



RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Mustapha Stambouli de Mascara

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

« Laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire (BGMSS) »

THÈSE

Présentée par : M^{me} BELMIMOUN ASMAA

Pour l'obtention d'un Doctorat 3^{ème} cycle En Sciences Biologiques

Option : Science, Technologie et Santé

Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de quelques plantes aromatiques et médicinales

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

Présidente : M^{me} Tir Touil Meddah A.

Professeur à l'U. de Mascara

Examineur : Mr Aoues A.

Professeur à l'U. d'Oran 1

Examineur : Mr Sahraoui T.

Professeur à l'U. d'Oran 1

Examineur : Mr Benyoucef A.

Professeur à l'U. de Mascara

Examineur : Mr Hariri A.

MCA à l'U. de Mascara

Directeur de thèse : Mr Meddah B.

Professeur à l'U. de Mascara

Année Universitaire : 2015-2016

« Le vrai point d'honneur d'un scientifique n'est pas toujours d'être toujours dans le vrai. Il est d'oser, de proposer des idées neuves et ensuite de les vérifier. »

Pierre-Gilles de Gennes

Remerciements

Il m'est tout d'abord agréable de remercier **madame le professeur Tir touil-Meddah A.** qui a bien voulu non seulement assumer la présidence du jury, mais qui m'a accueillie dans son laboratoire tout en lui témoignant mon admiration pour sa force de caractère, elle compte parmi les personnes qui m'ont formé scientifiquement. Merci pour vos encouragements et votre soutien moral.

Je remercie infiniment mon directeur de thèse **monsieur le professeur Meddah B.** qui a dirigé ce travail de recherche, Il m'a donné beaucoup de son temps pour approfondir mon travail et il a su me faire transmettre son goût pour la rigueur. Merci pour vos conseils, pour la grande compétence et l'humanisme qui vous caractérisent. Vous avez tout mon respect.

Mr Aoues A., c'est un honneur et un immense plaisir de présenter ce travail devant vous et de prendre de votre temps pour siéger dans mon jury.

Mr Sahraoui T., merci d'avoir accepté avec tant d'enthousiasme de nous faire partager vos impressions avisées lors de l'examen de ce travail.

Mr Benyoucef A., je suis très sensible à l'intérêt que vous avez manifesté à l'égard de ce travail et je vous remercie de votre présence.

Mr Hariri A., merci d'avoir aimablement accepté de faire partie de notre jury de thèse.

J'adresse mes vifs remerciements à Mr Sonnet, Mme Viviane et Mr Gabaldon, de m'avoir accueillies au sein de leurs laboratoires, et de m'avoir guidé et orienté dans cette étude, pour leur disponibilité sans limite et pour les précieux conseils qui m'ont donné.

Je remercie cordialement le personnel de la ferme expérimentale et des laboratoires SNV de l'université de Mascara, pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Je souhaite remercier aussi le personnel des services d'Anatomo-pathologies des hôpitaux de Mascara et Sidi Belabess pour leur aide

Je voudrais désormais remercier mes enseignants qui m'ont aidé de près ou de loin surtout Mme Sahnouni et Mr Yahyaoui du département de Chimie.

A mon mari, pour ton affection et ton support continuuel, merci...

Je n'oublie pas, mes frères, et ma famille qui ont toujours cru en moi et qui ont su me redonner confiance lorsque la motivation n'était plus au rendez-vous. Merci pour tout.

Khadidja et Hamza, je ne peux vous remercier autant pour votre précieuse aide et vos encouragements, je serais toujours reconnaissante, milles merci.

Tout mes amis : Fatima (2), kheira, Amina, Souhila, Karima, et toute la promotion de Doctorat 2, merci

A tous ceux qui ne se sentent pas nommément citer la liste est longue, je dis merci....

JE DEDIE CETTE THESE

A mes très chers parents ;

Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond respect, mon grand amour et toute ma gratitude pour les sacrifices que vous avez consenti. Vous m'avez donné toute l'attention et tout l'amour qu'un être puisse espérer. Merci pour vos instructions, votre soutien, aucun de mes mots ne saurait exprimer l'ampleur de ma reconnaissance.

Que le tout puissant vous accorde une longue vie papa,maman....

A Mon Très Cher Petit Poussin Mohammed Rayane ;

C'est à toi mon adorable ange, ma joie, mon petit trésor que maman dédie ce travail pour te dire que tu resteras pour toujours le rayon du soleil qui égaye ma vie.

Je t'aime mon bébé et je te souhaite tout le bonheur du monde....

Tendrement....

Asmaa

Tables des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction générale

Etat de l'art

Chapitre I : Radicaux libres et stress oxydant

I.1. Définition	03
I.1.1 Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)	03
I.1.2 Les espèces réactives azotées (ERN)	03
I.2. La production des radicaux libres	04
I.2.1. La production intracellulaire	04
I.2.2 La production extracellulaire	05
I.2.3. Les conséquences des radicaux libres et le stress oxydant	05
I.3. Les Antioxydants	06
I.3.1 Définition des antioxydants	06
I.3.2 Types d'Antioxydants	07

Chapitre II : Le microbiote intestinal

II.1. Définition	11
II.2. Les conditions d'équilibre de la microflore gastro-intestinale	12
II.3. Sources des principales infections microbiennes du tube digestif	14
II.3.1. Les infections entériques et réponse de l'hôte	14
II.3.2. Facteurs d'expression de la pathogénicité	16
II.4. L'infection intestinale due à <i>Bacillus cereus</i>	17
II.4.1. Généralités	17
II.4.2. Caractères Bactériologiques	17
II.4.3. Implication de <i>Bacillus cereus</i> dans les TIAC en Algérie	18
II.4.4. Pouvoir pathogène de <i>Bacillus cereus</i>	18
II.4.5. Traitement	19
II.5. Translocation bactérienne et pathogénicité	19
II.5.1. Définition	19
II.5.2. Mécanisme de la translocation bactérienne	20

Tables des matières

II.5.3. Conséquences et altérations dues à la translocation bactérienne	20
Chapitre III : L'antibiorésistance	
III.1. Définition	22
III.2. Types de résistance bactérienne	22
III.2.1. La résistance naturelle	22
III.2.2. La résistance acquise	22
III.3. Mécanismes de la résistance	24
III.3.1. L'inactivation enzymatique	24
III.3.2. Le mécanisme d'Efflux actif	24
III.3.3. Modification de la cible	25
III.3.4. Diminution de la perméabilité de la membrane	26
III.4. Cas de résistance de Bacillus cereus aux antibiotiques	27
III.5. Impact de l'antibiorésistance	27
Chapitre IV : Polyphénols et huiles essentielles en phytothérapie	
IV.1. Définition de la Phytothérapie	28
IV.2. Différents types de la Phytothérapie	28
IV.3. Les avantages de la phytothérapie	29
IV.4. Phytothérapie et composés phénoliques	29
IV.4.1. Généralités	29
IV.4.2. Principales classes des composés phénoliques	30
IV.4.3. Propriétés des composés phénoliques	30
IV.5. Phytothérapie et huiles essentielles	33
IV.5.1. Définition	33
IV.5.2. Les constituants des huiles essentielles	34
IV.6. Les critères de qualité des huiles essentielles	36
IV.7. Les propriétés pharmacologiques des huiles essentielles	37
IV.7.1. Propriétés anti-infectieuse	37
IV.7.2. Propriétés Anti-inflammatoires	38
IV.7.3. Régulatrices du système nerveux	38
IV.7.4. Drainantes respiratoires	39
IV.7.5. Digestives	39

Tables des matières

IV.7.6. Cicatrisantes	39
<i>Partie Expérimentale</i>	
<i>-Matériels et Méthodes-</i>	
I. Introduction	40
II. Objectifs de l'étude	41
III. Matériel d'étude	41
III.1. Produits consommables	41
III.2 Matériel végétal	42
III.2.1. Choix des plantes	42
III.2.2. Situations géographiques des stations d'étude	44
III.2.3. Récolte du Matériel végétal	45
III.3. Animaux d'expérimentation	45
III.4. Souches microbiennes	46
III.4.1. Les souches bactériennes	46
IV. Méthodes appliquées	47
Partie 01 : Etude phytochimique	
I. Etude Phytochimique quantitative du matériel végétal (métabolites primaires)	48
I.1. Détermination de la teneur en eau	48
I.2. Détermination de la matière organique et Minérale	48
I.3. Lipides	49
I.4. Protéines	49
I.5. Sucres	50
II. Extraction des huiles essentielles et des composés phénoliques	51
II.1. Extraction des huiles essentielles	51
II.1.1. Protocole d'extraction	51
II.1.2. Isolation des huiles essentielles	51
II.2. Préparations des extraits polyphénoliques par différents méthodes	52
II.2.1. Extraction par macération avec l'eau (Décoction 10%)	52
II.2.3. Extraction par macération à l'Ethanol 80%	53
II.3. Calcul des rendements d'extraction	53
III. Etude quantitative et qualitative de différentes essences et extraits obtenus	54
III.1. Les huiles essentielles	54
III.1.1. Etude analytique des Huiles essentielles	54

Tables des matières

III.1.2. Analyse chromatographique de l'huile essentielle	55
III.2. Les extraits polyphénoliques	55
III.2.1. Analyse qualitative des extraits polyphénoliques	55
III.2.2. Les Analyses quantitatives des différents extraits polyphénoliques	56
III.2.3. Analyse chromatographique des extraits polyphénoliques	59
Partie 02 : Evaluation du pouvoir antioxydant des huiles essentielles et des extraits polyphénoliques des plantes	
I.Evaluation de l'activité antioxydante par technique ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)	62
II.Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil)	64
- Evaluation du potentiel antiradicalaire par le calcul de l'IC50	65
III. Activité antioxydante totale (TAC)	66
Partie 03 : Evaluation de l'activité antimicrobienne de <i>Zygophyllum album</i> et <i>Myrtus communis</i>	
I. Etude <i>in vitro</i> b	67
I.1. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits et huiles essentielles	67
I.1.1.Préparation des extraits	67
I.1.2 Préparation de l'inoculum bactérien	67
I.1.3. Evaluation de l'activité antibactérienne par méthode de diffusion sur gélose	68
I.1.4. Détermination de la CMI par micro-dilution en milieu liquide	68
I.1.5.Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)	69
I.1.6. Le rapport CMB/CMI	69
I.2. Evaluation de l'activité antifongique des extraits et huiles essentielles	69
I.2.1. Préparation de l'inoculum microbien	70
I.2.2.Evaluation de l'activité antibactérienne par méthode de diffusion sur gélose	70
I.2.3. Evaluation de la CMI par micro-dilution en milieu liquide	70
I.2.4. Evaluation de la Concentration Minimale Fongicide (CMF)	71
II. Etude <i>in vivo</i>	71
II.1. Evaluation de la toxicité orale aigue des extraits végétaux	72
II.1.1. Préparation des extraits	72

