



THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR A L'UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS DE MOSTAGANEM

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Agronomiques

Option : Biochimie Végétale

SUJET:

**"Extraction et étude de l'activité biologique des huiles essentielles du Myrte
(*Myrtus communis* L.)"**

Présentée et soutenue publiquement par

Aïcha HENNIA

Le 24 mai 2016

JURY

M^r Mohamed BENKHELIFA , Professeur, Université de Mostaganem	Président
M^r Daoudi CHABANE SARI , Professeur, Université de Tlemcen	Examineur
M^{me} Malika BENNACEUR , Professeur, Université d'Oran 1 Ahmed BenBella	Examinatrice
M^r Ahmed BEKADA , Professeur, Centre Universitaire de Tissemsilt	Examineur
M^r Moussa BRADA , Professeur, Université de Khemis-Miliana	Rapporteur
M^r Saïd NEMMICHE , MCA, Université de Mostaganem	Co-encadreur
M^{me} Maria da Graça Costa MIGUEL , Professeur, Université De l'Algarve, Portugal	Invitée

Année Universitaire 2015-2016

Remerciements

J'exprime d'abord mes profonds remerciements à Monsieur **Brada M.**, Professeur, Université de Khemis-Miliana pour avoir accepté de m'encadrer, m'enseigner et de m'orienter tout au long de mon travail de thèse de Doctorat.

Mes sincères remerciements et reconnaissance vont aussi à Monsieur **NEMMICHE S.**, Maître de Conférences, Université de Mostaganem pour sa précieuse aide et apport scientifique pour la réalisation du présent travail.

Je remercie Monsieur **BENKHELIFA M.**, Professeur à l'Université de Mostaganem d'avoir voulu présider le jury d'évaluation de ma thèse de Doctorat.

Je tiens à exprimer également ma très grande considération et respect ainsi que ma vive reconnaissance à **Maria da Graça Costa MIGUEL**, Professeur à l'Université De l'Algarve (Portugal) de m'avoir encadrée, enseignée et soutenue durant mon séjour scientifique au sein de son laboratoire.

J'exprime mes vifs remerciements aussi à **M^r CHABANE SARI D.**, Professeur à l'Université de Tlemcen, **M^{me} BENNACEUR M.**, Professeur à l'Université d'Oran 1 Ahmed BenBella et **M^r BEKADA A.**, Professeur au Centre Universitaire de Tissemsilt pour avoir accepté d'examiner le présent travail et contribuer à son évaluation.

ملخص:

تم استخراج الزيوت الطيارة من أوراق و ثمار نبات الآس (*Myrtus communis L.*) ، الم جموع من منطقة شمال غرب الجزائر (Zeboudja و Ténès) عن طريق التقطير بالبخار وكان المردود متغيرا تبعاً لمرحلة الجمع (0.55-1.15 % في مرحلة الإزهار مقابل 0.34-0.39 % في مرحلة الإثمار بالنسبة للأوراق) و العضو (0.34-0.39 بالنسبة للثمار). تم تحديد التركيب الكيميائي للزيوت الطيارة المستخلصة باستخدام الكروماتوغرافيا الغازية (GC) و الإقتران كروماتوغرافيا غازية / قياس الطيف الكتلي (GC / MS). كشفت النتائج المتحصل عليها عن وجود أنماط كيميائية جديدة للزيوت الطيارة لأوراق الآس. الزيوت الطيارة لأوراق الآس الم جموع من غابة BISSA (Chlef) خلال الإزهار ذات العناصر الرئيسية: limonène (23.4%)، linalool (15.4%)، acétate géranyl (10.9%)، pinène (10.7%)، linalyl acétate (8.2%) و 1,8-cinéole (6.6%)، وتلك المستخرجة من الآس الم جموع من 14 موقعا في مناطق Zeboudja و Ténès غنية ب linalool والمصنفة إلى مجموعتين (المجموعة الأولى المتسمة بغالبية: α-pinène 32-49%، limonène 11-30%، 1,8-cinéole 10-24% و linalool 2-20%، المجموعة الثانية بغالبية: linalool 20-32%، α-pinène 23-28%، 1,8-cinéole 16-19% و limonène 15-17%). كانت الزيوت الطيارة للثمار ممتثلة نوعياً لتلك المستخلصة من الأوراق ولكن مختلفة كمياً (المجموعة الأولى: α-pinène 21-43%، limonène 25-35%، 1,8-cinéole 5-12% و linalool 1-7%، المجموعة الثانية: α-pinène 34-43%، 1,8-cinéole 9-13% و linalool 2-5%). تمتلك الزيت الطيارة المستخرجة خلال الإزهار قدرة مضادة للميكروبات ملحوظة. *Staphylococcus aureus* (Gram+) هو الأكثر حساسية (36,67 مم / 8 مئلي مقابل 16,67 مم / 20 مئلي مسجلة ل *Escherichia coli*). أيضاً، *Proteus mirabilis* (ATCC 43862) اظهر حساسية عالية لوجود الزيت الطيارة (CMI = 0.12 و CMB = 16 مئلي / مل). لوحظت CMI (4-25 مئلي / مل) ل *Proteus mirabilis* (الإكلينيكي). كانت *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)، *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 35657) و *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) مقاومة لجميع الجرعات المختبرة. عند الجرعة القصوى 0.5%، لوحظ معدل تثبيط النمو الفطري الأكثر وضوحاً عند *Alternaria solani* (92%)، يليه *Aschocyta rabiei* (85%)، و *Aspergillus ochraceus* (68%). لوحظت أفضل القدرات الإرجاعية ل DPPH (90-91%) للآس الم جموع من المواقع (Oued Goussine، Teraghnia، Dalas و Bissa). تمتلك عينات الزيوت الطيارة للآس الم جموع من المواقع Oued khdhar و Oued Goussine (Ténès) أفضل القدرات الإرجاعية للحديد بينما تلك المستخلصة من الآس الم جموع من Oued Goussine-place el Khazna و Tigharghar (Ténès) كانت تتمتع بقدرات خالصة للحديد أعلى من باقي العينات. لكن بالنسبة لاختبار ارجاع ال ABTS، الزيوت الطيارة للعينات الم جموع من مواقع (Tifless، Oued khdhar، Teraghnia و Boucheral) أظهرت أنشطة إرجاعية فوق 50%.

كلمات مفتاحية: الآس (*Myrtus communis L.*) - الزيوت الطيارة - التركيب الكيميائي - النشاط المضاد للميكروبات - القدرة المضادة للأوكسدة.

Résumé:

L'extraction des huiles essentielles (HE) des feuilles et des fruits de *Myrtus communis* L., récolté de la région nord-ouest de l'Algérie (Zeboudja et Ténès) a été réalisée par hydrodistillation et le rendement était variable en fonction du stade de récolte (0.55-1.15% en floraison vs 0.34- 0.39% en fructification pour les feuilles) et de l'organe (0.34-0.39% pour les fruits). La composition chimique des HE extraites a été déterminée par l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse (CG) et du couplage chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (CG/MS). Les résultats obtenus ont permis de révéler l'existence de nouveaux chémotypes d'HE des feuilles de myrte; celle extraite du myrte récolté de la forêt de Bissa (Chlef) durant la floraison avec les composants majoritaires: limonène (23.4%), linalool (15.4%), géranyl acétate (10.9%), α -pinène (10.7%), linalyl acétate (8.2%) et 1,8-cinéole (6.6%) et celles extraites du myrte récolté de 14 sites dans les régions de Zeboudja et Ténès riches en linalool et classées en deux groupes (groupe I caractérisé par la dominance de : α -pinène 32–49%, limonène 11–30%, 1,8-cinéole 10–24% et linalool 2–20% ; groupe II à dominance linalool 20–32%, α -pinène 23–28%, 1,8-cinéole 16–19% et limonène 15–17%). Les HE des fruits étaient qualitativement similaires à celles des feuilles mais quantitativement différentes (groupe I : α -pinène 21–43%, limonène 25–35%, 1,8-cinéole 5–12% et linalool 1–7% ; groupe II : α -pinène 34–43%, 1,8-cinéole 13–31%, limonène 9–13% et linalool 2–5%). L'HE extraite durant la floraison possédait un pouvoir antimicrobien remarquable. *Staphylococcus aureus* (Gram +) était le plus sensible (36,67mm / 8 μ L vs 16,67mm / 20 μ L noté pour *Escherichia coli*). Egalement, *Proteus mirabilis* (ATCC 43862) s'est montré fort sensible à la présence de l'HE (CMI=0.12 et CMB=16 μ g / mL). Des CMI de 0.25-4 μ g/mL ont été notées pour *Proteus mirabilis* (clinique), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 35657). *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) était résistant à toutes les doses testées. A la dose maximale de 0,5%, le taux d'inhibition de la croissance mycélienne le plus marqué est noté pour *Alternaria solani* (92%) suivie de *Fusarium oxysporum* (85%), *Aschocyta rabiei* (64%) et *Aspergillus ochraceus* (68%). Les meilleurs pouvoirs réducteurs du DPPH (90-91%) ont été notés pour le myrte récolté des sites (Oued Goussine, Teraghnia, Dalas et Bissa). Les échantillons d'HE récoltés des sites Oued khdhar et Oued Goussine (Ténès) possédaient les meilleurs pouvoirs réducteurs du fer alors que les HE du myrte récolté de Oued Goussine -place el Khazna- et Tigharghar (Ténès) avaient des pouvoirs chélatants du fer supérieures au reste des échantillons. Or pour le test de réduction de l'ABTS, les HE des échantillons récoltés des sites (Tifless, Oued khdhar, Teraghnia, et Boucheral) affichaient des activités réductrices supérieures à 50%.

Mots clés : *Myrtus communis* L.- huile essentielle - composition chimique - activité antimicrobienne - capacité antioxydante.

Summary :

Extraction of leaves and fruits *Myrtus communis* L. essential oils (EO), harvested from the north west region of Algeria (Zeboudja and Ténès) was performed by steam distillation and the yield was variable depending on the harvest stage (0.55-1.15% on flowering vs 0.34- 0.39% on fruiting for leaves) and the organ (0.34-0.39% for fruits). The chemical composition of EO extracted was determined by using gas chromatography (GC) and gas chromatography coupling to mass spectrometry (GC / MS). The results have revealed the existence of new chemotypes of EO myrtle leaves; that extracted from myrtle harvested at forest Bissa (Chlef) during flowering stage with major components: limonene (23.4%), linalool (15.4%), geranyl acetate (10.9%), α -pinene (10.7%), linalyl acetate (8.2%) and 1,8-cineole (6.6%) and those extracted from myrtle harvested in 14 sites in regions of Zeboudja and Ténès rich on linalool and classified into two groups (group I characterized by the dominance of α -pinene 32-49%, limonene 11-30%, 1,8-cineole 10-24% and linalool 2-20%; group II dominated by linalool 20-32%, α -pinene 23-28% 1,8-cineole 16-19% and limonene 15-17%). Fruits EO were qualitatively similar to leaf EO but quantitatively different (group I: α -pinene, 21-43%, limonene 25-35%, 1,8-cineole 5-12% and linalool 1-7% ; group II : α -pinene 34-43%, 1,8-cineole 13-31%, limonene 9-13% and linalool 2-5%). EO extracted during flowering stage had a remarkable antimicrobial power. *Staphylococcus aureus* (Gram +) was the most sensitive (36,67mm / 8 μ L vs 16,67mm / 20 μ L noted for *Escherichia coli*). Also, *Proteus mirabilis* (ATCC 43862) was very sensitive to the presence of EO (MIC = 0.12 and MBC = 16 μ g / mL). MIC of 0.25-4 μ g / mL were noted for *Proteus mirabilis* (clinical), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 35657). *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) was resistant to all tested doses. At the maximum dose of 0.5%, the rate of inhibition of mycelial growth was most marked for *Alternaria solani* (92%) followed by *Fusarium oxysporum* (85%), *Aschocyta rabiei* (64%) and *Aspergillus ochraceus* (68%). Best reducing powers of DPPH (90-91%) were noted for the myrtle harvested from the sites (Oued Gousine, Teraghnia, Dalas and Bissa). EO of samples harvested from Oued khdhar and Oued Gousine (Ténès) had the best iron reducing powers while those of myrtle harvested at Oued Gousine -Place el Khazna- and Tigharghar (Ténès) had superior iron chelating powers of the remaining samples. However, for the reducing power of ABTS test, EO samples harvested from Tifless, Oued khdhar, Teraghnia and Boucheral showed reducing activities above 50%.

Keywords : *Myrtus communis* L.- essential oil - chemical composition - antimicrobial activity - antioxidant capacity.

Sommaire

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale.....	1
Partie bibliographique	
Chapitre 1 : <i>Myrtus communis</i> L.....	3
1. Généralités.....	3
2. Origine.....	4
3. Caractéristiques botaniques et physiologiques.....	5
4. Utilisations traditionnelles du myrte.....	7
Chapitre 2 : Vertus thérapeutiques du myrte.....	8
Introduction.....	8
1. Composition chimique de l'huile essentielle du myrte.....	8
2. Activités biologiques du myrte.....	20
2.1. Activité antimicrobienne.....	20
2.2. Activité antioxydante.....	38
2.3. Activités pharmacologiques.....	42
2.3.1. Activité antidiabétique.....	48
2.3.2. Activité anti-inflammatoire.....	50
2.3.3. Activité pro-apoptique.....	52
2.3.4. Activité cytotoxique.....	53
2.3.5. Activités antimutagène et antigénotoxique.....	55
2.3.6. Activité anti-athérogène.....	56
2.3.7. Activité contre l'ischémie hépatique.....	57
2.3.8. Activité anti-ulcère.....	57
2.3.9. Activité insecticide.....	58
2.3.10. Activités vermifuge, molluscicide et antiprotozoaire.....	61
Partie pratique	
Chapitre 3 : Matériel et méthodes.....	62
1. Objectifs de travail.....	62
2. Matériel.....	62
2.1. Matériel végétal.....	62
2.2. Microorganismes étudiés.....	63
2.2.1. Bactéries.....	63
2.2.2. Champignons et levure.....	63
3. Méthodes.....	64
3.1. Extraction des huiles essentielles.....	64
3.2. Détermination des caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques..	66
3.3. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles.....	66
3.3.1. Analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC-FID).....	67
3.3.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS).....	67
3.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	68

3.4.1. Activité antibactérienne	68
3.4.1.1. Les milieux de culture	68
3.4.1.2. Préparation des précultures	68
3.4.1.3. Identification des bactéries pathogènes isolées.....	69
3.4.1.4. L'antibiogramme.....	76
3.4.1.5. Effet antibactérien de l'huile essentielle de <i>M. communis</i> sur la croissance des bactéries pathogènes d'origine clinique.....	77
3.4.1.6. Effet antibactérien de l'huile essentielle de <i>M. communis</i> L. sur les souches bactériennes de référence.....	78
3.4.2. Effet antifongique.....	78
3.4.2.1. Le milieu de culture.....	78
3.4.2.2. Préparation des précultures.....	78
3.4.2.3. Tests, <i>in vitro</i> , de l'activité antifongique.....	79
3.5. Evaluation du potentiel antioxydant de l'huile essentielle.....	80
3.5.1. Détermination du potentiel antiradicalaire par la méthode du DPPH	80
3.5.2. Pouvoir réducteur du fer par la méthode FRAP.....	80
3.5.3. Pouvoir chélatant du fer.....	81
3.5.4. Potentiel antiradicalaire ABTS	81
4. Analyses statistiques	81
Chapitre 4 : Résultats et discussion	83
1. Détermination du taux d'humidité et du rendement.....	83
2. Détermination des caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques.....	89
3. Composition chimique des huiles essentielles extraites.....	90
3.1. Composition chimique de l'huile essentielle extraite pendant la floraison...	90
3.2. Composition chimique de l'huile essentielle extraite pendant la fructification.....	93
3.3. Etude de la cinétique d'hydrodistillation.....	104
Conclusion	106
4. Identification des bactéries pathogènes d'origine clinique.....	107
4.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	107
4.1.1. Aspect macroscopique.....	107
4.1.2. Aspect microscopique.....	107
4.1.3. Tests biochimiques.....	108
4.1.4. L'antibiogramme.....	108
4.2. <i>Escherichia coli</i>	109
4.2.1. Aspect macroscopique.....	109
4.2.2. Aspect microscopique.....	109
4.2.3. Tests biochimiques.....	110
4.2.4. L'antibiogramme	111
4.3. <i>Salmonella</i> sp.....	112
4.3.1. Aspect macroscopique.....	112
4.3.2. Aspect microscopique.....	112
4.3.3. Tests biochimiques.....	113
4.3.4. L'antibiogramme.....	113

4.4. <i>Proteus</i> sp.....	114
4.4.1. Aspect macroscopique.....	114
4.4.2. Aspect microscopique.....	115
4.4.3. Tests biochimiques.....	115
4.4.4. L'antibiogramme.....	115
4.5. <i>Klebsiella</i> sp.....	116
4.5.1. Aspect macroscopique.....	116
4.5.2. Aspect microscopique.....	117
4.5.3. Tests biochimiques.....	117
4.5.4. L'antibiogramme.....	118
5. Activité antibactérienne de l'huile essentielle des feuilles de <i>M. communis</i> L. sur les souches bactériennes pathogènes d'origine clinique.....	119
5.1. Méthode de diffusion en puits.....	119
5.2. Méthode sur milieu liquide ou par contact direct.....	122
5.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	122
5.2.2. <i>Salmonella</i> sp.....	123
5.2.3. <i>Proteus</i> sp.....	124
5.2.4. <i>Klebsiella</i> sp.....	124
6. Activité antibactérienne de l'huile essentielle des feuilles de <i>M. communis</i> L. sur les souches bactériennes pathogènes de référence.....	125
7. Effet antifongique de l'huile essentielle de <i>Myrtus communis</i> L. extraite durant la floraison.....	128
7.1. Evaluation de la croissance mycélienne.....	128
7.2. Evaluation du taux d'inhibition.....	129
Conclusion.....	133
8. Evaluation du potentiel antioxydant de l'huile essentielle	134
8.1. Pouvoir réducteur du DPPH.....	134
8.2. Pouvoir réducteur du fer par la méthode FRAP.....	135
8.3. Pouvoir chélatant du fer.....	136
8.4. Potentiel antiradicalaire ABTS.....	137
Conclusion.....	138
Conclusion générale.....	139
Références bibliographiques.....	142
Annexes.....	162

Liste des figures

Figure 1 : Position phylogénétique des <i>Myrtaceae</i> et présentation des taxons les plus connus.....	3
Figure 2 : Distribution du genre <i>Myrtus</i>	4
Figure 3 : Caractéristiques botaniques de <i>Myrtus communis</i> L. à partir de dessins [1-3] de photographies [4-9] et d'images au microscope électronique à balayage [10-11].....	6
Figure 4 : Appareil de type Clevenger.....	64
Figure 5 : Variation du taux d'humidité des feuilles et des fruits de <i>Myrtus communis</i> L de la région de Chlef (Bissa) en fonction du mois de récolte.....	83
Figure 6 : Variation du rendement (%) en huiles essentielles des feuilles et des fruits de <i>Myrtus communis</i> L. récolté dans la forêt de Bissa en fonction du mois de récolte.....	86
Figure 7 : Variation du rendement (%) en huiles essentielles des feuilles et des fruits de <i>Myrtus communis</i> L. à fruits blancs et fruits bleu-violacé récolté dans la forêt de Bissa en fonction du mois de récolte.....	86
Figure 8 : Dendrogramme obtenu par l'analyse de groupes de la composition en pourcentage des huiles essentielles isolées des feuilles de <i>Myrtus communis</i> L basée sur la corrélation et en utilisant la méthode non pondérée paire-groupe avec la moyenne arithmétique (UPGMA).....	99
Figure 9 : Dendrogramme obtenu par l'analyse de groupes de la composition en pourcentage des huiles essentielles isolées des fruits de <i>Myrtus communis</i> L basée sur la corrélation et en utilisant la méthode non pondérée paire-groupe avec la moyenne arithmétique (UPGMA).....	100
Figure 10 : Cinétique d'hydrodistillation des principaux composants de l'HE extraite de: feuilles de <i>M. communis</i> récolté à Ouled Sidi Ali -Boucheral- (Algérie).....	104
Figure 11 : Cinétique d'hydrodistillation des principaux composants de l'HE extraite de: feuilles de <i>M. communis</i> récolté à Bissa (Algérie).....	105
Figure 12 : Culture de <i>Staphylococcus aureus</i> sur milieu Chapman.....	107
Figure 13 : Vue microscopique de <i>Staphylococcus aureus</i> après la coloration de Gram (x 100).....	107
Figure 14 : L'antibiogramme de <i>S. aureus</i>	109
Figure 15 : Culture d' <i>Escherichia coli</i> sur milieu Hektoen.....	109
Figure 16 : Vue microscopique d' <i>Escherichia coli</i> après la coloration de Gram (x 100).....	110
Figure 17 : L'antibiogramme d' <i>E. coli</i>	111
Figure 18 : Culture de <i>Salmonella</i> sp. sur gélose SS.....	112
Figure 19 : Vue microscopique de <i>Salmonella</i> sp. après la coloration de Gram (x 100).....	112
Figure 20 : L'antibiogramme de <i>Salmonella</i> sp.....	114
Figure 21 : Culture de <i>Proteus</i> sp. sur milieu Hektoen.....	114
Figure 22 : Vue microscopique de <i>Proteus</i> sp. après la coloration de Gram (x 100).....	115

Figure 23 : L'antibiogramme de <i>Proteus</i> sp.....	116
Figure 24 : Culture de <i>Klebsiella</i> sp. gélose sur gélose Mac Conkey.....	116
Figure 25 : Vue microscopique de <i>Klebsiella</i> sp. après la coloration de Gram (x 100).....	117
Figure 26 : L'antibiogramme de <i>Klebsiella</i> sp.....	118
Figure 27 : Effet de l'huile essentielle des feuilles de <i>M. communis</i> extraite durant la floraison sur la croissance des souches bactériennes cliniques par la méthode de diffusion en puits.....	119
Figure 28 : Effet de l'huile essentielle des feuilles de <i>M. communis</i> extraite durant la floraison sur la croissance d' <i>E. coli</i> d'origine clinique par la méthode de diffusion en puits.....	119
Figure 29 : Aromatogrammes des différentes souches bactériennes pathogènes testées.....	121
Figure 30 : Cinétique de croissance microbienne de <i>S. aureus</i> en présence de l'huile essentielle de <i>M. communis</i> L. à différentes doses.....	122
Figure 31 : Cinétique de croissance microbienne de <i>Salmonella</i> sp. en présence d'huile essentielle de <i>Myrtus communis</i> L. à doses croissantes.....	123
Figure 32 : Cinétique de croissance microbienne de <i>Proteus</i> sp. en présence de l'huile essentielle de <i>M. communis</i> à différentes doses.....	124
Figure 33 : Cinétique de croissance microbienne de <i>Klebsiella</i> sp. en présence de l'huile essentielle de <i>Myrtus communis</i> L. à doses croissantes.....	125
Figure 34 : Effet de l'huile essentielle de <i>Myrtus communis</i> L. sur la croissance mycélienne des quatre champignons phytopathogènes testés.....	128
Figure 35 : Variation du taux d'inhibition moyen en fonction de la concentration de l'huile essentielle.....	129
Figure 36 : Inhibition de la croissance mycélienne des quatre champignons phytopathogènes testés par les différentes doses d'huile essentielle.....	130
Figure 37 : Pouvoirs réducteurs du DPPH des différents huiles essentielles extraites durant la fructification.....	135
Figure 38 : Essai de linéarité du pouvoir réducteur des différentes huiles essentielles en fonction de la concentration d'HE testée.....	136
Figure 39 : Pouvoirs chélatants du fer des différents huiles essentielles extraites durant la fructification.....	137
Figure 40 : Potentiels antiradicalaires ABTS des différents huiles essentielles extraites durant la fructification.....	137

Liste des tableaux

Tableau I : Etudes antérieures sur les composants volatiles du myrte de différentes origines.....	9
Tableau II : Activité antimicrobienne de <i>Myrtus comunis</i> L.....	20
Tableau III : Propriétés pharmacologiques de <i>Myrtus communis</i> L.....	43
Tableau IV: Sites de collecte et identification des échantillons de feuilles et de fruits séchés de <i>Myrtus communis</i> L. recueilli au nord-ouest d'Algérie.....	63
Tableau V : Souches microbiennes testées.....	65
Tableau VI : Antibiotiques utilisés.....	77
Tableau VII : Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle avec la méthode de l'aromatogramme.....	77
Tableau VIII : Concentrations testées de l'huile essentielle.....	79
Tableau IX : Rendement en huiles essentielles du myrte algérien extraites par hydrodistillation.....	85
Tableau X : Variation du rendement en huiles essentielles en fonction de l'origine du myrte et de la période de récolte.....	88
Tableau XI : Composition des huiles essentielles des feuilles de <i>M. communis</i> L. de la forêt de Bissa (Chlef) récolté durant la floraison (juin).....	91
Tableau XII : Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles des feuilles et des fruits de <i>M. communis</i> L. d'Algérie.....	92
Tableau XIII : Teneurs en composants majoritaires des huiles essentielles des feuilles de <i>M. communis</i> L. de différents origines durant la période de floraison (juin-juillet).....	94
Tableau XIV: Composition en pourcentage des huiles essentielles isolées par hydrodistillation des feuilles et des fruits séchés de <i>Myrtus communis</i> L. recueilli au nord-ouest d'Algérie. Les échantillons sont ordonnés, de gauche à droite, selon le degré de corrélation obtenu après analyse de groupes sur la base de la composition chimique des huiles essentielles.....	96
Tableau XV : Teneurs en composants majoritaires des huiles essentielles des feuilles et des fruits de <i>M. communis</i> L. de différents origines durant la période de fructification.....	102
Tableau XVI : Résultats des tests biochimiques de <i>S. aureus</i>	108
Tableau XVII : L'antibiogramme de <i>S. aureus</i>	108
Tableau XVIII : Résultats des tests biochimiques d' <i>E. coli</i>	110
Tableau XIX : L'antibiogramme d' <i>E. coli</i>	111
Tableau XX : Résultats des tests biochimiques de <i>Salmonella</i> sp.....	113
Tableau XXI : L'antibiogramme de <i>Salmonella</i> sp.....	114

Tableau XXII : Résultats des tests biochimiques de <i>Proteus</i> sp.....	115
Tableau XXIII : L'antibiogramme de <i>Proteus</i> sp.....	116
Tableau XXIV : Résultats des tests biochimiques de <i>Klebsiella</i> sp.....	117
Tableau XXV : L'antibiogramme de <i>Klebsiella</i> sp.....	118

Introduction générale

Face au problème soulevé depuis plusieurs années de l'accroissement de l'apparition de souches bactériennes pathogènes multirésistantes en milieu hospitalier forçant les industries pharmaceutiques à concevoir de nouveaux médicaments efficaces (Carle, 2009), de nombreux chercheurs se sont intéressés à l'emploi de molécules naturelles dotées d'activités antibactériennes puissantes ne pouvant présenter un risque de développement de la résistance chez ces germes opportunistes. De plus, l'évolution des esprits et le refus du "tout chimique" qui se manifeste de plus en plus, ouvrent un peu plus la porte au "retour au naturel". La gravité des toxi-infections alimentaires collectives, couplée à la tendance des bactéries à résister aux agents antimicrobiens nous a conduit à nous intéresser à l'inépuisable source de produits naturels à vertu antimicrobienne : les plantes médicinales.

Selon le rapport de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), plus de 80% de la population mondiale utilise la médecine traditionnelle comme outil de traitement (Issazadeh *et al* cités par Sadeghi Nejad *et al.*, 2014). Actuellement, la population algérienne utilise un bon nombre de plantes aromatiques et médicinales endémiques entre autres *Myrtus communis*.

Myrtus communis L., communément appelé Myrte, est un arbuste aromatique de la famille des *Myrtacées*, répandu tout autour du bassin méditerranéen. En Algérie, il pousse de façon spontanée à travers l'Atlas tellien, les régions côtières d'Alger et de Constantine, où il est connu sous les noms de «Rihan» ou «mersin» (Quézel et Santa, 1962). En médecine traditionnelle, le myrte est souvent consommé en infusion et décoction (LeFloc'h, 1983). Une infusion des feuilles et jeunes branches est stimulante, antiseptique, astringente et hypoglycémiant et a été considérée comme un remède de santé pour l'eczéma, le psoriasis, l'asthme, les troubles gastro-intestinaux, les infections urinaires et la diarrhée (Ziyyat *et al.*, 1997).

Des études antérieures faites sur les parties aériennes de *Myrtus communis* ont révélé la présence de plusieurs composés chimiques susceptibles d'exercer ses effets biologiques très intéressants. Les feuilles et les fleurs contiennent des huiles essentielles, des tanins, des acides phénoliques et flavonoïdes (Messaoud *et al.*, 2005 ; Aidi *et al.*, 2010). Les fruits sont principalement composés de matières volatiles, de tanins, de sucres, d'anthocyanes, d'acides gras et d'acides organiques tels que l'acide citrique et l'acide malique (Martin *et al.*, 1990 ; Messaoud et Boussaid, 2011).

Les huiles essentielles (HE) offrent dans ce contexte une solution alternative de part les activités biologiques intéressantes diverses rapportées par plusieurs chercheurs. En effet, la complexité du mélange pose obstacle au développement de la résistance bactérienne (Enrico *et al.*, 2004). Comme l'oxydation est un processus lié à l'apparition de certaines maladies humaines et états pathologiques (maladies cardio-vasculaires et inflammatoires), ainsi que responsables de la détérioration de plusieurs denrées alimentaires, il serait intéressant d'explorer leurs potentiels antioxydants. Le pouvoir antifongique mis en évidence des HE offre de son côté une possibilité de substitution des fongicides de synthèse posant le problème de toxicité comme celui de pollution par ce mélange de molécules naturelles.

Afin de contribuer à une éventuelle application de ces HE en Algérie, nous nous sommes intéressés, dans cette étude, à la valorisation du myrte, plante aromatique et médicinale endémique. Pour une exploration large des activités biologiques de ses HE, les démarches expérimentales suivantes ont été fixées :

- Extraction et caractérisation des HE des feuilles et des fruits de *M. communis* L., récolté de différents sites de la région nord-ouest de l'Algérie, durant deux stades physiologiques de la plante (floraison et fructification);

- Exploration de l'activité antimicrobienne de ces HE à savoir antibactérienne sur une gamme de bactéries pathogènes d'origine clinique et de référence par l'application de techniques microbiologiques standardisées servant à déterminer la sensibilité des germes aux antibiotiques ou drogues susceptibles d'exercer une activité antimicrobienne ainsi qu'antifongique par des méthodes référenciées justifiant leur emploi comme agent antimicrobien;

- Evaluation de la capacité antioxydante des HE extraites par différents tests usuellement pratiqués tels la capacité de piégeage des radicaux libres DPPH et ABTS, le pouvoir réducteur ainsi que chélatant du fer.

Bibliographie

Chapitre 1 : *Myrtus communis* L.

1. Généralités

Le genre *Myrtus* est à la fois le type botanique d'une grande famille végétale, La famille des Myrtaceae Jussieu, la huitième plus grande famille de plantes à fleurs, en comptant plus de 140 genres et environ 5 600 espèces (Kew Gardens check-list). La classification APGIII (2009) et les travaux récents de Soltis *et al.* (2011) classent la famille des *Myrtaceae* au sein des clades suivants: les Angiospermes, les Eudicotyledoneae, les Rosidae, les Malvidae et enfin l'ordre des Myrtales (Figure 1). Au sein des Myrtaceae, on trouve des arbres et des arbustes très fréquemment producteurs d'huiles aromatiques (*Eucalyptus*, *Melaleuca*, *Myrtus*...) à usage thérapeutique ou pour la parfumerie, avec également production de fruits (*Eugenia* ou *Psidium* dont fait partie le goyavier) ou d'épices (*Syzygium* dont le giroflier) (Migliore, 2011).

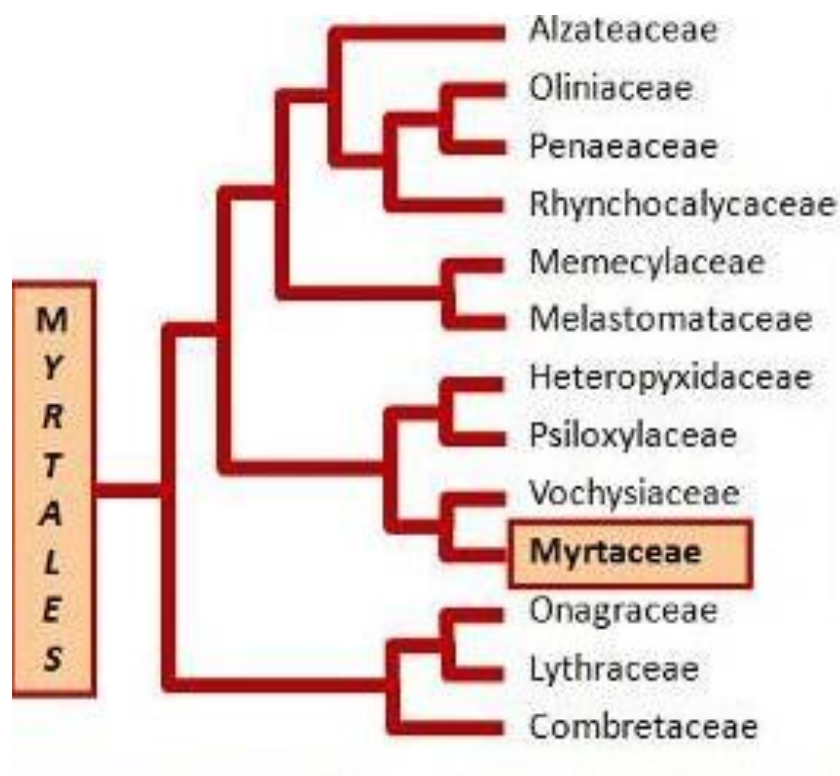


Figure 1 : Position phylogénétique des *Myrtaceae* et présentation des taxons les plus connus (Sytsma et Hapeman, 1996 *in* Migliore 2011).

2. Origine

Le genre *Myrtus* est le seul genre qui soit indigène en Méditerranée et au Sahara (Figure 2). Au sein de cette famille d'affinité tropicale, *Myrtus communis* L. a une distribution circum-méditerranéenne, puisqu'il s'étend en Macaronésie (Açores et Madère), mais aussi en zone irano-touranienne (montagnes de l'Alborz, du Zagros et région de Kerman en Iran), et même, peut-être, en Asie (en Afghanistan voire au Pakistan) (Migliore 2011 ; Figure 2). En Algérie, il pousse spontanément sur l'Atlas tellien et les régions côtières d'Alger et de Constantine, où il est connu sous le nom de «rihan» ou «mersin» (Quézel et Santa, 1962). D'innombrables variétés de myrtes ont été décrites par de nombreux botanistes. Cependant, cela reflète plus le polymorphisme foliaire du myrte commun, que sa phylogénie. Ainsi, il n'existe officiellement qu'un seul autre taxon au sein du genre *Myrtus* : il s'agit du myrte de Nivelles ou *Myrtus nivellei* (Migliore 2011).

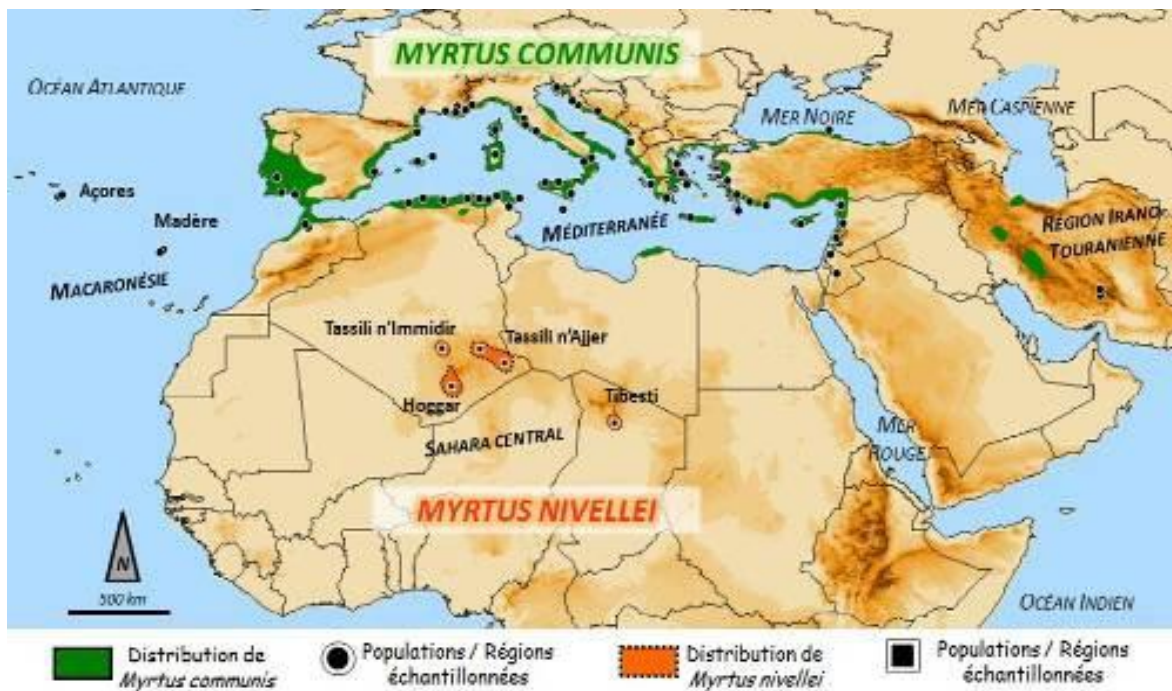


Figure 2 : Distribution du genre *Myrtus* (Migliore, 2011)

3. Caractéristiques botaniques et physiologiques

Le myrte commun est une phanérophYTE sempervirente, en général de 1 à 3 m de hauteur, mais qui peut former un véritable arbre dans des conditions favorables de sol profond à humidité quasi-permanente. Les rameaux sont quadrangulaires et à légère pubescence les deux premières années, ils présentent une écorce de couleur cannelle, lisse, se détachant en lambeaux (Figure 3[4]). Le myrte se caractérise par des feuilles opposées, munies d'un pétiole très court. Mesurant 20-24 × 4-11 mm (forte variation en fonction de l'exposition), les feuilles sont entières, ovales, un peu convexes et à extrémités aiguës-pointues. Elles ont une consistance ferme, en étant lisses, coriaces et d'un vert foncé brillant (quelques petits poils transparents les parsèment). Élément important dans la valorisation du myrte, les feuilles renferment de nombreuses petites glandes translucides à huiles essentielles qui les rendent très aromatiques au froissement (Figure 3 [10-11]). La floraison peut débuter à partir de mai - juin et s'étale jusqu'en août sous la forme de fleurs odorantes, aux pétales d'un blanc éclatant ou taché de rose (Figure 3 [2-3-6]). Les fleurs sont solitaires, jusqu'à 3 cm de diamètre, isolées à l'aisselle des feuilles et portées par de longs pédoncules. Elles sont régulières de type 5 et abritent un bouquet d'étamines proéminentes. Le pistil est constitué de deux ou trois carpelles soudés et l'ovaire est surmonté d'un très long style, qui traverse un disque nectarifère blanc et pentagonal. La pollinisation est effectuée par les insectes (abeilles, par exemple). Le fruit est une baie ovale (7-10 × 6-8 mm), au sommet d'un pédoncule ténu, couronnée par le calice et de couleur noir-bleuâtre, quelquefois blanche (Figure 3 [7-8]). Sous la peau bleu foncé, la chair blanche est plus ou moins épaisse, parfois presque entièrement résorbée, de saveur âpre, résineuse et astringente. Devenus bleus, eux aussi, les lobes libres des sépales se sont rabattus vers l'intérieur. Les graines sont nombreuses avec des irrégularités de formes et de tailles. Elles sont généralement réniformes, luisantes, couleur ivoire et de saveur résineuse (Figure 3 [9]) (Migliore, 2011).



Figure 3 : Caractéristiques botaniques de *Myrtus communis* L. à partir de dessins [1-3], de photographies [4-9] et d'images au microscope électronique à balayage [10-11] (Migliore, 2011).

4. Utilisations traditionnelles du myrte

Myrtus communis L. a été utilisé depuis l'antiquité aussi bien comme une épice dans les préparations alimentaires que pour des fins médicinales. Le myrte, malgré son odeur agréable, ne trouve pas d'application à grande échelle comme épice. Le goût est très intense, très désagréable et fortement amer et son application culinaire est limitée à la région d'origine comme l'Italie (Gortzi *et al.*, 2008). En Italie, notamment en Sardaigne, les baies et les feuilles sont utilisées pour produire des liqueurs bien connues (Messaoud *et al.*, 2012). Toutefois, certaines parties de la plante sont utilisées dans l'industrie alimentaire pour améliorer le goût de la viande et des sauces (Chalchat *et al.*, 1998).

Il est traditionnellement utilisé comme antiseptique, désinfectant et agent hypoglycémique (Elfellah *et al.*, 1984). En Turquie, aussi bien les feuilles que les fruits du myrte ont été utilisés comme un médicament antiseptique (Baytop, 1999). De même, dans la médecine populaire italienne, le fruit de cette plante est utilisé dans le traitement de nombreux types de maladies infectieuses, y compris la diarrhée et la dysenterie; les feuilles sont utilisées comme agent antiseptique et anti-inflammatoire, aussi comme un rinçage de bouche et pour le traitement de la candidose (Gortzi *et al.*, 2008). L'huile essentielle obtenue à partir de feuilles de myrte a été utilisée dans le traitement de troubles pulmonaires (Clark, 1996). En médecine traditionnelle, le myrte est souvent consommé en infusion et décoction (Le Floch, 1983). Généralement, dans la médecine populaire, une décoction de feuilles et de fruits est utilisée par voie orale pour le traitement de maux d'estomac, l'hyperglycémie, la toux, la constipation, la perte d'appétit aussi bien qu'en usage externe pour la cicatrisation (Serce *et al.*, 2010). Différentes parties de la plante ont traditionnellement des applications spécifiques. Les infusions préparées à partir des feuilles et des jeunes branches sont connues pour être stimulantes, antiseptiques, astringentes et hypoglycémiques et elles sont considérées comme étant un remède de santé pour l'asthme, l'eczéma, le psoriasis, la diarrhée, les troubles gastro-intestinaux et les infections urinaires (Ziyyat *et al.*, 1997). La décoction de feuilles est utilisée pour le lavage vaginal, les lavements et contre les maladies respiratoires (Marchini et Maccioni, 1998), tandis que la décoction à partir des fruits est utilisée comme antidiarrhéique, antihémorroïdale et dans le traitement des maladies de la bouche et des yeux (Ziyyat *et al.*, 1997). Les fleurs, par contre, sont traditionnellement utilisées contre les varices et pour la préparation de lotions capillaires (Le Floch, 1983).

Chapitre 2 : Vertus thérapeutiques du myrte

Introduction

Myrtus communis a été largement utilisé en médecine traditionnelle, pour la préservation des aliments, comme épice, en parfumerie, en cosmétiques et en industries pharmaceutiques. En Algérie, les feuilles de *M. communis* sont traditionnellement utilisées dans le traitement des troubles respiratoires, la bronchite, la sinusite, l'otite, la diarrhée et les hémorroïdes (Beloued, 1998). Ses baies sont consommées comme fruit par la population locale pour le traitement d'ulcère gastrique alors que l'infusion des feuilles est utilisée comme boisson remède pour traiter les troubles digestifs notamment ceux du colon aussi pour le problème d'otite. Durant les dernières années, plusieurs chercheurs se sont intéressés au myrte comme plante aromatique et médicinale et ont mené des travaux d'identification de ses composants ainsi que de prospections de leurs éventuelles activités biologiques. Globalement, ces travaux tournent autour de deux axes de recherches à savoir la détermination de la composition chimique des extraits obtenus et la mise en évidence de l'activité biologique. Le premier volet de notre approche de synthèse est la composition chimique de l'huile essentielle du myrte.

1. Composition chimique de l'huile essentielle du myrte

Plusieurs travaux réalisés sur *Myrtus communis* L. montrent que la composition chimique des huiles essentielles extraites du myrte ainsi que le rendement varient selon l'origine de la plante, son mode d'existence (cultivé ou spontané), l'organe concerné et son stade végétatif (Tableau I).

Savikin-Fodulovic *et al.* (2000) rapportent une différence significative du rendement en HE extraite des feuilles du myrte de Belgrade pendant l'été pour les plantes cultivées *in vitro* (0.37%) et les plantes poussant à l'état naturel (0.76%) ; Ce rendement en HE du myrte cultivé est comparable à celui signalé par Boelens et Jimenez (1991) pour les feuilles et les pousses du myrte cultivé d'Espagne (0.4%) qui reste inférieur à celui du myrte sauvage (0.5%). Le site de récolte ou localité ainsi que les conditions pédo-climatiques qui s'y reportent semblent influencer le rendement en HE des feuilles de *M. communis* d'Iran récolté pendant le mois de juillet (période de floraison), Weyerstahl et Marschall (1994) notent un rendement de 2.5% pour le myrte récolté du nord-ouest d'Iran, Pezhmanmehr *et al.* (2010) rapportent une valeur de 1.8-2.61 % pour les deux provinces Booshehr et Lorestan en Iran et Ghasemi *et al.* (2011) notent un rendement de 0.47% pour la région de

Manjil (Iran). Pour le mois de mai (période de préfloraison), le rendement en HE des feuilles est de 0.69 % pour le myrte commun récolté en province de Fars, au sud d'Iran (Zomorodian *et al.*, 2013).

Par contre, Tuberoso *et al.* (2006) ne rapportent pas de variation de ce rendement en HE des feuilles de *M. communis* ($0.52 \pm 0.03\%$) collecté de 11 localités en Sardaigne (Italie) entre les mois de novembre et décembre (stade de maturation industrielle). De même, Asllani (2000) observe des différences de rendement en fonction du lieu de récolte quel que soit l'organe collecté du myrte poussant en Albanie : feuilles 0.48-0.8% (juin-septembre), fleurs 0.14-0.25%, feuilles et fleurs 0.2- 0.35% (juin) et fruits mûrs 0.1-0.15% (octobre). Bouzabata *et al.* (2013a, 2013b et 2015) dans leurs travaux sur les populations du myrte endémique algérien (*M. communis* et *M. nivellei*) appuient aussi cette variation du rendement en fonction du site de récolte (0.5 - 2.0% pour *M. nivellei*, 0.4 - 1% pour *M. communis*).

