon phosphate, les tubes sont incubés à température ambiante pendant 168 heures.

## Mode opératoire

On prépare un contrôle négatif de la même façon. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif. La cinétique de l'évolution de la lipo-péroxydation est évaluée chaque 24h pendant une semaine.

### 2.3.3.6.2.3. Evaluation de la cinétique de l'oxydation de l'acide linoléique

Chaque 24h, on prélève dans un tube à essai 0,1 ml de la suspension incubée à laquelle on ajoute 5 ml d'éthanol 75%, 0,1 ml d'ammonium thiocyanate et 0,1 ml de chlorure de fer (20 mM). Les tubes sont incubés à température ambiante pendant 3 min, l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre UV-vis à 500 nm. Le pourcentage d'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique est calculé, après 120h, en utilisant la formule de PIN DER [331]:

$$\% \text{ inhibition} = [ 1 - ( \Delta\text{DO échantillon} / \Delta\text{DO contrôle négatif} ) ] \times 100$$

% inhibition: Pourcentage d'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique

$\Delta\text{DO échantillon}$ : Correspond à la différence de DO de l'échantillon entre  $J_1$  et  $J_5$

$\Delta\text{DO blanc}$ : Correspond à la différence de DO du contrôle négatif entre  $J_1$  et  $J_5$

### 2.3.3.6.3. Pouvoir chélateur du fer

Le pouvoir chélateur des ions  $\text{Fe}^{2+}$  est mesuré selon la méthode rapportée par DECKER et WELCH [332].

#### Principe

Il est basé sur la réduction des ions  $\text{Fe}^{2+}$  en ions  $\text{Fe}^{3+}$ , l'extrait testé fournit les protons  $\text{H}^+$  stabilisateurs s'il exerce un effet anti-oxydant. La férrozine joue le rôle d'un ligand qui raccorde les ions  $\text{Fe}^{2+}$  avec l'extrait anti-oxydant.

#### Mode opératoire

Un millilitre d'extrait à tester (contenant 1mg) est placé dans un tube à essai auquel on ajoute 0,1 ml d'une solution  $\text{FeCl}_2$  (2 mM) et 0,2 ml de férrozine (5 mM). Le mélange est agité vigoureusement, puis maintenu en incubation pendant 10 min. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans ce test.

L'absorbance est mesurée à 562 nm au spectrophotomètre. Les résultats sont exprimés en pourcentage de chélation selon l'équation de GÜLÇİN [333]:

$$\% \text{chélation} = [ ( \text{Abs contrôle négatif} - \text{Abs échantillon} ) / \text{Abs contrôle négatif} ] \times 100$$

Abs : Absorbance à la longueur d'onde de 562 nm.

### 2.3.3.7. Analyse statistique

Tous les essais (24 tubes par essai) ont été répétés trois à six 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 analysés chez les deux espèces obtenues *in situ* et *in vitro*. Les résultats ont été vérifiés par le logiciel SPSS. De même, des corrélations ont été établies entre les différentes variables. Les différences ont été considérées significatives à  $p < 0,05$ .

## CHAPITRE 3 RESULTATS ET DISCUSSION

### 3.1. 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.

#### 3.1.1. Etude morphologique

##### 3.1.1.1. Examen macroscopique des fleurs

###### *Myrtus communis* L.

La fleur est hermaphrodite, actinomorphe, de 2 à 3 cm de diamètre, localisée à l'aisselle de la feuille et portée par un pédoncule grêle de 2 cm de long, qui se termine par deux petites bractées caduques (Figure 3.1).

Le périanthe est formé d'une calice composée de cinq petits sépales verts finement poilus, qui persistent même après la formation du fruit, et une corolle formée par cinq petites pétales rondes de couleur blanchâtre. Ces dernières tombent juste après la pollinisation. Les sépales et les pétales présentent des extrémités arrondies (figure 3.2 et figure 3.3).

L'androcée est dialystemone, il se compose d'une touffe d'étamines insérées sur deux cycles à raison de 200 étamines/fleur en moyenne, dont chacune est formée par un long filet blanc surmonté par une anthère jaune midifixe, présentant deux loges polliniques (figure 3.4). Le gynécée est constitué d'un ovaire infère finement velu à l'extérieur et doté de très petites glandes oléifères (figure 3.5), il est formé par trois carpelles soudées à placentation axiale (figure 3.6), le style se termine par un stigmate légèrement papilleux (figure 3.7).



Figure 3.1: Fleur de *M communis* L.

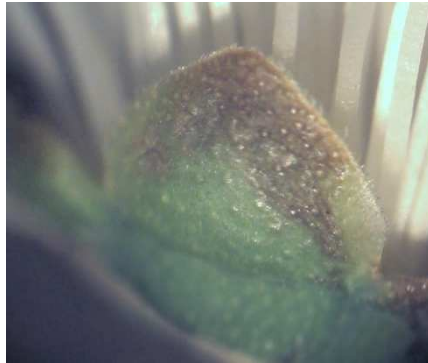


Figure 3.2: Sépale vu de face (G:x4)



Figure 3.3: Pétale vue de face (G:x2,5)



Figure 3.4: Etamine vue de profil (G:x4,5)



Figure 3.5: Face externe de l'ovaire (G:x4)



Figure 3.6: Ovaire en coupe transversale  
(G:x4,5)



Figure 3.7: Style vu de profil (G:x2,5)

Planche N°1: Morphologie de la fleur de *M communis* L.

La floraison débute à partir du mois de Juin et s'étale jusqu'à la fin du mois d'Août. Cependant, il semble que les variations climatiques influent considérablement sur la période de floraison, BIANCHINI et CORBETTA [165] rapportent qu'elle s'étale du mois d'Avril jusqu'à Juin.

*Myrtus nivellei* Batt et Trab.

La fleur est hermaphrodite, insérée à l'aisselle de la feuille, actinomorphe ne dépassant pas 2 cm de diamètre, elle est portée par un fin pédoncule de 1,5 à 2 cm de long (figure 3.8).

Le périanthe est composé d'une calice à cinq petits sépales poilus de couleur verte contenant de minuscules glandes, et une corolle à cinq petites pétales blanchâtres rondes (figure 3.9 et figure 3.10).

L'androcée est dialystemone, il est constitué par une touffe d'étamines à raison de 180 étamines/fleur en moyenne. Chaque étamine est formée par un long filet blanc et une anthère jaune midifixe (figure 3.11).

Pour ce qui est du gynécée, nous avons noté qu'il est constitué par un ovaire infère à paroi finement velue et présentant de minuscules glandes (figure 3.12). Il est gamocarpellé (3 carpelles soudées), contenant un grand nombre d'ovules à placentation axiale (figure 3.13 et figure 3.14). Le style est légèrement poilu (figure 3.15).

La période de floraison de cette espèce saharienne commence à partir du mois de Mars et s'étale jusqu'à la fin du mois de Juin, si les conditions climatiques sont favorables.



Figure 3.8 : Fleur de *M nivellei* Batt et Trab.



Figure 3.9: Sépale vu de face (G:x4,5)



Figure 3.10 : Pétale vue de face (G:x2,5)



Figure 3.11 : Etamine vue de profil (G:x4,5)



Figure 3.12: Face externe de l'ovaire  
(G:x4,5)



Figure 3.13: Ovaire en coupe transversale  
(G:x4)



Figure 3.14: Ovaire en coupe longitudinale  
(G:x4)

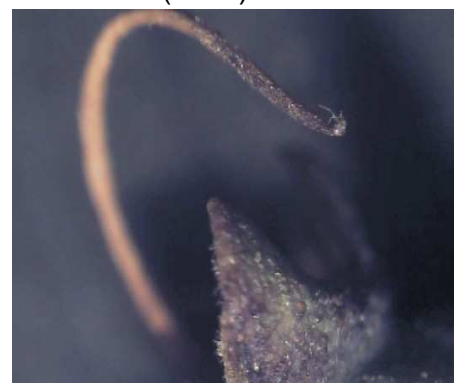


Figure 3.15: Style vu de profil  
(G:x4)

Planche N°2: Morphologie de la fleur de *M nivellei* Batt et Trab.



### 3.1.1.2. Examen macroscopique des feuilles

#### *Myrtus communis* L.

Les feuilles sont très aromatiques, d'un vert brillant persistant, opposées décussées (figure 3.16). chaque feuille est caractérisée par un limbe entier à contour lisse, avec une forme ovale lancéolée, de 15 à 45 mm de long sur 10 à 30 mm de large, et présentant une nervation pennée. Les feuilles se raccordent avec l'axe principale de la plante par un pétiole rougeâtre très court de 1mm, le stipule est absent (figures 3.17).

A l'éclatement des bourgeons, les jeunes feuilles sont très tendres, poilues avec une teinte pourpre, qui persiste durant le premier mois de croissance (figure 3.18). 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 (figure 3.19). Des petites glandes oléifères sont visibles sous loupe sur ses deux faces.

Les feuilles du myrte poussant dans les endroits très ensoleillés présentent une taille plus petite que celles poussant dans les régions 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 nécessaire à la photosynthèse.

#### *Myrtus nivellei* Batt et Trab.

Le feuillage est d'un vert sombre persistant et luisant, opposé décussé (figure 3.20) 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. Le limbe peut être qualifié de sub-sessile, parcequ'il est raccordé à la tige par un pétiole très court rougeâtre et poilu ne dépassant pas 1mm, le stipule est absent (figure 3.21).

A l'éclatement des bourgeons, les jeunes feuilles sont tendres et très poilues, présentant une pigmentation rouge foncée, qui vire au pourpre (figure 3.22). 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 (figure 3.23). Les deux faces renferment un nombre important de petites glandes oléifères visibles sous loupe.



Figure 3.16: Disposition des feuilles sur la tige de *M communis* L.



Figure 3.20: Disposition des feuilles sur la tige de *M nivellei* Batt et Trab.

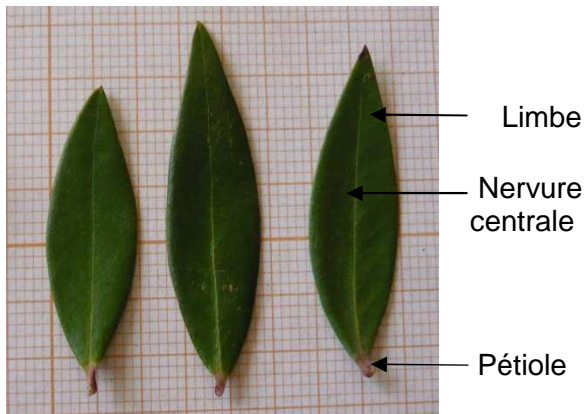


Figure 3.17: Feuilles de *M communis* L.

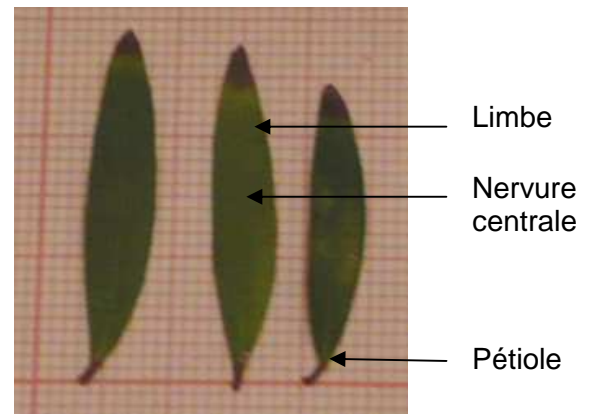


Figure 3.21: Feuilles de *M nivellei* Batt et Trab

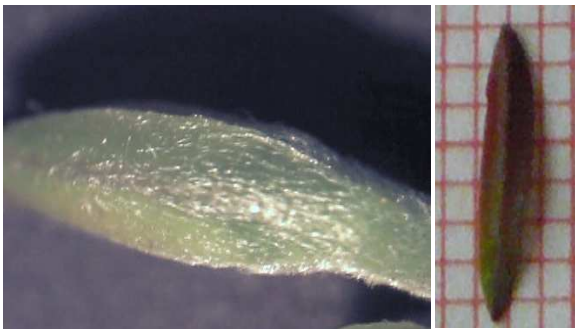


Figure 3.18: Jeune feuille poilue (G:x4)

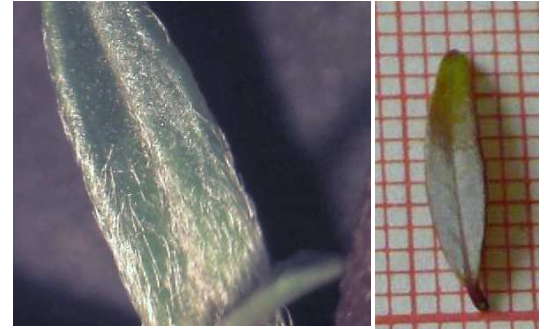


Figure 3.22: Jeune feuille poilue (G:x4)



Figure 3.19: Face supérieure de la feuille montrant des poils tecteurs et des glandes oléifères (G:x4)



Figure 3.23: Face supérieure de la feuille montrant les glandes oléifères et l'extrémité pointue pigmentée du limbe (G:x2)

Planche N°3: Morphologie des feuilles de *M communis* L. (à gauche) et *M nivellei* Batt et Trab. (à droite)

### 3.1.1.3. Examen macroscopique des tiges et de l'écorce

Pour les deux espèces étudiées, l'axe aérien se ramifie dès la base du collet, les tiges qui en divergent sont très ramifiées, rugueuses à écorce rougeâtre et entièrement ligneuses (figure 3.24 et figure 3.25).

La présence des poils est notable au stade juvénile (figure 3.26 et figure 3.27), ils disparaissent graduellement avec la croissance. Les tiges des jeunes pousses sont tendres herbacées et fortement pigmentées.

Pour l'espèce *M communis* L., la taille de la partie aérienne peut facilement atteindre 2 m de long avec un diamètre qui peut aller jusqu'à 50 cm pour les vieux rameaux.

L'espèce *M nivellei* Batt et Trab. est caractérisée par une partie aérienne qui ne dépasse pas 1,2m de long avec un diamètre moins important des tiges ligneuses.

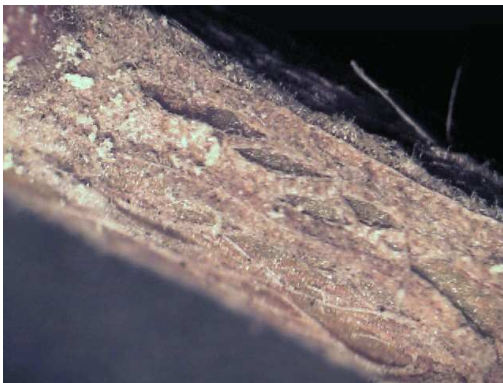


Figure 3.24: Rameau ligneux de *M communis* L. (G:x 2)



Figure 3.25: Rameau ligneux de *M nivellei* Batt et Trab. (G:x 2)



Figure 3.26: Tige herbacée et poilue de *M communis* L. (G:x 4)



Figure 3.27: Tige herbacée et poilue de *M nivellei* Batt et Trab. (G:x 4)

Planche N°4: Morphologie des tiges de *M communis* L. (à gauche) et *M nivellei* Batt et Trab. (à droite)

#### 3.1.1.4. Examen macroscopique des fruits et des graines

Les fruits des deux espèces étudiées sont des baies 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 (figure 3.28 et figure 3.32). A maturité, elles deviennent très sucrées et acquièrent une couleur bleue noirâtre, ces baies sont très appréciées par les oiseaux et les insectes.

Les graines sont réniformes, de couleur jaune avec un tégument externe lisse et très dur et un élaïosome central brun.

##### *M communis* L.

Chez *M communis* L., les baies présentent en moyenne une dimension qui est de 7-10 x 6-8 mm (figure 3.29 et figure 3.30). Elles sont portées par un pédoncule légèrement poilu, pouvant atteindre 2 cm de long. Le nombre moyen des graines est de  $9,05 \pm 0,66$  graines/baies, ces graines mesurent en moyenne 4 x 2 mm (figure 3.31).

##### *M nivellei* Batt et Trab.

Les baies de *M nivellei* Batt et Trab. ont une dimension plus petite de l'ordre de 4-6 x 5-8 mm, leur couleur est plus sombre, elles sont portées par un pédoncule long et légèrement poilu (figure 3.33 et figure 3.34). Le nombre moyen des graines est de  $8,34 \pm 1,2$  graines/baie, la taille moyenne de la graine avoisine 3 x 2 mm (figure 3.35)

TRAVESET et al. [334] rapportent que le fruit de *M communis* L. présente les dimensions suivantes: 11,3 x 10,21 mm et renferme en moyenne 12 graines. Cependant, les travaux de ARONNE et ROSSU [203] ont rapporté qu'il renferme 3 à 3,5 graines/baie.

Il y a une corrélation linéaire significative entre la taille géométrique des baies et le nombre de graines de *M communis* L. ( $r^2 = 0,991$ ,  $p < 0,05$ ) et *M nivellei* Batt et Trab. ( $r^2 = 0,949$ ,  $p < 0,05$ ). Cette même déduction est confirmée par TRAVESET et al. [334].





Figure 3.28: Disposition des baies sur le rameau de *M communis* L.



Figure 3.32: Disposition des baies sur le rameau de *M nivellei* Batt et Trab.

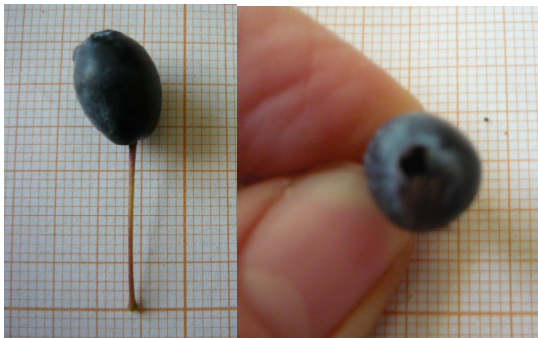


Figure 3.29 : Taille et diamètre de la baie de *M communis* L.

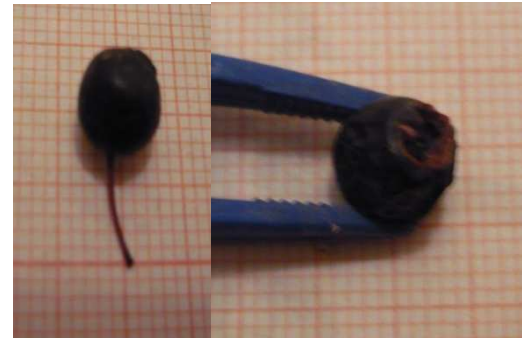


Figure 3.33: Taille et diamètre de la baie de *M nivellei* Batt et Trab.

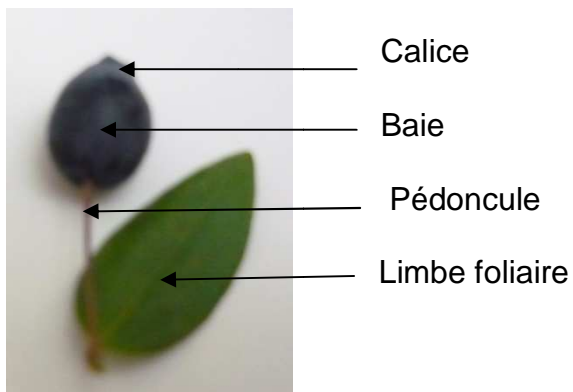


Figure 3.30: Fruit de *M communis* vu de profil

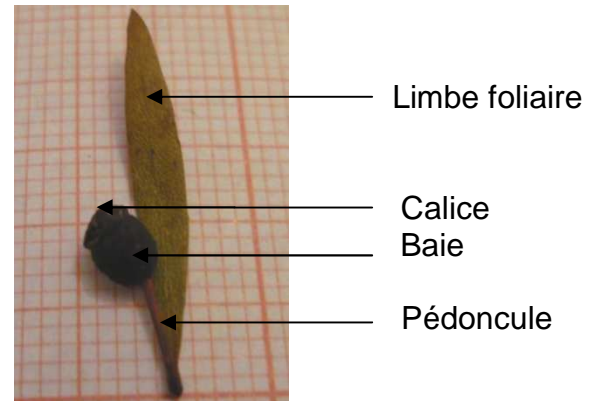


Figure 3.34: Fruit de *M nivellei* vu de profil

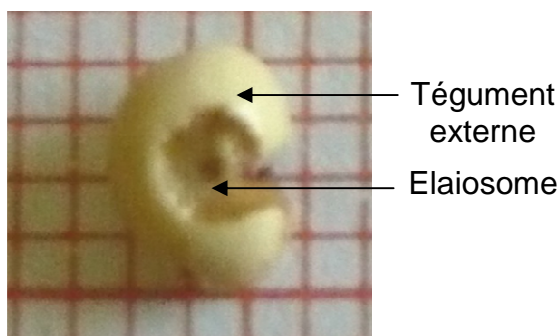


Figure 3.31: Taille de la graine de *M communis* L. (G:x4)

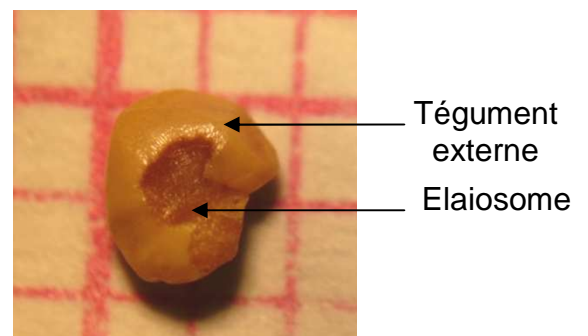


Figure 3.35: Taille de la graine de *M nivellei* Batt et Trab. (G:x6)

Planche N°5: Morphologie des fruits et des graines de *M communis* L. (à gauche) et *M nivellei* Batt et Trab. (à droite)

### 3.1.2. Etude histo-anatomique

#### 3.1.2.1. Examen microscopique des tiges

L'organisation anatomique en coupe transversale 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

On observe à l'extérieur le liège (suber) constitué par des cellules rectangulaires à parois subérifiées, disposées en file radiales formant la couche externe rugueuse qui couvre la tige (figure 3.36, figure 3.38, figure 3.44 et figure 3.46). Ce tissu d'origine secondaire prend naissance à partir de l'assise génératrice subero-phéllodermique, cependant le phelloderme n'est pas perçu.

Le liber chez le genre *Myrtus* présente la particularité d'être situé au dessus et au dessous du bois, dont on observe clairement les cellules (à parois péctocellulosiques) et les rayons libériens intensément riches en macles d'oxalates de calcium (figure 3.39 et figure 3.47). Le liber dirigé vers l'extérieur s'organise en un anneau continu.

L'oxalate de calcium est la forme insoluble de l'acide oxalique, ayant un rôle répulsif pour les insectes et les herbivores [157]. La densité de ces 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 constitué par:

- Des vaisseaux représentés par de grandes cellules à lumière importante avec des diamètres variables (figure 3.40 et figure 3.48), 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 lumière réduite.

Le liber situé sous le bois en contact étroit avec la moelle, est formé par de petites cellules regroupées en quatre amas ou arcs. La partie centrale de cet organe est constituée par un parenchyme médullaire formé par de larges cellules

à parois pectocellulosiques, riches en cristaux d'oxalates de calcium, séparées par de larges lacunes donnant l'apparence d'un tissu spongieux chez l'espèce *M communis* L. (figure 3.43). Cependant, l'espèce *M nivellei* Batt et Trab. est caractérisée par un parenchyme médullaire, formé par des cellules larges, à parois fines pectocellulosiques, dont certaines sont pourvues de macles ou de petites vésicules tanifères (figure 3.51).

- Tige herbacée

Les tiges herbacées présentent une structure quadrangulaire en section transversale qui a tendance à disparaître dès l'installation du suber (figure 3.37 et figure 3.45). L'épiderme est représenté par une seule assise de cellules épidermiques à parois pectocellulosiques. 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 3.41 et figure 3.49).

Le parenchyme cortical est localisé juste sous l'épiderme, il est formé par 5 à 6 assises de petites cellules arrondies à parois pectocellulosiques laissant entre elles des méats. Ce tissu est riche en cristaux d'oxalates de calcium. Les cavités sécrétrices endogènes appelées également poches sécrétrices (PS) sont clairement visibles en coupe transversale (figure 3.42 et figure 3.50). Elles sont enfoncées dans le parenchyme cortical et étroitement accolées à l'épiderme par deux petites cellules appelées "cellules chapeau" d'après CICARELLI et *al.* [176].

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 pectocellulosiques riches en macles et de larges lacunes inter-cellulaires. Cet aspect persiste chez l'espèce *M communis* L. (figure 3.43), alors qu'il change pour *M nivellei* Batt et Trab

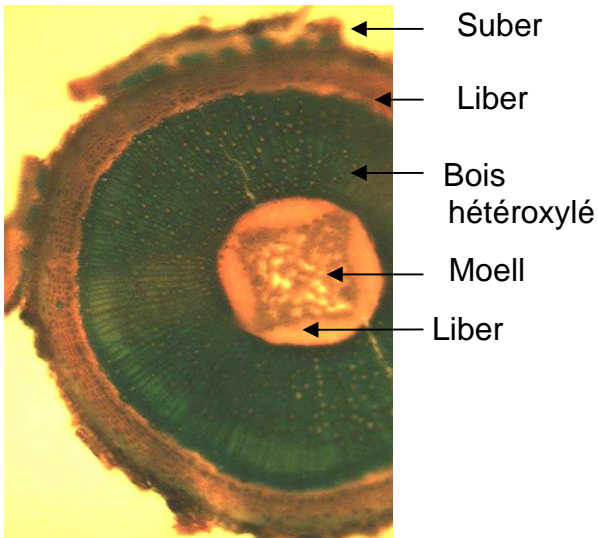


Figure 3.36: Coupe transversale d'une tige ligneuse de *M communis* L. (G: x 10)

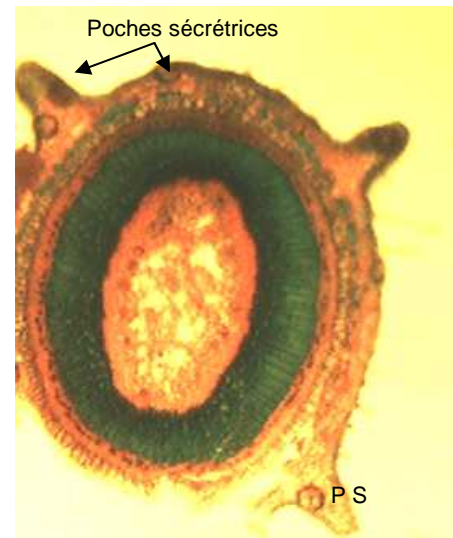


Figure 3.37 : Coupe transversale d'une jeune tige (G: x 10)

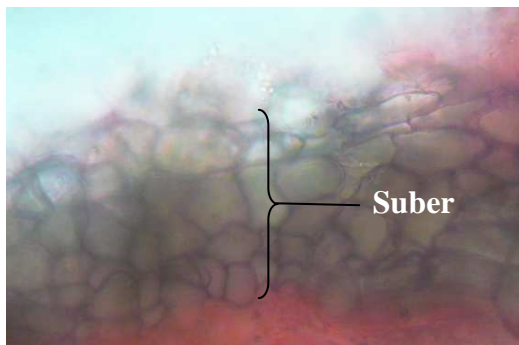


Figure 3.38: le suber d'une tige ligneuse (G: x 40)

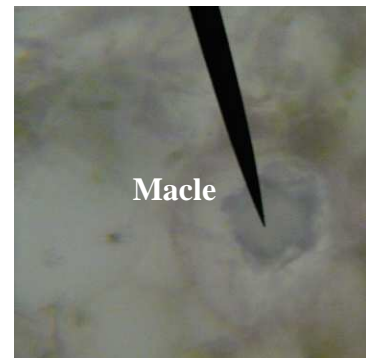


Figure 3.39 : Macle d'oxalate de calcium (G: x 100)

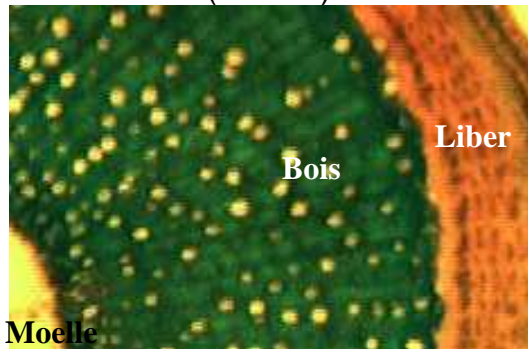


Figure 3.40 : Bois hétéroxylé (G: x 40)

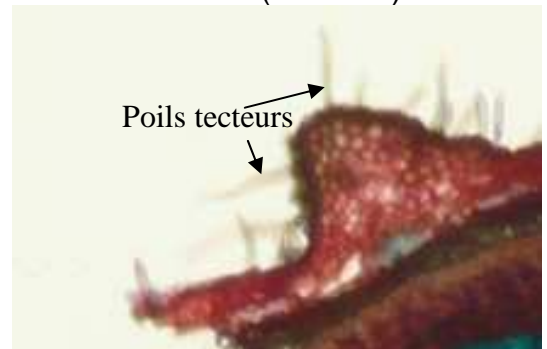


Figure 3.41: Poils tecteurs (G: x 40)

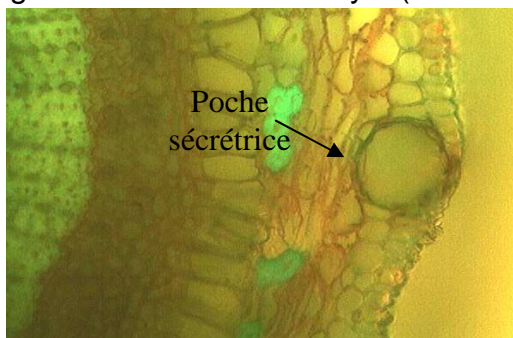


Figure 3.42: Poche sécrétrice (G: x 40)

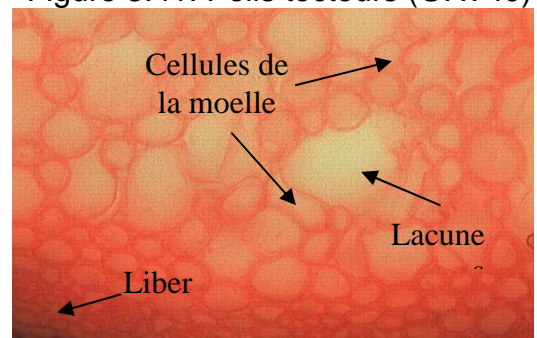


Figure 3.43: Parenchyme médullaire (G: x 40)



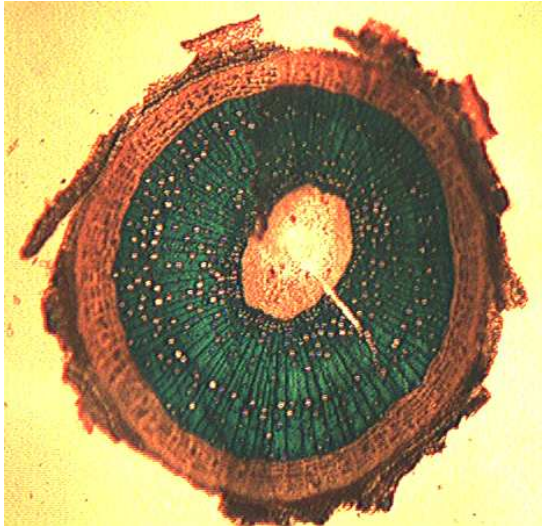


Figure 3.44 : Coupe transversale d'une tige ligneuse de *M nivellei* Batt et Trab. (G: x 10)

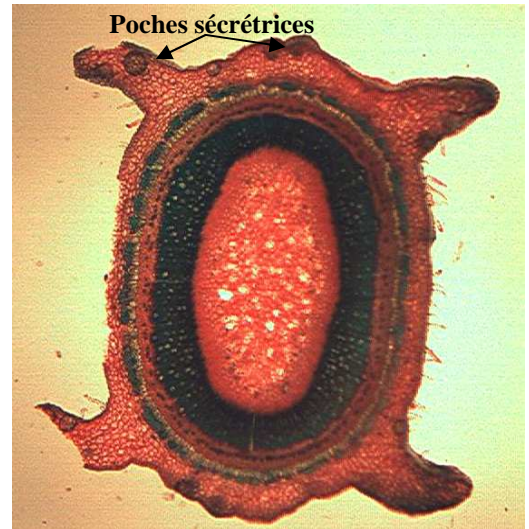


Figure 3.45: Coupe transversale d'une jeune tige (G: x 10)

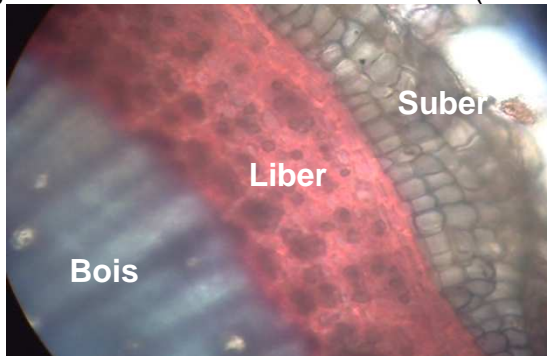


Figure 3.46: Le suber d'une tige ligneuse (G: x 40)



Figure 3.47 : Macle d'oxalate de calcium (G: x 40)

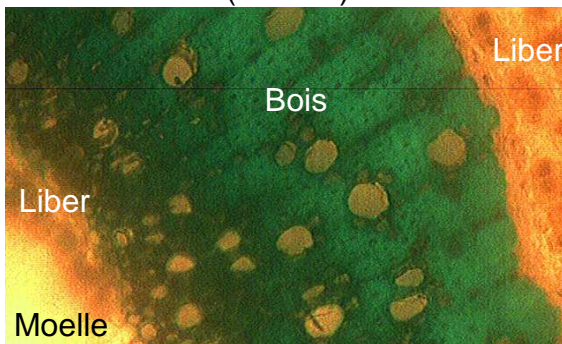


Figure 3.48: Bois hétéroxylé (G: x 40)

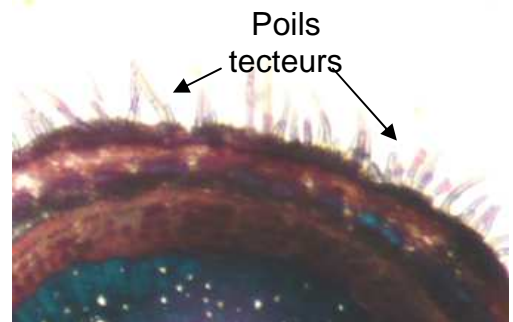


Figure 3.49: Poils tecteurs (G: x 40)

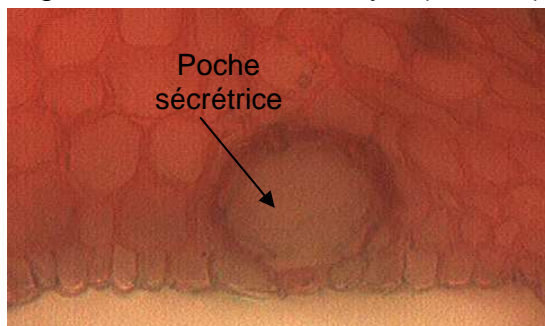


Figure 3.50 : Poche sécrétrice (G: x 40)

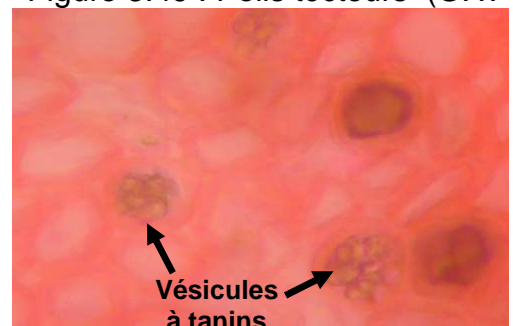


Figure 3.51: Parenchyme médullaire (G: x 40)

### 3.1.2.2. Examen microscopique des feuilles

Chez les deux espèces, l'épiderme foliaire est constitué par une seule assise de cellules épidermiques, il est suivi d'un parenchyme chlorophyllien palissadique représenté par 1 à 2 assises de cellules allongées.

Plus profondément, se situ le parenchyme chlorophyllien lacuneux, qui est parcouru par les nervures secondaires (figure 3.52 et figure 3.56). Du côté de la face supérieure de la feuille, on note la présence d'un amas de cellules du collenchyme annulaire, situé au dessus de la nervure principale. Les fibres de sclerenchyme organisées en amas delimitent les tissus conducteurs secondaires (figure 3.53 et figure 3.57)

On note également la présence des macles (cristaux d'oxalate de calcium) dans les parenchymes (lacuneux et palissadique) situés juste au dessous de l'assise épidermique.

Le limbe foliaire présente une symétrie bilatérale clairement perceptible en section transversale (figure 3.54 et figure 3.58), avec une pigmentation violacée naturelle à l'état juvénile, qui a tendance à disparaître au fil du temps (figure 3.55, figure 3.59).

- La fonction sécrétoire

Cette fonction est inégalement répartie suivant les organes: elle est nulle dans les parties souterraines, et faible dans les tiges âgées. L'activité principale s'exerce dans un ordre décroissant des feuilles, aux tiges, aux sépales puis aux pétales. Les structures sécrétrices sont inégalement distribuées sur tous les organes aériens et sont localisées à proximité de l'épiderme chez ces deux espèces. Il s'agit de glandes sécrétrices sous forme de cavités sub-épidermiques sphériques ou oblongues, délimitées par deux rangées de cellules, la rangée la plus interne est formée par des cellules aplaties à paroi très fine, ces cellules sécrétrices dégénèrent à maturité, la deuxième rangée est formée par des cellules parenchymateuses à parois épaisses.

Chez *M communis* L., les cavités sécrétrices des fleurs sont formées à partir des cellules épidermiques [335, 336, 176], l'ontogénie de ces cavités montre qu'elles suivent un développement schyzolysogène, ce terme a été introduit pour la première fois par TSCHIRCH [176].

On suppose que quelques cellules du parenchyme corticale sont à l'origine des cavités sécrétrices présentes dans les tiges et les feuilles: ces cavités sont initialement schizogènes mais deviennent plus tard lysogènes à maturité, suite à la destruction des cellules sécrétrices, ce qui provoque un élargissement du lumen glandulaire (figure 3.60, figure 3.61 et figure 3.62). Le sommet de la poche (ou cavité) est délimité par 2 à 4 cellules appelées cap cells ou cellules chapeau [176].

LUCKOW et GRIMES [337] ont proposé quatre hypothèses démontrant le rôle de ces 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.

Ces poches glandulaires sont localisées à l'intérieur du mésophyle, à proximité étroite avec la surface. Ces structures sont abondantes au niveau de la tige et des feuilles, où elles sont enfoncées dans le parenchyme, donnant l'aspect d'un tissu spongieux. Ces poches persistent uniquement au niveau des feuilles et ont tendance à disparaître progressivement dans les organes qui vont se lignifier (figure 3.63).



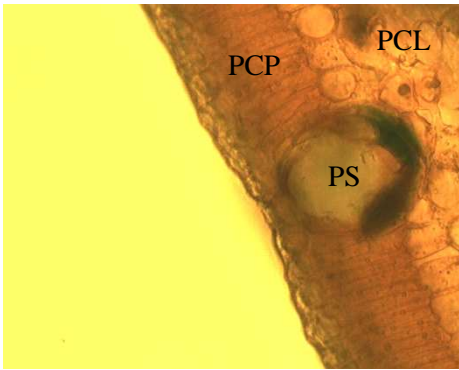


Figure 3.52: Poche sécrétrice dans une feuille de *M communis* L. (G: x 40)

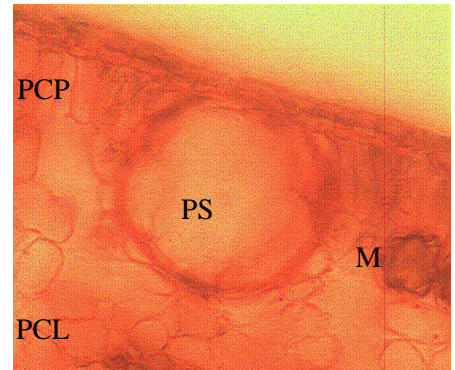


Figure 3.56 : Poche sécrétrice dans une feuille de *M nivellei* Batt et Trab. (G: x 40)

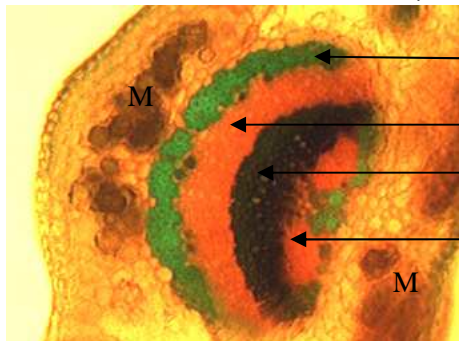


Figure 3.53 : Coupe transversale dans la nervure centrale d'une feuille de *M communis* L. (G: x 40)

Fibre de sclérenchyme  
Liber  
Bois  
Liber

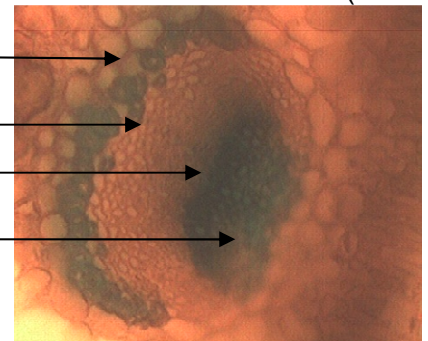


Figure 3.57: Coupe transversale dans la nervure centrale d'une feuille de *M nivellei* Batt et Trab.(G: x 40)

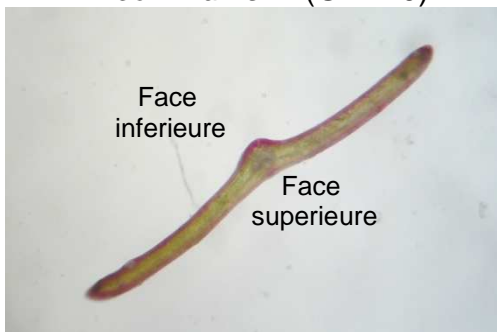


Figure 3.54: Coupe transversale dans une jeune feuille de *M communis* L.(G:x4)

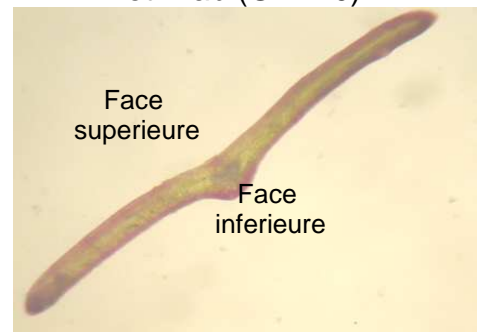


Figure 3.58: Coupe transversale dans une jeune feuille de *M nivellei* Batt et Trab. (G: x 40)

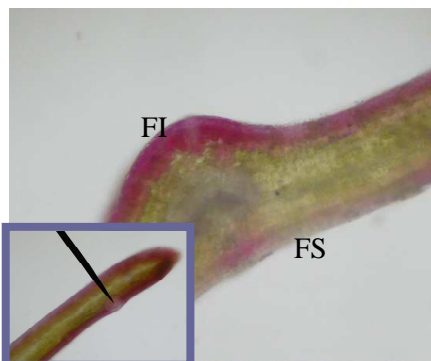


Figure 3.55: Pigmentation naturelle de la feuille à l'état vital (G: x 10)

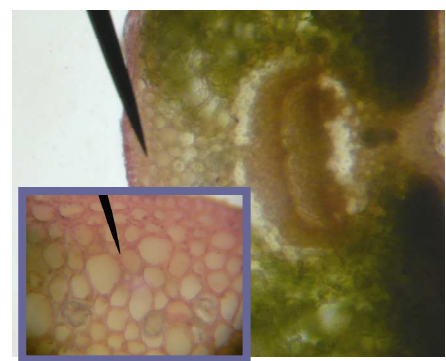


Figure 3.59: Pigmentation naturelle de la feuille à l'état vital (G: x 10)

**PCL**: parenchyme chlorophyllien lacuneux  
**PCP**: parenchyme chlorophyllien palissadique  
**PS** : poche sécrétrice

**FS**: face supérieure  
**FI** : face inferieure  
**M** : macles

Planche N°8: Anatomie des feuilles de *M communis* L. (à gauche) et *M nivellei* Batt et Trab. (à droite)

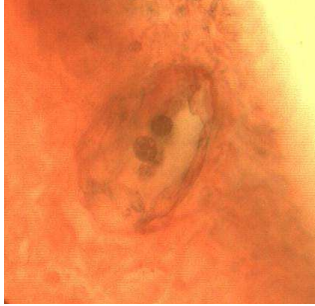


Figure 3.60: Début de formation de la cavité résultant de la séparation des cellules sécrétrices (G: x 40)



Figure 3.61: Elargissement graduel du lumen avec lyse des cellules séparant la cavité de l'épiderme (G: x 40)

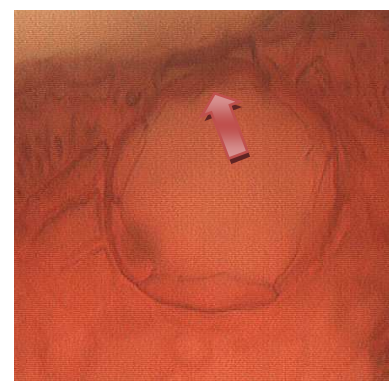
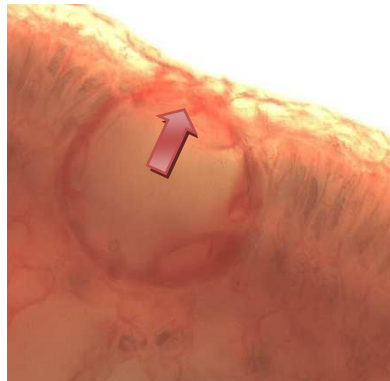
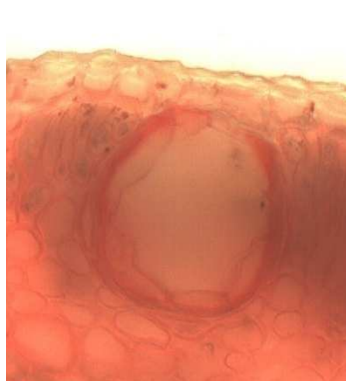
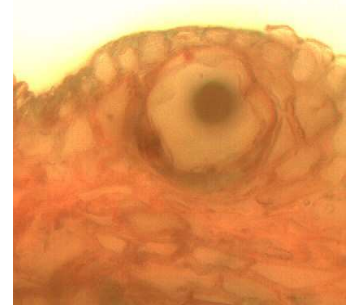


Figure 3.62 : Elargissement apparent du lumen délimité par une couche de cellules sécrétrices et une rangée de cellules parenchymateuses. Le point de fusion (en flèche) de la cavité avec l'épiderme est marqué par deux petites cellules "cap cells" (G: x 40)

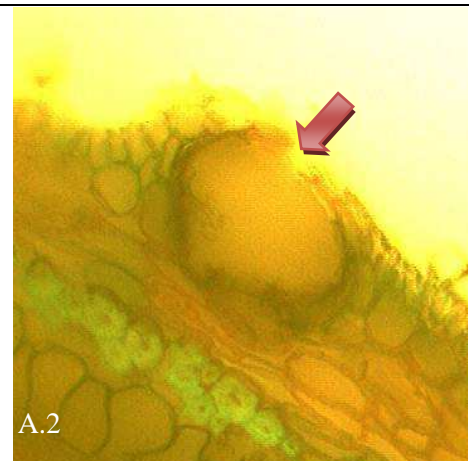
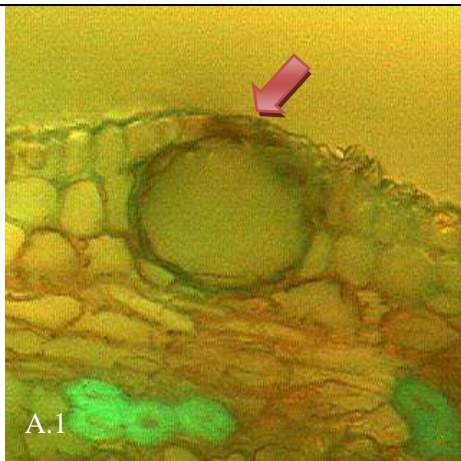


Figure 3.63: Dégénérescence des poches sécrétrices (G: x 40).