Tables des matières

II.1.2. Préparation des groupes	73
II.1.3. Administration des substances et suivi des animaux	73
II.2. Evaluation de l'activité antibactérienne vis à vis <i>B. cereus</i>	74
II.2.1. Préparation de l'inoculum de <i>Bacillus cereus</i>	74
II.2.2. Préparation des extraits	75
II.2.3. La répartition des groupes de rats	75
II.2.4. Induction de l'infection et le traitement par les extraits	76
II.2.5. Suivi des animaux	76
II.2.6. Sacrifice des rats	77
II.2.7. Poids relatif des organes internes	78
II.2.8. Recherche et dénombrement des germes dans le sang et dans les organes de translocation	79
II.2.9. Etude histologique	80
II.3. Ethique	80
Partie 04 : Analyses statistiques	81
-Résultats et discussions-	
Partie 01 : Résultats de l'étude phytochimique	82
I. Analyse quantitative du matériel végétal	82
II. Les rendements d'extraction	84
II.1. Rendement d'extraction des huiles essentielles	84
II.2. Rendement d'extraction des différents extraits organiques	85
III. Analyse des huiles essentielles	86
III.1. caractérisation organoleptique des huiles essentielles	86
III. 2. Caractérisation physicochimique des huiles essentielles	87
III. 3. Analyse chromatographique des huiles essentielles	87
III.3.1. L'huile essentielle de <i>Myrtus communis</i>	87
III.3.2. L'huile essentielle de <i>Zygophyllum album</i>	90
IV.Résultats des analyses qualitatives et quantitatives des extraits polyphénoliques	92
IV.1. Analyse qualitative des extraits polyphénoliques	92
IV.1.1. <i>Myrtus communis</i>	93
IV.1.2. <i>Zygophyllum album</i>	93
IV.2. Analyses quantitatives des différents extraits polyphénoliques	94
IV.2.1. <i>Myrtus communis</i>	96

Tables des matières

IV.2.2. <i>Zygophyllum album</i>	97
IV.3. Analyses chromatographiques des extraits polyphénoliques	98
IV.3.1. Analyses chromatographiques sur couche mince (CCM)	98
IV.3.2. Analyse chromatographique des extraits polyphénoliques par LC-MS	101
Partie 02 : Résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante	108
I. La technique ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)	108
I.1. Extraits polyphénoliques	108
I.2. Huiles essentielles	112
II. Résultats de l'activité antioxydante de DPPH	112
II.1. Extraits polyphénoliques	112
-Evaluation de l'IC 50	115
II.2. Huiles essentielles	116
III. Activité antioxydante totale	
Partie 03 : Evaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits	118
I. Etude <i>in vitro</i>	118
I.1. Evaluation de l'activité antibactérienne	118
I.2. Activité antifongique des différents extraits	128
II. Etude <i>in vivo</i>	131
II.1. Etude de la toxicité aigue	131
II.2. Résultats de l'activité anti-infectieuse <i>in vivo</i>	138
II.2.1. Evolution des signes cliniques	138
II.2.2. Evolution pondérale	141
II.2.3. Détection de <i>B. cereus</i>	142
II.2.4. Poids relatif des organes	145
II.2.5. Evaluation de la translocation bactérienne	147
II.2.5.1. Détection de <i>B. cereus</i> dans les différents organes de translocation	147
II.2.5.2. Etude de la translocation bactérienne de flore résidante et transitoire du tube digestif	148
II.2.6. Résultats des analyses histologiques	156
Discussion générale	162
Conclusion générale et perspectives	
Références bibliographiques	
Annexes	

Tables des matières

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
1	Différents systèmes enzymatiques d'antioxydants et leurs principales propriétés	7
2	Systèmes antioxydants endogènes et leurs fonctions	8
3	Les principaux facteurs influençant la composition et la fonction de la microflore intestinale	13
4	Principaux agents infectieux responsables d'infections entériques	14
5	Principales classes des flavonoïdes	31
6	Principales propriétés des polyphénols	33
7	Différentes classes de composés phénoliques	35
8	Différentes classes des terpénoïdes	36
9	Lieu de récolte des plantes et caractéristiques géographiques et bioclimatiques des stations d'étude	45
10	Les bactéries utilisées pour l'étude de l'activité antibactérienne <i>in vitro</i>	46
11	L'ensemble des espèces fongiques utilisées dans l'étude	47
12	Profil d'antibiorésistance des souches bactériennes testées	47
13	La mise en lots des rats d'expérimentation <i>in vivo</i>	75
14	Ensemble des germes recherchés dans les organes de translocation	79
15	Teneurs en métabolites primaires des deux plantes étudiées	82
16	Principaux cirières organoleptiques des huiles essentielles des plantes étudiées	86
17	Les constantes physico-chimiques des huiles essentielles obtenues	87
18	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Myrtus communis</i>	89
19	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Zygodphyllum album</i>	91
20	Résultats du screening Phytochimique des différents extraits de plantes	92
21	Dosage des polyphénols dans les extraits phénoliques de <i>Myrtus communis</i> et <i>Zygodphyllum album</i> .	95
22	Les rapports frontaux (Rf) des composés phénoliques des différents extraits de plantes séparés par deux systèmes de solvants.	99
23	Rapports frontaux des étalons utilisés pour les deux systèmes	100
24	Identification par LC/MS des composés phénoliques de <i>M. communis</i>	103
25	Identification par LC/MS des composés phénoliques de <i>Z. album</i> .	106
26	Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) des différents extraits	110
27	Diamètres d'inhibition des différents extraits vis-à-vis les germes testés	118
28	Concentration Minimale inhibitrice	120
29	Concentrations minimales bactéricides des extraits végétaux et rapport CMB/CMI	127
30	Diamètres d'inhibition des différents extraits de <i>M. communis</i> et <i>Z. album</i>	128
31	Résultats de la CMI et CMF des différents extraits testés	130
32	Taux de mortalité des rats après administration des extraits alcooliques et des huiles essentielles de <i>Z. album</i> et <i>M. communis</i> .	134
33	L'effet toxique des extraits polyphénoliques et des huiles essentielles des plantes sur le comportement des rats	135

34	Différentes manifestations biologiques observées chez les rats en cours d'expérimentation.	138
35	Détection de <i>Bacillus cereus</i> dans les organes internes	147

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
1	Sites de production intracellulaire des ERO	4
2	Domages causés par les ERO	6
3	Action des antioxydants au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène	7
4	Structure chimique d'un polyphénol de synthèse (3,3',5,5'-Tetra-t-butyl-biphenyl-4,4'-diol)	9
5	Les espèces réactives, le dommage oxydatif et les réponses cellulaires au stress oxydatif	10
6	Les compartiments de l'appareil digestif de l'homme et leurs microflores	12
7	Les infections à <i>B. cereus</i> chez l'homme	17
8	Les différents modes d'acquisition des gènes de résistance (R) aux antibiotiques chez les bactéries	23
9	Différents mécanismes de résistance des bactéries	24
10	Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne	38
11	Matériel végétal	43
12	Carte géographique représentant les sites de récolte	44
13	Montage d'hydrodistillation	52
14	Schéma d'extraction par Décoction à 10%	52
15	Schéma d'extraction par les solvants organiques	53
16	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	56
17	Courbe d'étalonnage de catéchine	57
18	Courbes d'étalonnage de la cyanidine	58
19	Courbe d'étalonnage de catéchine	59
20	Plaque utilisée pour la méthode ORAC	64
21	Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH et un antioxydant	65
22	Schéma d'utilisation de la microplaque	69
23	Administration des substances par gavage	73
24	Prélèvement du sang	77
25	Dissection des rats et prélèvement des organes	78
26	Protocole expérimentale <i>in vivo</i>	81
27	Résultats des rendements obtenus	84
28	Les rendements d'extraction des différents extraits polyphénoliques	85
29	Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Myrtus communis</i>	88
30	Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Zygophyllum album</i>	90
31	Profil chromatographique de CCM des différents extraits de <i>M. communis</i> et <i>Z. album</i> .	98
32	Spectres de LC-MS-ESI de l'extrait aqueux de <i>M. communis</i>	102
33	Spectres de LC-MS-ESI de l'extrait méthanolique de <i>Z. album</i>	105
34	Intensité de fluorescence induite par AAPH en présence des extraits de <i>Z. album</i> et <i>M. communis</i> à différentes concentrations	108
35	Relation linéaire entre les concentrations des extraits phénoliques et le Trolox	109
36	Intensité de fluorescence induite par AAPH en présence des huiles essentielles de <i>Z. album</i> et <i>M. communis</i> à différentes	110
37	Relation linéaire entre les concentrations des huiles essentielles et le Trolox	111
38	Pourcentage d'inhibition de DPPH	112
39	IC50 des différents extraits de <i>M. communis</i> et <i>Z. album</i>	113
40	Pourcentage d'inhibition de DPPH par les huiles essentielles de <i>M. communis</i> et <i>Z. album</i> .	115
41	Courbe d'étalonnage d'acide gallique	116

42	Résultats de l'activité antioxydante totale des différentes essences	117
43	Cinétique de croissance des souches en présence des extraits polyphénoliques (ZAM, MCA)	122
44	Cinétique de croissance des souches en présence des huiles essentielles	125
45	Cinétique de croissance des souches en présence des extraits de plantes.	129
46	Evolution du poids corporel des rats traités avec les différents extraits	137
47	Température rectale quotidienne enregistrée	140
48	Poids corporels enregistrés avant et après l'expérience	141
49	% des rats porteurs de <i>B. cereus</i> dans leurs matières fécales.	143
50	Poids relatif des différents organes chez les différents groupes de rats	145
51	Etude de la translocation bactérienne dans les lots administrés de l'huile essentielle de <i>Z. album</i> .	149
52	Etude de la translocation bactérienne dans les lots administrés de l'huile essentielle de <i>M. communis</i>	151-152
53	Etude de la translocation bactérienne dans les lots administrés de l'extrait méthanolique de <i>Z. album</i>	153-154
54	Etude de la translocation bactérienne dans les lots administrés de l'extrait aqueux de <i>M. communis</i>	156
55	Changements histopathologiques du foie dans les différents lots grossissement	157
56	Changements histopathologiques de la rate dans les différents lots grossissement	158
57	Changements histopathologiques de l'iléon dans les différents lots grossissement	159