Mais, il apparaît que le rendement est aussi influencé par le stade physiologique de la plante, Pezhmanmehr *et al.* (2010) signalent pour la région de Lorestan en Iran un rendement en HE des feuilles de 2.61% pendant la période de floraison contre 1.3% pendant le stade de maturation des fruits. Les rendements signalés par Chalchat *et al.* (2010) et Özek *et al.* (2000) pour le myrte collecté de sites différents en Turquie confirment aussi cette variabilité (0.62 % et 1.10%) pour les mois d'août et mai, respectivement. Le fruit de *M. communis* renferme beaucoup moins d'HE que les autres parties de la plante (feuilles, fleurs et tiges); la feuille étant l'organe le plus riche (Aboutabl *et al.*, 2011; Tuberoso *et al.*, 2006; Barboni *et al.*, 2010 et Aidi Wannes *et al.*, 2007). De même pour le myrte algérien de la région de Miliana récolté pendant le mois de novembre (période de fructification complète), les rendements sont de l'ordre de 0.3% et 0.1% pour les feuilles et les fruits, respectivement (Brada *et al.*, 2012). Cette variabilité entre organes est d'autant plus affirmée durant tout le cycle végétatif de la plante dans les travaux de Jerkovic *et al.* (2002) (feuilles 0.19-0.37%, fleurs 0.21- 0.26% et fruits 0.03-0.13%) montrant que le rendement des feuilles reste supérieur et atteint son maximum pendant la période de floraison. Plusieurs auteurs relèvent l'influence du stade physiologique (Bradesi *et al.*, 1997 ; Chryssavgi *et al.*, 2008 ; Pereira *et al.*, 2009 ; Aidi Wannes *et al.*, 2010 et 2011 et Aidi Wannes et Marzouk, 2012). Toutefois, Viuda-Martos *et al.* (2011) n'observent pas de différence significative entre les feuilles (2.0%) et les fruits (1.8%) pour le myrte du Maroc durant la période végétative.

Cette différence entre organe reste constante en présence de variétés différentes du myrte commun avec des rendements en HE des feuilles de 0.5% pour var. *italica* et 0.3% pour var. *baetica* et ceux des HE des fruits de 0.1% pour var. *italica* et 0.07% pour var. *baetica* (Aidi Wannas *et al.*, 2007). Alors que, le changement de la couleur du fruit (blanc et bleu-violacé) ne paraît nullement influencer le rendement des feuilles (0.44 - 0.52%) au sein des populations de *Myrtus communis* L. var. *italica* selon l'étude faite par Messaoud *et al.* (2011). Cependant, Bradesi *et al.* (1997) ainsi que Mulas et Melis (2011) remarquent des variations individuelles dans le rendement des feuilles que ce soit pour le myrte commun poussant à l'état naturel ou celui des cultivars. Il varie de 0.13 à 0.46% pour le myrte sauvage de Corse et de 0.16 - 1.07 % pour le myrte cultivé d'Italie. Ce type de variation ne pouvant être expliqué que par l'existence de caractéristiques génétiques individuelles. Ghasemi *et al.* (2011), Koukos *et al.* (2001), Jerkovic *et al.* (2002), Tuberoso *et al.* (2006), Özek *et al.* (2000), Farah *et al.* (2006), Pereira *et al.* (2009), Messaoud *et al.* (2011), Berka-Zougali *et al.* (2010), Aboutabl *et al.* (2011) ainsi que Khan *et al.* (2014) montrent, par ailleurs, que *M. communis* provenant de différentes origines ou pays (Iran, Grèce, Croatie, Italie, Turquie, Maroc, Portugal, Tunisie, Algérie, Egypte et Arabie Saoudite) fournit des quantités différentes en HE extraites à partir des feuilles (0.47%, 0.22%, 0.19-0.37%, 0.52%, 1.10%, 0.3 -0.4%, 0.33% - 0.74%, 0.44 - 0.52%, 0.51%, 3.5% et 0.68%, respectivement) tous mois de récolte confondus. Alors que, Senatore *et al.* (2006) dans leur étude comparative des HE obtenues à partir des feuilles et fleurs du myrte d'Italie et celui de la Turquie récoltés en juin, ne soulèvent pas de différence significative en notant des rendements respectifs de 0.33% et 0.38%.

Vu la diversité pédoclimatique et génétique entre pays, il est par conséquent évident d'apercevoir une telle variabilité qui d'ailleurs est fortement présente dans l'analyse de la composition chimiques des HE extraites. Dans des études antérieures, les huiles de myrte ont été séparées en deux groupes: le premier est caractérisé par une teneur élevée en myrtényl acétate et une faible teneur en α -pinène; le deuxième groupe est caractérisé par l'absence de myrtényl acétate et des teneurs élevées en α -pinène et 1,8-cinéole comme principaux constituants (Bradesi *et al.*, 1997). Le myrtényl acétate est l'un des principaux composants qui distingue les myrtes de différentes origines. Sa présence a été signalée dans les huiles essentielles de myrte de certains pays tels que le Portugal (Pereira *et al.*, 2009), la Tunisie (Messaoud *et al.*, 2011), le Maroc (Viuda-Martos *et al.*, 2011), l'Espagne (Boelens et Jimenez, 1991), la Croatie (Jerkovic *et al.*, 2002), l'Albanie (Asllani, 2000), la

Bulgarie (Savikin-Fodulovic *et al.*, 2000), ex-Yougoslavie (Chalchat *et al.*, 1998) et la Turquie (Özek *et al.*, 2000). L'absence de ce dernier a été rapporté dans les pays comme l'Iran (Weyerstahl et Marschall, 1994), la Corse (Bradesi *et al.*, 1997), la Grèce (Koukos *et al.* (2001), l'Italie (Flamini *et al.* 2004 ; Tuberoso *et al.*, 2006), la Turquie (Senatore *et al.*, 2006), la France (Barboni *et al.* (2010), l'Égypte (Aboutabl *et al.*, 2011), l'Arabie Saoudite (Khan *et al.*, 2014) et l'Algérie (Brada *et al.*, 2012 ; Bouzabata *et al.* 2013a, 2013b et 2015). En revanche, il convient de mentionner l'apparition dans les HE dépourvues de myrtényle acétate d'une di-ène 3,3,5,5,8,8 hexaméthyl-7-oxabicyclo[4.3.0]non-1(6)-ène-2,4-dione, découverte pour la première fois dans le myrte iranien (Weyerstahl et Marschall, 1994).

Dans les huiles essentielles des feuilles de myrte algérien, quelle que soit la méthode d'extraction utilisée, l' α -pinène et le 1,8-cinéole sont les principaux composants (Berka-Zougali *et al.*, 2010 et 2012 ; Brada *et al.*, 2012 ; Bouzabata *et al.* 2013a, 2013b et 2014), semblable au myrte tunisien (Messaoud *et al.*, 2011; Aidi Wannes *et al.*, 2009) ainsi qu'au myrte français (Chalchat *et al.*, 1998). Pour le myrte d'Espagne (Boelens et Jimenez, 1991) et celui de la Grèce (Chryssavgi *et al.*, 2008), les principaux composants sont le myrtényle acétate et le 1,8-cinéole. Cependant, les composants majoritaires des HE des feuilles de myrte frais en provenance du Maroc, de l'ex-Yougoslavie et du Liban sont l' α -pinène, le 1,8-cinéole et le limonène (Chalchat *et al.*, 1998). Il a également été rapporté (Owlia *et al.*, 2009; Ashnagar *et al.*, 2009 et Moradi *et al.*, 2012) que les quatre principaux composants qui caractérisent les HE du myrte iranien sont l' α -pinène, le limonène, le 1,8-cinéole et le linalool. Ces résultats corroborent avec ceux obtenus par Yadegarinia *et al.* (2006).

Ghasemi *et al.* (2011) ont mené une autre étude comparative réalisée sur le myrte iranien en utilisant l'hydrodistillation (HD) et l'extraction au CO₂ supercritique ou au fluide supercritique (SFE). Sept composants majoritaires ont été identifiés dans HE-HD : α -pinène, 1,8-cinéole, limonène, linalool, α -terpinolène, linalyle acétate et α -terpényle acétate. Les principaux composés de l'HE extraite des feuilles de myrte albanais (Asllani, 2000) ont été : 1,8-cinéole, α -pinène, limonène, myrtényle acétate et linalool. Dans le cas du myrte turque (Özek *et al.*, 2000), trois principaux composés ont été trouvés: 1,8-cinéole, linalool et myrtényle acétate. Quant au myrte portugais, Pereira *et al.* (2009) a cité quatre principaux composés dont la domination est étroitement liée au cycle végétatif. Il s'agit du myrtényle acétate, α -pinène, limonène et 1,8-cinéole. Récemment, dans le cas du myrte égyptien, Aboutabl *et al.* (2011) ont rapporté que les principaux composés de l'HE étaient le 1,8-

cinéole (27,19%) et l' α -pinène (25,53%). La composition de l'HE est enrichie par la présence de β -linalool (11,75%), p-menth-1-énol (6,95%), myrtényl acétate (4,2%), linalyl acétate (3,39%), néryl acétate (2,94%), limonène (1,6%) et α -terpényl acétate (1,4%).

La variation quantitative et qualitative sur le plan chimique est aussi présente entre organes (Brada *et al.*, 2012), les feuilles sont riches en monoterpènes (51,30%) tandis que les fruits sont riches en monoterpènes oxygénés (71,2%). Par contre, le contenu en sesquiterpènes est très faible (1%) pour les feuilles et assez grande (16%) pour les baies. Les résultats montrent également que l'HE des feuilles est riche en α -pinène et 1,8-cinéole alors que l'HE du fruit se caractérise par une grande quantité de linalool, estragole, 1,8 cinéole et une quantité appréciable de bergamotène et E-caryophyllène. L'HE des fruits de myrte algérien est différente de celles rapportées par la littérature et se caractérise par une composition typique: linalol/estragole/1,8 cinéole.

Aidi Wannas *et al.* (2010) rapportent aussi de fortes fluctuations dans la composition chimique des HE obtenues des différentes parties de *Myrtus communis* var. *italica* durant tout le cycle végétatif. Pour les feuilles, les composants majoritaires sont α -pinène (28,3–58,0%), 1,8-cinéole (12,7–30,7%), linalool (2,4–21,5%) et limonène (0,1–13,3%). Pour les fruits, les principaux constituants sont 1,8-cinéole (7,3–44,9%), géranyl acétate (1,8–20,5%), linalool (0,7–18,9%) et α -pinène (1,2–12,6%) et pour les tiges, les composés majeurs sont 1,8-cinéole (21,0–52,4%), linalool (3,1–18,4%) et α -pinène (1,5–16,1%). Des variations saisonnières similaires sont rapportées par Jerkovic *et al.* (2002), Chryssavgi *et al.* (2008), Pereira *et al.* (2009), Aidi Wannas *et al.* (2011) et Aidi Wannas et Marzouk (2012). Aussi, Aidi Wannas *et al.* (2009) signalent dans leurs travaux une variation de la composition chimique des HE extraites à partir de feuilles de deux variétés de *Myrtus communis* (*baetica* et *italica*), poussant à l'état sauvage dans le nord de Tunisie, au cours du cycle végétatif et notent l' α -pinène comme principal composant des deux variétés mais il atteint un maximum au stade de fructification pour *baetica* (49,14%) et au stade de floraison pour *italica* (58,05%).

De même, le lieu de récolte ou la localité semble influencer les proportions des composants majoritaires des HE obtenues des feuilles de myrte italien récolté de deux localités différentes (Flamini *et al.*, 2004). Les auteurs ont rapporté que le type de sol joue un rôle important dans la variabilité de la composition de l'HE car l' α -pinène et le limonène ont été identifiés en plus grandes quantités dans les plantes qui poussent sur des sols

calcaires alors que le linalool, le linalyl acétate et le trans-myrtanol acétate ont été détectés à des pourcentages plus élevés sur les sols siliceux. Le trans-myrtanol acétate étant identifié pour la première fois comme un constituant naturel de l'HE de *M. communis*.

Même si la composition de l'HE de myrte est déterminée essentiellement par des facteurs génétiques, elle varie aussi avec les saisons. Bradesi *et al.* (1997), Jerkovic *et al.* (2002), Chryssavgi *et al.* (2008), Pereira *et al.* (2009) et Aidi Wannes *et al.* (2009, 2010 et 2011) signalent des variations saisonnières significatives dans les proportions des principaux constituants des HE de myrte qui pourrait être dû à la dynamique génétique (Bouzabata *et al.*, 2013b) et des facteurs environnementaux tels que la géographie, la température, les précipitations, la durée du jour, nutriments, etc. Ces facteurs influencent probablement les voies de biosynthèse de la plante et par conséquent la proportion relative des principaux composés.

Différentes parties de *M. communis* L. telles que ses feuilles et ses fruits ont largement été utilisés en médecine populaire depuis plusieurs siècles. Cette plante est utilisée traditionnellement pour le traitement de troubles tels que la diarrhée, l'ulcère gastro-duodéal, les hémorroïdes, l'inflammation, les maladies pulmonaires et les maladies de la peau bien que les études cliniques et expérimentales suggèrent qu'elle possède un spectre plus large d'effets pharmacologiques et thérapeutiques comme antioxydante, anticancéreuse, anti-diabétique, antivirale, antibactérienne, antifongique, hépatoprotective et activité neuroprotectrice (Alipour *et al.*, 2014). Un aperçu de ces activités est donné dans la partie qui suit.

2. Activités biologiques du myrte

Les nombreuses études phytochimiques, pharmacologiques, toxicologiques et cliniques d'HE, de divers extraits et d'ingrédients actifs de *M. communis* sont listées aux Tableaux II et III.

2.1. Activité antimicrobienne

Un grand nombre d'études a été fait sur l'activité antimicrobienne du myrte (Tableau II). La plupart portaient sur l'exploration du potentiel antibactérien et celui antifongique de l'huile essentielle extraite des parties aériennes de la plante principalement les feuilles et peu de travaux étaient réalisés sur les différents extraits.

Akin *et al.* (2010) et Rosato *et al.* (2007) ont montré dans leurs travaux l'activité inhibitrice de l'HE de *M. communis* contre huit bactéries pathogènes Gram positives et Gram négatives (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus durans*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*). L'efficacité de *M. communis* a été confirmée par la méthode de dilution en milieu gélosé. Owlia *et al.* (2009 ; 2010) rapportent aussi un effet inhibiteur appréciable de l'HE sur *P. aeruginosa*, bactérie pathogène réputée pour sa résistance, avec une CMI (concentration minimale inhibitrice) et une CMB (concentration minimale bactéricide) de 64 µg/mL et une réduction significative des facteurs de virulence testés (production d'alginate, formation de biofilm, mobilité et adhérence) aux 1/2 et 1/4 de cette concentration effective.

Selon Deriu *et al.* (2007), l'HE du myrte a été aussi efficace contre plusieurs souches cliniques d'*Helicobacter pylori*, agent pathogène responsable d'ulcères gastriques, avec des concentrations allant de 0.075 à 2.5% (v/v) et celle extraite lors de la floraison fut très active contre *Mycobacterium tuberculosis* et modérément active contre *Mycobacterium paratuberculosis* (agents tuberculeux multirésistants) avec des CMI respectives de 0.17 et >2% (v/v) (Zanetti *et al.*, 2010). Par contre, une CMI >1000 (µg/mL) et une dose de 10000 µg/mL d'HE des feuilles de myrte iranien est nécessaire pour assurer 39.77% d'inhibition de la croissance de *Streptococcus iniae* (Pirbalouti *et al.*, 2011).

Zomorodian *et al.* (2013) avaient testé l'HE extraite des feuilles de myrte avant la floraison sur une large gamme de bactéries pathogènes (Gram + et -), levures et champignons et montré son efficacité à inhiber 90% de la croissance de ces germes en présence des CMI₉₀ allant de 0.5 à 64 µl/mL. Les CMI signalées pour les bactéries à Gram positif étaient plus faibles que celles notées pour les bactéries à Gram négatif; ces différences pourraient être dues à la structure multicouche et la présence du lipopolysaccharide dans la membrane cellulaire de ces dernières. En outre, HE avait deux activités inhibitrice et bactéricide contre toutes les bactéries à Gram négatif examinées avec l'égalité des CMI et CMB. Toutes les espèces de *Candida* testées, incriminées dans plusieurs infections nosocomiales, étaient aussi inhibées à des concentrations de l'ordre de 0.65-2 µl/mL. Résultats concordants à ceux trouvés par Yadegarinia *et al.* (2006) qui rapportent une CMI de 2 µl/mL pour *Candida albicans*. Les CMF (concentrations minimales fongicides) étaient aussi comparatives avec 3.85 et 4 µl/mL, respectivement. Ben Hsouna *et al.* (2014) confirment ces observations avec une activité inhibitrice élevée de l'HE contre les bactéries

Gram positives par rapport aux bactéries Gram-négatives (CMI allant de 0.078 à 2.5 mg/mL) et un effet remarquable contre plusieurs souches fongiques. L'étude du mode d'action de l'HE par la détermination de la courbe de la cinétique bactérienne (the time-kill curve) de *Listeria monocytogenes* (isolat alimentaire) a montré un effet bactéricide drastique après 5 min en appliquant une concentration de 312 mg/mL. Ces résultats sont la preuve que *M. communis* L. possède des propriétés antimicrobiennes et par conséquent est une source potentielle pour des ingrédients actifs pour les industries alimentaires et pharmaceutiques.

Par ailleurs, Aboutabl *et al.* (2011) trouvent une meilleure efficacité de l'HE des fruits du myrte comparativement à celle des feuilles sur des bactéries Gram +, celles à Gram - et bacilles acido-résistants (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium phlei* et *Candida albicans*) et explique cette différence par le pourcentage relativement élevé en composés phénoliques (eugénol) et oxydes (cinéole) de ces huiles. Ce qui ouvre par conséquent une voie d'utilisation prometteuse en phytomédecine comme agents antibactériens et antituberculeux.

Bouzouita *et al.* (2003) signalent des concentrations effectives relativement plus élevées de l'HE des feuilles du myrte tunisien (2.5 à 3.5%, v/v) sur *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* et *Geotrichum candidum*, ces derniers ayant appliqué la méthode de culture en milieu submergé (submerged broth culture method). Cherrat *et al.* (2014) appuient aussi cette hypothèse en confirmant dans leurs résultats la sensibilité des bactéries Gram positives à l'inhibition par les HE comparativement aux bactéries Gram négatives à l'exception de *Campylobacter jejuni* (Rossi *et al.*, 2007). Une CMI₅₀ de 1 µl/mL a pu en l'occurrence inhiber de 50% la croissance de *Porphyromonas gingivalis*, bactérie à Gram négatif considérée comme l'espèce la plus parodonto-pathogène et un effet bactéricide à raison de 8µl/mL (Hedayati *et al.*, 2013). En outre, le lavage de la laitue (*Lactuca sativa*) et de la tomate (*Lycopersicon lycopersicum* L.) inoculées par une population de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (nalidixic acid resistant strain) avec 1000ppm de l'HE obtenue des feuilles du myrte turque a permis de la réduire à raison de 1.66 UFC/g -1.89 UFC/tomate, respectivement et ce sans aucun traitement de rinçage à l'eau distillée stérile. Ces résultats suggèrent que l'utilisation de l'HE de myrte peut être un outil innovant et utile pour la désinfection et la conservation des fruits et légumes à la place du chlore ou d'autres désinfectants synthétiques ou autres produits biologiques (Gündüz *et*

al., 2009). Cependant, l'HE extraite des feuilles de myrte égyptien pendant la période de floraison affichait une faible activité inhibitrice contre deux bactéries phytopathogènes: *Agrobacterium tumefaciens* responsable du crown gall ou galle du collet et *Erwinia carotovora* var. *carotovora* incriminée dans la moisissure molle ou soft mold disease avec une CMI >1000 mg/L aussi bien pour un champignon phytopathogène *Fusarium solani* avec une EC₅₀ (concentration effective réduisant de 50% la croissance mycélienne) >1000mg/L contrairement à *Alternaria alternata* (EC₅₀ = 328); *Botrytis cinerea* (EC₅₀ = 458) et *Fusarium oxysporum* (EC₅₀ = 724). La germination des spores de tous ces champignons telluriques phytopathogènes était significativement affectée par la présence de l'HE du myrte avec des EC₅₀ de l'ordre de (216, 357, 169 et 351 mg/L) pour *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* et *Fusarium solani*, respectivement (Badawy et Abdelgaleil, 2014).

Ces résultats sont comparables à ceux de Curini *et al.* (2003) qui observent 60% d'inhibition de la croissance de *Rhizoctonia solani* à une dose de 1600 ppm avec altération morphologique des hyphes des trois champignons phytopathogènes étudiés (dommages structurels des hyphes de *Rhizoctonia solani*, bien que le diamètre des hyphes traités n'a pas changé par rapport à ceux du témoin 7,16 mm et 7,15 mm, respectivement). Les hyphes de *Fusarium solani* semblaient plus épais et ondulés que ceux non traités, qui semblaient croître linéairement et parus plus ramifiés et de forme irrégulière comme ceux de *Colletotrichum lindemuthianum*. Selon ces auteurs, ce phénomène est probablement dû à la déshydratation induite par les composants de l'HE du myrte.

Dans l'étude récente de Bouzabata *et al.* (2015), les HE extraites des parties feuilles et fleurs du myrte algérien récolté durant la période de floraison ont montré divers degrés d'inhibition contre tous les champignons testés (levures: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida guilliermondii* et *Candida krusei*; champignons: *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus flavus* et dermatophytes: *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* et *Trichophyton verrucosum*). Pour la plupart des dermatophytes testés, y compris *M. canis*, *T. rubrum* et *E. floccosum*, la CMI était équivalente à la CML ou concentration minimale létale (0,64 mg/mL), ce qui indique un effet fongicide pour l'HE de myrte. Cette dernière était moins efficace contre les souches de *Candida* sp. et *Aspergillus* sp. avec des valeurs de CMI de 1,25 mg/mL et 5mg/mL,

respectivement. Cette activité antifongique était semblable pour les deux échantillons d'HE étudiés en dépit de leurs compositions chimiques différentes. Ces résultats justifient l'utilisation traditionnelle de l'HE de myrte comme désinfectant et antiseptique (Sumbul *et al.*, 2011).

Des résultats inverses ont été rapportés par Omidbaigi *et al.* (2007) qui notent une très faible activité inhibitrice de l'HE du myrte iranien sur la croissance d'*Aspergillus flavus*, important agent pathogène de plantes, d'animaux et de l'être humain produisant des toxines dangereuses: les aflatoxines. Les pourcentages d'inhibitions étaient de 3.7 - 9.7% aux doses de 600 et 900 µl/L, respectivement par la méthode de contact direct en milieu gélosé et 3.4% à une dose de 24µL d'HE brute par la méthode de micro-atmosphère. Selon ces chercheurs, la faible activité de l'HE de myrte pourrait être attribuée à des composants non phénoliques ayant une activité fongitoxique connue tels que le limonène.

Une étude comparative des HE extraites des feuilles de *M. communis* L. d'Algérie par deux méthodes d'extraction différentes : micro-ondes ou solvant-free-microwave-extraction (SFME) et hydrodistillation (HD) a montré une meilleure activité antimicrobienne de l'HE extraite par SFME que celle par HD vis-à-vis de tous les micro-organismes testés, à l'exception de *Candida albicans*, qui a affiché une résistance similaire. Des bactéries hautement résistantes telles que *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* et *Enterobacter cloaca* ont été très sensibles à la présence des deux huiles essentielles; Toutefois, elle a été plus prononcée avec HE-SFME probablement en raison de la teneur plus élevée des composés oxygénés et phénoliques (57,12% vs 40,33% pour les composés oxygénés et 39,34% vs 56,10% pour les composés hydrocarbonés) (Bekhechi *et al.*, 2008). L'efficacité des deux huiles essentielles est similaire pour la levure *Candida albicans*. Malgré une certaine résistance par rapport à d'autres souches, la CMI est encore très importante car elle ne dépasse pas 50 µl/mL. Les champignons *Aspergillus ochraceus* et *Fusarium culmorum* ont montré une plus grande sensibilité pour l'HE-SFME.

L'emploi de l'extrait brut de *M. communis* contre des agents pathogènes humains communs par Alem *et al.* (2008) a permis de déterminer des CMI et CMB similaires de l'ordre de 0,5mg/mL pour *Saphylococcus aureus*, 2,5 mg/mL pour *Proteus mirabilis* et *Proteus vulgaris*, 15 mg/mL pour *Salmonella typhi* et *Klebsiella aerogenes* et 20 mg/mL pour *Pseudomonas aeruginosa*. Les CMB de l'extrait brut pour les deux espèces relativement moins sensibles, *Shigiella shigie* et *Escherichia coli* ont été de 40 mg/mL et 45 mg/mL,

respectivement. L'activité antibactérienne a été nettement augmentée par 18 fois après autoclavage à 121°C pendant 15 minutes. L'extrait aqueux des feuilles de myrte iraquien a aussi donné un excellent effet inhibiteur de la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* isolé de plusieurs cas de brûlés et Al-Saimary *et al.* (2002) rapportent des CMI de 140-150 µg/mL pour les brûlés non traités avec la tétracycline et 300-320 µg/mL pour les cas traités alors que des concentrations semblables d'autres extraits n'ont pas été efficaces. Ce qui donne une nouvelle approche pour le traitement des cas de brûlures.

En médecine traditionnelle, *Myrtus communis* L. est souvent consommé en infusions et décoctions. Dans l'étude réalisée par Messaoud *et al.* (2012), les infusions des feuilles de myrte tunisien présentaient une activité antibactérienne appréciable contre toutes les bactéries testées (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* et *Shigella flexneri*). Les valeurs de CMI et CMB contre les différents isolats pathogènes étaient de l'ordre de 12,5 à 25mg MS/mL et 12,5 à 50 mg de MS/mL (poids des feuilles séchées/mL d'infusion), respectivement. Les inhibitions les plus fortes ont été obtenues contre *P. mirabilis* et *S. flexneri*. Pour les deux souches, les valeurs de CMI étaient de 12,5mg de MS/mL et les valeurs de CMB variaient de 12,5 à 25 mg de MS/mL. Ces résultats concordent avec des études antérieures (Yadegarinia *et al.*, 2006 ; Gündüz *et al.*, 2009), où des extraits de myrte ont démontré une activité inhibitrice contre différentes espèces bactériennes, y compris *E. coli*, *S. typhimurium*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* et *C. albicans*. L'effet antimicrobien de l'extrait de la plante peut être attribué éventuellement à leurs huiles essentielles et composés phénoliques qui sont connus pour endommager les membranes cellulaires, ce qui provoque des fuites de matériaux cellulaires et finalement la mort des micro-organismes (Cox *et al.*, 2001). Les propriétés antimicrobiennes des infusions de myrte sont soupçonnées d'être associées à leurs teneurs élevées en polyphénols et monoterpènes oxygénés. Il est généralement admis que les composés phénoliques présents dans les extraits végétaux jouent un rôle majeur dans l'expression de leurs effets antimicrobiens et plusieurs études prétendent que des terpènes oxygénés tels que le 1,8-cinéole, le linalool, et l' α -terpinéol présentent une activité antibactérienne puissante (Randrianarivelo *et al.*, 2009). Ces résultats sont intéressants puisque certaines de ces bactéries sont couramment impliquées dans les diarrhées aiguës et peut expliquer l'utilisation du myrte en médecine traditionnelle pour le traitement ou la prévention de diverses maladies dont les symptômes pourrait impliquer des infections bactériennes.

Mansouri *et al.* (2001) avaient évalué l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique brut des feuilles de myrte iranien avec ses différentes fractions ainsi que les HE contre 10 bactéries pathogènes incluant 6 bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* et *Listeria monocytogenes*) et 4 bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Campylobacter jejuni*). L'extrait brut a inhibé la croissance de toutes les bactéries testées à l'exception de *C. jejuni*. Le diamètre de la zone d'inhibition de 0,5 mg/mL de l'extrait brut (fraction M) variait de 18mm pour *S. aureus* à 8mm pour *S. agalactiae* et les CMI variaient de 0,1 pour *S. aureus* et *M. luteus* à plus de 2 mg/mL pour *E. coli*. En outre l'extraction de la fraction M avec de l'éther diéthylique, l'acétate d'éthyle et l'éthanol a donné 6 fractions différentes (M1-M6). Ces fractions ont été criblées pour une activité antibactérienne contre les bactéries pathogènes testées (*S. aureus*, *M. luteus*, *E. coli*, *P. vulgaris* et *P. aeruginosa*). La fraction extraite par l'éther diéthylique (fraction M1) a montré le plus haut niveau d'activité par rapport à la fraction M et les autres fractions. Les CMI pour *S. aureus* et *M. luteus* ont été réduites de 0,1 dans la fraction M à 0,025 mg/mL dans la fraction M1 et pour *E. coli* et *P. aeruginosa* a été réduite de plus de 1 mg/mL dans la fraction M à 0,1 mg/mL dans la fraction M1. L'HE a été également active contre les bactéries testées et *M. luteus* a montré le plus haut niveau de sensibilité (MIC = 1:1600). Selon ces auteurs, la présence de l'activité antibactérienne dans les différentes fractions et l'huile essentielle indique que l'extrait possède différents composés qui ont différentes activités.

L'extrait méthanolique des feuilles de *M. communis* de la Grèce a également été étudié pour son activité antimicrobienne, avant et après encapsulation dans des liposomes contre quatre bactéries pathogènes à Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus mutans* et *Staphylococcus viridans*, quatre à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* et *Klebsiella pneumoniae*), trois levures pathogènes (*Candida albicans*, *Candida tropicalis* et *Candida glabrata*) et une bactérie pathogène alimentaire (*Listeria monocytogenes*). A la dose de 1mg/mL, l'extrait parut actif contre la plupart des micro-organismes étudiés (10-14 mm de zone d'inhibition). Après son encapsulation, l'activité antimicrobienne est apparue forte (12-18 mm zone d'inhibition). En général, les bactéries Gram positives se montraient moins résistantes que *L. monocytogenes* et *C. albicans*. Après encapsulation, l'activité antimicrobienne est devenue significativement plus forte, la plupart du temps contre les

bactéries à Gram positif (Gortzi *et al.*, 2008). Lors de l'utilisation des liposomes comme vecteurs ou transporteurs pour le ciblage ou l'orientation de composés bioactifs (Fang *et al.*, 2005), les propriétés physico-chimiques des formulations liposomales sont sans aucun doute les principaux déterminants de leur efficacité finale en ciblage. Il est bien connu et documenté que la taille des liposomes, leurs propriétés de surface et leur stabilité ont un profond effet sur leur biodistribution et ainsi vont fortement influencer la possibilité d'orienter ou de vectoriser tout composé bioactif encapsulé à des tissus spécifiques (Schiffelers *et al.*, 1999). L'encapsulation dans des liposomes a permis par conséquent d'améliorer l'activité antimicrobienne de l'extrait et son application commerciale dans la conservation des aliments pourrait être considérée. Cependant, une enquête plus approfondie doit être effectuée sur la modification de la solubilité de l'extrait, ainsi que le taux de libération de ses composants antioxydants et antimicrobiens des liposomes (Gortzi *et al.*, 2008).

L'extrait hydroalcoolique des feuilles de myrte iranien a aussi été évalué à 4 concentrations allant de 10 à 80 mg/mL sur quatre souches de bactéries pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* serovar Ogawa et *E. coli*) en utilisant la technique de diffusion et les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides ont été déterminées en utilisant la méthode des macro-dilutions (Taheri *et al.*, 2013). Le traitement par la concentration de 80 mg/mL d'extrait de cette plante a montré le plus grand effet sur la bactérie *Staphylococcus aureus* et *Vibrio cholerae* serovar Ogawa comparativement aux autres traitements et antibiotiques standards. L'extrait n'a montré aucun effet sur la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* et juste la concentration de 80 mg/mL a montré un peu d'effet sur *E. coli* et les autres antibiotiques n'ont eu aucun effet significatif sauf la tétracycline qui a eu peu d'effet sur cette souche. La CMI a été de 0,2mg/mL pour la bactérie *Staphylococcus aureus* et un maximum pour *E. coli* (8 mg/mL). L'effet positif de l'extrait sur *S. aureus* a aussi été reporté par Salvagnini *et al.* (2008) avec 12mm de diamètre de zone d'inhibition mais l'HE était plus active (15mm) par contre *E. coli* s'est montrée très résistante.

Une activité antibactérienne remarquable avec des zones d'inhibition supérieures à 15mm et des valeurs de CMI entre 62,5 et 250 µg/mL a été remarquée pour les extraits méthanoliques des feuilles et fruits de *M. communis* du Yemen sur les bactéries pathogènes Gram négatives notamment celles multi-résistantes (*Staphylococcus epidermidis*,

Staphylococcus haemolyticus et *Staphylococcus aureus*) avec des zones d'inhibitions de 24, 22 et 26mm de diamètre, respectivement (Mothana *et al.*, 2011).

Cet effet antibactérien des extraits de *M. communis* a aussi été révélé par les travaux de Amensour *et al.* (2010) sur une large gamme d'agents pathogènes d'origine alimentaire (*Escherchia coli*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* et *Proteus vulgaris*) et de bactéries de contamination alimentaire (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescense* et *Bacillus subtilis*). Les extraits méthanolique et éthanolique des feuilles et des fruits ont présenté un effet antibactérien potentiel contre toutes les bactéries testées à l'exception d'*E. coli*. Aucun effet antibactérien des extraits d'éthyle acétate (feuilles ou fruits) n'a été observé contre l'une des souches de *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* IH, *P. aeruginosa* CECT 118, *P. aeruginosa* CECT 110T, *P. aeruginosa* CECT 378), *Proteus vulgaris* CECT 484 et *S. aureus* MBLA. Par contre, tous les extraits de *M. communis* présentaient significativement une activité antibactérienne plus élevée ($P < 0,05$) contre les bactéries Gram positives (*Bacillus subtilis*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecium* et *Staphylococcus aureus*) que les bactéries Gram négatives (*P. aeruginosa*, *E. coli* et *Proteus vulgaris*). Il est souvent indiqué que les bactéries Gram négatives sont plus résistantes aux extraits à base de plantes et aux HE car la structure hydrophile de la paroi cellulaire de ces dernières est constitué essentiellement d'un lipopolysaccharide (LPS) qui bloque la pénétration de l'huile hydrophobe et permet d'éviter l'accumulation des HE dans la membrane de la cellule cible. Ceci est la raison pour laquelle les bactéries à Gram positif se révèlent être plus sensibles aux extraits de *M. communis* que les bactéries à Gram négatif (Bezić *et al.*, 2003). Dans l'ensemble, l'extrait méthanolique des feuilles de *M. communis* a montré l'activité antibactérienne la plus élevée par rapport aux autres extraits. En outre, cet extrait a exposé son effet antibactérien le plus élevé contre une bactérie Gram positive d'origine alimentaire (*L. monocytogenes* CECT 4032) et une bactérie Gram négative de contamination alimentaire (*P. aeruginosa* IH). De même, Farnaz *et al.* (2010) ont signalé une activité antibactérienne appréciable des extraits aqueux et éthanolique des fruits de myrte du Pakistan sur cinq bactéries pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae* et *Escherichia coli*) avec une zone maximale d'inhibition de 16 mm pour *Shigella dysenteriae*.

2.2. Activité antioxydante

Les plantes aromatiques et médicinales sont une source d'antioxydants naturels grâce à leurs métabolites secondaires comme les polyphénols et les huiles essentielles. Émanant de ce constat, *Myrtus communis* L. a fait l'objet de plusieurs études portant sur l'exploration de son potentiel antioxydant. Une faible activité antioxydante de l'HE du myrte d'Iran a été observée par Yadegarinia *et al.* (2006) en terme de pouvoir de piégeage du radical libre - DPPH- (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) à raison de 3.53% seulement. Par contre, cette activité a été estimée de 42.98% par le test d'inhibition de la peroxydation lipidique ou le test du β -carotène-acide linoléique. Selon ces chercheurs, cette différence dans les résultats est probablement due à la grande spécificité du second test aux composés lipophiles. L' α -pinène (29.1%), le limonène (21.5%), le 1,8-cinéole (17.9%) et le linalool (10.4%) étaient les majeurs composants de l'HE. Pour l'HE extraite des feuilles du myrte marocain, l'activité antioxydante a été aussi faible même pour le test du β -carotène-acide linoléique (8% à la dose maximale de 10 μ l/mL). A cette même dose, la méthode du DPPH a donné une activité inférieure à 20% et celle du pouvoir réducteur une DO₇₀₀ inférieure à 0.5 alors que celle du BHT (antioxydant de référence) était égale à 5. L'HE contenait une forte proportion de composés monoterpéniques avec myrtényl acétate (49.27%), 1,8-cinéole (26.93%) et α -pinène (16.52%) comme composants majoritaires. Les HE des feuilles de myrte de Monténégro (les Balkans) ont été évaluées par Mimica-Dukić *et al.* (2010) et leur pouvoir de réduire 50% le radical DPPH stable à la couleur jaune à des IC₅₀ de 5,99 mg/mL et de 6,24 mg/mL, pour les deux sites de récolte respectifs. Ces valeurs sont nettement supérieures à celles notées pour les antioxydants standards (BHT et BHA) qui étaient de 8.62 et 3.09 μ g/mL, respectivement. Les composants majoritaires de ces HE étaient l' α -pinène (14.7%–35.9%), le linalool (10.1%-10.9%), le 1,8-cinéole (23.9-25.7) et le myrtényl acétate (5,4%-21,6%) or le test dot-blot a permis de mettre en évidence le pouvoir considérable du 1,8-cinéole et du méthyl eugénol pour le piégeage du radical DPPH. Ce dernier était présent à raison de 0.8% à 1.0% justifiant leur activité antioxydante comparable. Les deux composés ont déjà été signalés comme puissants piègeurs de radicaux libres, en particulier le méthyl eugénol, très probablement en raison de sa fraction phénylpropanoïde (Božin *et al.*, 2006).

L'évaluation de l'activité antioxydante des infusions des feuilles de myrte tunisien pendant 15mn a révélé, par ailleurs, un potentiel considérable par les test de DPPH, de la réduction du β -carotène, du pouvoir chélatant et celui du pouvoir réducteur du fer avec des IC₅₀ de

282.53 µg MS/mL, 84.88 µg MS/mL, 206.44 µg MS/mL et 38.93 mmol Fe²⁺/mL alors que les valeurs des IC₅₀ des standards étaient comme suit : Trolox 75.36 µg/mL (activité de piégeage du DPPH), BHT 29.42 µg/mL (réduction du β-carotène) et EDTA 18.91 µg/mL (pouvoir chélatant). Les teneurs en phénols totaux et flavonoïdes de ces infusions étaient de 179.55mg (équivalents acide gallique ou EAG)/g MS et 7.16mg (équivalents rutine) ER/g MS, respectivement et l'analyse par HPLC (chromatographie en phase liquide à haute pression) à permis d'identifier 11 composants phénoliques avec les acides phénoliques (7.64 à 14.28 µmol/g MS) et les glycosides flavonoliques (7.05 à 12.11 µmol/g MS) comme majeures fractions phénoliques de ces infusions. En outre, l'analyse de la composition chimique de la fraction volatile des infusions des feuilles récupérées par extraction liquide-liquide avec de l'hexane a révélé des niveaux élevés de monoterpènes oxygénés et la présence majoritaire du 1,8-cinéole (42.58%), α-terpinéol (9.45%), méthyle eugénol (6.69%) et linalool (5.91%). Selon Messaoud *et al.*, (2012), cette activité antioxydante intéressante est en corrélation avec la forte teneur en phénols totaux et la présence des composés actifs de la fraction volatile.

Les effets antioxydants de l'HE extraite des feuilles du myrte de la Turquie sur les huiles comestibles du noyau de grenade, du pavot, du raisin et celle du lin ont été déterminés par Inan *et al.* (2012). L'addition d'une dose de 0.05% a permis de prévenir l'augmentation des valeurs de la viscosité, du peroxyde et de l'acidité libre de toutes les huiles testées et conservées en contact d'oxygène à 60°C. Ces résultats ont appuyé l'utilisation de l'HE comme conservateur alimentaire notamment des huiles comestibles afin de stabiliser l'oxydation de ces dernières durant la conservation. De même, l'HE extraite des boutons floraux du myrte tunisien a montré une forte activité antioxydante. Le test de réduction du β-carotène à permis de déterminer le coefficient d'activité antioxydante (CAA) à 200 ppm, qui était de 670,49 et 581,97 pour l'HE et le BHT, respectivement. Contrairement à la méthode du DPPH, l'IC₅₀ notée pour l'HE était de 240 µg/mL et 20µg/mL pour le BHT révélant la faible activité antioxydante de l'HE par rapport à ce dernier. D'après ces auteurs, cette forte activité peut être attribuée à la présence d'une quantité élevée du 1,8-cinéole (15.3%) dans l'HE.

Les activités antioxydantes de l'HE et de l'extrait méthanolique des parties aériennes du myrte tunisien (*M. communis* var. *italica* L.) collectées pendant la période de floraison ont été évaluées par Aidi wannes *et al.* (2010) à l'aide des tests de piégeage des radicaux libres du DPPH, du blanchissement du β-carotène et pouvoirs chélatant et réducteur du fer. Dans

tous les tests, les extraits méthanoliques des différentes parties de myrte ont montré une meilleure activité antioxydante que les HE. Les HE des feuilles et de la tige n'ont montré aucun effet chélatant alors que l'IC₅₀ enregistrée pour l'HE extraite des fleurs était de 5 mg/mL. Les extraits méthanoliques, par contre, ont montré la meilleure activité antioxydante avec des IC₅₀ de 8µg/mL, 70µg/mL, 10µg/mL et 5mg/mL pour les tests de DPPH, du blanchissement du β-carotène, du pouvoir réducteur et du pouvoir chélatant du fer, respectivement. L'IC₅₀ enregistrée pour le test DPPH était inférieure à celle du BHT (25µg/mL) et celle du β-carotène comparable (70µg/mL), l'effet chélatant était appréciable mais l'IC₅₀ de l'EDTA restait meilleure (0.03mg/mL) alors que le pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique des feuilles était nettement supérieur à celui de l'acide ascorbique dont l'IC₅₀ était de 40µg/mL. L'extrait méthanolique des fleurs affichait aussi une activité antioxydante intéressante comparativement à celui des tiges avec des IC₅₀ de 3µg/mL, 78µg/mL, 50µg/mL et 46mg/mL pour les tests de DPPH, du blanchissement du carotène, du pouvoir réducteur et du pouvoir chélatant du fer, respectivement. Cette activité distincte des extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs revient probablement au contenu riche des feuilles (79.39%, 8.90 mg/g) et des fleurs (60.00%, 3.50 mg/g) en tanins hydrolysables (gallotanins) alors que les tiges étaient riches en flavonoïdes (61.38%, 1.86 mg/g) à forte teneur en catéchine (36.91%, 1.12 mg/g). Plusieurs chercheurs ont conféré des activités biologiques intéressantes aux tanins comme l'activité antioxydante, le pouvoir anti-génotoxique (Hayder *et al.*, 2004), l'activité antivirale (Pousset *et al.*, 1993) et l'effet antihypertenseur (Yokozawa *et al.*, 1994).

D'autre part, l'étude saisonnière de la composition chimique de l'HE et de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques des feuilles du myrte de Zakynthos (île grecque) avant et pendant la floraison ainsi qu'en fructification menée par Chryssavgi *et al.* (2008) a mis en évidence une meilleure activité antioxydante de l'extrait méthanolique des feuilles en pleine floraison correspondante à un contenu maximal en phénols totaux de 373mg (EAG)/g de plante. Le pouvoir réducteur du fer a été estimé à 70.2 mmol Fe⁺²/L d'extrait de plante et l'IC₅₀ relevée pour le test DPPH de 9.54 mg/L pendant la floraison contre 0.51mg/L notée pour l'acide ascorbique. A l'issue de leurs résultats, ces chercheurs ont confirmé l'utilisation potentielle de *M. communis* L. en technologie alimentaire et en médecine.

Gortzi *et al.* (2008) ont déterminé l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique des feuilles du myrte de Grèce par trois méthodes différentes des précédentes : le test

Rancimat, la formation du malonalaldéhyde (MDA) et la détermination de l'action antioxydante par analyse calorimétrique différentielle (ACD). La méthode Rancimat permettant de calculer le facteur de protection (= période d'induction avec l'antioxydant / période d'induction sans l'antioxydant). Un facteur de protection supérieur à 1 indique une inhibition de l'oxydation des lipides. Plus la valeur est grande, meilleure est l'activité antioxydante. A des concentrations allant jusqu'à 160 ppm, l'extrait méthanolique pur a montré une action antioxydante supérieure à celle de l' α -tocophérol dans l'huile de tournesol (facteur de protection >1.15). A 150 ppm, la concentration en malondialdéhyde dans le tournesol est moindre avec l'extrait méthanolique pur qu'avec l' α -tocophérol ou le BHT. A la dose de 160ppm, l'encapsulation de l'extrait dans des liposomes (PC:C 10:2 mg/mL ou L- α -phosphatidylcholine de l'œuf (PC) à 10 mg/mL et cholestérol (C) à 2 mg/mL) a permis d'améliorer de 25% l'action antioxydante par rapport à l'extrait pur. L'efficacité d'un antioxydant représente la possibilité de bloquer le processus de la chaîne de formation des radicaux par interaction avec les radicaux peroxytes, qui sont responsables de la durée de la période d'incubation (29.5h pour l'extrait encapsulé contre 23.5h pour l'extrait pur). Il est bien établi que l'auto-oxydation des graisses, des acides gras et des lipides est un procédé exothermique et les méthodes de l'analyse thermique sont utiles pour l'étude de la thermo-stabilité et la thermo-oxydation (Litwinienko *et al.*, 1997 in Gortzi *et al.*, 2008). La DSC est par conséquent une bonne technique pour déterminer les paramètres cinétiques de l'oxydation des acides gras non-inhibée et celle inhibée. A la même vitesse de chauffage, la température du début de la réaction d'oxydation est nettement plus élevée pour la préparation liposomale que celle signalée pour l'extrait pur. Par conséquent, l'addition de l'extrait encapsulé dans des liposomes a eu une action antioxydante plus intense que l'extrait à l'état pur. En finalité, ces résultats ouvrent une possibilité d'application commerciale du myrte dans la conservation des aliments susceptibles à l'oxydation (Gortzi *et al.*, 2008).