A.1: Dégénérescence de la rangée de cellules sécrétrices au niveau de la cavité sécrétrice mature.

A.2: Début de dégénérescence de la cavité sécrétrice associé à un début de lignification de l'organe.

Planche N°9: Les différents stades de développement des poches sécrétrices.

### 3.2. Résultats des essais *in vitro*

#### 3.2.1. Résultats de la désinfection des micro-boutures récoltées en *in situ*

Chez l'espèce *M communis* L., nous avons constaté que l'utilisation de l'hypochlorite de calcium à une concentration de 8%, a donné le plus faible taux de contamination pour les micro-boutures herbacées, puisque le pourcentage de contamination (cryptogamiques essentiellement) 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 3.64)

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 mais également les plus sensibles aux traitements prolongés.

Pour l'espèce *M nivellei* Batt et Trab., les rameaux prélevés étaient tous lignifiés et les essais de désinfection des micro-boutures ont tous échoués.

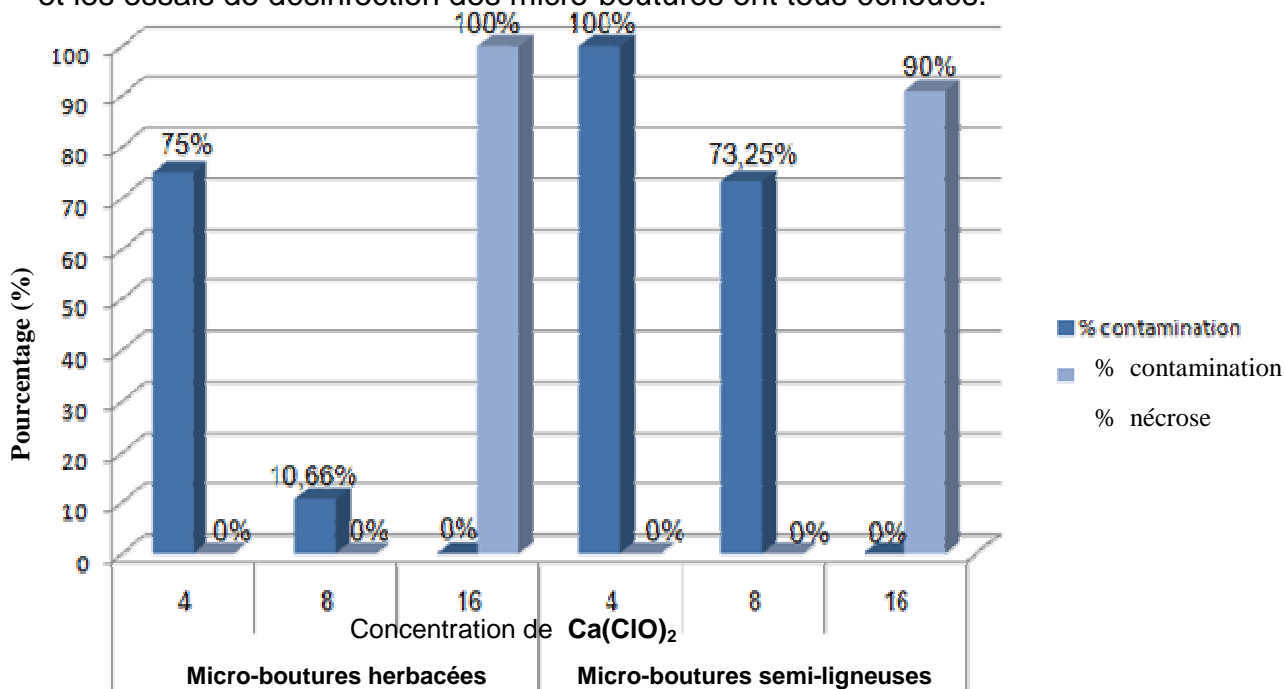


Figure 3.64 : Effet de **Ca(ClO)<sub>2</sub>** sur le taux de contaminations des micro-boutures de *M communis* L.



ZRYD [112] rapporte que chez beaucoup d'espèces ligneuses, les tissus peuvent renfermer certains agents infectieux à localisation endogène, et qui ne sont pas éliminés par les méthodes de désinfection classique. C'est ainsi que certains contaminants peuvent se manifester ultérieurement.

Selon SEZNEC [339], 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 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 [340]. Cependant, BOUDERRAH [338] suggère que les produits stérilisants utilisés doivent avoir un double effet: éviter les infections dûes à la propagation des bactéries et des champignons d'une part, et éviter le traumatisme des tissus pouvant conduire à la nécrose et la mort cellulaire d'autre part.

Les micro-boutures sont mises en culture sur 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 10<sup>ème</sup> semaine, les micro-boutures se nécrosent (figure 3.65)

Les nécroses observées sont marquées par un noircissement total ou partiel de la micro-bouture. Des observation similaires sur le comportement des ligneux vis-à-vis du milieu MS ont été rapportées par de nombreux travaux [341, 339]. Ces derniers suggèrent que la concentration importante en éléments minéraux et en particulier les ions ammonium  $\text{NH}_4^+$  devient toxique et serait responsable du dépérissement des micro-boutures.

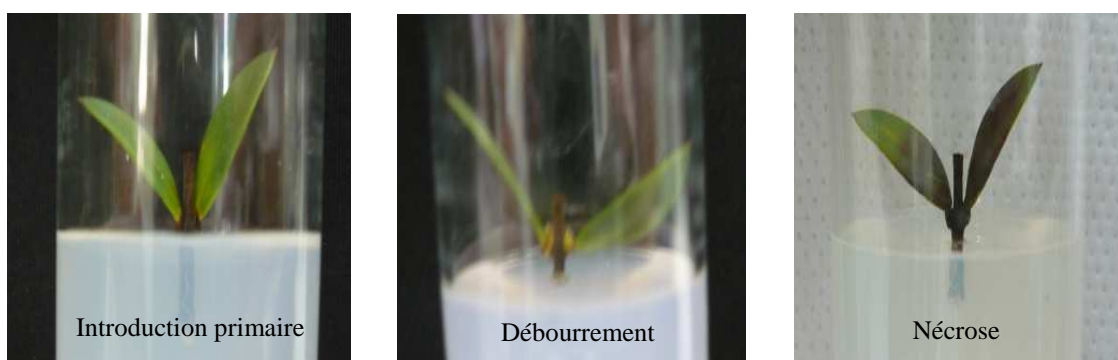


Figure 3.65: Différents stades d'évolution des micro-boutures de *M communis* L.

### 3.2.2. Résultats de la désinfection des graines

Deux désinfectants ont été utilisés avec une variation des concentrations en hypochlorite de calcium  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  et en hypochlorite de sodium  $\text{Na}(\text{ClO})_2$ , en testant plusieurs combinaisons de temps de trempage et de concentrations des désinfectants.

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* L., et ne dépasse pas 16% pour *M nivellei* Batt et Trab (tableau 3.1). 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 [121].

Tableau 3.1: Effet de  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  et  $\text{Na}(\text{ClO})_2$  sur le taux de contamination des graines de *M communis* L.(MC) et *M nivellei* Batt et Trab.(MN).

	Concentrations	Temps de trempage	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.* [3] 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.

### 3.2.3. Résultats de la multiplication par graines sur boîtes de pétri

#### 3.2.3.1. 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* L. et au-delà de la 4<sup>ème</sup> semaine pour *M nivellei* Batt et Trab. Le taux de germination du départ a été de 10% pour *M communis* L. et 8% pour *M nivellei* Batt et Trab (figure 3.66).

La cinétique de l'évolution du pourcentage de germination a été suivie sur une durée de 100 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> jours, où il avoisine un seuil stable estimé à 46% pour *M communis* L. et ne dépasse pas 39% pour l'espèce *M nivellei* Batt et Trab (figure 3.66).

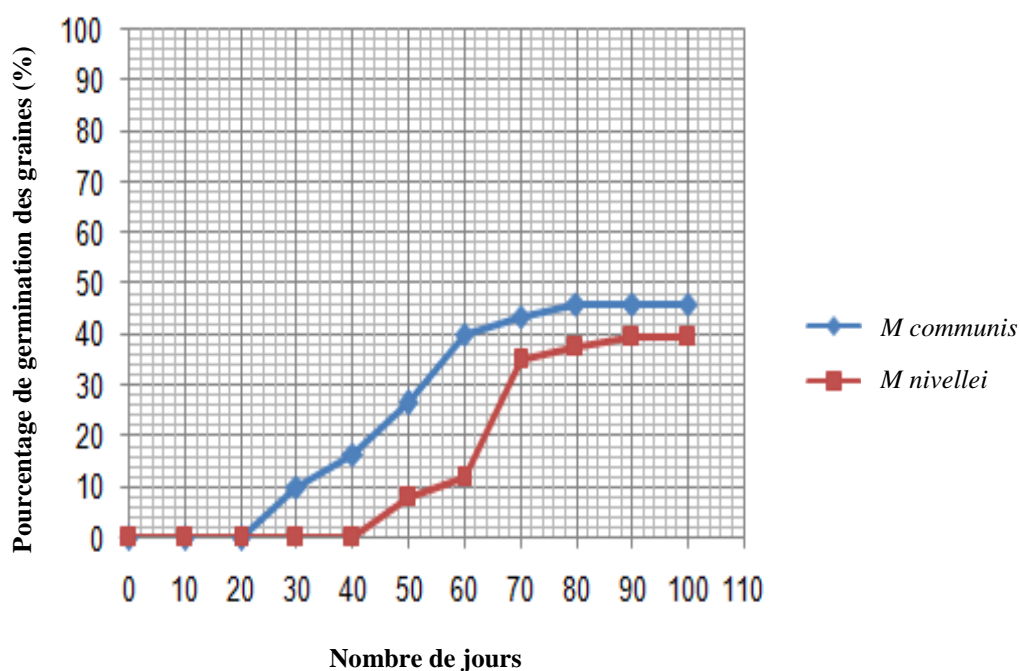


Figure 3.66: Evaluation de la cinétique de germination des graines entières de *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab. sur boîtes de pétri.

### 3.2.3.2. 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* L., la germination des graines scarifiées débute après le 2<sup>ème</sup> jour, avec un taux de germination de 75%, il évolue ensuite jusqu'à 100% après un mois.

Des résultats similaires ont été obtenus pour l'espèce *M nivellei* Batt et Trab., chez laquelle la germination débute à partir du 2<sup>ème</sup> jour avec un taux de germination de 86% pour les graines scarifiées pour atteindre après 70 jours un seuil maximal de 98% (figure 3.67). D'après ces essais, on constate que les graines scarifiées ont germé dix fois plus que les témoins en boîtes de pétri.

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, et induit une dormance de type tégumentaire. Celle-ci peut être rompue par simple scarification mécanique sans risque pour la viabilité 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 [342], HARTMANN et *al.* [343] ainsi que les travaux de BANI AMEUR et ALOUANI [344].

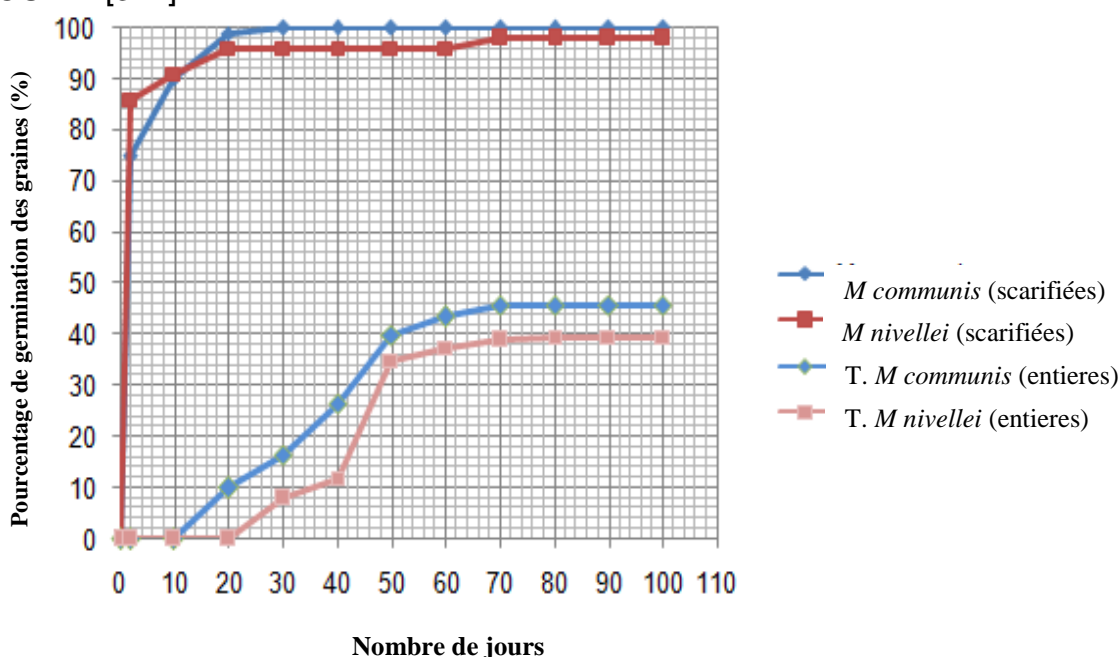


Figure 3.67: Evaluation de la cinétique de germination des graines de *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab. pré-traitées par scarification.

### 3.2.4. Résultats des essais de multiplication *in vitro*

#### 3.2.4.1. 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 *M communis* L. par rapport à l'espèce *M nivellei* Batt et Trab (figure 3.68 et figure 3.69). Après huit semaines de développement, leur appareil végétatif est constitué par deux feuilles cotylédonaire, un hypocotyle et une petite racine.

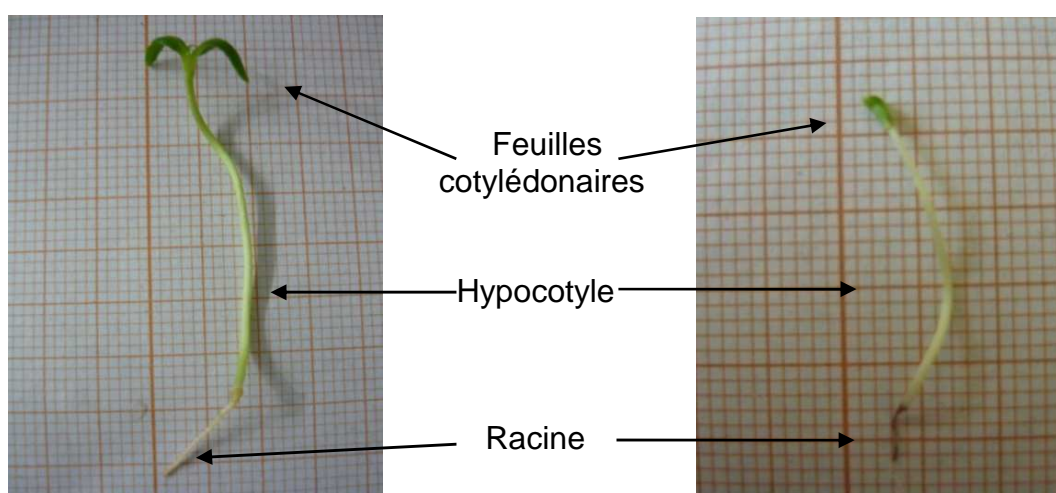


Figure 3.68: Vitro-semis de *M communis* L. âgé de 8 semaines.

Figure 3.69: Vitro-semis de *M nivellei* Batt et Trab. âgé de 8 semaines.

##### 3.2.4.1.1. Elongation de l'hypocotyle

La cinétique de croissance du semis sur un milieu MS dépourvu d'hormones chez les deux espèces, montre durant les dix premiers jours un début de germination marqué par l'apparition d'une fine racine blanchâtre.

L'hypocotyle suit une évolution exponentielle pour l'espèce *M communis* L. 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 3.70).

Quant à l'axe aérien de l'espèce *M nivellei* Batt et Trab., 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 3.70).

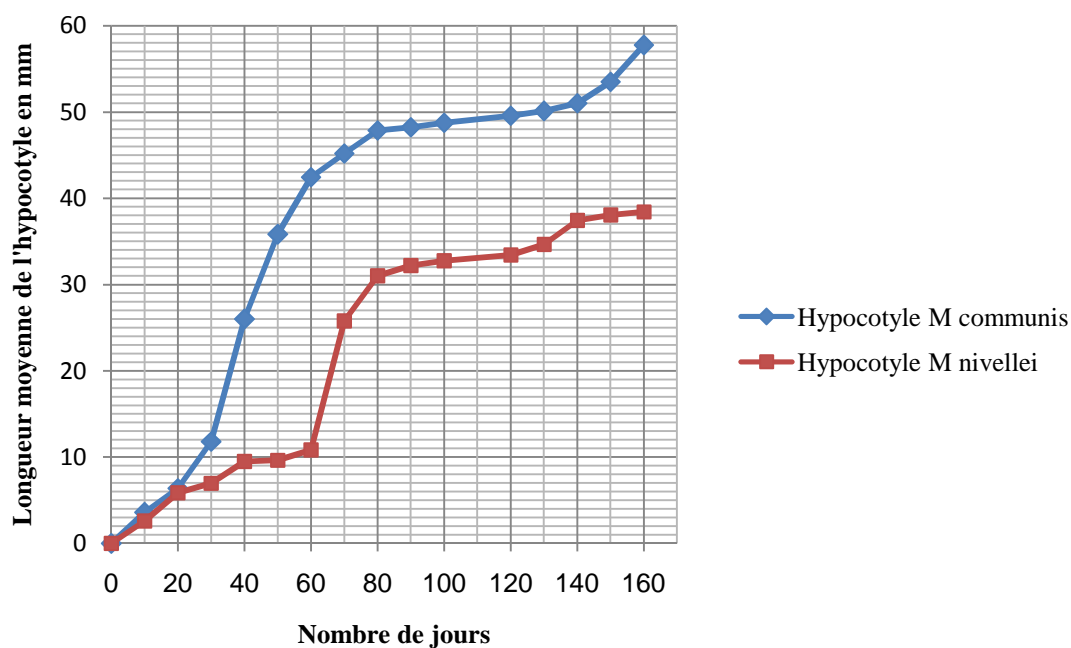


Figure 3.70: Evaluation de la cinétique d'allongement des hypocotyles chez les vitro-semis de *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab.

#### 3.2.4.1.2. 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* L., 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* L. 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 3.71).

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 (figure 3.71).

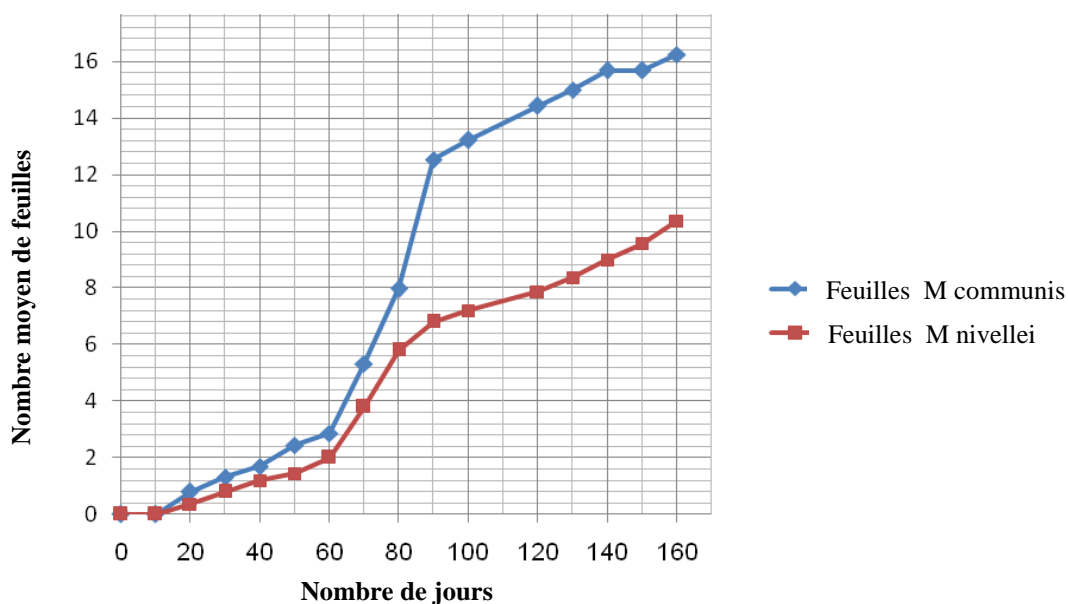


Figure 3.71: Evaluation de la cinétique d'apparition des feuilles chez les vitro-semis de *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab.

#### 3.2.4.1.3. Développement de la racine

L'évolution de la croissance racinaire a été lente durant les trois premières semaines, suivit 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* L. et 14,14 mm pour l'espèce *M nivellei* Batt et Trab (figure 3.72).

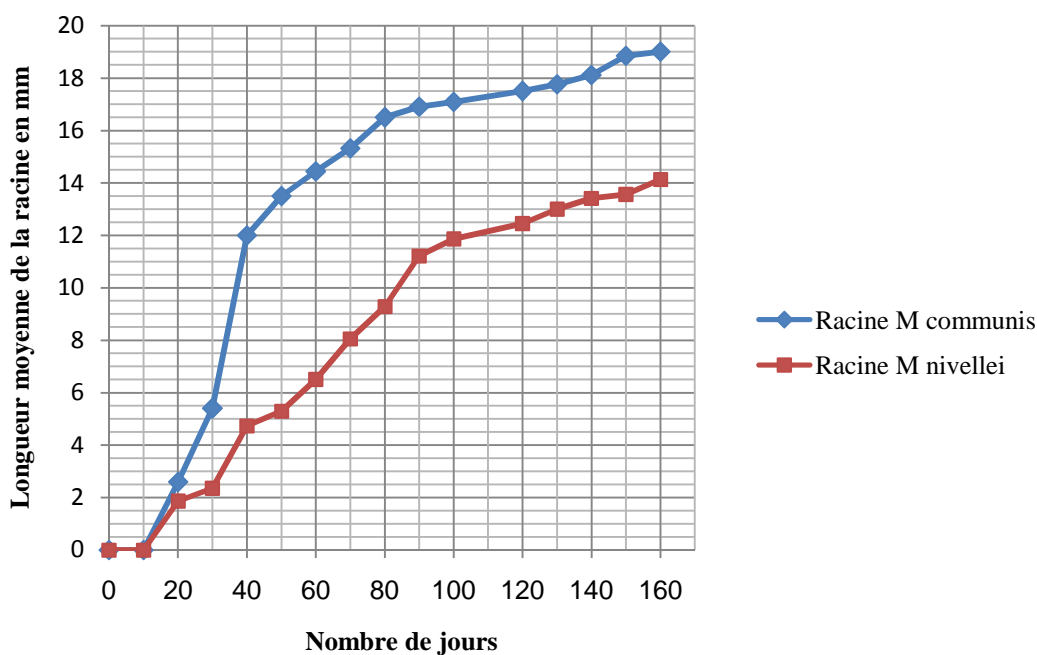


Figure 3.72: Evaluation du développement racinaire de *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab.

Le développement des racines adventives à partir des feuilles cotylédonaires à été observé chez *M communis* L. au cours des essais effectués sur boîtes de pétri ainsi que ceux réalisés *in vitro*, témoignant de leur bonne aptitude rhizogène (figure 3.73).

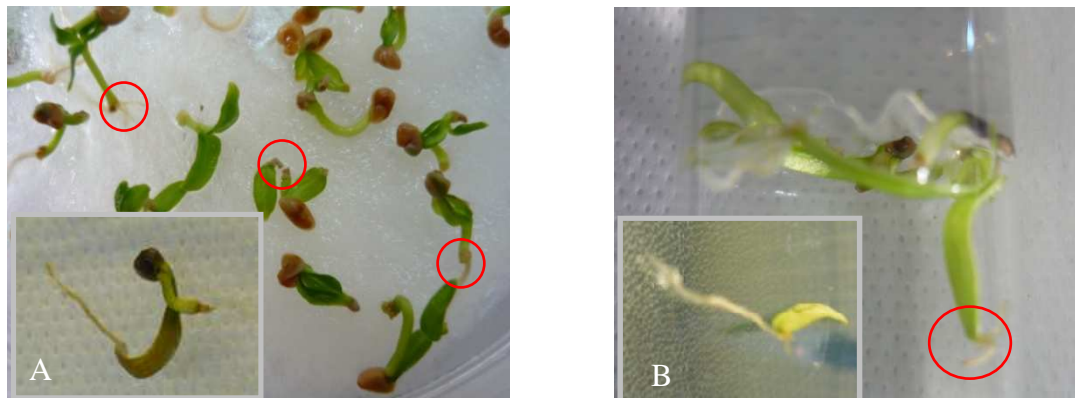


Figure 3.73: Développement des racines adventives chez *M communis* L.  
 A: Racines adventives chez *M communis* L. cultivée en boîtes de pétri  
 B: Racines adventives chez *M communis* L. cultivée en *in vitro*.

### 3.2.4.2. Résultats de la multiplication par micro-bouturage des vitro-semis

#### 3.2.4.2.1. 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. Cependant, plusieurs balances hormonales ont été testées en utilisant la BA et l'ANA.

##### 3.2.4.2.1.1. Effet de la balance hormonale ( BA/ANA)

Nous avons constaté que la plupart des combinaisons hormonales testées donnent un bon débourrement des micro-boutures, avec des pourcentages dépassant 50% 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>2</sub> respectivement (figure 3.74). Le taux de débourrement, sur le milieu M<sub>3</sub>, est plus important pour *M communis* L. avec 92,12%, par rapport à *M nivellei* Batt et Trab. ayant présenté un taux de 90,13%.

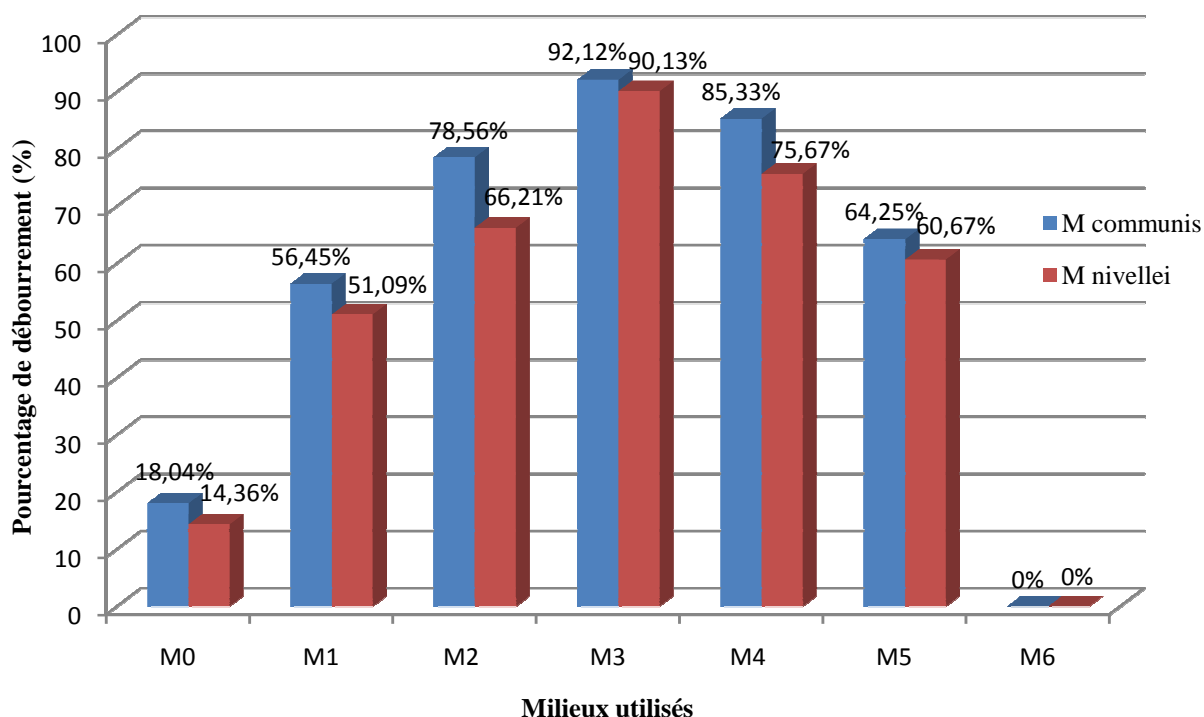


Figure 3.74: Pourcentage de débourrement des bourgeons chez *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab.

Le milieu témoin présente un faible pourcentage de débourrement des bourgeons évalué à 18,04% pour *M communis* L. et 14,36% pour *M nivellei* Batt et Trab., 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. (figure 3.75 et figure 3.76)

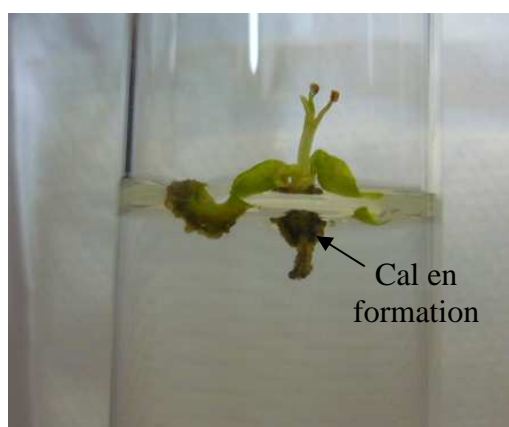


Figure 3.75: Micro-bouture de *M communis* L. en début de différenciation callogène.

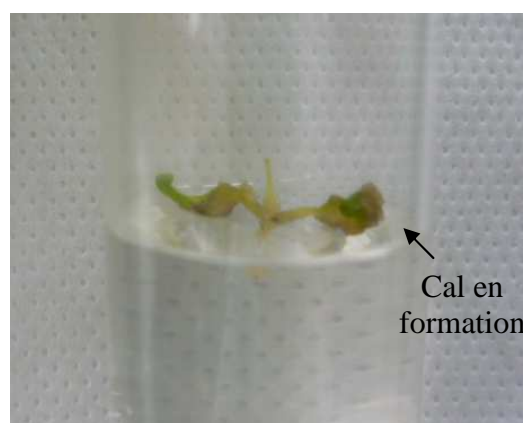


Figure 3.76: Micro-bouture de *M nivellei* Batt et Trab. en début de différenciation callogène.



### 3.2.4.2.2. Phase d'élongation

#### 3.2.4.2.2.1. Effet de la balance hormonale auxine/cytokinine

- Chez *M communis* L.

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 3.2 et figure 3.77).

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 3.2: Effet de la balance hormonale BA/ANA sur l'allongement moyen des tiges et le nombre moyen des feuilles chez *M communis* L.

	MC	BA (mg/l)				
	ANA (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>	$17,12 \pm 0,67$



1mg/l BA+0,1mg/l ANA



1,5mg/l BA+0,1mg/l ANA



2mg/l BA+0,1mg/l ANA

Figure 3.77: Croissance des micro-boutures de *M communis* L. selon la balance hormonale



- Chez *M nivellei* Batt et Trab.

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 3.3 et figure 3.78). Cependant, tout comme pour *M communis* L., l'augmentation dans la concentration en BA n'apporte pas d'amélioration.

On remarque également qu'au delà de la 8<sup>ème</sup> 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. Nous supposons que cela pourrait être dû à l'épuisement du milieu de culture, des observations similaires ont été rapportées par HAROUNI et al. [345].

Tableau 3.3: Effet de la balance hormonale BA/ANA sur l'allongement moyen des tiges et le nombre moyen des feuilles chez *M nivellei* Batt et Trab.

	MN	BA (mg/l)				
	ANA (mg/l)	0	0,5	1	1,5	2
Longueur moyenne de la tige (cm)	0	$1,33 \pm 0,25$	$1,65 \pm 0,06$	$2,11 \pm 0,95$	$2,56 \pm 0,36$	$3,02 \pm 0,55$
	0,1	-	$1,98 \pm 0,08$	$3,42 \pm 0,19$	<b><math>5,63 \pm 0,48</math></b>	$5,16 \pm 0,33$
Nombre moyen de feuilles	0	$3,44 \pm 0,67$	$6,12 \pm 1,24$	$10,23 \pm 1,12$	$15,46 \pm 2,45$	$15,78 \pm 0,39$
	0,1	-	$10,25 \pm 0,34$	$18,50 \pm 0,32$	<b><math>25,00 \pm 0,89</math></b>	$23,22 \pm 0,33$



1mg/l BA+0,1mg/l ANA



1,5mg/l BA+0,1mg/l ANA



2mg/l BA+0,1mg/l ANA

Figure 3.78: Croissance des micro-boutures de *M nivellei* Batt et Trab. selon la balance hormonale.

#### 3.2.4.2.2.2. Effet de l'acide gibbérellique (AG<sub>3</sub>)

Certaines plantules obtenues après induction du bourgeonnement axillaire, se sont développées en touffe avec des entre-nœuds très courts, rendant ainsi leur séparation difficile (figure 3.79 et figure 3.80). A cet effet, nous avons tenté de reprendre ces mêmes combinaisons hormonales avec l'addition de l'AG<sub>3</sub> à raison de 0,05mg/l.

Après 1 mois, l'axe caulinaire a connu un allongement remarquable et une bonne séparation inter-nodale chez *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab. par rapport aux témoins (figure 3.81 et figure 3.82).

La réponse aux régulateurs de croissance est variable (figure 3.83). Le milieu M<sub>2</sub> a fourni le meilleur allongement caulinaire aussi bien pour *M communis* L (7,8±0,23cm) que pour *M nivellei* Batt et Trab (6,63±0,48cm). Le milieu M<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 l'espèce *M nivellei* Batt et Trab (4,10±0,56cm).

L'analyse de la variance (au risque  $\alpha=0,05$ ) révèle que la composition du milieu influe de façon significative sur l'allongement moyen des vitro-plants.

Les travaux de DRUART et *al.* [346] ainsi que ceux de MOREL et MULLER [347] 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 GA<sub>3</sub>. Son action s'exerce au niveau de la zone méristématique subapicale en favorisant l'élongation des entre-nœuds de la tige.



Figure 3.79: Vitro-plant de *M. communis* L. à entre-nœuds très courts.



Figure 3.80: Vitro-plant de *M. nivellei* Batt et Trab. à entre-nœuds très courts.



Figure 3.81: Vitro-plant de *M. communis* L. après un mois sur milieu M<sub>2</sub>.



Figure 3.82: Vitro-plant de *M. nivellei* Batt et Trab. après un mois sur milieu M<sub>2</sub>.

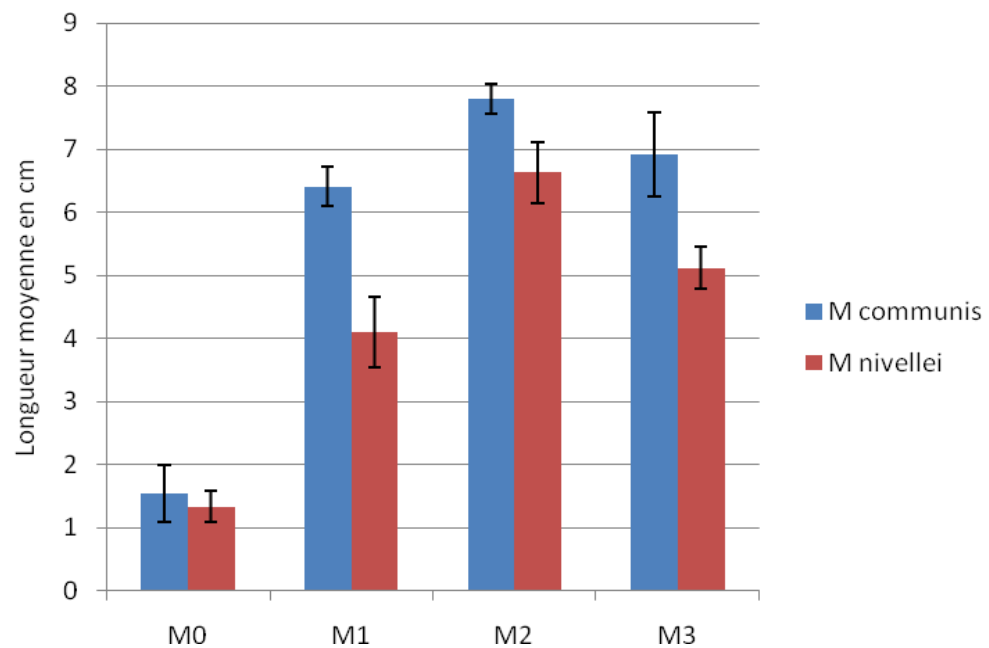


Figure 3.83: Effet de la GA<sub>3</sub> sur l'allongement moyen des vitro-plants de *M. communis* L. et *M. nivellei* Batt et Trab.

### 3.2.4.2.3. Phase d'enracinement

L'enracinement des vitro-plants est obtenu après 12 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 développé des racines (figure 3.84).

L'ANA à 0,5mg/l a pu initier la rhizogenèse, mais une concentration de 1mg/l ( $M_3$ ) a donné un résultats meilleur (figure 3.85 et figure 3.86), aussi bien pour *M communis* L ( $3,98 \pm 0,23$  cm) que pour *M nivellei* Batt et Trab ( $2,69 \pm 0,33$  cm).

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 3.87 et figure 3.88).

En culture *in vitro*, la phase d'enracinement est généralement favorisée par l'addition d'auxines aux milieux de culture. Selon VIANA et *al.* [348], 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 [349], rapportant que, s'il est admis par tous, 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.

Selon FAVRE [350], 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, celle-ci fonctionne en association avec les auxines exogènes.

Par ailleurs, HARTMANN et *al.* [343] ont démontré, que dans la plupart du temps, la présence des bourgeons et des feuilles sont nécessaires à la rhizogenèse, tout en sachant que la synthèse des auxines se fait au niveau des bourgeons.

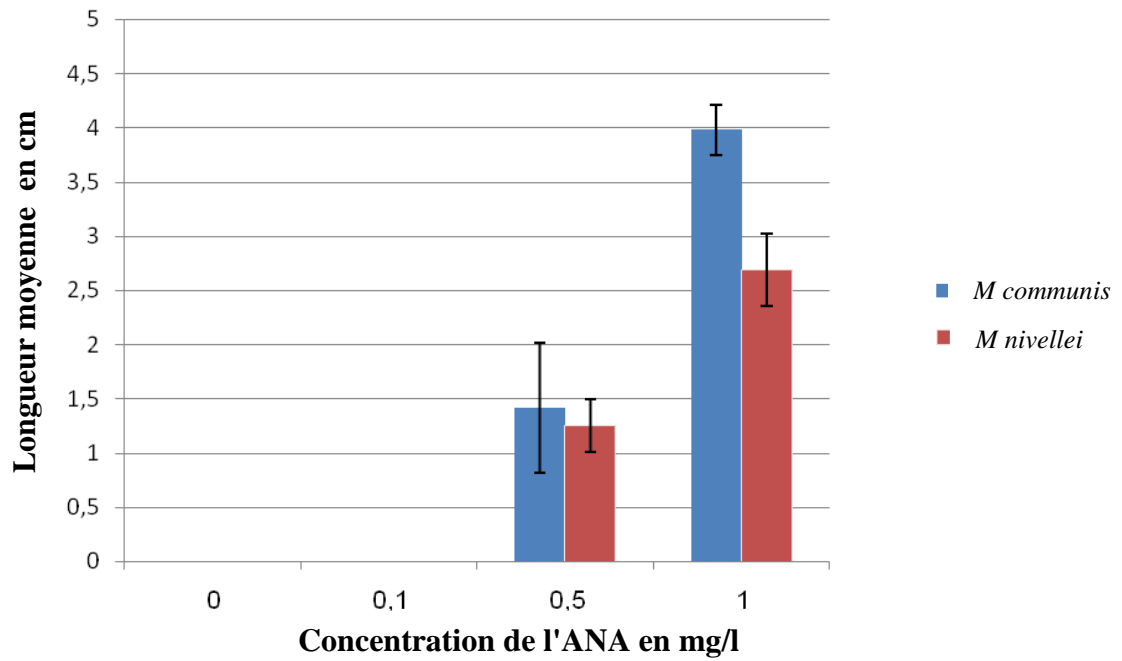


Figure 3.84: Effet de la variation de la concentration en ANA sur l'enracinement des vitro-plants de *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab.