Liste des abréviations

AAPH : 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride

AUC : « Area Under the Curve », aire sous la courbe des concentrations plasmatiques. *f*

CAT : Capacité Antioxydante Totale

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMF : Concentration Minimale Fongicide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

MC.DCM : Extrait dichlorométhanique de *Myrtus communis*

MC.EtOH : Extrait éthanolique de *Myrtus communis*

MCA : Extrait aqueux de *Myrtus communis*

MCH : Huile essentielle de *Myrtus communis*

MCM : Extrait méthanolique de *Myrtus communis*

NCCLS : « National Committee on Clinical Laboratory Standards », organisme américain chargé de définir les normes de biologie clinique. *f*

OMS : Organisation Mondiale de Santé *f*

ORAC : Oxygen Radical Absorbance Capacity

SFM-CA : Société Française de Microbiologie-Comité de l'Antibiogramme

TB : Translocation Bactérienne

ZA.DCM : Extrait dichlorométhanique de *Zygophyllum album*

ZA.EtOH : Extrait éthanolique de *Zygophyllum album*

ZAA : Extrait aqueux de *Zygophyllum album*

ZAH : Huile essentielle de *Zygophyllum album*

ZAM : Extrait méthanolique de *Zygophyllum album*

Résumé

Les travaux présentés dans cette thèse contribuent à la valorisation des deux plantes médicinales ; une méditerranéenne *Myrtus communis* (*Myrtaceae*) et l'autre saharienne *Zygophyllum album* (*Zygophyllaceae*) en les caractérisant par screening phytochimique, une identification de certains composés volatils et phénoliques par chromatographie et une évaluation des activités antioxydante et antimicrobienne.

L'évaluation préliminaire de la composition chimique a permis de mettre en évidence la présence de quelques groupes chimiques et de sélectionner un extrait phénolique parmi quatre pour chaque plante. La détermination quantitative des flavonoïdes et des tannins révèle que l'extrait aqueux de *M.communis* est le plus riche avec des teneurs respectives de 7.28 ± 0.57 et 18.78 ± 0.86 mgEC/g.

L'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante des différents extraits végétaux a été réalisée par trois méthodes : la réduction du phosphomolybdate (ou capacité antioxydante totale (CAT)), le piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH \cdot) et le pouvoir réducteur de la fluorescéine par méthode ORAC. Ainsi, ils présentent des activités antiradicalaire et antioxydante intéressantes dépendantes du contenu en polyphénols totaux, en flavonoïdes et tannins présents dans l'extrait polyphénolique et d'autres composés actifs présents dans l'huile essentielle. Selon les résultats, tous les extraits végétaux présentaient une activité antioxydante importante mais qui varie d'une méthode à une autre. Néanmoins, la meilleure activité est retrouvée dans l'extrait aqueux de *M.communis* avec une $IC_{50} = 0.029 \pm 0.01$ mg/ml par rapport à l'antioxydant de synthèse (acide ascorbique), $CAT = 68.05$ mg EAA/g et $ORAC = 1.21 \pm 0.07$ μ mol ET/mg. Une relation linéaire a été établie ; l'extrait le plus riche en flavonoïdes étant le plus actif. Inversement, une très forte inhibition de réduction de la fluorescéine et même du radical DPPH a été obtenu par l'huile essentielle de *Z.album* par rapport à celle de *M.communis* avec $ORAC = 0.56$ μ mol ET/mg. Ceci est probablement dû à la présence de substances actives qui peuvent agir indépendamment ou en synergie.

Les différents extraits végétaux ont été également soumis à un criblage pour leur possible activité antimicrobienne. L'extrait méthanolique de *Z.album* a révélé une très forte activité antibactérienne vis à vis *E.coli*, *B.cereus* et *S.aureus* avec des CMI=25 et 50mg/ml respectivement, suivi de son huile essentielle avec CMI= 125 μ l/ml. Ce résultat *in vitro* a été conformément prouvé *in vivo*, car cet extrait de 800mg/ml a visée curative a démontré une remarquable capacité à traiter l'infection due à *B. cereus*, à empêcher sa translocation envers les organes internes et le sang et à inhiber la perméabilité intestinale des germes résidents tout en assurant sa faible toxicité aiguë. Par contre l'extrait aqueux de *M.communis* ainsi que son huile essentielle ont révélé une activité antifongique *in vitro* importante par rapport à *Z.album*.

L'identification chromatographique menée sur les deux espèces a permis de caractériser leurs extraits polyphénoliques ainsi que leurs huiles essentielles. Les principes actifs majeurs détectés possèdent diverses activités biologiques qui pourraient jouer un rôle reconnu dans le maintien d'un bon état de santé.

Mots-clés : *M.communis*, *Z.album*, composés phénoliques, huiles essentielles, activité antioxydante, pouvoir antimicrobien, CCM, LC-MS, CPG.

Abstract

The work presented in this thesis contribute to the recovery of two medicinal plants one Mediterranean; *Myrtus communis* (Myrtaceae) and the other from Sahara; *Zygophyllum album* (Zygophyllaceae) by the characterization with phytochemical screening, the identification of certain volatile and phenolic compounds using chromatography and finally the evaluation of antioxidant and antimicrobial activities.

The preliminary assessment of the chemical composition allowed highlighting the presence of some chemical groups and selecting a phenolic extract from four for each plant. The quantitative determination of flavonoids and tannins reveal that the aqueous extract of *M. communis* is the richest with respective levels of 7.28 ± 0.57 and 18.78 ± 0.86 mg CE / g.

The *in vitro* evaluation of the antioxidant activity of different extracts was performed by three methods: reducing the phosphomolybdate (total antioxidant capacity (TAC)), trapping the radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH.) and the reducing power of fluorescein by ORAC method. Thus, they present interesting dependent radical scavenging and antioxidant activities of total polyphenol content in flavonoids and tannins of the polyphenolic extract and other active compounds present in the essential oil. According to the results, all the plant extracts showed significant antioxidant activity but that varies from one method to another. Nevertheless, the best activity was found in the aqueous extract of *M. communis* with an $IC_{50} = 0.029 \pm 0.01$ mg / ml compared to the synthetic antioxidant (ascorbic acid), TAC = 68.05 mg EAA / g ORAC = 1.21 ± 0.07 μ mol ET / mg. A linear relationship was established; the richest extract on flavonoids are the most active. Conversely, a strong inhibition of reduction of fluorescein and even radical DPPH was obtained by the essential oil of *Z. album* compared to *M. communis* with ORAC = 0.56 μ mol ET / mg. This is probably due to the presence of active substances that may act independently or synergistically.

The various plant extracts were subjected to screening for their potential antimicrobial activity. The methanol extract of *Z. album* revealed a very strong antibacterial activity against *E. coli*, *B. cereus* and *S. aureus* with MIC = 25 and 50 mg / ml, respectively, followed by its essential oil with MIC = 125 μ l / ml. This *in vitro* result was proven *in vivo* because this extract 800 mg / ml referred curative demonstrated a remarkable ability to treat infection of *B. cereus*, to prevent its translocation to the internal organs and blood and inhibiting intestinal permeability of residents germs while maintaining its low acute toxicity. By against, the aqueous extract of *M. communis* and its essential oil showed antifungal activity in vitro large relative to *Z. album*.

Chromatographic identification conducted on two species allowed to characterize their polyphenolic extracts and their essential oils. The detected major active compounds have various biological activities that could play a recognized role in maintaining good health.

Keywords : *M. communis*, *Z. album*, phenolic compound, essential oils, antioxidant activity, antimicrobial activity, TLC, LC-MS, GC.

ملخص

العمل المقدم في هذه الأطروحة يساهم في الاستفادة من اثنين من النباتات الطبية. الأولى ذات الأصل الساحلي وهي نبتة الريحان والثانية ذات الأصل الصحراوي وهي نبتة العكاية وذلك عن طريق الفحص الكيميائي النباتي، والتعرف على بعض المركبات المتطايرة والفينول بواسطة جهاز الكروماتوغرافيا وتقييم الأنشطة المضادة للأكسدة والمضادة للميكروبات.

يسمح التقييم الأولي من التركيب الكيميائي لتسليط الضوء على وجود بعض المجموعات الكيميائية وكذلك اختيار أحد المستخلصات الأربعة لكل نبتة. يكشف التحديد الكمي للفلافونويد والتانين ان المستخلص المائي لنبتة الريحان هو ذو 18.78 ± 0.86 و 7.28 ± 0.57 غ/المستوى الاغنى وذلك بقيمة ملغ.

تم إجراء التقييم مخبريا لنشاط مضاد الأكسدة للمستخلصات النباتية بثلاث طرق مختلفة: ارجاع الفوسفوموليبيدات [القدرة الكلية لمضاد الاكسدة]، تثبيت جذر 2,2 ديفينيل 1 بيكرهيدرازيلواخيرا عن طريق القدرة الارجاعية للفليوريسين [اوراك]. قدمت المستخلصات نشاط مهم مضاد للجذور والاكسدة معتمدة على محتواها من مركبات الفلافونويد والتانين والمركبات النشطة الأخرى الموجودة في الزيت العطري لكل مستخلص. ووفقا لنتائج ذلك كله فقد أظهرت المستخلصات النباتية نشاط مضاد للأكسدة كبير ولكن هذا يختلف من طريقة إلى أخرى. ومع ذلك، تم العثور على أفضل النشاط في المستخلص المائي لنبتة الريحان مقارنة مع مضادات الاكسدة الاصطناعية [حمض الاسكوربيك] وذلك ب:

ملغ/مل $IC_{50} = 0.029 \pm 0.01$.

وبالتالي هناك علاقة طردية حيث ان المستخلص الغني بالفلافونويد هو الأكثر نشاطا. على العكس من ذلك، تم الحصول على تثبيط قوي لإرجاع فلوريسين وحتى جذر 2,2 ديفينيل 1 بيكرهيدرازيل للزيت العطري لنبتة العكاية مقارنة بنبتة الريحان. هذا ربما يرجع إلى وجود المواد الفعالة التي يمكن أن تعمل بشكل مستقل أو تآزر بينها.