Des résultats comparables ont été rapportés par Mothana *et al.* (2011) en confirmant la forte activité antioxydante de l'extrait méthanolique des feuilles et fruits de myrte du Yémen évaluée par le test du DPPH avec 94,5% d'activité contre 23,7% observé pour l'extrait aqueux chaud à la dose de 1000 μ g/mL alors que celle de l'acide ascorbique était de 96.3%. De plus, Messaoud et Boussaid (2011) ont collecté les fruits mûrs bleu-violacé et blancs de *Myrtus communis* var. *italica* de la Tunisie en pleine fructification et évalué les activités antioxydantes de leurs extraits méthanoliques par le test du DPPH et la

méthode de FRAP (pouvoir réducteur du fer). Les IC₅₀ relevées ont montré une bonne activité antioxydante et plus élevée pour les extraits méthanoliques des fruits bleu-violacé (2.1mg/mL et 2.7 mmol Fe⁺²/g vs 2.8 mg/mL et 2.1 mmol Fe⁺²/g pour les extraits méthanoliques des fruits blancs alors que l'IC₅₀ du Trolox était de 0.2 mg/mL). Cette différence dans la capacité antioxydante entre les deux formes de myrte observée dans cette étude pourrait être attribuée selon ces auteurs à leurs différents contenus phénoliques. Il existerait des variations intraspécifiques entre les deux formes de myrte étudié car le fruit blanc était riche en myrtényl acétate et acides gras insaturés alors que le fruit bleu-violacé a montré des teneurs élevées en α -pinène, linalol, α -terpinéol et polyphénols. En effet, les teneurs en phénols totaux pour les fruits bleu-violacé et les fruits blancs étaient de 63.2 et 53 mg (EAG/g MS), celles en flavonoïdes de 25.6 et 15 mg (ER/g MS) et en flavonols de 3.5 et 1.4 mg (équivalents catéchine EC/g MS). La part des anthocyanes était aussi importante dans les fruits bleu-violacé (625.8 mg en équivalents malvidine 3-O-glucoside ou M-3-GE/100 g MS) contre 5.4 mg M-3-GE/100 g MS pour les fruits blancs.

L'activité antioxydante de la myricétine-3-*o*-galactoside et la myricétine-3-*o*-rhamnoside, isolées à partir de feuilles de *M. communis*, a été déterminée par la capacité de chaque composé à inhiber l'activité de la xanthine oxydase, la peroxydation lipidique et à piéger le radical libre DPPH. Les valeurs des IC₅₀ de la peroxydation lipidique pour la myricétine-3-*o*-galactoside et la myricétine-3-*o*-rhamnoside sont respectivement de 160 μ g/mL et 220 μ g/mL. A une concentration de 100 μ g/mL, les deux composés ont montré l'effet inhibiteur le plus puissant de l'activité de la xanthine oxydase par 57% et 59%, respectivement. La myricétine-3-*o*-rhamnoside est un piègeur de radicaux très puissant avec une valeur d'IC₅₀ de 1,4 μ g/mL (Hayder *et al.*, 2008).

2.3. Activités pharmacologiques

En plus des activités mentionnées précédemment, il y a aussi d'autres nombreuses activités biologiques importantes de *M. communis* qui peuvent être sous-classifiées comme des effets biochimiques c'est-à-dire pharmacologiques, y compris les effets anti-inflammatoire, anti-diabétique, anti-mutagénique, pro-apoptotique dans les cellules cancéreuses, anti-atherogène, antiischémique hépatique, aussi bien qu'insecticide, molluscicide et antiprotozoaire. Ils sont listés dans le Tableau III avec des références indiquées confirmant l'activité spécifique de l'HE du myrte, d'extraits ou de ses composés.

Le terme "activité pharmacologique" se réfère aux interactions biochimiques d'extraits de myrte, des huiles ou ses composés dans la circulation sanguine, comme des interactions avec différentes hormones et enzymes. Les activités pharmacologiques sont d'habitude examinées *in vivo* sur des organismes modèles différents considérant la biodisponibilité des huiles essentielles. Le terme "biodisponibilité" représente une des propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques principales des médicaments et il est utilisé pour décrire la fraction d'une dose administrée d'un médicament (ou drogue) inchangée qui atteint la circulation générale et peut être utilisée pour une fonction spécifique et/ou stockée. Par définition, quand un médicament (une drogue) est administré en intraveineux, sa biodisponibilité est de 100 %. Cependant, quand un médicament est administré par d'autres voies (par exemple orale), il doit franchir les barrières de l'absorption et celles métaboliques, avant d'atteindre le système de circulation générale et sa biodisponibilité est sujette à diminuer (en raison du métabolisme gastro-intestinal, de l'absorption incomplète ou du métabolisme de premier passage). La biodisponibilité est mesurée par analyse pharmacocinétique de prélèvements de sang pris de la circulation systémique et reflète la fraction du médicament atteignant la circulation systémique. Si un composé est mal absorbé ou largement métabolisé au préalable, seule une fraction limitée de la dose administrée va atteindre la circulation systémique. Ainsi, afin de parvenir à une biodisponibilité élevée, le composé doit avoir une absorption suffisamment élevée et une faible clairance rénale (mesure de la capacité d'excrétion rénale ou d'autres organes) (Djilani et Dicko, 2012).

2.3.1. Activité antidiabétique

Le myrte est utilisé comme un agent antidiabétique dans la médecine populaire (Sepici *et al.*, 2004). Certaines expériences ont été menées pour évaluer l'effet hypoglycémiant du myrte et son mécanisme d'action chez des modèles animaux. Elfellah *et al.* (1984) ont examiné son effet hypoglycémiant chez des souris diabétiques par induction suite à l'injection intrapéritonéale de streptozotocine (150 mg/kg de poids corporel). L'administration intragastrique d'un extrait hydro-éthanolique de *M. communis* (2 g/kg) 30 min avant le traitement par la streptozotocine (150 mg/kg) a inhibé l'hyperglycémie initiale 2h après l'administration de streptozotocine sans affecter la deuxième phase (48-72 h après l'administration de streptozotocine qui a persisté tout au long d'une période d'observation de 7 jours). L'extrait de myrte donné avant la streptozotocine et répété à 24 h et 30 h, ne permettait pas l'hyperglycémie de se développer jusqu'après 48 h. Par contre, son

administration 48 h après la streptozotocine, a considérablement réduit l'hyperglycémie et cet effet a été maintenu par son administration répétée. Cet état de fait a été aussi constaté par Fahim *et al.* (2009) chez des rats Wistar diabétiques par induction avec injection d'une dose unique de streptozotocine (65 mg/kg). Les rats ayant reçu 800mg d'extrait de composés phénoliques ont montré une réponse antihyperglycémiant marquée tandis que les rats ayant reçu 400 mg de cet extrait n'ont eu qu'une réponse modérée.

Le mécanisme de l'effet antidiabétique n'est pas encore élucidé. Toutefois, selon Sepici *et al.* (2004), vu que l'HE des feuilles de myrte n'a pas affecté les concentrations sériques d'insuline dans les lapins alloxéniques et les lapins normaux, ils supposent que l'activité hypoglycémique du myrte n'est pas liée à la sécrétion d'insuline mais plutôt due à l'inhibition réversible de l' α -glucosidase présente dans la muqueuse de l'intestin grêle réduisant ainsi l'absorption intestinale du glucose, activation de la glycolyse envisageable par l'activité plus élevée de la glucokinase, comme l'un des enzymes clés de la glycolyse et activation de la glycogénèse comme en témoigne la plus grande quantité de glycogène présent dans le foie après l'administration de l'HE de myrte.

La génération des ROS (espèces réactives à l'oxygène) joue également un rôle important dans l'étiologie des complications diabétiques. La glycosilation des protéines et l'auto-oxydation du glucose peut générer des radicaux libres qui catalysent la peroxydation lipidique dans un état diabétique (Wolff et Dean, 1987). L'augmentation de radicaux libres pourrait être due à l'augmentation de la peroxydation des lipides et peut également être le résultat de dommages aux systèmes de défense antioxydants (Bugdayci *et al.*, 2006). Sepici-Dincel *et al.* (2007) se sont intéressés à cet état des faits et ont cherché à déterminer les effets de l'HE du myrte sur les principales enzymes antioxydantes dont la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT), les niveaux du malondialdéhyde (MDA) dans les tissus du foie comme indice de la peroxydation lipidique et les taux des nitrites-nitrates dans les tissus du foie des lapins normoglycémiques, alloxano-diabétiques et ceux traités par l'HE *in vivo*. La SOD, comme la plus importante enzyme antioxydante, catalyse l'élimination des radicaux libres superoxydes dans tous les organismes aérobiques et anaérobiques. La CAT, *in vivo*, joue un rôle important dans la suppression des effets néfastes causés par les ROS dans les systèmes vivants. Ces derniers n'ont pas remarqué de changement dans les activités enzymatiques de la SOD et de la CAT durant l'étude de courte durée chez les animaux diabétiques qui ont reçu l'HE de myrte à raison de 50mg/kg. Cependant, après 21 jours de traitement, il y avait une augmentation significative de

l'activité enzymatique de la SOD dans les homogénats du foie et de l'activité enzymatique de la CAT chez les animaux diabétiques traités avec l'HE comparés au groupe d'animaux non traités ($p = 0.001$). Une diminution significative des niveaux de MDA a aussi été observée après 21 jours de traitement comparativement au groupe d'animaux diabétiques ($p = 0.001$). Les taux des Nitrites-nitrates ont significativement baissé après cette période et durant l'étude de toxicité aigüe ($p = 0.004$ et 0.02 , respectivement). En plus de la réduction significative du taux de glucose chez les animaux diabétiques, l'HE a aussi induit une diminution significative du taux de triglycérides durant l'étude de courte durée (14.3%) et après 21 jours d'administration de l'HE (24.7%) ($p = 0.001$). Par conséquent, les principales déductions qui découlent de cette étude est que l'HE des feuilles de myrte, administrée par voie sublinguale à raison de 50 mg/kg, n'offre pas de protection contre le stress oxydatif mais peut conduire après 21 jours de traitement à une augmentation des niveaux d'activités enzymatique de la SOD et de la CAT mais est capable d'inhiber la peroxydation lipidique. En l'occurrence, l'HE pourrait améliorer l'hémostase altérée du glucose dans les cas de diabète via son activité antioxydante. Des études plus approfondies seraient nécessaires pour élucider tout mécanisme d'action de l'HE extraite de *M. communis* ou ses extraits pouvant contribuer au traitement des sujets diabétiques.

2.3.2. Activité anti-inflammatoire

Al-Hindawi *et al.* (1989) a mis en évidence les propriétés anti-inflammatoires de *M. communis in vivo*. Son activité anti-inflammatoire a été évaluée chez des rats intacts en mesurant la suppression d'œdème de la patte induit par la carragénine (1%) après injection par voie intrapéritonéale d'une dose volume de 10 ml/kg équivalente au 1/10 de la dose DL_{50} estimée pour les 80% d'extrait éthanolique des parties aériennes. La DL_{50} d'extrait éthanolique injectée était de 444 mg/kg de poids corporel équivalente à 44.4 mg/kg d'extrait assurant une inhibition de 34.7% de l'œdème induit.

Les effets protecteur et anti-inflammatoire de l'extrait hydroéthanolique des fruits de *M. communis* ont aussi été mis en évidence *in vitro*. Une forte activité inhibitrice de la sécrétion de l'interleukine 8 (IL-8) (<1000 pg/mL) par les cellules humaines gastriques cancéreuses AGS suite à leur infection par *Helicobacter pylori* a été exercée par 50µg/mL d'extrait de fruits et la réponse était dose-dépendante pour 100µg/mL d'extrait hydroéthanolique. Comme la sécrétion de l'IL-8 est cruciale pour l'initiation de la réponse inflammatoire générée par *Helicobacter pylori*, les résultats de cette étude peuvent donc fournir un moyen thérapeutique pouvant prévenir la pathogénèse des troubles associés à

l'infection des cellules de la muqueuse gastrique par cette bactérie fort résistante aux antibiotiques.

Comme la surproduction de médiateurs pro-inflammatoires, par exemple sous forme d'oxyde nitrique (NO), augmente et maintient l'inflammation, les composés ciblant leur production sont de bons candidats pour atténuer les maladies inflammatoires. Ainsi, l'effet des HE sur la production du médiateur pro-inflammatoire (NO) a été découvert dans l'étude de Bouzabata *et al.* (2015). Après stimulation des macrophages de souris (Raw 264.7) avec le puissant activateur de l'inflammation (lipopolysaccharide ou LPS), Les deux huiles ont été en mesure d'inhiber de manière significative la production de NO, sans affecter la viabilité des cellules, à des concentrations allant jusqu'à 0,64 mg/mL. L'échantillon d'HE caractérisé par des teneurs élevées en linalool présentait une activité anti-inflammatoire légèrement plus élevée. Ces résultats prometteurs ont révélé des concentrations bioactives de l'HE de *M. communis* avec un profil non cytotoxique suggérant une application orale et topique potentielle ou utilisation par inhalation.

Feisst *et al.* (2005) ont mené des études plus approfondies en isolant deux oligomères uniques, acylphloroglucinols non prénylés, myrtucommulone (MC) et semimyrtucommulone (S-MC) des feuilles de *M. communis* et en examinant par la suite leur potentiel anti-inflammatoire. Il s'est avéré que MC et S-MC réduisaient puissamment la biosynthèse des eicosanoïdes par l'inhibition directe, *in vitro* et *in vivo*, de la cyclooxygénase-1 et la 5-lipoxygénase à des valeurs d'IC₅₀ allant de 1.8 à 29 µM. De plus, ils prévenaient la mobilisation du Ca⁺² dans les leucocytes polymorphonucléaires médiée par les voies de signalisation à G protéine à des valeurs d'IC₅₀ de 0.55 et 4.5 µM, respectivement et inhibaient la formation des ROS et la libération d'élastase à des concentrations comparables. Le noyau isobutyrophénone du MC aussi bien du S-MC était beaucoup moins puissant voir inactif. En outre, ces deux composés ont partiellement inhibé la formation de peroxydes et ne sont pas arrivés à bloquer la mobilisation du Ca⁺² et la libération d'élastase quand les leucocytes polymorphonucléaires (PMN) étaient confrontés à l'ionomycine qui contourne la signalisation de la protéine G pour l'activation des cellules. Sommairement, ils contribuent, *in vitro*, à la suppression de diverses réponses fonctionnelles cellulaires des leucocytes, y compris la biosynthèse des prostaglandines et du leucotriène, la libération d'élastase des leucocytes et la génération des ROS. Compte tenu de la capacité du MC et à moindre degré du S-MC à supprimer les réponses cellulaires pro-inflammatoires typiques, les acylphloroglucinols uniques et contenus dans

les feuilles du myrte pourraient posséder un potentiel anti-inflammatoire, suggérant leur utilisation thérapeutique pour le traitement des maladies liées à l'inflammation et l'allergie.

Pour prospecter une éventuelle application thérapeutique chez l'homme, ces chercheurs ont évalué le potentiel antiinflammatoire de ces acylphloroglucinols non prénylés de *M. communis* dans des modèles animaux *in vivo*. Après administration par voie intrapéritonéale du myrtucommulone (MC), isolé des feuilles de myrte, à raison de 0,5, 1,5 et 4,5 mg/kg chez la souris, Rossi *et al.* (2009) ont observé une réduction du développement de l'œdème de la patte de la souris induit par la carragénine d'une manière dose-dépendante. De plus, MC (4,5 mg/kg) administré par voie intrapéritonéale 30 minutes avant et après l'injection de carragénine exerçait des effets anti-inflammatoires dans le modèle présentant une pleurésie. En particulier, 4 h après injection de carragénine dans le modèle de pleurésie, cet acylphloroglucinol réduisait le volume d'exsudat et le nombre de leucocytes, les lésions pulmonaires (analyse histologique) et l'infiltration de neutrophiles (activité de la myéloperoxydase), l'adhésion intercellulaire et pulmonaire de la molécule-1 et la localisation immunohistochimique de la P-sélectine, les niveaux de cytokine (facteur α de nécrose tumorale et l'interleukine-1 β) dans l'exsudat pleural et leur localisation immunohistochimique dans le poumon, les niveaux de leucotriène B₄, mais pas la prostaglandine E₂, dans les exsudats pleuraux et la peroxydation du poumon (substance réactive à l'acide thiobarbiturique) et immunocoloration de la nitrotyrosine et la poly (ADP-ribose). Ces données suggèrent que la répression des molécules d'adhésion et l'inhibition de la production de LTB₄ et l'infiltration des PMN font partie des mécanismes importants de protection contre les lésions pulmonaires assurée par le MC. Ces résultats confirment en outre l'utilisation future potentielle du MC en tant qu'agent thérapeutique dans le traitement d'affections associées à une inflammation aiguë.

2.3.3. Activité pro-apoptotique

Autre action pharmacologique, action pro-apoptotique, de *M. communis* fut prospectée par Tretiakova *et al.* (2008). L'étude consistait en la recherche du potentiel du MC à induire l'apoptose de cellules cancéreuses. En effet, MC a potentiellement induit la mort cellulaire de différentes lignées cellulaires cancéreuses avec les caractéristiques de l'apoptose visualisées par l'activation des caspases 3, 8 et 9, clivage de la poly ADP-ribose polymérase (PARP), libération de nucléosomes dans le cytosol et fragmentation de l'ADN. Au moins deux grandes voies de la mort apoptotique des cellules peuvent être distinguées: la voie extrinsèque qui signale par des récepteurs de la mort cellulaire et la voie

intrinsèque impliquant la mitochondrie. La première est déclenchée par les récepteurs de mort comprenant CD95 (Fas, APO-1), le récepteur-1 du facteur de nécrose tumorale (TNF), TRAIL récepteurs 1 et 2, conduisant finalement, au recrutement de la protéine adaptatrice FADD (Domaine de mort associé à Fas) et l'activation suivante de la caspase 8 qui à son tour active la caspase-3. La voie intrinsèque est caractérisée par une perte du potentiel de la membrane mitochondriale ($D\Psi_m$) et la libération de cytochrome C de la mitochondrie qui interagit avec la protéine adaptatrice Apaf-1 recrutant la caspase-9 qui active alors la caspase-3 (Green et Kroemer, 2004 *in* Tretiakova *et al.*, 2008).

L'apoptose induite par MC était médiée plus par la voie de mort cellulaire intrinsèque que celle extrinsèque. Ainsi, MC a causé la perte du potentiel de la membrane mitochondriale dans les cellules de leucémie monocyttaire aiguë (MM6) avec libération du cytochrome C de la mitochondrie. Fait intéressant, les cellules de leucémie à cellules T aiguë (Jurkat) déficientes en caspase 9 étaient plus résistantes à la mort cellulaire induite par MC et aucune transformation de PARP ou de caspase 8 n'a été mise en évidence. Dans les lignées cellulaires déficientes aussi bien en signalisation CD95 (Fas, APO-1), en FADD qu'en caspase-8, MC était encore capable d'induire potentiellement la mort cellulaire et le clivage de PARP. MC induit l'apoptose dans des lignées cellulaires de cancer avec une cytotoxicité marginale pour les cellules non transformées, via la voie du cytochrome C mitochondrial/Apaf-1/caspase-9. Le composant naturel des feuilles du myrte MC agit comme un fort inducteur de l'apoptose de manière sélective des cellules cancéreuses avec une plus faible cytotoxicité pour les cellules normales non transformées. De toute évidence, les phénomènes mitochondriaux sont des déterminants de la mort cellulaire induite par MC et la caspase 9 est un élément crucial dans la transduction du signal apoptotique, tandis que la voie extrinsèque impliquant les récepteurs de la mort cellulaire, le FADD et la caspase-8 est moins importante. Par conséquent, il sera un défi passionnant de caractériser davantage la pharmacologie du myrte et en particulier l'action pharmacologique du MC à l'égard de la mort cellulaire par apoptose.

2.3.4. Activité cytotoxique

Comme mentionné précédemment, Tretiakova *et al.* (2008) ont aussi évalué la cytotoxicité du MC vis à vis de diverses lignées cellulaires cancéreuses ainsi que des cellules normales. Ce dernier induisait fortement la mort cellulaire apoptotique de diverses lignées cellulaires cancéreuses ($EC_{50} = 3.1 - 8.9 \mu M$) avec les caractéristiques de l'apoptose décrites auparavant. MC était beaucoup moins cytotoxique pour les cellules mononucléaires non-

transformées du sang périphérique humain (PBMC) ($EC_{50} > 50\mu M$) ou les fibroblastes du prépuce humain (HFF) ($EC_{50} > 20\mu M$). Des concentrations allant jusqu'à $30\mu M$ de MC a, à peine, causé des transformations de PARP, des caspases 3, 8 et 9 dans les cellules PBMC.

Les extraits méthanoliques et aqueux chauds des feuilles et fruits de *M. communis* ont aussi été évalués pour leur cytotoxicité sur des cellules de carcinome de la vessie humaine 5637 et des cellules de cancer du sein humain MCF-7. Les extraits méthanoliques se sont montrés plus toxiques et les cellules du carcinome de la vessie humaine plus sensibles avec des IC_{50} de 135 et 258 $\mu g/mL$ pour les extraits méthanolique et aqueux chaud, respectivement contre $IC_{50} > 250$ et $333\mu g/mL$ notées pour les cellules de cancer du sein humain MCF-7. Suggérant ainsi que *M. communis* pourrait être une source prometteuse de nouveaux agents anticancéreux potentiels, toutefois, un fractionnement et un isolement bio-guidés doivent être effectués afin d'identifier les composés responsables de l'activité observée.

L'HE de *M. communis* a aussi exhibé un haut potentiel cytotoxique contre plusieurs lignées de cellules tumorales du col de l'utérus, du colon, du larynx, du foie et des seins avec des IC_{50} de 0.42, 0.43, 0.54, 0.36 et 1.30 μL , respectivement pour l'HE des feuilles et des IC_{50} de 0.87, 0.69, 0.72, 0.40 et 1.30 μL , respectivement pour l'HE des fruits (Aboutabl et al, 2011). La sûreté des doses actives de l'HE du myrte a été évaluée sur plusieurs types de cellules mammifères : macrophages, kératinocytes, hépatocytes et cellules épithéliales alvéolaires (Bouzabata et al., 2015). Le degrés de toxicité était dose-dépendant et variait avec l'échantillon de l'HE testée (MCI et MCII). Aux concentrations 2.5 et 1.25 mg/mL, MCI a diminué la réduction de MTT de 26.54% et 67.22%, respectivement, alors qu'aux concentrations de 0.64, 0.32, 0.16 et 0.08 mg/mL, l'huile ne montrait pas de cytotoxicité significative dans les macrophages, avec des valeurs de 87.40%, 91.86%, 101.0% et 103.3%, respectivement. Pour MCII, aux concentrations de 2.5 et 1.25 mg/mL, la réduction de MTT a diminué de 20.44% et 59.67%, respectivement, alors qu'aux concentrations de 0.64, 0.32, 0.16 et 0.08 mg/mL, l'huile ne montrait pas de cytotoxicité significative dans les macrophages, avec des valeurs de 81.87%, 84.63%, 98.21% et 102.5%, respectivement. Les HE testées n'ont pas affecté la viabilité des macrophages à des concentrations allant jusqu'à 0.64mg/mL. MCII était doté d'une toxicité légèrement plus élevée que MCI, qui peut être due à sa teneur élevée en linalool et linalyl acétate. En

fait, la toxicité de ces deux composants a été démontrée auparavant dans les cellules humaines de la peau (cellules endothéliales et fibroblastes) (Prashar *et al.*, 2004).

2.3.5. Activités antimutagène et antigénotoxique

L'effet antimutagène de *M. communis* a été évalué contre la mutagénèse spontanée et induite par le t-BOOH (*tert*-butyl hydroperoxide) chez le mutant d' *Escherichia coli oxyR* IC202, souche bactérienne déficiente en la suppression des espèces réactives de l'oxygène (ROS). En présence d'HE de myrte, la mutagénèse spontanée était légèrement réduite (jusqu'à 13% à la plus forte concentration testée de 0.15µL). Toutefois, quand le mutagène oxydatif fut appliqué, la présence de l'HE a exprimé une réduction plus élevée de la mutagénèse, d'une manière dose-dépendante, avec signification statistique à la plus forte dose (28%). La suppression de la mutagénèse induite par le t-BOOH est apparue clairement corrélée à l'activité de piégeage du radical libre DPPH (Mimica-Dukić *et al.*, 2010).

L'effet des extraits des feuilles de *M. communis* sur la réponse SOS induite par l'aflatoxine B1 (AFB1) et le nifuroxazide a été étudié dans un système d'essai bactérien; le SOS chromotest avec *Escherichia coli* PQ37 (Hayder *et al.*, 2004). L'extrait aqueux, la fraction d'oligomères de flavonoïdes totaux (TOF), extraits d'hexane, de chloroforme, d'éthyle acétate et méthanolique ainsi que l'HE obtenue de *M. communis* a significativement diminué la réponse SOS induite par AFB1 (10 µg/essai) et nifuroxazide (20 µg/essai). Les extraits d'éthyle acétate et méthanolique ont montré la plus forte inhibition de l'induction de la réponse SOS par l'agent génotoxique indirect AFB1. Les extraits méthanolique et aqueux ont exhibé le plus haut niveau de protection contre la réponse SOS induite par l'agent génotoxique direct nifuroxazide. En plus de l'activité anti-génotoxique, l'extrait aqueux, le TOF et les extraits d'éthyle acétate et de méthanol ont montré une activité importante de piégeage des radicaux libres du 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH).

La myricétine-3-*o*-galactoside et la myricétine-3-*o*-rhamnoside, isolée des feuilles de *M. communis*, ont aussi induit une activité inhibitrice de la mutagénicité induite par le nifuroxazide, l'aflatoxine B1 et H₂O₂. Cette activité a été déterminée en utilisant le SOS chromotest (qui est une analyse bactérienne et colorimétrique pour détecter le potentiel génotoxique des agents préjudiciables à l'ADN) et l'essai Comet (une méthode sensible pour détecter les ruptures d'ADN dans les cellules individuelles et un outil polyvalent qui est très efficace dans la bio-surveillance humaine de composés naturels) (Aruoma, 1999 *in*

Hayder *et al.*, 2008). 2, 10 et 50 µg de myricétine-3-*o*-galactoside par essai a significativement diminué le facteur d'induction (FI) de l'AFB1 de 96%, 90% et 80% et celui du nifuroxazide de 25%, 61% et 78%, respectivement. D'autre part, la myricétine-3-*o*-rhamnoside a montré une activité plus faible en diminuant le FI de l'AFB1 de 44%, 50% et 51% et celui du nifuroxazide de 22%, 21% et 27%, respectivement. Par ailleurs, la sensibilité de l'essai Comet et la capacité fournie pour mesurer les dommages de l'ADN en cellules individuelles l'ont destiné à devenir un outil pour la prédiction rapide de la génotoxicité de composés d'intérêt. La myricétine-3-*o*-galactoside et la myricétine-3-*o*-rhamnoside n'étaient pas génotoxiques. Par contre, les deux composants examinés étaient efficaces en réduisant la génotoxicité induite par 30 µM de H₂O₂. Elles ont diminué l'Extent Tail Moment (ETM) respectivement de 38% et de 47% aux concentrations respectives de 220 µg/mL et de 150 µg/mL. L'effet protecteur exhibé par ces molécules a également été déterminé par analyse de l'expression génique en tant que réponse à un stress oxydatif en utilisant cDNA micro-array ou puce à ADN. Ces deux composants ont modulés les profils d'expression de gènes cellulaires impliqués dans le stress oxydatif, respectivement (GPX1, TXN, AOE372, SEPW1, SHC1) et (TXNRD1, TXN, SOD1 AOE372, SEPW1), dans la réparation des dommages de l'ADN, respectivement (XPC, LIG4, RPA3, PCNA, DDIT3, POLD1, XRCC5, MPG) et (TDG, PCNA, LIG4, XRCC5, DDIT3, MSH2, ERCC5, RPA3, POLD1) et dans l'apoptose (PARP) (Hayder *et al.*, 2008).

2.3.6. Activité anti-athérogène

Rosa *et al.* (2008) ont reporté que les deux composés phénoliques semimyrtucommulone et myrtucommulone A extraits de *M. communis* possédaient un effet protecteur puissant dans des modèles simplifiés de la dégradation oxydative du cholestérol et LDL, deux processus qui sont bien connus pour jouer un rôle dans les maladies cardio-vasculaires. Les deux acylphloroglucinols montraient des propriétés antioxydantes puissantes protégeant le cholestérol des dommages oxydatifs. De plus, le prétraitement avec ces deux composés a significativement préservé LDL (low density lipoprotein) des dommages oxydatifs induits par les ions Cu⁺² à 2h d'oxydation et ont montré un effet protecteur remarquable sur la réduction des acides gras polyinsaturés et du cholestérol, en inhibant l'augmentation de leurs produits d'oxydation. Les deux composés ont été proposés comme antioxydants alimentaires naturels avec potentiel antiathérogène très intéressant.

2.3.7. Activité contre l'ischémie hépatique

Salouage *et al.* (2009) ont évalué l'effet du myrte sur un modèle de reperfusion de rats avec ischémie hépatique en déterminant les niveaux des transaminases (alanine aminotransférase ou ALT et aspartate aminotransférase AST) et la concentration du monoéthylglycylxéridide (MEGX), principal métabolite de la lidocaïne qui est métabolisé exclusivement dans le foie par le cytochrome P450 3A4 (Klouz *et al.*, 2007 *in* Salouage *et al.*, 2009). Le taux de protection le plus important a été obtenu avec l'extrait aqueux (macération dans de l'eau physiologique contenant 9 % de NaCl pendant 5 jours) de fruits blancs (85,3% et 92,7% de protection pour AST et ALT, respectivement avec un taux de protection obtenu pour le test de MEGX de 37%), en dépit de sa faible teneur en polyphénols (26,8%) et son faible pouvoir antioxydant (21,2%). Le taux de protection le plus faible a été observé pour l'extrait aqueux de fruits noirs (29,34% et 26,71% de protection pour ASAT et ALAT, respectivement). Par contre, les rats ont décédé quelques minutes après injection de l'extrait aqueux des feuilles du myrte à fruit blanc. Selon la littérature, le taux de protection du foie contre la reperfusion dépend de la relation avec sa capacité antioxydante protectrice (Alamans et Cossu, 2007 *in* Salouage 2009). Fait qui amène à supposer l'existence d'un autre composant pouvant être responsable de l'action anti-ischémique de l'extrait du myrte.

2.3.8. Activité anti-ulcère

L'étude a été menée afin d'évaluer l'effet protecteur des fruits séchés de *M. communis* L. dans des modèles d'ulcères gastriques induits par l'éthanol, l'indométacine et la ligature pylorique chez les rats Wistar. Deux doses d'extraits aqueux de *M. communis* (AE1 et AE2) aux doses de 105 et 175 mg/kg, respectivement et extraits méthanoliques (ME1 et ME2) aux doses de 93 et 154 mg/kg, respectivement ont été administrés par voie orale aux animaux avant l'exposition à des ulcérogènes. Les paramètres pris pour évaluer l'activité anti-ulcère étaient l'indice d'ulcère, le volume du suc gastrique, le pH gastrique, l'acidité totale, le mucus de la paroi gastrique et les études histopathologiques. L'administration orale de AE1 et AE2 a réduit de façon significative l'indice de l'ulcère dans tous les modèles d'ulcères. La faible dose d'extrait aqueux et la forte dose d'extrait méthanolique de *M. communis* ont exhibé un effet plus significatif par rapport à l'oméprazole (médicament standard) dans le modèle de l'ulcère induit par l'éthanol. Les deux doses d'extraits aqueux et méthanoliques ont également réduit le volume du suc gastrique, l'acidité totale et ont

augmenté le pH gastrique et le contenu du mucus de la paroi gastrique dans tous les modèles d'ulcères utilisés dans cette étude. Les examens histopathologiques des tissus gastriques de rats traités avec les extraits aqueux et méthanoliques dans le modèle d'ulcère induit par l'indométacine ont montré un effet protecteur significatif contre l'ulcère pour les deux doses (Sumbul *et al.*, 2010).

2.3.9. Activité insecticide

Dans l'étude conduite par Ayvaz *et al.* (2010) sur l'HE extraite des feuilles de *M. communis* de la Turquie pour la détermination de son activité insecticide contre trois insectes des produits stockés : les adultes de la pyrale méditerranéenne de la farine *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), la pyrale indienne de la farine *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae) et la bruche du haricot *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae), les concentrations létales effectives (LC₉₉ ou 100% de mortalité) étaient de 29.43, 41.74 et 76.07 µ/L air après 24h d'exposition respectivement. Après 144h, celle notée pour les adultes de *A. obtectus* a été réduite à 50.97 µ/L air. Selon ces auteurs, cet effet toxique du myrte pourrait être attribué aux constituants majeurs de l'HE tels que le linalool (31,3%), le linalyl acétate (17,8%) et le 1,8-cinéole (14,7%). Par contre, à la dose la plus élevée de 300ppm, l'HE de *M. communis* d'Italie n'a induit que 36,7% de mortalité des larves de *Aedes albopictus* (insecte de la famille Culicidae, vecteur de plusieurs maladies virales dangereuses) (Conti *et al.*, 2010). Selon Gauthier *et al.* (1989) in Aleksic et Knezevic (2014), l'activité de l'HE de *M. communis* sur *Pediculus humanis capitis* est due à la présence du linéol, l' α -pinène et le linalool.

L'HE des feuilles et des fleurs de *M. communis* du Liban s'est avérée très toxique contre les larves du quatrième stade larvaire du moustique *Culex pipiens molestus* Forskal ou moustique commun et Traboulsi *et al.* (2002) ont rapporté des CL₅₀ et CL₉₀ de 16 et 59mg/L pour l'HE, CL₅₀ de 47 - 49mg/L pour (1R)-(+)- α -pinène et (1S)-(-)- α -pinène et CL₅₀ de 191, 193 et 194mg/L pour 1,8-cinéole, linalool et terpinéol. Cette HE contenait du 1,8-cinéole (40%), α -pinène (17%), linalool (9.9%) et terpinéol (7.9%) et les chercheurs justifiaient cet effet toxique par la forte teneur en 1,8-cinéole. L'HE extraite des feuilles et tiges de *M. communis* a aussi montré une activité antipaludique contre *Plasmodium falciparum* à des IC₅₀ allant de 267 à 471 µg/mL et de 149 à 168 µg/mL après 24h et 72h de contact, respectivement. Pour expliquer cette activité, Bastide *et al.* (1997) signalaient l'existence de certains composants seulement dans les huiles les plus efficaces, tels que le

carvacrol (dans l'huile de l'*Origanum vulgare*) ou le myrtényl acétate (dans l'huile de *M. communis*) et peut également être due à un effet synergique de certains composants présents dans l'huile essentielle. Dell'Agli *et al.* (2012) ont confirmé ces résultats pour les HE du myrte de la Sardaigne (Italie) extraites des parties aériennes avant, pendant et après la floraison et ont trouvé des IC₅₀ de l'ordre de (37.3 - 28.5 µg/mL), (>50 - 36.5 µg/mL) et (21.8 - 18.3 µg/mL) pour *P. falciparum* D10 (souche sensible à la chloroquinine) et *P. falciparum* W2 (souche résistante à la chloroquinine), respectivement. Ces HE étaient riches en α-pinène (78.00, 56.6 et 54.77%) et limonène (5.54, 5.68 et 6.53%) pour les trois périodes évoquées, respectivement.

Dans l'étude réalisée par Lamiri *et al.* (2001), *M. communis* du Maroc fut classé parmi les plantes à forte activité atteignant les 100% de mortalité des adultes de *Hessian fly*, *Mayetiola destructor* (Say) (Diptera : Cecidomyiidae) après 2h d'exposition à une dose de 10µl/L d'air de l'HE par contre sa toxicité était faible pour les œufs de cet insecte ravageur de blé avec 36.67% de mortalité à la dose de 10µl/L d'air et 56.66% à la dose de 20µl/L d'air après 24h d'exposition. L'HE était riche en 1,8-cinéole (49.3%), α-pinène (20%) et myrtényl acétate (15.5%). D'après ces auteurs, l'activité insecticide d'une HE peut être attribuée soit au composant majeur de l'huile ou aux effets synergique et/ou antagoniste de tous les composants présents dans l'huile prenant en compte la variation de la composition chimique avec certains paramètres comme le lieu géographique, la saison de collecte, le procédés d'extraction, la partie utilisée (feuille, fleur, tige, fruit et racine) et la présence de chémotypes ou races chimiques pour la même espèce.

Selon Motazedian *et al.* (2012), les vapeurs de l'HE extraite des parties aériennes de *M. communis* récolté pendant la période de floraison d'Iran ont été aussi toxiques ainsi que répulsives vis à vis de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), l'un des ravageurs les plus nuisibles des fruits, légumes et plantes ornementales à travers le monde. La toxicité est atteinte à la concentration létale CL₅₀ = 53.22µl/L d'air et 90% de mortalité à CL₉₀ = 371.69µl/L d'air et le temps léthal (TL) estimé pour la dose de 69.61µl/L d'air est de 19.64 heures. L'effet répulsif était remarquable avec des DE₅₀ et DE₉₀ de 138.80-304.863µl/L d'air, respectivement et un indice de répulsion (IR) de 61% à la dose de 159.24 µl/L d'air. Il serait donc judicieux de l'utiliser comme biopesticide pour lutter contre les attaques de cet acarien. Des résultats comparables sur la toxicité volatile de l'HE extraite des feuilles du myrte iranien ont été rapportés par Khani et Basavand (2012) contre deux insectes des produits stockés (*Tribolium confusum* et *Callosobruchus maculatus*).

Après 24 heures d'exposition. *C. maculatus* a été plus sensible ($CL_{50} = 9,5 \mu\text{L}$ d'air) à l'HE de *M. communis* que *T. confusum* ($CL_{50} = 260,7 \mu\text{L}$ d'air). L'analyse de la composition chimique a révélé comme principaux composants l' α -pinène (10,4%), l' α -terpinéol (10,1%), le linalol (9,0%), le 1,8-cinéol (7,6%), le géranyl butyrate (6,3%), le géraniol (6,2%), l'oxyde de caryophyllène (5,3%) et le néryl acétate (5,0%). Après un temps similaire d'exposition, CL_{50} pour l'HE des feuilles de *M. communis* L. récolté pendant la période floraison en Syrie enregistrées pour les œufs, les larves, les nymphes et les adultes du trogoderme, *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae, insecte redoutable des grains et de produits céréaliers entreposés), étaient de 54,7, 307,4, 328,6 et 68,4 μL d'air, respectivement. Cependant, les larves étaient les plus résistantes avec 94% et 100% de mortalité obtenues pour la dose de 562,5 μL d'air après 24 et 48 heures d'exposition, respectivement. Après la période de 48h, les CL_{50} et CL_{90} étaient de 221 μL d'air et 487 μL d'air, respectivement (Tayoub *et al.*, 2012).

En général, il est rapporté par la littérature que les monoterpènes sont actifs en tant que substances volatiles toxiques, insecticides ou répulsives envers les insectes des produits entreposés (Bakkali *et al.*, 2008). La concentration de 50ppm d'une solution acétonique de l'HE de *M. communis* de Corse a induit, selon Amer et Mehlhorn (2006), 86,7, 96,7 et 100% de mortalité des larves d'*Aedes aegypti* (vecteur principal de la dengue) au troisième stade larvaire après 1, 12 et 24 h, respectivement. Les CL_{50} enregistrées après 24h d'exposition aux solutions de l'HE ont été d'environ 10, 50 et 100 ppm pour les larves au troisième stade de *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* et *Anopheles stephensi*, respectivement. *Culex quinquefasciatus* (moustique vecteur de diverses maladies dont le virus du Nil occidental, de l'encéphalite de Saint Louis, du paludisme aviaire dû à *Plasmodium relictum*) s'est montré le plus sensible à l'inverse d'*Anopheles stephensi* (vecteur principal de la Malaria) qui était plus résistant. Par contre, cet insecte s'est avéré très sensible à l'effet répulsif de l'HE extraite des feuilles du myrte d'Iran. L'effet a été remarquable même à la dose minimale de 10% dans de l'éthanol et durable même après 5h avec un nombre de piqûres < à 4 (Kayedi *et al.*, 2014).

Ces résultats concordent avec une étude similaire réalisée par Tavassoli *et al.* (2011). Bien que leurs méthodes étaient différentes, ils ont signalé que l'effet répulsif de la concentration 50% d'HE de *M. communis* (feuilles et fleurs) d'Iran dans de l'éthanol a été modéré et inférieur au DEET (N, N-diéthyl-méta-toluamide). Ces chercheurs ont conclu que l'HE de *M. communis* peut être un moyen utile et sûr pour la prévention des piqûres de moustiques

et constitue un répulsif biologique potentiel. Dans les tests de Bertoli *et al.* (2012) et après 96h de contact, l'HE du myrte italien a montré une faible activité insecticide sur les adultes de *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera Dryophthoridae, le Charonçon du maïs) avec une mortalité de 26% à la concentration de 75% dans de l'acétone. Toutefois, elle possédait un fort effet répulsif (93.7%) avec la dose de 0.1% après 24h de traitement topique. Cette huile était riche en α -pinène (51.8%), eucalyptol (24.6%) et limonène (7.6%). En plus d'être toxique contre le stade post-embryonnaire des insectes et des acariens, il a été démontré par Topuz et Erler (2007) que l'HE de *M. communis* est toxique contre les adultes et les œufs de *Tetranychus cinnabarinus* (LC_{50} = 2.80 μ l/L d'air et 8.38 μ l/L d'air, respectivement) et possède une activité déterrente de la ponte avec 73.81% de déterrence à la concentration de 0.5%.

2.3.10. Activités vermifuge, molluscicide et antiprotozoaire

Aboutabl *et al.* (2011) recommandait à l'issue de son étude d'utiliser l'HE du myrte comme agent vermifuge. Leurs résultats montraient que les HE extraites des feuilles et des fruits de *M. communis* d'Egypte possédaient une activité vermifuge intéressante contre le ver de terre (*Allolobophora caliginosa*) avec un temps écoulé avant la mort de ce dernier estimé à 8-3min pour l'HE des feuilles et 5-4min pour celle des fruits et ce pour les doses de 0.1% et 0.2% (dans 1% de tween 80), respectivement. Cette efficacité de l'HE des fruits est probablement due à sa richesse en 1,8-cinéole (29.6% vs 27.2% pour les feuilles). A la dose de 2 mg/mL de solution d'HE (préparée dans du Triton X-100 à concentration de 5g/mL) et extraite des parties aériennes du myrte du Portugal en floraison, Barbosa *et al.* (2010) ont signalé un faible taux de mortalité (10.87%) de *Bursaphelenchus xylophilus* après 24 h de contact. Par contre, l'extrait aqueux brut ainsi que la fraction flavonoïdique des feuilles du myrte de Corse (France) paraissent avoir une bonne activité molluscicide contre l'escargot aquatique *Biomphalaria glabrata* impliqué dans la transmission de la schistosomiase. Les doses effectives médianes (DE_{50s}) rapportées par Deruaz *et al.* (1993) étaient de 0.7g/L et 72ppm après 24h de contact, respectivement. 100% de mortalité était atteint avec la dose de 150ppm après 24h de contact avec la fraction flavonoïdique. En plus, Mahdi *et al.* (2006) a signalé l'activité antiprotozoaire de l'extrait aqueux des feuilles de *M. communis* sur *Trichomonas vaginalis* (un protozoaire flagellé qui infecte le tractus urogénital des hommes et des femmes). 50 et 100mg d'extrait aqueux dans 0.1mL de milieu de culture à pH 4.65 ont induit la mort de *T. vaginalis* en début de l'inoculation.

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

1. Objectifs de travail

Le présent travail contribue à la valorisation d'une plante aromatique et médicinale endémique anciennement utilisée en médecine traditionnelle "*Myrtus communis*". Afin de réaliser cette étude, les objectifs suivants ont été fixés :

- La caractérisation physicochimique de l'huile essentielle extraite de *Myrtus communis* L.,
- L'analyse par la chromatographie en phase gazeuse (GC-FID) et par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) de l'huile essentielle obtenue de *M. communis* et,
- L'évaluation des activités biologiques de l'huile essentielle de *M. communis* (activité antimicrobienne et pouvoir antioxydant).

La caractérisation physicochimique ainsi que l'étude préliminaire de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle extraite des feuilles du myrte de la forêt de Bissa à Chlef ont été effectuées aux laboratoires de Biochimie et Microbiologie de l'Université de Mascara et au laboratoire de Microbiologie à l'Université de Mostaganem. L'analyse des huiles essentielles du myrte de Bissa a été réalisée au niveau de l'Unité de Chimie Générale et Organique à Gembloux Agro-Bio Tech de l'Université de Liège (Belgique) alors que celles de Zeboudja et Ténès ont eu lieu au Centre de Biotechnologie Végétale à l'Université de Lisbonne (Portugal). La détermination des activités antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles extraites des feuilles de myrte récolté des régions de Zeboudja et Ténès a été accomplie au niveau de la Faculté des Sciences et Technologie à l'Université de l'Algarve à Faro (Portugal).

2. Matériel

2.1. Matériel végétal

La plante étudiée «*Myrtus communis* L.» a été récoltée durant les mois de juin, juillet, août, novembre et décembre de l'année 2009, janvier et juin de l'année 2010 de la forêt de Bissa à la wilaya de Chlef et 14 sites situés dans les régions de Ténès et Zeboudja durant le mois de Septembre 2012. L'extraction des huiles essentielles a été faite à partir des feuilles préalablement séchées à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant 7 jours. La situation géographique des 14 sites de récolte de *M. communis* dans les régions de Zeboudja et Ténès durant la période de fructification est donnée par le Tableau IV.

Tableau IV: Sites de collecte et identification des échantillons de feuilles et de fruits séchés de *Myrtus communis* L. recueilli au nord-ouest d'Algérie.