Figure 3.85: Développement de racines sur un vitro-plant de *M communis* L.



Figure 3.86: Développement de racines sur un vitro-plant de *M nivellei* Batt et Trab.



Figure 3.87: Vitro-plant de *M communis* L. sans racines.



Figure 3.88: Vitro-plant de *M nivellei* Batt et Trab. sans racines.

### 3.2.4.3. 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 sa provenance. Ainsi, les explants provenant de plantules cultivées *in vitro* réagissent mieux que ceux prélevés des plantes obtenues *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.

#### 3.2.4.3.1. 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 séparément, 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 kinétine est significativement plus callogène que le milieu contenant le 2,4-D et la kinétine. 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 [339] sur le comportement callogène de l'espèce *Bremontiera ammoxylon*.

Par ailleurs, si aucune corrélation n'apparaît entre le brunissement et la nature des fragments callogènes, il n'est pas impossible que ces nécroses observées soient dues à la production de composés de nature phénolique ayant une action inhibitrice sur l'activité des tissus et la croissance des cals.

#### 3.2.4.3.2. 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.

### L'espèce *M communis* L.

- Explants de feuilles

Les feuilles ont exprimé une excellente aptitude à la callogenèse sur le milieu M<sub>1</sub>, 96,04% des explants ont abouti à des cals après 4 semaines de culture, suivi en deuxième position par le milieu M<sub>2</sub> avec 70,75% (figure 3.89). On note un faible pourcentage de callogenèse sur les milieux M<sub>3</sub> et M<sub>4</sub>, estimé respectivement à 54,16% et 48,30%. Les concentrations de ces derniers sont deux fois plus faibles que celles de M<sub>1</sub> et M<sub>2</sub>.

- 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 89,17%. Les milieux M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> et M<sub>4</sub> ont donné des pourcentages respectivement décroissants (figure 3.89).

- Explants de racines

Pour les explants issus des racines, les observations ont été prolongées pour une durée de 12 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 qui ne dépassent pas le seuil de 25% (figure 3.89).

### L'espèce *M nivellei* Batt et Trab.

D'après les résultats obtenus, les quatre milieux testés 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> ont provoqué l'expression des cals sur la moitié des explants testés. Par contre, le milieu témoin dépourvu d'hormones n'a aucun effet (figure 3.90).

- Explants d'entre-nœuds

La callogenèse des fragments d'entre-nœuds ne débute jamais avant 7 semaines et ne concerne que 78,22% pour M<sub>1</sub> et 68% pour M<sub>2</sub> (figure 3.90). Ces cals connaissent une croissance très active au delà de la 12<sup>ème</sup> semaines, et aboutissent presque toujours à la formation de cals compacts de couleur claire.

- Explants de racines

Sur l'ensemble des milieux testés, aucune manifestation callogène n'a été observée (figure 3.90).

D'après ces résultats, on peut dire que:

- 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 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 volumineux et compacts.
- Pour les explants de racines, la callogenèse n'a été observée que chez *M communis* L., où elle ne débute jamais avant la 10<sup>ème</sup> semaines, et ne concerne qu'un nombre très restreint d'explants. Les rares cals obtenus connaissent parfois une croissance active au delà de la 18<sup>ème</sup> semaine.

L'effet combiné des différents milieux et de la nature de l'explant montrent un effet hautement significatif dont on peut tirer les observations suivantes:

- Effet des différentes concentrations de l'ANA et la kinetine combinées sur le développement callogène: le développement callogène est excellent 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 présente aucune aptitude à la callogenèse.
- Effet des différentes combinaisons sur la couleur et la texture des cals.



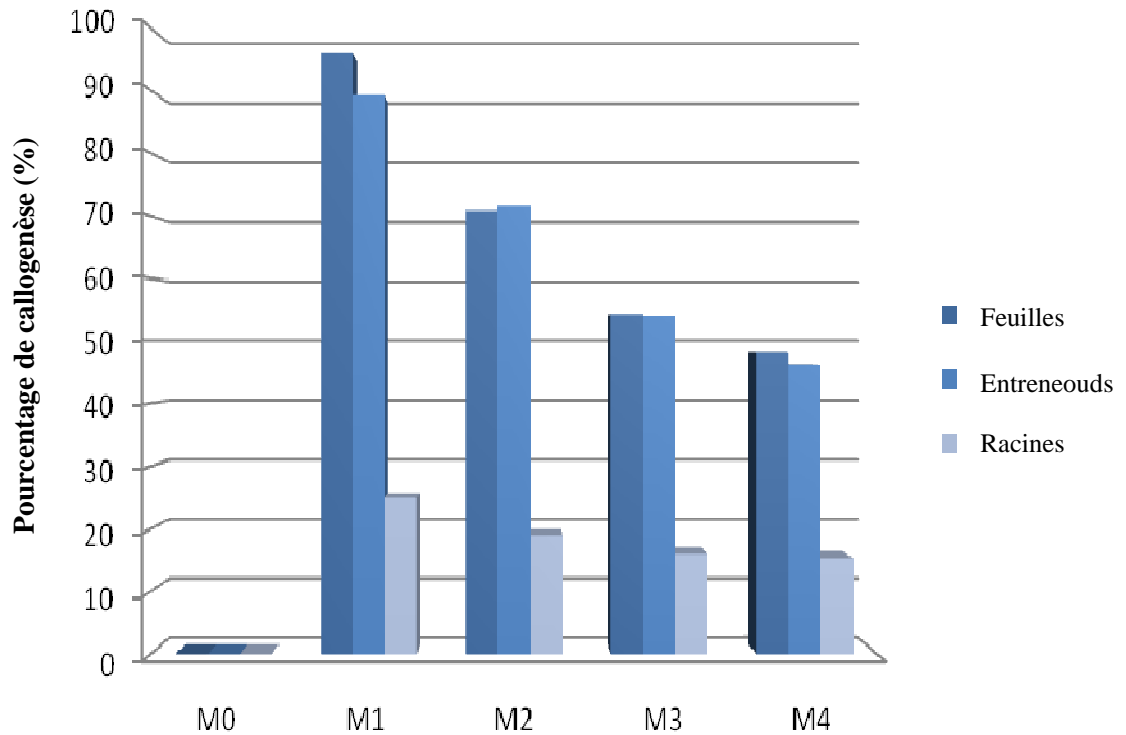


Figure 3.89: Effet des balances hormonales auxine/cytokinine (1/1) sur le pourcentage d'induction de callogenèse chez *M. communis* L.

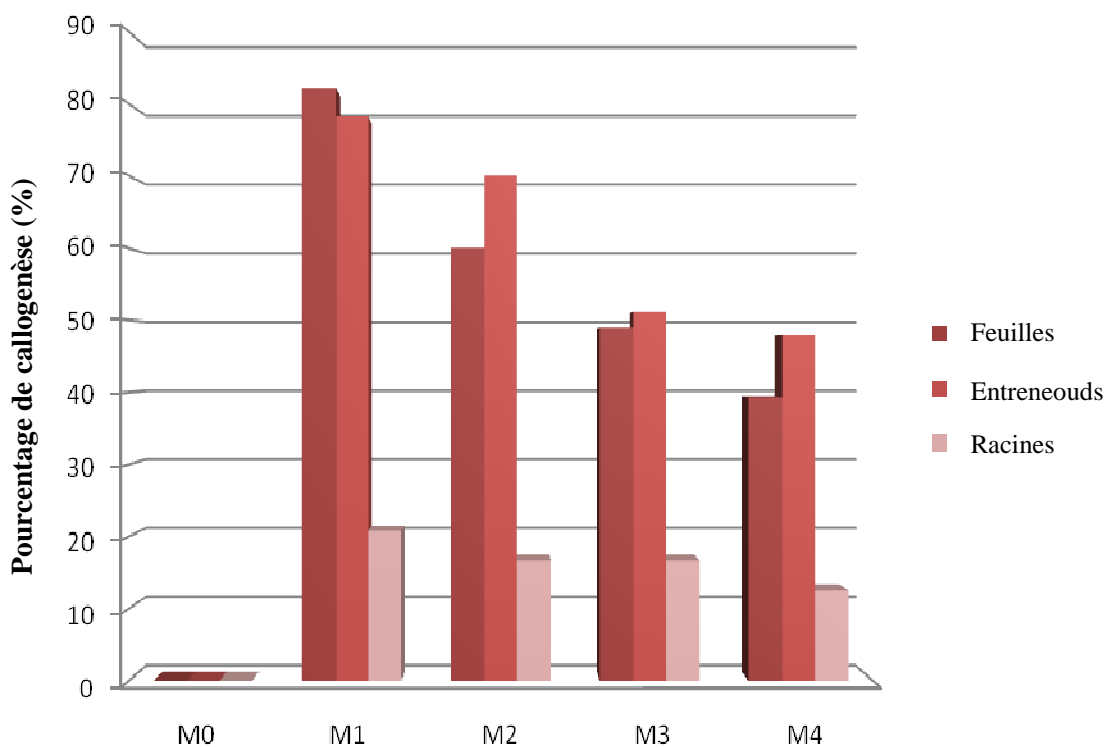


Figure 3.90: Effet des balances hormonales auxine/cytokinine (1/1) sur le pourcentage d'induction de callogenèse chez *M. nivellei* Batt et Trab.

### 3.2.4.3.3. Effet des différentes combinaisons hormonales sur la texture et la couleur des cals

#### 3.2.4.3.3.1. Aspect et texture des cals issus d'explants de feuilles

Le cal commence à se former souvent au niveau de la nervure principale, et parfois sur les marges du limbe foliaire chez les deux espèces (appendice I).

En présence de la kinétine, les cals sont limités, de forme régulière et de texture friable, ils passent progressivement d'une couleur initiale jaune-vert clair au vert.

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 3.4). Ces derniers sont aptes à être conduits vers une organogénèse bien définie, 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 verte à jaune claire, caractérisés par un développement réduit, mais finissent par se dessécher au bout de 8 semaines et deviennent brunâtres.

Tableau 3.4: Aspect et couleur des cals obtenus à partir des explants de feuilles.

Milieu	Composition (mg/ml)	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 Claire, 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

#### 3.2.4.3.3.2. Aspect et texture des cals d'entre-nœuds

Le développement callogène commence à partir des deux extrémités opposées de l'explant d'entre-nœuds (appendice I). Les différents milieux de cultures utilisés au cours de cet essai donnent des cals de couleur et de texture variées (tableau 3.5).

Nous remarquons que les cals issus d'entre-nœuds diffèrent par leur couleur et leur texture en fonction de la composition du milieu en hormones de croissance. La plupart des milieux ont donné des cals de couleur vert claire, beige à jaune, de texture friable à consistance molle, caractéristique morphologique des cals embryogènes d'après PIATTI [137]. Le milieu témoin, quant à lui, ne donne aucune structure indifférenciée et l'explant finit par se nécroser.

Tableau 3.5: Aspect et couleur des cals obtenus à partir des explants d'entre-nœuds.

Milieu	Composition (mg/ml)	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 Claire, jaune
M <sub>2</sub>	0,5mg/l 2,4-D + 0,5mg/l Kin	Cals friables bien développés	Vert Claire, 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

#### 3.2.4.3.3.3. Aspect et texture des cals issus d'explants de racines

Quand aux explants de racines chez *M communis* L., on note le développement de cals très petits avec une texture noduleuse, à consistance molle, caractéristique morphologique des cals embryogènes (appendice I). Malheureusement, aucun développement callogène n'a été observé sur les explants des racines de *M nivellei* Batt et Trab.

Selon BOXUS et *al.* [351], 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.* [125] confirment que le milieu MS sans hormones ne manifeste aucune réaction callogène et la plupart des explants se nécrosent. Chose que nous avons constaté au cours nos essais.

#### 3.2.4.3.4. Développement de bourgeons néoformés sur cals

Quelques cals issus des explants de feuilles, développés sur les milieux M<sub>1</sub> à balance hormonale ANA/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+0,05mg/l ANA+0,05mg/l GA<sub>3</sub>.

Un mois et demi plus tard, le bourgeon néoformé sur le cal a évolué en une minuscule pousse feuillée, avec une longueur moyenne de  $14 \pm 0,67$  mm pour *M communis* L. et  $15,23 \pm 0,45$  mm pour *M nivellei* Batt et Trab (appendice J).

Certains cals développés sur le milieu  $M_1$  ont été transférés sur un même milieu de base neuf (milieu de callogenèse) et ont été régulièrement repiqués pour tenter de stimuler le développement des bourgeons restants, malheureusement, bien que le volume des cals a légèrement augmenté, mais les bourgeons néoformés n'ont pas bien évolué et ont gardé une teinte jaune pâle (vitrifiés) surtout chez *M nivellei* Batt et Trab (appendice J).

Après 7 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 J).

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* [352].

Au cours de nos expériences, 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 peut être 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.

### 3.3. Résultats de l'étude phytochimique des plantes étudiées

#### 3.3.1. Résultats de la caractérisation physico-chimique

##### 3.3.1.1. Détermination du pH

L'analyse des résultats obtenus indique que les valeurs de pH mesurées présentent une légère différence entre les deux espèces étudiées selon leur origine (figure 3.91).

L'espèce *M communis* L. prélevée en *in situ* montre un pH légèrement acide (pH=5,38) par rapport à celui de *M nivellei* Batt et Trab (pH=5,66). Ces résultats semblent être plus ou moins similaires avec ceux obtenus par culture *in vitro*, où les cals de *M communis* L. présentent un pH inférieur à celui des cals de *M nivellei* Batt et Trab (5,45 et 5,57 respectivement).

HELLER [353] a indiqué que le pH peut varier suivant l'état physiologique de la plante, mais aussi suivant les variations climatiques, les conditions de stockage et les pratiques culturales appliquées.

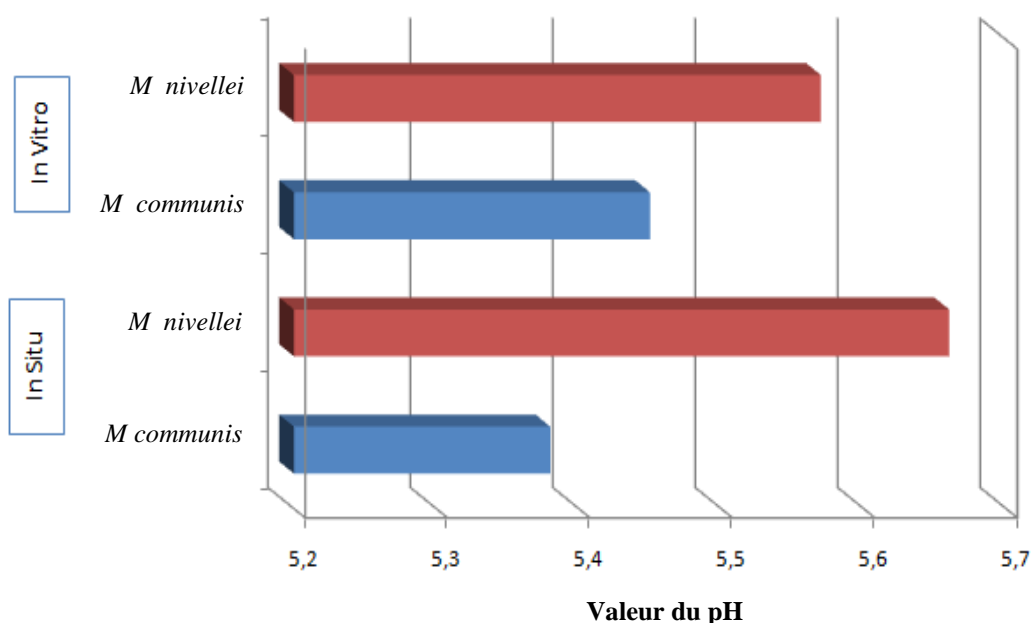


Figure 3.91: Valeurs du pH de *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab.

### 3.3.1.2. Résultats de la teneur en eau

#### 3.3.1.2.1. Résultats de la teneur en eau de la plante fraîche *in situ*

Les plantes étudiées sont des plantes ligneuses (arbustes), les analyses de nos échantillons ont révélé, chez *M communis* L., un pourcentage moyen en eau avoisinant 47,912%. Cela s'approche de la moitié du poids de la plante fraîche (figure 3.92), autrement dit, l'organisme végétal comprend en poids approximativement des proportions équivalentes de matière sèche et d'eau.

L'espèce *M nivellei* Batt et Trab. présente, quant à elle, un pourcentage moyen de 39,917%, ce dernier est légèrement inférieur à celui de l'espèce *M communis* L (figure 3.93)

Selon PARIS et MOYSE [172], l'eau représente un taux de 35 à 50% dans les tissus lignifiés. Les résultats que nous avons obtenus s'intègrent parfaitement dans cet intervalle.

Il est probable que la différence de la teneur en eau entre ces deux espèces soit due aux conditions climatiques et à l'environnement proche de chacune d'elles. Sachant que *M communis* L. est une espèce méditerranéenne, alors que l'espèce *M nivellei* Batt et Trab. est originaire d'un étage bioclimatique aride.

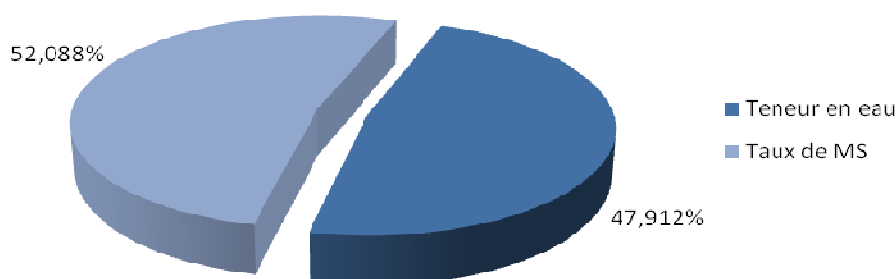


Figure 3.92: Teneur en eau chez l'espèce *M communis* L.

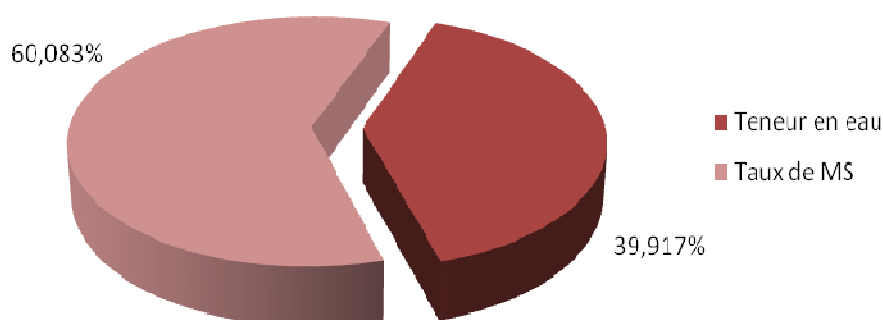


Figure 3.93: Teneur en eau chez l'espèce *M nivellei* Batt et Trab.

### 3.3.1.2.2. Résultats de la teneur en eau dans les cals

La teneur en eau des cals est remarquablement élevée, dépassant 80% pour les deux espèces, ceci semble être tout à fait évident vu qu'il s'agit d'une culture tissulaire soumise à des conditions opératoires contrôlées.

L'espèce *M communis* L. présente une teneur en eau égale à 84,7703% (figure 3.94), alors que *M nivellei* Batt et Trab. en renferme 80,8693% (figure 3.95).

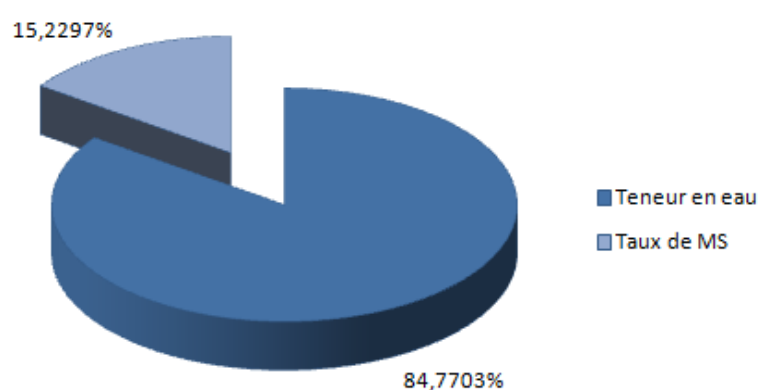


Figure 3.94: Teneur en eau des cals de *M communis* L.

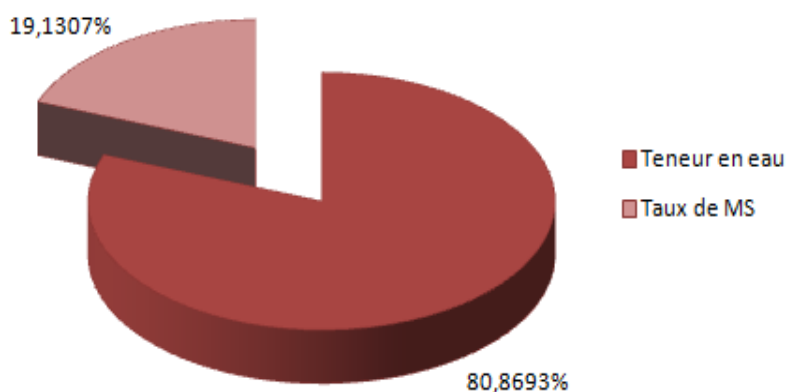


Figure 3.95: Teneur en eau des cals de *M nivellei* Batt et Trab.

### 3.3.1.3. Résultats du taux d'humidité

Le taux d'humidité dans la poudre végétale obtenue en *in situ* de *M communis* L. avoisine 6,9286%, alors qu'il est égal à 6,7686% pour l'espèce *M nivellei* Batt et Trab. Il est de même pour la poudre des cals, qui a présenté un taux d'humidité compris entre 6,5 et 6,7% chez les deux plantes étudiées (tableau 3.6).

Nous avons trouvé un pourcentage d'eau avoisinant 6,7% en moyenne dans la poudre de chaque espèce, indépendamment de leur origine. Ceci montre que l'échantillon sur lequel nous avons travaillé a été soumis à de bonnes conditions de conservation. De plus, ces taux d'humidité obtenus répondent à la norme décrite par la pharmacopée européenne [44]. La poudre obtenue est donc de bonne qualité.

Tableau 3.6: Taux d'humidité chez *M communis* L (MC) et *M nivellei* Batt et Trab (MN).

	MC (masse en g)		Taux d'humidité (%)	MN (masse en g)		Taux d'humidité (%)	Norme [44]
	Avant séchage	Après séchage		Avant séchage	Après séchage		
<i>In situ</i>	1,0002	0,9309	6,9286	1,0002	0,9325	6,7686	<15%
<i>In vitro</i>	1,0000	0,9345	6,5500	1,0000	0,933	6,7000	

#### 3.3.1.4. Résultats du taux des substances extractibles

L'extrait sec obtenu par macération dans l'éthanol affiche un taux de 16,44% pour *M communis* L. contre 11,12% seulement pour *M nivellei* Batt et Trab.

Le taux du résidu sec extrait par l'eau (infusion) représente 3,02% pour l'espèce *M communis* L., il est légèrement plus élevé pour l'espèce *M nivellei* Batt et Trab. où il avoisine 3,41% (figure 3.96).

Nous avons remarqué que le taux des substances extraites par l'éthanol est cinq fois plus important que celles extraites par l'eau pour l'espèce *M communis* L. Alors que, chez *M nivellei* Batt et Trab., le taux des substances extractibles par l'éthanol est quatre fois plus important que celui obtenu avec l'eau.

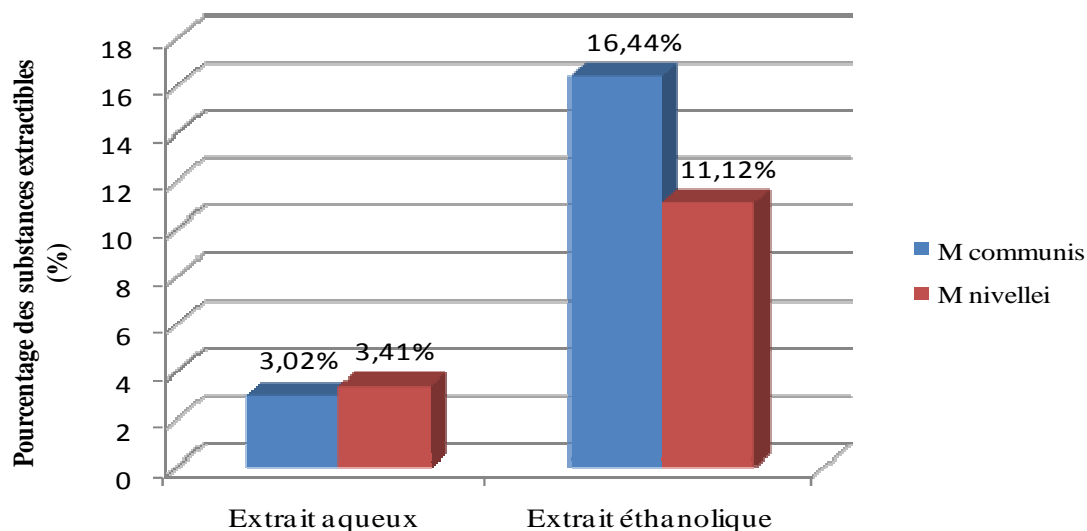


Figure 3.96: Taux de substances extractibles par l'eau et par l'éthanol 80%



### 3.3.1.5. Résultats du taux des cendres

Le taux moyen des cendres de la poudre végétale de *M communis* L. obtenue en *in situ* est estimé à 4,3083%, alors qu'il avoisine 6,1147% pour l'espèce *M nivellei* Batt et Trab. Ces résultats indiquent la présence d'une forte teneur en minéraux chez la plante saharienne par rapport à l'espèce méditerranéenne (figure 3.97).

Le taux de cendres moyen pour les cals de *M communis* L. est égal à 5,3462%, et avoisine 6,1124% pour l'espèce saharienne *M nivellei* Batt et Trab (figure 3.97).

AMMAR et *al.* [354] rapportent que la matière organique représente 957g/kg de *M communis* L. soit un taux de cendres égal à 4,3%, ce taux concorde parfaitement avec celui que nous avons trouvé.

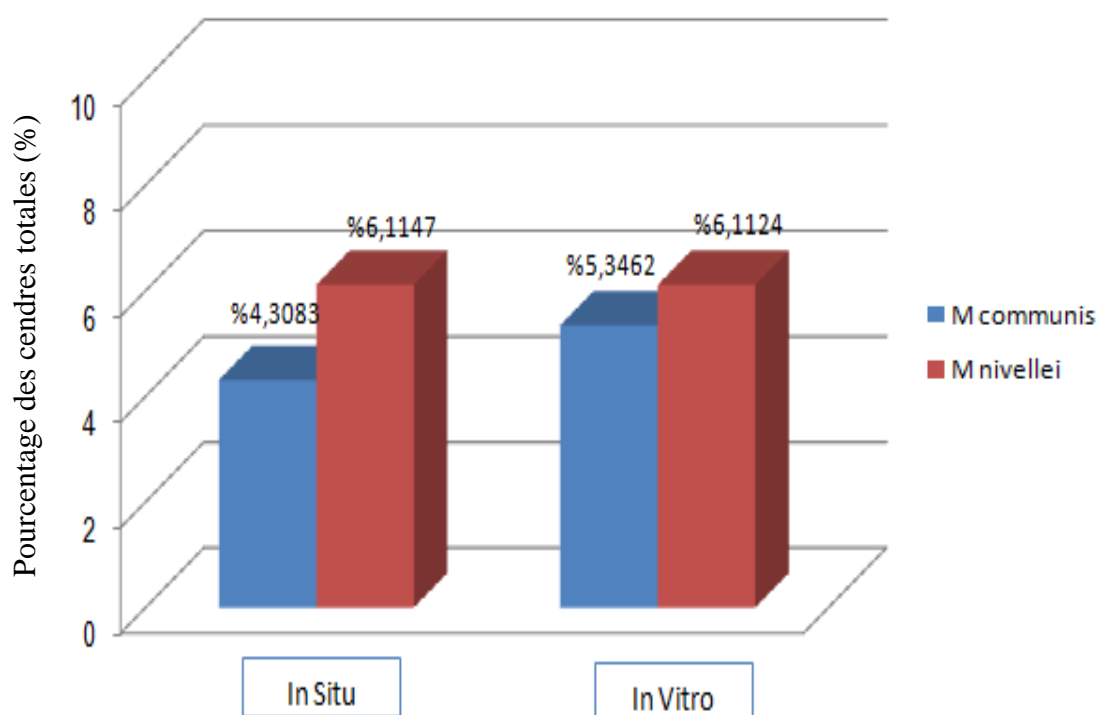


Figure 3.97: Taux des cendres chez *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab.

### 3.3.2. Résultats du Screening phytochimique

Le nombre de signes "+" est fonction de l'intensité de la coloration et/ou des précipités. Les composés les plus abondants chez *M communis* L. sont essentiellement: les tanins galliques, les flavonoïdes, les sennosides, les coumarines, les saponosides et les leuco-anthocyanes. Cette plante est moyennement riche en anthocyanes, glucosides et en mucilages: ces derniers sont présents mais leur taux est faible. L'iode a fourni une réaction négative par les techniques de caractérisations que nous avons utilisé indiquant l'absence d'amidon (tableau 3.7).

Tableau 3.7: Résultats du Screening phytochimique de *M communis* L.

Recherche	Réactifs	Réaction	Résultats
Alcaloïdes	NH <sub>4</sub> OH+éther/chloroforme+HC I+ Réactif de Valser Mayer	Précipité blanc jaunâtre	+/-
Flavonoïdes Flavanes	HCl+Mg HCl+vaniline	Rouge orange Rouge	+++ +++
Tanins Catéchiques Galliques	Réaction avec FeCl <sub>3</sub> Réactif de Stisny Réactif de stiany+acétate de sodium+ FeCl <sub>3</sub>	Bleu noire Precipité Bleu noire	++++ ++ ++++
Saponosides	Acétate de plomb	Précipité blanc	+++
Coumarines	Ethanol+KOH+HCl	Trouble	++++
Mucilages	Ethanol absolu	Précipité floconneux	++
Anthocyanes Leucoanthocyan s	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> +NH <sub>4</sub> OH Propanol/HCl	Rouge puis bleu Rouge	++ ++++
Quinones Quinones libres Quinones combinés	HCl+CHCl <sub>3</sub> +NH <sub>4</sub> OH H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + CHCl <sub>3</sub> +NH <sub>4</sub> OH	Rouge Rouge foncé	+ +/-
Glucosides	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Rouge brique puis violet	++
Sucres réducteurs	Liqueur de Fehling (A+B)	Rouge brique	++
Amidon	I <sub>2</sub>	Bleu violet	-
Sennosides	HCl+éther+sulfate de sodium anhydre +NH <sub>4</sub> OH	Rouge violet	+++

-: Nulle

+/- : Très faible

+ : Faible

++ : Moyennement riche

+++ : Riche

++++: Très riche

Pour l'espèce saharienne *M nivellei* Batt et Trab., on constate qu'elle est très riche en flavonoïdes, sennosides, tanins galliques, leuco-anthocyanes et en saponosides. La présence des coumarines, des mucilages et des glucosides demeure, toutefois, non négligeable. Les quinones combinées sont très faiblement détectées. Les tests de caractérisation des alcaloïdes, tanins catéchiques, anthocyanes, quinones libres et amidon ont donné des réactions négatives, témoignant de l'absence de ces molécules dans la plante étudiée (tableau 3.8).

Tableau 3.8: Résultats du Screening phytochimique de *M nivellei* Batt et Trab.

Recherche	Réactifs	Réaction	Résultats
Alcaloïdes	NH <sub>4</sub> OH+éther/chloroforme+HCl +Réactif de Valser Mayer	Précipité blanc jaunâtre	-
Flavonoïdes	HCl+Mg	Rouge orange	++++
Flavanes	HCl+vaniline	Rouge	++++
Tanins	Réaction avec FeCl <sub>3</sub>	Bleu noire	+++
Catéchiques	Réactif de Stiany	Precipité	-
Galliques	Réactif de stiany+acétate de sodium+ FeCl <sub>3</sub>	Bleu noire	+++
Saponosides	Acétate de plomb	Précipité blanc	+++
Coumarines	Ethanol+KOH+HCl	Trouble	++
Mucilages	Ethanol absolu	Précipité floconneux	++
Anthocyanes	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> +NH <sub>4</sub> OH	Rouge puis bleu	-
Leucoanthocyanes	Propanol/HCl	Rouge	++++
Quinones			
Quinones libres	HCl+CHCl <sub>3</sub> +NH <sub>4</sub> OH	Rouge	-
Quinones combinés	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + CHCl <sub>3</sub> +NH <sub>4</sub> OH	Rouge foncé	+/-
Glucosides	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Rouge brique puis violet	++
Sucres réducteurs	Réactif de Fehling (A+B)	Rouge brique	++
Amidon	I <sub>2</sub>	Bleu violet	-
Sennosides	HCl+éther+sulfate de sodium anhydre +NH <sub>4</sub> OH	Rouge violet	++++

-: Nulle

+/- : Très faible

+ : Faible

++ : Moyennement riche

+++ : Riche

++++:Très riche

### 3.3.3. Résultats de l'étude des principes actifs

#### 3.3.3.1. Résultats de l'étude de la fraction volatile (huiles essentielles)

##### 3.3.3.1.1. Propriétés organoleptiques

Les huiles essentielles des deux plantes étudiées ont un aspect liquide et limpide, dont chacune possède une odeur caractéristique rappelant celle des feuilles.

La couleur de l'huile essentielle de *M communis* L. apparaît jaune claire, cependant celle de *M nivellei* Batt et Trab. est d'un jaune foncé, parsemée par de très petites gouttelettes bleuâtres (tableau 3.9).

GARDELI et *al.* [221] rapportent que la couleur de l'huile essentielle de *M communis* L. est d'un jaune clair, Mais en raison de la non disponibilité d'informations concernant ces huiles étudiées dans les normes AFNOR [58], nous n'avons pas pu comparer nos résultats.

Tableau 3.9: Caractères organoleptiques des huiles essentielles étudiées.

	Couleur	Aspect	Odeur
<i>M communis</i>	Jaune claire	Liquide, limpide et mobile	Odeur rappelant celle des feuilles
<i>M nivellei</i>	Jaune foncé	Liquide, limpide et mobile	Odeur rappelant celle des feuilles

##### 3.3.3.1.2. Rendement des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont été extraites à partir de plantes fraîches, l'espèce *M communis* L. présente un rendement égal à 0,195% (tableau 3.10). Ce dernier est meilleur que celui décrit par AYDIN et OZAN [234], ainsi que par la norme AFNOR [58]. Cependant, les travaux de GARDELI et *al.* [221] ont rapporté que *M communis* L., originaire de la Grèce, présente un rendement relativement élevé égal à 1,45; ils ont également constaté que les variations saisonnières n'influent pas sur le rendement, contrairement à l'altitude qui semble en avoir un rôle déterminant.

L'huile essentielle de *M nivellei* Batt et Trab. présente un rendement égale à 0,291% (tableau 3.10). Il semblerait que le biotope aride de cette plante influe sur sa richesse en essences. Dans ce même contexte, BELAICHE [42] rapporte que les huiles essentielles conservent l'humidité des plantes poussant dans les climats arides, comme c'est le cas pour notre espèce saharo-endémique.

Tableau 3.10: Rendement des huiles essentielles étudiées.

	Masse de la matière végétale fraîche (g)	Poids de l'HE (g)	Rendement (%)
<i>M communis</i>	600	1,1700	0,19500
<i>M nivellei</i>	520	1,5142	0,29119

### 3.3.3.1.3. Densité relative des huiles essentielles

Les mesures de la densité des huiles essentielles de *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab. effectuées à 20°C, montrent qu'elles appartiennent à un intervalle étroit entre 0,8 et 0,9.

La densité de l'huile essentielle, à 20°C, est de  $0,81 \pm 0,0407$  pour *M communis* L. et de  $0,85 \pm 0,1471$  pour *M nivellei* Batt et Trab. Il paraît ainsi que les huiles essentielles de ces deux plantes ont des densités presque semblables (tableau 3.11), qui s'intègrent parfaitement dans l'intervalle décrit par la pharmacopée européenne. Ces huiles essentielles sont solubles dans l'éthanol, cette solubilité facilite leur utilisation pour différents usages.

L'augmentation de la densité relative s'explique par la présence de certains composés caractérisés par de grandes masses moléculaires (limonène:  $C_{10}H_{16}$ , camphre:  $C_{10}H_{16}O$ , citronellol:  $C_{10}H_{20}O$ ) [41].

Tableau 3.11 : Densité relative des huiles essentielles étudiées.

	Masse de 50 $\mu$ l de l'HE (mg)	Masse de 50 $\mu$ l d'H <sub>2</sub> O (mg)	Densité relative	IC	Norme [44]
<i>M communis</i>	40,60	50,1	0,8103	$0,81 \pm 0,0407$	0,80-0,95
<i>M nivellei</i>	42,59	50,1	0,8501	$0,85 \pm 0,1471$	

### 3.3.3.1.4. Analyse et identification des huiles essentielles par CG/SM

Les chromatogrammes obtenus par CG/SM des huiles essentielles de *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab. donnent une distribution des différents composés identifiés et non identifiés. Selon les proportions obtenues, nous pouvons distinguer les composés majoritaires à partir desquels nous pourrions déterminer le chémotype de chaque espèce (figure 3.98 et figure 3.99).

Pour l'espèce *M communis* L.

L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle par CG/SM a révélé la présence de 62 composés, caractérisée par 5 pics majoritaires (tableau 3.12).

- On note la présence d'une forte proportion en monoterpènes hydrocarbonés dont on cite les deux fractions majoritaires: le limonène et l'alpha pinène avec 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 avec un taux de 15,04%, suivi par le 1,8 cinéol (9,12%).
- 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 %.
- Trois alcools monoterpéniques ont été détectés dans cette huile essentielle, il s'agit du linalool (7,49%), du bergamiol (3,13%) et de l'alpha terpineol (4,30%).
- Les composés non identifiés représentent un taux inférieur à 5%.

A la lumière de ces résultats nous pouvons déduire que l'huile essentielle de l'espèce *M communis* L. appartient au chémotype: ***Limonène/Alpha pinène*** avec une présence remarquable de l'octadiénol et du cinéol (figure 3.98).

Tableau 3.12: Composés majoritaires de l'huile essentielle de *M communis* L.

N°	Temps de rétention (min)	Composé identifié	Pourcentage %	Nature chimique
1	6,75	<b>Alpha pinène</b>	<b>15,93</b>	Monoter hydroc
2	11,04	<b>Limonène</b>	<b>16,22</b>	Monoter hydroc
3	13,07	1,8 cinéol	9,12	Monoter oxyge
4	16,66	Octadienol	15,04	Alcool
5	20,63	Bornylène	4,64	Sesqui hydroc
6	21,40	Alpha terpineol	4,30	Alcool monoter
7	24,97	Linalool	7,49	Alcool monoter
8	32,75	Bergamiol	3,126	Alcool monoter
9	33,71	Benzen, 1,2dimethoxy-4-(2propenyl)	5,06	Monoter oxyge
10	35,88	Alpha caryophyllène	4,14	Sesqui hydroc
11	43,55	Alpha patcoulene	1,38	Sesqui hydroc
Chémotype étudié			<b><i>Limonène/alpha pinène</i></b>	

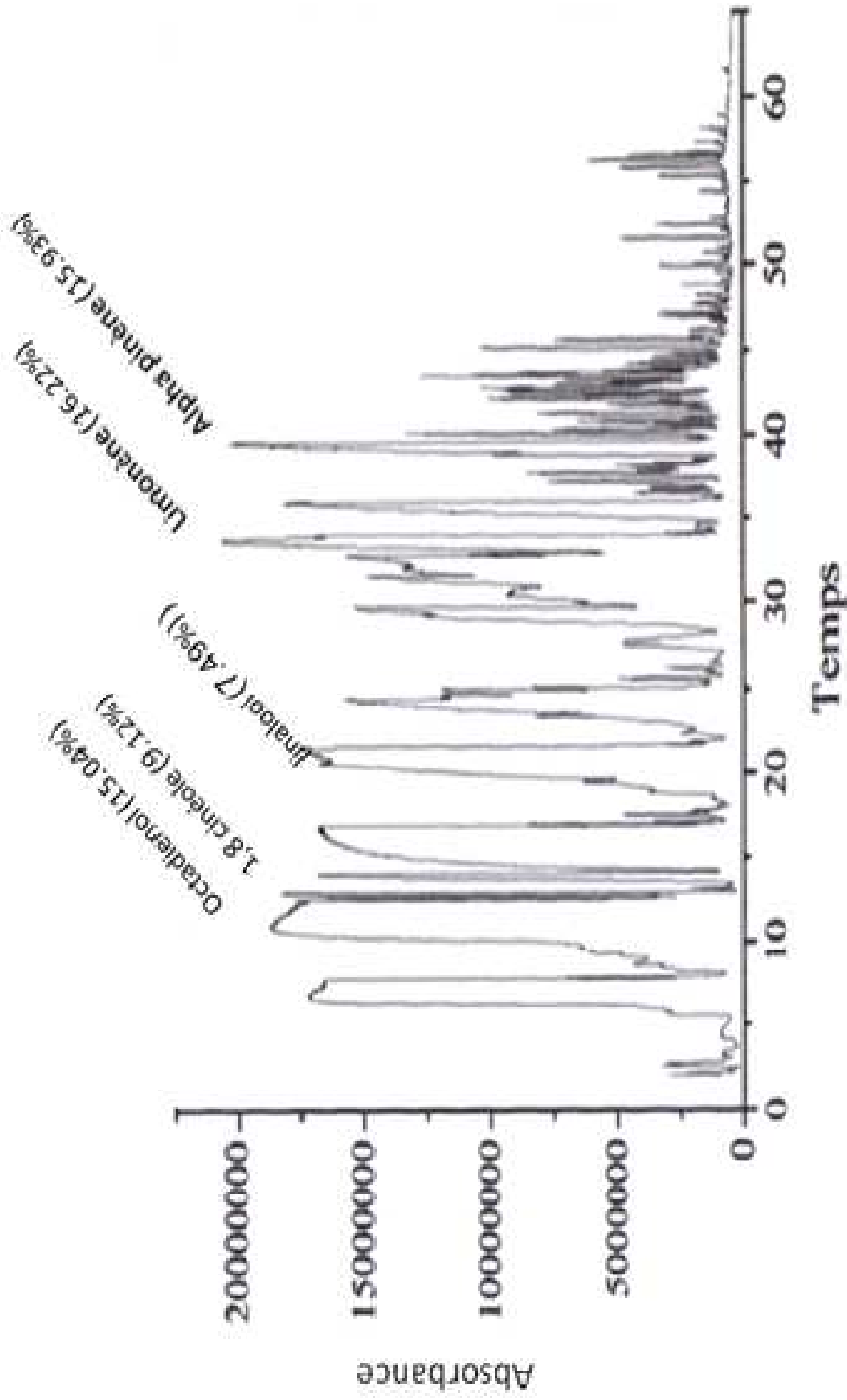


Figure 3.98: Profil chromatographique de l'huile essentielle de *M communis* L. extraite par entraînement à la vapeur et analysée par CG/SM (Chromatogramme 1)

Pour l'espèce *M nivellei* Batt et Trab.