تم ايضا الكشف عن نشاط مضادات الميكروبات للمستخلصات النباتية المختلفة. مستخلص الميثانول لنبتة العكاية كشف عن وجود نشاط مضاد للجراثيم قوي جدا ضد انواع البكتيريا المدروسة حيث بلغ التركيز المثبط الأدنى قيمة 25 و 50 ملغ/مل على التوالي يليها الزيت العطري ب 125 مل/مكل. تم اثبات هذه النتيجة عمليا حيث بتركيز 800 ملغ/مل ظهرت قدرة ملحوظة لعلاج الاصابات بالبكتيريا الشمعية ومنع انتشارها للأعضاء الداخلية والدم وتثبيط نفاذية الجراثيم المعوية مع الحفاظ على سميتها الحادة منخفضة. والزيت العطري لنبتة الريحان أظهر مخبريا نشاط مضاد للفطريات كبير نسبة إلى لنبتة العكاية.

إجراء التحديد الكروماتوغرافيا على مستخلصات النبتتين اظهر ان الزيوت العطرية ومركبات البوليفينول تحتوي على مكونات رئيسية نشطة تتميز بالأنشطة البيولوجية المختلفة والتي تلعب دور معترف به في الحفاظ على صحة.

كلمات البحث: الريحان، العكاية، المركبات الفينولية، الزيوت العطرية، النشاط المضادة للأكسدة، الطاقة المضادة للميكروبات، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، الكروماتوغرافيا السائلة، الكروماتوغرافيا الغازية.

Introduction Générale

Introduction Générale

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses ressources trouvées dans son environnement afin de traiter et de soigner toutes sortes de maladies (Lee, 2004). Actuellement, l'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 81% de l'humanité a recours aux préparations traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire (WHO, 2015). Les médicaments à base de plantes sont encore largement utilisés et ont une importance considérable dans le commerce international (Penchev, 2010 et Leblanc, 2015).

Selon certains auteurs, les composés d'origine naturelle présentent l'avantage d'une très grande diversité de structures chimiques et ils possèdent aussi un très large éventail d'activités biologiques (Rollinger *et al.*, 2004).

Les propriétés antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité pour lutter contre les infections antibiorésistantes et se soigner grâce à la phytothérapie et à l'aromathérapie (OMS, 2015).

La matière végétale contient un grand nombre de molécules à des intérêts multiples tels que les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tanins, les lignanes, les terpènes et les flavonoïdes (Abedini, 2013 ; Bahorun ; 1997 et Bidie *et al.*, 2011).

La flore intestinale assure essentiellement 80% des défenses immunitaires alors que notre système digestif abrite près de 500 espèces de microorganismes qui participent à la digestion et à l'immunité.

Les microorganismes responsables des infections touchant le tube digestif qui sont fréquemment rencontrés sont: *E. coli*, et les genres *Shigella*, *Salmonella*, *Bacillus* et rarement *Vibrio cholerae* qui ne se trouvent que dans des zones bien définies (Girardot, 2014).

A côté des infections microbiennes, les radicaux libres sont impliqués dans l'étiologie d'un grand nombre de pathologies qui sont maintenant considérées comme l'un des problèmes majeurs de santé publique (Tiwari, 2005). Les radicaux libres sont des sous produits métaboliques des processus oxydatifs. Les cellules s'en protègent grâce à une variété d'enzymes ou de substances chimiques endogènes piègeuses des radicaux libres (Halliwell et Gutteridge, 1990). Lors d'un stress oxydatif, les radicaux libres non piégés induisent des dommages aux tissus.

Cependant, les végétaux présentent un potentiel antiradicalaire qui leur permettrait de jouer un rôle bénéfique en termes d'action préventive très importante pour la santé humaine et animale (Buronzo, 2016).

La végétation Algérienne est constituée de plusieurs variétés végétales que ce soit méditerranéenne ou saharienne. Cette diversité explique ses nombreuses potentialités dans le domaine de l'exploitation des espèces végétales. C'est dans le cadre de la valorisation des ressources végétales qu'un vaste programme de recherche, visant à inventorier toutes les espèces végétales susceptibles à potentialité thérapeutique à été mis en place au niveau de notre laboratoire BGMSS. A cet effet, nous apportons notre modeste contribution à ce programme par l'étude Phytochimique, et évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne de quelques plantes aromatiques et médicinales algériennes.

Ce travail repose sur deux plantes, la 1^{ère} plante est de la région méditerranéenne (*Myrtus communis*) alors que la 2^{ème} est de la région saharienne (*Zygophyllum album*).

Dans la première partie et en premier chapitre de ce manuscrit, nous avons présenté un rappel bibliographique qui englobe le problème du stress oxydant, son origine, et ses graves conséquences sur la santé humaine ;

Dans le deuxième chapitre, nous rappelons aussi l'utilisation abusive des antibiotiques, et son implication dans le problème d'antibiorésistance ;

Le troisième chapitre est consacré à l'étude *in vivo* de la flore intestinale et les principales infections qui la perturbent ;

Le quatrième chapitre portera sur la phytothérapie et plus particulièrement sur des données des deux plantes *M.communis* et *Z.album* ;

La deuxième partie, est la partie expérimentale qui se déroule en deux axes :

Dans le premier axe, regroupe l'extraction des huiles essentielles et des composés polyphénoliques et l'étude qualitative et quantitative de ces derniers.

Dans le deuxième axe, nous nous sommes intéressés à évaluer le pouvoir antioxydant, antimicrobien des extraits des plantes par différents techniques *in vitro* et *in vivo*.

A la lumière des résultats trouvés, nous aborderons une discussion sur les intérêts et les avantages des tests biologiques réalisés, et pour interpréter l'action biologique des composés actifs.

Enfin, nous présenterons une conclusion générale de ce travail avec des perspectives.

Rappel bibliographique

Chapitre I
Radicaux libres et stress
oxydant

I. Radicaux libres et stress oxydant

La recherche sur la capacité antioxydante représente un enjeu scientifique important ; notion largement relatée dans l'étude des propriétés biologiques des plantes. Au travers du chapitre suivant, nous allons présenter les molécules responsables de l'oxydation et celles qui permettent de la combattre.

I.1. Définition

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, morceau de molécule ou simple atome, capable d'avoir une existence indépendante « libre » en contenant un ou plusieurs électrons célibataires sur un atome d'oxygène ou d'azote. Cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable : il va donc se réduire en oxydant un autre composé (Goudable & Favier, 1997).

Un stress oxydatif survient lorsque l'équilibre est rompu en faveur des radicaux libres (figure n°01). Toutefois, une production excessive de ces molécules réactives ou une insuffisance des mécanismes antioxydants peut déséquilibrer la balance oxydant/antioxydant (Christophe & Christophe, 2011; Papazian & Roch, 2008).

I.1.1 Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

On distingue deux grands groupes de molécules réactives impliquées dans le stress oxydant:

- les espèces radicalaires [l'anion radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical perhydroxyle (HO_2), Le radical hydroxyle (HO^{\cdot}), Le radical peroxyde (RO_2) et Le radical secondaire alkoxydes (RO)].
- les espèces non-radicalaires [L'oxygène singulet (O_2), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'acide hypochlorique ($HOCl$)]. La réactivité d'un radical libre varie d'un radical à un autre et dépend de l'environnement où ils se trouvent (Rezaire, 2012; Delattre *et al.*, 2005a).

I.1.2 Les espèces réactives azotées (ERN)

Il en existe deux genres ; des espèces radicalaires azotées tels que le monoxyde d'azote ($\text{NO}\bullet$) qui joue un rôle protecteur vis-à-vis du stress oxydant en limitant la lipoperoxydation. Concernant les espèces azotées non radicalaires ; ils se caractérisent par leur grande faculté de diffusion dans les membranes cellulaires. Il s'agit du trioxyde d'azote (N_2O_3).et le peroxydinitrite (ONOO^-), moins réactif que son précurseur azoté, mais responsable de l'oxydation de nombreuses biomolécules (protéines, lipides et acides nucléiques) (Barouki ,2006).

I.2. La production des radicaux libres

Les radicaux libres nocifs sont produits dans l'organisme au cours du métabolisme normal. Cette production peut se faire en deux niveaux par plusieurs mécanismes et systèmes (Benhamou ,2012).

I.2.1. La production intracellulaire

La production des EOR dans les cellules mammifères découle de plusieurs sources possibles(Figure) mais est essentiellement d'origine enzymatique. Il s'agit principalement de la NAD(P) H oxydase membranaire qui est responsable des fuites d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie. Compte tenu de l'intense activité de la chaîne respiratoire dans les organismes aérobies, cette fuite d'électrons semble devancer les activités de la NAD(P) H.

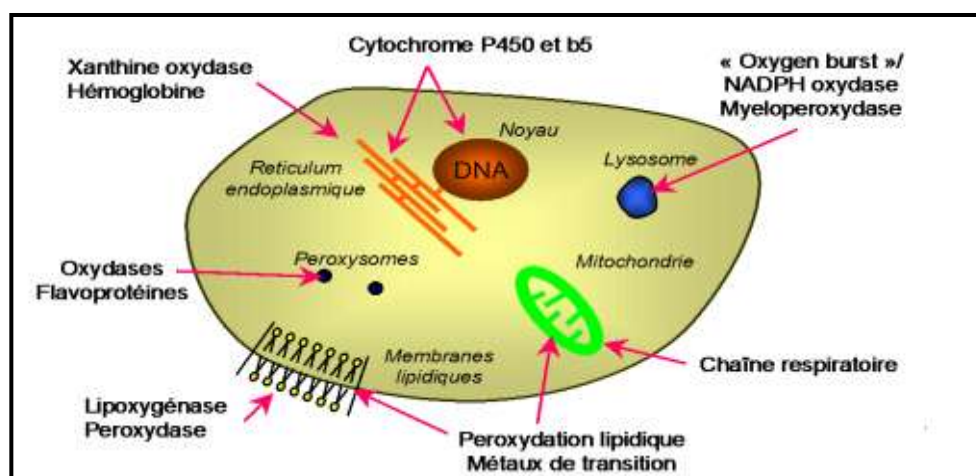


Figure 01: Sites de production intracellulaire des ERO (Machlin *et al.*, 1987).