Site de récolte	Code de la feuille	Code du fruit	Latitude	Longitude	Altitude (m)
Oued Goussine, place el Khazna, Ténès	Mc_Fl_1	Mc_Fr_1 ^a	N 36° 29' 59.9"	E 1° 28' 42.6"	409
Tifless, Ténès	Mc_Fl_2	Mc_Fr_2 ^a	N 36° 31' 11.1"	E 1° 21' 24.1"	201
Tigharghar, Ténès	Mc_Fl_3	Mc_Fr_3 ^a	N 36° 31' 13.9"	E 1° 21' 31.9"	204
Oued khdhar, Canton rouaichia, Ténès	Mc_Fl_4	Mc_Fr_4 ^a	N 36° 30' 25.4"	E 1° 21' 49.5"	322
Oued Goussine, Ténès	Mc_Fl_5	Mc_Fr_5 ^b	N 36° 29' 58.3"	E 1° 28' 42.9"	410
Teraghnia, Ténès	Mc_Fl_6	Mc_Fr_6 ^a	N 36° 31' 18.4"	E 1° 22' 59.1"	234
Boucheral, Ténès	Mc_Fl_7	Mc_Fr_7 ^a	N 36° 30' 35.5"	E 1° 25' 59.8"	140
Boucheral, Oued Sidi Ali, Ténès	Mc_Fl_8	Mc_Fr_8 ^a	N 36° 29' 40.5"	E 1° 25' 16.6"	137
Bissa, Zeboudja	Mc_Fl_9	Mc_Fr_9 ^b	N 36° 26' 30.9"	E 1° 27' 53.6"	990
Teraghnia, Ténès	Mc_Fl_10	Mc_Fr_10 ^b	N 36° 31' 8.7"	E 1° 23' 19.9"	290
Dalas, Ténès	Mc_Fl_11	Mc_Fr_11 ^a	N 36° 29' 3.3"	E 1° 19' 19.0"	202
Bissa, Zeboudja	Mc_Fl_12	Mc_Fr_12 ^a	N 36° 26' 31.2"	E 1° 27' 53.6"	992
Tifless, Ténès	Mc_Fl_13	Mc_Fr_13 ^a	N 36° 31' 13.7"	E 1° 21' 27.9"	199
Oued khdhar, Canton Rouaichia, Ténès	Mc_Fl_14	Mc_Fr_14 ^b	N 36° 30' 26.0"	E 1° 21' 51.4"	318

a: fruits bleu-violacés; b: fruits blancs.

2.2. Microorganismes étudiés

2.2.1. Bactéries

Treize souches de bactéries pathogènes ont fait l'objet de cette étude dont six d'origine clinique : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Proteus* sp., *Klebsiella* sp., *Proteus mirabilis* et sept de référence : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Proteus mirabilis* ATCC 43862, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 35657 (*American Type Culture Collection*), *Pseudomonas aeruginosa* DSM 939, *Haemophilus influenza* DSM 9999 (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* ou *Collection allemande de microorganismes et de cultures cellulaires*) et *Streptococcus pneumoniae* TIGR 4 (*The Institute for Genomic Research*). Ces bactéries sont à l'origine de plusieurs infections urinaire, intestinale, respiratoire, etc. Elles sont revivifiées par repiquage sur gélose nutritive pendant 24 h, à l'obscurité et à 37 °C.

2.2.2. Champignons et levure

Les champignons étudiés (*Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Ascochyta rabiei* et *Aspergillus ochraceus*) sont connus pour leur capacité à contaminer les denrées

alimentaires et leur pathogénicité et la levure *Candida albicans* ATCC 90028 pour être responsable de candidose. Ces champignons sont cultivés sur le milieu nutritif PDA (*Potato Dextrose Agar*) pendant 7 jours à 25 °C et à l'obscurité. La levure sur de la gélose à l'extrait de malt et incubée à 37 °C pendant 24-48h. L'origine de ces microorganismes est mentionnée dans le Tableau V.

3. Méthodes

3.1. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation, en sauvegardant un rapport hydromodule de 1/10, dans un montage d'hydrodistillation et dans un appareil de type Clevenger (Figure 4) selon la méthode de la pharmacopée européenne (Conseil de l'Europe, 2007). Pour les feuilles du myrte récolté les mois de juin, juillet et août (2009), l'extraction a été faite par le montage d'hydrodistillation selon le protocole suivant : 200 g de feuilles séchées imprégnées d'un litre et demi d'eau distillée sont portées à ébullition pendant 6 heures. Les vapeurs chargées d'huile, en traversant un réfrigérant se condensent et coulent dans un erlenmeyer, ce mélange (eau-huile essentielle) est ensuite remis dans une ampoule à décanter : l'eau et l'huile se séparent par différence de densité. L'huile essentielle est repoussée de l'eau vers une phase organique constituée par l'éther diéthylique, suite à l'ajout de 6 % de NaCl. Le solvant est éliminé par la suite de la phase organique par évaporation dans le rotavapor. Les huiles essentielles récupérées ont été stockées à -20 °C jusqu'à analyse. Les protocoles détaillés sont donnés en annexe 2.



Figure 4 : Appareil de type Clevenger

La cinétique de l'extraction a été explorée en effectuant des prélèvements à intervalles de temps réguliers de 30mn sur les phases aqueuses et organiques durant l'hydrodistillation.

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre la masse de l'huile extraite (g) et la masse de la plante traitée (Caree, 1953). Le rendement est déterminé par rapport à la matière sèche et exprimé en pourcentage par la formule suivante :

$$R (\%) = m_B / m_A \times 100$$

Où

R : Rendement de l'huile essentielle en %

m_B : masse de l'huile essentielle en g

m_A : masse de la plante sèche en g

Le taux d'humidité a été déterminé par séchage des feuilles à l'air libre durant sept jours selon la formule avancée par Twidwell *et al.* (2002) in Mohammadi (2006) :

$$H\% = (\text{poids } \alpha - \text{poids } \beta) / \text{poids } \alpha \times 100$$

Où

α : poids de l'échantillon (plante fraîche)

β : poids de l'échantillon (plante sèche)

H% : taux d'humidité exprimé en pourcentage

3.2. Détermination des caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques

Le rendement optimal de la récolte de juin (2009) a permis d'effectuer la caractérisation physicochimique et organoleptique de l'huile essentielle extraite des feuilles de *M. communis* L. poussant dans la forêt de Bissa conformément aux méthodes de normalisation française (AFNOR 1986 et 1988). Les diverses méthodes utilisées sont décrites en annexe 2.

3.3. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles

Dans une première partie de travail, l'HE extraite des feuilles du myrte récolté de la région de Zeboudja pendant le mois de juin (2009) a été analysée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) et par la chromatographie en phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme (GC-FID).

3.3.1. Analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC-FID)

L'analyse chimique des HE obtenues le mois de juin (2009) est effectuée à Gembloux (Belgique) à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse HP GC 6890A équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. La colonne capillaire 5 % Phényl Méthyl Siloxane possède les caractéristiques suivantes (longueur : 30 m, diamètre interne : 0,25 mm ; épaisseur du film : 0,25 μ m). Les conditions opératoires sont : la température de l'injecteur splitless : 280 °C ; la température du détecteur FID 300 °C ; la programmation de température de 40 °C (1 min) à 200 °C à raison de 6 °C/min puis de 200 à 280 °C à 30 °C/min et maintien à 280 °C pendant 2 min; le gaz vecteur : He à 1 ml/min (vitesse linéaire moyenne = 33 cm/sec).

Les HE obtenues des 14 sites ont été analysées, au Portugal, en utilisant un chromatographe en phase gazeuse Perkin Elmer 8700 (Perkin Elmer, Shelton, CT, USA) équipé de deux détecteurs à ionisation de flamme (FID), un système de traitement des données et un port de l'injecteur de vaporisation dans laquelle deux colonnes de polarités différentes ont été installées: DB-1 colonne en silice fondue (polydiméthylsiloxane, 30m x 0.25mm id, épaisseur du film 0.25 μ m; J et W Scientific Inc., Rancho Cordova, CA, USA) et une colonne de silice fondue DB-17HT (30m x 0.25mm id, l'épaisseur du film 0.15 μ m; J & W Scientific Inc.). La température du four a été programmée, de 45 à 175 °C, à 3 °C/min, ensuite à 15 °C/min jusqu'à 300 °C, puis maintenu isotherme pendant 10 minutes; la température de l'injecteur et celle du détecteur, 280 °C et 300 °C, respectivement; gaz porteur, de l'hydrogène, ajustée à une vitesse linéaire de 30 cm/s. Les échantillons ont été injectés en utilisant la technique d'échantillonnage fractionné avec un rapport 1:50. Le volume d'injection était 0.1 μ L d'une solution pentane-huile essentielle (1:1). La composition en pourcentage des huiles a été calculée par la méthode de normalisation des surfaces des pics de CG, calculé en tant que valeurs moyennes de deux injections de chaque huile, sans l'aide de facteurs de correction.

3.3.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)

Pour l'HE de juin (2009), le spectromètre de masse utilisé est Agilent 5973 à quadripole est couplé à un chromatographe en phase gazeuse Agilent 6890. La colonne utilisée est identique à celle mentionnée ci-dessus. Les conditions opératoires sont: la température de l'injecteur splitless 250 °C ; la programmation de température: de 40°C à 250 °C à raison de 6 °C/ min, le gaz vecteur: He à 1 ml/min (vitesse linéaire moyenne = 36 cm/sec). Les températures de la source et du quadripole sont fixées à 230 °C et 150 °C

respectivement ; énergie d'ionisation 70 eV, gamme de masse : 35 à 400 amu. L'identification des différents constituants est réalisée à partir de leurs spectres de masse en comparaison avec ceux des composés standards de la banque de données informatisées (Wiley 275.L). Pour les hydrocarbures terpéniques diverses confirmations sont obtenues par comparaison des spectres de masse et de leurs indices de rétention selon Kovats donnés par la littérature. Pour le calcul des indices de rétention (RI), un mélange d'hydrocarbures n-alcanes (C₇-C₃₀) a été utilisé dans les mêmes conditions chromatographiques.

Pour les HE des 14 sites, l'appareil GC-MS utilisé est comprenait un chromatographe en phase gazeuse Perkin Elmer Autosystem XL, équipé d'une colonne DB-1 en silice fondue (30 m x 0,25 mm de diamètre interne, épaisseur du film 0,25 µm; J et W Scientific, Inc.) et en interface avec un spectromètre de masse Perkin-Elmer TurboMass (de la version logicielle 4.1, Perkin Elmer, Shelton, CT, USA). Injecteur et températures du four étaient comme ci-dessus; température de la ligne de transfert, 280 °C; température de la source d'ions, 220°C; gaz vecteur, l'hélium, ajusté à une vitesse linéaire de 30 cm/s; rapport de division, 01:40; énergie d'ionisation, 70 eV; plage de balayage, 40-300 u; temps de balayage, 1 seconde. L'identité des composants a été affecté par la comparaison de leurs indices de rétention par rapport à ceux du mélange des n-alcanes (C₉-C₁₆) et les spectres GC-MS de la bibliothèque du laboratoire, réalisée sur la base des analyses des huiles de référence, composants synthétisés au laboratoire et normes commerciales disponibles.

3.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne

3.4.1. Activité antibactérienne

3.4.1.1. Les milieux de culture

Tous les milieux de culture et d'identification utilisés pour l'isolement et la purification des souches bactériennes pathogènes d'origine clinique sont mentionnés dans l'annexe 1. La gélose nutritive a été utilisée pour le repiquage de l'ensemble des souches étudiées ainsi que pour la conservation à 4°C et la gélose Mueller Hinton pour la réalisation des tests d'aromatogramme et d'antibiogramme.

3.4.1.2. Préparation des précultures

Pour chaque microorganisme, 10 mL de culture fraîchement préparé et stérilisé a été inoculé avec une colonie prélevée d'une culture 24 h, incubée durant la nuit. Après 18 h à 24 h d'incubation quelques gouttes de cette culture ont été diluées dans de l'eau distillée

stérile pour avoir une densité de 0.1. On admet que cette densité mesurée à 625 nm est équivalente à 1×10^8 UFC/ml, la suspension d'inoculum a été diluée 1/10 dans de l'eau distillée stérile pour avoir une concentration finale de 1×10^7 UFC /ml.

3.4.1.3. Identification des bactéries pathogènes isolées

L'identification des souches bactériennes pathogènes isolées a été faite par des examens macroscopique, microscopique et biochimique et toutes les techniques utilisées sont mentionnées dans l'annexe 2. Cinq souches bactériennes pathogènes isolées ont fait objet d'identification dans cette étude à savoir *Staphylococcus aureus*, *Eschérichia coli*, *Salmonella* sp., *Proteus* sp. et *Klebsiella* sp..

A. Détermination des caractères macroscopiques

Les souches testées ont été isolées sur des milieux sélectifs afin de garantir leur pureté. L'examen à l'œil nu révèle la forme, l'aspect et la couleur des colonies bactériennes après 24 heures de culture et une température de 37 °C d'incubation.

B. Détermination des caractères microscopiques

La coloration de Gram permet de distinguer les bactéries Gram positif (+) des bactéries Gram négatif (-), non seulement d'après leur forme, mais aussi selon leur affinité pour les colorants, liée à la structure de leur paroi. Le principe de cette technique est la fixation des colorants basiques sur les composants cytoplasmiques. Chez les bactéries Gram+, la paroi est épaisse, de composition chimique particulière et constitue une barrière à l'alcool-acétone pour la décoloration négative. Le cytoplasme demeure coloré en violet (suite à l'ajout du violet de gentiane), ce qui n'est pas le cas des bactéries Gram- dont la paroi plus fine et plus perméable laisse passer l'alcool-acétone qui décolore le cytoplasme. Ce dernier devient rose après être passé sous un autre colorant (la fuschine) (Brelière *et al.*, 2009). Les bactéries Gram+ sont colorées en violet, tandis que les bactéries Gram- sont colorées en rose. La coloration de Gram reste une étape essentielle dans l'analyse médicale pour la détermination des bactéries pathogènes (Gram -).

C. Détermination des caractères biochimiques

➤ Test de l'oxydase

Principe

Ce test permet de mettre en évidence la phénylène diamine oxydase ou cytochrome oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé. Le réactif utilisé est un dérivé N-méthylé du paraphénylène diamine (composé réduit incolore) qui, en présence de l'enzyme, est oxydé et libère un composé rose violacé (forme oxydée semi-quinone), noircissant à l'air. La recherche de l'oxydase est un des critères les plus discriminatifs et les plus employés pour l'identification des bactéries, surtout celle des bacilles à Gram négatif en particulier pour *Escherichia coli* (Brossard *et al.*, 1997).

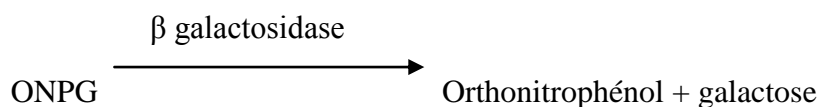
Lecture

Si la colonie prend une teinte rose qui devient rapidement violette puis brune le germe possède une oxydase, le test est dit positif.

➤ Test de la β -galactosidase (ONPG)

Principe

La recherche de la β -galactosidase est un des premiers tests enzymatiques réalisés en pratique courante. Il est particulièrement important pour les entérobactéries. L'Ortho-Nitro-Phényl β -D-Galactopyranoside ou ONPG est hydrolysé, comme le lactose, par la β galactosidase en libérant du galactose et de l'orthonitrophénol de couleur jaune. Ce test est pratiqué pour toute bactérie lactose négative après 24 h de culture, aérobie facultative et peu exigeante (Larpent *et al.*, 1997).



Lecture

Le test est positif quand la suspension se colore en jaune citron. Si absence de coloration jaune, la lecture est à poursuivre 24 heures.

➤ Utilisation de citrate de Simmons

Principe

Le milieu de Citrate de Simmons est utilisé pour la recherche de l'utilisation de citrate de sodium comme seule source de carbone et d'énergie (Brossard *et al.*, 1997). Sachant que le citrate est utilisé selon la réaction :



L'utilisation du citrate s'accompagnera d'une alcalinisation mise en évidence par le bleu de bromothymol.

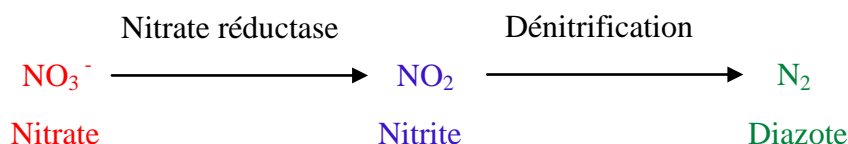
Lecture

Si le citrate est positif, cela se traduit par le bleuissement du milieu en donnant souvent une culture abondante.

➤ **Recherche de la nitrate réductase**

Principe

En l'absence d'oxygène, certaines bactéries peuvent obtenir leur énergie par respiration anaérobie. Cette respiration anaérobie est liée à l'activité d'enzymes localisées dans la membrane plasmique bactérienne (Le Minor et Richard, 1993). Au cours de ce test, on détecte si une bactérie peut utiliser le nitrate comme accepteur d'électrons. La réduction des nitrates par la nitrate réductase se traduit par la production de nitrites. Parfois, certaines bactéries peuvent poursuivre cette réduction jusqu'à une dénitrification.



Lecture

Si le milieu devient rouge : Présence de nitrites, donc la bactérie possède une nitrate réductase. Résultat NR+.

Si le milieu reste inchangé: On ajoute de la poudre de zinc qui joue le même rôle que la nitrate réductase vis-à-vis des nitrites.

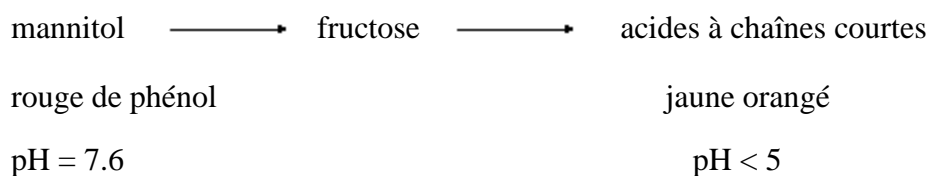
Coloration rouge : On a donc transformation des nitrates en nitrites par le zinc. La bactérie ne possède pas cette enzyme Résultat NR-.

Pas de coloration : Les nitrates ont été transformés par la bactérie au-delà des nitrites. La bactérie possède cette enzyme. Résultat NR⁺.

➤ Utilisation du Mannitol mobilité

Principe

Ce milieu contient du mannitol, des nitrates et du rouge de phénol (indicateur de pH) qui permet de déceler l'attaque du mannitol et la mobilité du germe (Guiraud, 1998). La dégradation en anaérobiose du mannitol conduit à la formation de fructose dont l'attaque conduit elle-même à la formation d'acides à chaînes courtes (acide méthanoïque, acide éthanoïque...).



L'acidification produite par les bactéries aérobies strictes est en général insuffisante pour permettre le virage du rouge de phénol du fait de l'importance du pouvoir tampon du milieu. Ce milieu convient donc plus particulièrement à l'étude des bacilles Gram négatif fermentatifs.

La présence de nitrates permet la recherche de nitrate réductase en ajoutant les réactifs de Griess (à la surface du milieu). Par contre, si l'addition de zinc est nécessaire, la lecture peut être un peu plus délicate. Les nitrates inhibent l'hydrogène lyase, enzyme catalysant la production de CO₂ et H₂ à partir de l'acide méthanoïque (HCOOH). Dans le cas de bactéries mannitol +, le seul gaz produit est donc le CO₂. Pour celles qui sont mannitol -, l'utilisation des peptones ne produit pas de gaz : le CO₂ est alors sous forme d'hydrogénocarbonate, le milieu restant alcalin. L'apparition de bulles pour une bactérie mannitol - ne peut donc être due qu'à la respiration des nitrates et le gaz est alors de l'azote (N₂). Une bactérie aérobie stricte pourra, si elle possède une nitrate réductase, se développer dans toute la masse du milieu (Joffin et Leyral, 2001).

Lecture

Si le mannitol est fermenté (mannitol +), le milieu vire au jaune (teinte du rouge de phénols en milieu acide). Les bactéries mobiles diffusent à partir de la ligne

d'ensemencement en créant un trouble du milieu (gélose molle), les bactéries immobiles se développent uniquement le long de la strie d'ensemencement.

➤ **Test des trois sucres (T.S.I)**

Principe

La gélose TSI est utilisée pour l'identification présomptive des entérobactéries basée sur la fermentation du glucose, du lactose, du saccharose et sur la production de gaz et d'H₂S (gaz qui est produit à partir d'un acide aminé : la cystéine) (Guiraud, 1998). La fermentation de ces glucides provoque une production d'acide, qui est détectée par l'indicateur au rouge de phénol. Des changements de couleurs en résultent, et le milieu vire au jaune en cas de production d'acide, ou au rouge en cas d'alcalinisation. En cas de pH neutre ou alcalin, l'acide sulfhydrique (produit à partir du thiosulfate de sodium) réagit avec le sel d'ammonium ferreux et entraîne la formation de sulfure de fer noir

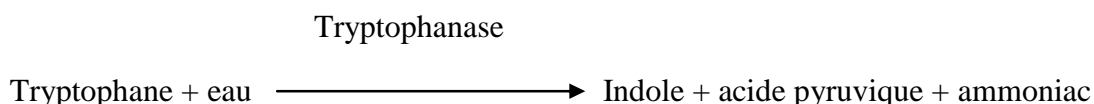
Lecture

- Virage du culot au jaune : culture glucose positive et bactérie aéro-anaérobie.
- Virage du culot au rouge : culture glucose négative ou bactérie aérobie stricte
- Pente virant au jaune: culture lactose et/ou saccharose positive.
- Pente virant au rouge : culture lactose et saccharose négative
- Présence d'un précipité noir : culture H₂S positive.
- Bulle dans la masse du milieu: production du gaz.

➤ **Production d'indole**

Principe

Certaines espèces bactériennes dégradent le tryptophane en indole, grâce à une tryptophanase. Ces bactéries sont dites indologènes (Brossard *et al.*, 1997).



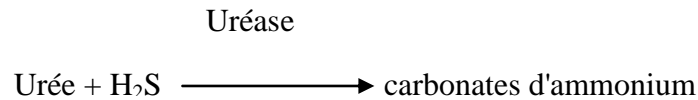
Lecture

La présence d'indole est révélée par un anneau rouge en surface.

➤ **Recherche de l'uréase**

Principe

L'uréase est une enzyme responsable de l'hydrolyse de l'urée, entraînant sa transformation en carbonates d'ammonium (Brossard *et al.*, 1997).



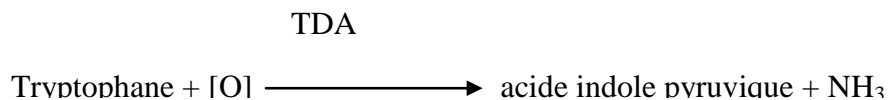
Lecture

Le virage du milieu du jaune grâce à l'indicateur de pH (rouge de phénol) au rouge violacé traduit une forte alcalinisation donc hydrolyse de l'urée.

➤ **Test de tryptophane désaminase (TDA)**

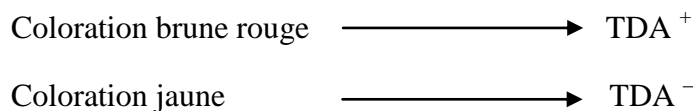
Principe

Elle permet la transformation en acide indole pyruvique qui développe une teinte brune rouge en présence de perchlorure de fer (Brossard *et al.*, 1997).



Lecture

La réaction colorée est immédiate :



➤ **Test de Clark et Lubs (RM-VP)**

Principe

Le milieu de Clark et Lubs permet l'étude de la voie de fermentation du glucose: différenciation entre les fermentations « acides mixtes » et « butylène glycolique ».

Le test RM (rouge de méthyle) permet la mise en évidence, grâce au rouge de méthyle, de la fermentation "acides mixtes" par acidification d'un milieu glucosé après fermentation du glucose.

Les bactéries dites Voges-Proskauer positives possèdent une voie métabolique particulière dans la fermentation des hexoses. A partir de l'acide pyruvique (produit

d'oxydation du glucose), elles peuvent former de l'acétyl-méthyl-carbinol ou de l'acétoïne et du butane-diol-2-3. En milieu alcalin, ces produits sont oxydés en diacétyl qui réagit avec des peptones pour produire un complexe de couleur rose rouge en présence de l' α -naphthol qui accélère la réaction. D'une façon générale, les bactéries qui possèdent cette voie métabolique présentent une réaction peu acide (virage au jaune du rouge de méthyle ou RM-) (Larpent *et al.*, 1997).

Le test VP est beaucoup plus spécifique que le test RM qui ne donne qu'une idée globale du métabolisme. Le test VP est particulièrement intéressant pour caractériser le groupe *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* des entérobactéries. Cette distinction des deux voies peut justifier une règle parfois contestable mais fréquemment vérifiée : les bactéries VP+ sont toujours RM-, les bactéries RM+ sont VP-. Les bactéries oxydatives ne sont pas concernées (Joffin et Leyral, 2001).

Lecture

Une coloration rouge franche indique une réaction de RM+. Le milieu reste incolore indique une réaction de RM-. Si la réaction est une RM positif c a d le VP est négatif.

➤ Test des décarboxylases (LDC, ODC, ADH)

Principe

Le diagnostic différentiel des espèces appartenant aux familles des Enterobacteriaceae, Vibrionaceae et Pseudomonadaceae, est souvent facilité par la recherche de la lysine décarboxylase (LDC), de l'ornithine décarboxylase (ODC) et de l'arginine dihydrolase (ADH). Les deux types d'enzymes ont été rassemblés parce que leurs techniques de recherche sont identiques. De plus, en ce qui concerne l'ADH, la technique utilisée ne permet pas de distinguer, pour l'arginine, décarboxylase de dihydrolase. Leurs caractéristiques sont cependant très différentes. Les bactéries dégradent les acides aminés en empruntant des voies multiples qui toutes aboutissent pratiquement à une libération d' NH_3 . Les décarboxylases (LDC, ODC) constituent le groupe où se situent les réactions les plus importantes en ce qui concerne la biodégradation des acides aminés par les bactéries (Le Minor et Richard, 1993).

Lecture

Le milieu est violet et trouble, les bactéries sont développées. Elles ont acidifié le milieu à partir du glucose puis l'ont réalcalinisé en décarboxylant la lysine, l'ornithine ou l'arginine. Le milieu est jaune (forcément trouble); les bactéries ont acidifié le milieu à partir du glucose et ne l'ont pas réalcalinisé.

➤ **Mise en évidence de la catalase**

Principe

Dans les conditions d'aérobiose, certaines bactéries produisent le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée). La catalase peut décomposer le peroxyde d'hydrogène en H₂O₂ avec dégagement d'oxygène (Singleton, 2005).

La catalase est habituellement présente chez les bactéries Gram + sauf les genres *Streptococcus* et *Lactobacillus*.

Lecture

Le dégagement de gaz (O₂) indique un résultat positif.

➤ **Test de la coagulase**

Principe

Ce test met en évidence la capacité de la bactérie de coaguler le plasma. Il s'agit du principal test caractérisant *Staphylococcus aureus* (Singleton, 2005).

Lecture

Si le plasma est coagulé en moins de 24 heures, le germe possède une coagulase.

➤ **Test de la désoxyribonucléase (ADNase)**

Principe

Technique utilisée pour l'identification de *Staphylococcus aureus*.

Ce test met en évidence la capacité de la bactérie à hydrolyser de l'acide désoxyribonucléique (ADN) par l'ADNase. La mise en évidence pour un Staphylocoque d'une ADNase thermostable (après chauffage à 100 °C) suffit à l'identification de l'espèce *aureus* (Larpen et al., 1997).

Lecture

Une zone claire en présence d'HCl ou une zone rose avec le bleu de toluidine est une réponse positive.

3.4.1.4. L'antibiogramme

Principe

L'antibiogramme est la méthode analytique qui permet, *in vitro*, l'interprétation de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques (Tableau VI). Ce dernier a été réalisé la caractérisation des bactéries pathogènes d'origine clinique selon la technique décrite par (Guezlane *et al.*, 2008).

Lecture

Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'une règle ou d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boîte fermée. Cette mesure permettra de classer la bactérie étudiée comme étant **Sensible**, **Intermédiaire** ou **Résistante** (Singleton, 2005).

Tableau VI : Antibiotiques utilisés

Antibiotique	Signe	La charge du disque
Pipéracilline	PIP	75µg
Céfazoline	CZ	30µg
Amikacine	AN	30µg
Doxycycline	DO	30µg
Amoxicilline + acide clavulanique	AMC	20/10µg
Pénicilline	P	6µg

3.4.1.5. Effet antibactérien de l'huile essentielle de *M. communis* sur la croissance des bactéries pathogènes d'origine clinique

Les souches bactériennes pathogènes suscitées précédemment d'origine clinique ont fait l'objet de cette première étude. Deux échantillons d'HE de myrte récolté à Bissa (2009) ont été testés et deux méthodes ont été appliquées :

➤ **Méthode de diffusion en puits (Test de sensibilité)**

Principe

L'aromatogramme permet un choix judicieux, en adaptant la prescription d'essences à chaque syndrome infectieux. Comme l'antibiogramme, l'aromatogramme

révèle aussi des sensibilités à certaines essences, dont le pouvoir antiseptique est totalement insoupçonné (Luu, 2002 in Benzeggouta 2005). Différentes concentrations de l'HE (2, 4, 6 et 8 μL par puit) ont été testées pour *S. aureus*, *Salmonella* sp., *Proteus* sp. et *Klebsiella* sp. et des concentrations de l'ordre de 5, 10, 15 et 20 μL pour *E. coli*.

Lecture

La lecture des zones d'inhibition (Tableau VII) a été faite selon Basaran et Ahmet (2004).

Tableau VII: Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle avec la méthode de l'aromatogramme (Basaran et Ahmet, 2004).

Diamètre des zones d'inhibition	< 8 mm	8 – 13 mm	> 14 mm
Activité de l'HE	Inactive	Activité intermédiaire	Activité supérieure

➤ **Méthode de dilution en milieu liquide ou par contact direct**

Principe

C'est le procédé le plus simple, le plus rapide et actuellement le plus utilisé pour évaluer la masse microbienne. Il s'agit d'une méthode optique générale, appelée opacimétrie, fondée sur la propriété que présente toute solution d'absorber une partie de l'intensité d'un faisceau de lumière qui la traverse en ligne droite. L'absorbance est proportionnelle à la concentration cellulaire (Archambaud, 2000).

La cinétique de croissance en fonction du temps des différentes souches a été évaluée pour les mêmes doses mentionnées précédemment, additionnées aux souches en suspension sur milieu liquide Mueller Hinton.

Lecture

La lecture des résultats s'est faite à la lumière du jour et à l'œil nu. La limpidité du milieu implique l'effet antimicrobien de l'extrait testé tandis que la présence d'un trouble indique son inefficacité (signe de croissance bactérienne). La CMI correspond donc à la plus faible concentration d'huile essentielle à laquelle on n'observe pas de croissance visible (Oussou et *al.*, 2004).

3.4.1.6. Effet antibactérien de l'huile essentielle de *M. communis* L. sur les souches bactériennes de référence

L'étude, *in vitro*, du pouvoir antibactérien de l'HE du myrte de Bissa (2009) a été évaluée par la méthode de diffusion sur disque (conformément à la méthode de Bauer *et al.* (1966) adoptée par NCCLS ou National Committee for Clinical Laboratory Standards) et la méthode des microdilutions pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) selon la technique décrite par Motyl *et al.*, (2005). Les techniques détaillées sont présentées en annexe 2.

3.4.2. Effet antifongique

3.4.2.1. Le milieu de culture

Le choix des milieux de culture pour tout parasite dépend de ses exigences nutritionnelles. Le milieu PDA (Potato-Dextrose-Agar), préparé à base de pomme de terre (annexe 1) a été utilisé pour la croissance des champignons (Rappily, 1968).

3.4.2.2. Préparation des précultures

Au centre de chaque boîte de pétri, contenant le milieu PDA gélosé, on dépose un disque provenant d'une culture pure et on incube pendant 7 jours pour tous les champignons testés. Les quatre espèces destinées aux tests antifongiques ont été identifiées par des examens macroscopiques et microscopiques. L'examen macroscopique consistait à définir les caractères cultureux comme la vitesse de croissance, la couleur et la texture du thalle...etc en plus de l'observation microscopique de la culture pure.

3.4.2.3. Tests, *in vitro*, de l'activité antifongique

L'étude du pouvoir antifongique a été réalisée, *in vitro*, par addition sur milieu gélosé PDA de différents doses d'huile essentielle de *Myrtus communis* (méthode de contact direct). Des quantités appropriées de l'extrait naturel d'huile essentielle de *Myrtus* ont été ajoutées au milieu PDA stérile encore liquide pour obtenir différentes concentrations (Tableau VIII). Un disque mycélien de diamètre de 5 mm pris de la culture pure du mycète a été posé au centre de chaque boîte de pétri. Le volume de PDA est de 20 ml/boîte, l'huile essentielle à différentes concentrations (V/V) est ajoutée au milieu de culture à la température de 56°C. Les souches sont incubées à 25°C pendant 7 jours (Mohammedi, 2006).

Tableau VIII : Concentrations testées de l'huile essentielle

	Concentration en µl /20ml PDA	Concentration en % (V/V)
	20	0,1
Huile essentielle	40	0,2
	100	0,5

V/V : volume d'huile/volume PDA

Des mesures de diamètres des colonies ont été prises à la fin d'incubation pour chaque champignon. La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la plus basse concentration où aucune croissance n'est visible. L'IC₅₀ représente la dose réduisant de 50 % la croissance microbienne, ainsi pour ce dernier paramètre l'action antifongique a été déterminée par la mesure de l'inhibition de la croissance de la colonie fongique en utilisant la formule d'Ebbot (Motiejūnaitė et Pečiulytė, 2004) :

$$T = (D_k - D_0) / D_k \times 100\%$$

Où

D_k : diamètre de la colonie mycélienne témoin en cm.

D₀ : diamètre de la colonie mycélienne dans l'expérience en cm.

T : taux de la croissance du mycélium en pourcentage.

3.5. Evaluation du potentiel antioxydant de l'huile essentielle

3.5.1. Activité de piégeage du radical libre (DPPH)

En présence d'antioxydant, le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) radical stable à électron non apparié, est piégé soit par liaison à un atome d'hydrogène du groupement hydroxyle (cinétique rapide de certaines acides et dérivées phénoliques) ou la libération d'un électron (cinétique lente des dérivées glycosylées et des anthocyanes). La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue (initiale) et l'apparition d'une couleur jaunâtre, due à une recombinaison des radicaux DPPH•, mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm. Pour l'évaluation de l'activité antioxydante, deux approches sont appliquées : d'une part, la détermination de la réduction relative du radical DPPH• à un temps de référence ou la détermination de la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50 % de DPPH• et d'autre part, le suivi de la cinétique de la réduction. L'antioxydant synthétique BHT (butyl-hydroxy-toluène) est

utilisé comme contrôle positif. L'activité antiradicalaire est calculée par la formule suivante:

$$\text{Inhibition du DPPH (\%)} = (\text{Abs}_{\text{contrôle}} - \text{Abs}_t) / \text{Abs}_{\text{contrôle}} \times 100\%$$

Où : l'absorbance du mélange réactionnel qui contient le radical libre et l'échantillon de l'antioxydant est reliée avec l'absorbance du mélange sans aucun antioxydant (solution témoin ou contrôle) à un temps t. Cet essai a été réalisé selon la technique décrite par Brandwilliams *et al.* (1995).

3.5.2. Pouvoir réducteur du fer par la méthode FRAP

Le principe de cette méthode correspond à la réduction d'un complexe tripyridyltriazine ferrique [(Fe(III)-TPTZ)₂] en un complexe tripyridyltriazine ferreux [(Fe(II)-TPTZ)₂] par un antioxydant (AH), la réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique (Fe³⁺) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe²⁺), l'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur. Les résultats permettent de calculer la concentration efficace (CE₅₀ mg/mL), concentration de l'HE correspondante à une absorbance égale à 0.5, obtenue par l'interprétation de la courbe de régression linéaire. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif. La technique est rapportée par Aazza *et al.* (2011).

3.5.3. Pouvoir chélatant du fer

La ferrozine forme avec le fer libre, présent dans un milieu réactionnel, un complexe ferrozine-Fe²⁺ de couleur violette intense. La quantification de ce complexe par spectrophotométrie à 562 nm, dans un milieu de concentration connue en fer, renseigne sur la quantité de fer non chélaté et donc sur la capacité de l'HE à piéger cet élément. Ce pouvoir chélateur est proportionnel à la diminution de l'absorbance du complexe ferrozine-Fe²⁺ mesurée et la concentration CE₅₀ est calculée comme pour le test du DPPH. L'EDTA est utilisé comme contrôle positif (Miguel *et al.*, 2010).

3.5.4. Capacité de piégeage du radical-cation ABTS

Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS^{•+} [acide 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)] de coloration bleu-

verte en le transformant en $ABTS^+$ incolore, par piégeage d'un proton par l'antioxydant. Le radical est formé par oxydation de l'ABTS incolore avec le persulfate de potassium; le radical $ABTS^{\bullet+}$ (absorbant à 734nm) est formé par arrachement d'un électron (e^-) à un atome d'azote de l'ABTS. La décroissance de l'absorbance causée par l'antioxydant reflète la capacité de capture du radical libre. Une comparaison est faite avec la capacité du Trolox (analogue structural hydrosoluble de la vitamine E) à capturer $ABTS^{\bullet+}$. La capacité antioxydante, exprimée en équivalent Trolox (TEAC), correspond donc à la concentration de Trolox ayant la même activité que la substance à tester à une concentration. Le résultat est donné en μM ou mM d'équivalent Trolox par g de produit ou par mL, s'il s'agit d'un liquide. L'essai a été réalisé selon la technique rapportée par la littérature (Re *et al.*, 1999).

4. Analyses statistiques

La composition en pourcentage des huiles essentielles isolées a été utilisée pour déterminer la relation entre les différents échantillons par analyse de groupes à l'aide du système de taxonomie numérique et d'analyse multivariée (logiciel NTSYS-pc, version 2.2, Exeter Software, Setauket, New York) (Rohlf, 2000). Pour l'analyse de groupes, le coefficient de corrélation a été choisi comme une mesure de similarité entre toutes les adhésions et la méthode d'agrégation de paires non pondérées faisant appel aux moyennes arithmétiques (UPGMA; Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Means) a été utilisé pour la définition des groupes. Le degré de corrélation a été évaluée selon Pestana et Gageiro (2000) et classée comme très élevé (0,9-1), élevé (0,7 - 0,89), modérée (0,4 - 0,69), faible (0,2 - 0,39) et très faible (<0,2).

Le dispositif expérimental appliqué pour le traitement statistique des résultats du test antifongique est un bifactoriel en randomisation totale. La comparaison des moyennes a été réalisée avec le test de Newman Keuls à un seuil de probabilité de 5%. L'analyse de la variance a été faite à l'aide du logiciel STAT BOX 6.0.4. (GRIMMERSOFT).

Le traitement statistique des résultats des activités antibactériennes et antioxydantes a été fait avec ANOVA (monofactorielle et bifactorielle) incluant le test de comparaison multiple (Tukey). Le niveau de signification a été fixé à $P < 0,05$. Le calcul statistique a été effectué en utilisant le logiciel SPSS.

Chapitre 4 : Résultats et discussion

1. Détermination du taux d'humidité et du rendement en huiles essentielles

Les taux d'humidité déterminés pour les feuilles de myrte récolté de la région de Chlef (Bissa), après 7 jours de séchage à l'ombre dans un endroit aéré, sont illustrés par la figure 5. Les valeurs enregistrées sont variables en fonction du mois de récolte et de l'organe concerné. Un taux d'humidité moyen des feuilles de 25,73% est noté pour la période hivernale (novembre, décembre et janvier) contre 37,81% noté pour la période estivale (juillet et août) et 28,91% pour le mois de juin. Les valeurs élevées observées pour les mois de juillet et août sont peut être dues à l'élévation de la température ambiante de séchage à l'air libre durant cette période de chaleur permettant probablement l'évaporation d'une quantité plus importante de l'eau des feuilles. En l'occurrence, les fruits (blancs et bleu-violacé) contenaient plus d'eau avec des taux d'humidité de l'ordre respectivement de 41,635% et 48,9% récoltés les mois de novembre et décembre. Des résultats comparables ont été signalés par Aidi et Marzouk (2012) pour les fruits de *M. communis* var. *baetica* récoltés durant les différents stades de maturation (août-janvier) qui sont de l'ordre de 39,12% à 76,16% avec 67,13% et 75,11% pour respectivement les mois de novembre et décembre. La région de récolte présentait une pluviométrie allant de 1,6 mm à 156,8 mm pour cette période de récolte avec le maximum enregistré pour le mois de décembre et 55,6mm pour le mois de novembre et des températures de 16,8 °C et 13,2 °C, respectivement.

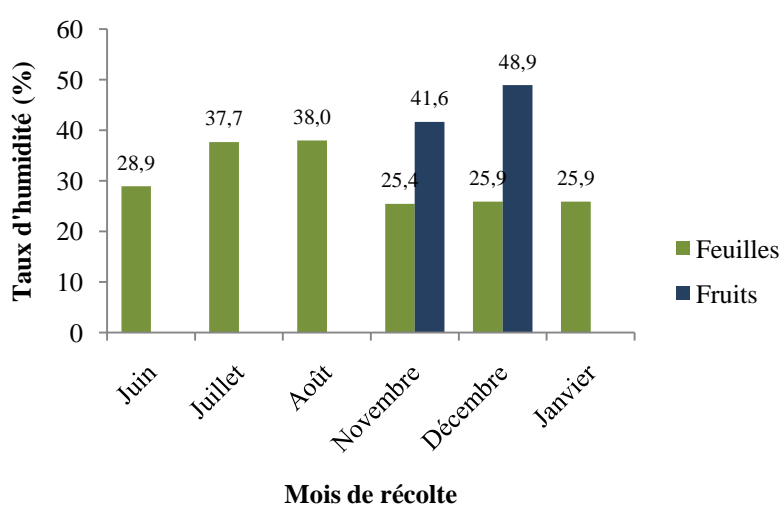


Figure 5 : Variation du taux d'humidité des feuilles et des fruits de *Myrtus communis* L. de la région de Chlef (Bissa) en fonction du mois de récolte.

Ces températures restent comparables à celles observées dans la forêt de Bissa mais les taux de précipitation sont plus élevés. Berka-Zougali *et al.* (2012) ont rapporté un taux d'humidité moyen des feuilles de l'ordre de $48,4\% \pm 0,2\%$ pour le myrte algérien récolté de la forêt de Bâinem, située dans la banlieue nord-ouest d'Alger à 400m d'altitude et caractérisée par un climat doux et l'exposition au soleil et ce durant la mi-novembre (pleine fructification). Cette hausse de la valeur d'humidité serait probablement due au mode de séchage appliqué à l'étuve à $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 24 h. Ayant utilisé le même mode de séchage, Koukos *et al.* (2001) rapportent aussi un taux d'humidité moyen des feuilles de 49,5% pour le myrte de Grèce récolté pendant le mois de juin.

Le rendement en HE extraites des feuilles par hydrodistillation est aussi variable en fonction du mois de récolte et de l'organe (feuilles ou fruits). Les plus faibles rendements observés pour la période de fructification sont respectivement de 0,34%, 0,38% et 0,39% pour novembre, décembre et janvier (2009-2010). Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par Brada *et al.* (2012) et Berka-Zougali *et al.* (2012) pour le myrte récolté à des endroits différents (la forêt de Bâinem et Miliana) également au mois de novembre de la même année (2009). Ces deux localités étant respectivement situées au Centre et Ouest algériens (Tableau IX). L'influence des paramètres climatiques est d'autant plus confirmée par Berka-Zougali *et al.* (2010) ayant travaillé sur le myrte récolté du même endroit (forêt de Bâinem) à la même période (novembre ou période de pleine fructification) mais à une date antérieure ; le rendement en huiles essentielles extraites, par hydrodistillation, des feuilles était de 0.51%. Les travaux réalisés par Bouzabata *et al.* (2013b et 2015) approuvent ce constat en rapportant des valeurs de rendement en HE des feuilles oscillant de 0.4 à 1% pour le myrte algérien récolté de 16 localités situés à l'Est, au Centre et Ouest algériens durant la période de pleine floraison (mai et juin). Les valeurs du rendement enregistrées pour le myrte récolté de la forêt de Bissa pour la période de floraison (juin, juillet et août) sont de 1,15%, 0,61% et 0,55%, respectivement. Quant au rendement en HE extraites des feuilles, durant le mois de juin, il reste proche de celui cité précédemment par ces auteurs (1%) relevant ainsi l'effet du stade physiologique donc de la saison sur le rendement. D'ailleurs, ce dernier s'est révélé plus faible durant la période de fructification (novembre, décembre et janvier) avec des valeurs de l'ordre de 0,34%, 0,38% et 0,39% (Figure 6).

Tableau IX : Rendement en huiles essentielles du myrte algérien extraites par hydrodistillation.

Partie de la plante utilisée, stade physiologique et site de la récolte	Rendement (%)	Référence
- Feuilles - Mi-novembre (pleine fructification) - Forêt de Baïnem (banlieue nord-ouest d'Alger)	0,51	Berka-Zougali <i>et al.</i> (2010)
- Feuilles - Mi-novembre (pleine fructification) - Forêt de Baïnem (banlieue nord-ouest d'Alger)	0,32	Berka-Zougali <i>et al.</i> (2012)
- Feuilles et fruits - Novembre - Miliana (nord-ouest de l'Algérie)	0,3 et 0,1, respectivement	Brada <i>et al.</i> (2012)
- Feuilles et rameaux de <i>M. communis</i> à fruits bleu-violacé - Feuilles de <i>M. communis</i> à fruits blancs - Stade de fructification - Région de Gouraya (nord-est de l'Algérie)	0,92 et 0,05, respectivement 0,77	Foudil-Cherif <i>et al.</i> (2013)
- Feuilles et fleurs (parties aériennes) - Mai et juin (stade de floraison) - 16 sites de l'Est algérien (Jijel, Skikda, Seraidi, Bouchegout, Mechroha et Bouhadjar) au Centre algérien (Tadma, Adekkar, Bouira, Tazmalt, Mansoura, Saoula, forêt de Baïnem, Mouzaïa et Hammam Righa) et Ouest algérien (Nedroma).	0,4 – 0,9	Bouzabata <i>et al.</i> (2013b)
- Feuilles et fleurs (parties aériennes) - Mai et juin (stade de floraison) - Deux groupes d'endroits : MCI (forêt de Baïnem - Tipaza -, Mechroha -Tell Atlas, Guelma - et Saoula - Alger -); MCII (Hammam Righa -Aïn Defla -).	0,6 - 1	Bouzabata <i>et al.</i> (2015)

Les rendements des feuilles du myrte à fruits bleu-violacé notés pendant la période de fructification (0,31%, 0,365% et 0,38% pour les mois de novembre, décembre et janvier) sont inférieurs à ceux relevés pour les feuilles à fruits blancs (0,37%, 0,39% et 0,40%, respectivement; Figure 7) contrairement à ceux observés par Foudil-Cherif *et al.* (2013). Ces derniers ayant rapporté des rendements en HE des feuilles de 0,92% et 0,77% pour le myrte à fruits bleu-violacé et celui à fruits blancs récoltés de la région de Gouraya (Nord-est algérien). Le climat de cette région tout comme celui de la forêt de Bissa et Miliana sont classés comme semi-arides ; toutefois, cette dernière est située à 20m d'altitude et présente une moyenne des précipitations annuelles de 580 mm avec un taux

oscillant de 87mm, 120mm et 79mm en hiver (novembre, décembre et janvier) et des températures de 15,8 °C, 12,6 °C et 11,9 °C.