L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle par CG/SM a révélé la présence de 48 composés, caractérisée par 6 pics majoritaires, avec une prédominance des sesquiterpènes hydrocarbonés, dont on cite: le  $\delta$  elemene (15,69%), l'alpha terpineol (13,01%), le 1,8 cinéole (12,06%) et le citral (11,66%)

- 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, il s'agit du 1,2-benzendiol avec un taux de 5,36%. L'alpha patcoulène présente un taux égale à 2,87% (tableau 3.13).
- Les autres composés non identifiés représentent un taux inférieur à 10%.

D'après ces résultats, on peut déduire que l'huile essentielle de *M nivellei* Batt et Trab. appartient au chémotype  **$\delta$  elemene/ Alpha Terpinéol** avec une présence non négligeable du cinéol et du citral (figure 3.99).

Tableau 3.13: Composés majoritaires de l'huile essentielle de *M nivellei* Batt et Trab.

N°	Temps de retention (min)	Composé identifié	Pourcentage %	Nature chimique
1	6,75	<b><math>\delta</math> elemene</b>	<b>15,69</b>	Sesqui hydroc
2	11,07	1,8 cinéol	12,06	Monoter oxyge
3	14,16	1,6 octadien-3-ol,3,7-dimethyl	2,42	Alcool
4	20,34	<b>Alpha Terpinéol</b>	<b>13,01</b>	Alcool monoter
5	32,53	Citral	11,66	Aldehyde
6	38,66	1,2-benzenediol,3,5-bis	5,36	Alcool
7	41,43	Quinoline	2,29	Quinone
8	43,16	Azulène	6,18	Sesqui hydroc
9	43,57	Alpha patcoulène	2,87	Sesqui hydroc
Chémotype étudié			<b><math>\delta</math> elemene/ Alpha Terpinéol</b>	



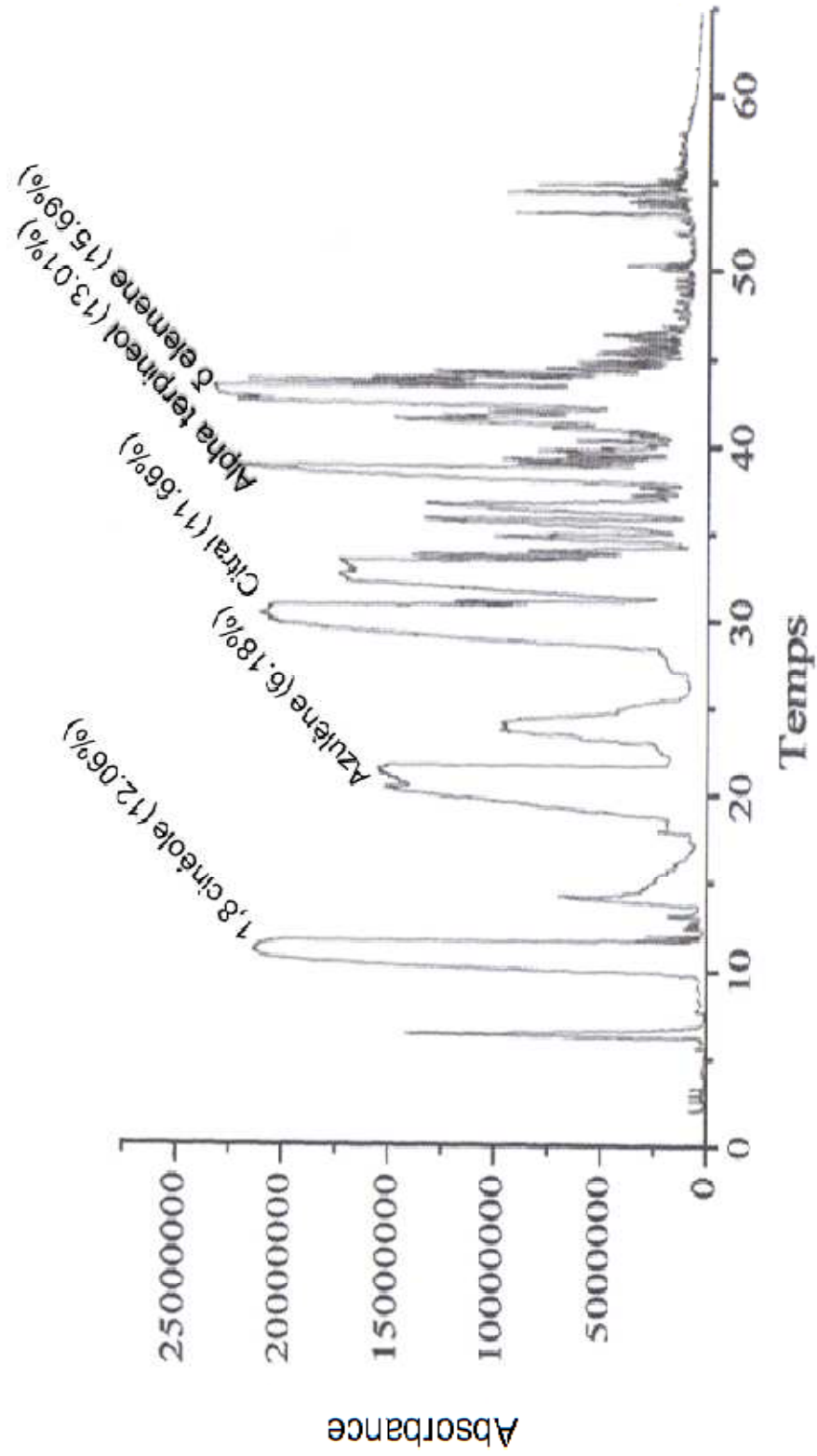


Figure 3.99: Profil chromatographique de l'huile essentielle de *M. nivellei* Batt et Trab. extraite par entraînement à la vapeur et analysée par CG/SM (Chromatogramme 2)

On constate que les huiles essentielles de ces deux myrtaceae 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 esters, les acides et les cétones sont minoritaires, dont certains sont sous forme de traces (acide benzendicarboxylique, dodecatrienol, acide hexadecanoïque).

Cependant, nous remarquons la présence de quatre composés communs chez les deux espèces (cinéol, alpha terpinéol, octadiénol et alpha patcouène) mais avec des proportions variables. L'effet combiné de ces composés est responsable de l'odeur caractéristique de l'huile essentielle de chaque plante. L'alpha terpinéol est responsable de l'odeur florale sucrée exhalée par le végétal [218]. L'huile essentielle de *M communis* L. présente une composition chimique tout à fait différente des autres myrtaceae [355].

Néanmoins l'azulène, composé très utilisé en cosmétologie et connu pour ses propriétés anti-inflammatoires, donne un aspect de très petites gouttelettes bleuâtres dispersées dans l'huile essentielle de *M nivellei* Batt et Trab.

Le chémotype Limonène/alpha pinène de l'huile essentielle de l'espèce *M communis* L. que nous avons détecté, concorde avec les résultats de l'analyse chimique de l'huile essentielle du myrte en Turquie [227], en Tunisie [226], et en Suède [228], qui ont tous révélé la présence de cette race chimique.

Cependant, nos résultats montrent que la composition chimique de l'huile essentielle de *Myrtus communis* L. algérien est complètement différente de celle de l'huile essentielle du myrte en Grèce. En effet, cette dernière est caractérisée par une prédominance en acétate de myrtenyl (39%), en 1,8 cinéole (13,5%), en alpha pinène (10,9%) et en linalool (7,7%), d'où le chémotype Acétate de myrtenyl/cinéole [221].

BRADESI et al. [213] ont révélé la présence de deux chémotypes d'huiles essentielles de *M communis* L., il s'agit du chémotype acétate de myrtenyl/cinéole et le chémotype cinéole/acétate de myrtenyl, ce même auteur a constaté que chacun des deux chémotypes déjà cités se divise à son tour, en deux sous-groupes selon le rapport relatif:  $\alpha$  pinène/ acétate de myrtenyl ou  $\alpha$  pinène/ 1,8 cinéole.

Toutefois, selon les travaux de YADERGARINIA et *al.* [224], le myrte iranien est caractérisé par la présence des mêmes fractions majoritaires que nous avons détecté chez *M communis* mais avec une prédominance de l' $\alpha$  pinène par rapport au limonène ( $\alpha$ -pinène:29,1%, limonène:21,5%, cinéol:17,9%, linalool: 10,4%)

L'un des principaux constituants de l'huile essentielle de *M communis* L. est le 1,8 cinéole, auquel peuvent s'ajouter le linalool, le myrténol, l' $\alpha$ -pinène et l'acétate de myrtenyl comme composés majoritaires [41] [213] [179].

Les travaux de FLAMINI et *al.* [220] ont démontré que l' $\alpha$ -pinène, le limonène, le 1,8 cinéole et le  $\beta$ -caryophyllène sont présents en grandes concentrations chez le myrte poussant dans un sol calcaire, alors que le linalool, l'acétate de myrtenyl et l'acétate de linalyl sont fréquents chez le myrte vivant dans un sol siliceux.

Cependant, plusieurs facteurs environnementaux comme l'ensoleillement, la nature du sol, la période de récolte, l'origine géographique et le climat en sont responsables [59] [218] [219] [221]. Ces facteurs influent sur les voies de biosynthèse de l'huile essentielle provoquant l'apparition de chémotypes différents avec des réponses thérapeutiques spécifiques [213] [214] [220].

### 3.3.3.2. Résultats de l'étude de la fraction non volatile polaire (analyse des extraits)

#### 3.3.3.2.1. Extraits méthanoliques et éthanoliques

Les extraits méthanoliques sont quantitativement les plus importants. Cela voudrait dire que la plante contient beaucoup de composés solubles dans ce solvant. Nous avons d'ailleurs pu le constater lors des extractions à chaud. En effet, l'extraction au méthanol a duré 6 heures, alors que la macération éthanolique a été étendue sur 24 heures. L'extrait méthanolique est d'un marron très foncé légèrement gras, tandis que l'extrait éthanolique est poudreux et friable de couleur vert claire. Quant aux extraits des cals, ils ont un aspect collant de couleur vert foncé (tableau 3.14).

Cependant, la macération est une méthode discontinue, le solvant devrait être remplacé jusqu'à ce que la matière végétale soit épuisée [356]. Le rendement n'est que relatif et dépend 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 [357].

D'après le tableau 3.14, le rendement des extraits méthanoliques (MeOH) de *M communis* L. est inférieur à celui de l'espèce saharienne. Cependant l'extrait éthanolique (EtOH) de *M communis* L. se montre plus rentable.

GARDELI et al. [221] ont montré que le rendement de l'extrait méthanolique de *M communis* L. 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. [358], ont rapporté que le rendement de l'extrait méthanolique de *M communis* L. est égal à 28,66%, signalant qu'il est très riche en tanins, en flavonoïdes et en coumarines.

Tableau 3.14: Aspects, couleurs et rendements des extraits obtenus.

		Nature de l'extrait	Rendement de l'extrait (%)	Aspect de l'extrait	Couleur de l'extrait
<i>M communis</i>	<i>In vitro</i>	Extrait MeOH	35,56	Collant pâteux	Vert foncé
	<i>In situ</i>	Extrait MeOH	41,30	Collant pâteux	Marron foncé
		Extrait EtOH	14,41	Friable	Vert claire
<i>M nivellei</i>	<i>In vitro</i>	Extrait MeOH	40,45	Collant pâteux	Vert foncé
	<i>In situ</i>	Extrait MeOH	59,15	Collant pâteux	Marron foncé
		Extrait EtOH	12,45	Friable	Vert claire

### 3.3.2.2.2. Extraits flavonoïdiques

Les deux espèces étudiées ont donné une masse en extrait flavonoïdique sec relativement faible. Ces extraits ont présenté un aspect poudreux, friable, de couleur jaune orange. Du point de vue rentabilité, nous avons obtenu une proportion de 4,26 % pour *M communis* L. et 3,74 % pour l'espèce *M nivellei* Batt et Trab (figure 3.100).

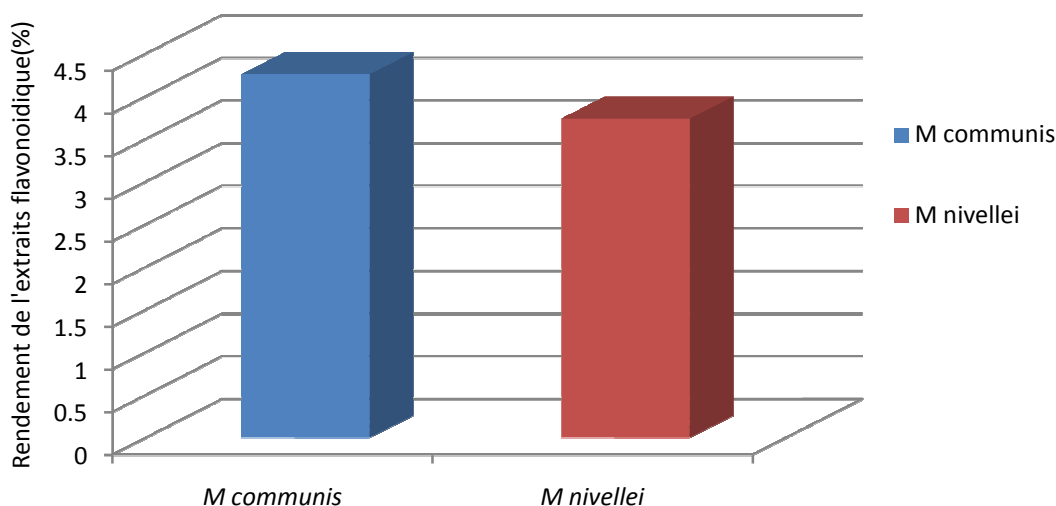


Figure 3.100: Rendement des extraits flavonoïdiques de *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab.

### 3.3.3.2.3. Analyse des extraits par spectrophotométrie UV- visible

L'analyse des extraits par spectrophotométrie UV-vis 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'infirmier leurs richesse en polyphenols (figure 3.101 et appendice L).

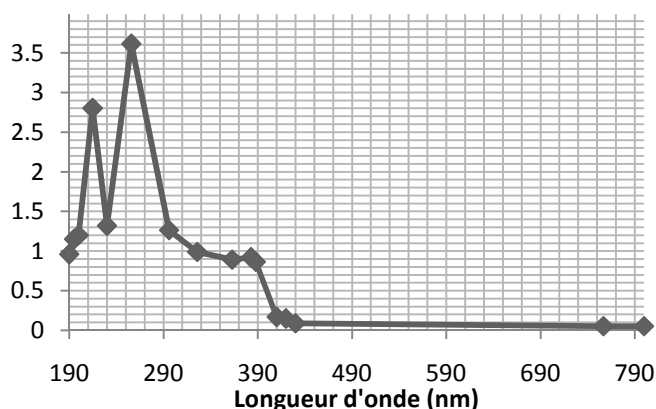


Figure 3.101 : Spectre UV-visible de l'acide gallique

- Extraits méthanoliques

Selon MARKHAM [359], les longueurs d'ondes allant de 260 à 360 nm présentent deux pics importants correspondant au domaine d'absorbance des flavonoïdes. Cependant, les quatre extraits méthanoliques provenant des plantes obtenues *in situ* et *in vitro*, 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 3.102, figure 3.103, figure 3.104, figure 3.105 et appendice L).

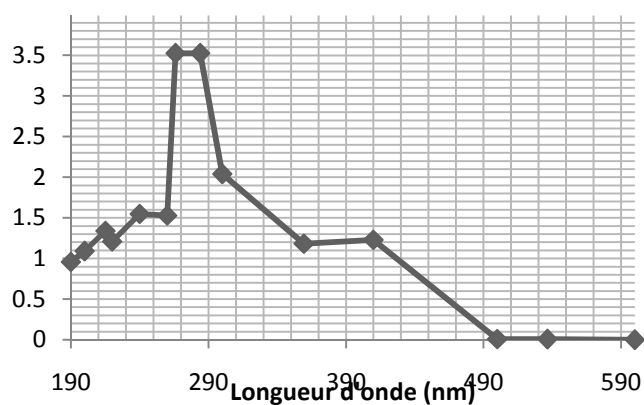


Figure 3.102 : Spectre UV-visible de l'extrait MeOH de *M communis* L. (*in situ*)

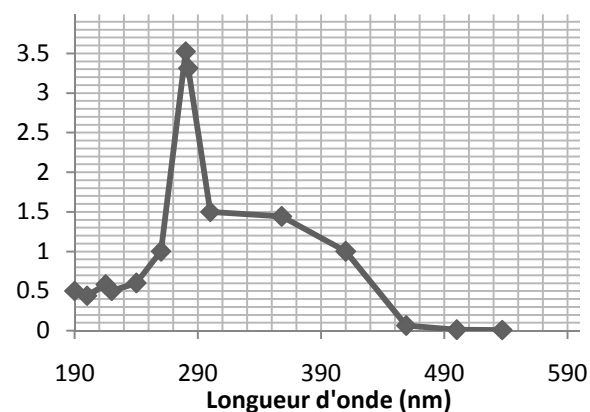


Figure 3.103 : Spectre UV-visible de l'extrait MeOH de *M nivellei* Batt et Trab. (*in situ*)

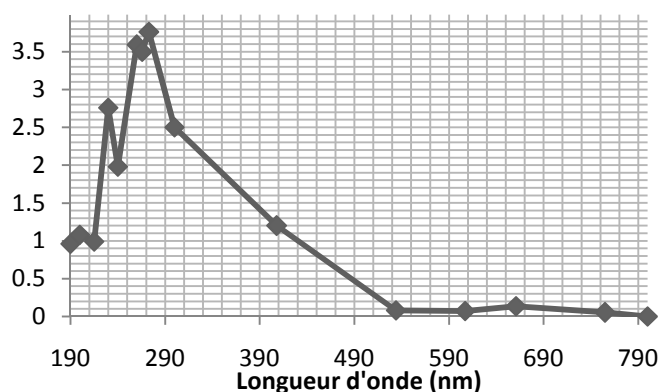


Figure 3.104 : Spectre UV-visible de l'extrait MeOH de *M communis* L. (*in vitro*).

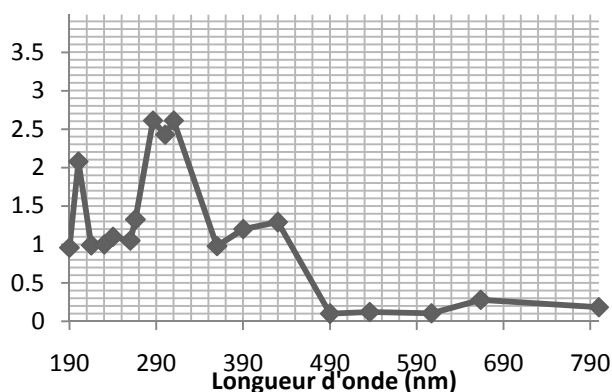


Figure 3.105 : Spectre UV-visible de l'extrait MeOH de *M nivellei* Batt et Trab. (*in vitro*).

- Extraits éthanoliques

D'après MARKHAM [359], 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 3.106, figure 3.107 et appendice L).

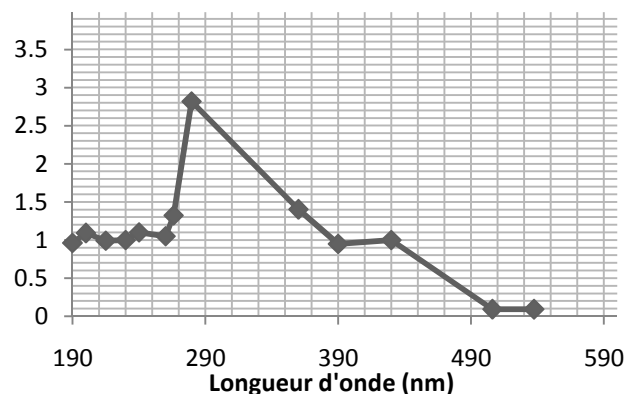


Figure 3.106: Spectre UV-visible de l'extrait EtOH de *M communis* L. (*in situ*)

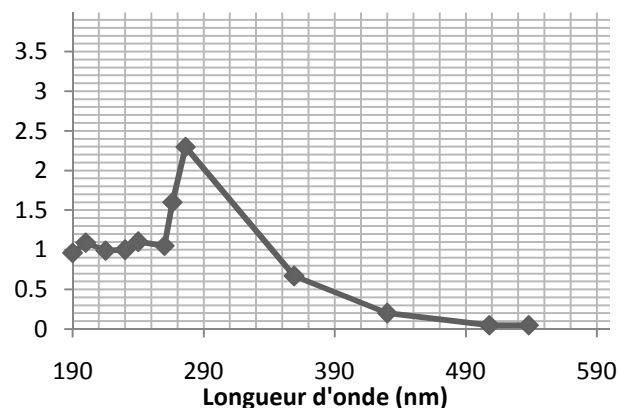


Figure 3.107 : Spectre UV-visible de l'extrait EtOH de *M nivellei* Batt et Trab. (*In situ*)

- Extraits flavonoïdiques

Les différents pics d'absorption en fonction de la longueur d'onde et de l'absorbance des extraits flavonoïdiques sont étudiés (figure 3.108 et appendice L). Pour cette fin, la quercetine dissoute dans le méthanol a été également soumise au balayage spectrophotométrique au même titre que les extraits.

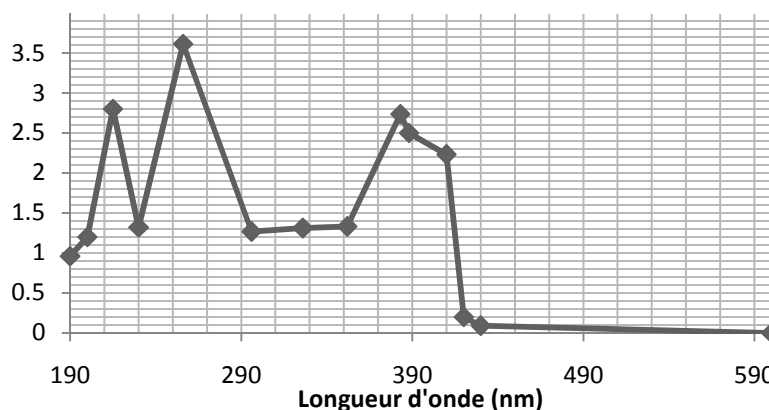


Figure 3.108: Spectre UV-visible de la quercetine

D'après les spectres obtenus, nous constatons que les valeurs de la longueur d'onde des flavonoïdes des deux espèces sont presque identiques (pic 3 de *M communis* L. et pic 2 de *M nivellei* Batt et Trab. par rapport au pic 3 de l'étalon). Il s'agirait éventuellement d'un même composé. Rappelant que les longueurs d'ondes 278 et 283 nm correspondent à l'absorbance des noyaux aromatiques (figure 3.109, figure 3.110 et appendice L).

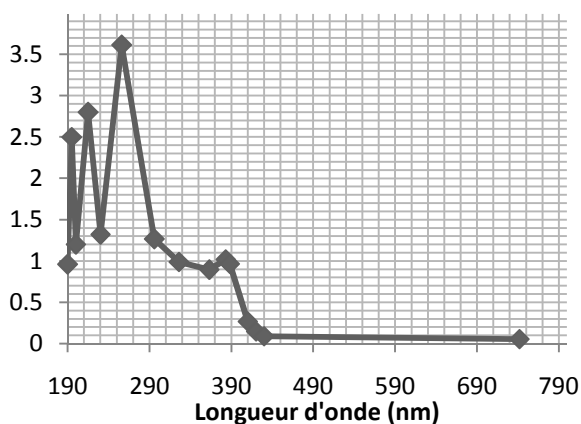


Figure 3.109: Spectre UV-visible de l'extrait flavonoïdique de *M communis* L.

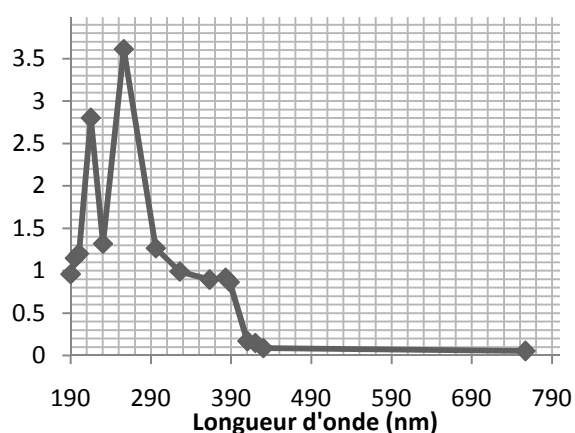


Figure 3.110: Spectre UV-visible de l'extrait flavonoïdique de *M nivellei* Batt et Trab.

#### 3.3.3.2.4. Dosages biochimiques de quelques métabolites par spectrophotométrie UV-Visible)

L'étude quantitative des extraits au moyen des dosages spectrophotométriques, avaient pour objectif la détermination de la teneur de quelques métabolites. Pour chaque dosage, nous avons réalisé une courbe de calibration à différentes concentrations d'étalon selon une équation de type :  $y = ax + b$ . Le choix de l'étalon dépend étroitement de la nature de l'extrait (tableau 3.15).

Tableau 3.15: Principaux étalons sélectionnés pour les dosages et leurs longueurs d'ondes.

Paramètre de dosage	Etalon sélectionné	Longueur d'onde (nm)
Polyphenols	Acide gallique	760
Flavonoïdes	Quercetine	415
Flavonols	Rutine	440
Sucres totaux	Glucose	488
Tannins	Acide tannique	760
Anthocyanes	Cyanidine	520

##### 3.3.3.2.4.1. Dosage des composés phénoliques

L'analyse quantitative des polyphenols totaux a été réalisée par la méthode Folin Ciocalteu. La teneur en composés phénoliques des extraits méthanoliques et éthanoliques a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (appendice K).

Nous avons constaté que les extraits obtenus par macération sont plus riches en polyphenols que ceux obtenus par extraction à chaud avec du méthanol chez les deux espèces étudiées, soit 789  $\mu\text{g eq ac gal/mg ES}$  pour *M communis* L. et 734  $\mu\text{g eq ac gal/mg ES}$  pour *M nivellei* Batt et Trab (figure 3.111).

Cependant, indépendamment du mode d'extraction effectué, les extraits de la plante *M communis* L. sont toujours plus riches en polyphenols par rapport à ceux de *M nivellei* Batt et Trab., qu'ils soient obtenus *in situ* ou bien *in vitro* (figure 3.111).

Les extraits méthanoliques présentent également des concentrations rapprochées estimées à 487  $\mu\text{g eq ac gal/mg ES}$  pour *M communis* L. et 348  $\mu\text{g eq ac gal/mg ES}$  pour l'espèce *M nivellei* Batt et Trab.



Selon GARDELI et al. [221], la teneur des extraits méthanoliques en polyphénols chez *M communis* L. varie entre 352 et 373  $\mu\text{g eq ac gal/mg ES}$  et atteint un maximum durant la période de pleine floraison. Cependant, AMMAR et al. [354] rapportent que sa teneur avoisine 227  $\mu\text{g eq ac gal/mg ES}$ .

Par ailleurs, si nous comparons les teneurs en polyphénols des extraits de *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab. obtenues en *in situ*, à ceux de leurs homologues obtenues en *in vitro*, 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.

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 [360].

BAHORUN et al. [361] 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 [362], qui ont amélioré la production des colonies tissulaires de *Crotalaria* en présence de différents acides phénoliques.

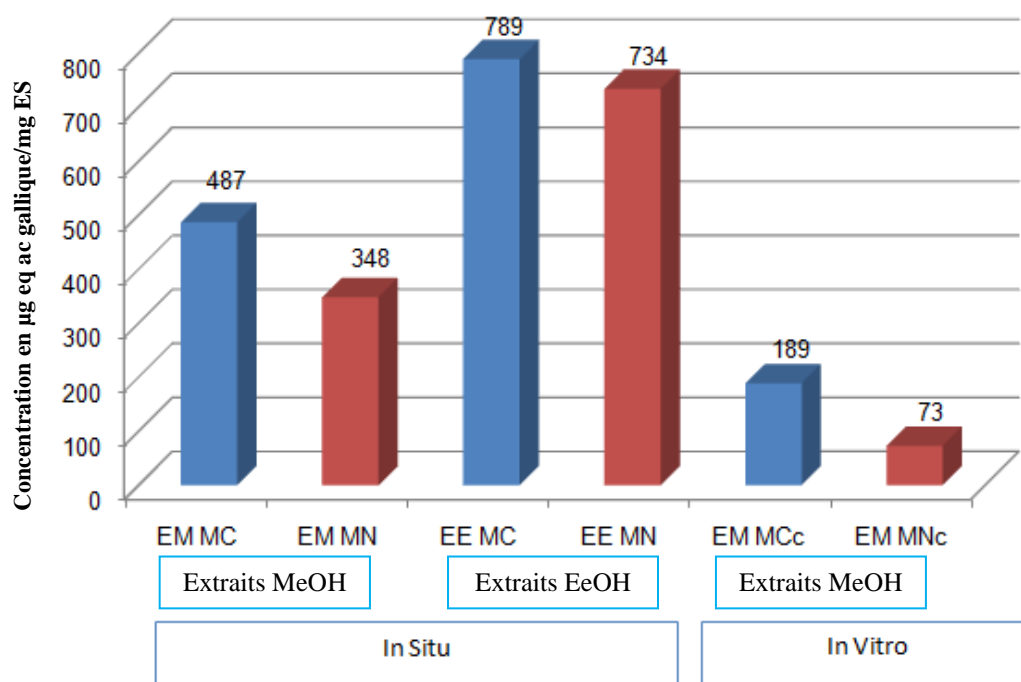


Figure 3.111: Concentrations en polyphénols des différents extraits de *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab.

### 3.3.3.2.4.2. 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.* [315]. Les teneurs en flavonoïdes ont été alors calculées à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine (appendice K).

Pour l'espèce *M nivellei* Batt et Trab., la concentration en flavonoïdes est très importante dans l'extrait éthanolique avec 181,1  $\mu\text{g eq quer/mg ES}$ , légèrement inférieure pour l'extrait méthanolique où elle avoisine 152,25  $\mu\text{g eq quer/mg ES}$ . Concernant les cals, ils sont moins riches en flavonoïdes, avec une concentration qui ne dépasse pas 91  $\mu\text{g eq quer/mg ES}$  (figure 3.112).

Chez *M communis* L., la concentration de l'extrait éthanolique est de 146,9  $\mu\text{g eq quer/mg ES}$ , alors son extrait méthanolique présente un taux de 125,25  $\mu\text{g eq quer/mg ES}$ , le plus faible taux en flavonoïdes a été marqué dans l'extrait méthanolique des cals de *M communis* L. avec un 64,1  $\mu\text{g eq quer/mg ES}$  seulement.

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 chez l'espèce *M nivellei* Batt et Trab.

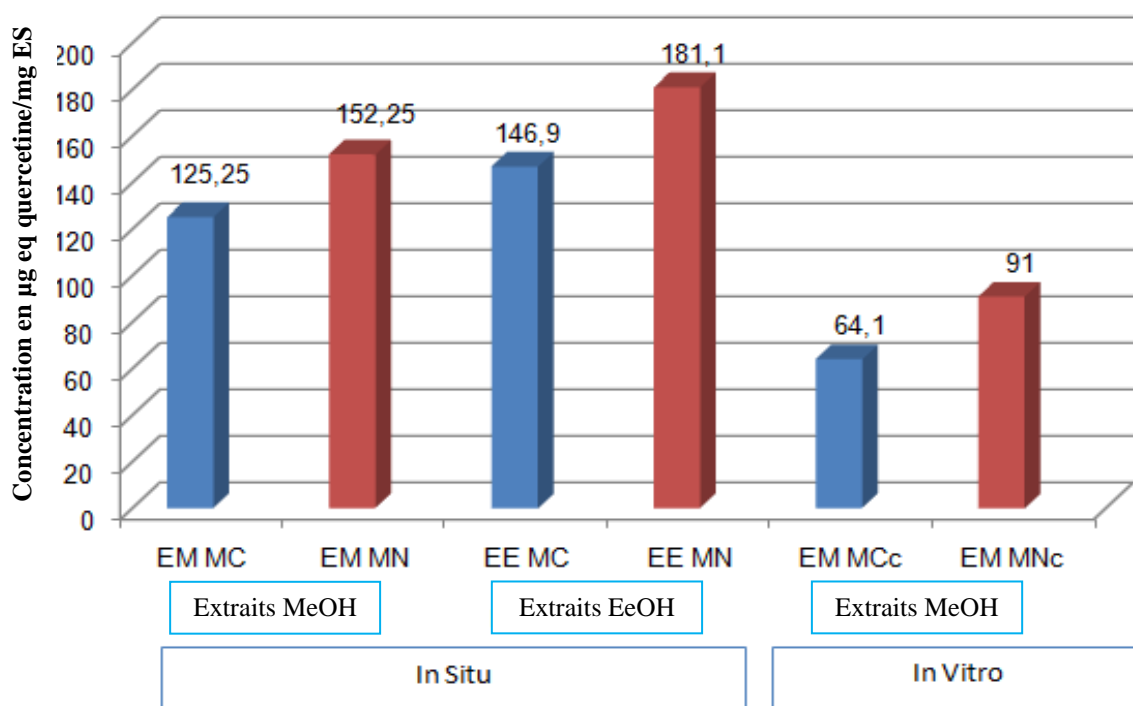


Figure 3.112: Concentrations en flavonoïdes des différents extraits de *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab.

### 3.3.3.2.4.3. Dosage des flavonols

La quantification des flavonols contenus dans les extraits a été faite conformément au protocole décrit par YERMAKOV et *al.* [316]. La teneur en flavonols de chaque extrait (méthanolique, éthanolique et flavonoïdique) a été évaluée à partir de la courbe d'étalonnage de la rutine (appendice K).

Il paraît clairement que les extraits éthanoliques et flavonoïdiques fournissent respectivement les taux les plus élevés en flavonols, qui dépassent 700  $\mu\text{g eq rut/mg ES}$  chez les espèces obtenues en *in situ* (figure 3.113).

La concentration en flavonols dans les extraits méthanoliques des plantes récoltées *in situ*, est moins importante avec 438,5  $\mu\text{g eq rut/mg ES}$  pour *M nivellei* Batt et Trab. et 378  $\mu\text{g eq rut/mg ES}$  pour *M communis* L. Quant aux extraits méthanoliques des cals, le taux varie entre 100 et 111  $\mu\text{g eq rut/mg ES}$ , mais demeure toutefois non négligeable.

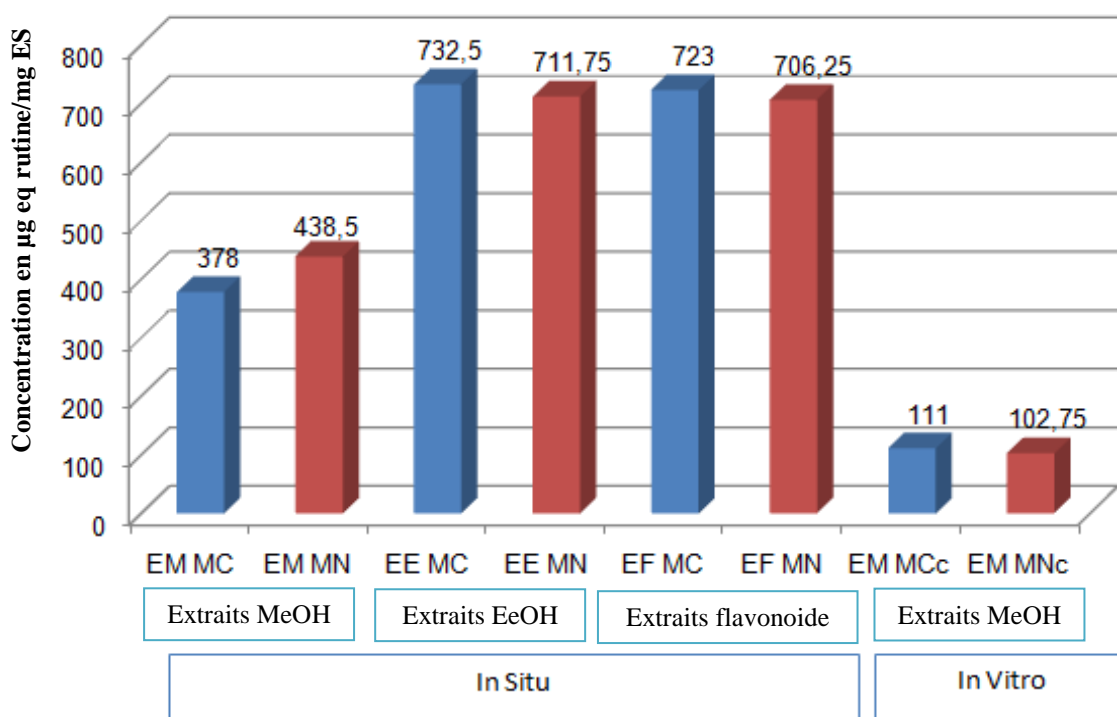


Figure 3.113: Concentrations en flavonols des différents extraits de *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab.

### 3.3.3.2.4.4. Dosage des sucres

La teneur en sucres de chaque extrait (méthanolique et éthanolique) est calculée à partir de la courbe d'étalonnage du glucose (appendice K).

On remarque d'après les résultats obtenus (figure 3.114), que les extraits méthanoliques et éthanoliques de *M nivellei* Batt et Trab. récoltée *in situ* présentent respectivement 2,2820 et 17,2628  $\mu\text{g eq glu/mg ES}$ . Ils sont plus riches en sucres que les extraits de *M communis* L. qui présentent des concentrations moindres (respectivement 0,7948 et 15,8461  $\mu\text{g eq glu/mg ES}$ ).

Les extraits méthanoliques des cals ont donné les plus grandes teneurs en sucres. Ces concentrations relativement élevées ne sont pas surprenantes, car elles témoignent de leur intense activité métabolique, ce qui explique la production importante de ce métabolite primaire.

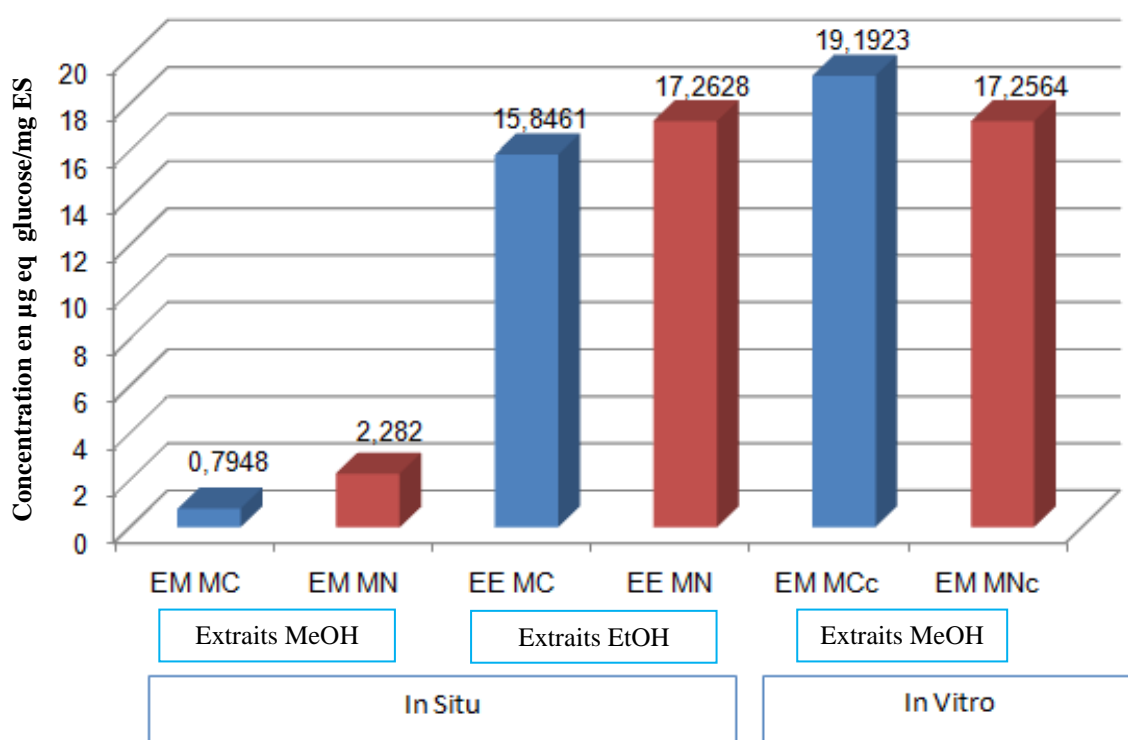


Figure 3.114: Concentrations en sucres des différents extraits de *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab.

### 3.3.3.2.4.5. Dosage des tanins

Après extrapolation des résultats de l'absorbance mesurée au spectrophotomètre, sur la courbe d'étalonnage de l'acide tannique (appendice K), nous avons constaté une forte présence de tanins dans les extraits méthanoliques des plantes obtenues *in situ* avec une concentration de 155,27  $\mu\text{g eq ac tan/mg ES}$  pour *M nivellei* Batt Trab. et 135,02  $\mu\text{g eq ac tan/mg ES}$  pour *M communis* L. (figure 3.115)

Les extraits éthanoliques renferment des concentrations moins importantes que les précédentes, ne dépassant pas le seuil de 140  $\mu\text{g eq ac tan/mg ES}$  (figure 3.115).

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.

Les travaux de GASMI BOUBAKER et al. [263] rapportent que la concentration des tanins dans l'extrait méthanolique de *M communis* avoisine 104  $\mu\text{g eq Ac tan/mg ES}$ . Alors que AMMAR et al. [358] ont confirmé la présence d'un taux de tanins qui avoisine 282  $\mu\text{g eq ac tan/mg ES}$  chez cette même espèce.

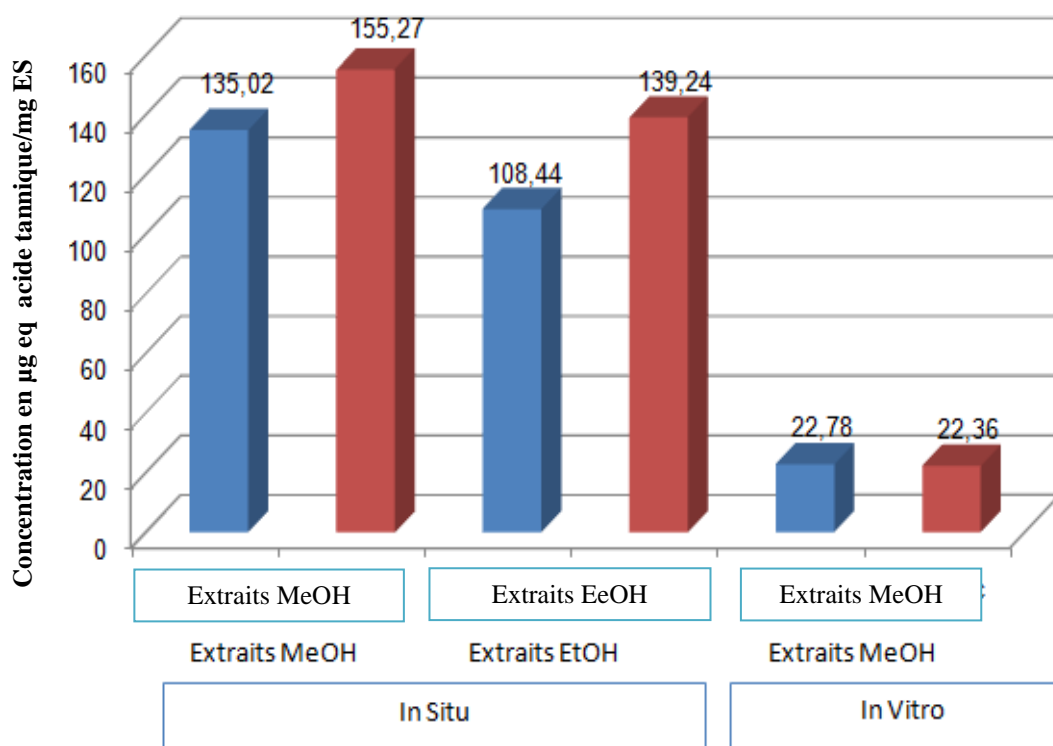


Figure 3.115: Concentrations en tanins des différents extraits de *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab.