D'autres sources peuvent également jouer un rôle dans la production de radicaux comme :

- La xanthine oxydase qui réduit l'oxygène moléculaire en ion superoxyde,
- Les peroxysomes qui possèdent plusieurs enzymes sources de peroxyde d'hydrogène et les lipo-oxygénases, qui permettent la synthèse des prostaglandines, oxydent les acides gras pour donner des hydroperoxydes d'acide gras insaturés (Delattre *et al.*,2005b).
- Les cellules phagocytaires activées par une réaction inflammatoire produisent un grand nombre d'ERO lors de la défense antibactérienne.
- Les NO synthases, à l'origine du radical NO•, peuvent, sous certaines conditions, produire également des anions superoxydes.
- Lors de la flambée respiratoire ; il y a production massive d'anion superoxyde par le mécanisme leucocytaire (Delattre *et al.*, 2005c ; Valko *et al.*,2006).

I.2.2 La production extracellulaire

Les facteurs environnementaux sont également responsables de la création et de l'accumulation de radicaux libres dans l'organisme en incluant des agents cancérigènes non-génotoxiques qui peuvent être impliqués dans la génération de radicaux libres (xénobiotiques, activation des leucocytes) (Martinez ,2004).

Aussi l'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO₂) présents dans notre mode de vie (tabagisme, radiations ionisantes, champs électriques, polluants industriels..), ainsi qu'une alimentation raffinée, riche en graisses saturées et en sucre ainsi que la consommation d'alcool, sont autant d'éléments favorisant la genèse de radicaux libres (Mena *et al.*, 2009).

I.2.3. Les conséquences des radicaux libres et le stress oxydant

Les EOR et ERN sont connues pour jouer un double rôle dans les systèmes biologiques, puisqu'ils peuvent être à la fois nocifs mais aussi bénéfiques, voire indispensables pour les organismes vivants (Rezaire,2012;Devalko *et al.*,2004).Lorsqu'il y a un déséquilibre entre la balance des ERO et ERN et les systèmes de défense, avec comme conséquence l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule (ADN, protéines, lipides) en lien avec l'apparition de nombreuses maladies graves (cancer, artériosclérose, arthrite, maladies neurodégénératives) : c'est le stress oxydatif (Hadj Salem,2009 ; Evans et Halliwell ,1999).

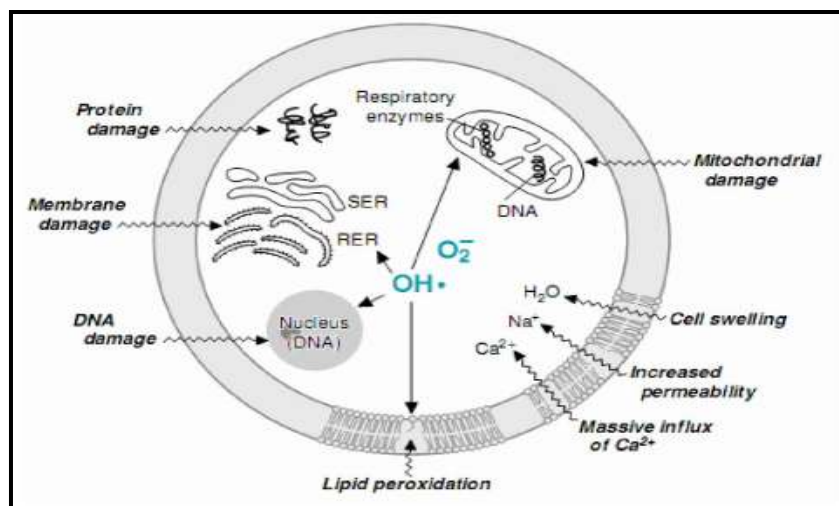


Figure 02: Dommages causés par les ERO (Amzal, 2010).

I.3. Les Antioxydants

Comme déjà prouvé précédemment, l'organisme est capable, dans une certaine mesure, de limiter les dommages dus aux radicaux libres, grâce à des mécanismes de défense enzymatiques et chimiques développés au cours de l'Évolution grâce à ce qu'on appelle les antioxydants (Hennebelle, 2006).

I.3.1 Définition des antioxydants

D'après Bayala (2014), un antioxydant est toute molécule endogène ou exogène présente en faible concentration qui est capable de prévenir, de retarder et de réduire l'ampleur de la destruction oxydante des biomolécules.

Valco *et al.*, (2006) les définit aussi comme étant toutes molécules ou micro-constituants capables d'interférer avec les radicaux libres, Un bon antioxydant se devra de respecter quelques critères :

- ❖ Être capable de piéger directement et spécifiquement les radicaux libres ;
- ❖ Chélater des ions de métaux de transition (Fe^{2+} , Cu^{+}) d'importance biologique capables de promouvoir la production de radicaux libres par la réaction de Fenton ;
- ❖ Interagir avec d'autres antioxydants, et, dans la mesure du possible, les régénérer ;
- ❖ Être rapidement absorbé et Être efficace en milieu aqueux et/ou dans le milieu membranaire
- ❖ Avoir une concentration qualifiée de « physiologique » dans les tissus et les fluides biologiques

I.3.2 Types d'Antioxydants

I.3.2.1 Systèmes d'antioxydants enzymatiques

Les principaux systèmes enzymatiques antioxydants (Figure 3, Tableau 1) les plus efficaces chez les mammifères ainsi que chez les plantes sont la superoxyde dismutase, la catalase et le glutathion peroxydase (Mates *et al.*, 1999; Sharma *et al.*, 2012).

Tableau 01: Différents systèmes enzymatiques d'antioxydants et leurs principales propriétés.

Système enzymatique d'antioxydants	Propriétés
Superoxydedismutase (SOD)	catalyser la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire
Catalase	transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire
Glutathion peroxydase (GPx)	détoxifier le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes d'origine lipidique en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur
Autres systèmes (glutathion réductase, thioredoxine reductase, glutathion Transférase...)	Non définis

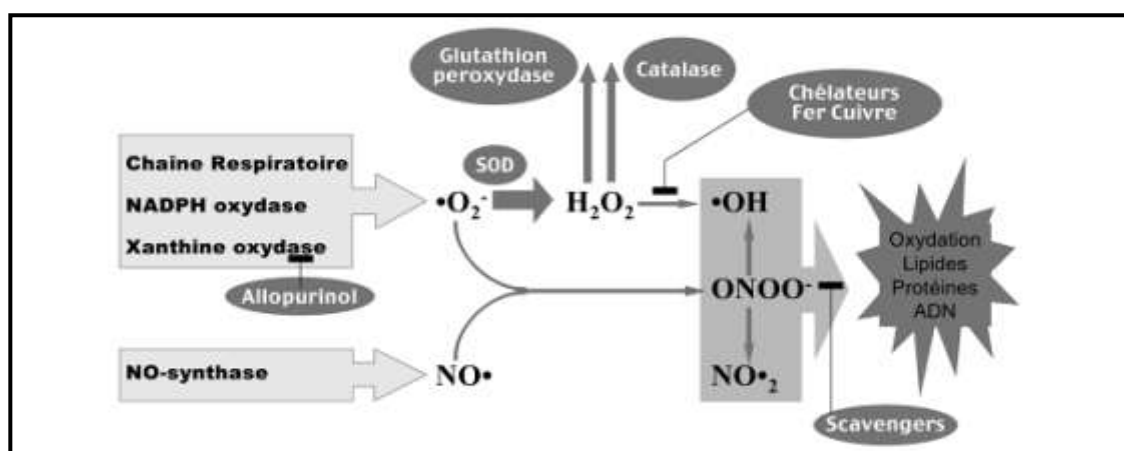


Figure 03: Action des antioxydants au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène (Boubekri ,2014).

I.3.2.2 Systèmes d'antioxydants non-enzymatiques

Ce genre de systèmes peut être aussi classé en deux types :

- Systèmes antioxydants endogènes : Les systèmes antioxydants non-enzymatiques endogènes incluent de nombreux thiols dont (tableau 2) (Mc Call et Frei, 1999; Packer *et al.*, 2001 ;Smith *et al.*, 2004 et Delattre *et al.*, 2005d)

Tableau 02 : Systèmes antioxydants endogènes et leurs fonctions.

Antioxydant	Fonction
Glutathion	C'est le plus majoritaire ;il est capable de réagir, <i>in vitro</i> , avec les radicaux HO [•] , RO ₂ [•] , RO [•] , 1O ₂ , ONOO ⁻ , des radicaux centrés sur le carbone, et l'acide hypochloreux HOCl. détoxifie le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes.
Acide lipoïque	il piège les HO [•] , RO ₂ [•] , l'HOCl et l'1O ₂ en se liant à des métaux comme le fer et le cuivre
Acide urique, bilirubine, mélanines et la mélatonine	Ils possèdent des propriétés antioxydantes <i>in vitro</i> contre les HO [•] et RO ₂ [•]

- Systèmes antioxydants non enzymatiques exogènes

Les antioxydants chimiques exogènes (Figure), eux, comprennent majoritairement les vitamines C et E, les caroténoïdes et des composés phénoliques (Mc Call et Frei, 1999).

- a) Antioxydants liposolubles : Du fait de leur lipophilicité, ils sont incorporés dans les structures lipoprotéiques membraneuses ou circulantes.

- Tocophérols (incluant la vitamine E) : ils inhibent la propagation de la peroxydation lipidique (Burton & Ingold, 1984). Ce sont d'excellents piègeurs de radicaux lipidiques, tout particulièrement LO[•] et LOO[•] (Kontush *et al.*, 1996).

- Caroténoïdes (Krinsky, 1992) : les caroténoïdes, dont la vitamine A, sont d'excellents piègeurs d'espèces radicalaires grâce à leur système conjugué de doubles liaisons (Packer *et al.*, 1981).

b) Antioxydants hydrosolubles

- Acide ascorbique (C-OH) : il joue un rôle très important en assurant la régénération de l'alpha-tocophérol en se transformant en un radical très peu réactif (C-O•) (Bielski *et al.*, 1975). Il piège directement les radicaux hydroxyles, et un surplus d'acide ascorbique peut s'avérer néfaste (c'est-à-dire avoir un effet oxydant), surtout lorsque les membranes sont pauvres en alpha-tocophérol ou en présence d'une concentration élevée de métaux de transition.