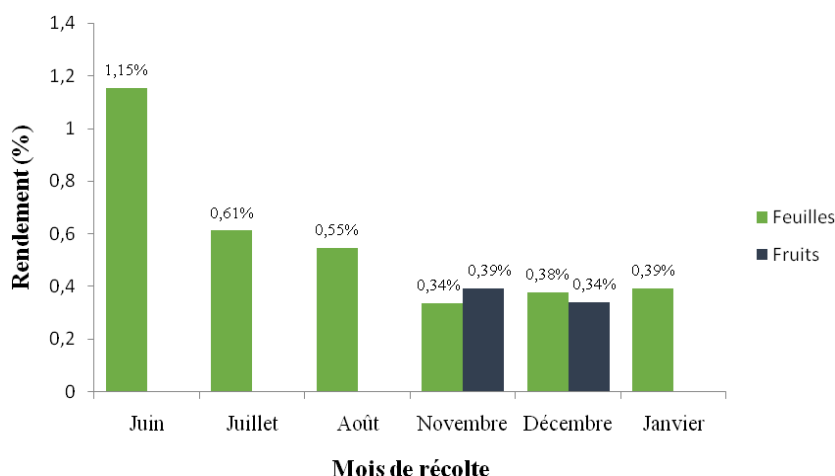
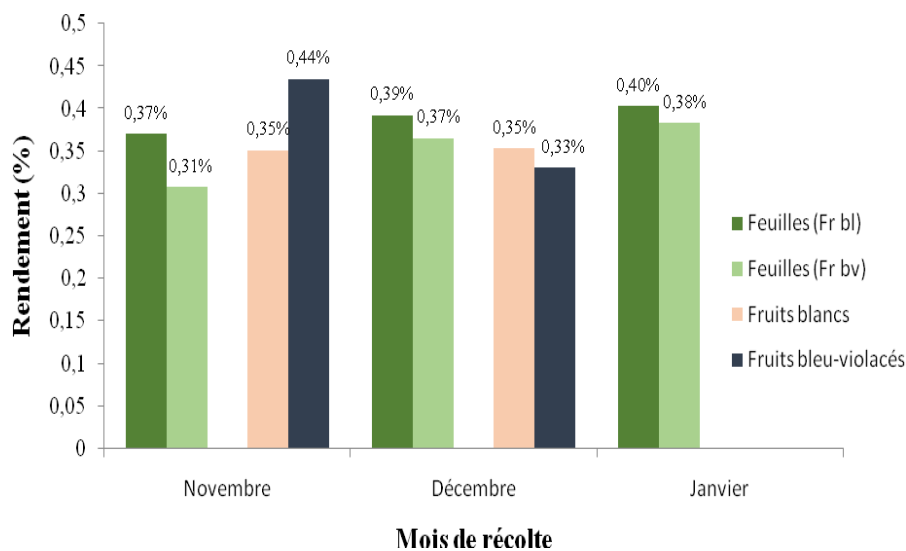


Figure 6 : Variation du rendement (%) en huiles essentielles des feuilles et des fruits de *Myrtus communis* L. récolté dans la forêt de Bissa en fonction du mois de récolte.



Fr bl : fruit blanc; Fr bv : fruit bleu-violacé

Figure 7 : Variation du rendement (%) en huiles essentielles des feuilles et des fruits de *Myrtus communis* L. à fruits blancs et fruits bleu-violacé récolté dans la forêt de Bissa en fonction du mois de récolte.

L'effet du stade physiologique sur le rendement en HE, des feuilles et des fruits du myrte, apparaît significativement dans les travaux de Aidi Wannes *et al.* (2009; 2010 et 2011). En omettant l'origine de la plante (Yougoslavie, Croatie et Albanie), les rendements en HE des feuilles de myrte varient effectivement avec la période de récolte (Savikin-Fodulovic *et al.*, 2000, Asllani, 2000 et Jerkovic *et al.*, 2002). Les rendements enregistrés pour le myrte de la forêt de Bissa pendant la période de floraison (juin, juillet et août) qui sont de 1,15%, 0,61% et 0,55%, respectivement sont proches de ceux signalés par Chalchat *et al.* (2010), Ghasemi *et al.* (2011), Rahimmalek *et al.* (2013) et Gavahian *et al.* (2013). Khan *et al.* (2014) rapportent aussi une valeur de rendement comparable à nos résultats de 0,68% pour le myrte d'Arabie Saoudite récolté au mois d'avril pendant le stade de floraison. Par contre, Koukos *et al.* (2001) rapportent un rendement plus faible de 0,22% pour le myrte de Grèce récolté en juin. Quant au myrte récolté des régions de Ténès et Zeboudja (Chlef) durant le mois de septembre (2012), les rendements en HE des feuilles oscillaient de 0,28- 0,77% et restent comparables au myrte du Portugal (0,56%) et celui de la Tunisie (0,34%) (Pereira *et al.*, 2009 et Aidi Wannes *et al.*, 2010) contrairement au myrte d'Iran dont le rendement était de 1,2% (Ghannadi et Dezfily, 2011).

Le rendement en HE des fruits est légèrement plus élevé (0,39% et 0,34% pour les mois de novembre et décembre) comparativement à celui rapporté par Brada *et al.* (2012) qui est de 0,1% pour le mois de novembre (période de pleine fructification). Les deux endroits se caractérisent par une bonne exposition au soleil se situant à des altitudes proches (750 m pour la région de Miliana et de 852-858m pour la forêt de Bissa) avec disponibilité d'eau de source dans cette dernière contre 70 mm de pluviométrie enregistrée pour la région de Miliana. Cette variabilité des facteurs pédoclimatiques (altitude, exposition au soleil, température, nature du sol et disponibilité d'eau) pourraient probablement influencer la synthèse des HE par la plante. Par ailleurs, Aidi Wannes *et al.* (2010) signalent des rendements en HE des fruits de l'ordre de 0,11%, 0,006%, 0,01% et 0,003% pour les mois de septembre, novembre, décembre et janvier, respectivement. Le rendement reste toujours supérieur en septembre 0,23% et 0,08% pour respectivement le myrte du Portugal et de Tunisie (Pereira *et al.*, 2009 ; Aidi Wannes et Marzouk, 2012). Selon les travaux réalisés sur le myrte (Tableau X), l'origine ou lieu de récolte semble exercer un effet significatif sur le rendement. Cette variabilité des résultats est certainement due à la variabilité des facteurs externes ou pédoclimatiques et internes propres à la plante (génétiques).

Tableau X : Variation du rendement en huiles essentielles en fonction de l'origine du myrte et de la période de récolte.

Feuilles			
Origine	Période de récolte	Rendement (%)	Référence
Yougoslavie	Eté	0,76	Savikin-Fodulovic <i>et al.</i> (2000)
Croatie	Un an de cycle végétatif	0,19-0,37 (min en mai et max en juillet et novembre)	Jerkovic <i>et al.</i> (2002)
Albanie	Juin - octobre	0,48-0,8	Asllani (2000)
Turquie	Mai	1,10	Özek <i>et al.</i> (2000)
	Août	0,62	Chalchat <i>et al.</i> 2010
Grèce	Juin	0,22	Koukos <i>et al.</i> (2001)
Zakynthos (île grecque située sur la mer Ionienne)	Février, mai et août	1,45, 1,20 et 1,45 respectivement	Chryssavgi <i>et al.</i> (2008)
Italie	Novembre-décembre	0,52	Tuberoso <i>et al.</i> (2006)
Portugal	Mai (pré-floraison), juin (boutons floraux), juillet (floraison), septembre (fruits non mûrs) et octobre (fruits mûrs)	0.33-0.74 (min en mai et max en octobre)	Pereira <i>et al.</i> (2009)
Iran	Juin (mi-floraison)	0.6-1.4	Rahimmalek <i>et al.</i> (2013)
Iran	Juillet	0.47	Ghasemi <i>et al.</i> (2011)
Iran	Juillet	0.7	Gavahian <i>et al.</i> (2013)
Iran	Septembre	1,2	Ghannadi et Dezfuly (2011)
Maroc	Mai	0,3-0,4	Farah <i>et al.</i> (2006)
Maroc	Stade végétatif	2,0	Viuda-Martos <i>et al.</i> (2011)
Tunisie	Janvier, avril et juillet (stades de fructification, végétatif et de floraison)	0,18, 0,11 et 0,41, respectivement pour var. <i>baetica</i>	Aidi Wannes <i>et al.</i> (2009)
		0,20, 0,14 et 0,61 pour var. <i>italica</i>	
Tunisie	Un an de cycle végétatif	0,14-0,61 max (juillet) et min (avril) pour var. <i>italica</i>	Aidi Wannes <i>et al.</i> (2010)
Tunisie	Un an de cycle végétatif	0,17-0,47 pour var. <i>baetica</i>	Aidi Wannes <i>et al.</i> (2011)
Arabie Saoudite	Avril (stade de floraison)	0,68	Khan <i>et al.</i> (2014)

Fruits

Origine	Période de récolte	Rendement (%)	Référence
Tunisie	Un an de cycle végétatif	0,003-0,11 d'août à janvier (maximum en septembre)	Aidi Wannas <i>et al.</i> (2010)
Tunisie	Stades de maturation (août-janvier)	0,01-0,08 pour var. <i>baetica</i> (max septembre et min novembre)	Aidi Wannas et Marzouk (2012)
Tunisie	Janvier	0,04 pour var. <i>baetica</i>	Aidi Wannas <i>et al.</i> (2011)
Maroc	Stade végétatif	1,8	Viuda-Martos <i>et al.</i> (2011)
Corse	Novembre	0,04	Barboni <i>et al.</i> (2010)
Albanie	Octobre (fruits mûrs)	0,1-0,15	Asllani (2000)
Italie	Novembre et décembre	0,02	Tuberoso <i>et al.</i> (2006)
Portugal	Septembre (fruits non mûrs) et octobre (fruits mûrs)	0,23 et 0,11	Pereira <i>et al.</i> (2009)
Croatie	Un an de cycle végétatif (août-février)	0,03-0,13 (min en novembre, décembre et janvier et max en octobre)	Jerkovic <i>et al.</i> (2002)

2. Détermination des caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques

L'huile essentielle des feuilles de myrte extraite durant la floraison (juin) est légèrement acide ($\text{pH}=5,10 \pm 0,642$), moins dense que l'eau ($0,853 \pm 0,090$) présentant des indices de réfraction de $1,470 \pm 0,0341$, d'acide de $2,58 \pm 0,682$, de peroxyde de $12,70 \pm 1,0321$ et de saponification de $193,175 \pm 6,230$. Elle est de couleur jaune pâle, très légère et d'aspect mobile avec une senteur fraîche et agréable. Berka-Zougali *et al.* (2012) rapportent des valeurs de densité et d'indice de réfraction comparables ($0,9051 \pm 0,0342$ et $1,470 \pm 0,021$, respectivement) pour l'huile essentielle des feuilles du myrte récolté mi-novembre dans la forêt de Baïnem.

3. Composition chimique des huiles essentielles extraites

3.1. Composition chimique de l'huile essentielle extraite pendant la floraison

L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de myrte, récoltées en juin 2009, par GC et GC/MS a révélé la présence de 34 composants (Tableau XI) avec prédominance du limonène (23,4 %), linalool (15,4 %), géranyl acétate (10,9%), α -pinène (10,7%), linalyl acétate (8,2%) et 1,8-cinéole (6,6%). Les monoterpènes oxygénés étaient le groupe chimique prédominant (50,5%) suivi par les monoterpènes (40,5%), tandis que les sesquiterpènes (1,9%) et les sesquiterpènes oxygénés (2,1%) étaient présents en faibles quantités. L'huile essentielle est caractérisée par l'absence de myrtényl acétate et richesse en limonène, linalool et géranyl acétate c'est à dire de chémotype : limonène/ linalool/ géranyl acétate. L' α -pinène (10,7%) et le 1,8-cinéole (6,6%) sont aussi présents mais à des teneurs plus faibles mettant ainsi en évidence l'existence d'un nouveau chémotype algérien pour l'HE des feuilles de *M. communis* L. Effectivement, les travaux réalisés sur le myrte d'Algérie (Tableau XII) évoquent un chémotype : α -pinène/1,8-cinéole pour l'HE des feuilles et ce, quelque soit le stade physiologique de la plante (stade de floraison ou de fructification) ainsi que le lieu de récolte (Nord-Est, Centre ou Nord-Ouest algériens). Exception faite pour l'HE des feuilles du myrte à fruits blancs qui apparait de chémotype : 1,8-cinéole / α -pinène (Foudil-Cherif *et al.*, 2013). Ce constat est d'autant plus confirmé par les travaux de Bouzabata *et al.* (2013b) sur le myrte algérien.

Tableau XI : Composition des huiles essentielles des feuilles de *M. communis* L. de la forêt de Bissa (Chlef) récolté durant la floraison (juin).

Composants	IR ^a	IR ^b	Aire (%)
α -thujène	930	925	0,5 ± 0,1
α-pinène	939	932	10,7 ± 0,6
β - pinène	979	974	Tr
Myrcène	991	990	3,1 ± 0,1
α -phéllandrène	1003	1008	Tr
p-cymène	1025	1023	0,5 ± 0,2
Limonène	1029	1029	23,4 ± 0,4
1,8 cinéole	1031	1031	6,6 ± 0,8
(E)- β ocumène	1050	1047	1,2 ± 0,1
α -terpinolène	1089	1087	Tr
Linalool	1097	1102	15,4 ± 1,7
<i>allo</i> -ocimène	1132	1128	1,1 ± 0,1
terpinène-4-ol	1177	1177	0,18 ± 0,1
α -terpinéol	1189	1191	1,5 ± 0,5
Estragole	1196	1198	0,8 ± 0,1
trans carvéol	1217	1219	Tr
Nérol	1230	1228	0,4 ± 0,1
cis-carvéol	1229	1230	Tr
Carvone	1243	1244	Tr
linalyl acétate	1257	1257	8,2 ± 1,7
Géranial	1267	1270	0,2 ± 0,1
bormyl acétate	1289	1286	Tr
methyl géranate	1325	1323	0,3 ± 0,1
α -terpényl acétate	1349	1349	0,8 ± 0,1
néryl acétate	1363	1363	2,02 ± 0,7
géranyl acétate	1381	1385	10,9 ± 1,5
methyl eugénol	1404	1404	2,3 ± 0,4
E-caryophyllène	1419	1422	0,7 ± 0,1
γ -élemène	1437	1434	Tr
α humulène	1455	1456	0,7 ± 0,1
(E-E), α -farnésène	1506	1507	Tr
δ -cadinène	1523	1521	0,5 ± 0,1
oxyde de caryophyllène	1583	1587	1,9 ± 0,3
caryophylla-4(14),8(15) diène-5. β - ol	1641	1638	0,2 ± 0,1

Note: tr, traces (<0.1%); IR^a, indice de rétention (Adams, 2001); IR^b, indice de rétention relative aux C₇-C₃₀ sur la colonne capillaire HP-5MS.

Monoterpènes : 40,5%

Monoterpènes oxygénés : 50,5%

Sesquiterpènes: 1.9%

Sesquiterpènes oxygénés : 2,1%

Composés identifiés : 95%

Par ailleurs, Brada *et al.* (2012) observent une variation de la composition chimique de l'huile essentielle de myrte en fonction de l'organe; les feuilles sont riches en monoterpènes (51,30%) tandis que les fruits sont riches en monoterpènes oxygénés (71,2%). Le contenu en sesquiterpènes y est très faible (1%) contrairement aux fruits (16%). L'huile essentielle de ces derniers est aussi caractérisée par une grande quantité de linalool, estragole, 1,8 cinéole et une quantité appréciable de bergamotène et E-caryophyllène c'est à dire de chémotype typique : linalol/estragole/1,8 cinéole.

Tableau XII : Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles des feuilles et des fruits de *M. communis* L. d'Algérie.

Partie de la plante utilisée, stade physiologique et site de la récolte	Principaux composants (> 5%)	Référence
- Feuilles - Mi-novembre (pleine fructification) - Forêt de Bâinem (banlieue nord-ouest d'Alger)	- α -pinène 50,81 - 1,8-cinéole 24-32	Berka-Zougali <i>et al.</i> (2010)
- Feuilles - Mi-novembre (pleine fructification) - Forêt de Bâinem (banlieue nord-ouest d'Alger)	- α -pinène 44,62 - 1,8-cinéole 25,46	Berka-Zougali <i>et al.</i> (2012)
- Feuilles et fruits - Novembre - Miliana (nord-ouest de l'Algérie)	Feuilles - α -pinène 46,9 - 1,8 cinéole 25,2 - Linalool 5,6 Fruits - Linalool 36,2 - Estragole 18,4 - 1,8-cinéole 11,4 - α -bergamolène 5,9	Brada <i>et al.</i> (2012)
- Feuilles et rameaux de <i>M. communis</i> à fruits bleu-violacé et blancs - Stade de fructification - Région de Gouraya (nord-est de l'Algérie)	Feuilles des fruits blancs et bleu-violacé, respectivement: - 1,8-cinéole 42,4-33,3 - α -pinène 33,4-39,3 - Linalool 1,0-6,5	Foudil-Cherif <i>et al.</i> (2013)
- Feuilles et fleurs (parties aériennes) - Mai et juin (stade de floraison) - 16 sites de l'Est algérien (Jijel, Skikda, Seraidi, Bouchegout, Mechroha et Bouhadjar) au Centre algérien (Tadma, Adekhar, Bouira, Tazmalt, Mansoura, Saoula, forêt de Bâinem, Mouzaïa et Hammam Righa) et Ouest algérien (Nedroma).	- α -pinène 27,4-59,2 - 1,8-cinéole 6,1-34,3 - Limonène 2,9-24,3 - Linalool 0,6-1,2 - Linalyl acétate (Jusqu'à 13,1) - α -terpinéol 1,8-5,5 - Geranyl acétate 1,4-6,0	Bouzabata <i>et al.</i> (2013b)
- Feuilles et fleurs (parties aériennes) - Mai et juin (stade de floraison) - Deux groupes d'endroits: MCI (Forêt de Bâinem - Tipaza -, Mechroha -Tell Atlas, Guelma - et Saoula -Alger -); MCII (Hammam Righa -Aïn Defla -).	MCI et MCII, respectivement: - α -pinène 50,8-33,6 - 1,8-cinéole 21,9-13,3 - Linalool 2,7-14,8 - Linalyl acétate 0,3-9,5	Bouzabata <i>et al.</i> (2015)

En comparaison avec le myrte provenant de diverses origines (Tableau XIII) récolté durant la période de floraison, l'HE du myrte de Turquie de profil chimique: linalool/linalyl acétate/1,8-cinéole/géranylacétate/ α -terpinéol/ α -pinène et celle de la Grèce de profil chimique: linalyl acétate/limonène/ α -pinène/géranyl acétate se rapprochent de l'HE recueillie en juin. Le myrte d'Arabie Saoudite est aussi riche en linalool et 1,8-cinéole en plus de l' α -pinène. D'autre part, le myrte de Tunisie, d'Iran et de Corse sont de chémotype : α -pinène/1,8-cinéole et celui de la Yougoslavie et d'Italie sont de chémotype : 1,8-cinéole/ α -pinène alors que le myrte du Portugal et de la Croatie sont plus riches en myrtényl acétate et α -pinène. De ce fait, il paraît évident que l'origine du myrte influence nettement la composition chimique de l'HE synthétisée au niveau des feuilles durant la période de floraison. Toutefois, la présence de l' α -pinène, du 1,8-cinéole, du limonène et du linalool est prépondérante dans toutes les HE extraites des myrtes évoqués précédemment durant cette période mais à des teneurs différentes et ce quelque soit l'origine du myrte. La présence du linalyl acétate et du géranyl acétate semblent caractériser certaines de ces HE.

3.2. Composition chimique de l'huile essentielle extraite pendant la fructification

L'analyse de la composition chimique des HE extraites des feuilles de myrte collecté de 14 sites dans les régions de Ténès et Zeboudja en début de fructification (septembre 2012) a révélé la présence de 57 composants représentant une fraction $\geq 95\%$ de matières volatiles totales. Les composants sont répertoriés dans le tableau XIV dans l'ordre de leur élution sur la colonne DB-1, agencés en fonction du degré de corrélation obtenu après l'analyse de groupes basée sur la composition chimique des huiles essentielles. La fraction des monoterpènes est dominante dans toutes les HE analysées (feuilles : 93-97% et fruits : 84-95%), tandis que la fraction des sesquiterpènes varie de 1-2% dans les HE des feuilles et de 2-10% dans celles des fruits. Les hydrocarbures monoterpéniques étaient, en général, présents dans des pourcentages plus élevés (39-75%) que les monoterpènes oxygénés (19-55%).

L'analyse de groupes basée sur la composition chimique des HE des feuilles et des fruits a permis de les regrouper en principaux groupes hautement corrélés (Scorr ≥ 0.88 et Scorr ≥ 0.80 , respectivement), chacun subdivisé par la suite en sous groupes distincts (Figures 8 et 9, Tableau XIV). Pour les huiles essentielles des feuilles, le groupe I réuni

onze échantillons caractérisés par la prédominance de l' α -pinène (32-49%), le limonène (11-30%), le 1,8-cinéole (10-24%) et le linalool (2-20%). Bien que comprenant les mêmes composants principaux, les trois échantillons du groupe II ont montré des pourcentages plus faibles en α -pinène (23-28%), plus élevés en linalool (20-32%) et des teneurs intermédiaires en limonène (15-17%) et 1,8-cinéole (16-19%) (Figure 8, Tableau XIV). Bien que qualitativement similaires aux HE des feuilles, les HE des fruits diffèrent quantitativement (Figure 9, Tableau XIV). La composition des HE des fruits appartenant au groupe I est dominée par la présence de l' α -pinène (21-43%), le limonène (25-35%), le 1,8-cinéole (5-12%) et linalool (1-7%), tandis que les échantillons appartenant au groupe II ont montré des niveaux élevés d' α -pinène (34-43%) et de 1,8-cinéole (13-31%), inférieurs en limonène (9-13%) et des teneurs similaires en linalool (2-5%).

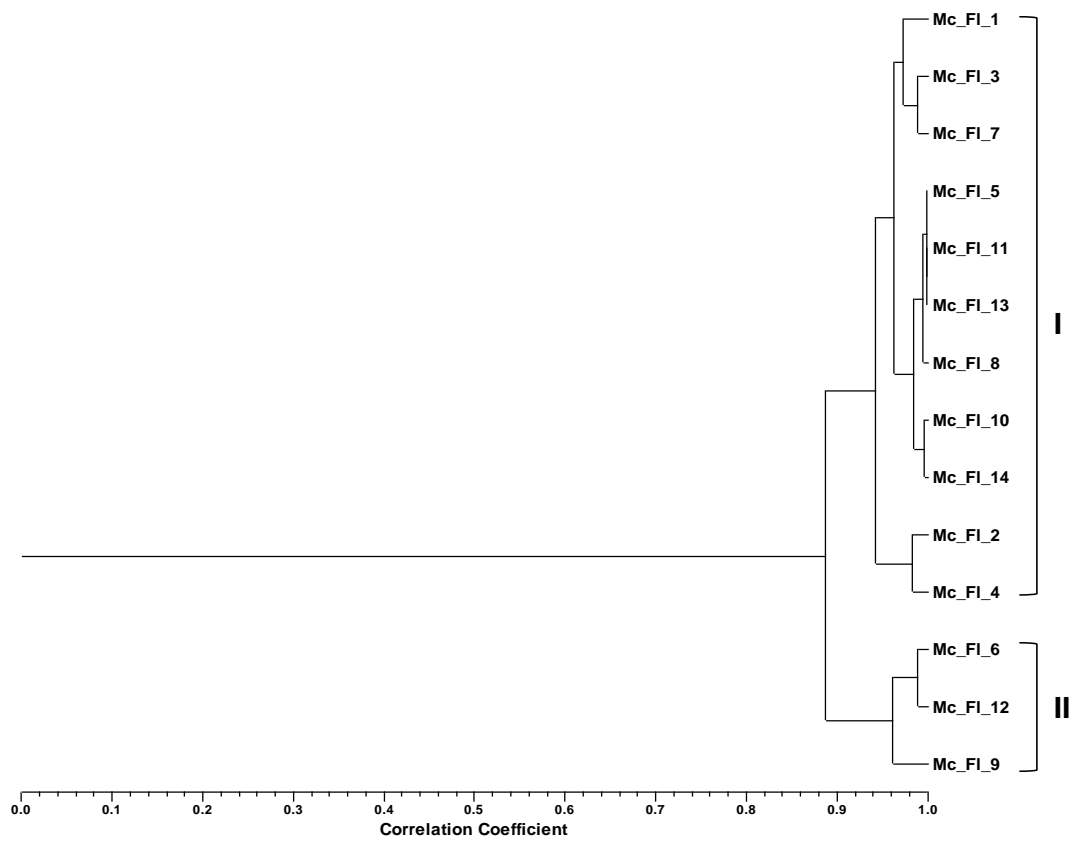


Figure 8: Dendrogramme obtenu par l'analyse de groupes de la composition en pourcentage des huiles essentielles isolées des feuilles de *Myrtus communis* L. basée sur la corrélation et en utilisant la méthode non pondérée paire-groupe avec la moyenne arithmétique (UPGMA).

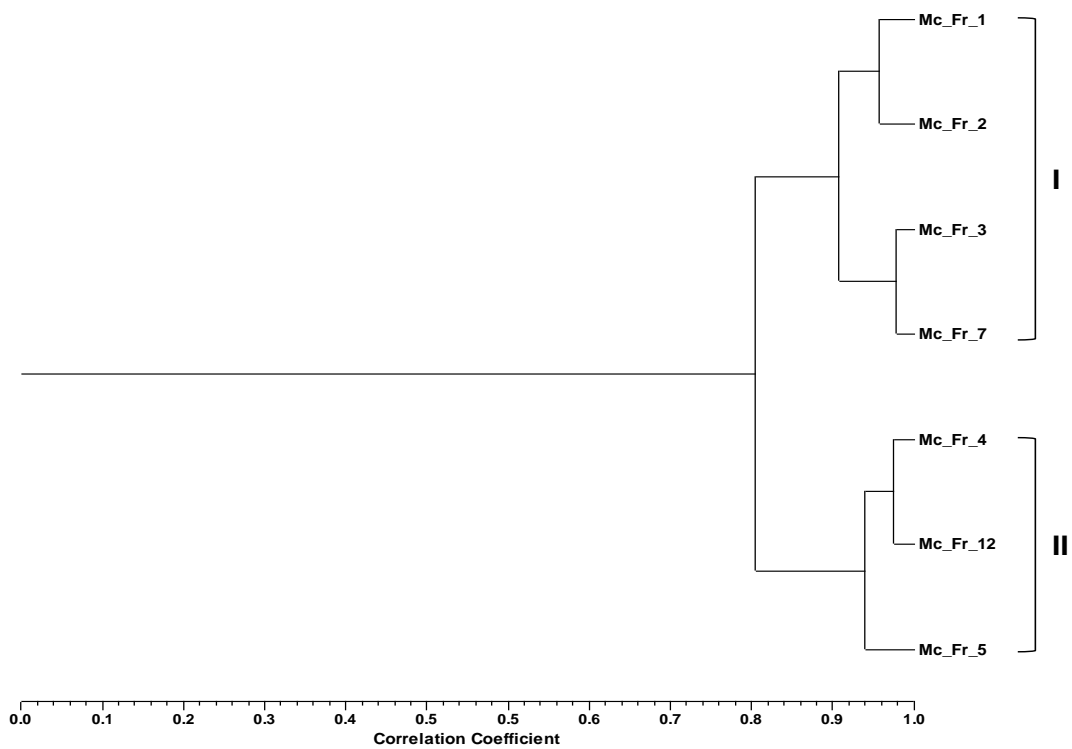


Figure 9: Dendrogramme obtenu par l'analyse de groupes de la composition en pourcentage des huiles essentielles isolées des fruits de *Myrtus communis* L. basée sur la corrélation et en utilisant la méthode non pondérée paire-groupe avec la moyenne arithmétique (UPGMA).

Des études antérieures réalisées sur la composition chimique des huiles essentielles des feuilles de myrte algérien (Tableau XII) ont également montré, la présence de l' α -pinène, du 1,8-cinéole, du limonène et du linalool comme principaux composants. Bien que le linalool a également été signalé dans certaines huiles essentielles, il n'a jamais été $\geq 15\%$ (Foudil-Cherif *et al.*, 2013 ; Bouzabata *et al.*, 2013b et 2015) suggérant ainsi l'existence d'un nouveau chémotype pour les HE des feuilles de myrte algérien non encore signalé jusqu'à présent. Des teneurs relativement élevées ($\geq 15\%$) en linalool ont également été rapportées pour les huiles de myrte de la Croatie (Jerkovic *et al.*, 2002); la Grèce (Chryssavgi *et al.*, 2008) et de la Tunisie (Aidi *et al.*, 2010 et 2011). Seul le myrte de Turquie affiche un chémotype semblable à celui du groupe II (linalool/ α -pinène/limonène/1,8-cinéole) avec absence de limonène comme composé majoritaire (Tableau XV).

Par ailleurs, les HE des fruits regroupées dans le groupe I ont montré des quantités inférieures d' α -pinène que les HE des feuilles, résultats concordant à ceux rapportés par Brada *et al.* (2012) et Foudil-Cherif *et al.* (2013). Cependant, les échantillons de fruits regroupés dans le groupe II ont montré des quantités similaires d' α -pinène à celles des HE des feuilles du groupe I (Tableau XIV). A l'opposé des HE des feuilles (Tableau XIV), les teneurs en limonène des HE des fruits du groupe I étaient inférieures à celles enregistrées pour le 1,8-cinéole. Foudil-Cherif *et al.* (2013) ont également rapporté des niveaux supérieurs en limonène dans les HE des fruits que dans celles des feuilles de *M. communis* L., dans lesquelles des traces ou même l'absence de limonène a été signalé. Néanmoins, dans cette étude, les HE des fruits du groupe II avaient des quantités plus élevées de 1,8-cinéole que le limonène (Tableau XIV).

L'absence du myrtényl acétate dans les HE des feuilles détectée dans ce travail a été précédemment rapporté pour des échantillons algériens (Berka-Zougali *et al.*, 2012; Bazzali *et al.*, 2012; Brada *et al.*, 2012; Foudil-Cherif *et al.*, 2013 et Bouzabata *et al.*, 2015). Néanmoins, ce composé est détecté dans certaines HE des fruits, bien qu'à l'état de traces à 1% (Tableau XIV). Le myrtényl acétate a été rapporté dans les HE de myrte d'Albanie (Asllani, 2000), Italie (Pistelli *et al.*, 2013), Maroc (Viuda-Martos *et al.*, 2011, Bouzabata *et al.*, 2013b), Turquie (Ozek *et al.*, 2000), Croatie (Jerkovic *et al.*, 2002), Grèce (Chryssavgi *et al.*, 2008) et Portugal (Pereira *et al.*, 2009). Pour ces trois derniers pays, le myrtényl acétate est encore le principal composant des HE de myrte. Le 3,3,5,5,8-hexaméthyl-7-oxabicyclo[4.3.0]non-1(6)-ène-2,4-dione a été trouvé dans les HE des

feuilles et des fruits, allant des traces à 1%. Ce composant a déjà été rapporté par Bouzabata *et al.* (2010 et 2013b) et Bazzali *et al.* (2012). Bien que Bouzabata *et al.* (2013b) aient rapporté que les HE du myrte contenant des teneurs élevées en linalool possédaient également des quantités élevées de cette diène, une telle corrélation n'a pas été observée dans cette étude (Tableau XIV).

3.3. Etude de la cinétique d'hydrodistillation

Les feuilles de myrte recueillies à Boucheral-Ouled Sidi Ali (à prédominance 1,8-cinéole) et à Bissa (à prédominance linalool) (Tableau XIV) ont été choisies pour évaluer l'effet de la durée de la distillation sur la composition chimique des HE, à savoir les quantités relatives d' α -pinène, de 1,8-cinéole, de limonène, d' α -terpinéol, de méthyl eugénol et de géranyl acétate (Figures 10 et 11). L'expérience a été fixée pour extraire par hydrodistillation toute l'huile essentielle à des intervalles de temps réguliers.

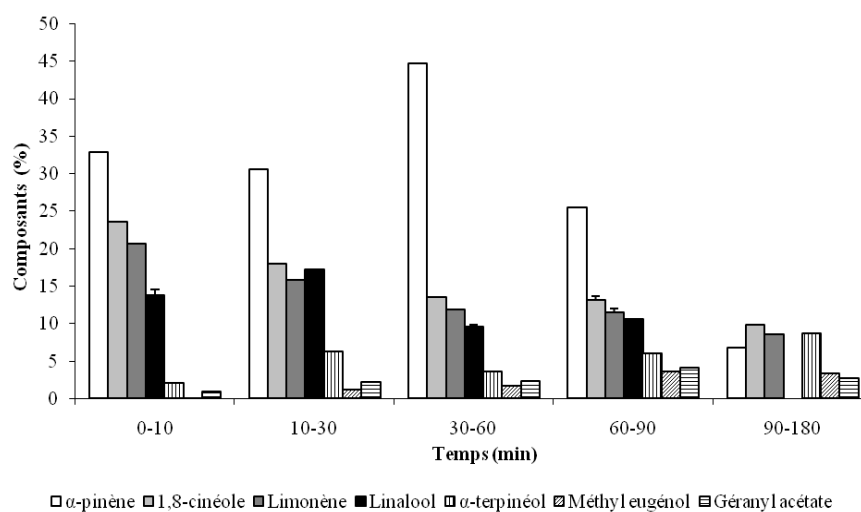


Figure 10 : Cinétique d'hydrodistillation des principaux composants de l'HE extraite des feuilles de *M. communis* récolté à Ouled Sidi Ali -Boucheral- (Algérie).

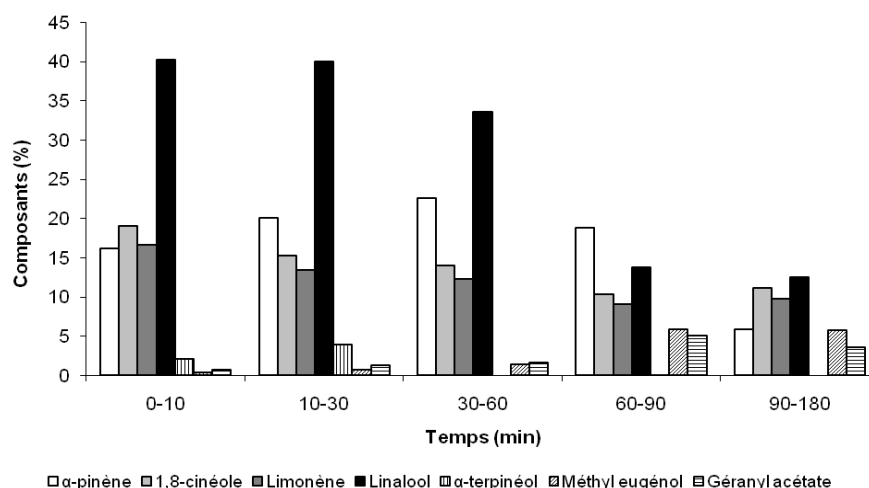


Figure 11 : Cinétique d'hydrodistillation des principaux composants de l'HE extraite des feuilles de *M. communis* récolté à Bissa (Algérie).

Les teneurs en 1,8-cinéole, limonène et linalool diminuent généralement au cours de l'hydrodistillation, dans les deux cas, alors que l' α -pinène a montré une augmentation de la fraction extraite durant les 30-60 minutes après le début de l'hydrodistillation (Figures 10 et 11). Les pourcentages du méthyl eugénol et du géranyl acétate ont montré une tendance à augmenter au cours de l'hydrodistillation dans les trois échantillons d'HE. L'augmentation du géranyl acétate et la diminution de l' α -pinène et du 1,8-cinéole au cours de l'hydrodistillation a également été signalée par Farah *et al.* (2006) pour l'HE de myrte marocain de chémotype : α -pinène/1,8-cinéole/ myrtényl acétate. Ce comportement peut différer selon la source de l'huile essentielle. Ganou (1993) a signalé une diminution de la quantité d' α -pinène au cours de l'hydrodistillation dans les HE des fruits de persil, alors que dans l'HE des fruits de coriandre, l'inverse a été observé. Le point d'ébullition, le poids moléculaire et la pression de vapeur sont des facteurs responsables du fractionnement des HE, néanmoins d'autres facteurs tels que la vitesse de distillation peuvent expliquer les différents résultats obtenus. Si ce facteur est relativement élevé, l'extraction de composés polaires est favorisée par rapport à celui des terpènes hydrocarbonés (Moghrani et Maachi, 2008).

Conclusion

Les principaux constituants de l'huile essentielle des feuilles de *M. communis* récolté de la forêt de Bissa au nord-ouest d'Algérie durant la période de floraison (juin) étaient le limonène, le linalool, l' α -pinène, le géranyl acétate, le linalyl acétate et le 1,8-cinéole. Les huiles essentielles isolées à partir des feuilles de *M. communis* recueilli dans les régions de Zeboudja et Ténès (Chlef) en fructification et appartenant au groupe II étaient principalement riches en linalool, α -pinène, limonène et 1,8-cinéole. Cependant, les HE des fruits, appartenant au groupe II, renferment des quantités plus élevées de 1,8-cinéole que de limonène. Ces résultats suggèrent l'existence de nouveaux chémotypes d'huile essentielle des feuilles de myrte algérien riche en limonène et/ou linalool selon le stade physiologique de la plante qui devraient être étudiés davantage. Par ailleurs, aucune corrélation entre la couleur des fruits et la composition chimique ne pourrait être dessinée. Néanmoins, lors de l'hydrodistillation, des teneurs relativement élevées en α -pinène, 1,8-cinéole, limonène et linalool peuvent être obtenues avec une courte durée d'extraction.

4. Identification des bactéries pathogènes d'origine clinique

4.1. *Staphylococcus aureus*

4.1.1. Aspect macroscopique

La culture de *S. aureus* obtenue sur milieu Chapman (Figure 12) se caractérise par une forme sphérique, lisse, luisante et bombée plus ou moins pigmentée en jaune or.



Figure 12 : Culture de *Staphylococcus aureus* sur milieu Chapman

4.1.2. Aspect microscopique

Après la coloration de gram, l'observation microscopique (Figure 13) montre que les *S. aureus* ont des formes arrondies de couleur violette, ils apparaissent isolées, groupées par deux ou en amas caractéristiques « en grappes de raisin », donc se sont des coques à Gram positif.

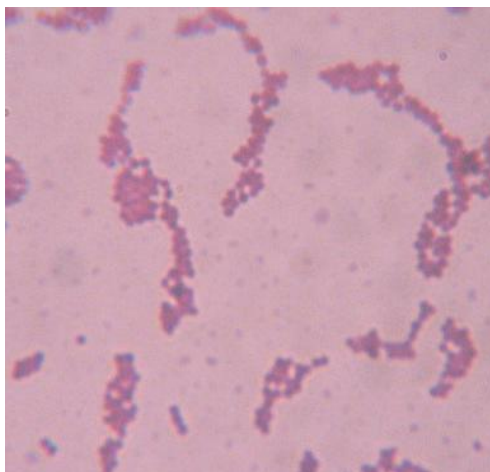


Figure 13 : Vue microscopique de *Staphylococcus aureus* après la coloration de Gram ($\times 100$)

4.1.3. Tests biochimiques

Le tableau ci-dessous présente les résultats des tests biochimiques permettant l'identification de *Staphylococcus aureus*. Le test positif de la catalase est à la base de l'identification des bactéries gram +. La coagulase libre (exoenzyme) est une enzyme libérée dans le milieu au cours de la culture par *S. aureus*. Sa mise en évidence permet seule, d'affirmer la présence de *S. aureus*. La mise en évidence pour un Staphylocoque d'une ADNase thermostable (après chauffage à 100°C) suffit à l'identification de l'espèce aureus (Joffin et Leyral, 2001).

Tableau XVI : Résultats des tests biochimiques de *S. aureus*

Tests biochimiques	Résultats
Catalase	+
Coagulase	+
ADNase	+

+ : positif

4.1.4. L'antibiogramme

Selon le test de l'antibiogramme (Tableau XVII, Figure 14), cette souche clinique de *S. aureus* est sensible aux trois antibiotiques : Amoxicilline + acide clavulanique (AMC) (20/10 µg), Amikacine (AN) (30 µg) et Céfazoline (CZ) (30 µg) mais présente une sensibilité intermédiaire à la pénicilline (P) (6 µg) et la Doxycycline (DO) (30 µg).

Tableau XVII : L'antibiogramme de *S. aureus*.

Antibiotiques	Diamètre des zones d'inhibition en (mm)	Résultats
AMC	22	S
AN	18	S
CZ	16	S
P	8	I
DO	8	I

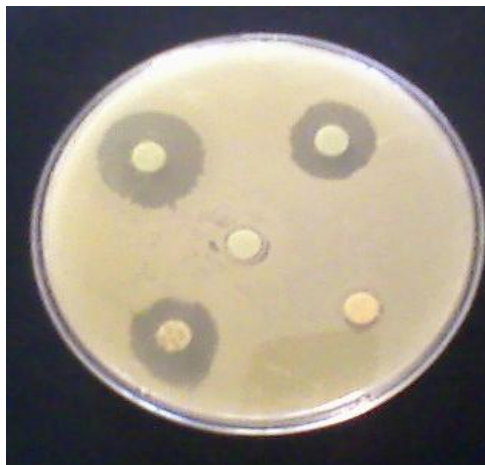


Figure 14 : L'antibiogramme de *S. aureus*

4.2. *Escherichia coli*

4.2.1. Aspect macroscopique

Les colonies obtenues sur gélose Hecktoen se caractérisent par un aspect visqueux, lisse, plat de couleur jaune saumon (Figure 15).

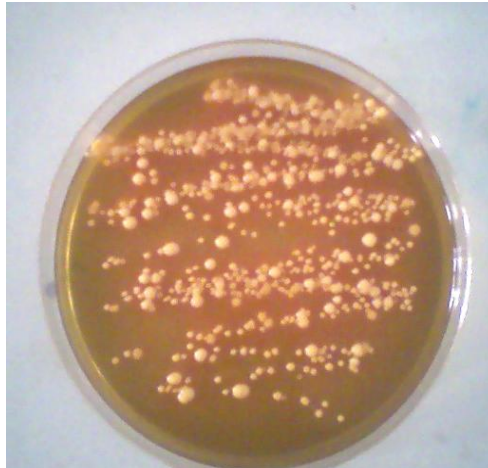


Figure 15 : Culture d'*Escherichia coli* sur milieu Hektoen

4.2.2. Aspect microscopique

L'observation microscopique de la coloration de Gram d'*E. coli* (Figure 16) montre la présence de formes coccobacilles colorées en rose, donc ce sont des bacilles Gram négatif.

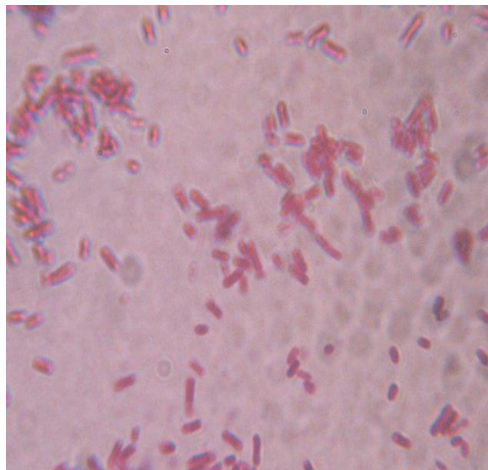


Figure 16 : Vue microscopique d'*Escherichia coli* après la coloration de Gram (x 100)

4.2.3. Tests biochimiques

Les tests biochimiques réalisés pour l'identification d'*E. coli* sont présentés par le tableau XVIII (caractères d'une entérobactérie : oxydase -, Glucose + et nitratase + et caractères d'*E. coli* : gaz en glucose, lactose +, ONPG +, H₂S -, mannitol +, indole +, citrate -, VP -, urée -, LDC variable (90% +), ODC variable, ADH -) (Clave, 2012).

Tableau XVIII : Résultats des tests biochimiques d'*E. coli*

Tests biochimiques		Résultats
Oxydase		-
ONPG		+
Nitrate réductase		+
	Lactose	+
	Saccharose	+
TSI	Glucose	+
	Gaz	+
	H ₂ S	-
Citrate de Simmons		-
Mannitol mobilité	Mannitol	+
	Mobilité	-
Urée-Indole	Uréase	-
	Indole	+
RM/VP	RM	+
	VP	-
ADH		-
LDC		+
ODC		+

4.2.4. L'antibiogramme

Cette souche d'*Escherichia coli* présente une sensibilité similaire à celle de *S. aureus* (Tableau XIX, Figure 17).

Tableau XIX : L'antibiogramme d'*E. coli*.

Antibiotiques	Diamètre des zones d'inhibition en (mm)	Résultats
AMC	20	S
AN	24	S
CZ	20	S
P	8	I
DO	7	I



Figure 17 : L'antibiogramme d'*E. coli*

4.3. *Salmonella* sp.

4.3.1. Aspect macroscopique

Sur gélose SS, *Salmonella* donne des colonies incolores de taille moyenne (2 à 3mm de diamètre) (Figure 18).



Figure 18 : Culture de *Salmonella* sp. sur gélose SS

4.3.2. Aspect microscopique

Après la coloration de Gram, l'observation microscopique montre la présence de formes bacilles colorées en rose, ce sont des bacilles Gram négatif (Figure 19).