#### 3.3.3.2.4.6. Dosage des anthocyanes

La teneur en anthocyanes de chaque extrait est calculée à partir de la courbe d'étalonnage de la cyanidine (appendice K)

Les extraits éthanoliques ont enregistré des teneurs estimées à 21,3µg et 25,5µg eq cyan/mg ES respectivement pour *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab. (figure 3.116).

Les extraits méthanoliques des plantes obtenues *in situ* ont fourni des faibles teneurs, avec un taux de 19,8 µg eq cyan/mg ES pour *M communis* L. et 17,2 µg eq cyan/mg ES de *M nivellei* Batt et Trab. Pour les cals obtenus en *in vitro*, ces taux demeurent très faible et ne dépassent pas 5,20 µg eq cyan/mg ES.

En comparant les teneurs des extraits des plantes obtenues *in situ* avec leurs homologues cultivés *in vitro*, nous pouvons dire que les cals de *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab. ne montrent pas des productions élevées.

D'après les travaux de ISHIKURA et TERAMOTO [363], Il paraît que les cultures en suspensions des cals de *Cryptomeria japonica* produisent jusqu'à 26 µg eq cyan/mg d'extrait sec. Des résultats impressionnants ont été également obtenus à partir des suspensions cellulaires de *Pseudotsuga menziesii* avec un rendement en anthocyanes allant jusqu'à 40µg/mg ES [364]. Alors que *Ginkgo biloba* peut accumuler jusqu'à 50 à 60 µg d'anthocyanes par gramme de masse sèche [365].

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, les différentes réactions qui provoquent 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 [366].
- La combinaison des anthocyanes avec les tanins pour donner des polymères, qui possèdent des propriétés et des couleurs différentes de celles des anthocyanes.

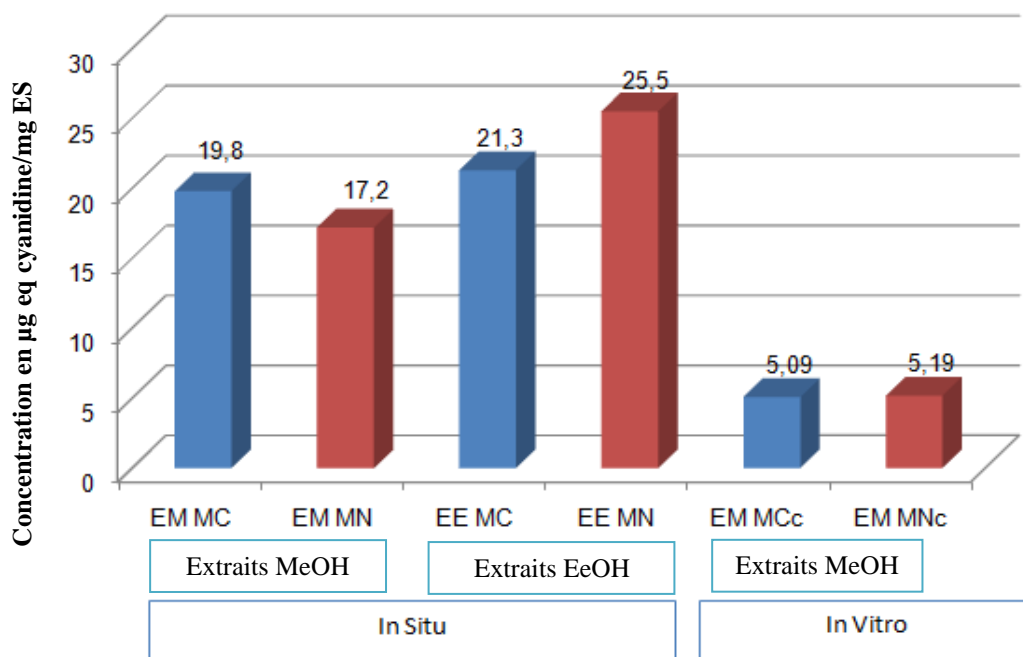


Figure 3.116: Concentrations en anthocyanes des différents extraits de *M. communis L.* et *M. nivellei Batt et Trab.*

### 3.3.3.3. Résultats du pouvoir anti-microbien

#### 3.3.3.3.1. 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 [360].

Nous avons constaté que le méthanol exerce une zone d'inhibition autour du disque. En revanche avec l'éthanol absolu, la souche se développe normalement. A la lumière de ces résultats, l'utilisation de l'éthanol est préférée pour dissoudre les extraits secs plutôt que le méthanol, qui exerce un effet bactéricide.

Nous avons enregistré 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 3.16). Concernant la levure *C. albicans*, une zone moyenne d'inhibition de 12 mm a été obtenue sous l'action de la nystatine.

Tableau 3.16: Effets de la nystatine sur les souches fongiques testées

Souche	Dose	Diamètre de l'auréole d'inhibition (mm)
<i>Candida albicans</i>	50 ppm/disque	12,50
<i>Alternaria sp</i>		09,00
<i>Fusarium oxysporium fsp albidinis</i>		00,00
<i>Fusarium oxysporium fsp lycopersici</i>		00,00
<i>Penicillium sp</i>		07,50

L'amoxicilline a un effet remarquablement positif sur les bactéries testées avec des zones d'inhibitions variables, une seule souche bactérienne a présenté une nette résistance vis-à-vis de cet antibiotique: *Shigella flexineri* (tableau 3.17).

Tableau 3.17 : Effets de l'amoxicilline sur les souches bactériennes testées.

Souche	Dose	Diamètre de l'auréole d'inhibition (mm)
<i>S pneumoniae</i>	30µg/disque	20
<i>E faecalis</i>		16
<i>S epidermidis</i>		7
<i>P aerogenosa</i>		23
<i>E coli</i>		8
<i>S aureus</i>		11
<i>S typhi</i>		17
<i>S flexineri</i>		-

### 3.3.3.3.2. Résultat de l'aromatogramme

Nous constatons que les extraits et les huiles essentielles des deux espèces présentent des activités anti-microbiennes (appendice M). Néanmoins, cette action est effective mais à différents degrés[367],. Le diamètre de la zone d'inhibition des cultures microbiennes est exprimé en millimètre (figure 3.117).



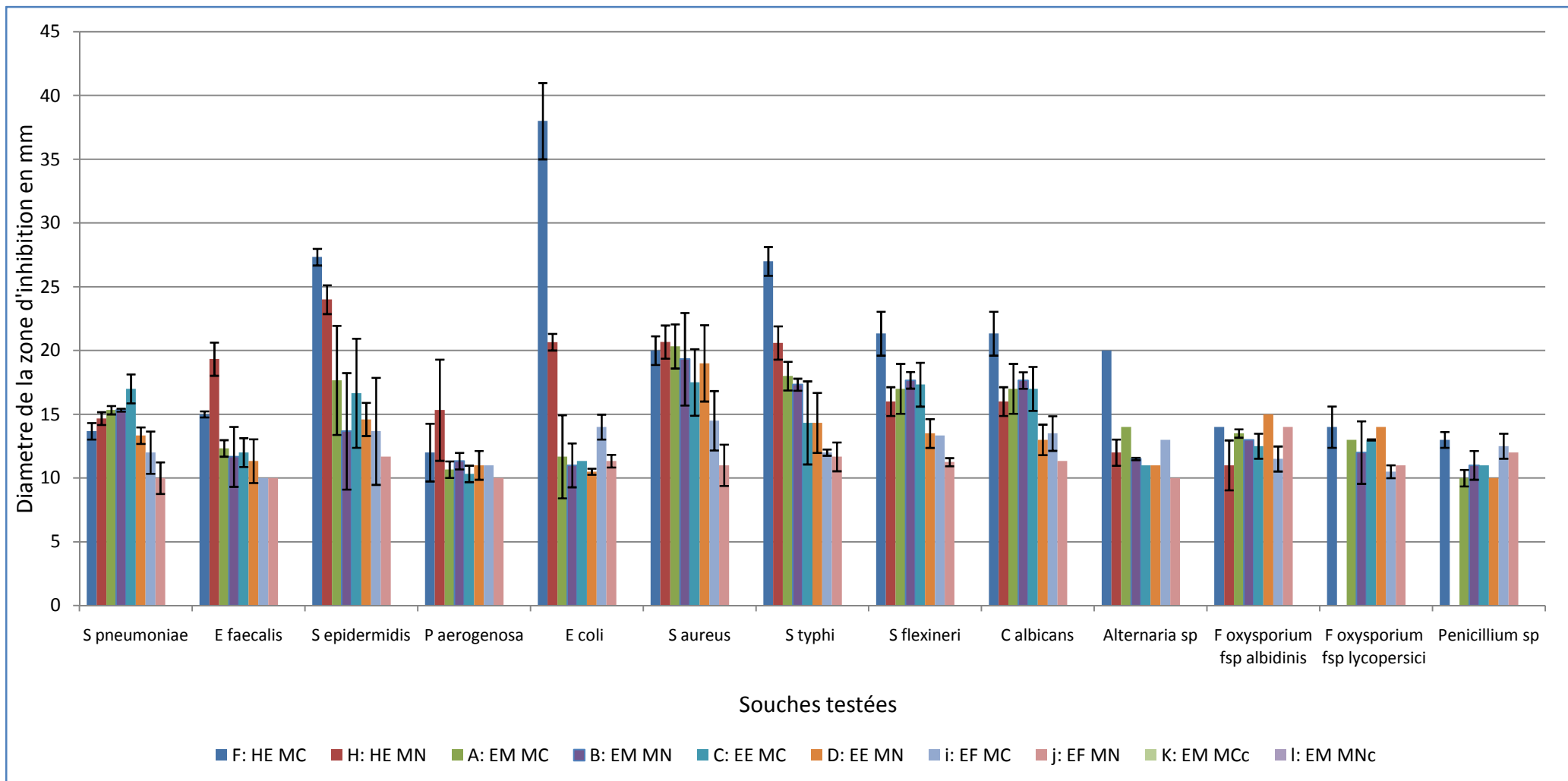


Figure 3.117: Activité des huiles essentielles et des extraits de *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab. sur la croissance des différentes souches étudiées (exprimée en diamètre de la zone d'inhibition)

- Les huiles essentielles

Les souches: *E faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S typhi*, *S flexineri* et *C albicans* ont présenté des zones d'inhibition allant de 15 à 20 mm (figures 3.118 a,b,d,e). Elles sont donc considérées comme des souches sensibles aux huiles essentielles de *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab. Cependant, ces essences se sont avérées moyennement actives sur les champignons phytopathogènes.

Le test avec l'huile essentielle de *M communis* L. a révélé une forte sensibilité de *E coli* où nous avons noté une zone d'inhibition de 38 mm.

Nos résultats concordent avec ceux de DELAURENTIS et al. [368] ainsi que YADEGARINIA et al. [224], qui parlent d'une très bonne activité anti-microbienne contre: *E coli*, *P aerogenosa*, *E faecalis*, *S aureus*, *S epidermidis* et *S flexineri*. Cette activité peut être dûe à la richesse de ces huiles en:  $\alpha$ -pinène, limonène, cinéole et terpinéol [369] [370].

L'action de l'huile essentielle de *M communis* L. sur *Alternaria sp* est remarquable où la valeur moyenne de l'auréole d'inhibition a été de 20 mm. Des zones d'inhibitions modérées (< 15 mm) ont été enregistrées avec *F oxysporum fsp albidinis*, *F oxysporum fsp lycopersici* et *Penicillium sp*. Des résultats similaires sont rapportés par DOMINIGUEZ et ORTEGA [371].

L'huile essentielle de l'espèce saharienne a montré une activité sur *P aerogenosa* avec une zone d'inhibition égale à 15 mm par rapport à *M communis* L. qui n'a pas dépassé 12 mm. Cependant, nous avons remarqué que l'action de l'huile essentielle de *M nivellei* Batt et Trab. sur *F oxysprum fsp lycopersici* et *Penicillium sp* est nulle.

L'effet synergique des composés aromatiques contenus dans l'huile essentielle du myrte sont les principaux responsables de cette activité:  $\alpha$ -pinène, limonène, cinéole et terpinéol, et qui sont connus pour leurs propriétés anti-microbiennes [372], leur mécanisme d'action n'est pas totalement élucidé, mais il est connu qu'ils fragilisent les membranes des micro-organismes [64].

Selon DOMINIGUEZ et ORTEGA [371], l'huile essentielle extraite des graines de *M communis* L. possède une action contre *Alternaria sp*, *Penicillium sp* et *Fusarium sp*.

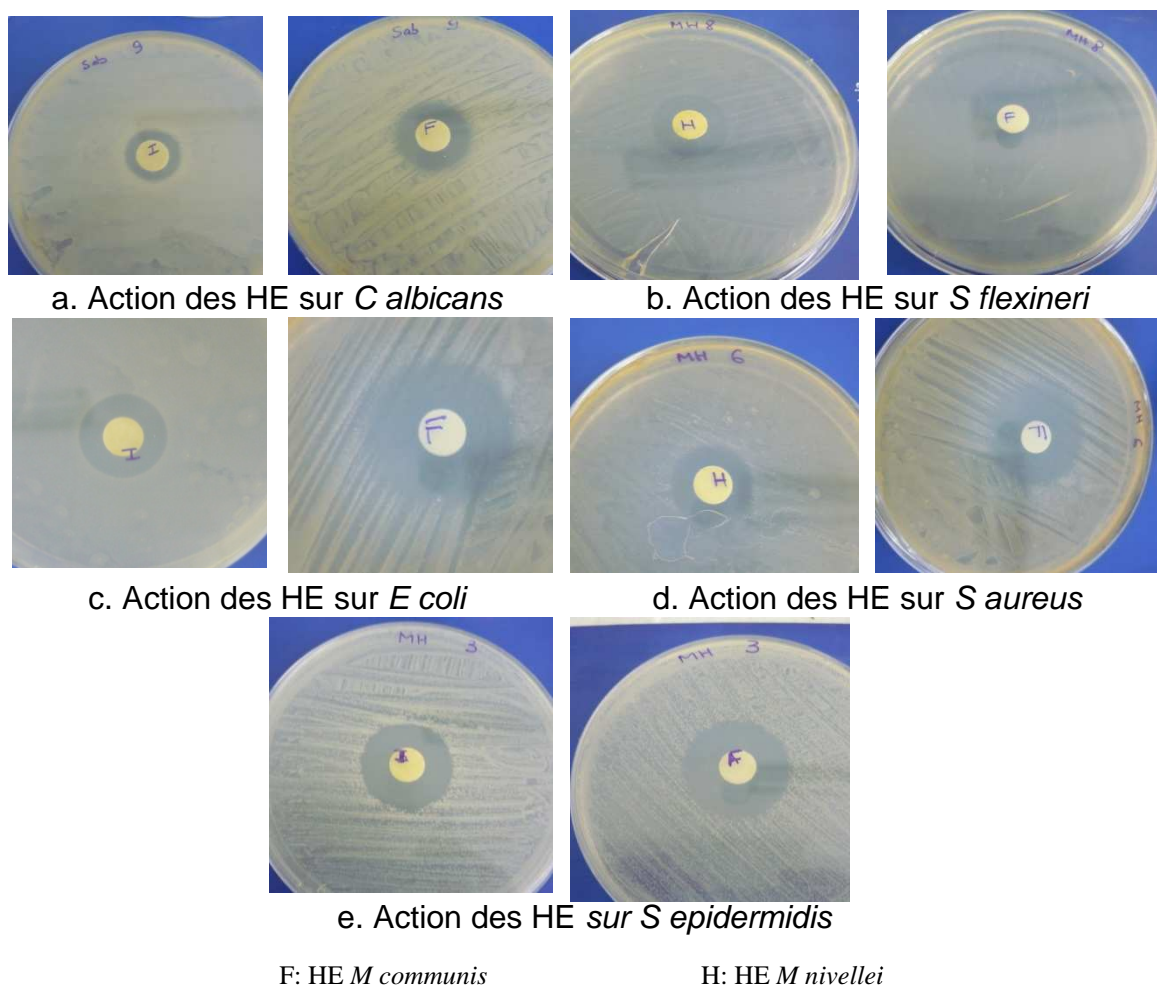


Figure 3.118 : Effets des huiles essentielles de *M. communis* L. et *M. nivellei* Batt et Trab. sur quelques souches testées

- Les extraits méthanoliques

Nous constatons que les extraits méthanoliques des plantes obtenues *in situ* présentent une action anti-microbienne. Néanmoins, cette action est effective mais à des degrés différents. Les souches: *S. pneumoniae*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. flexneri*, *S. typhi* et *C. albicans* ont toutes montré une nette sensibilité à l'égard de l'extrait méthanolique de *M. communis* L. Cependant, l'extrait de *M. nivellei* Batt et Trab. a présenté des résultats proches mais avec une zone d'inhibition réduite de l'ordre de 13,67 mm pour *S. epidermidis* (figure 3.119).

De nombreux travaux ont démontré l'effet anti-bactérien des extraits méthanoliques sur de nombreuses bactéries [239] [268]. Cet effet anti-bactérien significatif est attribué particulièrement aux phloroglucinols [373] et à leur richesse en polyphénols [187].

Pour ce qui est des extraits méthanoliques des cals, nous avons noté une grande résistance de toutes des souches testées, où aucune zone d'inhibition n'a été détectée avec les extraits des cals de *M communis* et *M nivellei*. On attribue cette grande résistance à leur stade de croissance juvénile, n'ayant pas encore développé assez de métabolites susceptibles d'avoir un effet anti-microbien.

- Les extraits éthanoliques

Les souches: *S flexineri*, *C albicans* et *S pneumoniae* et surtout *S aureus* présentent toutes une sensibilité remarquable à l'égard des extraits éthanoliques de *M communis* L., avec des zones d'inhibition de 16 à 17 mm. Cependant, le reste des souches présentent une sensibilité modérée (figure 3.119).

L'extrait éthanolique de *M nivellei* possède un excellent pouvoir anti-microbien, contre *S aureus* (19mm) et *F oxysporum fsp albidinis* (15mm), cette dernière s'est montrée plus ou moins résistante face aux autres extraits testés.

Les extraits éthanoliques de *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab. paraissent moins actifs que leurs homologues méthanoliques, et pratiquement inactifs face à *P aerogenosa*. Cette résistance n'est pas surprenante, elle est en relation avec la nature de sa membrane externe, qui lui confère une résistance à la plupart des agents biocides [374].

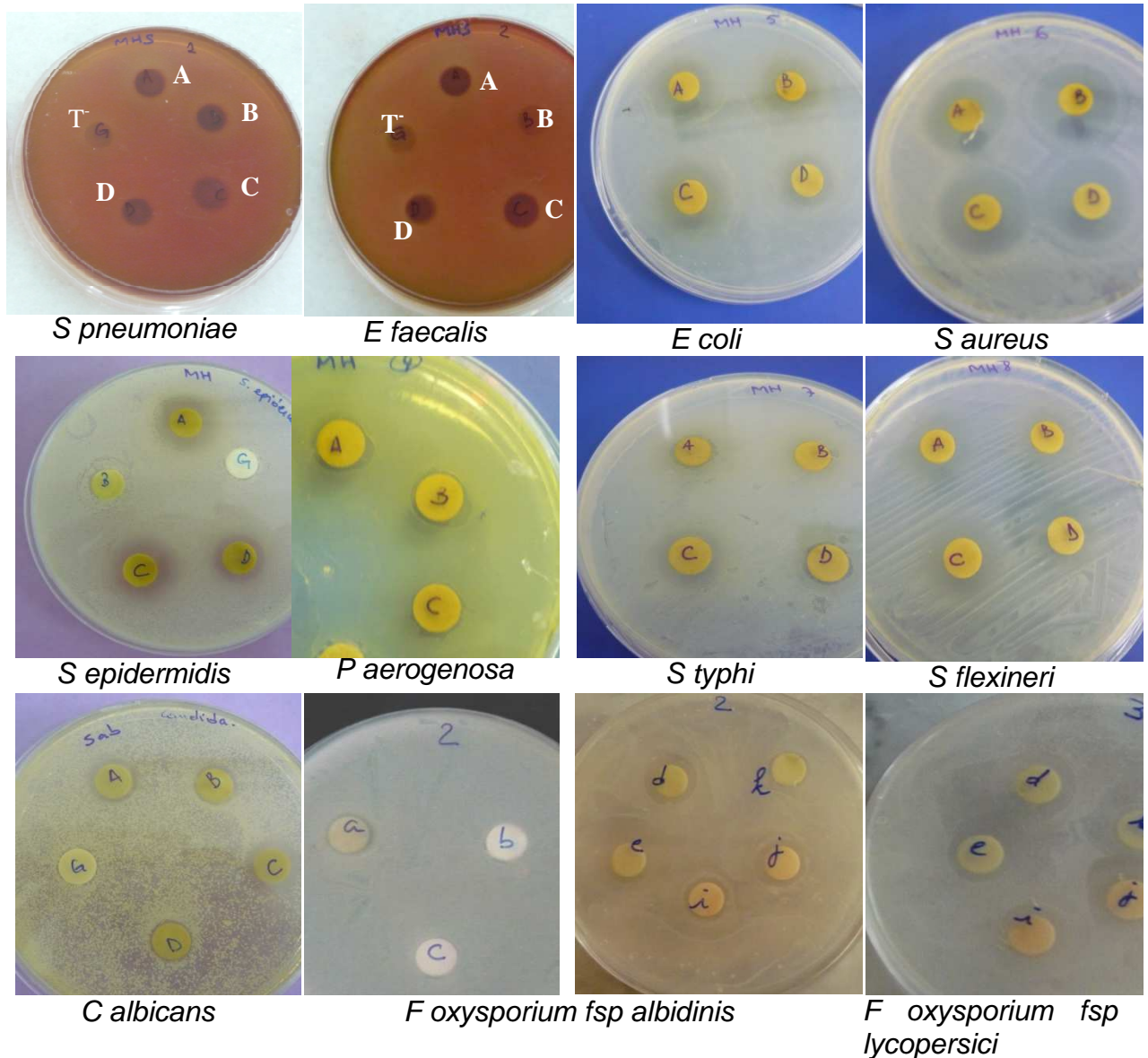
- Les extraits flavonoïdiques

L'extrait flavonoïdique de *M communis* L. présente une action modérée sur *E coli*, *S aureus*, *S epidermidis* et *C albicans* dont les zones d'inhibition apparaissent entre 12 et 14 mm (figure 3.119).

Avec les extraits flavonoïdiques, à la concentration de 50 µg par disque, une faible activité est constatée. Ce qui nous amène à supposer que cette concentration est trop faible pour exercer une action anti-microbienne.

Les champignons ont montré une nette résistance face à ces extraits, l'exception est observée avec l'extrait flavonoïdique de *M nivellei* Batt et Trab. qui a exercé une action sensibilisante contre *F oxysporum fsp albidinis* avec une zone d'inhibition de 14mm.

La souche *Alternaria sp* est remarquablement la plus résistante de tous les champignons testés. HOLETZ et al. [375] ont rapporté que certains extraits bruts naturels peuvent favoriser la prolifération et l'envahissement du mycélium.



A: extrait méthanolique de *M communis*      T: témoin négatif  
 B: extrait méthanolique de *M nivellei*      J: extrait flavonoïdique de *M nivellei*  
 C: extrait éthanolique de *M communis*      K: extrait méthanolique des cals de *M communis*  
 D: extrait éthanolique de *M nivellei*      i: extrait flavonoïdique de *M communis*

Figure 3.119: Effets de certains extraits alcooliques et flavonoïdiques de *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab. sur quelques souches testées.

### 3.3.3.4. Résultats des tests du pouvoir anti-oxydant

#### 3.3.3.4.1. Résultats du Test au DPPH

Les pourcentages d'inhibition des radicaux libres des différentes substances testées, extraites à partir de *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab. ont été comparés avec les contrôles positifs (tableau 3.18)

La EC<sub>50</sub> définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH [376]. Cette dernière est déterminée graphiquement, à partir de trois essais indépendants dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait brut et l'ordonnée l'activité anti-oxydante en pourcentage, soumise à une régression linéaire.

Un autre paramètre exprimant la puissance anti-radicalaire a été calculé à partir du premier paramètre nommé : "ARP" qui est égale à 1/EC<sub>50</sub>. Les valeurs ARP de tous les extraits sont significatives (tableau 3.18). Plus ces valeurs s'éloignent du zéro, plus la puissance anti-oxydante augmente.

Tableau 3.18: Effet anti-oxydant des huiles essentielles et des extraits de *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab. par le test DPPH

	Contrôles positifs			<i>In situ</i>								<i>In vitro</i>	
				HE		Extraits MeOH		Extraits EtOH		Extraits flavonoid		Extraits MeOH	
	Vit C	Vit E	Quer	MC	MN	MC	MN	MC	MN	MC	MN	MC	MN
% inhibition	86,62	51,27	85,56	2,32	2,18	77,52	52,00	81,01	78,81	90,55	74,08	47,90	33,49
EC <sub>50</sub> (mg/ml)	0,39	0,99	0,43	23,12	26,06	0,69	0,98	0,49	0,59	0,18	0,71	1,01	1,44
PAR	2,56	1,01	2,32	0,04	0,04	1,45	1,02	2,04	1,69	5,56	1,41	0,99	0,69

#### 3.3.3.4.1.1. Les huiles essentielles

D'après les résultats, il semble qu'il existe une relation inversement proportionnelle entre la valeur de l'absorbance et la concentration de l'huile testée. Nous avons mesuré l'activité anti-oxydante de trois concentrations croissantes pour chaque huile essentielle (0,25/0,5 et 1mg/ml), afin de déterminer la EC<sub>50</sub> correspondant à la concentration de l'huile qui inhibe 50% des radicaux libres.

Les huiles essentielles des deux espèces présentent une activité infiniment faible par rapport aux contrôles positifs testés. L'huile essentielle de *M communis* L. présente un pouvoir anti-oxydant égale à 2,32% (EC<sub>50</sub>= 23,12mg/ml) alors que *M nivellei* Batt et Trab. présente 2,18% (EC<sub>50</sub>=26,06mg/ml). Les pouvoirs anti-oxydants des trois contrôles positifs sont largement supérieurs (figure 3.120, figure 3.121, figure 3.122 et figure 3.123).

Les résultats du pouvoir anti-oxydant obtenus pour les huiles essentielles concordent avec les travaux effectués par YADERGARINIA et *al.* [224], qui ont rapporté que l'huile essentielle de *M communis* L. 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 cinéole présente dans l'huile essentielle testée.

De nombreux travaux rapportent que les composés majoritaires des huiles essentielles étudiées dont l' $\alpha$ -pinène, le cinéole et le limonène sont connus pour leur importante activité anti-oxydante [377].

MOHAMMEDI [29] rapporte que pour les huiles essentielles, l'activité anti-oxydante sera davantage augmentée de façon significative lorsqu'on prolonge le temps d'incubation.

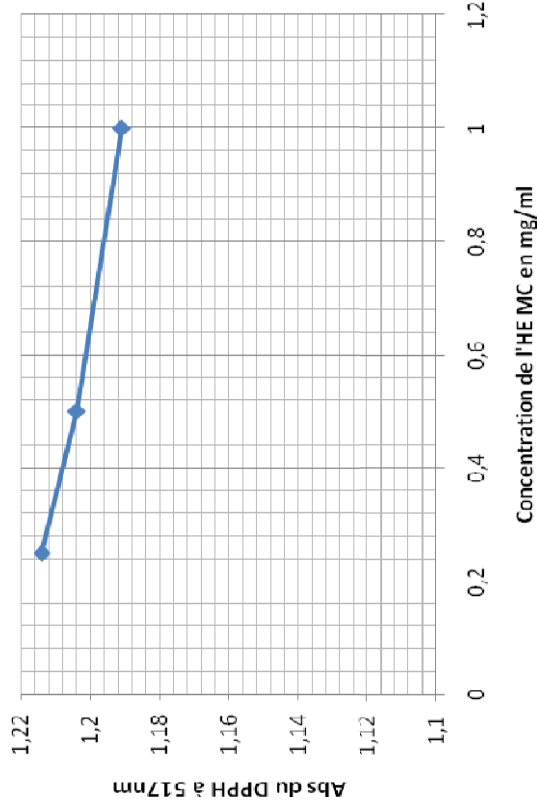


Figure 3.120 : Pouvoir antioxydant de l'huile essentielle de *M communis* L. (*in situ*)

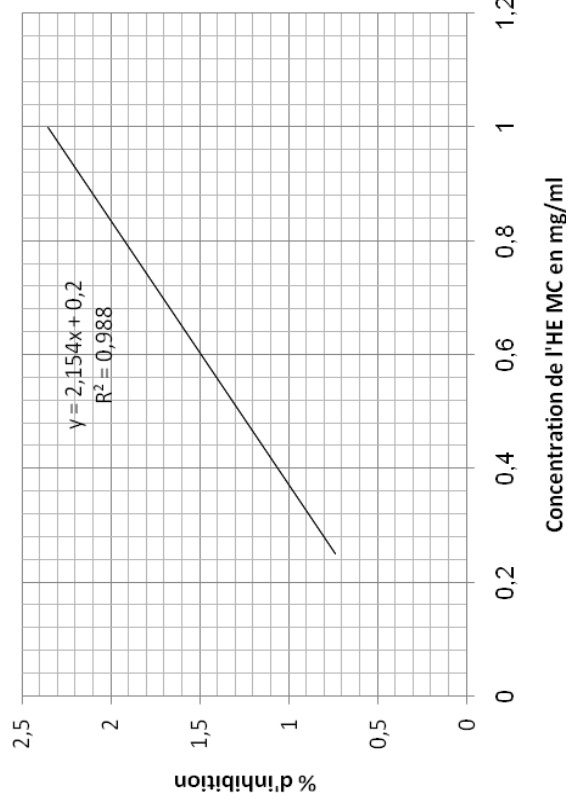


Figure 3.122: Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'huile essentielle de *M communis* à différentes concentrations

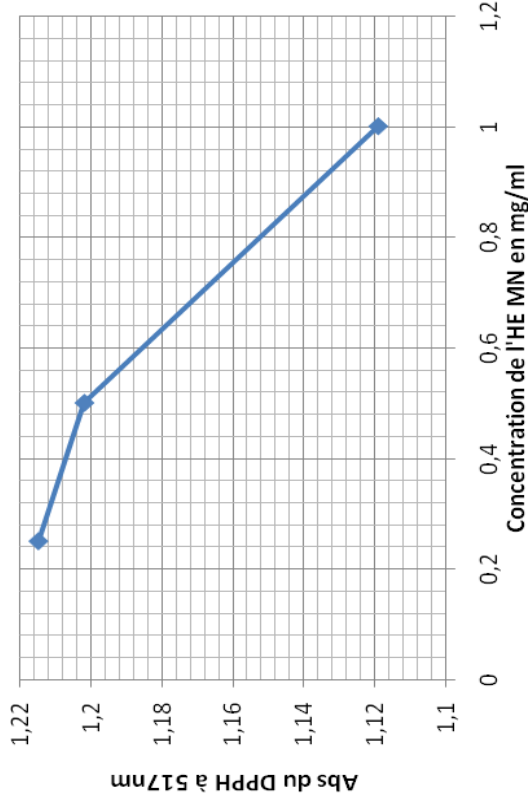


Figure 3.121: Pouvoir antioxydant de l'huile essentielle de *M nivellei* Batt et Trab. (*in situ*)

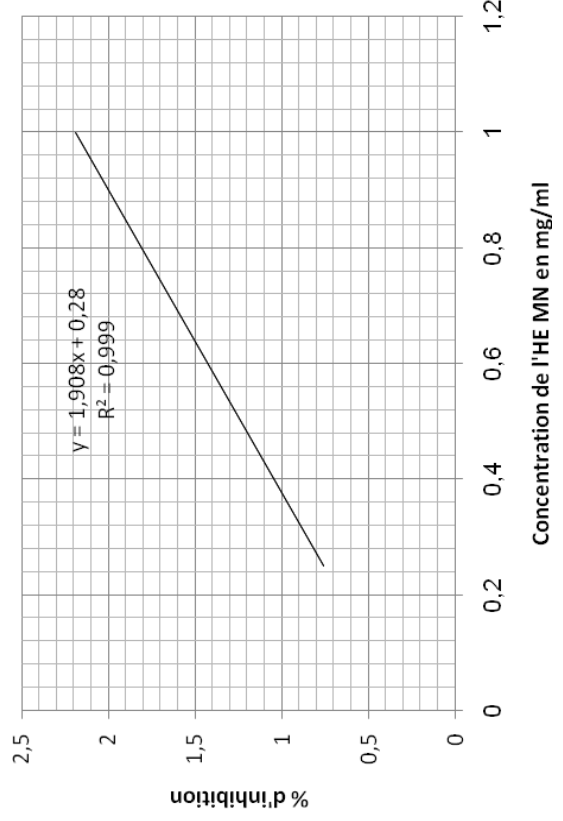


Figure 3.123: Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'huile essentielle de *M nivellei* à différentes concentrations



### 3.3.3.4.1.2. Les extraits alcooliques

#### 3.3.3.4.1.2.1. Les extraits éthanoliques

On note la présence d'une relation inversement proportionnelle entre l'absorbance et la concentration de l'extrait à tester (figure 3.124 et figure 3.125). 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 l'extrait éthanolique de *M communis* L. exerce 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 *M nivellei* Batt et Trab (figure 3.126 et figure 3.127).

Toutefois, Il existe une corrélation linéaire ( $r^2=0,98$ ) entre le pouvoir anti-oxydant et la teneur des extraits éthanoliques en polyphénols.

De plus, il n'y a pas de différence significative entre les extraits éthanoliques, la quercétine et l'acide ascorbique utilisés en tant que contrôles positifs, or l'alpha tocophérol semble être moins efficace que ces extraits.

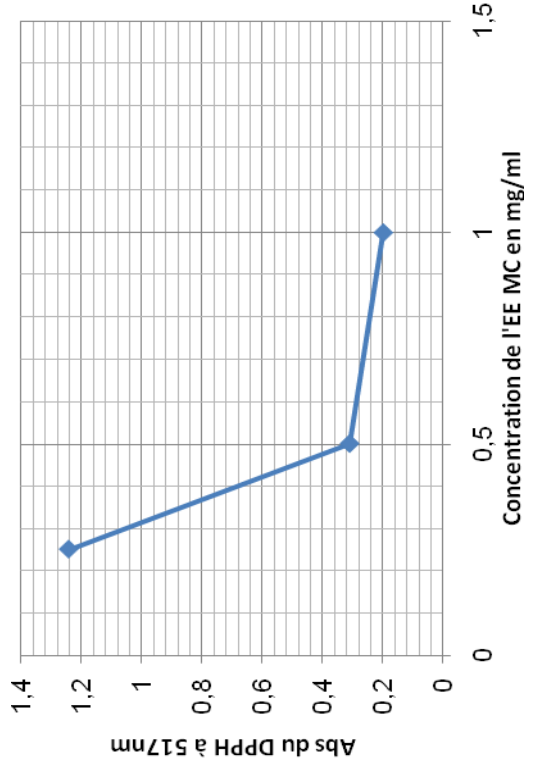


Figure 3.124 : Pouvoir antioxydant de l'extrait éthanolique de *M communis* L. (*in situ*)

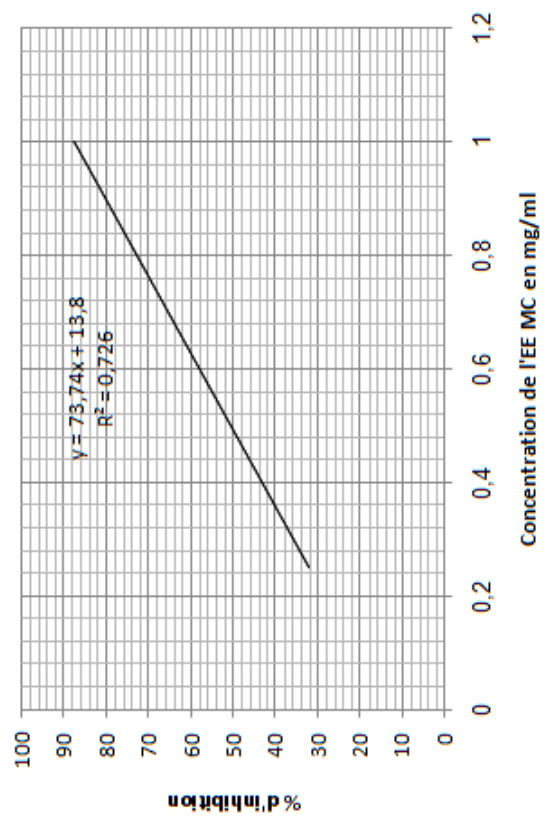


Figure 3.126: Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait éthanolique de *M communis* à différentes concentrations

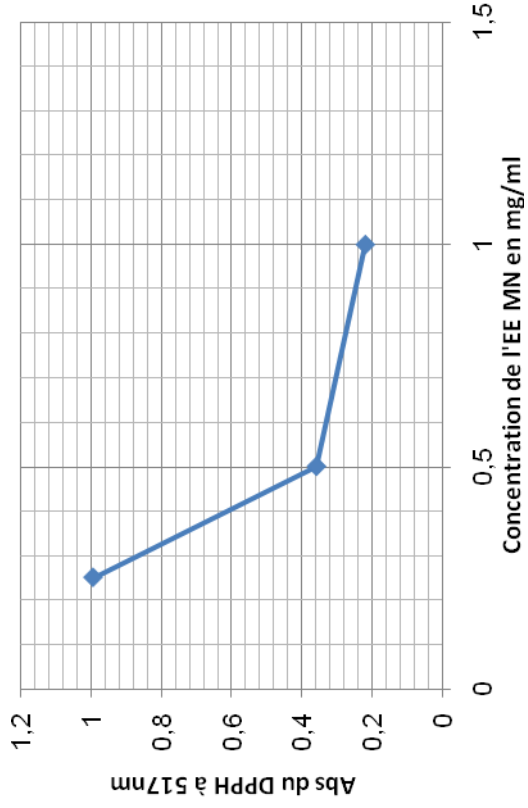


Figure 3.125 : Pouvoir antioxydant de l'extrait éthanolique de *M nivellei* Batt et Trab. (*in situ*)

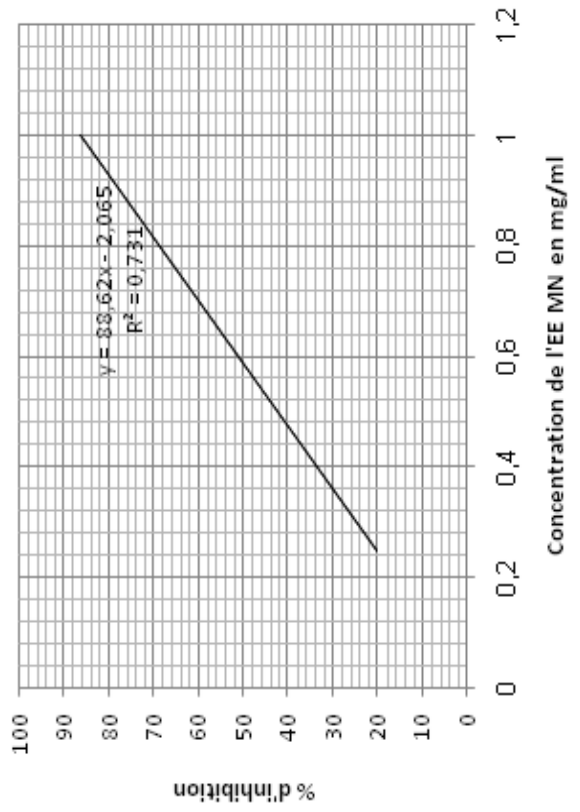


Figure 3.127: Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait éthanolique de *M nivellei* à différentes concentrations

#### 3.3.3.4.1.2.2. Les extrait méthanoliques

L'absorbance du DPPH mesurée à 517 nm, montre une diminution importante de cette dernière au fur et à mesure que l'on augmente la concentration de l'extrait testé, ceci plaide en faveur d'une relation de type dose-dépendante (figure 3.128, figure 3.129, figure 3.132, figure 3.133).

Les extraits méthanoliques des plantes obtenues en *in situ* ont présenté des pourcentages d'inhibition de 77,52% ( $EC_{50}=0,69\text{mg/ml}$ ) pour *M communis* L. et 52% ( $EC_{50}=0,98\text{mg/ml}$ ) pour *M nivellei* Batt et Trab. Ces résultats sont meilleurs que ceux de l' $\alpha$  tocophérol, mais demeurent, toutefois, inférieures aux résultats obtenus avec la vitamine C 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 3.130, figure 3.131, figure 3.134, figure 3.135). Il côtoie 47,90% ( $EC_{50}=1,01\text{mg/ml}$ ) pour *M communis* L. et environs 33,49% ( $EC_{50}=1,44\text{mg/ml}$ ) seulement pour *M nivellei* Batt et Trab.

Les travaux de BANERJEE et al. [378], 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  $EC_{50}$  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 [379] [380].

La  $EC_{50}$  de *M communis* L., rapportée par les travaux de GARDELI et al. [221] est incluse entre 0,0095 et 0,017mg/ml, la plus faible  $EC_{50}$  correspond à la plus grande activité anti-oxydante, ces mêmes auteurs ont également démontré que les extraits de *M communis* L. récoltés pendant la période estivale étaient les plus anti-oxydants.