- Caroténoïdes : Les caroténoïdes sont des pigments fabriqués par les végétaux. Les plus importants sont le bêta-carotène, l'alpha-carotène, la lutéine, la zéaxanthine et le lycopène. Ce sont eux qui donnent aux fruits et légumes des couleurs orange, rouge et jaune. Ce sont d'excellents piègeurs d'espèces radicalaires particulièrement vis-à-vis de la lipoperoxydation des phospholipides membranaires grâce à leurs structures (Packer *et al.*, 1981).

I.3.2.3. Antioxydants de synthèse

Il existe de nombreux antioxydants synthétiques dont les squelettes sont souvent dérivés des antioxydants naturels (Lee *et al.*, 2009). Pour une utilisation pratique, les antioxydants ne doivent pas être toxiques, ils doivent être hautement actifs à des faibles concentrations (0.01-0.02%) et doivent être présents à la surface ou dans la phase grasse de l'aliment. Parmi les polyphénols de synthèse, on peut citer à titre d'exemple : la 3,3', 5, 5'-Tetra-t-butyl-biphenyl-4,4'-diol (figure 04) qui a montré un effet protecteur des cellules neuronales (Duong *et al.*, 2008).

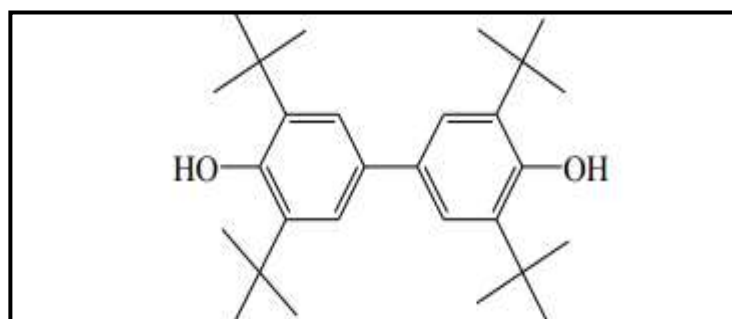


Figure 04 : Structure chimique d'un polyphénol de synthèse (3,3', 5, 5'-Tetra-t-butyl-biphenyl-4,4'-diol).

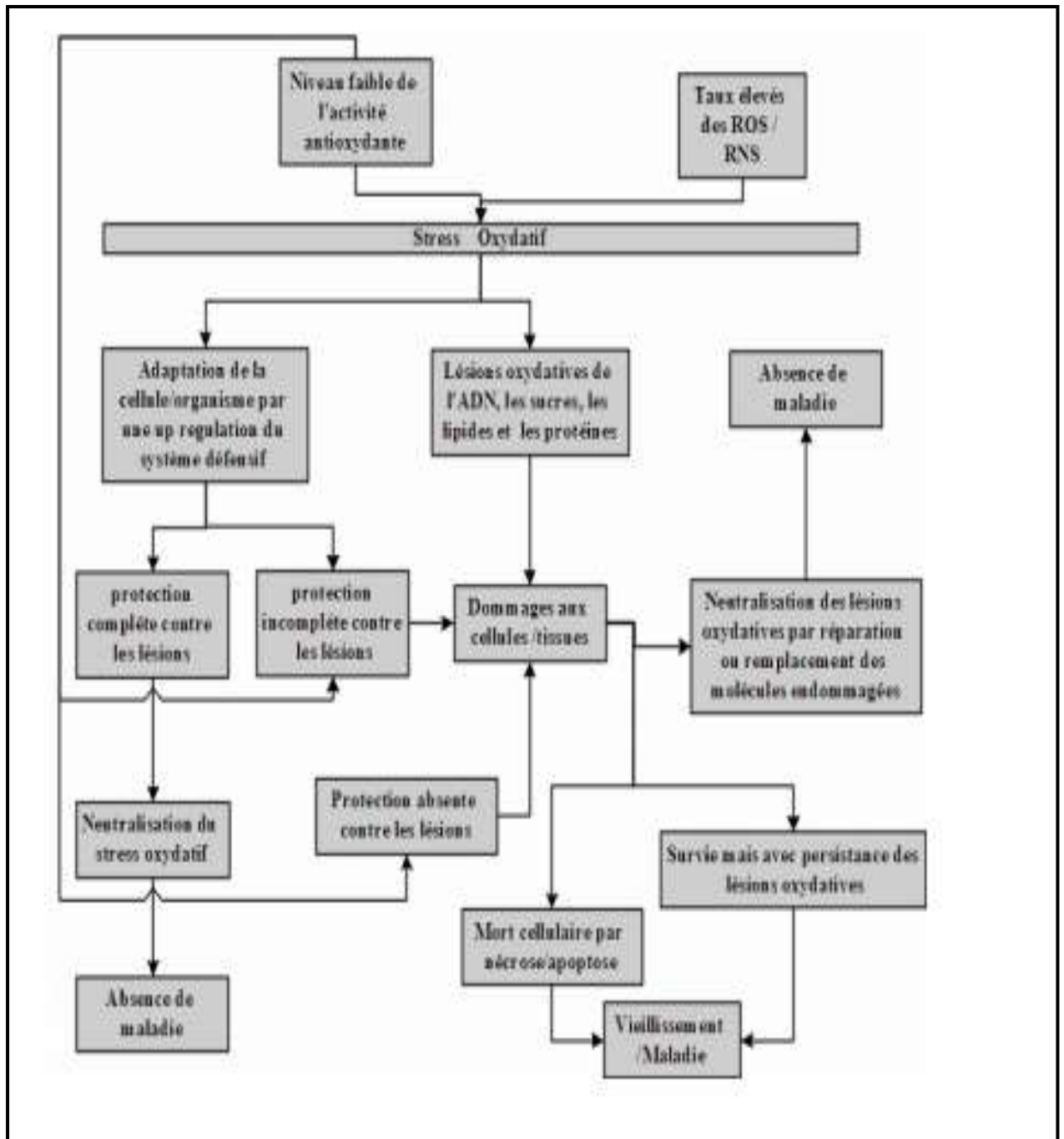


Figure 05 : Les espèces réactives, le dommage oxydatif et les réponses cellulaires au stress oxydatif.

Chapitre II

Le microbiote intestinal

II. Le microbiote intestinal

Le tractus gastro-intestinal est un écosystème complexe et ouvert aux microorganismes exogènes. De par sa surface totale (muqueuse) estimée à 200-300 m², il représente la plus grande surface du corps en contact avec l'environnement, Cette flore mérite d'être connue puisque certains médicaments, pathologies, modes de vie peuvent la perturber, par contre certains aliments ou compléments alimentaires peuvent l'améliorer (Goulet, 2015).

L'écosystème gastro-intestinal est généré par une alliance stable entre l'épithélium gastro-intestinal, le système immunitaire et une importante flore microbienne. Ces trois composants sont continuellement liés entre eux et évoluent ensemble en assurant une fonction et une activité normale de l'écosystème.

II.1. Définition

Selon la définition d'Isaulori *et al.*, (2002), la flore intestinale normale est une collection complexe et en équilibre des microorganismes qui habitent normalement le tractus gastro-intestinal et remplissant un rôle dans la nutrition, la physiologie, la détoxification et le contrôle du système immunitaire de l'hôte. La flore intestinale est un véritable écosystème qui associe :

- Une flore résidente, une flore saprophyte présente à l'état physiologique dans les intestins, composée d'une flore dominante et d'une flore sous-dominante. La flore dominante est constituée d'une vingtaine d'espèces différentes présentes à des concentrations élevées, plusieurs milliards par millilitre, de bacilles gram- (bactéroïdes), gram+ (*eubactérium*, *bifidobactérium*, *catenabactérium*), et de cocci gram+ (*peptostreptococcus*, *ruminococcus*, *veillonella*, *acidaminococcus*, *méthanobrevibacter smithii*). La flore sous-dominante est constituée par quelques millions de bactéries par millilitre, avec des entérobactéries, des streptocoques, des lactobacilles. Cette dernière peut être pathogène lorsqu'elle se multiplie.

- Une flore de passage, polymorphe qui, sauf circonstances pathologiques, ne s'implante pas dans le tube digestif (Nathan, 2013).

Du point de vue microbiologique, l'environnement gastro-intestinal comprend trois régions principales qui offrent des conditions très différentes pour la survie des différents microorganismes.

Dans le premier compartiment, l'estomac, la prolifération microbienne est fortement réduite par la présence d'oxygène apporté par la déglutition et d'une forte acidité. De ce fait, l'estomac héberge sélectivement les microorganismes acido-tolérants et anaérobies facultatifs comme les lactobacilles, streptocoques, levure, etc.

Dans le deuxième compartiment qui est le petit intestin, la microflore est constituée essentiellement de bactéries anaérobies facultatives tels que : les lactobacilles, les streptocoques et les entérobactéries, et anaérobies strictes notamment les bifidobactéries, la bactéroïdes et les clostridies.

Dans le dernier compartiment qui est le colon (dépourvu d'oxygène), le transit digestif est plus lent et la flore microbienne est plus abondante, représentant 35 à 50% du volume du contenu du colon humain (Cummings *et al.*, 1989 et Gournier-Chateau, 1994).