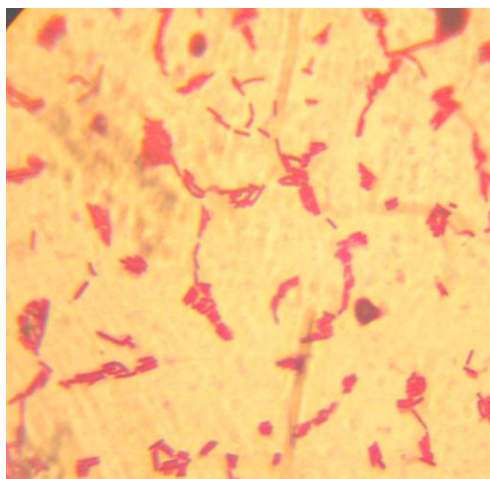


Figure 19 : Vue microscopique de *Salmonella* sp. après la coloration de Gram (x 100)

4.3.3. Tests biochimiques

Les résultats des tests biochimiques ci-dessous ont permis l'identification du genre *Salmonella* (Tableau XX). Les principaux caractères négatifs de ce genre sont : oxydase négative, ONPG hydrolase (β galactosidase), fermentation du lactose, urée, indole et réaction de Voges-Proskauer (VP). Les principaux caractères positifs sont : la réduction des nitrates en nitrites (possédant une nitrate réductase), la fermentation du glucose avec production de gaz (sauf *S. Typhi*), la libération d' H_2S , l'utilisation du citrate (*S. Typhi* et *S. Paratyphi*) et la fermentation du mannitol. Les salmonelles, grâce à leur ciliature péritriche, sont mobiles d'où le test positif de mobilité (Stiegler, 2003).

Tableau XX : Résultats des tests biochimiques de *Salmonella* sp.

Tests biochimiques		Résultats
Oxydase		-
ONPG		-
Nitrate réductase		+
TSI	Lactose	-
	Glucose	+
	Gaz	-
	H_2S	+
Citrate de Simmons		-
Mannitol mobilité	Mannitol	+
	Mobilité	+
Urée-Indole	Uréase	-

	Indole	-
RM/VP	RM	+
	VP	-

4.3.4. L'antibiogramme

L'antibiogramme réalisé (Tableau XXII, Figure 20) montre que cette souche est résistante à la pipéracilline 75µg, céfazoline 30µg et pénicilline 6µg) mais sensible à l'amikacine et la doxycycline).

Tableau XXI : L'antibiogramme de *Salmonella* sp.

Antibiotiques	diamètres des zones d'inhibition en (mm)	Résultats
PIP	0	R
AN	20	S
CZ	0	R
P	0	R
DO	16	S

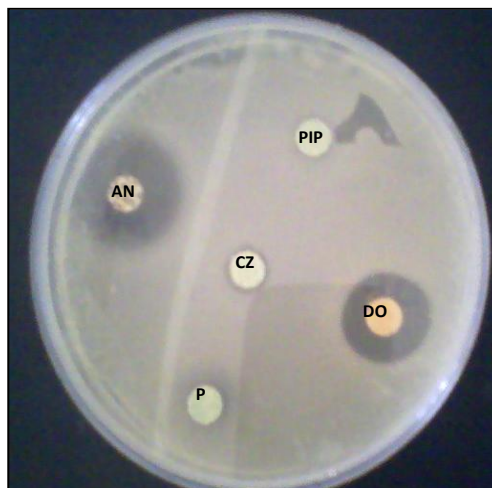


Figure 20 : L'antibiogramme de *Salmonella* sp.

4.4. *Proteus* sp.

4.4.1. Aspect macroscopique

Sur gélose Mac conkey, *Proteus* sp. donne des colonies incolores de taille moyenne (Figure 21).



Figure 21 : Culture de *Proteus* sp. sur milieu Hektoen

4.4.2. Aspect microscopique

L'observation microscopique après la coloration de Gram (Figure 22) montre que *Proteus* forme des bacilles colorés en rose, ce sont des bacilles Gram négatif.



Figure 22 : Vue microscopique de *Proteus* sp. après la coloration de Gram (x 100)

4.4.3. Tests biochimiques

Les résultats des tests biochimiques ci-dessous ont permis d'identifier le genre *Proteus* (Abbott et al., 2008).

Tableau XXII : Résultats des tests biochimiques de *Proteus* sp.

Tests biochimiques	Résultats
Oxydase	-
ONPG	-
Nitrate réductase	+
Uréase	+
TDA	+

4.4.4. L'antibiogramme

D'après les résultats de l'antibiogramme (Tableau XXIII, Figure 23), cette souche de *Proteus* est résistante à la doxycycline (30µg) et la pénicilline (6µg), modérément sensible à la pipéracilline (PIP,75 µg) et la céfazoline (30 µg) et sensible à l'amikacine (30 µg).

Tableau XXIII : L'antibiogramme de *Proteus* sp.

Antibiotiques	diamètres des zones d'inhibition en (mm)	Résultats
PIP	10	I
AN	24	S
CZ	14	I
P	0	R
DO	0	R



Figure 23 : L'antibiogramme de *Proteus* sp.

4.5. *Klebsiella* sp.

4.5.1. Aspect macroscopique

Klebsiella sur milieu Mac conkey donne des colonies rondes de 3 à 4 mm de diamètre, bombées, muqueuses et brillantes (Figure 24).



Figure 24 : Culture de *Klebsiella* sp. sur gélose Mac Conkey

4.5.2. Aspect microscopique

L'observation microscopique indique que les *Klebsiella* sont des bacilles Gram négatif (Figure 25).

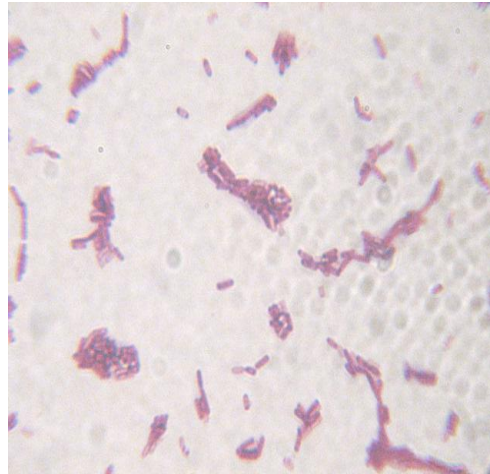


Figure 25 : Vue microscopique de *Klebsiella* sp. après la coloration de Gram (x 100)

4.5.3. Tests biochimiques

Les différents tests biochimiques permettant d'identifier le genre *Klebsiella* sont illustrés par le tableau XXIV (Holt *et al.*, 2000).

Tableau XXIV : Résultats des tests biochimiques de *Klebsiella* sp.

Teste biochimiques		Résultats
Oxydase		-
ONPG		+
Nitrate réductase		+
	Lactose	+
	Saccharose	+
TSI	Glucose	+
	Gaz	+
	H ₂ S	-
Citrate de Simmons		+
Mammite mobilité	Mannitol	+
	Mobilité	-
Urée-indole	Uréase	+
	Indole	+
RM/VP	RM	-
	VP	+

4.5.4. L'antibiogramme

D'après les résultats de l'antibiogramme (Tableau XXV, Figure 26), cette souche de *Klebsiella* est résistante à la doxycycline (30µg) et la pénicilline (6µg), modérément sensible à l'amoxicilline + acide clavulanique (20/10µg) et la céfazoline (30 µg) et sensible à l'amikacine (30 µg).

Tableau XXV : L'antibiogramme de *Klebsiella* sp.

Antibiotiques	diamètres des zones d'inhibition en (mm)	Résultats
AMC	14	I
AN	22	S
CZ	8	I
P	0	R
DO	0	R

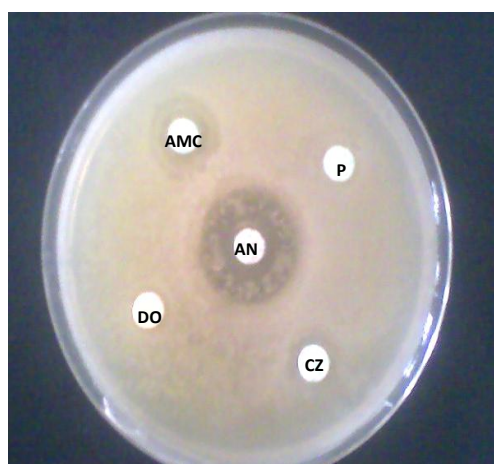


Figure 26 : L'antibiogramme de *Klebsiella* sp.

5. Activité antibactérienne de l'huile essentielle des feuilles de *M. communis* L. sur les souches bactériennes pathogènes d'origine clinique

5.1. Méthode de diffusion en puits

L'effet dose d'huile essentielle sur les différentes souches bactériennes testées est hautement significatif ($p < 0.01$). Les bactéries Gram - testées (*Salmonella* sp., *Proteus* sp. et *Klebsiella* sp.) présentent une sensibilité croissante avec l'augmentation du volume d'HE testé (Figure 27). *E. coli* est plus résistante (Figure 28) et nécessite l'addition de volumes supérieurs (5 à 20 μL). *S. aureus*, bactérie Gram+, s'est montré la plus sensible (36,67 mm/8 μL vs 16,67/20 μL).

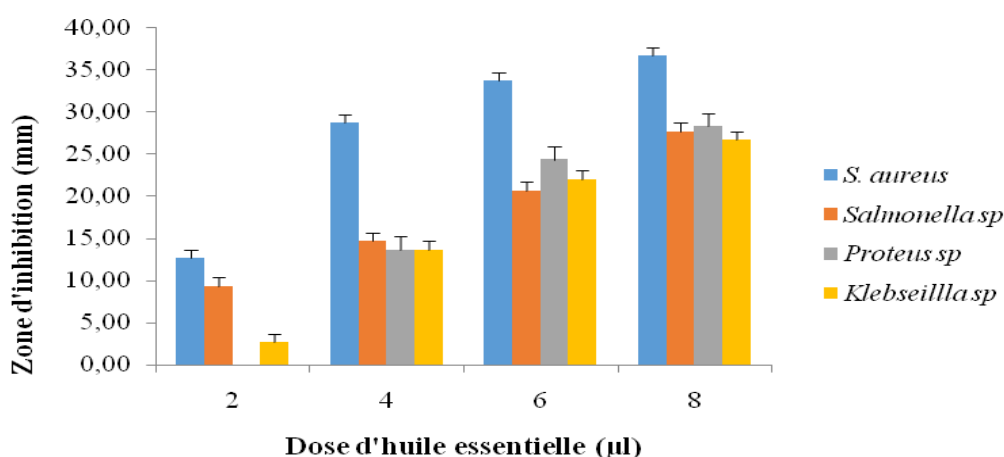


Figure 27 : Effet de l'huile essentielle des feuilles de *M. communis* extraite durant la floraison sur la croissance des souches bactériennes cliniques par la méthode de diffusion en puits.

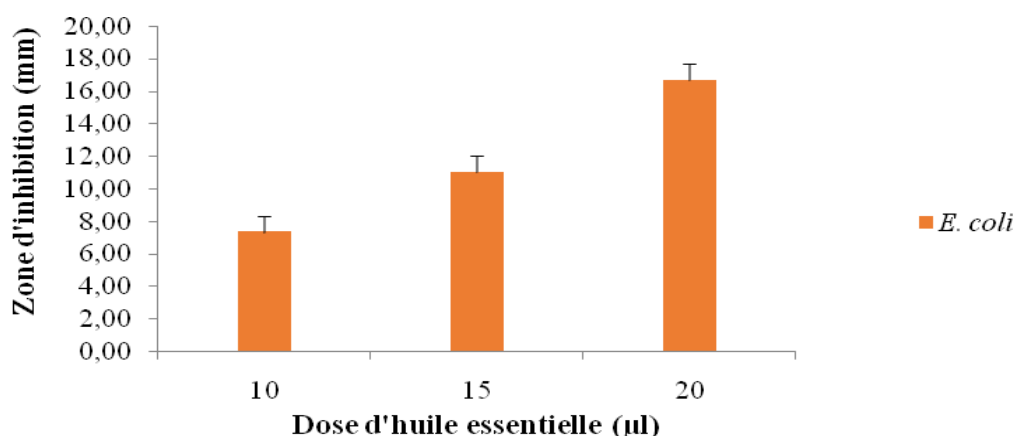


Figure 28 : Effet de l'huile essentielle des feuilles de *M. communis* extraite durant la floraison sur la croissance d' *E. coli* d'origine clinique par la méthode de diffusion en puits.

Pour des doses d'huile essentielle testées (2-8 µl/puit), les zones d'inhibition mesurées étaient de (12,67-36,67 mm) pour *S. aureus*, *Salmonella* sp. (9,33-27,67 mm) et (2,67-26,67 mm) pour *Klebsiella* sp. alors qu'aucune inhibition n'a été observée pour *Proteus* sp. et *E. coli* aux plus petites doses (2 µl et 5 µl/puit, respectivement). Les zones d'inhibition signalées pour ces derniers étaient de (13,67-28,33 mm avec des doses allant de 4 à 8 µl/puit) pour *Proteus* sp. et (7,33-16,67 mm avec des doses allant de 10-20 µl/puit) pour *E. coli* (Figure 29).

Des résultats comparables ont été rapportés par Cherrat *et al.* (2014). A une dose de 20 µl d'HE/disque (HE dissoute dans 3% de l'éthanol absolu), la croissance de *S. aureus* a été fortement inhibée (24.2 mm) comparativement à celle d'*E. coli* (7.4 -10.8 mm) et de *Salmonella senftenberg* (11.7 mm). Cette HE extraite des feuilles de myrte marocain en juin était riche en myrtényl acétate (49,27%), 1,8-cinéole (26,93%), α-pinène (16,52%) et méthyl eugénol (4,84%). Ben Hsouna *et al.* (2014) confirment ces observations lors de l'application d'HE des feuilles de myrte tunisien récolté en mai à raison de 50 µl/puit à partir d'une solution stock de 50mg/mL. *Staphylococcus aureus* était le plus sensible (ZI = 22-25 mm et CMI = 0,078-0,625 mg/mL), suivi de *Salmonella enteritidis* (isolat alimentaire) (ZI = 20 mm et CMI = 1,25 mg/mL), d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* (ZI = 16mm et CMI = 2,5mg/mL). Les principaux composants de cette HE étaient le myrtényl acétate (20,75%), le 1,8-cinéole (16,55%), l'α-pinène (15,59%), le linalool (13,30%) et le limonène (8,94%).

De même Zomorodian *et al.* (2013) rapportent pour *S. aureus* (résistant et sensible à la méthicilline) des CMI₉₀ et CMB de l'ordre de 4-5,65 µl/mL et 5,65-8 µl/mL, respectivement, pour *E. coli* (3ème génération sensible et résistante à la céphalosporine) 25,4-27,85 µl/mL, respectivement et *Salmonella enterica* subsp. *enterica* une CMI₉₀ et CMB de 64 µl/mL d'HE des feuilles de myrte iranien récolté avant la floraison (mai). Mais aucune différence significative dans la sensibilité à l'huile essentielle n'a été observée entre les bactéries résistantes aux antibiotiques et celles sensibles qu'elles soient Gram positif ou Gram négatif. Les composants majoritaires présents dans l'HE extraite étaient l' α -pinène (39,2 %), 1,8-cinéole (22 %) et linalool (18,4 %) aussi bien que l'HE testée dans cet essai (forêt de Bissa, juin). Salvagnini *et al.* (2008) signalent par ailleurs la résistance d'*E. coli* à la dose de 20 µl/disque d'HE des feuilles du myrte de Brésil cueilli en mars face à l'inhibition appréciable de *S. aureus* (15 mm).

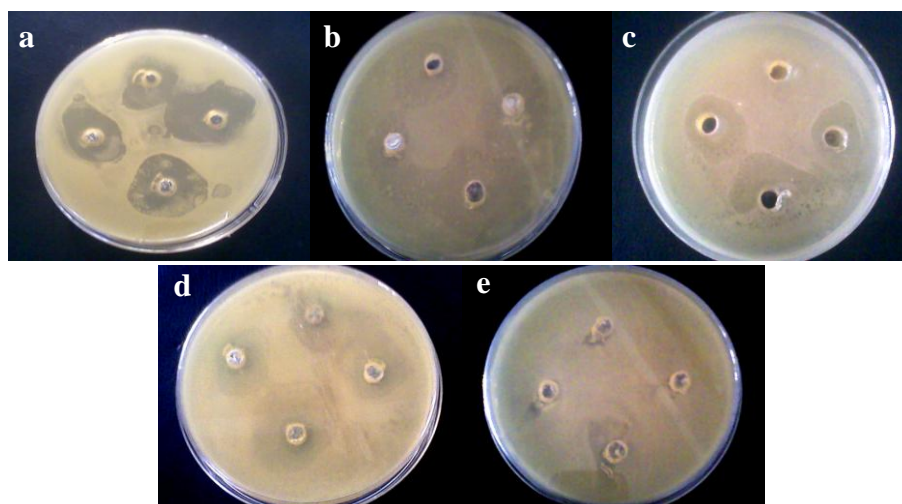


Figure 29 : Aromatogrammes des différentes souches bactériennes pathogènes testées.

a: *S. aureus*, **b:** *Salmonella* sp., **c:** *Proteus* sp., **d:** *Klebsiella* sp., **e:** *E. coli*

Cependant, une sensibilité égale de *S. aureus* (non résistant à la méthicilline) et d'*E. coli* (15 mm) a été signalée par Akin *et al.* (2010) après application de 10 µl/disque d'HE extraite en Octobre, des feuilles du myrte poussant au nord de Chypre riche en linalool (12,65%) et α-terpineol (7,57%). Yadegarinia *et al.* (2006) ont également observé une sensibilité comparable d'*E. coli* et de *S. aureus* (13 et 10 mm) suite à l'application de 5 µl/disque d'HE de myrte iranien récolté durant la période d'octobre/novembre présentant une richesse en α-pinène (29,1%), limonène (21,5%), 1,8-cinéole (17,9%) et linalool (10,4%); composants majoritaires également présents dans l'HE de floraison mais avec des teneurs variables. Des résultats similaires ont été obtenus avec l'HE des feuilles de myrte algérien en fructification avec *S. aureus* (30 µl/mL), *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* et *Salmonella enterica* (30 µl/mL) (Berka-Zougali *et al.*, 2012). L'α-pinène et le 1.8-cinéole étaient présents en de fortes teneurs 44,62% et 25,46% contrairement à l'HE testée qui était moins riche en α-pinène (10,7%) et 1,8-cinéole (6,6%). Pour l'espèce *Proteus vulgaris*, Aboutabl *et al.* (2011) signalent une CMI >200 µl/mL après exposition à l'HE des feuilles de myrte d'Egypte cueilli en mai. Cette HE renfermait principalement 1,8-cinéole 27,2%, α-pinene 25,5%, Linalool 11,8% et p-menth-1-enol 7% contre une CMI de 50 µl/mL pour l'HE des fruits qui contenait principalement du menthyl acétate 13,4%, *trans*-caryophyllène 10,5%, 1,8-cinéole 9,6% et p-menth-1-énol 9,2% confirmant la sensibilité de ce genre à la présence d'HE de myrte. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par la littérature avançant que les huiles essentielles sont légèrement plus actives contre les bactéries Gram + que celles à Gram- (Lambert *et al.*, 2001 et Farah *et al.*, 2008). La grande sensibilité de *S. aureus* (bactérie Gram +) confirme l'hypothèse de la variation de la

sensibilité des bactéries en fonction de la structure de leur paroi, les bactéries Gram+ sont constituées d'une couche épaisse de peptidoglycanes (sucres aminés), qui les rendent plus résistantes à la dessiccation mais moins résistantes aux antibiotiques, ce peptidoglycane est très épais et associé à des protéines pariétales exposées et à des structures polyosidiques (acides lipoteichoïques, acides teichoïques...). Par contre chez les bactéries à Gram-, le peptidoglycane est très fin et associé à une enveloppe externe complexe définissant un espace périplasmique. Cette membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique hydrophobe constituée de phospholipides, de protéines (porines...) et lipopolysaccharides (LPS). L'espace périplasmique est rempli d'enzymes qui dégradent les substances complexes pour qu'elles puissent traverser la membrane cytoplasmique et inactivent les produits chimiques toxiques (antibiotiques, métaux lourds...). La résistance des bactéries à Gram- aux glycopeptides et aux macrolides est due à l'incapacité de ces molécules de franchir la membrane externe (Berche, 2003).

5.2. Méthode sur milieu liquide ou par contact direct

5.2.1. *Staphylococcus aureus*

La cinétique de croissance microbienne de *S. aureus* en présence de l'HE de *M. communis* extraite durant la floraison (juin) à différentes doses est illustrée par la figure 30.

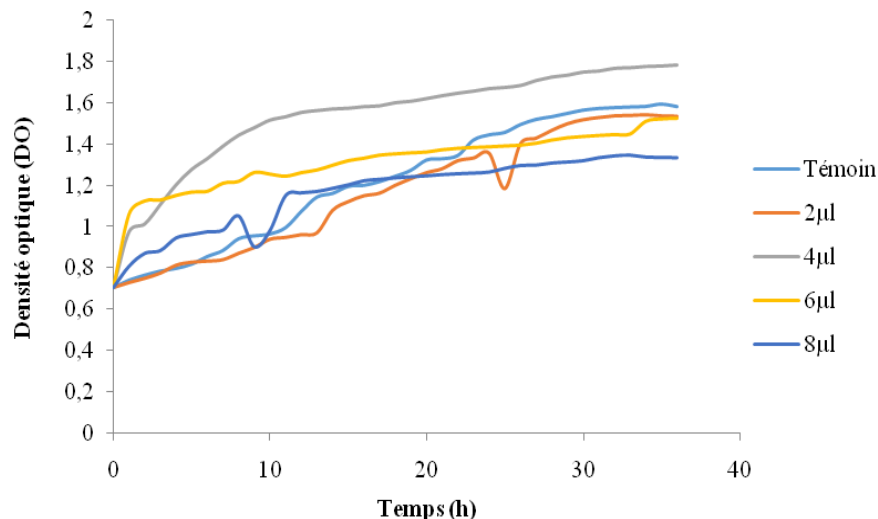


Figure 30 : Cinétique de croissance microbienne de *S. aureus* en présence de l'huile essentielle de *M. communis* L. à différentes doses.

D'après les courbes de croissance illustrées ci-dessus, la croissance de *S. aureus* ne paraît nullement être affectée par la présence d'HE de *M. communis* à la plus faible dose de 2µL. L'effet bactériostatique de la dose (6µL) se manifeste après 2h d'incubation et devient apparent après 23h de culture (DO = 1,384 vs 1,422 pour le témoin). Avec l'augmentation de la dose (8µL) et après un temps similaire de croissance, l'inhibition est plus remarquable (DO = 1,262 vs 1,422 et 1,333 pour le témoin et la dose 2µL, respectivement). Par contre, la dose de 4µL semble avoir un effet stimulateur de la croissance de *S. aureus* pendant les quatre premières heures du développement de *S aureus*. La dose de 8µL inhibe de manière apparente la croissance de cette bactérie durant les 20 dernières heures d'incubation.

5.2.2. *Salmonella* sp.

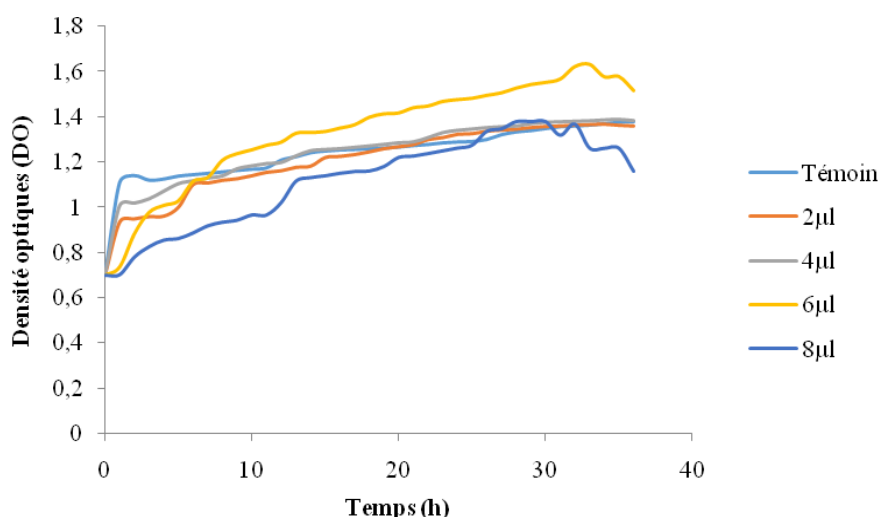


Figure 31 : Cinétique de croissance microbienne de *Salmonella* sp. en présence d'huile essentielle de *Myrtus communis* L. à doses croissantes.

La figure 31 ci-dessus montre que l'action bactériostatique de l'huile essentielle de *M. communis* n'est pas notable en présence de 2 et 4 µL sur la croissance de *Salmonella* sp.-et la croissance reste comparable à celle de la culture témoin. Par contre, la dose de 8 µL induit une chute du développement dès les premières heures de culture et conduit à la mort cellulaire durant les six dernières heures de culture (DO = 1,161 vs 1,377, 1,359 et 1,386 pour le témoin et les doses de 2 µL et 4 µL). La dose de 6 µl paraît stimuler la croissance de *Salmonella* sp. mais induit la mort cellulaire durant les 3 dernières heures de culture.

5.2.3. *Proteus* sp.

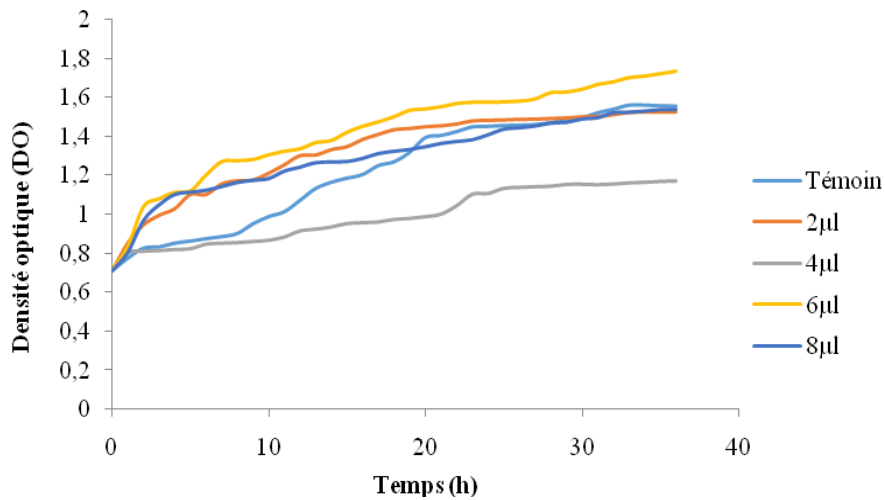


Figure 32 : Cinétique de croissance microbienne de *Proteus* sp. en présence de l'huile essentielle de *M. communis* à différentes doses.

A partir des courbes de croissance illustrées par la figure 32, on remarque que l'allure de la croissance en présence de 2, 6 et 8 µL d'huile essentielle suit la même tendance et reste supérieure à celle du témoin. Un développement important de ces trois cultures est observé dès les premières heures d'incubation par rapport à la culture témoin. La culture additionnée de 4 µL d'HE présente en l'occurrence une faible croissance (inhibition nette) par rapport aux autres cultures (DO = 1,169 vs 1,557, 1,523, 1,536 pour respectivement le témoin et les doses de 2 et 8 µL).

5.2.4. *Klebsiella* sp.

Concernant cette bactérie pathogène, un déclin de la croissance de la culture témoin est remarqué après 34 heures d'incubation probablement dû à l'épuisement du milieu de culture (DO = 0,803 en fin d'incubation). Après 10h de culture, la croissance se maintient en phase stationnaire pour les cultures additionnées de 2 et 4 µL d'HE avec un taux de croissance plus faible que celui noté pour le témoin. A partir de 22 h d'incubation, la culture en présence de 8 µL d'HE montre une chute remarquable de la croissance de *Klebsiella* sp. s'achevant par la mort cellulaire (DO = 1,041 vs 1,267 et 1,222 pour les doses 2 et 4 µL, respectivement). Tout comme *Salmonella* sp. et *Proteus* sp., la croissance de *Klebsiella* sp. semble être stimulée en présence de 6 µl d'HE de Myrte (DO = 1,472 en fin d'incubation).

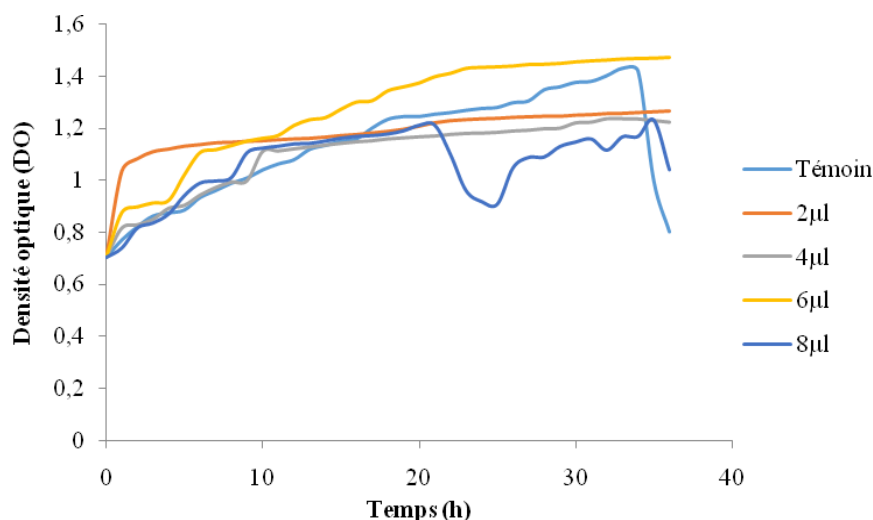


Figure 33 : Cinétique de croissance microbienne de *Klebsiella* sp. en présence de l'huile essentielle de *Myrtus communis* L. à doses croissantes.

6. Activité antibactérienne de l'huile essentielle des feuilles de *M. communis* L. sur les souches bactériennes pathogènes de référence

Des zones variables d'inhibition de la croissance microbienne par différentes dilutions de l'huile essentielle de *M. communis* L. ont été notées. Les CMI et CMB de l'HE des feuilles contre les bactéries pathogènes de référence testées sont présentées dans le tableau XXVI. L'huile essentielle de *M. communis* a un effet inhibiteur sur la croissance de toutes les bactéries pathogènes testées sauf *P. aeruginosa*, montrant une résistance à toutes les doses appliquées. Les deux souches de *P. mirabilis* sont les plus sensibles, avec une CMI de 0.12 µg/mL et une CMB de 16 µg/mL pour la souche de référence. L'application de la dose de 64 µg/mL s'est avérée modérément active contre *S. aureus* et *K. pneumoniae*, avec des zones d'inhibition de 12 et 10 mm et une CMI 4 µg/mL. Ce résultat confirme ce qui est généralement rapporté dans la littérature, le fait que les bactéries Gram négatif sont toujours plus résistantes au traitement que les bactéries à Gram positif. Plusieurs auteurs ont signalé la résistance de cette espèce à l'HE du myrte de Corse (Rossi *et al.*, 2007) et celle du myrte iranien (Rasooli *et al.*, 2002). En outre, Zomorodian *et al.* (2013) n'observent aucune différence significative dans la sensibilité à l'huile essentielle du myrte iranien pour cette espèce entre bactéries multi-résistantes et celles sensibles aux antibiotiques et rapportent une CMI₉₀ égale à la CMB de 14.25 µl/mL. L'effet inhibiteur et bactéricide contre de *P. aeruginosa* par l'HE du myrte d'Iran a été également rapporté par Owlia *et al.* (2009 ; 2010) (CMI = CMB = 64 µg/mL). 1/2 et 1/4 de cette CMI ont significativement réduit les facteurs de virulence testés (production d'alginate, formation de

biofilm, motilité et adhésion) alors qu'au 1/8 de la CMI, la motilité et l'adhésion n'ont pas été significativement affectées.

Akin *et al.* (2010) signalent aussi la résistance de *P. aeruginosa* à l'HE extraite des feuilles de myrte de Chypre avec une CMI >1% contre 0.5% notée pour les bactéries Gram positives. En l'occurrence, dans l'étude de Ben Hsouna *et al.* (2014), *Klebsiella pneumoniae* paraît plus résistante (CMI de 2.5mg/mL vs 1.25mg/mL pour *P. aeruginosa*). Cependant, l'HE du myrte de Tunisie a affiché des activités antibactériennes significatives contre les huit bactéries Gram positives testées, comparativement aux bactéries Gram négatives, avec des valeurs de CMI de 0,078-1,25 et 1,25-2,5 mg/mL, respectivement. Cette variabilité des résultats peut être expliquée par la variabilité de la composition chimique des HE extraites de *M. communis* de différentes origines à différents stades physiologiques de la plante.

Par ailleurs, l'HE extraite durant la fructification n'a eu aucune activité antibactérienne sur *Pseudomonas aeruginosa* DSM 939, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Haemophilus influenza* DSM 9999 et *Streptococcus pneumoniae* TIGR 4.

La forte activité antibactérienne de l'HE du myrte contre les microorganismes testés pourrait être attribuée à la présence de pourcentage élevé de monoterpènes (40,5%) tels que l' α -pinène et le limonène bien connus pour leurs potentiels antibactériens (Rasooli *et al.*, 2002). En effet, les effets antibactériens de l' α -pinène, le β -pinène, le limonène, le linalool, le β -caryophyllène et le 1,8-cinéole de la croissance d'*E. coli* et uniquement du limonène, du linalool et du 1,8-cinéole contre *K. pneumoniae* ont été démontrés par contre *P. aeruginosa* s'est avéré résistant à tous ces composants (Sonboli *et al.*, 2005 et 2006). Du fait que l'HE est un mélange complexe, il serait donc difficile d'attribuer cet effet inhibiteur à un composant particulier ou unique de l'HE et il serait judicieux de prendre en compte les effets de synergie et la diversité des constituants majeurs et mineurs présents pour expliquer leur activité biologique. Les mécanismes d'action des HE ont été élucidés par un certain nombre de chercheurs. Une perméabilisation des membranes est associée à la perte d'ions et la réduction du potentiel membranaire, l'effondrement de la pompe à protons et l'épuisement du pool d'ATP (Freeman et Carel, 2006 ; Mahmoud *et al.*, 2004 ; Caillet *et al.*, 2007; Bakkali *et al.*, 2008). Les huiles essentielles peuvent coaguler le cytoplasme (Gustafson *et al.*, 1998) et endommager les protéines et les lipides (Ultee *et al.*, 2002; Burt, 2004). Les dommages à la paroi et la membrane cellulaire peuvent conduire à la fuite de macromolécules et à la lyse cellulaire (Juven *et al.*, 1994; Gustafson *et al.*, 1998; Cox *et al.*, 2000; Lambert *et al.*, 2001; Oussalah *et al.*, 2006).

7. Effet antifongique de l'huile essentielle de *Myrtus communis* L. extraite durant la floraison

7.1. Evaluation de la croissance mycélienne

Les résultats de l'essai antifongique sont illustrés par la figure 34. La concentration de l'huile essentielle a un effet significatif ($P < 0.05$) sur la croissance mycélienne qui reste variable en fonction du champignon. *Alternaria solani* montre le plus de sensibilité à toutes les doses testées. *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus ochraceus* ont des comportements comparables en présence de l'HE contrairement à *Aschochyta rabiei* qui se révèle moins sensible (Figure 34). La dose de 100 μL se révèle la plus inhibitrice pour tous les champignons phytopathogènes testés.

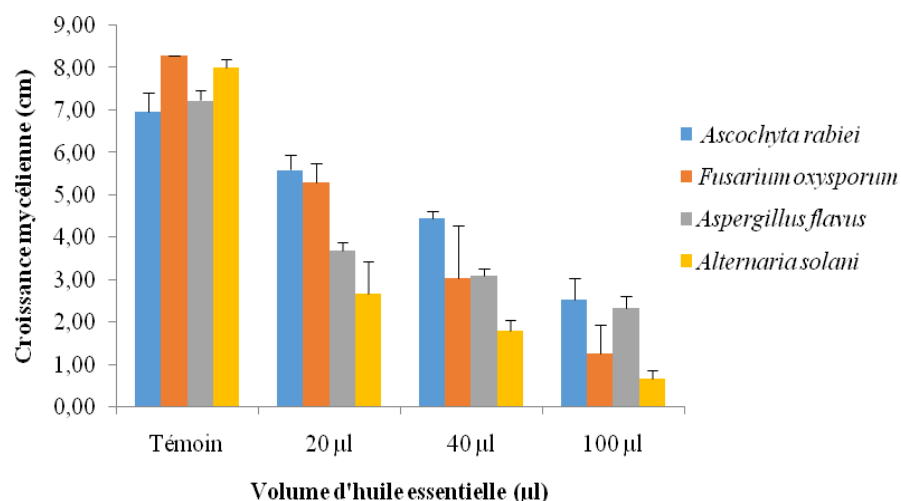


Figure 34 : Effet de l'huile essentielle de *Myrtus communis* L. sur la croissance mycélienne des quatre champignons phytopathogènes testés.

7.2. Evaluation du taux d'inhibition

L'effet inhibiteur d'huile essentielle de *M. communis* L. extraite durant la floraison sur les quatre champignons phytopathogènes testés est représenté par les figures 35 et 36.

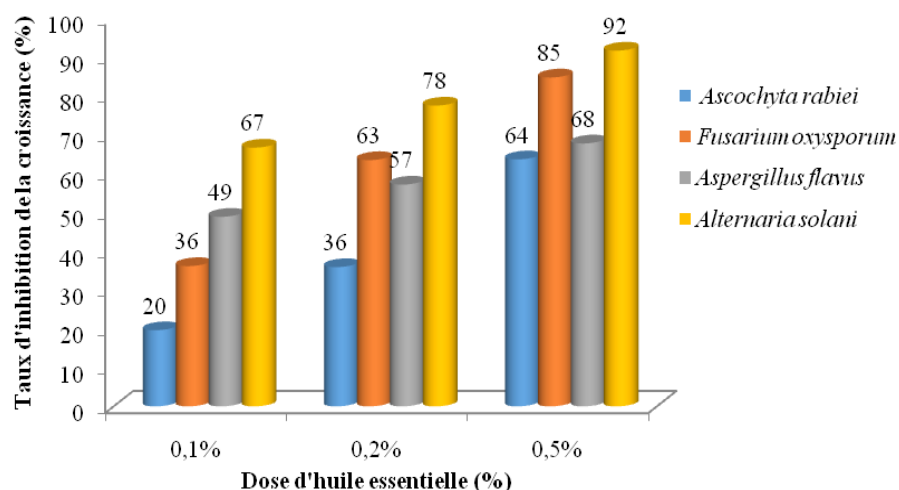
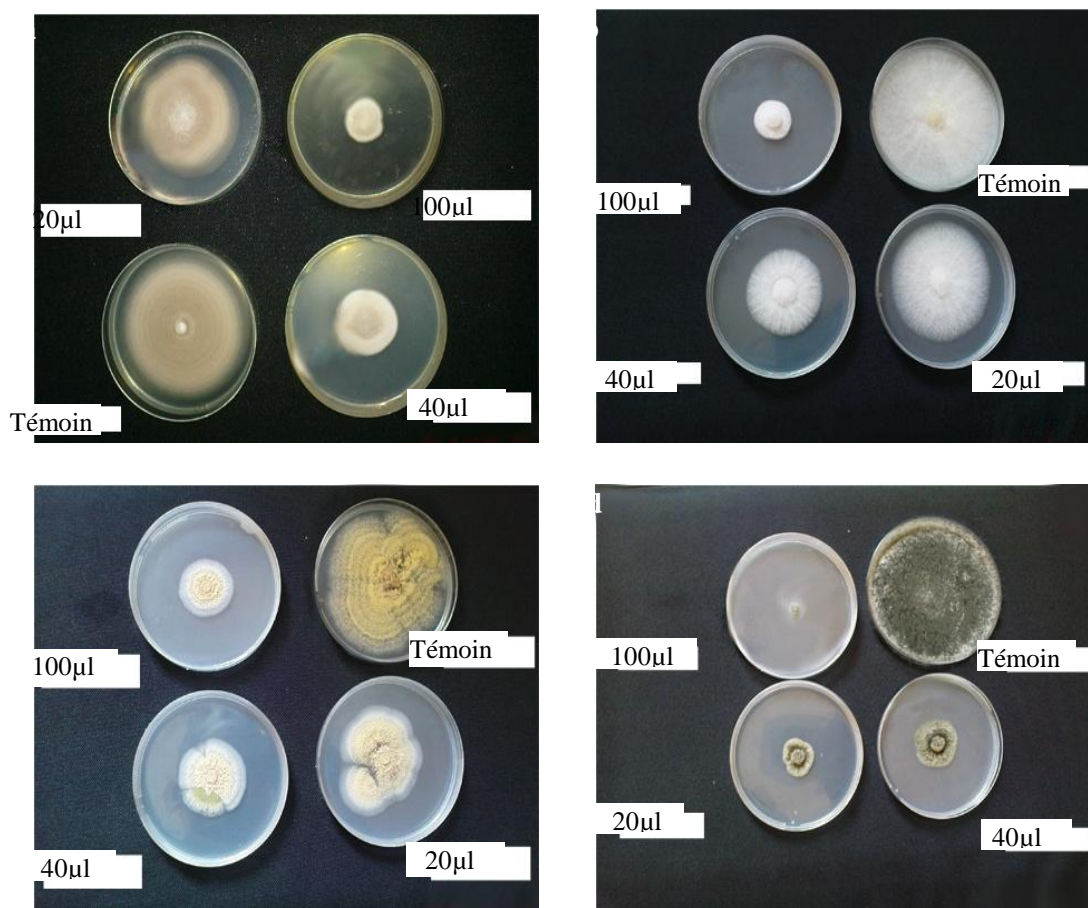


Figure 35 : Variation du taux d'inhibition moyen en fonction de la concentration de l'huile essentielle.

Les résultats obtenus montrent que le taux d'inhibition de la croissance fongique augmente avec l'augmentation de la dose d'HE appliquée. A la dose maximale de 0,5%, le taux d'inhibition le plus marqué est noté pour *Alternaria solani* (92%) suivie de *Fusarium oxysporum* (85%). *Ascochyta rabiei* (64%) et *Aspergillus ochraceus* (68%) montrent des taux d'inhibition moyens comparables.



a: *Ascochyta rabiei*, b: *Fusarium oxysporum*, c: *Aspergillus ochraceus*, d: *Alternaria solani*.

Figure 36 : Inhibition de la croissance mycélienne des quatre champignons phytopathogènes testés par les différentes doses d'huile essentielle.

Par ailleurs, l'HE extraite durant la fructification montrait une faible activité inhibitrice contre la croissance de la levure *Candida albicans* avec des zones d'inhibition allant de 7-9mm (3 µl d'HE/disque) contre 16,33 ± 1,04 mm notée pour l'antibiotique-antifongique (Amphotéricin B à raison de 10µg/disque). Berka-Zougali *et al.* (2012) confirment ce résultat pour l'HE des feuilles du myrte d'Algérie extraite durant la fructification (mi-novembre) en signalant des CMI de l'ordre de 50 et 30µl/mL (à partir d'une solution stock de 100 mg/mL) pour *C. albicans* et *A. ochraceus*, respectivement. Les monoterpènes hydrocarbonés étaient dominants de cette HE (51,36%) et étaient principalement représentés par l' α -pinène (44,62%) suivi par le limonène (3,71%). Les monoterpènes oxygénés étaient présents à raison de 37,47% avec le 1,8-cinéole comme composant majeur (25,46%). Comparativement aux dermatophytes testés, Bouzabata *et al.* (2015) notent des effets fongistatique et fongicide faibles de l'HE extraite durant la floraison (myrte récolté du Nord-est au Nord-ouest algériens) contre *Candida albicans* (CMI=CML= 2.5mg/mL) ainsi que pour *Aspergillus niger* et *Aspergillus fumigatus* (CMI= 0.2 et une CML >10mg/mL, respectivement). Les deux

échantillons d'HE testés étaient principalement composés de monoterpènes hydrocarbonés (57,6% et 40,4%) avec comme principaux composants : α -pinène (50.8- 33.6%), 1,8-cinéole (21.9-13.3%), linalool (2.7-14.8%), et linalyl acétate (0.5-9.5%) et affichaient des activités antifongiques similaires. L'effet inhibiteur de la croissance de *C. albicans* semble effectivement augmenter avec la dose testée d'HE du myrte du sud-ouest d'Iran récolté de la floraison jusqu'au début de fructification (mai-septembre) et Pirbalouti *et al.*(2010) rapportent une zone d'inhibition de 15 mm (à raison de 100 μ g/disque), un taux d'inhibition de 91,16% et une CMI <0.039 - 0.625 mg/mL (à raison de 10 mg/mL). Toutefois, Mahboubi et Bidgoli (2010) ne signalent pas de différence significative de l'HE du myrte d'Iran durant la floraison à l'égard de *C. albicans* et *Aspergillus* sp. et les valeurs des MIC et des MLC de l'HE de myrte allaient de 8-16 et 16-32 μ l/mL contre les champignons testés. Ces valeurs de CMI ont montré que l'HE était assez active contre les champignons à ces concentrations.