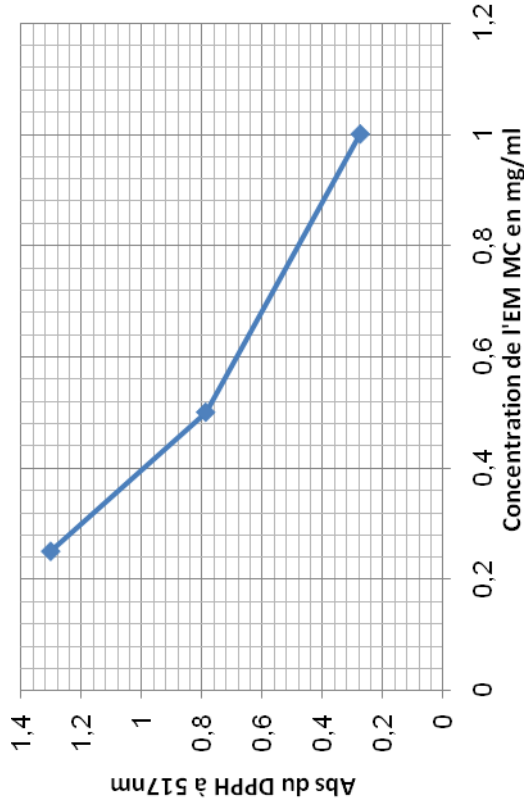


Figure 3.128 : Pouvoir antioxydant de l'extrait méthanolique de *M communis* L. (*in situ*)

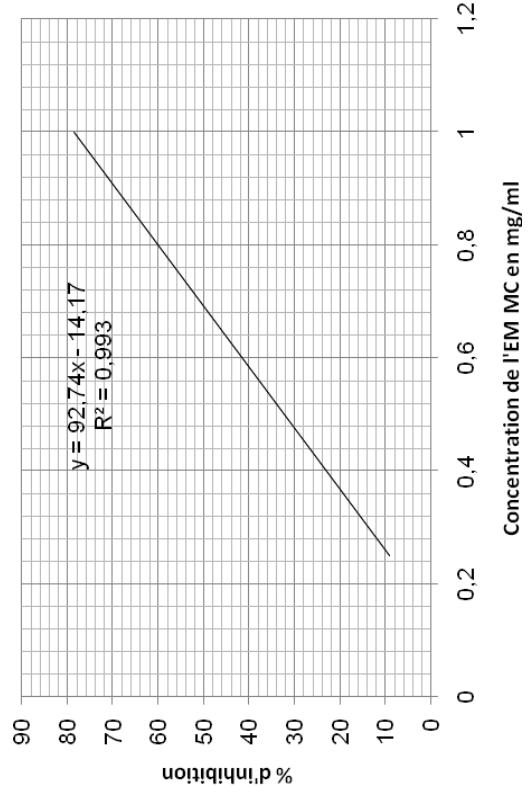


Figure 3.130: Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait méthanolique de *M communis* à différentes concentrations

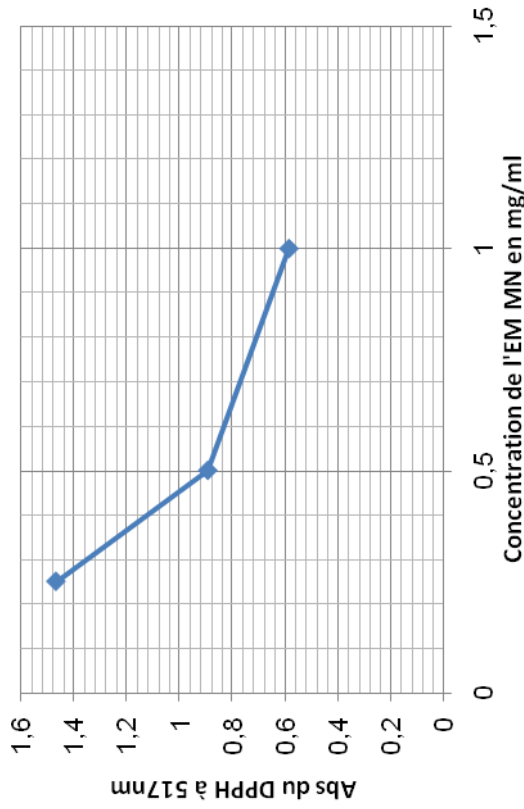


Figure 3.129 : Pouvoir antioxydant de l'extrait méthanolique de *M nivellei* Batt et Trab. (*in situ*)

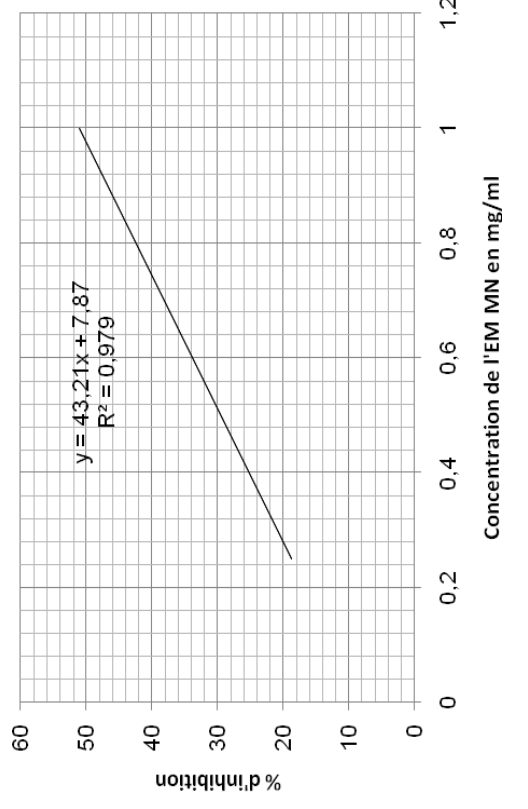


Figure 3.131: Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait méthanolique de *M nivellei* à différentes concentrations

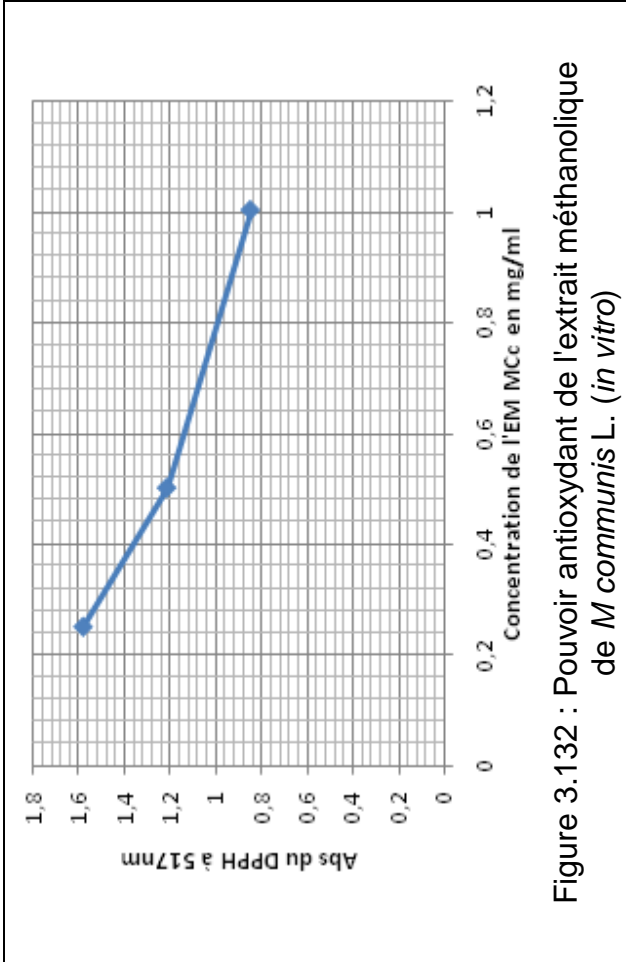


Figure 3.132 : Pouvoir antioxydant de l'extrait méthanolique de *M communis* L. (*in vitro*)

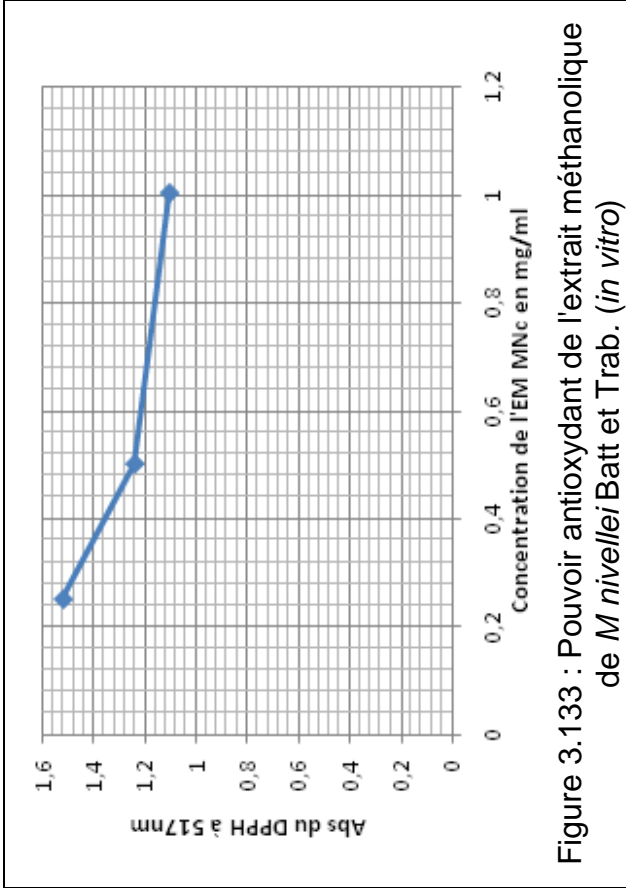


Figure 3.133 : Pouvoir antioxydant de l'extrait méthanolique de *M nivellei* Batt et Trab. (*in vitro*)

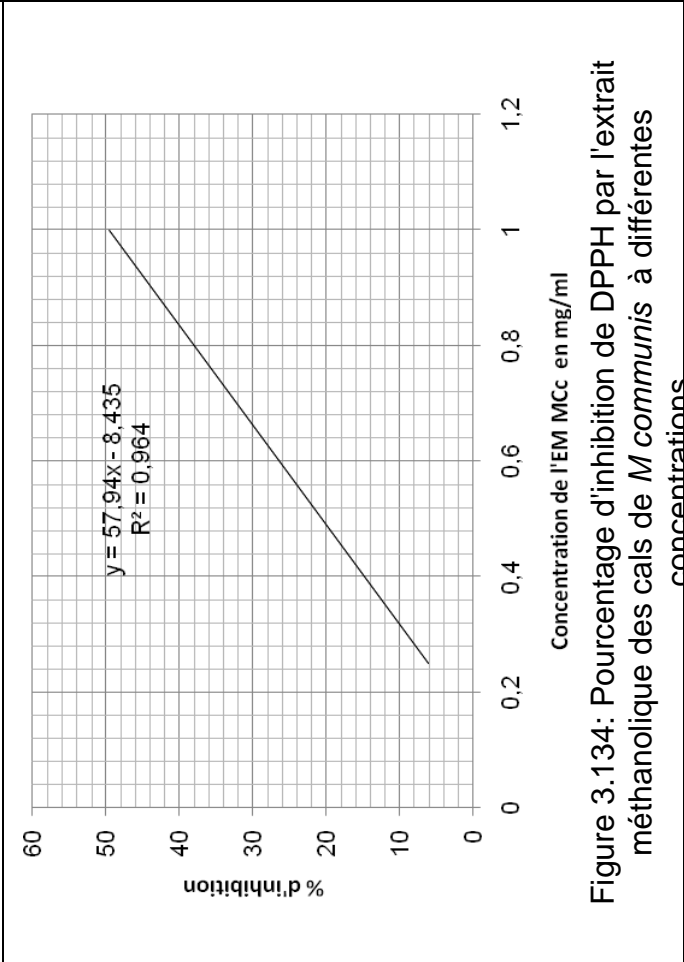


Figure 3.134: Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait méthanolique des cals de *M communis* à différentes concentrations

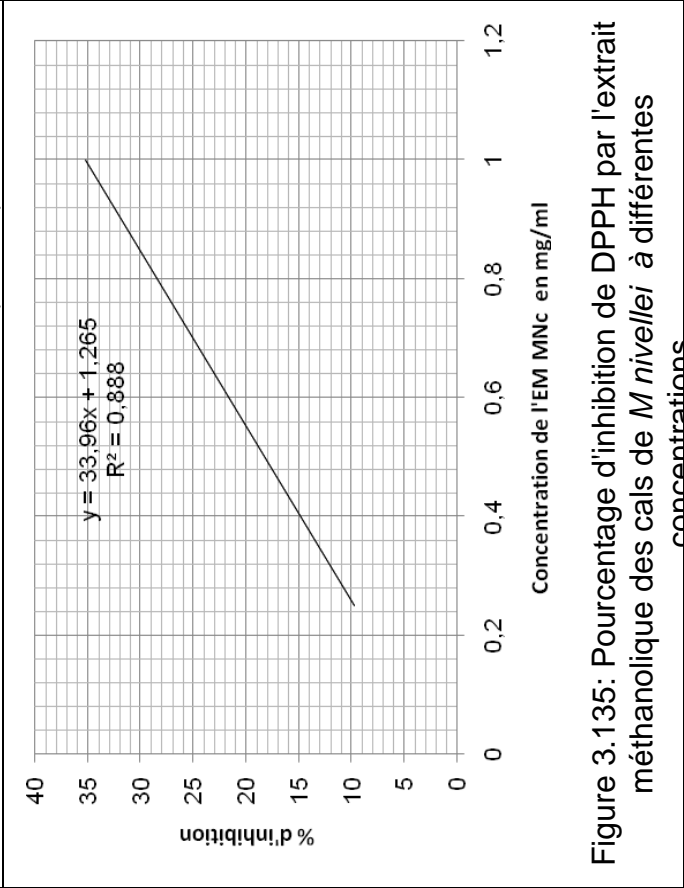


Figure 3.135: Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait méthanolique des cals de *M nivellei* à différentes concentrations

#### 3.3.3.4.1.3. les extraits flavonoïdiques

Nous avons déterminé les valeurs des  $EC_{50}$  de chaque extrait testé à partir des représentations graphiques (figure 3.136, figure 3.137, figure 3.138 et figure 3.139).

De nombreux travaux ont montré que les flavonoïdes d'origine naturelle sont des excellents capteurs de radicaux libres [327] [381].

On note une baisse rapide de la densité optique des différentes doses d'extraits flavonoïdiques de *M communis* L. testés dans un intervalle très réduit à 517nm, ceci confirme que l'activité anti-oxydante de ces extraits est de type dose-dépendante. Les résultats obtenus nous permettent de tracer les graphes montrant la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait:

- Le pouvoir anti-oxydant de l'extrait flavonoïdique de l'espèce *M communis* L. a été estimé à 90,55% ( $EC_{50}=0,18\text{mg/ml}$ ), il s'avère plus élevé que celui des trois contrôles positifs testés dans les mêmes conditions.
- L'espèce *M nivellei* Batt et Trab. a donné un pourcentage d'inhibition de 74,08% ( $EC_{50}= 0,71\text{mg/ml}$ ), bien qu'il soit moins important que celui de *M communis* L., de la vitamine C et de la quercétine, mais semble avoir un effet meilleur que celui de l'alpha tocophérol.

Les  $EC_{50}$  des extraits flavonoïdiques sont très bas, cependant, ils sont dotés d'un pouvoir anti-radicalaire potentiellement élevé, par rapport aux huiles essentielles ou aux extraits alcooliques.

Il existe également une corrélation entre la composition en polyphénols et l'intensité du pouvoir anti-oxydant pour l'ensemble des extraits testés.

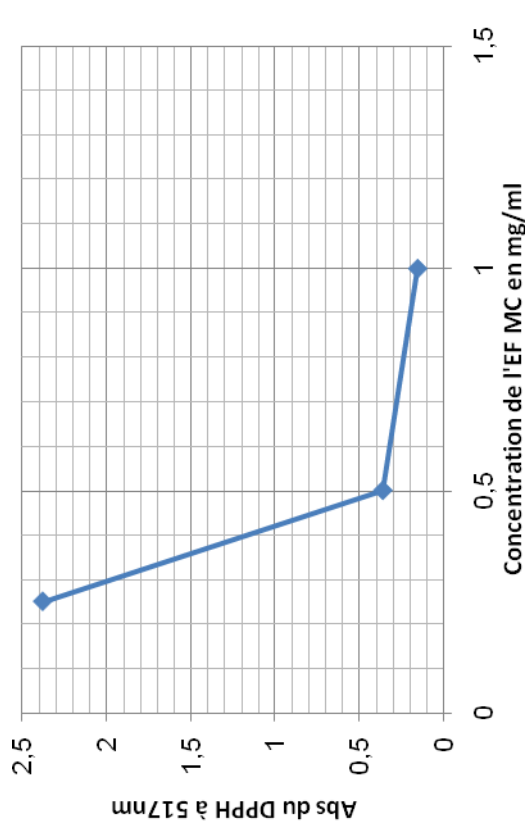


Figure 3.136: Pouvoir antioxydant de l'extrait flavonoïdique de *M communis* L. (*in situ*)

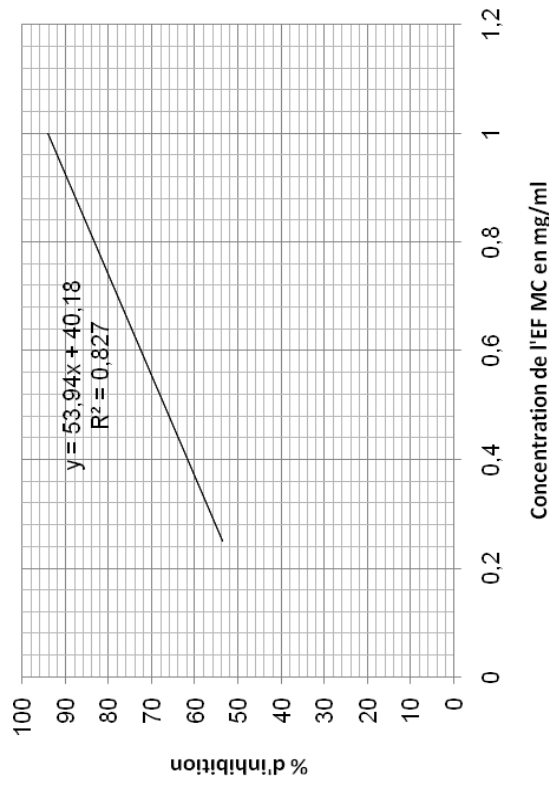


Figure 3.138: Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait flavonoïdique de *M communis* à différentes concentrations

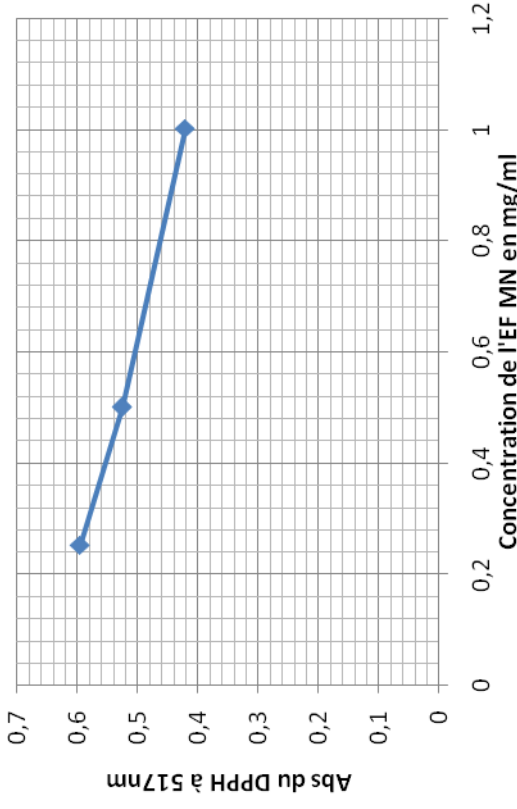


Figure 3.137: Pouvoir antioxydant de l'extrait flavonoïdique de *M nivellei* Batt et Trab. (*in situ*)

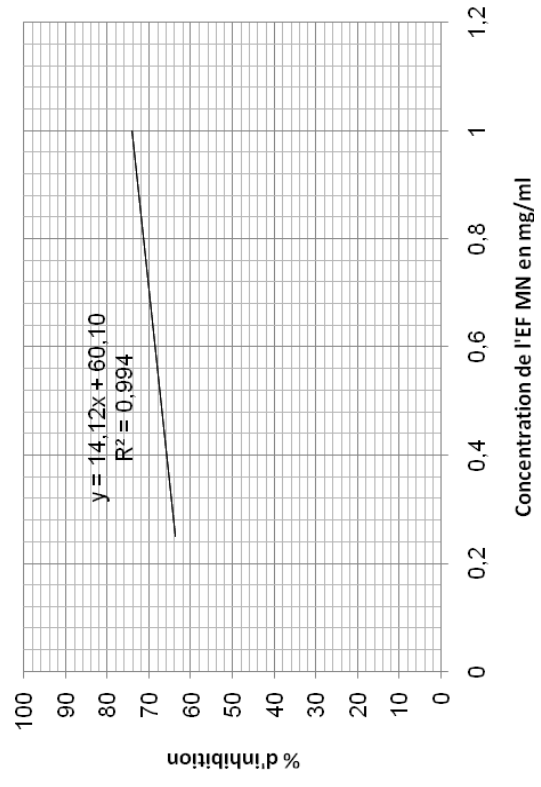


Figure 3.139: Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait flavonoïdique de *M nivellei* à différentes concentrations

Les flavonoïdes sont des molécules connues pour leurs propriétés anti-oxydantes [380]. L'étude menée par TUBEROSO et *al.* [382] a prouvé l'activité réductrice des baies de *M communis* L. et a démontré que leur richesse en anthocyanines, leur procure une protection supplémentaire contre le processus d'oxydation.

D'après les travaux menées par MOHAMMEDI [29], les extraits flavonoïdiques présentent toujours un potentiel anti-oxydant très fort, en comparaison avec les huiles essentielles ou les extraits alcooliques.

Le pouvoir réducteur des extraits étudiés est lié à la richesse de ces derniers en flavonoïdes et en flavonols, présents en concentrations importantes [231] [233] [383].

Ces résultats confirment la présence d'une corrélation 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 [384] [379]. De plus, la consommation de produits riches en polyphénols naturels semble prévenir contre les maladies causées par les radicaux libres [385].

#### 3.3.3.4.2. Résultats du pouvoir inhibiteur de la peroxydation de l'acide linoléique

Afin d'évaluer l'action des huiles essentielles et des extraits sur l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique, nous avons effectué un test sur une période d'une semaine.

Nous avons utilisé l'acide ascorbique comme contrôle positif (Cp). L'intensité de la réaction colorimétrique est d'autant plus importante que l'échantillon testé est riche en radicaux libres (tableau 3.19, figure 140a et figure 140b).

Tableau 3.19 : Pourcentages d'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique ((J<sub>5</sub>).

	Control positif Cp	<i>In situ</i>								<i>In vitro</i>	
		HE MC	HE MN	EM MC	EM MN	EE MC	EE MN	EF MC	EF MN	EM MCc	EM MNc
%inhibition	50,5706	92,2739	56,8042	87,4451	74,0122	98,6830	93,5030	76,9095	67,9543	66,8129	82,8797



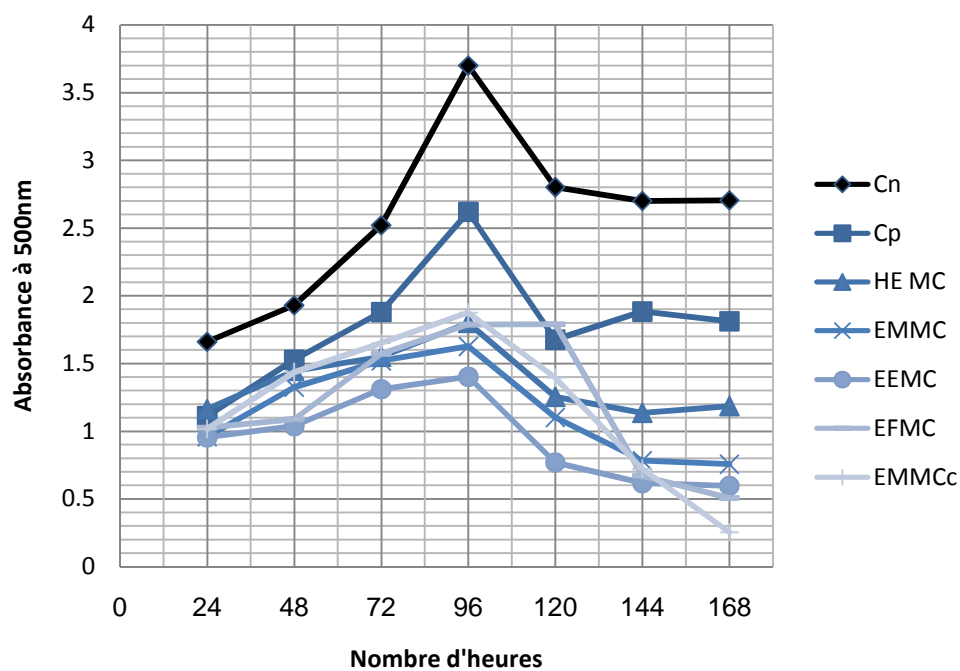


Figure 3.140a: Effet de l'huile essentielle et des extraits de *M communis* L. sur l'évolution de la peroxydation de l'acide linoléique

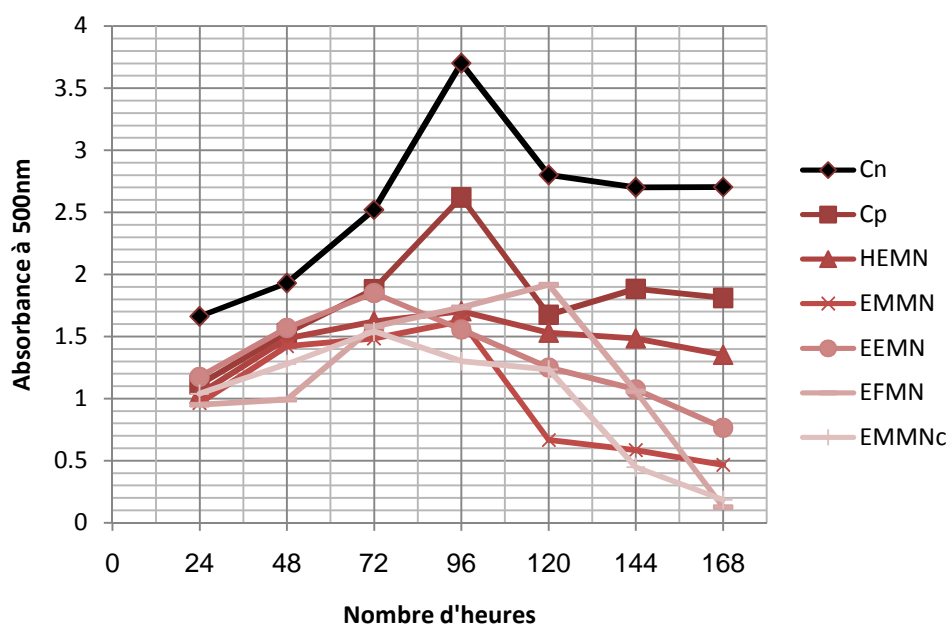


Figure 3.140b: Effet de l'huile essentielle et des extraits de *M nivellei* Batt et Trab. sur l'évolution de la peroxydation de l'acide linoléique

Cp: contrôle positif	Cn: contrôle négatif
HE: huile essentielle	MC: <i>M communis</i>
EM: extrait méthanolique	MN: <i>M nivellei</i>
EE: extrait éthanolique	MCC: <i>M communis</i> calcs
EF: extrait flavonoïdique	MNC: <i>M nivellei</i> calcs

D'après les résultats obtenus pour le contrôle négatif (Cn), nous remarquons que l'absorbance augmente progressivement jusqu'au 4<sup>ème</sup> jour puis connaît une réduction vers le 5<sup>ème</sup> jour, et demeure stagnante au-delà. Ceci s'explique par le fait qu'au cours des quatre premiers jours, l'acide linoléique a été soumis à une importante oxydation (tableau 3.24), engendrant des hydro-péroxydes d'acide linoléique qui sont des produits d'oxydation

Ces produits d'oxydation réagissent avec le chlorure de fer pour former le chlorure ferrique, puis le thiocyanate ferrique de couleur rouge-sang. Après 120h d'incubation, la formation des peroxydes est stagnante en raison de la non disponibilité de l'acide linoléique qui se traduit par une absorbance stable. De plus les produits intermédiaires ont tous été convertis en produits finaux stables. Autrement dit, la totalité de l'acide gras a été oxydée.

Le contrôle positif (Cp) a présenté des absorbances plus basses par rapport à celles enregistrées par le contrôle négatif, ce qui explique un comportement préservateur ou conservateur de l'acide ascorbique contre l'oxydation rapide de l'acide linoléique. Cet effet justifie son usage dans de nombreux domaines agro-alimentaires et cosmétiques [330].

La non disponibilité des hydro-péroxydes retarde l'oxydation du  $\text{FeCl}_2$ , et par conséquent l'absorbance n'augmente plus en présence de l'acide ascorbique, l'oxydation de l'acide linoléique est très ralentie, donc la couleur est moins intense.

- L'espèce *M communis* L.

L'extrait éthanolique et l'huile essentielle testés par la méthode thiocyanate, ont montré une excellente capacité de ralentir la peroxydation de l'acide linoléique (figure 3.140a). Cependant, l'extrait méthanolique, l'extrait flavonoïdique et l'extrait des calcs ont respectivement montré, eux aussi, des pourcentages d'inhibition largement supérieurs à ceux du contrôle positif (tableau 3.19). Il reste à signaler que l'extrait flavonoïdique présente la faculté de ralentir l'oxydation complète de l'acide linoléique jusqu'au 5<sup>ème</sup> jour.

On peut les classer selon l'ordre décroissant:

Extrait éthanolique (98,6830%) > huile essentielle (92,2739%) > extrait méthanolique (87,4451%) > extrait flavonoïdique (76,9095%) > extrait méthanolique des calcs (66,8129%) > Cp (50,5706%)

- L'espèce *M nivellei* Batt et Trab.

Il paraît clairement que l'extrait éthanolique ainsi que l'extrait des cals exercent un excellent effet inhibiteur de la lipo-péroxydation avec des pourcentages dépassant 80% (figure 3.140b et tableau 3.19).

Quant à l'extrait méthanolique, il présente également un très bon effet avec un pourcentage de 74,0122%, suivi par l'extrait flavonoïdique. Cependant, l'huile essentielle a marqué le plus faible pourcentage, mais qui demeure toutefois supérieure à celui du contrôle positif (Cp).

De façon générale, le classement selon l'ordre décroissant est:

Extrait éthanolique (93,5030%) > extrait méthanolique des cals (82,8797%) > extrait méthanolique (74,0122%) > extrait flavonoïdique (67,9543%) > huile essentielle (56,8042%) > Cp (50,5706%).

YADERGARINA et al. [224] ont constaté que l'huile essentielle de *M communis* L. présente un effet inhibiteur de la lipo-péroxydation, meilleur que celui du test DPPH. Ceci peut être lié à la grande spécificité de la méthode thiocyanate pour les composés lipophiles.

Les travaux de BANERJEE et al. [378], sur l'extrait méthanolique de *Syzygium cumini*, appartenant à la famille des myrtaceae, ont rapporté qu'elle présente un pouvoir inhibiteur de la lipo-péroxydation avec une  $EC_{50}=222\mu\text{g/ml}$ .

Quant à l'aspect biochimique des cals, THORPE et GASPER [386] 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 être l'indication d'une réduction du niveau auxinique endogène [387]. Cette propriété est très recherchée en industrie agro-alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie, pour obtenir de nouvelles molécules naturelles, susceptibles de remplacer les conservateurs synthétiques.

#### 3.3.3.4.3. Résultats du pouvoir chélateur du fer

Le pourcentage de chélation des ions  $\text{Fe}^{2+}$  exercé par l'acide ascorbique est égale à 43,2164%, il paraît être dix fois plus important, que celui de la quercétine

n'ayant exprimé que 4,9813% (figure 3.141). Quant aux extraits testés, nous pouvons déduire que:

- L'extrait méthanolique de l'espèce *M communis*, présente un pouvoir chélateur de 14,8908%, qui est quatre fois supérieur à celui exprimé par *M nivellei* (3,309%).
- Pour ce qui est des extraits méthanoliques des calcs, le pouvoir chélateur est très remarquable avec 73,1303% pour *M communis* et 66,7107% pour *M nivellei*, ces taux paraissent largement supérieurs à celui de Cp.
- Les extraits éthanoliques des deux espèces présentent un pouvoir chélateur remarquablement supérieur à celui du contrôle positif utilisé.
- L'extrait flavonoïdique de *M communis* marque un pourcentage de chélation de 46,7902%, légèrement supérieur à celui de l'acide ascorbique, alors que l'espèce *M nivellei* n'a exprimé que 35,1422%.
- Les huiles essentielles ont exercé le plus fort pouvoir chélateur, où le pourcentage d'inhibition moyen dépasse 80% chez les deux espèces.

Selon GARDELI et al. [221], l'extrait méthanolique de *M communis* L. exerce un important effet chélateur en pourcentage de réduction des ions  $Fe^{2+}$ . Il est 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. Les variations de l'activité réductrice des radicaux libres, sont directement liées aux taux des composés phénoliques présents dans la plante récoltée [380] [388].

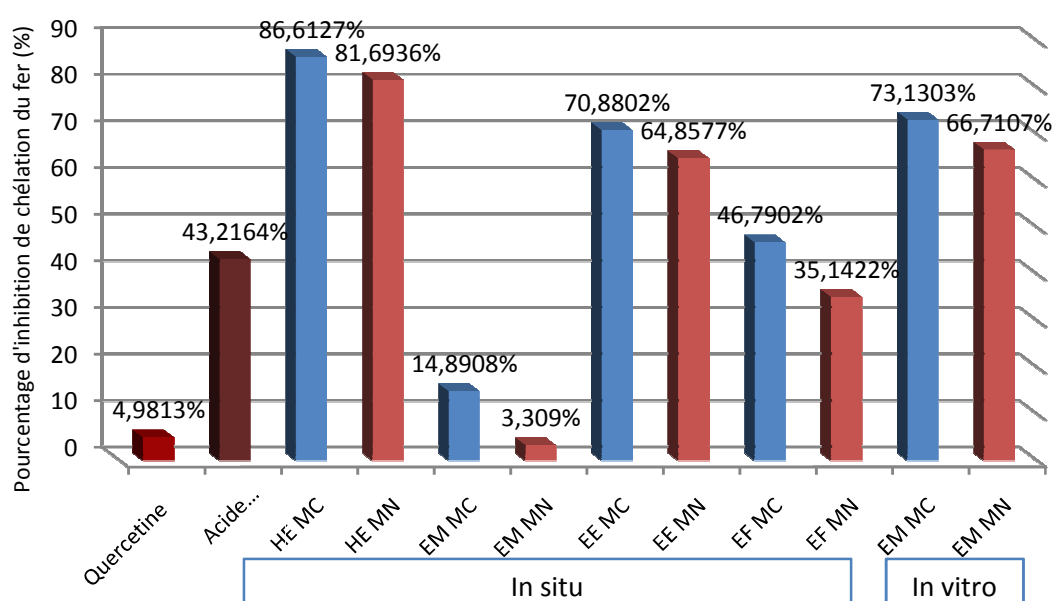


Figure 3.141: Pouvoir chélateur du fer exercé par les huiles essentielles et les extraits de *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab.

## CONCLUSION

A l'issue de notre expérimentation, nous avons acquis quelques connaissances sur deux espèces du myrte algérien: l'espèce méditerranéenne *Myrtus communis* L. et l'espèce saharo-endémique *Myrtus nivellei* Batt et Trab. Les techniques utilisées nous ont permis d'étudier les propriétés de certaines substances bioactives obtenues *in situ* et *in vitro*.

Dans le cadre de la valorisation des plantes à caractère thérapeutique d'une part, et la préservation des espèces endémiques du Sahara central d'autre part, nous avons consacré une partie de ce travail à l'introduction de ces deux espèces en culture *in vitro*, via la technique de micro-bouturage et la callogenèse.

Les essais préliminaires ont abouti à la détermination d'une méthodologie pour une meilleure désinfection des graines. L'utilisation de l'hypochlorite de calcium à 8% pendant 30 min s'est révélée plus efficace que l'hypochlorite de sodium. Le pré-traitement des graines par scarification a augmenté le pourcentage de germination à plus de 98% après 10 jours de leur introduction *in vitro*.

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 de base MS complété avec 1.5 mg/l BA et 0.1 mg/l ANA a favorisé le développement des bourgeons avec un taux de 92,12% pour *M communis* L. et 90,13% pour *M nivellei* Batt et Trab. Cependant, l'élongation est plus favorable sur un milieu contenant cette même combinaison hormonale supplémentée de 0,05mg/l GA<sub>3</sub>.

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 pouvoir d'enracinement faible voir nul.

Les essais pratiqués sur la culture de tissus indifférenciés, ont révélé que les cals peuvent apparaître après 60 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.

L'utilisation de la technique de CG/SM a permis d'identifier les constituents chimiques de la fraction volatile. Pour l'espèce *M communis L.*, nous avons noté la présence d'une forte proportion en monoterpènes hydrocarbonés, dont on cite: le limonène (16,22%), l' $\alpha$  pinène (15,93%), l'octadienol (15,04%) et le 1,8 cinéole (9,12%). Quant à l'espèce *M nivellei Batt et Trab.*, une prédominance des sesquiterpènes hydrocarbonés est constatée, dont on cite: le  $\delta$  elemene (15,69%), l' $\alpha$  terpinéol (13,01) le 1,8 cinéole (12,06%) et le citral (11,66%).

Différents extraits ont été préparés à partir de la poudre végétale des plantes obtenues *in situ*: extraits méthanoliques (par soxhlet), extraits éthanoliques (par macération) et extraits flavonoïdiques (par purification chimique). Cependant, en raison de la faible quantité des cals obtenus *in vitro*, seuls les extraits méthanoliques ont été préparés.

Nous avons pu déterminer aussi, grâce aux dosages spectrophotométriques, que les extraits éthanoliques sont plus riches en polyphénols par rapport aux extraits méthanoliques, ceci nous laisse supposer que l'extraction douce par macération permet de préserver les métabolites dans une situation aussi proche de la normale, contrairement à l'extraction par soxhlet où la chaleur est susceptible de dégrader certains composés chimiques thermosensibles, bien que son rendement est meilleur. Il reste également à souligner que les extraits obtenus à partir des cals sont moins riches en métabolites secondaires, mais en raison de leur intense activité métabolique, ils ont témoigné d'une forte teneur en sucres.

L'activité anti-microbienne des huiles essentielles des deux espèces a été plus importante que celle des extraits surtout pour les souches: *E coli*, *S aureus* et *S epidermidis*. Cependant, les extraits de *M nivellei Batt et Trab.* ont présenté des résultats prometteurs surtout contre la souche *F oxysporium fsp albidins*. Ces résultats peuvent constituer une plateforme pour l'introduction de cette espèce saharienne dans la lutte biologique contre cet agent responsable de la maladie du Bayoud ravageant le palmier dattier.

Les huiles essentielles et les extraits testés pour leur activité anti-oxydante, nous ont permis de conclure que l'activité des extraits testés dépend étroitement de leur richesse en polyphénols. Les extraits flavonoïdiques ont exprimé un pouvoir anti-radicalaire très intéressant. Cependant, les extraits méthanoliques et

ethanoliques ont montré une excellente inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique. Quant aux huiles essentielles et aux extraits méthanoliques des cals, ils ont présenté un important pouvoir chelateur du fer. Ces résultats sont très prometteurs, surtout qu'ils ont dépassé largement le seuil marqué par la quercétine, l' $\alpha$  tocophérol ou l'acide ascorbique.

A la lumière des résultats obtenus, ce travail a permis de dévoiler, pour la première fois, la composition chimique de l'huile essentielle et des extraits de *M nivellei Batt et Trab.* ainsi que ses effets anti-microbiens et anti-oxydants. L'essai de son introduction *in vitro* nous a permis également de comprendre son comportement organogène.

Au terme de cette étude, nous pouvons dire que *M communis L.* et *M nivellei Batt et Trab.* présentent un haut potentiel thérapeutique, puisqu'elles renferment de nombreuses substances bioactives. Il est certain que l'action de chaque espèce, n'est pas due à la présence d'un seul principe actif isolé, mais à l'effet synergique de ses différents composés.

Un appel de sensibilisation à la préservation du patrimoine floristique doit être sollicité, surtout pour la préservation des espèces endémiques du Sahara central, qui se raréfient d'avantage, d'autant plus qu'elles jouent un rôle important dans la conservation de la biodiversité. Les résultats obtenus sont encourageants et ouvrent de belles perspectives, qui consistent à:

- Apporter des preuves scientifiques à l'activité pharmacologique de ces plantes, dans le but d'accroître la valeur économique de ces ressources naturelles.
- Etudier leur activité anti-oxydante sur un model cellulaire.
- Augmenter la production des métabolites secondaires en *in vitro* par transformation génétique (développer des chevelus racinaires ou "Hairy roots").
- Optimiser les milieux de culture en testant de nouvelles combinaisons hormonales, afin d'assurer la production de quantités importantes de matériel végétal. Avec ces vitro-methodes, il serait possible de cultiver ces plantes en faisant abstraction aux saisons, tout en préservant les ressources potentielles naturelles.
- Opter pour l'acclimatation des plantules obtenues *in vitro* en vue de les replanter ultérieurement dans leur biotope naturel.

## APPENDICE A

### LISTE DES ABREVIATIONS, SYMBOLS ET CONVENTIONS

#### Partie phytochimie

Abs	: Absorbance
Ac gal	: Acide gallique
Ac tan	: Acide tannique
<i>Batt et Trab.</i>	: Battandier et Trabut
CG/SM	: Chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
Cn	: Contrôle négatif
Cp	: Contrôle positif
Cyan	: Cyanidine
EE	: Extrait ethanolique
EF	: Extrait flavonoïdique
EM	: Extrait méthanolique
ES	: Extrait sec
EtOH	: Ethanol
eV	: Electron volt
FCR	: Folin Ciocalteu Reagent
HCl	: Acide Chlorhydrique
HE	: Huile Essentielle
Hydroc	: Hydrocarboné
L.	: Linné
MeOH	: Méthanol
Monoter	: Monoterpène
Oxyge	: oxygéné
Quer	: Quercetine
R	: Rendement
RL	: Radicaux libres (= ERO: espèces réactives à l'oxygène)
rut	: Rutine
Sesqui	: Sesquiterpène
Vit C	: Vitamine C= Acide ascorbique
Vit E	: Vitamine E= Alpha tocophérol

#### 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
Kin	: Kinétine
MC	: <i>Myrtus communis</i> L.
MCc	: Cals de <i>M communis</i> L.
MN	: <i>Myrtus nivellei</i> Batt et Trab.
MNc	: Cals de <i>M nivellei</i> Batt et Trab.