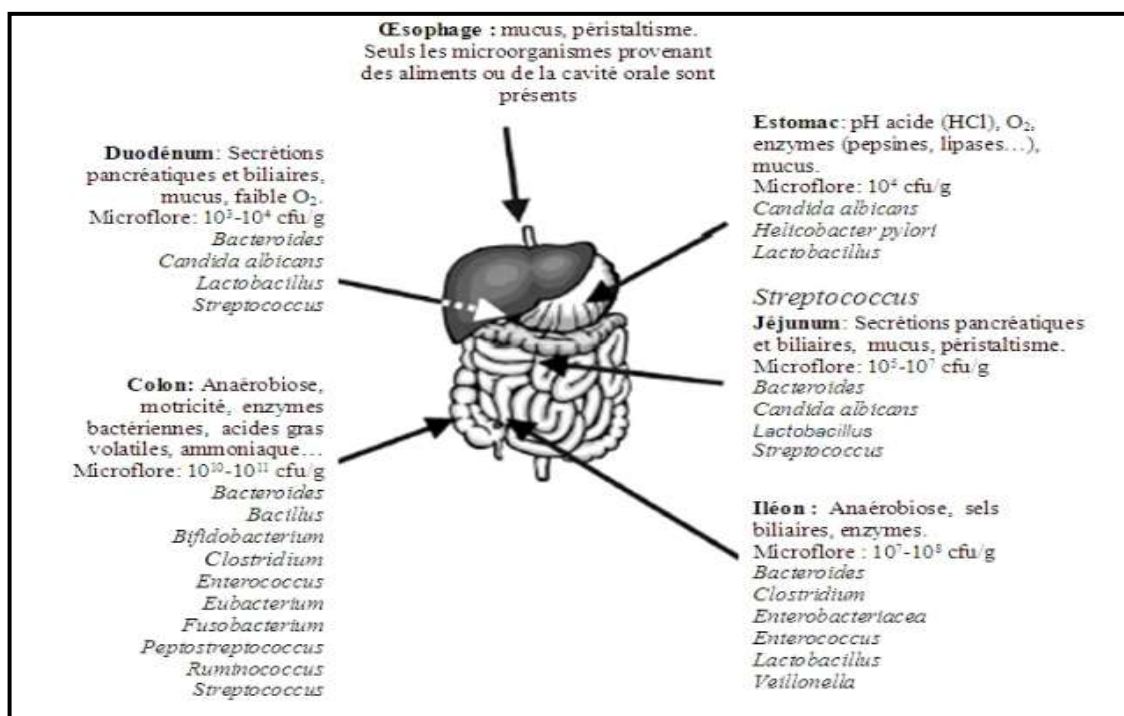


Figure 06 : Les compartiments de l'appareil digestif de l'homme et leurs microflores (Ouwehand *et al.*, 2003).

Toutefois, il faut noter qu'une partie de la flore gastro-intestinale (fraction minoritaire) demeure non cultivable et moins explorée, et ce pour diverses raisons : méconnaissance des besoins de croissance de certaines bactéries, la sélectivité des milieux utilisés, le stress dû aux conditions de culture, la nécessité d'anaérobiose stricte et la difficulté de stimuler les interactions entre les bactéries et les autres microorganismes ou les cellules de l'hôte (Zoetendal *et al.*, 2004).

II.2. Les conditions d'équilibre de la microflore gastro-intestinale

La composition et les fonctions de la microflore du tractus gastro-intestinal sont influencées par divers facteurs liés au changement des conditions physiologique de l'hôte (âge, état de santé,..), de la composition du régime alimentaire et des circonstances environnementales (contamination par les pathogènes, antibiothérapie, chimiothérapie, climat, stress, hygiène,...) (Perez-Cobas *et al.*, 2013).

Dans certains cas, ce déséquilibre peut être très favorable à la prolifération de microorganismes opportunistes pathogènes pouvant compromettre la santé et le bien-être de l'hôte. Il serait donc impératif de rechercher des solutions alternatives permettant la restauration de l'équilibre de la microflore intestinale de l'hôte (Hill *et al.*, 2014).

Tableau03 : Les principaux facteurs influençant la composition et la fonction de la microflore intestinale (Goulet ,2015).

Facteurs médiés par l'hôte	Facteurs microbiens
Terme de naissance et mode d'accouchement pH, sécrétions (immunoglobulines, bile, sels, enzymes), (motilité (péristaltisme), (physiologie) (variables selon les compartiments), cellules détachées, mucines, exsudats de tissus	Adhésion, Flexibilité nutritionnelle, Spores, capsules, enzymes, composants antimicrobiens, Temps de génération
Interactions microbiennes	
Synergie	Antagonisme / stimulation
Coopération métabolique, Excrétion de vitamines et facteurs de croissance, Changement de potentiel d'oxydoréduction pH et tension d'O ₂	Acide gras de courte chaine, amines. Changement de pH et tension d'O ₂ Composants antimicrobiens, sidérophores Besoins nutritionnels
Régime alimentaire	
Composition, fibres non digestibles, drogues, etc.	

II.3. Sources des principales infections microbiennes du tube digestif

II.3.1. Les infections entériques et réponse de l'hôte

II.3.1.1. Principales causes d'infections entériques

Les infections entériques résultent de l'ingestion de microorganismes pathogènes ou de leurs toxines (Steer *et al.*, 2000). Il existe une grande variété de bactéries, virus et parasites à l'origine des infections entériques (tableau 07). Cependant, les microorganismes d'origine bactérienne et virale sont le plus souvent impliqués dans les cas rapportés et leur mode de transmission de fait principalement par la voie oro-fécale (Mead *et al.*, 1999 et Tauxe, 2002).

Ces principaux entéropathogènes sont capables d'envahir le tractus intestinal pour s'y multiplier et causer principalement des symptômes diarrhéiques mais également dans certains cas de nausées, des vomissements et une altération générale de l'état de santé (Steer *et al.*, 2000).

Tableau 04 : Principaux agents infectieux responsables d'infections entériques (Koopmans *et al.*, 2002 ; Gadewar et Fasano, 2005 et Lamps, 2007).

Bactéries	Virus	Parasites / protozoaires
<i>Campylobacter</i>	Norovirus	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>Salmonella</i>	Rotavirus	<i>Giardia lamblia</i>
<i>E.coli</i>	Astrovirus	<i>Cryptosporidium parvum</i>
<i>Shigella</i>	Adenovirus entériques	<i>Microsporidium</i>
<i>Bacillus cereus</i>	(type 40, 41)	<i>Isospora belli</i>
<i>Vibrio cholera</i>	Hépatite A et E	<i>Cyclosporacayetanensis</i>
<i>Clostridium difficile</i>		
<i>Aeromonas</i>		
<i>Pleisiomonas</i>		
<i>Yersinia</i>		

II.3.1.2. Infections d'origine bactérienne

Les bactéries pathogènes telle que *Shigella dysenteriae*, *Campylobacter*, *Salmonella* et *E. coli* sont les causes les plus communes d'infections entériques au niveau mondial (Fasano, 2001 et Lamps, 2007) et l'incidence de ces microorganismes demeure préoccupante. De façon générale, les entéropathogènes bactériens représentent près de 15% de cas de diarrhées dans les pays développés et plus de 60% dans les pays en voie de développement (Dupont, 2005).

Parmi les pourcentages attribués aux infections entériques bactériennes dans les pays développés, *E. coli* et *Shigella dysenteriae* qui sont considérées comme des pathogènes émergent, représentent le troisième agent étiologique majeur avec 2 à 5% de cas de diarrhée (Fasano, 2001 et Tauxe, 2002).

II.3.1.3. Les principaux germes entéropathogènes

Les principales bactéries capables de déclencher des maladies intestinales sont : *Shigella*, *Salmonella*, *E. coli*, *Bacillus*, *Yersinia*, *Campylobacter* et *Vibrio*. L'abondance de ces bactéries est en relation directe avec l'hygiène. Les entéropathogènes développent leur pathogénicité en s'attachent aux entérocytes, ce qui leur permet la colonisation intestinale et la pénétration cellulaire (Cocconer *et al.*, 1998). Une diarrhée correspond à la survenue brutale de plus de trois émissions fécales. Elle peut être glaireuse, sanglante ou hydrique, ce qui constitue un premier élément de diagnostic entre infections à germes invasifs ou à germe toxigène (Bahri, 2014).

- **Bactéries entérotoxigènes :** Elles élaborent des toxines qui stimulent l'hypersécrétion d'eau et d'électrolyte. La diarrhée est essentiellement hydrique, abondante, sans fièvre avec parfois des vomissements. Sa gravité réside dans la déshydratation.
- **Bactéries entéropathogènes invasives :** Ces bactéries entéropathogènes invasives pénètrent la muqueuse du colon ; il s'agit d'une diarrhée douloureuse et fébrile, dysentérique avec des selles glaireuses et / ou sanglantes contenant du mucus, associées à des signes infectieux, parfois septicémiques (Hodille, 2015).

II.3.2. Facteurs d'expression de la pathogénicité

➤ Facteurs liés à l'espèce entéropathogène

Les bactéries entéropathogènes expriment leur action nuisible chez l'hôte, quand les conditions deviennent favorables pour leur croissance. Ces actions d'entéropathogénicité ne sont que le résultat de l'expression des gènes codant pour la synthèse des entérotoxines, et qui sont souvent portés sur des plasmides, ou à une prolifération et multiplication rapide de l'entéropathogène, qui conduit à une invasion de l'intestin de l'hôte (Haase *et al.*, 2005).

➤ Facteurs liés à l'hôte

L'hôte joue un rôle important dans l'expression de la pathogénicité de ces entéropathogènes, car son état de santé influence d'une manière directe le déclenchement de l'effet entéropathogène. En effet, les sujets immunodéprimés, comme les malades chroniques (sidaïques, diabétiques,..) et les porteurs de tumeurs, représentent tous la première cible de ces pathogènes.

➤ Autres facteurs

D'autres facteurs interviennent dans l'expression de l'entéropathogénicité, comme le bas niveau socio-économique, car il est en relation directe avec la mauvaise hygiène ainsi que la sous-alimentation. Ces facteurs sont présents dans les pays en voie de développement et en particulier dans le tiers monde (Perelman *et al.*, 1990).

II.4. L'infection intestinale due à *Bacillus cereus*

II.4.1. Généralités

Bacillus cereus est un germe tellurique (présent dans le milieu extérieur : sol, eau, air ...ect et capable d'y résister très longtemps sous forme de spore). Cette spore se transforme en forme active en présence d'humidité lorsque la température est favorable (15 à 50C°) et en présence d'éléments nutritifs tels que l'amidon (Wilcks *et al.*, 2006).

II.4.2. Caractères Bactériologiques

- Caractères morphologiques : Bacilles longs, mobiles à Gram positif, de formes régulières, en courtes chaînes, Peuvent être sporulés (spore non déformante). Certains éléments peuvent perdre la coloration de Gram.

- Caractères cultureux : Aéro-anaérobie, Pousse sur gélose ordinaire à 37°C en atmosphère normale ; pousse aussi à 45 °C. Colonies grisâtres, larges, arrondies, à contours irréguliers avec une large hémolyse sur gélose au sang de mouton.

- Caractères enzymatiques et biochimiques : Catalase +, Oxydase variable, En galerie API 20 E les caractères positifs sont : VP, Citrate, Nitrate, Gélatine, Le caractère ADH est variable CTCB (2007).