Pour le myrte de la même région récolté durant la même saison, Zomorodian *et al.* (2013) ont observé une activité antifongique importante de l'HE contre 19 souches de *C. albicans* avec des CMI₅₀ de 0,25 à 2 μ l/L, des CMI₉₀ de 0.5 - 4 μ l/mL et des CMF de 0.5 à 8 μ l/mL ainsi que pour les deux souches d'*Aspergillus* spp. avec CMI₅₀ de 4 - 16 μ l/mL comme le cas du présent travail où les CMI₅₀ se situent entre 1-2 μ l/mL et les CMF > 5 μ l/mL. L'HE était riche en monoterpènes hydrocarbonés (47,58 %) et monoterpènes oxygénés (47,85 %) avec comme principaux composants l' α -pinène (39,2 %), le 1,8-cinéole (22%) et le linalool (18,4 %). L'HE du myrte d'Italie semble aussi être efficace après 24 et 48h de contact contre 10 souches de *C. albicans* avec une CMI₉₀ de 2 μ g/mL; cette dernière était riche en α -pinène et 1.8-cinéole (Cannas *et al.*, 2013). L'efficacité de l'HE du myrte de Tunisie cueilli durant la floraison a été démontrée par Ben Hsouna et ses collaborateurs (2014) à des doses plus élevées que celles testées dans la présente étude pour *Alternaria alternata* (ZI=20 mm à raison de 50 μ l/mL et CMF=0,625 mg/mL) et *Fusarium oxysporum* (ZI=22mm à raison de 50 μ l/mL et CMF=0,156mg/mL). Des effets inhibiteurs puissants de l'HE sur la croissance d'*A. niger* et d'*A. flavus* ont été aussi observés avec des diamètres des zones d'inhibition de 30 mm et des valeurs de CMI de 0,078 mg/mL. L'HE a aussi exposé des activités antifongiques contre *Fusarium* sp. et *Aspergillus* sp., qui sont responsables de la détérioration de nombreux aliments. Des doses également importantes d'HE du myrte d'Iran (600 et 900 μ l/L, respectivement) ont faiblement inhibé la croissance mycélienne d'*A. flavus* (3,7-9,7% par la méthode de dilution en milieu gélosé) et l'application d'une dose de 24 μ L d'HE brute en microatmosphère a induit une inhibition de 3,4%. Les principaux composants de cette HE

étaient le limonène (38,2%) et l' α -pinène (31,5%) (Omidbaigi *et al.*, 2007). Pour le myrte d'Égypte, l'HE extraite durant la floraison n'est efficace qu'à des doses appréciables voir une CE₅₀ de 328 mg/L pour *Alternaria alternata* et 724 mg/L pour *Fusarium oxysporum*; les principaux constituants étant l' α -pinène (26,16%), le 1,8-Cineole (16,45%) et le linalool (11,23%). Parmi les champignons testés, *F. oxysporum* était le champignon le plus sensible à la totalité des HE des 18 plantes égyptiennes testées à l'exception de l'huile de *Schinus molle*. À l'issue de cette étude, la relation entre l'activité antimicrobienne et la composition chimique des HE isolées a été révélée par la sensibilité sélective des champignons testés à certaines HE (Badawy et Abdelgaleil, 2014).

Plusieurs mécanismes d'action possible par lesquels la croissance mycélienne est réduite ou totalement inhibée ont été proposés. Ainsi, Lucini *et al.* (2006) ont indiqué que cette inhibition est causée par les monoterpènes présents dans les HE. Ces composants pourraient augmenter la concentration des peroxydes lipidiques comme les radicaux hydroxyls (\bullet OH), alkoxylys (RO \bullet) et alkoperoxylys (ROO \bullet) et conduire par conséquent à la mort cellulaire. Pour Sharma et Tripathi (2006), les HE agiraient sur l'hyphe du mycélium, provoquant la sortie des composants du cytoplasme, la perte de la rigidité et de l'intégrité de la paroi cellulaire des hyphes entraînant son effondrement et la mort du mycélium. Selon Carović-Stanko *et al.* (2010), l'activité antimicrobienne des HE des plantes pourrait être provoquée par les composants majeurs de ces HE ou dues à un effet synergique entre les composants majeurs et mineurs. Des effets synergiques et antagonistes des composés peuvent également jouer un rôle important dans l'inhibition des champignons (Pitarokili *et al.*, 2002 et 2003 ; Mimica-Dukić *et al.*, 2003 ; Carović-Stanko *et al.*, 2010). Cependant, il existe de nombreuses recherches qui tentent d'expliquer le mécanisme antimicrobien (Viuda-Martos *et al.*, 2011; Xing *et al.*, 2012). Ces mécanismes antimicrobiens peuvent être une attaque de la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire, la rupture des systèmes enzymatiques, la modification du matériel génétique de la bactérie/champignons, la formation d'hydroperoxydase des acide gras par l'oxygénation des acides gras insaturés, la coagulation du cytoplasme, l'endommagement des lipides et des protéines, la perturbation de la force motrice protonique, du flux d'électrons et / ou du transport actif. Elles peuvent également inhiber l'activité des enzymes protectrices et inhiber de manière séquentielle une ou plusieurs voies biochimiques (Xing *et al.*, 2012). Puisque les huiles essentielles sont hydrophobes, elles peuvent pénétrer dans la double couche de phospholipides de la membrane cellulaire et des mitochondries altérant leurs structures et les rendant plus vulnérables à la fuite des matériaux

de la cellule. Cette fuite est due à l'accumulation d'huiles essentielles dans la membrane cellulaire et au déclenchement subséquent des événements associés à la modification de la membrane, augmentant ainsi sa perméabilité et induit la fuite des constituants intracellulaires vitaux, aussi bien qu'affecter la respiration cellulaire et d'autres systèmes enzymatiques Badawy et Abdelgaleil (2014).

Conclusion

L'huile essentielle de *M. communis* L. extraite durant la floraison exhibe des activités antibactériennes et antifongiques très intéressantes. Ces effets inhibiteurs de la croissance sont significativement variables en fonction du germe et de la dose appliquée. De manière générale, les bactéries pathogènes Gram+ sont plus sensibles que celles à Gram-. Les résultats obtenus avec la méthode des puits ou aromatoگرامme ont mis en évidence la grande sensibilité de *S. aureus* (bactérie Gram+) avec un diamètre de zone d'inhibition de 36,67mm pour 8 µL d'HE brute et la résistante d'*E. coli* (bactérie Gram -) avec un diamètre de zone d'inhibition de 16,67mm pour 20 µL d'HE brute. D'autre part, la méthode des microdilutions a permis de révéler un effet inhibiteur significatif de l'HE sur la croissance de toutes les bactéries pathogènes testées sauf *P. aeruginosa*, montrant une résistance à toutes les doses appliquées. Alors que les deux souches de *P. mirabilis* étaient les plus sensibles, avec une CMI de 0.12 µg/mL et une CMB de 16 µg/mL pour la souche de référence. L'application de la dose de 64 µg/mL s'est avérée modérément active contre *S. aureus* et *K. pneumoniae*, avec des zones d'inhibition respectives de 12-10 mm et une CMI de 4µ/mL. L'évaluation en l'occurrence du pouvoir antifongique a montré une activité antifongique intéressante par la méthode des dilutions en milieu liquide. A la dose maximale de 0,5% ou 5 µl/mL, la croissance mycélienne d'*Ascochyta rabiei*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus ochraceus* et *Alternaria solani* était inhibée respectivement de 64, 85, 68 et 92%. L'inefficacité de l'HE extraite durant la fructification sur la croissance des souches bactériennes pathogènes de référence (*Pseudomonas aeruginosa* DSM 939, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Haemophilus influenza* DSM 9999 et *Streptococcus pneumoniae* TIGR 4) ainsi que sa faible activité inhibitrice vis à vis de *C. albicans* ATCC 90028 à la dose de 3 µl/disque pourrait être due à la différence dans la composition chimique avec celle extraite durant la floraison. Néanmoins, les résultats obtenus sont de grande importance et peuvent présenter une solution alternative face au problème de l'accroissement de multirésistance des bactéries pathogènes particulièrement en milieu hospitalier cas de certaines souches de *S. aureus*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *E. coli* pouvant être à l'origine de nombreuses infections

nosocomiales. L'HE de *M. communis* a montré aussi son efficacité dans l'inhibition de la croissance mycélienne des quatre champignons phytopathogènes reconnus pour leurs dégâts importants sur certaines cultures agricoles et sur les produits agricoles en conservation. Les doses appliquées à raison du microlitre ont permis d'inhiber totalement la croissance d'*Alternaria solani* (92% pour une dose maximale de 5 µl/mL).

8. Evaluation du potentiel antioxydant de l'huile essentielle

8.1. Pouvoir réducteur du DPPH

Le pouvoir réducteur du radical DPPH des différentes HE est significativement variable ($p < 0.01$) en fonction de la concentration d'HE et de l'échantillon (Figure 37). A la dose maximale de 22 mg/mL, les plus faibles activités antioxydantes ont été notées pour le myrte récolté des sites (1, 2 et 3) qui varient de 72 à 77% alors que les meilleurs pouvoirs réducteurs (90-91%) ont été notés pour le myrte récolté des sites (5, 6, 11 et 12). Les HE du myrte récolté des sites (4, 10 et 13) ont montré des activités comparables (87-89%) comme celles extraites du myrte poussant sur les sites (7, 8, 9 et 14) avec des activités antioxydantes allant de 82 à 85%. Par ailleurs, le pouvoir réducteur du BHT (standard) était estimé à une IC_{50} de 0,089mg/mL qui est, de loin, plus faible que les doses effectives dans la présente étude (1,40-22,46 mg/mL). Cette faible activité antioxydante évaluée par le test DPPH a été rapportée par plusieurs auteurs. Yadegarinia *et al.* (2006) a signalé un très faible pouvoir réducteur (3,53%) pour l'HE du myrte iranien (diluée au 1/5 dans du méthanol) extraite durant la fructification. L'HE du myrte algérien extraite durant la floraison paraît posséder un meilleur pouvoir réducteur du DPPH avec des IC_{50} de 768 µg/mL et 693 µg/mL pour les deux procédés d'extraction l'hydrodistillation (HD) et Solvent-Free-Microwave-Extraction (SFME). L'HE extraite par SFME contenait une proportion élevée de composés oxygénés (57,12% vs 40,33%) ainsi que de composés phénoliques (6,34% vs 2,39%) (Berka-Zougali *et al.*, 2012). Ce constat a été aussi confirmé pour l'HE du myrte tunisien (var. *italica*) obtenue durant la floraison avec des IC_{50} de 600 µg/mL pour les feuilles, 2000 µg/mL pour la tige et 550 µg/mL pour les fleurs (Aidi Wannes *et al.*, 2010). Actuellement, il est bien connu que les huiles essentielles du myrte contiennent particulièrement des monoterpènes (α -pinène, β -pinène, limonène, 1,8-cinéole, linalool,...) et ces composés ont tous été testés individuellement dans des études antérieures et ne présentaient pas de fortes activités antioxydantes en utilisant la même procédure comme le test DPPH (Kelen et Tepe, 2008). Généralement, les HE riches en composés phénoliques tels que le carvacrol et le thymol affichaient des potentiels

antioxydants puissants comme le cas de *Thymus capitatus* Hoff. et Link. (Bounatirou *et al.*, 2007) et *Origanum acutidens* Hand.-Mazz. (Sökmen *et al.*, 2004).

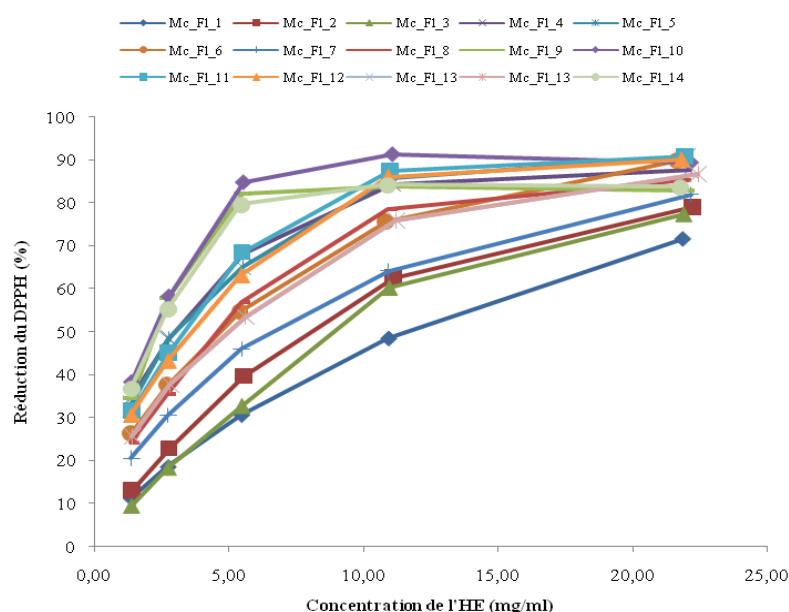


Figure 37 : Pouvoirs réducteurs du DPPH des différentes huiles essentielles extraites durant la fructification.

8.2. Pouvoir réducteur du fer par la méthode FRAP

Le pouvoir réducteur était aussi dose-dépendant ($p < 0.01$). Les 14 HE peuvent être distribuées en 2 groupes; les échantillons d'HE (Mc_Fl_4 et Mc_Fl_5) possédaient des pouvoirs réducteurs du fer supérieurs au reste des HE avec des DO de 0,349 et 0,371 à la dose maximale de 11 mg/mL (Figure 38). Cette dose d'HE reste bien supérieure à l'IC₅₀ de l'acide ascorbique (standard) qui est 0,0011mg/mL. Cherrat *et al.* (2014) ont rapporté une DO₇₀₀ < 0.5 à la dose maximale de 10 µl/mL d'HE du myrte marocain collecté pendant la floraison alors que des doses plus élevées ont été nécessaires pour réduire de 50% le fer (EC₅₀=1, 2.5 et 1.5 mg/mL) par les HE extraites des feuilles, tiges et fleurs du myrte de Tunisie cueilli en floraison (Aidi wannes *et al.*, 2010). L'HE du myrte marocain était également riche en monoterpènes avec des teneurs élevées en myrtényl acétate (49,27%) 1,8-cinéole (26,93%), α -pinène (16,52%) et méthyl eugénol (4,84%).

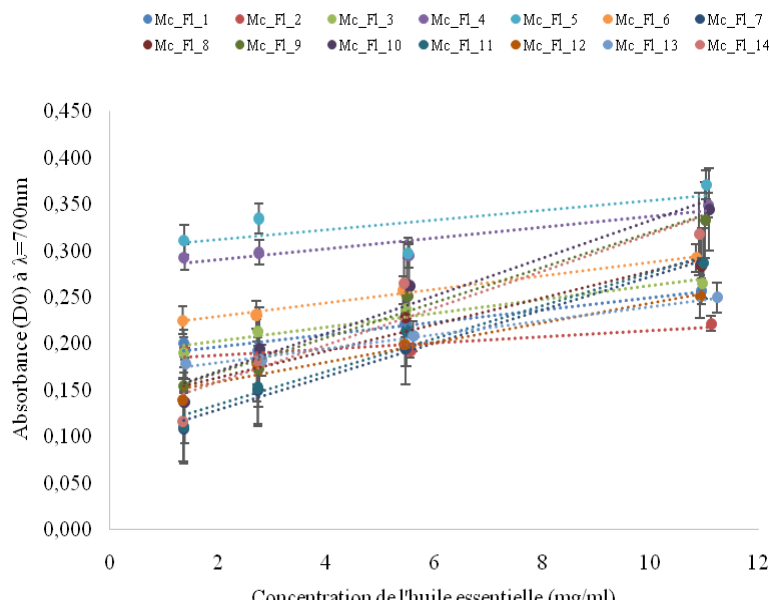


Figure 38 : Essai de linéarité du pouvoir réducteur des différentes huiles essentielles en fonction de la concentration d'HE testée.

8.3. Pouvoir chélatant du fer

Le pouvoir chélatant est aussi significativement différent entre échantillons ($p < 0.01$). Les meilleures activités ont été notées pour les échantillons (Mc_Fl_1 et Mc_Fl_3) contre la plus faible activité notée pour Mc_Fl_9 (Figure 39). Le reste des échantillons ont affiché des pouvoirs chélatants comparables (65-77% à la dose maximale de 22 mg/mL d'HE) alors que l' IC_{50} signalée pour l'EDTA était de 0,062 mg/mL. Pour le myrte de Tunisie, Aidi Wannas *et al.* (2010) ont signalé des pouvoirs chélatants du fer inférieurs à nos résultats avec des IC_{50} de 5, 10 et 46 mg/mL pour les feuilles, la tige et les fleurs. Cette différence dans les résultats peut être expliquée par la différence dans la composition chimique des HE étudiées.

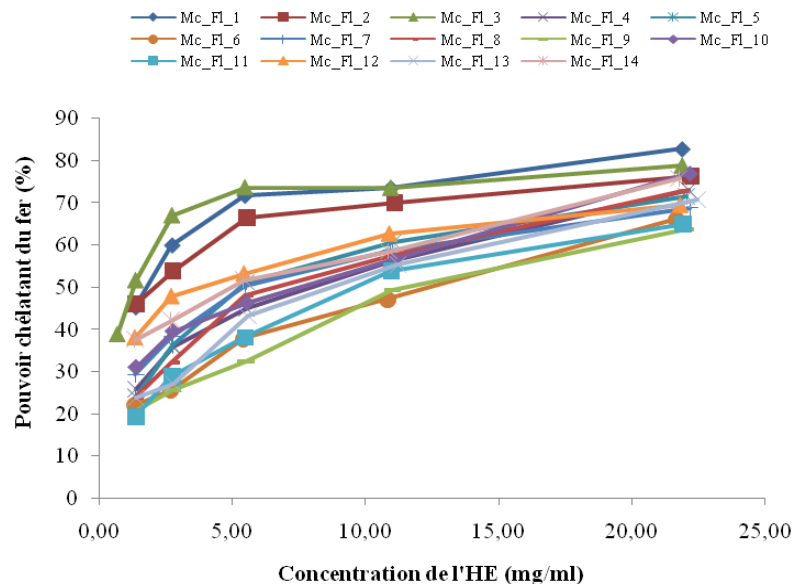


Figure 39 : Pouvoirs chélatants du fer des différentes huiles essentielles extraites durant la fructification.

8.4. Potentiel antiradicalaire ABTS

La capacité de piégeage du radical libre ABTS est significativement variable entre échantillons ($p < 0.01$). A raison de 100 μL d'HE testée, les HE des échantillons Mc_Fl_2, Mc_Fl_4, Mc_Fl_6, Mc_Fl_7, Mc_Fl_10 et Mc_Fl_13 affichaient des activités réductrices supérieures à 50% avec des équivalents Trolox oscillant de 0,0024 à 0,0034 mg/mL alors que l' IC_{50} du BHT était de 0.041 mg/mL. Avec le même volume testé, L'HE extraite de l'échantillon Mc_Fl_14 en l'occurrence ne montrait pas d'activité pour ce test.

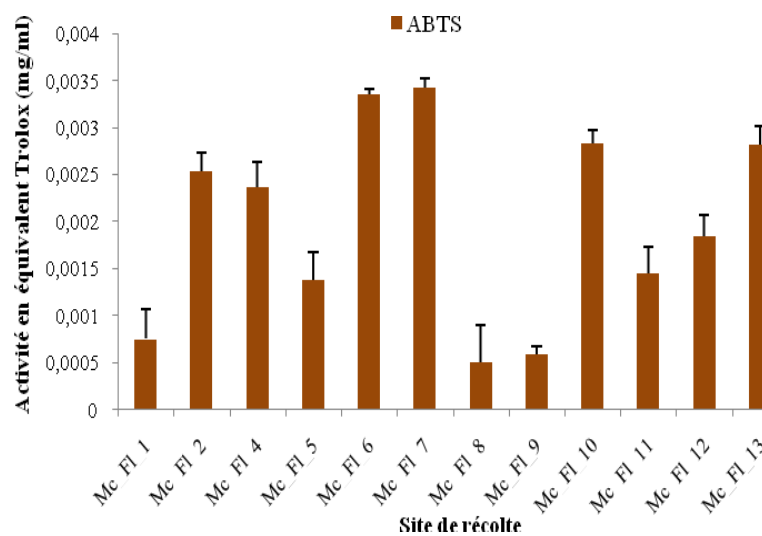


Figure 40 : Potentiels antiradicalaires ABTS des différentes huiles essentielles extraites durant la fructification.

Conclusion

Globalement, les potentiels antioxydants des HE de *M. communis* récolté des régions de Zeboudja et Ténès durant la fructification étaient plus faibles comparativement aux standards et restent variables entre échantillons appartenant aux différents sites de récolte. Cette variabilité est difficile à expliquer vu la complexité de la composition chimique de l'HE extraite des feuilles de *M. communis* L. Une corrélation entre les différentes variables mesurées (Capacité de réduire le DPPH, celle de réduire l'ABTS, pouvoirs réducteur et chélatant du fer) ne peut être proposée.

Conclusion générale

M. communis L. poussant à l'état spontané dans la région nord-ouest de l'Algérie (Zeboudja-Ténès) a été récolté durant les périodes de floraison (juin 2009) et de fructification (septembre 2012). Les huiles essentielles contenues dans les feuilles et les fruits ont été extraites par hydrodistillation. Le rendement en HE des feuilles du myrte récoltées de la forêt de Bissa pendant la période de floraison variait de 0.55-1.15% alors qu'il oscillait entre 0,34-0,39% durant la fructification. L'analyse de la composition chimique, par CG et CG/MS, des HE extraites a permis d'identifier 57 composés. Les principaux constituants de l'HE extraite des feuilles du myrte récolté de la forêt de Bissa durant la floraison sont : limonène 23.4%, linalool 15.4%, géranyl acétate 10.9%, α -pinène 10.7%, linalyl acétate 8.2% et 1,8-cinéole 6.6%. L'absence du myrtényl acétate a été aussi confirmé comme signalé par la littérature pour les HE des feuilles du myrte d'Algérie. Ce résultat a révélé par conséquent l'existence d'un nouveau chémotype d'HE à savoir limonène/ linalool/ géranyl acétate.

Par ailleurs, l'analyse de groupes basée sur la composition chimique des HE extraites des feuilles et des fruits de myrte collecté de 14 sites dans les régions de Ténès et Zeboudja en début de fructification a permis de les regrouper en principaux groupes hautement corrélés ($\text{Scorr} \geq 0.88$ et $\text{Scorr} \geq 0.80$, respectivement). Pour les HE des feuilles, le groupe I réunit 11 échantillons caractérisés par la prédominance du α -pinène (32-49%), limonène (11-30%), 1,8-cinéole (10-24%) et le linalool (2-20%). Ces résultats ont révélé la richesse de ces huiles en limonène et en linalool. Les HE des fruits renfermaient les mêmes composants majoritaires mais à des teneurs différentes. Les HE du groupe I sont dominées par la présence du α -pinène (21-43%), limonène (25-35%), 1,8-cinéole (5-12%) et linalool (1-7%), tandis que celles du groupe II présentaient des niveaux élevés d' α -pinène (34-43%) et de 1,8-cinéole (13-31%), inférieurs en limonène (9-13%) et des teneurs similaires en linalool (2-5%). Malgré la présence marquante du limonène dans les HE du groupe I, les HE extraites des fruits contenaient de faibles teneurs en linalool par rapport à celles extraites des feuilles mettant ainsi en évidence la variabilité de la composition chimique de l'HE en fonction de l'organe de synthèse chez *M. communis* L. Toutefois, ces deux composants restent fortement présents dans l'HE extraite des feuilles du myrte récolté pendant la floraison contrairement à l' α -pinène et le 1,8-cinéole supposant ainsi la variation du profil chimique de l'HE en fonction du stade physiologique de la plante. La mise en évidence de l'existence de nouveaux chémotypes d'HE du myrte algérien met en exergue en l'occurrence la complexité d'interactions entre plante, climat, site de récolte et stade de récolte (ou facteurs intrinsèques et extrinsèques) et son

impact sur les voies de biosynthèses des différentes molécules chimiques composant ces HE. En outre, le suivi de la cinétique de l'hydrodistillation a permis de déterminer le temps optimal d'extraction des composants majoritaires tels l' α -pinène, le 1,8-cinéole, le limonène et le linalool qui peuvent être obtenus durant une courte durée d'extraction.

L'étude de l'activité antimicrobienne de l'HE des feuilles du myrte a été explorée sur des bactéries pathogènes d'origine clinique et celles de référence ainsi que sur quelques champignons phytopathogènes. Les résultats obtenus ont révélé l'efficacité de l'HE extraite durant la floraison sur la croissance des bactéries Gram positives quelque soit l'origine. Parmi les souches bactériennes pathogènes d'origine clinique, *S. aureus* s'est montré le plus sensible avec des diamètres de zones d'inhibition de 12,67-36,67mm pour des doses d'HE testées de 2-8 μ l/puit contre 7,33-16,67mm à des doses de 10-20 μ l/puit signalés pour *E. coli*. Pour les bactéries pathogènes de référence, les deux souches de *P. mirabilis* étaient les plus sensibles, avec une CMI de 0.12 μ g/mL et une CMB de 16 μ g/mL pour la souche de référence. L'application de la dose de 64 μ g/mL s'est avérée modérément active contre *S. aureus* et *K. pneumoniae*, avec des zones d'inhibition de 12 et 10 mm, et une CMI 4 μ g/mL alors que toutes les doses testées (0.06-64 μ g/mL) montrait une faible activité contre la levure *C. albicans* ATCC 90028 à raison de 30 μ l/disque. De plus, l'HE extraite en floraison a montré un effet antifongique remarquable en inhibant la croissance mycélienne d'*Ascochyta rabiei*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium oxysporum* et *Alternaria solani* avec des taux d'inhibition de 64, 68, 85 et 92% à la dose maximale appliquée de 0.5%.

Par ailleurs, les résultats obtenus lors de l'évaluation de la capacité antioxydante des HE extraites durant la fructification ont montré qu'à la dose de 22mg/mL, les HE du myrte récolté de Oued Goussine, Teraghnia, Dalas (Ténès) et Bissa (Zeboudja) exhibaient les meilleures activités antioxydantes (90-91%) et des pouvoirs chélatants du fer importants (79 et 83%) notés pour les HE du myrte récolté de Oued Goussine, place el Khazna et Tigharghar (Ténès). Le myrte de Oued Goussine en plus de celui de Oued Khdhar possédaient les meilleurs pouvoirs réducteurs du fer pour la dose maximale de 11mg/mL. Pour l'ABTS, les HE des échantillons récoltés des sites (Tifless, Oued khdhar, Teraghnia, et Boucheral) affichaient des activités réductrices supérieures à 50%. Ces activités antioxydants intéressantes restent néanmoins inférieures à celles observées pour les standards ne permettant pas de prévoir l'emploi de l'HE du myrte comme antioxydant naturel puissant.

Il ressort de l'ensemble des résultats obtenus que l'HE des feuilles de *M. communis* L. récolté de la région de Chlef durant la période de floraison présente un potentiel antimicrobien

certain permettant son application dans le domaine médical aussi bien qu'agroalimentaire toutefois il paraît impératif de prospecter plus profondément les mécanismes d'action de ce mélange complexe ainsi que d'identifier les molécules dotées d'activités biologiques spécifiques afin de concevoir de nouveaux agents antimicrobiens efficaces.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- 1- Aazza S., Lyoussi B. et Miguel Maria G. (2011). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules*, 16, 7672-7690.
- 2- Abbott Sharon L., Adderson Elisabeth E., Azud Abdu F., Bahamonde Lourdes G., Bahamonde Mathew E., Barbuddhe S., Barua S., Basu P., Beier-Sexton M., Bora N., Bott M. *et al.* (2008). *Practical Handbook of Microbiology*, Second Edition. CRC Press, Taylor and Francis Group, NW, USA, 874 p.
- 3- Aboutabl E.A., Meselhy K.M., Elkhreisy E.M., Nassar M.I. et Fawzi R. (2011). Composition and bioactivity of essential oils from leaves and fruits of *Myrtus communis* and *Eugenia supraxillaris* (Myrtaceae) Grown in Egypt. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 14: 2, 192-200.
- 4- Adams R.P. (2001). *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy*. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL.
- 5- AFNOR (Association française de normalisation) (1986). *Recueil des normes françaises sur les huiles essentielles*. 2^{ème} édition, Tec et Doc, Lavoisier. Paris la Défense.
- 6- AFNOR (Association française de normalisation) (1988). *Recueil des normes françaises sur les corps gras, graines oléagineuses et produits dérivés*. 4^{ème} édition, Tec et Doc, Lavoisier. Paris la Défense.
- 7- [Aidi Wannes W.](#), [Mhamdi B.](#) et [Marzouk B.](#) (2007). Essential oil composition of two *Myrtus communis* L. varieties grown in North Tunisia. *Italian Journal of Biochemistry*. Vol 56 (2) : 180-6.
- 8- Aidi Wannes W., B. Mhamdi et B. Marzouk (2009). GC comparative analysis of leaf essential oils from two myrtle varieties at different phenological stages. *Chromatographia*, 69, No. 1/2, 145–150.
- 9- Aidi Wannes W., Mhamdi B., Sriti J., Ben Jemia M., Ouchikh O., Hamdaoui G., Kchouk M. E. et Marzouk B. (2010). Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and Chemical Toxicology*, 48 1362–1370.
- 10- Aidi Wannes W., Mhamdi B., Kchouk M.E. et Marzouk B. (2011). Composition of fruit volatiles and annual changes in the leaf volatiles of *Myrtus communis* var. *baetica* in Tunisia. *La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, LXXXVIII, 123-129.

- 11- Aidi Wannas W. et Marzouk B. (2012). Maturational effect on essential oil yield and composition of *Myrtus communis* var. *Baetica* fruit. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 15:5, 847-853.
- 12- Aidi Wannas W., Mhamdi B. et Marzouk B. (2007). Essential oil composition of two *Myrtus communis* L. varieties grown in North Tunisia. *The Italian Journal of Biochemistry*, 56(2), 180-186.
- 13- Aidi Wannas W., Mhamdi B., Sriti J. et Marzouk B. (2010). Changes in essential oil composition of Tunisian *Myrtus communis* var. *italica* L. during its vegetative cycle. *Journal of Essential Oil Research*, 22, 13-18.
- 14- Akin M., Aktumsek A. et Nostro A. (2010). Antibacterial activity and composition of the essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. and *Myrtus communis* L. growing in Northern Cyprus. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 9 (4), 531-535.
- 15- Alem G., Mekonnen Y., Tiruneh M. et Mulu A. (2008). In vitro antibacterial activity of crude preparation of myrtle (*Myrtus communis*) on common human pathogens. *Ethiop Med J*; 46 (1) : 63-9.
- 16- Al-Hindawi M. K., Al-Deen Ihsan H.S., Nabi May H.A. et Ismail Mudafar A. (1989). Anti-inflammatory activity of some Iraqi plants using intact rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 26 (2) :163-168.
- 17- Alipour G., Dashti S. et Hosseinzadeh H. (2014). Review of pharmacological effects of *Myrtus communis* L. and its active constituents. *Phytother. Res.*, 12p.
- 18- Aleksic V. et Knezevic P. (2014). Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. *Microbiological Research*, 169, 240-254.
- 19- Al-Saimary I.E., Bakr S.S., Jaffar T., Al-Saimary A.E., Salim H. et Al-Muosawi R. (2002). Effects of some plant extracts and antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa* isolated from various burn cases. *Saudi Med J*, 23 (7) : 802–5.
- 20- Amensour M., Bouhdid S., Fernandez-Lopez J., Idaomar M., Senhaji N.S. et Abrini J. (2010). Antibacterial activity of extracts of *Myrtus communis* against food-borne pathogenic and spoilage bacteria. *Int J Food Prop*, 13:1215–24.
- 21- Amer A. et Mehlhorn H. (2006). Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). *Parasitol Res*, 99 : 46 66–472.
- 22- Archambaud. M. (2000). Evaluation Methods of antibiotics activity. *Brûlures*, vol. 1, n°3, Ed. Carr. Med., p 2.

- 23- Ashnagar A., Naseri N. G. et Bayemani A. (2009). Isolation and determination of the major chemical compounds present in essential oil of the leaves of *Myrtus* plant grown in Khuzestan province of Iran. *Asian Journal of Chemistry*, 21, No. 7, 4969-4975.
- 24- Asllani U. (2000). Chemical composition of Albanian myrtle oil (*Myrtus communis* L.). *Journal of Essential Oil Research*, 12 : 2, 140-142.
- 25- Ayvaz A., Sagdic O., Karaborklu S. et Ozturk I. (2010). Insecticidal activity of the essential oils from different plants against three stored-product insects. *Journal of Insect Science*, 10 (21) : 1-13.
- 26- Azadbakht M., Ziai H., Abdollahi F. et Shabankhani B. (2003). Effect of essential oils of *Artemisia aucheri* Boiss., *Zataria multiflora* Boiss. and *Myrtus communnis* L. on *Trichomonas vaginalis*. *J Med Plant*, 8 : 35-40.
- 27- Badawy Mohamed E.I. et Abdelgaleil Samir A.M. (2014). Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. *Industrial Crops and Products*, 52 : 776– 782.
- 28- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. et Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46 446–475.
- 29- Barboni T., Venturini N., Paolini J., Desjobert J. M., Chiaramonti N. et Costa J. (2010). Characterisation of volatiles and polyphenols for quality assessment of alcoholic beverages prepared from Corsican *Myrtus communis* berries. *Food Chemistry*, 122, 1304–1312.
- 30- Barbosa P., Lima A. S., Vieira P., Dias L. S., Tinoco M. T., Barroso J. G., Pedro L. G., Figueiredo A. C. et Mota M. (2010). Nematicidal activity of essential oils and volatiles derived from Portuguese aromatic flora against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Journal of Nematology*, 42 (1) : 8–16.
- 31- Basaran D. et Ahmet G. 2004. Antimicrobial activity of certain plants used in Turkish traditional medicine. *Asian Journal of Plant Sciences*, 3 (1) : 104-107.
- 32- Bastide J.-M., Milhau G., Valentin A., Benoit F. et Mallié M. (1997). In vitro antimalarial activity of eight essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 9 : 3, 329-333.
- 33- Bauer A.W., Kirby W. M., Sherris J. C. et Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.*, 45 (4) : 493–496.
- 34- Baytop T. (1999). Therapy with medicinal Plants in Turkey (Past and Present). Nobel Typ. Kitapevleri Press, Istanbul.
- 35- Beloued A. (1998). Plantes médicinales d'Algérie, OPU, Alger. 218 p.
- 36- Ben Hsouna A., Hamdi N., Miladi R. et Abdelkafi S. (2014). *Myrtus communis* essential oil: Chemical composition and antimicrobial activities against food spoilage pathogens.

Chemistry and Biodiversity, Vol. 11, 571- 580.

37- Benkhayal F. A., El-Ghaithi M., Ramesh S. et Dhayabaran. D. (2009). Biochemical studies on the effect of phenolic compounds extracted from *Myrtus communis* in diabetic rats. *Tamilnadu J. Veterinary and Animal Sciences*, 5 (3) 87-93.

38- Benzeggouta N. (2005). Etude de l'activité antibactérienne des huiles infusées de quatre plantes médicinales connues comme aliments. Mémoire de Magister en Pharmacochimie. Université de Constantine (Algeria), p 44.

39- Berche P. (2003). Bactériologie générale. PCE M 2. Faculté de médecine Necker-Enfants malades (France). pp 89.

40- Berka-Zougali B., Hassani A., Besombes C. et Allaf K. (2010). Extraction of essential oils from Algerian myrtle leaves using instant controlled pressure drop technology. *J. Chromatogr. A*, 1217, 6134–6142.

41- Berka-Zougali B., Ferhat MA, Hassani A., Chemat F. et Allaf K.S. (2012). Comparative study of essential oils extracted from Algerian *Myrtus communis* L. leaves using microwaves and hydrodistillation. *Int J Mol Sci*, 13 : 4673–95.

42- Bertoli A., Conti B., Mazzoni V., Meini L. et Pistelli L. (2012). Volatile chemical composition and bioactivity of six essential oils against the stored food insect *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera Dryophthoridae). *Natural Product Research : Formerly Natural Product Letters*, 26 : 22, 2063-2071.

43- Bezić N., Skocibusic M., Dinkic V. et Radonic A. (2003). Composition and antimicrobial activity of *Achillea clavennae* L. essential oil. *Phytotherapy Research*, 17, 1037–1040.

44- Boelens M. H. et Jimenez R. (1991). The chemical composition of Spanish myrtle leaf oils. Part 1. *J. Ess. Oil Res.*, 3, 173-177.

45- Boelens, M.H. et Jimenez, R. (1992). The chemical composition of Spanish myrtle oils. Part II. *J. Essent. Oil Res.*, 4, 349–353.

46- Bounatirou S., Smiti S., Miguel M.G., Faleiro L., Rejeb M.N., Neffati M., Costa M.M., Figueiredo A.C., Barroso J.G. et Pedro L.G., (2007). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoffm. et Link. *Food Chem*, 105, 146–155.

47- Bouzabata A., Boussaha F., Casanova J. et Tomi F. (2010). Composition and chemical variability of leaf oil of *Myrtus communis* from north-eastern Algeria. *Natural Product Communications*, 5(10),1659-1662.

48- Bouzabata A., Bazzali, O., Cabral, C., Gonçalves, M.J., Cruz, M.T. et Bighelli, A. (2013a). New compounds, chemical composition, antifungal activity and cytotoxicity of the

- essential oil from *Myrtus nivellei* Batt.&Trab., an endemic species of Central Sahara. *J. Ethnopharmacol*, 149 (3), 613–620.
- 49- Bouzabata A., Castola V., Bighelli A., Abed L., Casanova J. et Tomi F. (2013b). Chemical variability of Algerian *Myrtus communis* L.. *Chemistry and Biodiversity*, 10, 129-137.
- 50- Bouzabata A., Cabral C., Gonçalves M. J., Cruz M. T., Bighelli A., Cavaleiro C., Casanova J., Tomi F. et Salgueiro L. (2015). *Myrtus communis* L. as source of a bioactive and safe essential oil. *Food and Chemical Toxicology*, 75, 166–172.
- 51- Bouzouita N., Kachouri F., Hamdi M. et Chaabouni M. M. (2003). Antimicrobial activity of essential oils from Tunisian aromatic plants. *Flavour and Fragrance Journal*, 18: 380–383.
- 52- Božin B., Mimica-Dukić N., Simin N. et Anačkov, G. (2006). Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 1822-1828.
- 53- Brada M., Tabti N., Boutoumi H., Wathelet J.P. et Lognay G. (2012). Composition of the essential oil of leaves and berries of Algerian myrtle (*Myrtus communis* L.). *Journal of Essential Oil Research*, 24, No. 1, 1-3.
- 54- Bradesi P., Tomi F. et Casanova J. (1997). Chemical composition of myrtle leaf essential oil from Corsica (France). *Essent. Oil Res.*, 9, 283-288.
- 55- Brandwilliams W., Cuvelier M. E. et Berset. C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.*, 28 (1) : 25-30.
- 56- Brelière B., Cerrato M., Martinez A. et Romoli V. (2009). Microbiologie BEP : les savoirs en situation (Broché), Ed. Hachette Technique, p 24.
- 57- Brossard H., Leyral G. et Terry O. (1997). Activités technologiques en microbiologie: classes de première BGB. Bactériologie systématique, Vol 2, Collection Biologie technique, Ed. CRDP d'Aquitaine, Bordeaux, p 15,75 et 83.
- 58- Bugdayci G., Altan N., Sancak B., Bukan N. et Kosova F. (2006). The effect of the sulfonylurea glyburide on glutathione-S-transferase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in streptozotocin-induced diabetic rat liver. *Acta diabetol*, 43: 131–134.
- 59- Burt S. (2004). Essential oils : their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 94, 223–253.
- 60- Caillet S. et Lacroix M. (2007). Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA).INRS-Institut Armand-Frappier, Laval (Québec). 1-8.

- 61- Cannas S., Molicotti P., Ruggeri M., Cubeddu M., Sanguinetti M., Marongiu B. et Zanetti S. (2013). Antimycotic activity of *Myrtus communis* L. towards *Candida spp.* from clinical isolates. *J Infect Dev Ctries*, 7(3) : 295-298.
- 62- Caree P. (1953) précis de technologie et de chimie industrielle. T3. Ed. Ballière JB. et fils, pp 238.
- 63- Carle S. (2009). La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important. *Pharmactuel*, Vol. 42, Supplément 2, 6-21.
- 64- Carović-Stanko K., Orlić S., Politeo O., Strikić F., Kolak I., Milos M. et Satovic Z. (2010). Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum taxa*. *Food Chemistry*, 119, 196-201.
- 65- Çabuk M., Eratak S., Alçicek A. et Bozkurt. M. (2014). Effects of herbal essential oil mixture as a dietary supplement on egg production in quail. *The Scientific World Journal*, 1-4.
- 66- Chalchat, J.C., Garry, R.P. et Michet, A. (1998). Essential oils of myrtle (*Myrtus communis* L.) of the Mediterranean littoral. *J. Essent. Oil Res.*, 10, 613-617.
- 67- Chalchat J. C., Figueredo G., Özcan M. M. et Unver A. (2010). Effect of hydrodistillation and microwave distillation extraction methods on chemical compositions of essential oil of pickling herb and myrtle plants. *South west J Hortic Biol Environ*, 1, No. 2, 133-141.
- 68- Cherrat L., Espina L., Bakkali M., García-Gonzalo D., Pagán R. et Laglaoui A. (2014). Chemical composition and antioxidant properties of *Laurus nobilis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils from Morocco and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes for food preservation. *JSci Food Agric*, 94 : 1197-1204.
- 69- Chryssavgi G., Vassiliki P., Athanasios M., Kibouris T. et Michael K.. (2008). Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry*, 107, 1120–1130.
- 70- Clark AM. (1996). Natural products as a resource for new drugs. *Pharmaceut Res*, 13:1133-44.
- 71- Clave D. (2012). Fiche technique bactériologie. Laboratoire de Bactériologie Hygiène, CHU de Toulouse - Institut Fédératif de Biologie, 3p.
- 72- Conti B., Canale A., Bertoli A., Gozzini F. et Pistelli. L. (2010). Essential oil composition and larvicidal activity of six Mediterranean aromatic plants against the mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res*, 107 : 1455-1461.
- 73- Council of Europe (COE) (2007). European Directorate for the Quality of Medicines. European Pharmacopoeia 6th Edition. Strasbourg.

- 74- Cox S.D., Mann C.M. et Markham J.L. (2001). Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Microbiol*, 91: 492-7.
- 75- Curini M., Bianchi A., Epifano F., Bruni R., Torta L. et Zambonelli A. (2003). Composition and in vitro antifungal activity of essential oils of *Erigeron canadensis* and *Myrtus communis* from France. *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 39, No. 2, 191-194.
- 76- Djilani A. et Dicko A. (2012). The therapeutic benefits of essential oils. In: Bouayed J, editor. Nutrition, well-being and health. *In Tech*, 155-78.
- 77- Dell'Agli M., Sanna C., Rubiolo P., Basilico N., Colombo E., Scaltrito M. M., Ndiath M. O., Maccarone L., Taramelli D., Bicchi C., Ballero M. et Bosisio E. (2012). Anti-plasmodial and insecticidal activities of the essential oils of aromatic plants growing in the Mediterranean area. *Malaria Journal*, 11 : 219.
- 78- Deriu A., Branca G., Molicotti P., Pintore G., Chessa M., Tirillini B., Paglietti B., Mura A., Sechi L.A., Fadda G. et Zanetti S. (2007). In vitro activity of essential oil of *Myrtus communis* L. against *Helicobacter pylori*. *Letters to the Editor/International Journal of Antimicrobial Agents*, 30: 562-565.
- 79- Deruaz D., Reynaud J. et Raynaud. J. (1993). Evaluation of the molluscicidal properties of *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). *Phytotherapy Research*, Vol.7, 428-430.
- 80- Edris A.E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytother. Res.*, 21, 308-323.
- 81- Elfellah M.S., Akhter M.H. et Khan M.T. (1984). Anti-hyperglycaemic effect of an extract of *Myrtus communis* in streptozotocin-induced diabetes in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 11, 275-281.
- 82- Enrico V., Papini A., Baldo F. et Zhan J. M. (2004). Etude expérimentale du renfort de l'immunité par le sirop du père Michel (POE 20). Institut de Sciences Naturopathiques (ISN)-C.R.A.O., 1-6.
- 83- Fahim A. B., El-Ghaithi M., Ramesh S. et Dhayabaran D. (2009). Biochemical studies on the effect of phenolic compounds extracted from *Myrtus communis* in diabetic rats. *Tamilnadu J Vet Anim Sci*, 5 (3), 87-93.
- 84- Fang J.-Y., Hung C.-F., Hwang T.-L. et Huang Y.-L. (2005). Physicochemical characteristics and in vivo deposition of liposome-encapsulated tea catechins by topical and intratumor administrations. *Journal of Drug Targeting*, January, 13(1) : 19-27.
- 85- Farah A., Afifi A., Fechtal M., Chhen A., Satrani B., Talbi M. et Chaouch A. (2006). Fractional distillation effect on the chemical composition of Moroccan myrtle essential oils. *Flav. Frag. J.*, 21, 351-354.

- 86- Farah D., Tran D. X., Masaaki Y. et Shinkichi T. (2008). Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. *Food Control*, 19, 346-352.
- 87- Farnaz M., Tahira M., Humayun R., Abdul H. et Shahzad H. (2010). Biological screening of seventeen medicinal plants used in the traditional systems of medicine in Pakistan for antimicrobial activities. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Vol.4 (6), 335-340.
- 88- Feisst C., Franke L., Appendino G. et Werz O. (2005). Identification of molecular targets of the oligomeric nonprenylated acylphloroglucinols from *Myrtus communis* and their implication as anti-inflammatory compounds. *J Pharmacol Exp Ther*, 315 : 389-396.
- 89- Flamini G., Cioni P. L., Morelli I., Maccioni S. et Baldini R. (2004). Phytochemical typologies in some populations of *Myrtus communis* L. on Caprione Promontory (East Liguria, Italy). *Food Chemistry*, 85, 599-604.
- 90- Foudil-Cherif Y., Boutarene N. et Yassaa N. (2013). Chemical composition of essential oils of Algerian *Myrtus communis* and chiral analysis of their leave volatiles. *Journal of Essential Oil Research*, 25 : 5, 402-408.
- 91- Freeman L. et Carel Y. (2006). Aromathérapie. NUTRA NEWS Science, Nutrition, Prévention et Santé. [http:// www. nutranews.org](http://www.nutranews.org).
- 92- Gauthier R., Agoumi A. et Gourai M. (1988). Activity of the extracts of *Myrtus communis* against *Pediculus humanis capitis*. *Plant Med Phytother*, 23(2), 25-108.
- 93- Gauthier R., Agoumi A. et Gourai M. (1989). Activity of *Myrtus communis* extracts against head lice. *Plantes Med Phytother*, 23: 95-108.
- 94- Gavahian M., Farahnaky A., Javidnia K. et Majzoobi M. (2013). A novel technology for extraction of essential oil from *Myrtus communis*: ohmic-assisted hydrodistillation. *Journal of Essential Oil Research*, 25:4, 257-266.
- 95- Ghannadi A. et Dezfuly N. (2011). Essential oil analysis of the leaves of Persian true myrtle. *Int. J. Med. Arom. Plants*, Vol. 1, No. 2, 48-50.
- 96- Ghasemi E., Raofie F. et Mashkouri-Najafi N. (2010). Application of response surface methodology and central composite design for the optimisation of supercritical fluid extraction of essential oils from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chem.*, 126, 1449-1453.
- 97- Gortzi O., Lalas S, Chinou I et Tsaknis J (2008). Reevaluation of bioactivity and antioxidant activity of *Myrtus communis* extract before and after encapsulation in liposomes. *Eur Food Res Technol*, 226 : 583-90.
- 98- Guezlane Tebibel N., Kahlouche Madaoui B. et Athmani Guemouri S. (2008). Polycopié de Microbiologie : Travaux Pratiques. Ed : office des publications universitaires (OPU),

Alger, 120-121.