## APPENDICE B

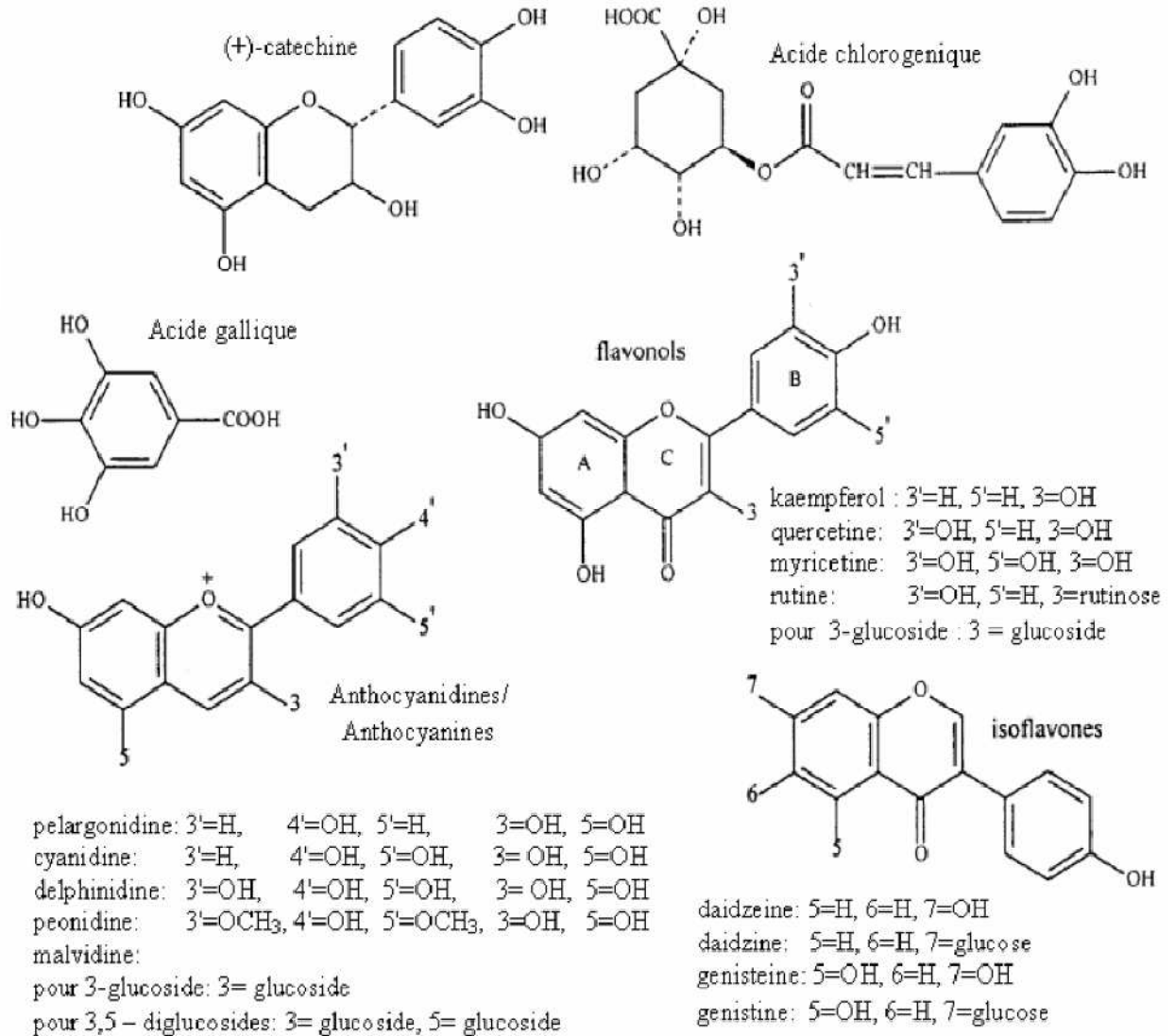
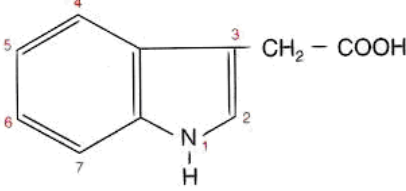
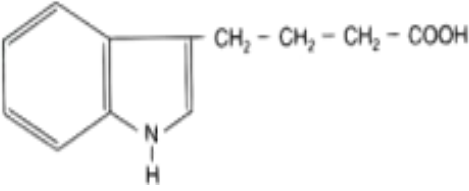
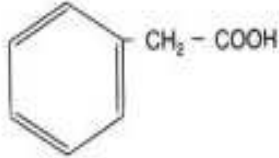
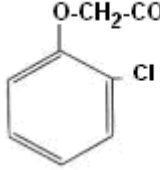
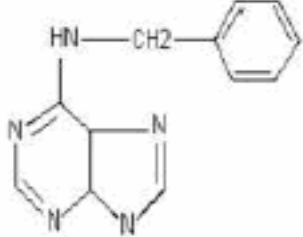
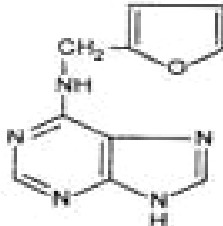
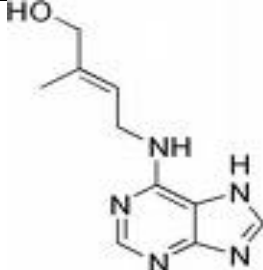
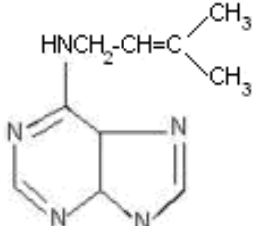
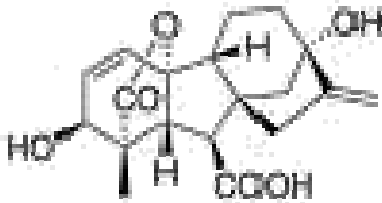
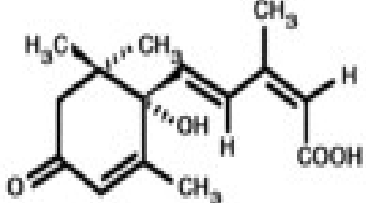


Figure 1: Structure de quelques composés phénoliques [76].

## APPENDICE C

Tableau 1: Structures chimiques de quelques régulateurs de croissance

 <p><b>Acide indole 3- acétique (AIA)</b></p>	 <p><b>Acide indole butyrique (AIB)</b></p>
 <p><b>Acide naphthalène acétique (ANA)</b></p>	 <p><b>Acide 2-4 dichlorophénoxyacétique (2-4D)</b></p>
<b>Auxines</b>	
 <p><b>6-Benzyl aminopurine (BAP)</b></p>	 <p><b>Kinétine</b></p>
 <p><b>Zéatine</b></p>	 <p><b>Isopentenylaminopurine</b></p>
<b>Cytokinines</b>	
 <p><b>Acide gibbérellique GA3</b></p>	 <p><b>Acide abscissique</b></p>
<b>Gibbérelline</b>	<b>Acide abscissique</b>

## **APPENDICE D**

### **INSTRUMENTS, APPAREILLAGES ET REACTIFS UTILISES**

#### 1. Appareillage:

- Agitateur magnétique (Snijders)
- Autoclave (Aesculap)
- Bain marie (Memmert)
- Balance analytique (Scaltec SBC 31)
- Balance analytique de précision (Kern)
- Broyeur
- Chromatographe phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse
- Dispositif d'extraction (montage pour entraînement à la vapeur)
- Etuve (Nuve EN 500)
- Etuve bactériologique (Nuve EN400)
- Evaporateur rotatif (Stuart RE300)
- Extracteur Soxhlet (250 ml)
- Four à moufle (Prolabo N°57018)
- Hotte à flux laminaire
- Loupe binoculaire (Motic ST30)
- Microscope photonique binoculaire (Motic BA 200)
- pH-mètre
- Phytotron
- Plaque chauffante
- Réfrigérateur
- Spectrophotométrie UV-visible (Shimadzu UV-1601)
- Vortex (Velp HP/MSD Agilent 5890)

#### 2. Verrerie et autres consommables:

- Ampoule à décanter 500 ml
- Anse de platine
- Ballons: 250, 500 ml
- Bec bunzen
- Bêchers: 100,250, 500ml
- Boîtes de pétri stériles de 90 mm de diamètre
- Creusets en platine et en verre
- Cristalliseur : 1000ml
- Disques de papier filtre stérile
- Disques d'antibiotiques et antifongiques de référence : Amoxicilline, Nystatine.
- Entonnoir en verre
- Eprouvettes: 500,1000ml
- Erlen Myers: 500, 1000, 3000ml
- Fioles jaugées: 50ml; 100ml, 1000ml
- Gants, gaze chirurgicale
- Lames et lamelles
- Micropipettes
- Papier aluminium, papier filtre
- Pipettes graduées: 1, 5, 10, 25ml
- Pipettes pasteur
- Portoirs
- Scalpels, ciseau, pinces

### 3. Réactifs , colorants et produits chimiques divers:

- Acétate de plomb
- Acétate de potassium
- Acétate de sodium (CH<sub>3</sub>-COONa)
- Acétate d'éthyle
- Acide acétique
- Acide chlorhydrique (HCl)
- Acide gallique
- Acide linoléique
- Acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentré
- Acide tannique
- Alcool chlorhydrique (alcool à 95°, eau distillée, HCl concentré v/v/v)
- Ammoniaque (NH<sub>4</sub>OH) (10%)
- Ammonium thiocyanate (30%)
- Bisulfite de sodium (15%)
- Butanol
- Carbonate de sodium (NaHCO<sub>3</sub>)
- Chloroforme (CHCl<sub>3</sub>)
- Copeaux de magnésium
- Cyanidine
- DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle)
- Ethanol ( 95%, 98%, absolu)
- Ether diéthylique
- Férozine
- Formol (10%) (1ml de solution mère de formaldéhyde 40%, 9ml eau physiologique)
- Gélose nutritive
- Glucose
- Hydroxyde de potassium (KOH)
- Hypochlorite de calcium Ca(ClO)<sub>2</sub>
- Hypochlorite de sodium Na(ClO)<sub>2</sub>: Eau de javel du commerce.
- Méthanol
- Milieu Muller Hinton
- Milieu Sabouraud
- Nitrate d'aluminium (10%)
- Phénol (5%)
- Propanol
- Quercetine
- Réactif de fehling (0.5ml de réactif A + 0.5ml de réactif B, mélange extemporané)
- Réactif de MAYER
- Réactif de STIANY (un mélange de 2 volumes de formol et 1 volume d'HCl 1N)
- Réactif Folin Ciocalteu (FCR)
- Réactif Folin Denis
- Rouge Congo (Rouge Congo:1g, NH<sub>4</sub>OH:100ml, Eau distillée qsp:1000ml)
- Rutine
- Saccharose
- Soude (NaOH) (10%)
- Tampon phosphate (0,2M, pH 7,0)
- Trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>)
- Trichlorure de fer (FeCl<sub>3</sub>)
- Vanilline (2%)
- Vert de méthyle (Vert de Méthyle:1g, Ac Acétique:100ml, Eau distillée qsp:1000ml)

## APPENDICE E

### COMPOSITION DES SOLUTIONS MINERALES ET VITAMINIQUES UTILISEES

Tableau 2: Compositions de solutions minérales utilisées lors de l'expérimentation

Solutions	Composés	Concentrations (mg/l)
Macroéléments MS	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
	KNO <sub>3</sub>	1900
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440
	MgSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	370
Microéléments MS	MnSO <sub>4</sub> ·4 H <sub>2</sub> O	16.9
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6
	KI	0.83
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25
	CuSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O	0.025
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025
Fe EDTA	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.85
	Na <sub>2</sub> EDTA	37.25

[112].






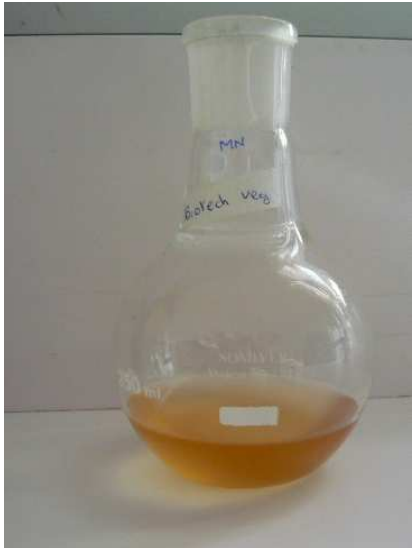

Tableau 3: Solution vitaminique de MOREL (1952) en mg pour 100 ml.

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

[112].


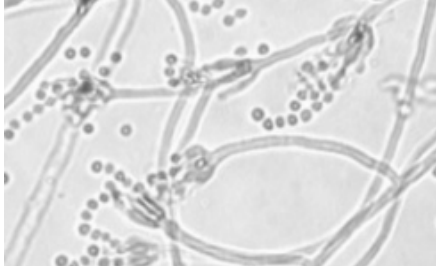
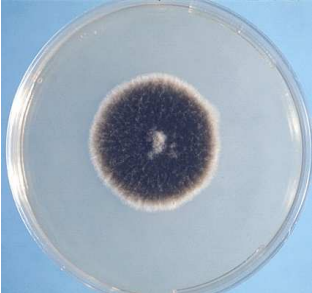


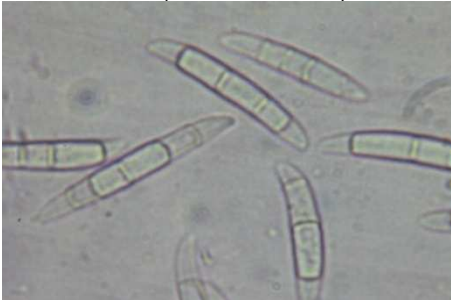


## APPENDICE F

Tableau 4: Principales étapes de l'extraction liquide-liquide des flavonoïdes (photos originales)

		
Elimination des lipides et de la chlorophylle Traitement par le chloroforme	Elimination des génines libres Traitement par l'éther diéthylique	Elimination des monosides Traitement par l'acétate d'éthyle
		
Récupération des flavonoïdes Traitement avec le butanol	Extrait butanolique riche en flavonoïdes	
		
Evaporation du butanol pour récupérer l'extrait flavonoïdique sec		

## APPENDICE G

Tableau 5: Identification des champignons phytopathogènes utilisés

Caractères culturaux	Morphologie microscopique
<i>Penicillium sp</i>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colonies poudreuses, grisâtres, blanches a la périphérie.</li> <li>- Croissance très rapide(1j)</li> </ul>  <p style="text-align: center;">Aspect macroscopique (originale)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Conidiophores cloisonnés, ramifiés,</li> <li>- Phialides serrés les unes contre les autres (pinceau)</li> <li>- Conidies unicellulaires disposés en chaînes (au bleu de methylene)</li> </ul>  <p style="text-align: center;">Aspect microscopique (G: x 40) (originale)</p>
<i>Alternaria sp</i>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colonies duveteuses, noirâtres</li> <li>- Croissance lente (5j)</li> </ul>  <p style="text-align: center;">Aspect macroscopique (originale)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Conidiospores cloisonnés,</li> <li>- Conidies noires mûriforme</li> </ul>  <p style="text-align: center;">Aspect microscopique (G: x 100) (originale)</p>
<i>Fusarium oxysporium fsp albidinis</i>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colonies duveteuses blanchâtres</li> <li>- Croissance lente</li> </ul>  <p style="text-align: center;">Aspect macroscopique(originale)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Conidiophores cloisonnés</li> <li>- Conidies fusiformes (macroconidies)</li> </ul>  <p style="text-align: center;">Aspect microscopique (G: x 100) (originale)</p>
<i>Fusarium oxysporium fsp lycopersici</i>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colonies duveteuses rougeâtres</li> <li>- Ccroissance lente</li> </ul>  <p style="text-align: center;">Aspect macroscopique(originale)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Conidiophores cloisonnés</li> <li>- Conidies fusiformes</li> </ul>  <p style="text-align: center;">Aspect microscopique (G: x 40) (originale)</p>

## APPENDICE H

### ETUDE STATISTIQUE

#### ✓ Caractéristiques des fruits

- Tableau 1: Propriétés des baies typiques de chaque espèce étudiée.

	Nombre moyen des graines/baie	Taille moyenne des graines	Taille moyenne géométrique des baies*	Dimensions moyennes des baies
<i>M communis</i>	9,05±0,66	4x2mm	7,1871mm <sup>3</sup>	7-10 x 6-8 mm
<i>M nivellei</i>	8,34±1,2	3x2mm	5,2277mm <sup>3</sup>	4-6 x 5-8 mm

\*: la taille moyenne géométrique d'une baie est obtenue par la formule suivante:  
 $D = (LWT)^{1/3}$  (exprimé en mm<sup>3</sup>)  
 L: longueur (length) (mm) W: largeur (Width) (mm) T: épaisseur (thickness) (mm)

#### ✓ Essais *in vitro*

##### 1. Etude de la multiplication par graines sur boîtes de petri

- Tableau 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 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 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			



## 2. Multiplication par micro-bouturage des vitro-semis.

- Tableau 2.1: 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 2.2: Relation entre M<sub>3</sub> et M<sub>2</sub> (comparaison de deux proportions) H<sub>0</sub>: pas de différence significative entre M<sub>3</sub> et M<sub>2</sub>

	t <sub>c</sub>	t <sub>t</sub>	H <sub>0</sub>
<i>M communis</i>	1,9152	1,645	t <sub>c</sub> >t <sub>t</sub> H <sub>0</sub> Rejetée
<i>M nivellei</i>	2,9634		

- Tableau 2.3: 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 2.4: Effet de l'ANA sur longueur moyenne des racines développées chez *M communis L.* et *M nivellei Batt et Trab.*

	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

## 3. Effet de la balance hormonale équilibrée sur la callogenèse

- Tableau 3.1: Pourcentage de callogenèse des différents explants étudiés en fonction de la composition du milieu de culture

	<i>M communis L.</i>			<i>M nivellei Batt et Trab.</i>		
	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%

## APPENDICE I

### 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

Figure 2: Aspect des cals obtenus *in vitro* à partir de différents explants de *M communis* L.(photos originales)



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

Figure 3: Aspect des cals obtenus *in vitro* à partir de différents explants de *M nivellei* Batt et Trab.(photos originales)

## APPENDICE J

Tableau 6: Développement de bourgeons néoformés sur cals d'origine foliaire

	
<p>A. Vitro-plant développé à partir d'un cal de <i>M communis</i> sur milieu d'élongation.</p>	<p>B. Vitro-plant développé à partir d'un cal de <i>M nivellei</i> sur milieu d'élongation.</p>
	
<p>C. Vitro-plant développé à partir d'un cal de <i>M communis</i> sur milieu de callogenèse.</p>	<p>D. Vitro-plant développé à partir d'un cal de <i>M nivellei</i> sur milieu de callogenèse.</p>
	
<p>E. Vitro-plant développé à partir d'un cal de <i>M communis</i> sur milieu MS sans hormones.</p>	<p>F. Vitro-plant développé à partir d'un cal de <i>M nivellei</i> sur milieu MS sans hormones.</p>

## GLOSSAIRE

**Antalgique** Qui calme la douleur.

**Antispasmodique** Contre les contractions brusques et violentes.

**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.

**Caulogenèse** C'est la formation d'une tige, il est aussi 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.

**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 plastides peu différenciés.

**Différenciation cellulaire** Perte progressive des caractères cytologiques et physiologiques des cellules embryonnaires et acquisition des caractéristiques des cellules adultes spécialisées avec les caractères cytologiques suivants: grande vacuole centrale, rapport nucléoplasmique faible.

**Dialystemone** Amas d'étamines non soudées.

**Multiplication végétative** Synonyme de reproduction asexuée. Elle aboutit à la constitution de clones homogènes.

**Néoformation** Formation de nouveaux tissus.

**Organogenèse** Formation des organes. L'organogenèse végétative se situe essentiellement au niveau des méristèmes.

**Totipotence cellulaire** Aptitude des cellules à exprimer la totalité des potentialités du génome.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Marc, T., Gerard, W. et Denis, L. “ Classification des anti-inflammatoires: Guide de pharmacologie”. Etudiants et professionnels paramédicaux. Paris. (2001). 426p.
2. Boullard, B. “ Plantes médicinales du monde: Réalités et croyances”. Edition Estem. (2001). 660p.
3. Auge, R., Beauchesne, G., Boccom Gibod, J., Decourtye, L., Digat, B., Jalouzot, R., Meynier, R., Morand, J.C.L., Reynoird, J., Sturullu, D.G. et Vidalie, M. “ La culture in vitro et ses applications horticoles”. Edition Tec & Doc. (1989). 256p.
4. Polunin, M. et Robins, C. “ La pharmacie naturelle”. Edition Parnett.London. (1992).510p.
5. Teixeira da Silva, J.A. “ Mining the essential oils of the Antherideae”. African journal of biotechnology. Vol 3. (2004). pp:706-720.
6. Iserni, P. “ Encyclopédie des plantes médicinales”. Edition Larousse.Paris.(2001). 110p.
7. Fouché, J.G., Marquet, A., Hambuckers, A. “ Les plantes médicinales: de la plante au médicament”. Observatoire du monde des plantes Sart-Tilman. (2000). pp:4-6.
8. Volàk, J. et Stodola, J. “ Plantes médicinales”. Edition Grund. Paris.(1984). 319p.
9. Pelikan, W. “ L'Homme et les plantes médicinales”.Tome I. Edition Triades. Paris .(1986). 284p.
10. Dweck, A.C. “ Herbal medicine for the skin: their chemistry and effects on skin and mukous membranes”. Personal care magazine. Vol 3.(2002). pp: 19-21.
11. Girre, L. “Connaître et reconnaître les plantes médicinales”. Edition Ouest. France.(1980). 332p.
12. Nostro, A., Germanò, M.P., D'Angelo, V., Marino, A. et Cannatelli, M.A. “ Extraction methods and bio-autography for evaluation of medicinal plant anti-microbial activity”. Lettres en microbiologie appliquée. Vol 30. (2000). p:37-39.
13. Sivropoulou, A., Nikolaou, C., Papanikolaou, E., Kokkini, S., Lanaras, T. et Arsenakis, M. “ Essential oils and their activities”. J.Agric.food.chem. Vol 45. (1997).pp:3197-3182.
14. Schauemberg, P. “ Guide des plantes médicinales: analyse, description et utilisation de 400 plantes”. Edition Ferdinand. Paris. (1977). 548p.
15. Thurzova, L. “ Les plantes: Santé qui poussent autour de nous”. Edition Bordas. Bruxelles. (1981). 268p.
16. Bruneton, J. “ Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales”. Edition Tec & Doc. Paris.(1999).1120p.

17. Koch, E . “ Extracts fruits of saw palmetto and roots of stinging nettle (the medical treatment of benign prostatic hyperplasia)”. Comptes rendus de Chimie. Vol 21. (2001). pp:650-656.
18. Vanney, J.R. “ La terre ”. Edition Larousse. 6<sup>ème</sup> édition . Paris. (1978). 245p.
19. Magnani, P.“Culture et cueillette des plantes médicinales”.Edition Hachette. (1979). 127p.
20. “ Encyclopédie Microsoft Encarta”. CD-ROM. (1999).
21. Debuigneg. “ Dictionnaire Larousse” . Edition Larousse. Paris. (1984). 255p.
22. “ Plantes médicinales du Maroc: Usages et toxicité”. Revue de l'institut agronomique et vétérinaire Hassan II. Rabat-instituts. Maroc. (2000).N°01. pp: 18-21.
23. Schawenberg, P. et Paris. F. “ Guide des plantes médicinales”. Edition Delachaux et Niestlé. Paris. (1977). 396p.
24. Valnet, J. “ Phytothérapie: Traitement des maladies par les plantes”. Edition Maloine. Paris. (1983). 568p.
25. Bahorun, T.“ Substances naturelles actives: La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle”. Edition Mauritius. (1997).133p.
26. Organisation Mondiale de la Santé. “ Médecine traditionnelle”. 56<sup>ème</sup> Assemblée mondiale de la santé. (2003). pp:1-5.
27. Pousset, J.L. “ Plantes médicinales africaines: utilisation pratique ”. Paris. (1989). In: Keita, Y., Koné, O., Ly, A.K., Häkkinen, V. “ Étude chimique et de l'activité anti-bactérienne des distillats de quelques variétés de mangue de Guinée”. Comptes rendus de chimie.Vol 1. (2004). pp: 1095-1100.
28. Scientific Correspondence. “ Broad spectrum anti-mycotic drug for the treatment of ringworm infection in human beings”. J. Pharmacology. Vol 85. (2003). pp: 30-34.
29. Mohammedi, Z. “ Etude du pouvoir anti-microbien et anti-oxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la region de Tlemcen”. Thèse de magister en biologie. Université Abou Bakr Belkaïd. Tlemcen. (2006). 105p
30. Baba aïssa, F. “ Encyclopédie des plantes utiles: Flore d'Algérie et du maghreb”. Edition Copyright-librerie. (1999). 368p.
31. Naves, Y.R. “ Technologie des parfums naturels”. Edition Masson. Paris.(1974). 168p.
32. “ Larousse Encyclopedie MEMO”. Edition Montreal. (1999). 182p.
33. Bruneton, J. “ Pharmacognosie et phytochimie: Plantes médicinales”. Edition Tec & Doc. Paris .(1993). 914p.

34. Garnéro, J. “ Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation”. Edition Tech & Doc. (1991). 180p.
35. Fahn, A. “ Secretory tissues in plants”. Edition Boca Raton. Florida.(1979). 102p.
36. Paris, P.P. et Harbielle, A. “ Abrégé de matière médicale: Pharmacognosie”. Tome I. Edition Masson. (1981). 183p.
37. Fahn, A.“ Secretory tissues in vascular plants”. J. Phytol. Vol 108. (1988). pp:229-257.
38. Guignard, J.L. “ Botanique systématique moléculaire”. Edition Masson. Paris. (2001).189p
39. Willem, J.P. “ Les huiles essentielles”. Edition Medecine d'avenir. (2004). 318p.
40. Rai, M.K., Acharya, D. et Wadegaonkar, P. “ Plant derived-antimycotics: Potential of asteraceous plants”. In: “Plant-derived anti-mycotics: Current trends and future prospects”. Haworth Press. Vol 24. (2003). pp: 165-185.
41. Sallé, J.L. “ Les huiles essentielles”. Edition Frison Roche. Paris.(1991). 167p.
42. Belaïche, P. “ Traité de phytothérapie et d’aromathérapie”. Tome I. Edition Maloine. Paris. (1979). 204 p.
43. Porter, N.“ Essential oils and their production”. Crop and food res.Vol 39.(2001),pp:32-38.
44. “ Pharmacopée européenne”. 4<sup>ème</sup> édition. Conseil de l'Europe. Strasbourg. (2002). 2060p.
45. Smallfield, B. “ Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes”. Crop and food research. Vol 45.(2001). pp: 14-17.
46. Delaveau, P. “ Les épices: Histoire, description et usage des différents épices, aromates et condiments”. Edition Albin Michel. (1987). 372 p.
47. Richard,H. et Multon, J.L.“ Les arômes alimentaires”. Edition Tec & Doc. (1992) 439p.
48. Takeoka, G. “ Flavor chemistry of vegetables: Thirty years of progress”. Edition Cluwer Academic-Plenum Publishers. New York. (1998). 304p.
49. Guignard, J.L. “ Biochimie végétale”. Edition Masson. Paris.(2000). 281p.
50. Guignard, J.L. “ Biochimie végétale”. Edition Masson. Paris. (1999). 245p.
51. Richter, G. “Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie”. Press polytechnique et universitaire. Romande. France. (1993). 515p.
52. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. “ Biological effects of essential oils”. Food and chemical toxicology. Vol 46 . (2008). pp:446-475.
53. Schwimmlé, B., Winkeihäuser, E., Kuzmanovam, S. et Steiner, W. “ Isolation of carvacrol assimilating microorganisms”. J. Biotechnology. Vol 39. (2001).pp:341-345.

54. 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.
55. Chen, C.N., Weng, M.S., Wu, C.L. et Lin, J.K. “ Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by taiwanese propolis from different sources”. J. Pharmacology. Vol 1. (2004). pp:175-185.
56. Lamarti, A., Badoc, A., Deffieux, G. et Carde, J.P. “ Biogénèse des monoterpènes”. Bull. soc. pharm. Vol 133. (1994). pp: 69-78.
57. Crespo, M.E., Jiménez, J. et Navarro, C. “Special methods for the essential oils of the genus *Thymus*”. Modern methodes for plant analysis. Vol 12. (1991). pp: 41-61.
58. AFNOR. “ Les huiles essentielles”. Fiches techniques de l'ingénieur. Tome II. Paris. (2000). pp: 45-48.
59. Lawrence, B.M.“ Progress in essential oils”.Flavour and Fragrance.Vol 1.(1976).pp:11-13.
60. Collin, J.G., France-Ida, J. et Lord, D. “ Essential oils and microwave. Extracts of cultivated plants”. Perfumer and flavorist. Vol 17. (1992). pp:34-41.
61. Padrini, F., Lucheroni, M.T. “ Le grand livre des huiles essentielles: Guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et l'aro-massage énergétique avec plus de 100 Photographies”. Edition De Vecchi. Paris. (1996). 198p.
62. Mengal, P., Behn, D., Gil, M.B. et Mompon, B. “ VMHD: Extraction d'huile essentielle par micro-ondes”. J. Parfums. cosmétiques. arômes. Vol 114. (1993). pp: 66-67.
63. Elisha, E.E., Mousa, S.O. et Abed, S.K. “ The effect of leaves of *Myrtus communis* on the central nervous system the central depressant and anti-convulsant actions”. J. Biol. sci. research. Vol 19. (1988). pp: 545-560.
64. Cowan, M.M. “ Plant products as anti-microbial agents”. Clinical microbiology reviews. Vol 12. (1999). pp:564-582.
65. Lopes, N., Kato, M.J., Andrade Eloisa, H.A., Maia, J.G.S., Yoshida, M., Planchart, A.R. et Katzin, A.M. “ Anti-malarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis Warb*”. J. Ethnopharmacology. Vol 67. (1999). pp: 313-319.
66. Pedneault, K., Léonhart, S., Angers, P., Gosselin, A., Ramputh, A., Arnason, J.T. et Dorais, M. “ Influence de la culture hydroponique de quelques plantes médicinales sur la croissance et la concentration en composés secondaires des organes végétaux”. 5<sup>ème</sup> Colloque sur les produits naturels d'origine végétale. Canada. (2001). pp:23-24.
67. Chamouleau, A. “ Les usages externes de la phytothérapie”. Edition Maloine.(1979). 270p.
68. Caillard, J. “ Les plantes, des usines chimiques en miniature”. Ressources documentaires. CRDP Midi-Pyrénées. N°13. (2003). pp: 6-9.



69. Stefanovits-Bányai, E., Tulok, M.H., Hegedûs, A., Renner, C. et Varga, I.S. "Antioxidant effect of various Rosemary clones". *Acta biologica szegediensis*. Vol 47.(2003).pp:111-113
70. Jukié, M. et Milo, M. "Catalytic oxidation and anti-oxidant properties of thyme essential oils (*Thymus vulgarae L.*)". *Croatica Chemica Acta*. Vol 78. (2005). pp:105-110.
71. Svoboda, K.P. et Hampson, J.B. "Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: anti-bacterial, anti-oxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities". In: Mohammedi, Z. "Etude du pouvoir qnti-microbien et anti-oxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen". Thèse de magister en biologie. Université Abou-Bakr Belkaïd. Tlemcen. (2006).105p.
72. Lugasi, A., Hévâri, J., Sâgi, K.V. et Birô, L. "The role of anti-oxidant phyto-nutrients in the prevention of diseases". *Acta Biologica Szegediensis*. Vol 47. (2003). pp:119-125.
73. Salunkh, D.K. "Dietary tannins: consequences and remedies". Edition Boca Raton. Florida.(1990). 132p.
74. Harborne, J.B. "General procedures and measurement of total phenolics". In: Harborne, J.B. "Plant phenolics". Academic Press. Londres. (1989). pp:1-28.
75. Beta, T., Nam, S., Dexter, J.E. et Sapirstein, H.D. "Phenolic content and anti-oxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions". *Cereal.chem.* Vol 82. (2005). pp:390-393.
76. Wang, J. et Mazza, G. "Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor in LPS/IFN  $\gamma$  Activated RAW 264.7 Macrophages". *J. Agricultural and food chemistry*. Vol 50. (2002). pp:4183-4189.
77. Serafini, M., Laranjinha, J.A., Aimeida, L.M., Maiani, G. "Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenoi-rich and their impact on plasma total anti-oxidant capacity in humans". *J. Natural biochemistry*. Vol 11. (2000). pp: 585-590.
78. Basu Tapan, K., Temple Nonnan, J. et Garg Manohar, L. "Anti-oxidants in human health and disease". CAB International. Vol 25. (1999). pp:123-128.
79. Scalbert, A. et Williamson, G. "Dietary intake and bioavailability of polyphénols". *J. Nutrition*. Vol 130. (2000). pp:2073-2085.
80. Didry, N., Pinkas, M. et Torck, M." Sur la composition chimique et l'activité anti-bactérienne des feuilles de diverses espèces de grindelia". *J. Plants medecine and phytotherapy*. Vol 16. (1982). pp: 7-15.
81. Ravn, H., Andary, C., Kovac, G. et Molgaard, P. "Caffeic acid esters as in vitro inhibitors of plant pathogenic bacteria and fungi". *J.Biochem.sys. ecol*.Vol 17.(1984).pp:175-184.
82. Hayase, F. et Kato, M. "Anti-oxidant compounds of sweet potatoes". *J. Nutrition. sci. vitaminol*. Vol 30. (1984). pp:37- 46.

83. Ribereau, G.P. “ Les composés phénoliques du raisin et du vin”. Annale de physiologie végétale. Edition INRA.(1964).256p.
84. Das, H.C., Wang, J.H. et Lien, E.J. “ Carcinogenicity and cancer preventing activities of flavonoids : A structure-system-activity relationship analysis”. In : Jucker, E., Das, H.C. et Weaver, G.M. “ Cellulose thin-layer chromatography of phenolic substances”. J. Chromatography. Vol 67. (1972). pp:105-111.
85. Bidet, D., Gagnault, J.C., Girard, P. et 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. Vol 6. (1987). pp: 89 - 97.
86. Aruoma, O.I., Spencer, J.P.E., Butler, J. et Halliwell, B. “ Commentary reaction of plantderived and synthetic antioxidants with trichloromethylperoxyl radicals”. Free.rad. res. Vol 22. (1995). pp:187-190.
87. Meddleton, E. et Kardasnam, J.C. “ The flavonoids advances in research since 1986”. Annales academiques. Vol 21. (1993). pp: 617-652.
88. Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, J.C. et Pinkas, M. “ Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations”. Arzneimittelforschung/ Drug research. Vol 46. (1996). pp:1086-1089.
89. De Oliveira, M.M., Sampaio, M.R.P., Simon, F., Gibert, B. et Mors, W.B. “ Anti-tumor activity of condensed flavenols”. Annales Acad. Brasil. Vol 44. (1972). pp:41-44.
90. Brownlee, H.E., Hedger, J. et Scott, I.M. “ Effects of a range of procyanidins on the cocoa pathogen *Crinipallis perniciosa*”. Physiology molecular and plant pathology. Vol 40. (1992). pp: 227-232.
91. Kreofsky, T., Schlager, J.W., Vuk-Pavlovic, Z., Abraham, R.T. et Rohrbach, M.S. “ Condensed tannin promotes the release of arachidonic acid from rabbit resident alveolar macrophages”. American journal of research. Vol 7. (1992). pp:172-181.
92. Okuda, T., Kimura, Y., Yoshida, T., Hatano, T., Okuda, H. et Arichi, S. “ Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs: Inhibitory effects of lipid peroxidation in mitochondria and microsome of liver”. Chemical and pharmacological bulletin. Vol 31. (1983). pp:1625-1631.
93. Cavin, A. “ Investigation phytochimique de trois plantes Indonésiennes aux propriétés anti-oxydante et anti-radicalaire: *Tinospora crispa*, *Merremia emarginata* et *Oropea enneandra*”. Thèse de doctorat en biologie. Université de Lausanne. France.(1999). 241p.
94. Paris, P. et Moyse, H. “ Pharmacognosie générale”. Edition Masson. (1965). 491p.
95. Nitsch, J. P et Nitsch, C. “ Synergistes naturels des auxines et des gibbérellines”. Bulletin société française. N°26. (1961). pp:22-25.

96. Alibert, G., Ranjeva, R. et Boudet, M.A. “ Organisation subcellulaire des voies de synthèse des composés phénoliques”. J. Physiologie végétale. Vol 15. (1977).pp: 279-301.
97. Brouillard, R., Figueiredo, P., Elhabiri, M. et Dangles, O. “ Molecular interactions of phenolic compounds in relation to the colour of fruits and vegetables”. J. Pharmacol. Vol 4. (1997).pp:30-49.
98. Harborne, J.B. “ Introduction to ecological biochemistry”. J.Pharmacology. Vol 4. (1977). pp:155-159.
99. Hadi, M. “ La quercétine et ces dérivés: molécules à caractères pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques”. Thèse de doctorat en pharmacochimie. Université Louis Pasteur. (2004). 155p.
100. Montoro, P., Tuberoso, C.I.G., Placente, S., Perrone, A., De Feo, V., Cabras, P., Pizza, C. “ Stability and anti-oxydant activity of polyphenols in extracts of *Myrtus communis* L berries used for the preparation of Myrtle liqueur”. J. Pharma.biomed. Vol 41. (2006). pp:1614-1619.
101. Rees, S.B. et Harborne, J.B.“ The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defence of the chicory plant”. J. Phytochemistry. Vol 24. (1985). pp:2225-2231.
102. Bovy, A. “ Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants”. J.Phytochemistry. Vol 65. (2004). pp:2631-2648.
103. Louis, S. “ Diversité structurale et activité biologique des albumines entomotoxiques de type 1b des graines de légumineuses”. Thèse de doctorat en Pharmacie. Institut national des sciences appliquées de Lyon. (2004). 260p.
104. Ziouti, A., El Madafar, C. et Boustani, E. “ Rôle des composés phénoliques du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L) dans sa défense contre le bayoud (*Fusarium oxysporum fsp albedinis*)”. These de Magister en biologie. Université Cadi Ayad. Maroc. (1998).129p.
105. Tan, K.S.,Tosont, T., Masuda, Y. et Kamisaca, S. “ Involvement of cell wall-bound diferulic acid in light-induced decrease in growth rate and cell wall extensibility of *Oryza coleoptles*”. J. Plant.cell.physiol. Vol 30. (1992). pp:103-108.
106. Sarni-Manchado, P. et Cheynier, V. “ Les polyphenols en agro-alimentaire”. Edition Lavoisier. (2006). 398p.
107. Misirli, A., Kiden, A., Demir, G. et Gülcan, R. “ Determination of phenolic compounds in some almond hybrids varying in resistance to *Pseudomonas amygdali*”. 11<sup>ème</sup> Colloque du GREMPA sur le pistachier et l’amandier. Zaragoza. (2001). pp:71-86.
108. Fleuriet, A. et Macheix, J.J. “ Effet des blessures sur les composés phénoliques des fruits de tomates cerises (*Lycopersicon esculentum* var *cerasiforme*)”. J. Physiologie végétale. Vol 15. (1977). pp:239-250.

109. Dubois, G.E., Grosby, G.A. et Saffron, P. “ Non nutritive sweeteners: Taste structure relationships with for some new simple dihydrochalcones”. J. Science. Vol 195. (1977). pp:397-399.
110. Bravo, L. “ Polyphenols. dietary source, metabolism, and nutritional significance”. J.Nutrition. Vol 45. (1998). pp:317-333.
111. Vergé, S., Soulet, S., Lacan, F., Mas, T., Arnaudinaud, V. et Nay, B. “ Les polyphenols du vin: de la chimie pour la vie”. Bull. soc. pharm. Vol 138.(1999). pp:75-90.
112. Zryd, J.P. “ Cultures de cellules, tissus et organes végétaux”. Edition Press polytechniques. Romandes. (1988). 308p.
113. Tourte, Y. “ Génie génétique et biotechnologie ”. Edition Dunod, Paris. (2002). 200p.
114. Haicour, R. “ Biotechnologie végétale”. Techniques de laboratoire. Paris. (2002). 273p.
115. Doré, C. et Varoquaux, F. “ Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées”. Edition Quae. (2006). 198p.
116. Raven, P.H. et al. “ Biologie végétale ”. Edition Boeck Université. (2003). 968p.
117. Neil, A. et al. “ Biologie ”. Edition Boeck Université. (2006). 1482p.
118. Kyte, L., Kleyn, J.G. “ Plants from test tubes, an introduction to micropropagation”. Edition Timber Press. (1996). 240p.
119. Saadi, A. “ Régénération de plantes de pois *Pisum sativum* L. par embryogenèse somatique”. Thèse de doctorat en agronomie. Paris Grignon. (1991). 162p.
120. Hamdani, F.Z. “ Régénération via l'organogénèse ou l'embryogénèse somatique chez le *Scorpiurus*”. Thèse de magister en agronomie. Université de Chlef. (2006). 132p.
121. Margara, F. “ Bases de multiplication végétative: les méristèmes et l'organogénèse”. Edition INRA. Paris. (1989). 262p.
122. Ferry, M., Bouguedoura, N. et El Hadrami, I. “ Patrimoine génétique et technique de propagation in-vitro pour le développement de la culture du palmier dattier”. Numéro spécial oasis. Sécheresse. N° 9.(1998). pp:13-16
123. Semal, J.“ Reproduire à l'identique: Mythe et réalité”. Cahier.Agric. Vol 7. (1998). pp:6-8
124. Debergh, P.C. et Zimmerman, R.H. “ Micropropagation technology and application”. Edition Kluwer Academic. (1991). 512p.
125. Chaussat, A et al. “ La multiplication végétale des plantes supérieures”. Edition Gauthier-Villars. (1980). 277p.
126. Margara, J. “ Bases de la multiplication végétative, les méristèmes et l'organogénèse” Edition INRA. Paris. (1982). 288p.

127. Gallais, A., Bannerot, H. “ Amélioration des espèces végétales cultivées, objectifs et critères de sélection”. Edition Quae. (1992). 168p.
128. Lafon, J.P et al. “ Biologie des plantes cultivées”. Edition Tec & Doc.(1998). 150p.
129. Jullien, M. “ La multiplication végétative in vitro, bases méthodologiques et physiologique”. Thèse de DEA en ressources génétiques. INA. Paris. (1991). 101p.
130. Loiseau, J., Ferriere, N.M. et Ledeneuf, Y. “ Histology of somatic embryogenesis in pea”. Plant physiology and biochemistry. Vol 36.(1998).pp: 125-129.
131. Vasilenko, A.J.K., Daniel, M.C. et Conger, B.V. “ Ultrastructural analysis of somatic embryo initiation: Development and polarity establishment from mesophyll cells of (*Dactylis glomerata*) ”. J. In-vitro cell and develop biol plant. Vol 36. (2000). pp:235-240.
132. Egertsdotter, U. et Arnold, S.V. “ Development of somatic embryos in Norway spruce”. J. Botany. Vol 49. (1998). pp:155-162.
133. Nuti Ranchi, V. “Mitosis and meiosis in cultured plant cells and their relationship to variant cell types arising in culture”. J. Cytology. Vol 158.(1995).pp:65-70.
134. Norrel, B. “ Cultures de tissus végétaux et embryogenèse non zygotique”. Soc. Bot. Vol 35. (1973). pp:71-78.
135. Nuti Ranchi, V. “ Organogenesis and embryogenesis: genetic and physiological approaches: 1<sup>st</sup> International symposium in-vitro culture and horticultural breeding”. Acta Horticulturae. Vol 280. (1990). pp:1-11.
136. Harkman, V. et Arnold, S. “ Plantlet regeneration through somatic embryogenesis in *Picea abies* ( Norway spruce) ”. Journal plant physiology. Vol 121. (1985). pp:149-158.
137. Piatti, M.F. “ Embryogenèse somatique et synchronisation du développement embryonnaire”. Thèse de doctorat en pharmacie . Paris VI. France. (1988). 130p.
138. Daikh, H. et Demarly, Y. “ Résultats préliminaires sur l'obtention d'embryons et la réalisation de semences artificielles de palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*)”. J. Botany. Vol 42. (1987) . pp:593-596.
139. Rouget, Y. “ Embryogenèse somatique de la laitue *Lactuca sativum L.*”. Thèse de doctorat en agronomie. Université d'Orsay.(1989). 147p.
140. Camefort, H. “ Morphologie des végétaux vasculaires” . Edition Doin.(1977). 418p.
141. Fletcher, P.J., Fletcher, J.D., Cross, R.J. “ Potato germplasm in-vitro storage and virus reduction”. J. Crop and horticultural science. Vol 26. (1998). pp:249-252.
142. Sama, A.E., Simon, Z., Nyochemberg, L., Tambong, T.A., Nezana, X. et Wutah, J.G. “Culture in-vitro et multiplication rapide de plante à tubercules et racines au Caméroune”. Cahier agriculture. Vol 7. (1998). pp :63-66.