99- Guiraud J.-P. (1998). Microbiologie alimentaire, Dunod, Paris, p 72 et 74.

100- Gündüz G. T., Gönül Ş. A. et Karapinar M. (2009). Efficacy of myrtle oil against *Salmonella Typhimurium* on fresh produce. *International Journal of Food Microbiology* 130 : 147-150.

101- Gustafson J.E., Liew Y.C., Chew S., Markham J.L., Bell H.C., Wyllie S.G. et Warmington J.R. (1998). Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 26, 194-198.

102- Hayder N., Abdelwahed A., Kilani S., Ben Ammar R., Mahmoud A., Ghedira K. et Chekir-Ghedira L. (2004). Anti-genotoxic and free radical scavenging activities of extracts from (Tunisian) *Myrtus communis*. *Mutat. Res.*, 564, 89–95.

103- Hayder N., Bouhlel I., Skandrani I., Kadri M., Steiman R., Guiraud P., Mariotte A.M., Ghedira K., Dijoux-Franca M.G. et Chekir-Ghedira L. (2008). In vitro antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-*o*-galactoside and myricetin-3-*o*-rhamnoside from *Myrtus communis*: modulation of expression of genes involved in cell defence system using cDNA microarray. *Toxicology in Vitro*, 22, 567–581.

104- Hedayati A., Khosropanah H., Bazargani A., Abed M. et Emami A. (2013). Assessing the Antimicrobial Effect of the Essential Oil of *Myrtus communis* on the Clinical Isolates of *Porphyromonas gingivalis*: An in vitro Study. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.*, 8(4) : 165-8.

105- Holt J. G., Krieg N. R., Sneath Peter H. A., Staley J. T. et Williams Stanley T. (2000). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Lippincott Williams et Williams, 9th ed, Philadelphia, USA, 787 p.

106- Hsueh, P.R., Chen, M.L., Sun, C.C., Chen, W.H., Pan, H.J., Yang, L.S., Chang, S.C., Ho, S.W., Lee, C.Y., Hsieh, W.C. et Luh, K.T. (2002). Antimicrobial drug resistance in pathogens causing nosocomial infections at a university hospital in Taiwan, 1981-1999. *Emerg. Infect. Dis.*, 8: 63-68.

107- Inan Ö., Özcan M. M. et Al Juhaimic F.Y. (2012). Antioxidant effect of mint, laurel and myrtle leaves essential oils on pomegranate kernel, poppy, grape and linseed oils. *Journal of Cleaner Production*, 27, 151-154.

108- Jamoussi B., Romdhane M., Abderraba A., Hassine B. et Gadri A. (2005). Effect of harvest time on the yield and composition of Tunisian myrtle oils. *Flav. Frag. J.*, 20, 274-277.

109- Jerkovic I., Radonic A. et Borcic, I. (2002). Comparative study of leaf, fruit and flower essential oils from Croatian *Myrtus communis* L. during a one-year vegetative cycle. *J. Essent. Oil Res.*, 14, 266-270.

- 110- Joffin J.-N. et Leyral G. (2001). Microbiologie Technique. 1- Dictionnaire des techniques. Collection Biologie technique 3^{ème} éd. CRDP d'Aquitaine, Bordeaux, 320p.
- 111- Juven B.J., Kanner J., Schved F. et Weisslowicz H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.*, 76, 626-631.
- 112- Kayedi M. H., Haghdoost A. A., Salehnia A. et Khamisabadi K.. (2014). Evaluation of repellency effect of essential oils of *Satureja khuzestanica* (Carvacrol), *Myrtus communis* (myrtle), *Lavendula officinalis* and *Salvia sclarea* using Standard WHO repellency tests. *J Arthropod-Borne Dis*, 8(1): 60-68.
- 113- Kelen M. et Tepe B. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Biores.Technol.*, 99, 4096-4104.
- 114- Khani A. et Basavand F. (2012). Chemical composition and insecticidal activity of myrtle (*Myrtus communis* L.) essential oil against two stored-product pests. *Journal of Medicinal Plants and By-products*, 2: 83-89.
- 115- Khan M., Al-Mansour M. A., Mousa A. A. et Alkathlan H. Z. (2014). Compositional characteristics of the essential oil of *Myrtus communis* grown in the central part of Saudi Arabia. *Journal of Essential Oil Research*, 26, No. 1, 13-18.
- 116- Koukos P. K., Papadopoulou K. I. et Papagiannopoulos A. D. (2001). Chemicals from Greek Forestry Biomass : Constituents of the leaf oil of *Myrtus communis* L. grown in Greece. *J. Essent. Oil Res.*, 13, 245-246.
- 117- Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P.J. et Nychas G.-J.E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453-462.
- 118- Lamiri A., Lhaloui S., Benjilali B. et Berrada M. (2001). Insecticidal effects of essential oils against Hessian fly, *Mayetiola destructor* (Say). *Field Crops Research*, 71, 9-15.
- 119- Larpent J.-P. et Larpent-Gourgand M. (1997). Mémento technique de microbiologie. 3^{ème} éd. Tec & Doc Lavoisier, Paris, p 71, 77, 79 et 82.
- 120- Le Floc'h E. (1983). Contribution à une étude ethnobotanique de la Flore Tunisienne. Tunisia: Imprimerie Officielle de la République Tunisienne.
- 121- Le Minor L. et Richard C. (1993). Méthodes de laboratoire pour l'identification des entérobactéries, Ed Institut Pasteur, Paris, , p 163, 165, 177 et 178.

- 122- Lucini E.I., Zunino M.P., Lopez M.L. Zygadlo J.A. (2006). Effect of monoterpenes on lipid composition and sclerotial development of *Sclerotium cepivorum* Berk. *J.Phytopathol.*, 154, 441-446.
- 123- Mahboubi M. et Bidgoli G. F. (2010). In vitro synergistic efficacy of combination of amphotericin B with *Myrtus communis* essential oil against clinical isolates of *Candida albicans*. *Phytomedicine*, 17 : 771-774.
- 124- Mahdi N. K., Gany Z. H. et Sharief M. (2006). Alternative drugs against *Trichomonas vaginalis*. *Eastern Mediterranean Health Journal*, Vol. 12, No. 5, 679-684.
- 125- Mahmoud Barakat S. M., Yamazaki K., Miyashita K., Il-Shik S., Dong-Suk C. et Suzuki T. (2004). Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds. *Food Microbiology.*, 21, 657-666.
- 126- Mansouri S., Foroumadi A., Ghaneie T. et Najjar AG. (2001). Antibacterial activity of the crude extracts and fractionated constituents of *Myrtus communis*. *Pharm Biol*, Vol. 39, No. 5, 399-401.
- 127- Marchini G., Maccioni S. (1998). Liguria in parole povere. La bassa Val di Magra. Genova : Sagep.
- 128- Martin T., Rubio B., Villaescusa L., Fernandez L. et Diaz A.M. (1990). Polyphenolic compounds from pericarps of *Myrtus communis*. *Pharm Biol*, 37 : 28-1.
- 129- Messaoud C., Zaouali Y., Ben Salah A., Khoudja M.L. et Boussaid M. (2005). *Myrtus communis* in Tunisia: variability of the essential oil composition in natural populations. *Flavour Fragrance J*, 20:577-582.
- 130- Messaoud C. et Boussaid. M. (2011). *Myrtus communis* Berry color morphs : A comparative analysis of essential oils, fatty acids, phenolic compounds and antioxidant activities. *Chemistry and Biodiversity*, Vol. 8, 300-310.
- 131- Messaoud C., Béjaoui A. et Boussaid M. (2011). Fruit color, chemical and genetic diversity and structure of *Myrtus communis* L. var. *italica* Mill. morph populations. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39, 570-80.
- 132- Messaoud C., Laabidi A. et Boussaid M. (2012). *Myrtus communis* L. infusions: the effect of infusion time on phytochemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. *J Food Sci*, 77 (9) : 941-7.
- 133- Migliore J. (2011). Empreintes des changements environnementaux sur la phylogéographie du genre *Myrtus* en méditerranée et au Sahara. Thèse de Doctorat. Discipline: Biologie des populations et Ecologie. Faculté des Sciences et Techniques, Université Paul Cézanne Aix-Marseille III. 250p.

- 134- Miguel M.G., Cruz C., Faleiro L., Simões M.T.F., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G. (2010). *Foeniculum vulgare* essential oils: Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. *Nat Prod Commun*, 5: 319-328.
- 135- Mimica-Dukić, N., Kujundzic, S., Sokovic, M. et Couladis, M. (2003). Essential oil composition and antifungal activity of *Foeniculum vulgare* Mill. obtained by different distillation conditions. *Phytother. Res.*, 17, 368–371.
- 136- Mimica-Dukić N., Bugarin D., Grbović S., Mitić-Ćulafić D., Vuković-Gačić B., Orčić D., Jovin E. et Couladis. M. (2010). Essential oil of *Myrtus communis* L. as a potential antioxidant and antimutagenic agents. *Molecules*, 15, 2759-2770.
- 137- Mohammedi Z. (2006). Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse de Magistère en Biologie. Option: Produits Naturels, Activités biologiques et Synthèse. Faculté des Sciences, Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen, 140p.
- 138- Moradi M., Kaykhaii M., Ghiasvand A. R., Shadabi S. et Salehinia A. (2012). Comparison of Headspace Solid-phase Microextraction, Headspace Single-drop Microextraction and Hydrodistillation for Chemical Screening of Volatiles in *Myrtus Communis* L. *Phytochem. Anal.*, 23, 379-386.
- 139- Motazedian N., Ravan S. et Bandani A. R. (2012). Toxicity and repellency effects of three essential oils against *Tetranychus urticae* koch (acari: tetranychidae). *J. Agr. Sci. Tech.*, Vol. 14: 275-284.
- 140- Mothana R. A. A., Kriegisch S., Harms M., Wende K. et Lindequist U. (2011). Assessment of selected Yemeni medicinal plants for their in vitro antimicrobial, anticancer and antioxidant activities. *Pharmaceutical Biology*, 49 (2) : 200–210.
- 141- Motiejūnaitė O. et Pečiulytė D. (2004). Fungicidal properties of *Pinus sylvestris* L. for improvement of air quality. *Medicina (Kaunas)*, 40 (8) : 787-794
- 142- Motyl M., Dorso K., Barrett J. et Giacobbe R. (2005). Basic microbiological techniques used in antibacterial drug discovery. *Current Protocols in Pharmacology*, 13A.3.1-13A.3.22.
- 143- Mulas M. et Melis R. A. M. (2011). Essential oil composition of myrtle (*Myrtus communis*) leaves. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 17, 21-34.
- 144- Nassar M., Aboutabl E.A., Ahmed R.F., El-Khrisy E.D.A., Ibrahim K.M. et Sleem A.A. (2010). Secondary metabolites and bioactivities of *Myrtus communis*. *Pharmacognosy Res.*, 2, 325-329.
- 145- Omidbaigi R., Yahyazadeh M., Zare R. et Taheri H. (2007). The in vitro action of essential oils on *Aspergillus flavus*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 10 : 1, 46-52.

- 146- Oussalah M., Caillet S. et Lacroix M. (2006). Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 69, 1046-1055.
- 147- Oussou K. R., Kanko C., Guessend N., Yolou S., Koukoua G., Dosso M., N'Guessan Y. T., Figueredo G. et Chalchat J.- C. (2004). Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. *C. R. Chimie*, 7, 1081-1086.
- 148- Owlia P., Saderi H, Rasooli I et Sefidkon F. (2009). Antimicrobial characteristics of some herbal oils on *Pseudomonas aeruginosa* with special reference to their chemical compositions. *Iran J Pharm Res*, 8 (2): 107–14.
- 149- Owlia P., Moein Najafabadi L., Mousavi Nadoshan S., Rasooli I. et Saderi H. (2010). Effects of sub-minimal inhibitory concentrations of some essential oils on virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13:4, 465-476.
- 150- Özek T., Demirci B. et Baser K.H.C. (2000). Chemical composition of Turkish myrtle oil. *J. Essent. Oil Res.*, 12, 541-544.
- 151- Pereira P. C., Cebola M. J. et Bernardo-Gil M. G. (2009). Evolution of the yields and composition of essential oil from portuguese myrtle (*Myrtus comunis* L.) through the vegetative cycle. *Molecules*, 14, 3094-3105.
- 152- Pestana, M.H. et Gageiro, J.N. (2000). Análise de dados para ciências sociais. A complementaridade do SPSS. Edições Sílabo, Lisbon.
- 153- Pezhmanmehr M., Dastan D., Ebrahimi S. N. et Hadian J. (2010). Essential oil constituents of leaves and fruits of *Myrtus communis* L. from Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, Vol 13, Issue 1, 123-129.
- 154- Pirbalouti A. G., Jahanbazi P., Enteshari S., Malekpoor F. et B. Hamedi (2010). Antimicrobial activity of some Iranian medicinal plants. *Arch. Biol. Sci.*, Belgrade, 62 (3), 633-642.
- 155- Pirbalouti A. G., Broujeni V. N., Momeni M., Poor F. M. et Hamedi B. (2011). Antibacterial activity of Iranian medicinal plants against *Streptococcus iniae* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Arch. Biol. Sci.*, Belgrade, 63 (1), 59-66.
- 156- Pistelli L., Noccioli C., D'Angiolillo F. et Pistelli L. (2013). Composition of volatile in micropropagated and field grown aromatic plants from Tuscany Islands. *Acta Biochimica Polonica*, 60, 1, 43-50.
- 157- Pitarokili, D., Couladis, M., Petsikos-Panayotarou, N., Tzakou, O. (2002). Composition and antifungal activity on soil-borne pathogens of the essential oil of *Salvia sclarea* from Greece. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6688-6691.

- 158- Pitarokili, D., Tzakou, O., Loukis, A. et Harvala, C. (2003). Volatile metabolites from *Salvia fruticosa* as antifungal agents in soil borne pathogens. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 3294-3301.
- 159- Pousset J.L., Rey J. P., Levesque J., Coursaget P. et Galen F.X. (1993). Hepatitis B surface antigen (HBs Ag) inactivation and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition in vitro by *Combretum glutinosum* perr. (*Combretaceae*), extracts. *Phytotherapy research*, 7(1), 101-102.
- 160- Prashar A., Locke I.C. et Evans C.S. (2004). Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. *Cell Prolif.*, 37, 221-229.
- 161- Quézel P. et Santa S. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Ed CNRS, Paris, France, p. 636.
- 162- Rahimmalek M., Mirzakhani M. et Pirbalouti A. G. (2013). Essential oil variation among 21 wild myrtle (*Myrtus communis* L.) populations collected from different geographical regions in Iran. *Industrial Crops and Products*, 51, 328-333.
- 163- Randrianarivelo R., Sarter S., Odoux E., Brat P., Lebrun M., Romestand B., Menut C., Andrianoeliso H.S., Raherimandimby M. et Danthu P. (2009). Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. *Food Chem*, 114 : 680-4.
- 164- Rapilly F., 1968. Les techniques de mycologie en pathologie végétale. *Annales des Épiphyties*, 19 (No. H.S.), Paris : INRA, 102 p.
- 165- Rasooli I., Moosavi M. L., Rezaee M. B. et Jaimand K. (2002). Susceptibility of microorganisms to *Myrtus Communis* L. essential oil and its chemical composition. *J. Agric. Sci. Technol.*, Vol. 4: 127-133.
- 166- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. et Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.*, 26 (9-10) : 1231-7.
- 167- Rohlf F.J. (2000). NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software. Applied Biostatistics. New York.
- 168- Rosa A., Melis M. P., Deiana M., Atzeri A., Appendino G., Corona G., Incani A., Loru D. et Dessì M. A. (2008). Protective effect of the oligomeric acylphloroglucinols from *Myrtus communis* on cholesterol and human low density lipoprotein oxidation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 155, 16-23.
- 169- Rosato A., Vitali C., De Laurentis N., Armenise D. et Antonietta Milillo M. (2007). Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine*, 14 : 727-32.

- 170- Rossi P.-G., Berti L., Panighi J., Luciani A., Maury J. et Muselli A. (2007). Antibacterial Action of Essential Oils from Corsica. *J. Essent. Oil Res.*, 19, 176– 182.
- 171- Rossi A., Di Paola R., Mazzon E., Genovese T., Caminiti R., Bramanti P., Pergola C., Koeberle A., Werz O., Sautebin L. et Cuzzocrea S. (2009). Myrtucommulone from *Myrtus communis* exhibits potent anti-inflammatory effectiveness in Vivo. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Vol. 329, No.1, 76–86.
- 172- Sadeghi Nejad B., Erfani Nejad M., Naanaie S. Y. et Zarrin M. (2014). Antifungal Efficacy of *Myrtus communis* Linn. *Jentashapir J Health Res.*, 5(4): e21879.
- 173- Salouage I., Klouz A., Ferchichi H., Charfi R., Ouanes L., Boussaid M. et Lakhal M. (2009). Effect of *Myrtus communis* L. on an experimental model of a rat liver ischemia-reperfusion. In: *Interational Symposium on medicinal an aromatic plants*, p 853.
- 174- Salvagnini L. E., Oliveira J. R. S., Eduardo dos Santos L., Moreira R. R. D. et Pietro Rosemeire Cristina L. R. (2008). Avaliação da atividade antibacteriana de folhas de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). *Brazilian Journal of Pharmacosy*, 18(2): 241-244.
- 175- Savikin-Fodulovic Katarina P., Bulatovic Vanja M., Menkovic Nebojsa R. et Grubisic Dragoljub V. (2000). Comparison between the essential oil of *Myrtus communis* L. obtained from naturally grown and in vitro plants. *Journal of Essential Oil Research*, 12:1, 75-78.
- 176- Schiffelers R. M., Bakker-Woudenberg Irma A.J.M., Sniijders S. V. et Gert S. (1999). Localization of sterically stabilized liposomes in *Klebsiella pneumoniae*-infected rat lung tissue: influence of liposome characteristics. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1421, 329-339.
- 177- Senatore F., Formisano C., Napolitano F., Rigano D. et zcan M. (2006). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Myrtus communis* L. growing wild in Italy and Turkey. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 9:2, 162-169.
- 178- Sepici A., Gürbüz I., Çevvik C. et Yesilada E. (2004). Hypoglycaemic effects of myrtle oil in normal and alloxan-diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*, 93, 311-318.
- 179- Sepici-Dincel A., Açıkgoz Ş., Çevik C., Sengelen M. et Yeşilada E. (2007). Effects of *in vivo* antioxidant enzyme activities of myrtle oil in normoglycaemic and alloxan diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*, 110, 498-503.
- 180- Serce S., Ercisli S., Sengul M., Gunduz K. et Orhan E. (2010). Antioxidant activities and fatty acid composition of wild grown myrtle (*Myrtus communis* L.) fruits. *Pharmacogn Mag*, 6: 9-12.
- 181- Sharma N. et Tripathi A. (2006). Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22 : 587–593.
- 182- Singleton P. (2005). Bactériologie : Pour la médecine, la biologie et les biotechnologies.

6^{ème} édition, DUNOD, Paris, 468 et 326.

183- Snoussi A., Chaabouni M. M. et Bouzouita N. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of *Myrtus communis* L. floral buds essential oil. *Journal of Essential Oil Research*, Vol. 23, 10-14.

184- Sökmen, M., Serkedjleva, J., Dalerera, D., Gulluce, M., Pollsslou, M., Tape, B., Akpulat, H.A., Sahin, F., Sökmen, A., 2004. In vitro antioxidant, antimicrobial and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 3309-3312.

185- Soković M. et Leo J.L.D. van Griensven. (2006). Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *European Journal of Plant Pathology*, 116:211–224.

186- Soltis D.E., Smith S.A., Cellinese N., Wirdack K.J., Tank D.C., Brockington S.F., Refulio-Rodriguez N.F., Walker J.B., Moore M.J., Carlsward B.S., Bell C.D., Latvis M., Crawley S., Black C., Diouf D., Xi Z., Rushworth C.A., Gitzendanner M.A., Sytsma K.J., Qiu Y.-L., Hilu K.W., Davis C.C., Sanderson M.J., Beaman R.S., Olmstead R.G., Judd W.S., Donoghue M.J. et Soltis P.S. (2011). Angiosperm phylogeny: 17 genes, 640 taxa. *American Journal of Botany*, 98 (4), 704-730.

187- Sonboli A., Eftekhar F., Yousefzadi M., et Kanani M. R. (2005). Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Grammosciadium platycarpum* Boiss. from Iran. *Z. Naturforsch.*, 60c, 30-34.

188- Sonboli A., Babakhani B. et Mehrabian A. R. (2006). Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. *Z. Naturforsch.*, 61c, 160-164.

189- Stiegler V. (2003). Les méthodes de détection des salmonelles en agro-alimentaire. Thèse pour obtenir le grade de Docteur vétérinaire. Université Claude-Bernard, Lyon (France), 141p.

190- Sumbul S., Aftab M. A., Asif M. et Akhta M. (2011). *Myrtus communis* Linn. A review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, Vol. 2(4) : 395-402.

191- Sumbul S., Ahmad M. A., Asif M., Saud I. et Akhtar M. (2010). Evaluation of *Myrtus communis* Linn. berries (common myrtle) in experimental ulcer models in rats. *Hum Exp Toxicol*, 29(11) : 935-944.

192- Taheri A., Seyfan A., Jalalinezhad S. et Nasery F. (2013). Antibacterial effect of *Myrtus communis* hydro-alcoholic extract on pathogenic bacteria. *Zahedan J Res Med Sci*, 15(6) :19-24.

193- Tavassoli M., Shayeghi M., Abai M.R., Vatandoost H., Khoobdel M., Salari M., Ghaderi

- A. et Rafi F. (2011). Repellency Effects of essential oils of myrtle (*Myrtus communis*), marigold (*Calendula officinalis*) Compared with DEET against *Anopheles stephensi* on human volunteers. *Iran J Arthropod-Borne Dis*, 5 (2) : 10–22.
- 194- Tayoub G., Abu Alnaser A., Ghanem. I. (2012). Fumigant activity of leaf essential oil from *Myrtus communis* L. against the Khapra Beetle. *Int. J. Med. Arom. Plants.*, Vol. 2, No. 1, 207-213.
- 195- Topuz, E. et Erler, F. (2007). Bioefficacy of some essential oils against the carmine spider mite, *Tetranychus cinnabarinus*, Fresen. *Environ. Bull.*, 16: 1498-1502.
- 196- Traboulsi A. F., Taoubi K., El-Haj S., Bessiere J.M. et Rammal S. (2002). Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). *Pest Manag Sci*, 58 : 491-495.
- 197- Tretiakova I., Blaesius D., Maxia L., Wesselborg S., Schulze-Osthoff K., Cinatl Jr J., M. Michaelis et Werz. O. (2008). Myrtucommulone from *Myrtus communis* induces apoptosis in cancer cells via the mitochondrial pathway involving caspase-9. *Apoptosis*, 13 : 119–131.
- 198- Tuberoso C. I. G., Barra A., Angioni A., Sarritzu E. et Pirisi F. M. (2006). Chemical composition of volatiles in Sardinian myrtle (*Myrtus communis* L.) alcoholic extracts and essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 1420-1426.
- 199- Tuberoso C.I.G., Meli, M., Angion, A., Pala M. et Cabras P. (2007). Myrtle hydroalcoholic extracts obtained from different selections of *Myrtus communis* L. *Food Chem.*, 101, 806-811.
- 200- Ultee, A., Bennik, M.H. et Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 1561-1568.
- 201- Viuda-Martos M., Sendra E., Pérez-Alvarez J. A. et Fernández-López J. (2011). Identification of flavonoïd content and chemical composition of the essential oils of Moroccan herbs: myrtle (*Myrtus communis* L.), rockrose (*Cistus ladanifer* L.) and Montpellier cistus (*Cistus monspeliensis* L.). *Essent. Oil Res.*, 23, 1-9.
- 202- Weyerstahl P. et Marschall H. (1994). Constituents of the essential oil of *Myrtus communis* L. from Iran. *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 9, 333-337.
- 203- Wilson C.L., Solar J.M., El Ghaouth A. et Wisniewski M.E., (1997). Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.*, 81, 204-210.
- 204- Wolff S.P. et Dean R. (1987). Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of autoxidative glycosylation in diabetes. *Biochem J*, 245: 243-250.

- 205- Xing Y., Xu Q., Li X., Che Z. et Yun J. (2012). Antifungal activities of clove against *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum* in vitro and in wounded fruit test. *Journal of Food Safety*, 32, 84-93.
- 206- Yadegarinia D., Gachkar L., Rezaei M. B., Taghizadeh M., Astaneh S. A. et Rasooli I. (2006). Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochemistry* 67: 1249-1255.
- 207- Yokozawa T., Oura, H., Sakanaka, S., Ishigaki, S. et Kim, M. (1994). Depressor effect of tannin in green tea on rats with renal hypertension. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58, 855-858.
- 208- Zaidi S. F., Muhammad J. S., Shahryar S., Usmanhanic K., Gilanib A.-H., Jafri W. et Sugiyama T. (2012). Anti-inflammatory and cytoprotective effects of selected Pakistani medicinal plants in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 141, 403-410.
- 209- Zanetti S., Cannas S., Molicotti P., Bua A., Cubeddu M., Porcedda S., Marongiu B. et Sechi L.A. (2010). Evaluation of the antimicrobial properties of the essential oil of *Myrtus communis* L. against clinical strains of *Mycobacterium spp.* *Interdisc Perspect Infect Dis*, 1-4.
- 210- Ziyat A., Legssyer A., Mekhfi H., Dassouli A., Serhrouchni M. et Benjelloun W. (1997). Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *J Ethnopharmacol*, 58 : 45-54.
- 211- Zomorodian K., Moein M., Lori Z. G., Ghasemi Y., Rahimi M. J., Bandegani A., Pakshir K., Bazargani A., Mirzamohammadi S. et Abbasi N. (2013). Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oil from *Myrtus communis* leaves. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16:1, 76-84.

Annexes

Annexe 1

1. Milieu d'enrichissement utilisé : (Guiraud, 1998)

1.1. Bouillon nutritif (= milieu BN).

- * Peptone10g
- * Extrait de viande5g
- * Chlorure de sodium (facultatif selon la formule)5g

pH 7,2 Autoclaver 20minutes à 120C°.

2. Milieux de culture utilisés : (Guiraud, 1998)

2.1. Chapman (= gélose mannitol) :

- * Extrait de viande1g
- * Peptones.....10g
- * Chlorure de sodium75g
- * Mannitol10g
- * Rouge de phénol0,025g
- * Agar...15g

pH 7,4 Autoclaver 15 minutes à 120C°.

2.2. Hektoen (gélose) :

- * Protéose – peptone12g
- * Extrait de levure3g
- * Chlorure de sodium5g
- * Thiosulfate de sodium5g
- * Sels biliaires9g
- * Citrate de fer ammoniacal1,5g

* Salicine	2g
* Lactose	12g
* Saccharose	12g
* Fuschine acide	0,1g
* Bleu de bromotymol	0,065g
* Agar..	13g

pH 7,6 stériliser par 5mn d'ébullition (ne pas autoclaver).

2.3. Mac Conkey :

* Peptone tryptique de gélatine	17g
* Peptone de viande et de caséine.....	3g
* Lactose.....	10g
* Sels biliaires.....	5g
* Chlorure de sodium.....	5g
* Rouge neutre.....	0,040 g
* Agar.....	13g

pH 7,4. Autoclaver 15 mn à 120 °C.

2.4. S.S (= gélose pour isolement de *Salmonella- Shigella*) :

* peptone	10g
* Extrait de viande	5g
* Lactose	10g
* Sels biliaires	6g
* Citrate de sodium	8,5g
* Citrate de fer ammoniacal	1g

- * Thiosulfate de sodium8,5g
- * Rouge neutre0,025g
- * Vert brillant0,00033g
- * Agar..13g

PH 7 Stériliser par 1 à 2mn d'ébullition (ne pas autoclaver).

3. Milieux d'identification : (Guiraud, 1998)

3.1. Simmons (gélose au citrate de).

- * Sulfate de magnésium0,2g
- * Phosphate monoammoniaqué1g
- * Phosphate dipotassique1g
- * Citrate de sodium2g
- * Chlorure de sodium5g
- * Bleu de bromothynol0,080g
- * Agar..12g

pH 6,8 répartir en tube à essais (6 à 8ml). Autoclaver 20mn à 120C° solidifier en position inclinée ou semi-inclinée.

3.2. TSI (=gélose glucose-lactose-saccharose- H₂S)

- * Peptone20g
- * Extrait de viande3g
- * Extrait de levure3g
- * Chlorure de sodium5g
- * Glucose1g
- * Lactose10g
- * Saccharose10g

- * Citrate de fer0,5g
- * Hyposulfite de sodium0,5g
- * Rouge de phénol0,025g
- * Agar.....12g

pH 7,4 répartir en tubes à essais (7 à 9ml). Autoclaver 15mn à 195C° solidifier en position semi inclinée.

3.3. Mannitol- mobilité (MM)

- * Peptone20g
- * Nitrate de potassium1g
- * Mannitol2g
- * Rouge de phénol0,0004g
- * Agar.....4g

pH 8,1 répartir en tubes à essais (8 à 10ml) Autoclaver 15mn à 120C°. solidifier en culot.

3.4.Urée-Indole (=milieu de Fergusson)

- * Tryptophane3g
- * Phosphate monophasique1g
- * Phosphate lipotassique1g
- * Chlorure de sodium5g
- * Urée20g
- * Alcool à 95C°10mL
- * Rouge de phénol0,025g

pH 6,7 stériliser par filtration répartir aseptiquement en tubes à essais (2 à 5ml).

3.5. Möller (milieu de base pour étude des décarboxylations)

- * Peptone pepsique de viande.....5g

- * Extrait de viande5g
- * Pourpre de bromocrésol.....0,1g
- * Rouge de crésol0,005g
- * Pyridoxal0,005g
- * Glucose0,5g

pH 6 répartir en tubes à essais (9 à 10ml). Autoclaver 15mn à 120C°.

Les tests décarboxylation (LDC, ODC) et le test dihydrolase (ADH) sont réalisés en ajoutant à chaque tube de milieu de base 1ml de la lysine, l'ornithine et l'arginine à 10%.

3.6. Nitrate de potassium (Bouillon nutritif au nitrate de potassium)

- * Bouillon nutritif1L
- * Nitrate de potassium1g

pH 7, répartir en tubes à essais (7 à 10ml). Autoclaver 15 mn à 120C°.

3.7. Clark et Lubs (milieu de culture)

- * Peptone10g
- * Phosphate dipotassique2g
- * Glucose5g

pH 7, répartir en tubes à essais (5ml). Autoclaver 20mn à 120C°.

3.8. Cerveille-cœur (bouillon)

- * Protéose-peptone10g
- * Infusion de cerveau de veau12,5g
- * Infusion de cœur de bœuf5g
- * Chlorure de sodium5g
- * Phosphate disodique2,5g
- * Glucose2g

pH 7,4 répartir en tubes à essais (9 à 10ml). Autoclaver 15 mn à 120C°.

3.9. Mueller Hinton (gélose pour antibiogramme)

* Extrait de viande	2g
* Hydrolysate acide de caséine	17,5g
* Amidon	1,5g
* Agar.....	10g

pH 7,4. Autoclaver 15mn à 120C°.

3.10. ADNase (gélose ADN)

* Trypticase	15g
* Phytone	5g
* Chlorure de sodium	5g
* Acide désoxyribonucléique (ADN)	2g
* Agar.....	15g

pH 7,3. Autoclaver 15mn à 120C°.

3.11. Glucose – lactose – H₂S (milieu de Hajna-Kligler)

* Extrait de viande de bœuf	3g
* Extrait de levure	3g
* Peptone tryptique ou pancréatique de fibrine	20g
* Chlorure de sodium	5g
* Citrate ferrique	0,3g
* Thiosulfate de sodium	0,3g
* Lactose	10g
* Glucose	1g

* Rouge de phénol0,05g

* Agar12g

* Eau distillée1L

pH 7,4 répartir en tubes à essais (8 à 10ml). Autoclaver 15mn à 115C°.

Refroidir en position inclinée, de façon à obtenir un culot de 3cm environ et une pente d'environ 5cm.

4. PDA (Potatoes Dextrose Agar=milieu de culture pour les champignons)

* Pomme de terre.....200g

* Agar.....20g

* Glucose.....20g

* Eau distillé.....1L

Acidifier à pH 4, 5. Autoclaver 15mn à 120C°.

Annexe 2

Caractérisation physicochimique des huiles essentielles

1. Mesure des indices chimiques :

1.1. Mesure du pH :

a. Principe :

Consiste au mesurage au moyen de pH-mètre approprié, de la différence de potentiel existant entre deux électrodes plongées dans un échantillon.

b. Mode d'opérateur :

Tout d'abord, il est nécessaire d'étalonner le pH-mètre en utilisant des solutions tampons. Si le pH-mètre ne comprend pas un système de correction de la température, la température de solution tampon doit être amenée à $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

c. Lecture:

Il est important d'effectuer au moins deux déterminations sur le même échantillon et d'adopter la moyenne arithmétique comme résultat si les conditions de la répétabilité sont remplies, dans le cas contraire effectuer à nouveau des déterminations.

1.2. Détermination de l'indice d'acide : (AFNOR, 1986 ; NFT 75-103)

a. Définition :

L'indice d'acide est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'huile essentielle.

b. Principe :

est la neutralisation des acides libres par une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium titrée.

c. Détermination :

Introduire la prise d'essai (0.5g de H.E) dans le ballon ou la fiole, ajouter 5ml d'éthanol à 95% et 5 gouttes de solution de phénolphthaléine (0.2%) comme indicateur coloré et neutraliser le liquide avec la solution d'hydroxyde de potassium (0.1N) contenue dans la burette.

d. Expression des résultats :

Le calcul de l'indice d'acide (IA) est donné par la formule suivante:

$$I_A = 5.61 \times V/m$$

Où :

V: est le volume en ml de la solution de KOH utilisée.

m: est la masse en g de la prise d'essai.

Si le volume d'hydroxyde de potassium est inférieur à 3ml, recommencer l'essai sur une prise d'essai plus importante.

1.3. Détermination de l'indice de peroxyde : (AFNOR, 1986 ; NFT 60-220)

a. Définition :

C'est le nombre de microgrammes actif du peroxyde contenu dans un gramme de produit et oxydant l'iodure de potassium avec libération d'iode.

b. Principe :

Le principe repose sur le traitement d'une prise d'essai, en solution dans l'acide acétique et du chloroforme, par une solution d'iodure de potassium, puis le titrage de l'iode par une solution titrés de thiosulfate de sodium.

c. Mode opératoire :

Dans une nacelle en verre, peser 2g de l'huile, dissoudre dans 10ml de chloroforme par agitation, on ajoute 15ml d'acide acétique pur et 1ml de solution d'iodure de potassium saturée récemment. Le flacon est fermé, agité et on laisse reposer 5 minutes à l'abri de lumière puis y ajouter 75ml d'eau distillée et quelques gouttes d'empois d'amidon (indicateur d'iode libéré).

L'iode libéré est titré avec une solution de thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0.01N. Parallèlement, un essai à blanc est réalisé dans les mêmes conditions.

d. Expression des résultats :

L'indice de peroxyde, exprimé en microgrammes d'oxygène actif par gramme, est calculé comme suit :

$$\text{Indice de peroxyde} = 8000 \times V/E$$

Où

V: volume en ml de la solution titrée de thiosulfate de sodium corrigé par l'essai à blanc.

E: prise d'essai en g.

L'indice de peroxyde peut être exprimé en milliéquivalents d'oxygène actif par kilogramme de corps gras selon la formule:

Indice de peroxyde exprimé en microgrammes par gramme x 1/8.

1.4. Détermination de l'indice de saponification : (AFNOR, 1988 ; NFT 60-206)

a. Définition :

L'indice de saponification représente le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire pour transformer en savon les acides gras et les glycérides d'un gramme de corps gras.

b. Principe :

Le principe consiste à titrer l'excès d'hydroxyde de potassium en solution par l'acide chlorhydrique. La réaction de saponification étant lente et incomplète, il faut opérer dans un milieu alcoolique à température élevée et en présence d'un excès de base, pour l'accélérer et la rendre aussi complète que possible.

c. Mode d'opérateur :

On pèse 2g d'huile dans une fiole puis on ajoute 25 ml de solution éthanolique d'hydroxyde de potassium (KOH) 0.5N. On adapte au réfrigérant la fiole contenant le mélange sous une légère ébullition. Après une heure, on arrête le chauffage puis on ajoute 4 à 5 goûtes de phénophtaléine. La solution savonneuse est titrée avec une solution d'acide chlorhydrique (HCL) 0.5N. Faire un essai à blanc dans les mêmes conditions.

d. Expression des résultats :

L'indice de saponification est donné par la formule suivante:

$$\text{Indice de saponification} = (V_0 - V_1) \times N \times 56.1/m$$

Où

V_0 : volume en ml d'HCL utilisé pour l'essai à blanc.

V_1 : volume en ml d'HCL utilisé pour la détermination.

N : normalité de la solution chlorhydrique titrée HCl 0.5 N.

m : poids en g de la prise d'essai.

2. Mesure des grandeurs physiques :

2.1. Détermination de l'indice de réfraction : (AFNOR, 1986 ; NFT 75-112)

a. Définition :

L'indice de réfraction est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence du rayon lumineux de longueur d'onde déterminée dans l'air et le sinus de l'angle de réfraction du rayon réfracté passant à travers l'huile essentielle maintenue à une température constante.

La longueur d'onde spécifiée est $(589,3 \pm 0,3)$ nm correspond aux radiations D1 et D2 du spectre de sodium. La température de référence est 20°C sauf pour les huiles essentielles qui ne sont pas à l'état liquide à cette température, dans ce cas, adopter les températures de 25°C ou de 30°C, suivant les points de fusion des huiles essentielles considérées .

b. Principe :

Suivant le type d'appareil utilisé, soit mesurage direct de l'angle de réfraction, soit l'observation de la limite de réflexion totale, l'huile étant maintenue dans des conditions d'isotropisme et de transparence.

c. Mode d'opérateur :

L'indice de réfraction à 20°C, notée n_d^t est mesurée à l'aide d'un réfractomètre d'ABBE de type à angle de réfraction. Avant de procéder à la mesure, faire passer un courant d'eau dans le réfractomètre afin de maintenir l'appareil à la température à laquelle les lectures doivent être effectuées, cette température ne doit pas différer de la température de référence de plus ou moins 0.2°C et doit être maintenue à $\pm 0.2^\circ\text{C}$. L'appareil est d'abord étalonné avec de l'eau distillée. Pour cela, quelques gouttes d'eau sont déposées sur le prisme puis laissées pendant 5 min, le temps que sa température s'équilibre avec celle de l'appareil et du laboratoire. L'indice de réfraction est alors lu sur le réfractomètre. Avant de le placer dans l'instrument, porter l'échantillon pour essai à une température à peu près égale à celle à laquelle le mesurage doit être effectué. Attendre, pour effectuer la lecture, que la température soit stable.

d. Expression des résultats :

L'indice de réfraction n_D^t , à la température de référence t , est donné par la formule :

$$n_D^t = n_D^{t'} + 0,0004 (t' - t)$$

Où

$n_D^{t'}$: indice de réfraction à 20°C

t' : température de la salle au moment de la mesure (°C)

t : température de référence (20°C)

n_D^t : est la valeur de la lecture, obtenue à la température t' , à laquelle a été effectuée la détermination.

Il est à noter que l'indice de réfraction des huiles essentielles varie de 0,0004 par degré autour de 20°C.

2.2. Détermination de la densité relative à 20°C : (AFNOR, 1988 ; NFT 60-214)

Elle est faite à l'aide d'un pycnomètre (à 20°C). Après avoir mesuré le pycnomètre sec et propre, on note le poids P1 puis on le remplit avec l'échantillon d'huile. On le met dans un bain marie à température constante (20°C).

Après avoir essuyé l'huile écoulée, on pèse l'ensemble avec une balance de précision, ensuite on note le poids P2. La différence de poids (P2-P1) donne le poids de l'échantillon d'huile. Ce poids est divisé par le volume du Pycnomètre pour la densité de l'huile en g/ml.

Annexe 3

Tests d'identification biochimique

1. Test de l'oxydase : (Brossard *et al.*, 1997)

Faire une suspension dense de bactérie dans 0,5ml d'eau physiologique et rajouter un disque oxydase.

2. Test de l'ONPG : (Larpent *et al.*, 1997)

Ajouter à une suspension dense dans 0,5ml d'eau physiologique un disque ONPG. Placer au bain marie à 37 °C.

3. Test de nitrate réductase : (Leminor et Richard, 1993)

A une culture en milieu nitrate de 18-24h, ajouter 5 gouttes du réactif I de Griess, puis 5 gouttes du réactif II de Griess. Agiter. Si la réaction de Griess est négative, ajouter une petite quantité de poudre de zinc au milieu incolore, Agiter 5mn.

4. Test sur citrate de Simmons : (Leminor et Richard, 1993)

Par une strie centrale et longitudinale, ensemercer la pente avec anse chargée d'une culture prélevée sur un milieu gélosé ou d'une suspension bactérienne en eau physiologie. Incuber à 37C° pendant 24h.

5. Test sur milieu de Hajna-Kligler et sur TSI : (Larpent *et al.*, 1997)

La pente est ensemercée par stries serrées, le culot par piqûre profonde et centrale. Incuber à 37C° pendant 24h.

6. Test sur mannitol-molbilité : (Singleton, 2005)

Ensemencer par piqûre centrale. Incuber à 37C° pendant 24h.

7. Test de l'indole : (Brossard *et al.*, 1997)

Ajouter quelques gouttes du réactif de Kovax à une suspension dense de bactérie en milieu « urée-indole » ou en eau peptonée après 24 heures à 37C° agiter et laisser reposer.

8. Test d'uréase : (Singleton, 2005)

Dans 0,5 ml de milieu « urée-indole », faire une suspension aussi dense que possible à partir de culture sur milieu gélosé. Incuber à 37C°/24h.

9. Test de TDA : (Brossard *et al.*, 1997)

A 4 gouttes d'une culture très abondante sur milieu urée indole, ajoute 1 goutte de Perchlorure de fer.

10. Test de Voges-Proskauer (milieu de Clark et Lubs):(Brossard *et al.*, 1997)

➤ **Réaction de VP :**

Ensemencer avec 1 goutte d'une suspension bactérienne dense à l'eau physiologique dans 1 ml de milieu Clark et Lubs (CL). Incuber pendant 24h. Après ce délai, ajouter 0,5ml d'une solution alcoolique d' α -naphtol et 0,5ml de NaOH. Chauffer avec précaution sur la flamme d'un bec bunsen jusqu'à commencement d'ébullition. Agiter pendant 30S.

➤ **Réaction de RM :**

Ensemencer comme précédemment 1ml de milieu CL, Après 24h, verser 1 goutte de solution de rouge de méthyle.

11. Tests des décarboxylases : (LDC-ODC-ADH) : (Leminor et Richar, 1993)

Ensemencer les tubes lysine, ornithine, argénine et témoin avec quelques gouttes d'une suspension bactérienne préparée à l'avance. Recouvrir la surface avec 1ml de l'huile de vaseline. Incuber pendant quatre jours au maximum à 37C°.

12. Test de la catalase : (Larpent *et al.*, 1997)

A partir d'un milieu solide en préférence, prélever une quantité suffisante de culture et la mettre en suspension dans de l'eau oxygénée.

13. Test de coagulase: (Singleton, 2005)

A l'aide d'une pipette graduée ajouter 0,5 ml de plasma à 0,5ml de milieu Cœur-Cerveille, ensemencé par la souche bactérienne et incubé à 37C°/24h.

Incuber le mélange à 37C et examiner après 1, 2, 3, 4 et 6 heures.

14. Test de la DNase : (Larpent *et al.*, 1997)

Prélever une quantité suffisante de la souche à étudier.ensemencer une gélose à l'ADN en stries ou en spots. Incuber à 37C°. Après 24heures, inonder leur surface avec quelques ml d'HCl (0,1N) ou avec une solution à 0,1% de bleu de toluidine et laisser agir 5mn.

Annexe 4

Activité antibactérienne ou Tests antibactériens (souches cliniques)

1. Technique de l'antibiogramme : (Guezlane *et al.*, 2008)

- Préparer une suspension de germe à partir d'une culture pure;
- Incuber à 37°C pendant 15 à 30mn;
- Inonder la boîte entière avec la suspension réalisée en inclinant la boîte dans toutes les directions;
- Réaspérer l'excès soigneusement;
- Sécher les boîtes à l'étuve à 37°C/15mn;
- Application des disques à la pince flambée (même distance entre les disques);
- Incuber à 37 °C/24h, couvercle en dessous.

2. Technique de diffusion en puits (Test de sensibilité):

- Ensemencer chaque souche dans l'eau physiologie (0.9%) jusqu'à ce que la suspension bactérienne arrive à une densité optique de 0.70 à une longueur d'onde de 620 nm qui correspond à une concentration de 2 à 3×10^8 germe/mL.
- Avec un emporte - pièce des puits sont creusés dans la gélose de Mueller-Hinton coulée dans des boîtes de pétri et ensemencée par un germe – test (la suspension bactérienne).
- Les puits sont remplis d'huile essentielle à tester.
- Les boîtes de pétri sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 h.
- Les diamètres d'inhibition sont ensuite mesurés autour des puits.

3. Méthode de contact direct en milieu liquide :

- Dans une série de tubes contenant le bouillon de culture, des concentrations croissantes d'huile essentielle à tester sont préparées. Ces tubes sont inoculés à partir d'une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance en vue d'obtenir une concentration cellulaire finale d'environ (2×10^8 UFC/ml) puis placés à l'étuve à 37 °C (le tube qui va servir de contrôle ne contient pas d'huile essentielle et sert de témoin).

- La cinétique de la croissance bactérienne est suivie toutes les heures jusqu'à 36h.
- La concentration minimale inhibitrice est déterminée et elle correspond à la plus petite concentration d'huile essentielle qui ne produit pas de croissance bactérienne (pour laquelle il n'y a pas de croissance visible après l'incubation). Le solvant servant à la dispersion de l'HE dans le bouillon de culture utilisé est le DMSO à raison de 3.2% (Motyl *et al.*, 2005).