143. Hopkins, G. “ Physiologie végétale ”. Edition Boeck Université. (2003). 312p.
144. Chlyah, H. et Demarly, Y. “ Le progrès génétique passe-t-il par le repérage et l'inventaire des gènes”. Journées scientifiques du réseau biotechnologies végétales. Rabat. Publié par John Libbey Eurotext. (1993). pp: 102-106.
145. Bajaj, Y.P.S. “ Biotechnology in agriculture and forestry: High-tech and Micropropagation”. Birkhäuser. Edition Springer. (1997). 395p.
146. Druart, P.H. et Samyn, G. “ Carbohydrates and in vitro organogenesis”. Bulletin de recherche qgronomique. Vol 30. (1995). pp:5-8.
147. Street, H.E. “ Culture in vitro cytologie organogénèse plant-tissu and cell culture”. Edition Oxford. London .(1977). 614p.
148. Druart, P.H. “ In vitro culture and micropropagation”. Edition Verlag Berlin Heidelberg. (1992). 301p.
149. Hobbie, L.J. “ Auxin molecular genetic approaches in *Arabidopsis*”. J. Plant physiology et biochemistry. Vol 36. (1998). pp:91-102.
150. Abrie, A.L. et Staden, J.V. “ Micropropagation of the endangered *Aloe polyphylla*” . J. Plant growth regulation. Vol 33. (2001). pp:19-23.
151. Compton, E.M., Pierson, B.L et Staub, J.E. “ Micropropagation for recovery of *Cucumis hystrix*” . Plant cell tissue and organ culture. Vol 64. (2001). pp:63-67.
152. Mok, W.S et al. “Cytokinins chemistry, activity and function”.Edition CRC. (1994). 338p.
153. Frett, J. “ Influence of nutrient salts , auxines and cytokinines on the in-vitro growth of *salvia greggie*” . J. Plant cell tissu and organ culture. Vol 9. (1977). pp:89-102.
154. Walker, K.A., Wendel, M.L. et Jawarski, E.G. “ Organogenesis in callus tissue of *Medicago sativa* the temporal repartition of induction process from differentiation process”. Plant science letters. Vol 16. (1979). pp:23-30.
155. Gautheret, R.J. “ La culture des tissus végétaux, techniques et réalisations”. Edition Masson. (1959).863p.
156. Bulard, C. “ Acide Abscissique, structure, synthèse et métabolisme”. Edition Palais des académies. (1972). 142p.
157. Nultsch, W. “ Botanique générale”. Edition Boeck université. (1998). 624p.
158. Svoboda, H., Albrechtova, J., Kumstyrova, L., Lipavska, H., Vagner, M. et Vondrakava, Z. “Somatic embryogenesis in Norway spruce: Anatomical study of embryo development and influence of polyethylene glycol on maturation process”. J. Plant physiology and biochemistry. Vol 37. (1999). pp:209-218.

159. Meynier, V. “ Propagation in vitro de deux noyers selectionnés: *Juglans regia*, *Juglans regia*, *Inglad regia*”. Thèse de doctorat en agronomie. Université de Nancy. France. (1985).115p.
160. Molet, D. “ Culture in vitro: Boutures, microboutures et mini-tuberisation de la pomme de terre française”. J. Physiol.plant. Vol 144. (1988). pp:43-46.
161. George, F. et Sherrington, P.D. “ Plant propagation by tissue culture”. Exegetic Ltd. Vol 33. (1984). pp:125 -129.
162. Brown, C.W. “ Germplasm of in-vitro somatic embryogenesis in alfalfa” . Hortscience. Vol 23. (1988). pp:526-531.
163. Evans, D.A., Sharp, W.R. et Flien, C.E. “ Growth and behaviour of cell cultures: embryogenesis and organogenesis in Plant tissue culture, methods and application agricultures”. Edition Boca Raton. Florida. (1981). 113p.
164. Demarly, Y. et Sibi, M. “ Amélioration des plantes et biotechnologie in vitro variation ou variations somaclonales”. Edition John-libbey. England. (1989). 152p.
165. Bianchini, F. et Corbetta, F. “ Atlas des plantes médicinales ”. Edition Fernand Nathan. Paris. (1975). 243p.
166. Klein, J.D., Cohen, S., Hebbe, Y. “ Seasonal variation in rooting ability of myrtle (*Myrtus communis* L) cuttings”. Scientia Horticulturæ. Vol 83. (2000). pp: 71-76.
167. Bonjar, S.G.H., Nik, A.K., Haydari, M.R., Ghasemzadeh, M.H., Farrokhi, P.R., Moein, M.R., Mansouri, S., Foroumadi, A. “ Anti-Pseudomonas and anti-bacilli activity of some dedicinal plants of Iran” . J. Pharmacol. Vol 11. (2003). pp:157-163.
168. Deriu, A., Branca, G., Mollicoti, P., Pintore, G., Tirillini, B., Paglietti, B., Mura, A., Sechi, L.A., Fadda, G. et Zanetti, S. “ In vitro activity of essential oil of *Myrtus communis* against *Helicobacter pylori*”. J. Antimicrob agents. Vol 30. (2007). pp:562-565.
169. Sepici Dincel, A., Açikgöz, S., Çevik, C., Sengelen, M., Yesilada, E. “ Effect of in vivo anti-oxidant enzyme activities of myrtle oil in normoglycaemic and alloxan diabetic rabbits”. J. Ethnopharmacol. Vol 110. (2007). pp:498-503.
170. Wilson, P.G., O'Brien, M.M., Gadek, P.A., Quinn, C.J. “ Myrtaceae revisited: a reassessment of infra-familial groups”. J.Amer.bot. Vol 88. (2001). pp: 2013-2025.
171. Crété, P. “ Précis de botanique: Systématique des angiospermes”. Tome II. Edition Masson. (1965). 429p.
172. Paris, R.R. et Moyse, H. “ Matière médicale”. Tome II. Edition Masson. (1967). 438p.
173. Beniston, N. “ Flore d'Algérie”. Edition Unite Reghaïa . Alger. (1985). 395p.
174. Beloued, A. “ Les plantes médicinales d'Algérie”. Edition OPU. Alger. (2001). 277p.

175. Somon, E. “Arbres, arbustes et arbrisseaux en Algérie”. Edition OPU. Paris. (1987).143p
176. Ciccarelli, D., Garbari, F., Pagni, A.M. “ The flower of *M communis*: Secretary structures, unicellular papillae, and their ecological role”. Flora. Vol 203. (2008). pp:85-93.
177. Davis, P.H. “ Flora of Turkey and the east Aegean Islands”. Univ Press, Edinburgh. Vol 4. (1982). pp: 172-177.
178. Akgül, A. “Spice science and technology”. Edition Turkish Assoc of Technol. Ankara. (1993).185p.
179. Özek, T., Demirci, I. et Baser. K.H.C. “ Chemical composition of Turkish myrtle oil”. Journal of Essential Oil Research. Vol 12. (2000). pp:541-544.
180. Quezel, P. et Santa, S. “La nouvelle flore de l’Algérie et des régions désertiques méridionales”. Edition CRS. Paris. (1963). 559p.
181. Bonafé, F. “ Flore de Mallorca”. III Editorial Moll Mallorca, spain. (1979). In: Traveset, A., Riera, N. et Mas, R. “ Ecology of fruit colour polymorphysm in *Myrtus communis* and differential effects of birds and mammals on seed germination and seedling growth”. J. Ecology. Vol 89. (2001). pp:749-760.
182. Bianchini, F., Azzura, C.P. “Le guide vert des plantes et fleurs”. Edition Art Graficas. Toledo. Espagne. (1975). 522p.
183. 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. Vol 7. (2007). pp:1-40
184. Salih, F.M. et Nadir, M.T. “ Anti-candidal activity in some Iraqi plants”. Fitoterapia. Vol 55. (1984). pp:238-241.
185. Al hindawi, M.K., Al Deen, I.H.S., Nabi, M.H., Ismail, M.A. “ Anti-inflammatory activity of some Iraqi plants using intact rats”. J.Ethnopharmacol.Vol 26.(1989).pp:163-168.
186. Varisco, D.M. “ Indigenous plant protection methods in Yemen”. J.Geology. Vol 37. (1995). pp:27-38.
187. Mansouri, S., Foroumadi, A., Ghanei, T., Gholamhosseinian Najar, A. “ Anti-bacterial activity of the crude extracts and fractionated constituents of *Myrtus communis*”. Pharmaceutical biology. Vol 39. (2001). pp:399-401.
188. Bnouham, M., Mekhfi, H., Legssyer, A. et Ziyat, A. “ Medicinal plants used in the treatùment of diabetes in Marocco”. J. Biabetes metabolism. Vol 10. (2002). pp:33-50.
189. Viegi, L., Pieroni,A., Guarrera,P.M., Vangelisti,R. “ A review of plant used in folk veterinary medicine in Italy”.J.Ethnopharm.Vol 89.(2003).pp:221-234.
190. Bonjar, G.H.S. “ Antibacterial screening of plants used in Iranian folkloric medecine”. Fitoterapia. Vol 75. (2004). pp:231-235.



191. Cakir, A. “ Essential oil and fatty acid composition of the fruits of *Hippophae rhamnoides* and *Myrtus communis* from Turkey”. *Biochem system ecology*. Vol 32.(2004). pp:809-816.
192. 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*. Vol 3.(2006). pp:229-235.
193. Della, A., Hadjichambi, D.P., Hadjichambi, A.C. “ An ethnobotanical survey of wild edible plants of Paphos Larnaca countryside of Cyprus”. *J.Ethnobiol.Etnomed*. Vol 2.(2006).pp:125-129.
194. Teklehaymanot, T. et Giday, M. “Ethnobotanical study of medicinal plants used by people in Zegie Peninsula, Northwwestern Ethiopia”. *J.Ethnobiol*. Vol 3.(2007).pp:256-258.
195. Roddier Quefelec, C. “ La région méditerranéenne: Un haut lieu de biodiversité”. *Revue nouvelles des forets*. N°11. (2008). pp:3-6.
196. Poletti, A. “ Fleurs et plantes médicinales”. Edition Delachaux & Niestlé. (1982). 222p.
197. Valdes, B., Talavera, S. et Ferbabdez Galiano, E. “ Myrto”. *Flora vascular de andalucia*. N°8. (2005). pp:76-77.
198. Bartels, A. “ Guide des plantes du bassin méditerranéen”. Edition Eugen Ulmer. France.(1998). 400p.
199. Compbell, M.S. “ *Myrtus L*”.(1968). In : Tutin, T.G., Heywod, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine; D.H., Walters, S.M. et Webb, T.G. “ Structure and development of elaiosome in *Myrtus communis* seeds”. *Flora europea*. Vol 2. (1968). pp:303-304.
200. Blakeley, W.F. “ A key to the Eucalyptus”. Edition Commonwealth forestry. Camberra. Sydney.(1959).228p.
201. Boukef, M.K. “ Les plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne”. Edition Agence de cooperation culturelle et technique. Tunisie. (1986). 436p.
202. Herrera, C.M. “ A study of avian frugivors, birds dispersed plants and their interactions in mediterranean scrublands”. *Ecological monography*. Vol 54. (1984). pp:1-23.
203. Aronne, G. et Russo, D. “ Carnivorous mammals as seed dispersers of *Myrtus communis* in the mediterranean shrublands”. *Plant biosystem*. Vol 131.(1997).pp:189-195.
204. Aronne, G.A. et Wilcock, C.C. “ First evidence of myrmecochory in fleshy fruited shrubs of the mediterranean region”. *New phytol*. Vol 127. (1994). pp:781-788.
205. Ramdani, I. “ Contribution à l'étude de la flore médicinale de la région d'Alger”. Thèse d'ingénieur en agronomie. INA. Alger. (1994). 144p.
206. Belot, A. “ Dictionnaire des arbres et arbustes du jardin”. Edition Bordas. Paris. (1987).383p.

207. Diaz, A.M. et Abeger, A. "A new contribution to the study of polyphenolic compounds in seeds of *Myrtus communis* L." J. Medicine and phytotherapy. Vol 21. (1987). pp:317-322
208. Taylor, P. "Guide des 500 meilleures plantes de jardins". Edition Egen Ulmer. Paris.(1993). 320p.
209. Khosh-Khui. M., Bassiri. A. "Physical dormancy in myrtle seeds". Science horticulture. Vol 5.(1976). pp:363-366
210. Holcomb, E.J. et Michalas, P.J. "Myrtle as a flowering potted plant". Bull pennsylvania flower growers. N°13. (1992). pp:5-7.
211. 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.
212. Boelens, M. et Jimenez, R. "The chemical composition of Spanish myrtle oils. Part II". J. Essential oil research. Vol 4. (1992). pp:349-353.
213. Bradesi, J., Casanova, J., Costa, J. et Bernardini, A.F. "Chemical composition of myrtle leaf oil from Corsica". J. Essential oil research. Vol 9.(1997). pp:283-288.
214. Chalchat, J.C., Garry, R.P. et Michet, A. "Essential oil of myrtle (*Myrtus communis* L.) of the mediterranean littoral". J. Essential oil research. Vol 10. (1998). pp:613-617.
215. Koukos, P.K. et al. "Chemicals from Greek forestry biomass : constituents of the leaf oil of *Myrtus communis* grown in Greece". J.Essential oil research. Vol 13.(2001).pp:245-246
216. Scora, R.W. "Essential leaf oil variability in green, variegated and albino foliage of *Myrtus communis*". Phytochemistry. Vol 12. (1973). pp:153-155.
217. Lawrence, B.M. "Progress in essential oils: Myrtle oil". Perfumer and flavorist. Vol 15. (1990). pp:65-66.
218. Lawrence, B.M. "Progress in essential oils: Myrtle oil". Perfumer and flavorist. Vol 18.(1993). pp : 52-55.
219. Lawrence, B.M. "Progress in essential oils: Myrtle oil". Perfumer and flavorist. Vol 21. (1996). pp:57-58.
220. Flamini, G., Luigi Cloni, P., Morelli, I., Maccioni, S. et Baldini, R. "Phytochemical typologies in some populations of *Myrtus communis* L. on Caprione promontory (East Liguria, Italy)". Food chemistry. Vol 85. (2004). pp:599-604.
221. Gardeli, C., Vassiliki, P., Athanasios, M., Kibouris, T. et Komaltis, M. "Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. et *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts". Food chemistry. Vol 107. (2008). pp:1120-1130.
222. 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. Vol 21. (2006). pp:351-354.

223. 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. Vol 14. (2002). pp:266-270.
224. Yadegarinia, D., Gachkar, L., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A., Rasoolim, I. “Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* and *Myrtus communis* essential oils”. J. Phytochemistry. Vol 67. (2006). pp: 1249-1255.
225. 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> Congr  botanique international. (17-23/08/2005), pp: 552-554.
226. Messaoud, C., Zaoualim Y., Bensalah, A., Khoudja, M.L., Boussaid, M. “ *Myrtus communis* in Tunisia: Variability of the essential oil composition in natural populations”. Flavour fragrance. J. Vol 20. (2005). pp:577-582.
227. Agkul, A. et Bayrak, A. “ The essential oil content and composition of myrtle (*Myrtus communis* L.) leaves”. Doga. Turk. Tram. Ormancik. Dergisi. Vol 13.(1989).pp:143-147.
228. Shikhiev, A.S., Abbasov, P.M., Mamedova, Z.A. “ The composition of *Myrtus communis* essential oil”. Khimiya prirod. Soedin. Vol 4. (1978). pp:529-530.
229. Umadevi, I., Daniel, M., Sabnis, S. “ Chemotaxonomic studies on some numbers of Anardiaceae. In Proceeding of the Indian Academy of Science”. Plant sciences. Vol 98. (1988). pp:205-208.
230. Baytop, T. “ Therapy with medicinal plants in Turkey, past and present”.(1999). In: Traveset, A, Riera, N. et 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. Vol 89. (2001).pp:749-760.
231. Romani, A., Pinelli, P., Mulinacci, N., Vincierei, F.F. et Tattini, M. “ Identification and quantification of polyphenols in leaves of *Myrtus communis* L.”. Liquid chromatographia. Vol 49. (1999). pp:17-20.
232. Romani, A., Coinu, R., Carta, S., Pinelli, P., Galardi, C. et Vincieri, F. “ Evaluation of antioxidant effect of different extracts of *Myrtus communis* L.”. Free radiance research. Vol 38. (2004). pp:97-103.
233. Alamani, M.C. et Cossu, M. “ Radical scavenging activity and antioxidant activity of liquors of myrtle (*Myrtus communis* L.) berries and leaves”. Italian journal of food science. Vol 2. (2004). pp:197-208.
234. Aydin, C. et Ozcan, M.M. “ Determination of nutritional and physical properties of myrtle (*Myrtus communis* L.) fruits growing wild in Turkey”. Journal of food engineering. Vol 79. (2007). pp:453-458.
235. Ozkan, M.M. et Akbulut, M. “ Estimation of minerals, nitrate and nitrite contents of medicinal and aromatic plants used as spices, condiments and herbal tea”. Food chemistry Vol 106. (2007). pp:852-858.

236. Poelman, M.C. “Initiation à la cosmétologie pratique”. Edition Dunod. Paris. (1987). 186p.
237. Albasini, A. et Bertelli, D. “ Determinazione della frazione aromatica in frutti di mirto, Atti Giorn.Stu. Mirto”. J.Natural production. Vol 37. (1999). pp:287-289.
238. 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. (2005). 137p.
239. Kashman, Y., Rotstein, A., Lifshitz, A. “ The structure determination of two new acylphloroglucinols from *Myrtus communis*”. Tetrahedron lett. Vol 30.(1974).pp:991-997.
240. Bezanger .“ Plantes médicinales des régions tempérées”.Edition Maloine.Paris.(1980). 413p.
241. Bharate, S.B. et al. “ Antiprotozoal and antimicrobial activities of O-alkylated and formylated acylphloroglucinols”. Bioorg. Med. Chemistry. Vol 15. (2007). pp:87-96.
242. Spedding, G., Ratty, A., Middleton, E.J. “ Inhibition of reverse transcriptase by flavonoids”. Antiviral. res. Vol 12. (1989). pp:99-110.
243. Veckenstedt, A., Pusztai, R. “ Mechanism of antiviral action of quercetin against cardiovirus infection in mice”. Antiviral research. Vol 1. (1981). pp:249-261.
244. Vrijssel, R. et al. “ The poliovirus-induced shut-off of cellular protein synthesis persists in the presence of 3-methylquercetin, a flavonoid witch blocks viral protein and RNA synthesis”. Antiviral research. Vol 7. (1987). pp:35-42.
245. Ohnishi, E. et Bannai, H. “ Quercetin potentiates TNF-induced antiviral activity”. Antiviral research. Vol 22. (1993). pp:327-331.
246. Alves, L. “ Aromathérapie”. Edition Dunod. (2002). 240p.
247. Verotta, L., Appendino, G. “ Acylphloroglucinols from mediterranean plants as potential leads for infectious disease”. 11<sup>ème</sup> Symposium National sur les produits de recherches. Network. E.C. Africa 2005. Antananarivo. Madagascar. (2005). pp:9-10.
248. Torre Mendoza, D. et al.“ Weakly anti-malarial flavonol arabinofuranosides from *Calycolpus warszewiczianus*”. J.Natural production. Vol 69. (2006). pp:826-828.
249. Azadbakht, M., Ziai, H., Adbollahi, F. et Shabankhani, B. “ Effect of essential oils of *Artemisia aucheri* Boiss., *Zataria multiflora* Boiss. and *Myrtus communis* L. on *Trichomonas vaginalis*”. J. Med. plant. Vol 8. (2003). pp:35-40.
250. Gauthier, R. “ Activité de l'extrait de *Myrtus communis* contre *Pediculus humanus capitatus*”. Brochure Tome III. (1989). pp: 93-108.
251. Oka, Y., Nacar, S., Putievsky, E., Ravid, U., Yaniv, Z. et Spiegel, Y. “ Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode”. J. Phytopathology. Vol 90. (2000). pp:710-715.

252. Traboulsi, K., Taoubi, K., El Haj, S., Bessiere, J.M., Rammal, S. “ Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera:Culicidae)”. Pest.manag. Sci. Vol 58. (2002). pp:491-495.
253. Bardeau, F. “ La médecine par les fleurs”. Edition Robert Laffount. Paris. (1978). 440p.
254. Deruaz, D. et Reynaud, J. “ Evaluation of the molluscicidal properties of *Myrtus communis* L. (Myrtaceae)”. J. Phytotherapy research. Vol 7. (1993). pp:428-430.
255. Rosa, A., Deiana, M., Casu, V., Corona, G., Appendino, G., Bianchi, F., Ballero, M., Desi, M.A. “ Antioxidant activity of oligomeric acylphloroglucinols from *Myrtus communis* L. ”. Free.rad.res. Vol 37. (2003).pp : 1013-1019.
256. Hayder, N. et al. “ Antimutagenic activities of aqueous extracts and essential oil isolated from *Myrtus communis* L.”. Pharmazie. Vol 58. (2003). pp:523-524.
257. Gonzalez, A.G., Darias, V. et Munguia, O. “ Contribution to the chemotherapeutic study of the seed of *Myrtus communis* L.”. Fitoterapia. Vol 52. (1981). pp:171-174.
258. Elfellah, M.S., Akhter, M.H. et Khan, M.T. “ Anti-hyperglycemic effect of an extract of *Myrtus communis* in streptozotocin-induced diabetes in mice”. J. Ethnopharmacol. Vol 11. (1984). pp: 275-281.
259. 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.
260. Onal, S., Timur, S., Okutuku, B., Zihnioglu, F. “ Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase by aqueous extracts of some potent antidiabetic medicinal herbs”. Prep.biochem.biotech. Vol 35. (2005). pp: 29-36.
261. Sepici, A.D., Gurbuz, I., Cevik, C., Yesilada, E. “ Hypoglycaemic effects of myrtle oil in normal and alloxan-diabetic rabbits”. J. Ethnopharmacology. Vol 93.(2004).pp:311-318.
262. Moreno-Jimenez, E., Penalosa, J.M., Carpena Ruiz, R. et Esteban, E. “ Comparison of arsenic resistance in mediterranean woody shrubs used in restoration activities”. Chemosphere. Vol 71. (2008). pp:466-473.
263. Guasmi Boubaker, A., Kayouli, C., Buldgen, A., Boukary, A., Ammar, H. et Lopez, S. “Effect of feed block supply on the ruminal ecosystem of goats grazing shrub land in Tunisia”. Animal feed science and technology. Vol 127. (2006). pp:1-12.
264. Maccioni, S., Tomei, P.E. et 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.
265. Marchini, G. et Maccioni, S. “ Liguria in parole povere Geneva”. (1998). In: Flamini; G., Luigi Cloni; P., Morelli, I., Maccioni, S. et Baldini, R. “ Phytochemical typologies in some population of *Myrtus communis* L. on Caprione promontory (East Liguria, Italy)”. Food chemistry. Vol 85. (2004). pp:599-604.

266. Benigni, R., Capra, C. et Cattorini, P.E. “ Les plantes medicinales”. (1964). In: Flamini, G., Luigi Cloni, P., Morelli, I., Maccioni, S. et Baldini, R. “ Phytochemical typologies in some populations of *Myrtus communis* L. on Caprione promontory (East Liguria, Italy)”. Food chemistry. Vol 85. (2004). pp:599-604.
267. Duke, J.A. “ Handbook of medicinal herbs”. Edition Boca Raton.(1988). 199p.
268. Twaij, H.A.A., Elisha, E.E. et Khalid, R.M. “ Analgesic studies on some Iraqi medicinal plants”. J. Crude drug research. Vol 27. (1989). pp:109-112.
269. Ogur, R. “ A research about myrtle tree (*Myrtus communis* L.)”. J. Ecology. Vol 10. (1994). pp:21-25.
270. Hammiche, V. et Maiza, K. “ Traditional medicine in central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N’ajjer”. J. Ethnopharmacol. Vol 105. (2006). pp: 358-367.
271. Karamanoglu, K. “ Pharmaceutic botanic”. Ankara Univ.Ecz.Fac.Yay.(1972). In: Aydin, C. et Ozcan, M.M. “ Determination of nutritional and physical properties of myrtle (*Myrtus communis* L.) fruits growing wild in Turkey”. J. Food engineering. Vol 79. (2007). pp:453-458.
272. Dogan, A. “ *Myrtus communis* L.”. In : Aydin, C. et Ozcan, M.M. “ Determination of nutritional and physical properties of myrtle (*Myrtus communis* L.) fruits growing wild in Turkey”. Journal of food engineering. Vol 79. (2007). pp:453-458.
273. Canhoto, J.M., Lopes, M.L. et Cruz, G.S. “ 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. (24-26/05/1998). Portugal. pp: 289-292.
274. Hutton Balfour, J. “ The plants of the Bible”. Trees and shrubs.(1857). 54p
275. Ozenda, P. “ Flore du Sahara”. Edition CNRS. Paris. (1977). 623p.
276. “Travaux”. Laboratoire forestier. Université de Toulouse. France. (1954). 221p.
277. Kossmann, M.G. “ Berber loanwords in Hausa”. Edition Köppe. (2005). 228p.
278. Mondelino. L. “ Parades post coloniales”. Edition Karthala. (2006). 160p.
279. “ Revue de géographie alpine”. Institut de géographie alpine. Université de Grenoble. N°1. (1957). pp:12-13.
280. “ Lybica Algeria service des antiquités”. Laboratoire d'anthropologie et d'archéologie préhistorique. Edition Musée de Bardo. Algérie. (1968). 86p.
281. Barry, J.P. “ Essai de monographie de *Cupressus dupreziana*, cyprès endémique du Tassili des Ajjer (Sahara Central)”. Bull. Société d'histoire naturelle de l'Afrique du Nord. N°61. (1970). pp:9-12.
282. Cloudsley-thompson, J.L. “ Biology of deserts”. Edition Institute of biology. (1954). 223p.

283. Maka, M. “ Fleurs du Sahara, arbres et arbustes au cœur de leurs usages avec les touareg du Tassili”. *Phytotherapia*. Vol 2. (2004). pp:191-197.
284. Quezel, P. “ Contribution à l'étude de la flore et de la végétation du Hoggar”. Monographies régionales. Travaux de l'institut de recherches sahariennes. (1954). 164p.
285. “ Bulletin de la société préhistorique française”. Edition CNRS. Paris. (1963). 151p.
286. Migliore, J. “ Evolution et persistance des végétaux méditerranéens face à une aridification croissante du climat: le cas du genre *Myrtus* (Myrtaceae)”. Poster Imep. Séminaire conservation, valorisation et gestion des populations. (2007).
287. 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.
288. Wichens, G.E. “ Ecophysiology of economic plants in arid and semi arid lands”. Edition Springer. (1998). 343p.
289. Freulon, J.M. “ Etude géologique des séries primaires du Sahara central (Tassili n'Ajjer et Fezzan)”. Edition CNRS. Paris. (1964). 189p.
290. “ Guide des parcs nationaux d'Afrique: Afrique du nord, Afrique de l'ouest”. Edition Delachaux & Niestlé. Paris. (1992). 368p.
291. 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. N°1. (1984). pp:1-9.
292. Le Houerou, H.N. “Définition et limites bioclimatiques du Sahara”. *Sécheresse*. N° 12. (1990). pp: 24-26.
293. “ Encyclopédie Microsoft Encarta”. CD-ROM. (2008).
294. Langeron, M. “ Précis de microscopie”. Edition Masson et Cie. Paris. (1949). 1362p.
295. Murashige, T., Skoog, F. “ A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures”. *Physiology of plants*. Vol 15. (1962). pp:473-497.
296. 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. (1986). 61p.
297. Dowson, A. et Aten, M. “ Composition et maturation, récolte et conditionnement des dattes”. Collection F.A.O. Rome. (1963). 167p.
298. Zerrad, W., Hillali, S., Mataoui, El antris, B.S., et Hmeyan, A. “ Etude comparative des mécanismes biochimiques et moléculaires de résistance au stress hydrique de deux variétés de blé dur”. *Bull. Laboratoire de biochimie d'environnement*. Maroc. N°7. (2006). pp:10-14.
299. “ Pharmacopée européenne”. Tome I. Conseil de l'Europe. Strasbourg. (2005). 3343p.

300. Togola, A. “ Etude de la phytochimie et de l'activité antipaludique de *Alchornea cordifolia* Schmach.”. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako. Mali. (2002). 100p.
301. Diarra, M.N. “ Etude phytochimique d'une plante antipaludique: *Spilanthes oleracea*”. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako. Mali.(2003). 78p.
302. “ Pharmacopée URSS”. Tome II. 11<sup>ème</sup> édition. Moscou. (1991).250p.
303. 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
304. Berthod, A., Billardello, B. et Geoffroy, S. “ Polyphenols in countercurrent chromatography. An example of large scale separation. Analysis”. EDP Sciences. Vol 27. (1999). pp:750-757.
305. Judith, M.D. “ 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.
306. Sanhaji, O. “ Etude de l'activité antifongique des extraits de cannelle”. Journal de mycologie medicale. Vol 15. (2005). pp:220-229
307. Kaid Slimane, I.L. “ 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.
308. Aprino, P. “ La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse”. Fiches Techniques d'ingénieur. (1985). pp: 130-136.
309. Bouchonnet, R. “ Les différents types de spectromètre de masse utilisés pour l'analyse”. Edition Masson. (1999). 356p.
310. William, B. J. “ The original of the soxhlet extractor ”. Journal of chemical education. Vol 84. (2007). pp:1913-1915.
311. Grzegorzczak, I., Matkowski, A., Wysokinska, H. “ Antioxidant activity of extracts from in vitro cultures of *Salvia officinalis* L.”. Food chemistry . Vol 104. (2007). pp:536–541.
312. Garvilovie, M., Magonot, M.J. et Walach, J. “ Manipulation d'analyse biochimique”. Edition Doin. 3<sup>ème</sup> édition. (1996). 453p.
313. Slinkard, K. et Singleton, V.L. “Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods”. American journal of viticulture. Vol 28. (1977). pp:49-55.
314. Ribereau, P. “ Les composés phénoliques des végétaux”. Edition Dunod. Paris. (1968). 254p.
315. Park, Y.K., Koo, M.H., Ikegaki, M. et Contado, J.L. “ Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil”. Brazilian archives of biology and technology. Vol 40. (1997). pp:97-106.



316. Yermakov, A.I., Arasimov, V.V. et Yarosh, N.P. "Methods of biochemical analysis of plants". Agropromizdat. Leningrad. (1987). In: Miliauskasa, G., Venskutonis, P.R. et Van Beek, T.A. "Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts". Food chemistry. Vol 85. (2004). pp:231-237.
317. Duboi, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, S. "Colorimetric method for determination of sugars and related substances". Anal.chem. Vol 28.(1956).pp:350-356.
318. Joslyn, M. A. "A serie of monography". Food. Sci. techn. Second Edition Board. (1970). In: Bessas, A., Benmoussa, L. et 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
319. Jur. (1967). In: Bessas, A., Benmoussa, L. et 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
320. Gullüce, M. et al. "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. Vol 51. (2006). pp:3958-3965
321. Guérin Faublée, V. et Carret, G. "L'antibiogramme : principes, méthodologie, intérêt et limites". Journées nationales GTV-INRA. (1999). pp: 5-12.
322. Fauchere, J.L. "Bactériofiches: Techniques en bactériologie clinique". Edition marketing SA. (1997). 174p.
323. Veličković, D.T., Randjelović, N.V., Ristić, M.S., Veličkovič, A.S. et Šmelcerović, A.A. "Chemical constituents and antimicrobial activity of the ethanol extracts obtained from the flower, leaf and stem of *Salvia officinalis L.*". J. serb. chem. soc. Vol 68. (2003).pp:17-24.
324. Cuendet. M., Hostettmann. K., Potterat. O. "Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*". Helvetica. Chimica. act. Vol 80. (1997). pp:1144-1152.
325. Dong-Sun, L., Nam-Soon, K. et Sang-Han, L. "2, 2-Diphenyl-1- picrylhydrazyl hydrate, a stable free radical: an  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor". J. Biological and pharmaceutical research. Vol 24. (2001). pp: 727-728.
326. Chevalley, I. "Contribution à l'étude phytochimique des Saxifragacées : isolement d'antioxydant à partir de *Saxifraga stellaris L.* et *Saxifraga cuneifolia L.* et d'un composé antifongique de *Ribes rubrum L.*". Thèse de doctorat. Université de Lausanne.(2000). 175p.
327. Wang, M., Li, J., Rangarajan, M., Shao, Y., La Voie, E.J., Huang, T.C., Ho, C.T. "Antioxidant phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*)". J. Agricultural and food chemistry. Vol 46. (1998). pp:4869-4873.
328. Heilerová, L., Bučková, M., Tarapčík, P., Šilhár, S. et Labuda, J. "Comparison of antioxidative activity data for aqueous extracts of some herbs obtained by conventional methods and the DNA-based biosensor technics". Food science. Vol 21. (2003). pp:78-84.

329. Jayaprakasha, G.K., Singh, R.P., Sakariah, K.K. "Antioxidant activity of *Vitis vinefera* extracts on peroxidation modes in vitro". Food chemistry. Vol 73. (2001). pp:285-290.
330. Hua Ming, C., Muramoto, K., Yamauchi, F., Nokihata, K. "Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein". J. Agricultural and food chemistry. Vol 44. (1996). pp:2619-2623.
331. Pin Der Duh, D. "Antioxidant activity of budrock (*Arctium lappa L.*): its scavenging effect on free radical and active oxygen". J.ame. oil. chem.soc. Vol 75.(1998).pp: 455-461.
332. Decker, E.A., Welch, B. "Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food". J. Agricultural and food chemistry. Vol 38. (1990). pp:674-677.
333. Gülçin, I., Oktay, M, Kireççi, E. et Küfrevioğlu, Ö.I. "Screening of antioxidant and anti microbial activities of anise seed extracts". Food chemistry. Vol 83. (2003). pp:371-382.
334. Traveset, A., Riera, N. et Mas, R. "Ecology of fruit colour polymorphysm in *Myrtus communis* and differential effects of birds and mammals on seed germination and seedling growth". J. Ecology . Vol 89. (2001). pp:749-760
335. Brocheriou, J., Belin-Depoux, M. "Contribtion a l'etude ontogenique des poches secretrices des feuilles de quelques myrtacées". Phytomorphol. Vol 24.(1974). pp: 321-338.
336. Kalachanis, D., Prasas, G.K. "Structure and development of the secretory cavities of *Myrtus communis* leaves". J. Biology of plants. Vol 49. (2005). pp:105-110.
337. Luckow, M. et Grimes, J. "A survey of anther glands in the mindmosoid legume tribes Parkieae and Mimoseae". American journal of botany. Vol 84. (1997). pp:285-297.
338. Bouderrah, M. "Comparaison de deux modes de vitro-propagation à partir de vitro-semis d'*Eucalyptus camaldulentsis* provenance ". J. Plant physiology. Vol 45.(1988). pp:102-106.
339. Sez nec, G. "Essai d'application des techniques de culture in vitro à la multiplication de deux espèces endémiques rares des Mascareignes: *Gouania mauritiana* et *Bremontiera amnoxylon*". Mémoire de DEA en biologie végétale. Université de Nancy.(1986). 84p.
340. Boulay; M. "Multiplication et clonage rapide de *Séquoia sempervirens* par la culture in vitro". Assoc. foret. cellulose. Vol 14. (1979). pp:49-55.
341. Letouze, R. et Daguin, F. "Manifestation spontanée et aléatoire d'une croissance anormale en culture in vitro". Revue canadienne de biologie. N°42. (1983). pp: 23-28.
342. Berrie, A.M.M. "Germination and dormancy". In: Wilkins, M.B. "Advanced plant". Pitman Ltd. Melbourne. N°9. (1985).pp: 44-46.
343. Hartmann, H.T., Kester, D.E. et Davies, F.T. "Plant propagation principles and practices". Edition Prentice hall international. Singapore. (1990). 647p.
344. Bani Ameer, F. et Alouani, M. "Viabilité et dormance des semences d'*Aargania spinosa*". Revue du Laboratoire de variabilité génétique. Univ Agadir. N°1.(1998).pp:31-35.

345. Harouni, M.C., Zahri, S. et 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). pp:115-123.
346. Druart, P., Kevers, C., Boxus, P.H., Gasper, T.H. “ In vitro promotion of root formation by apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases”. *flanzenphysiol.* Vol 108. (1983). pp:429-436.
347. Morel, G. et Muller, J.F. “ La culture in vitro du méristème apical de la pomme de terre”. *Comptes rendus.* Vol 258. (1964). pp.5250-5252.
348. Viana, A.M. “ Recent advances in biotechnology for tree conservation and management”. Edition IFS. Brezil. (1997). 251p.
349. Leifert, C, Ritchie, J.Y. et Whites, W.M. “ Contaminants of plant tissue and cell cultures”. *J. Microbial and biotech.* Vol 7. (1991). pp:542-459.
350. Favre, J.M. “ La rhizogenèse, aspects divers d’un processus d’organogenèse végétale”. *J. Physiol.* Vol 38. (1977). pp:37-52.
351. Boxus, P. “ Multiplication végétative: Micropropagation et embryogenèse somatique en biotechnologies végétales”. Edition CNED. (1995). 191p.
352. Skoog, F., Miller, C.O. “ Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro”. *Symposium experimental biology.* (1957). pp.118-130.
353. Heller, W. “Abrégé de physiologie végétale”. Tome II. Edition Masson. (1990). 280p.
354. Ammar, H., Lopez, S. et Gonzalez, J.S. “ Assessment of the digestibility of some mediterranean shrubs by in vitro techniques”. *Animal feed science and technology.* Vol 119. (2005), pp: 323-331
355. Chu, C. J. et Kemper, K.J. “Lavender (*Lavandula sp*)”. *Longwood herbal task force.* N°16.(2001). pp: 32-34.
356. Yrjönen, T. “ Extraction and chromatographic separation techniques in the analysis of natural products”. *These de magister en pharmacie.* Université de Helsinki.(2004). 64p.
357. Lee, K. W. et al. “ Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher anti-oxidant capacity than teas and red wine”. *J. Agric. food. chem.* Vol 51.(2003). pp:7292-7295.
358. Hayder, N. et al. “ Antimutagenic activity of *Myrtus communis L.* using the *Salmonella* microsome assay”. *South african journal of botany.* Vol 74. (2008). pp: 121-125.
359. Markham, K.R. “ Techniques of flavonoides identification”. Edition CNED. (1982). 120p.
360. Moumou, Y., Trotin, F., Vasseur, J., Vermeersch, G., Guyon, R., Dubois, J. et Pinkas, M. “Procyanidin production by *Fagopyrum esculentum* callus tissue cultures”. *J. Plant physiol.* Vol 15. (1992). pp:516-519.

361. Bahorun, T. “ Les polyphénols de *Crataegus monogyna* Jacq. in vivo et in vitro : Analyses et activités antioxydantes”. Thèse de doctorat. Université de Lille. France.(1995). 150 p.
362. Shah, R.R. et Mehta, A.R. “ Influence of phenolic acids on growth and production of phenolic compounds in *Crotalaria* callus cultures”. Bangladesh journal of botany. Vol 7. (1978). pp:51-57.
363. Ishikura, N. et Teramoto, S. “ Procyanidins and catechins from callus and cell suspension cultures of *Cryptomeria japonica*”. J. Agric. biol. chem. Vol 47. (1983). pp:421-423.
364. Stafford, H.A. et Cheng, T.Y. “ The procyanidins of douglas fir seedlings, callus and cell suspension cultures derived from cotyledons”. Phytochemistry. Vol 19. (1980).pp:131-135.
365. Stafford, H.A., Kreitlow, K.S. et Lester, H.H. “Comparison of proanthocyanidins and related compounds in leaves and leaf-derived cell cultures of *Ginko biloba* L., *Pseudotsuga menziesii* F. and *Ribes sanguineum* P”. Plant physiology. Vol 82. (1986). pp:1132-1138.
366. Bakker, J., Bridle, P., Honda, T., Kuwano, H., Saito, N., Terahara, N., Timberlake, C.F., “Identification of anthocyanin occurring in some red wines”. Phytochemistry. Vol 4. (1997). pp:145-148
367. Leclerc et al. “ Microbiologie générale”. Edition Doin. Paris.(1983). 363p
368. De Laurentis, N., Rosato, A., Gallo, L., Leone, L. et Milillo, M.A. “ Chemical composition and antimicrobial activity of *Myrtus communis*”. Revue E.P.P.O.S. Italy. N°39. (2005).pp:3-8
369. Rasooli, I., Moosavi, M.L., Rezaee, M.B., Jaimand, K. “ Susceptibility of microorganisms to *Myrtus communis* L essential oil and its chemical composition”.J.Agric.science technology. Vol 4. (2002). pp:127-133.
370. Satrani, B., Farah, A., Fechtal, M., Talbi, M., Blaghen, M. et Chaouch. A. “ Composition chimique et activité anti-microbienne des huiles essentielles de *Satureja calamintha* et *Satureja alpina* du Maroc”. Annales experientales en chimie. Vol 94.(2001).pp: 241-250.
371. Dominioguez, E., Ortega, M.M.“The effect of seed extract of *Myrtus communis* on the growth and germination of filamentous fungi”. Anal.acad.farma.(1983).Vol 49.pp:97-108.
372. Ultee, A., Kets, E.P., Alberda, M., Hoekstra, F.A. et Smid, E.J. “ Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol”. Arch.microbiol.Vol 174.(2000).pp:233-238.
373. Appendino, G., Bianchi, F., Minassi, A., Sterner, O. et Ballero, M. “ Oligomeric acylphloroglucinols from *Myrtus communis*”. J.Natural.prod.Vol 65. (2002). pp:334-338
374. Mann, C.M., Cox, S.D. et Markham, J.L. “ The outer membrane of *Pseudomonas aerogenosa* NCTC 6749 contributes to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*”. Lett. appl. microbiol. Vol 30. (2000). pp:294-297.

375. Holetz, F.B., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P. et Garcia C.D.A. “ Effect of plant extracts used in folk medicine on cell growth and differentiation of *Herpetomonas samuelpessoai* cultivated in defined medium”. Food chem.Vol 24. (2002). pp:657-662.
376. Molyneux, P. “ The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity”. Songklanakar J. Sci. Technol.Vol 26.(2004).pp:211-219.
377. Ruberto, G. et Baratta, M.T. “ Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems”. Food chemistry. Vol 69. (2000).pp:167-174.
378. Banerjee, A., Dasgupta, N., De, B. “ In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit”. Food chemistry. Vol 90. (2005). pp:727-733
379. Burda, S. et Oleszek, W. “ Antioxidant and antiradical activities of flavonoids”. J.Food chemistry. Vol 49.(2001). pp:2774-2779.
380. Vinson, J.A., Dabbagh, Y.A. et Serry, M.M. “ Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using in vitro oxidation model for heart disease”. J. Agricultural and food chemistry. Vol 43. (1995). pp:2800-2802.
381. Panichayupakaranant, P. et Kaewsuwan, S. “ Bioassay-guided isolation of the antioxidant constituent from *Cassia alata* L. leaves”. J. Sci. technol. Vol 26.(2004). pp:103-107.
382. Tuberoso, C.I.G., Melis, M., Angioni, A., Pala, M. et Cabras, P. “ Myrtle hydroalcoholic extracts obtained from different selections of *Myrtus communis* L.”. J. Food chemistry. Vol 101.(2007). pp: 806-811.
383. Park, K.Y. et al. “Antimutagenic activity of flavonoids from the heartwood of *Rhus verniciflua*”. J. Ethnopharmacol. Vol 90. (2004). pp: 73-79
384. Potterat, O. “Antioxidant and free radical scavengers of natural origin”. J. Current organic chemistry. Vol 1. (1997). pp:415-417.
385. Young, I.S. et Woodside, J.V. “ Antioxidants in health and disease”. J. Clinical pathology. Vol 54. (2001). pp: 176-186.
386. Thorpe, T.A. et Gasper, T.H. “ Changes in isoperoxidases during shoot formation in tobacco callus in vitro”. J.Physiol.Vol 14. (1978). pp.522-526.
387. Gaspar, T, Kevers, C. et Debergh, R. “ Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects”. In: “ Cell and tissue culture in forestry: general principles and biotechnology”. Edition Bonga. (1987). 316p.
388. Yeşilyurt, V., Halfon, B., Öwtürk, M., Topçu, G. “ Antioxidant potential and phenolic constituents of *Salvia cedronella*”. Food chemistry. Vol 108.(2008). pp: 31-39.