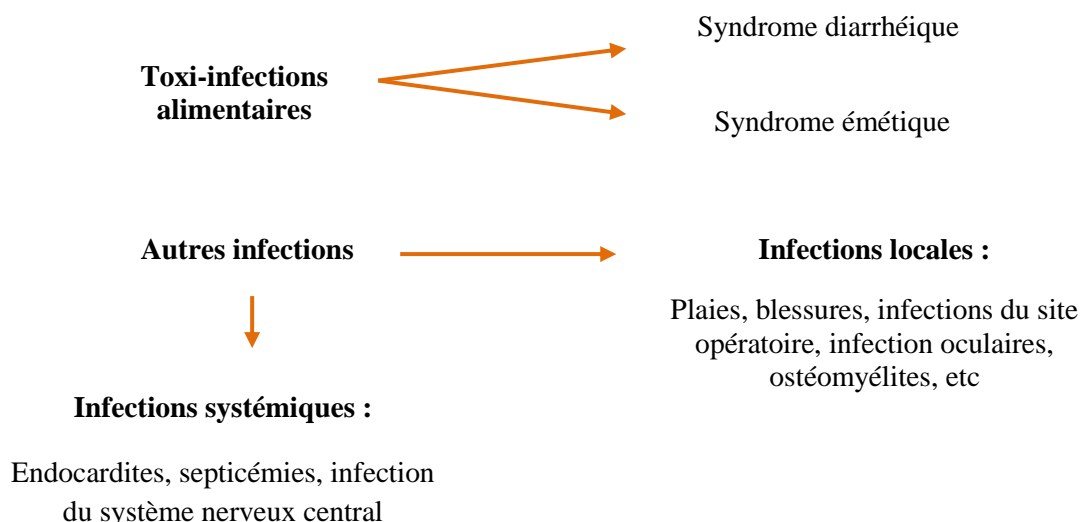


Figure 07 : Les infections à *B. cereus* chez l'homme

II.4.3. Implication de *Bacillus cereus* dans les TIAC en Algérie

Les infections digestives à *B. cereus* surviennent dans le cadre de toxiinfections alimentaires collectives et déterminent deux tableaux cliniques distincts en fonction du type de toxine produite par la bactérie : syndrome diarrhéique lié à la production d'une entérotoxine, ou vomissements diffus dus à la présence d'une toxine émétisante thermostable préformée dans l'aliment.

En Algérie, 60% de cas dont l'agent causal est inconnu à cause des lacunes législatives ou techniques. Certaines bactéries comme *Bacillus cereus* ne figurent pas dans la liste des germes recherchés causant les TIAC et même de critères microbiologiques (Ziane, 2015) de (Joradp, 1998).

De nombreux travaux ont montré l'implication de *B. cereus* dans les intoxications après la consommation des pâtes alimentaires (Pirhonen *et al.*, 2005 et Logan 2011) et produits déshydratés (Ouarsas *et al.*, 2008 et Delmas *et al.*, 2010) et moins souvent après consommation des eaux contaminées par ce germe (Mouffok, 2011).

II.4.4. Pouvoir pathogène de *Bacillus cereus*

Les TIAC à *B. cereus* déterminent deux tableaux cliniques différents, qui peuvent être associés entre eux : un syndrome de gastro-entérite aiguë et un syndrome émétique.

- Le syndrome diarrhéique : Les symptômes apparaissent 8 à 16 heures après l'ingestion du plat contaminant. Ils associent des rampes intestinales et diarrhée profuse. Le plus souvent, il n'existe pas de fièvre. L'évolution est rapidement favorable et aucun traitement antimicrobien n'est indiqué. Le syndrome diarrhéique est lié à l'élaboration par la souche bactérienne d'une entérotoxine thermolabile, produite soit dans l'aliment contaminé, soit in vivo dans l'intestin grêle, et synthétisée au cours de la phase exponentielle de croissance à une température comprise entre 32 et 37 °C.

- Le syndrome émétique : Le syndrome émétique dans les TIAC à *B. cereus* est caractérisé par une incubation courte (1 à 5 heures), la présence de nausées, de vomissements profus, de douleurs abdominales, et dans un tiers des cas, de diarrhée. L'évolution est presque toujours favorable, en quelques heures. Sur le plan épidémiologique, la survenue des vomissements est volontiers liée à l'ingestion de nourriture contaminée par des souches toxigènes. Ces toxines (céréulides) sont synthétisées pendant la phase exponentielle et la phase stationnaire de croissance. Il pourrait être également associé à la sporulation. La température optimale de synthèse et de production de la toxine se situe entre 25 et 30°C (Afssa, 2009).

II.4.5. Traitement

B. cereus est sensible à l'Imipénem et à la Vancomycine; la plupart des souches sont aussi sensibles au chloramphénicol, aux aminosides, à la Ciprofloxacine, à l'Erythromycine et à la gentamicine. Par contre, *B. cereus* produit de grandes quantités de β -lactamases et est résistant à la Pénicilline, à l'Ampicilline, aux céphalosporines et au Triméthoprime (Agence de la Santé Publique de Canada, 2012).

II.5. Translocation bactérienne et pathogénicité

II.5.1. Définition

La translocation bactérienne est définie comme le passage des bactéries endogènes viable du tube digestif à travers la muqueuse intestinale vers les ganglions lymphatiques mésentériques (G.L.M) et d'autres organes comme la rate et le foie (Berg et Carllington, 1979).

II.5.2. Mécanisme de la translocation bactérienne

La stabilité et la régulation de l'écosystème intestinal repose sur mécanismes majeurs :

- L'interaction entre les bactéries et le milieu où elles se développent.
- L'interaction entre le tube digestif et son contenu riche en substrats.
- L'interaction avec les épithéliums hautement différenciés et un système immunitaire spécialisé, les ganglions lymphatiques mésentériques (G.L.M).

Dans cette perspective globalisante, germes saprophytes, épithéliums intestinaux et système immunitaire participent concurremment au maintien d'un état d'équilibre trophique et nutritionnel au sein du tractus digestif ainsi qu'à l'optimisation des défenses à l'encontre des agressions exogènes quelle qu'en soit la nature (bactérienne, parasite ou toxique) (Berg, 1992).

La translocation est un phénomène facilement compréhensible quand il est associé à une ulcération de la muqueuse intestinale. Certains microorganismes traversent facilement l'épithélium intestinal pour s'infiltrer directement dans la *lamina propria*. Certaines particules peuvent être piégées dans la *lamina propria*, en état de phagocytose, par les macrophages du tube digestif.

L'utilisation d'endotoxine bactérienne comme indicateur de translocation dans une étude pilote, montre que l'endotoxine passe directement à travers les cellules de la muqueuse intestinale pour entrer dans la *lamina propria*. Elle peut être phagocytée par les macrophages (Jones *et al.*, 1989 et Berg, 1992).

La translocation bactérienne est soumise à des facteurs de régulations qui paraissent être la taille de la population bactérienne, l'importance de la flore associée ou adhérente à l'épithélium, la durée de cette association, l'intégrité de la muqueuse et l'état immunitaire du sujet (Hagiage, 1994).

II.5.3. Conséquences et altérations dues à la translocation bactérienne

II.5.3.1. Conséquences sur le système immunitaire de l'hôte

Récemment, il a été montré chez des souris que l'affaiblissement des défenses immunitaires du tube digestif peut promouvoir une translocation bactérienne à point de départ digestif (Berg, 1992). Il est vraisemblable qu'en plus des cellules de la muqueuse, l'immunité cellulaire et l'immunité humorale interviennent dans le phénomène de la translocation bactérienne.

II.5.3.2. Translocation bactérienne et lésions de la muqueuse intestinale

La muqueuse intestinale a le pouvoir d'être à la fois une barrière mécanique et un tissu immunologique contre le passage des particules étrangères et les germes pathogènes. Cependant, la perméabilité de la muqueuse peut être altérée et ne pas remplir sa fonction de barrière et rôle de défense.

Parmi les agents responsables de cette lésion, il y a l'acide ricinoléique, le choc hémorragique, les lésions thermiques et les endotoxines associées à l'ischémie intestinale. Sur le plan biochimique et métabolique, la xanthine oxydase apparaît comme médiateur de lésions intestinales après un choc hémorragique (Cooper, 1979 et Parck *et al.*, 1982).

Chapitre III
L'antibiorésistance

III. L'antibiorésistance

L'émergence rapide de l'antibiorésistance est un problème majeure pour la santé publique (OMS, 2007), les données de surveillance montre que qu'il y a une augmentation des infections causée par des bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques dans plusieurs pays (Vincent *et al.*,2013). La multi-résistance bactérienne aux antibiotiques est l'image la plus grave de la résistance car elle réduit notablement les possibilités thérapeutiques.

III.1. Définition

La résistance bactérienne est prise dans sa définition clinique, synonyme d'échec thérapeutique, c'est-à-dire, la capacité de la bactérie à se multiplier en présence d'une concentration d'antibiotique égale ou supérieur à celle que l'on peut obtenir in vivo. Pour le bactériologiste, une bactérie sera résistante par rapport à une valeur de référence qui est la concentration minimale inhibitrice de l'antibiotique vis-à-vis du germe (Jarlier et Nordman, 2000).

III.2. Types de résistance bactérienne

III.2.1. La résistance naturelle

On parle de résistance naturelle lorsque toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique. L'expression d'un caractère inné, partagé par l'ensemble de la communauté bactérienne, rend inappropriée l'utilisation de certains antibiotiques. Des particularités structurales de la paroi cellulaire, empêchant les antibiotiques d'accéder à leur cible, ou l'absence de cible sont autant de facteurs, qui conditionnent la résistance naturelle (Normak, 2002).

III.2.2. La résistance acquise

La résistance acquise survient lorsque, seules, quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique, deviennent résistantes. Cette résistance peut être acquise par mutation ou par transfert de gènes par transduction, conjugaison ou transformation.

La résistance acquise par mutation est aussi qualifiée de résistance chromosomique. Le phénomène de mutation est conditionné par l'utilisation des antibiotiques qu'ils contribuent à sélectionner, de manière spontanée, des mutants résistants au sein d'une population bactérienne. La cause principale de l'évolution et de l'extension des résistances aux antibiotiques est leur prescription à grande échelle en thérapeutique humaine, pour différentes infections et avec des doses incorrectes (Goossens *et al.*, 2006).

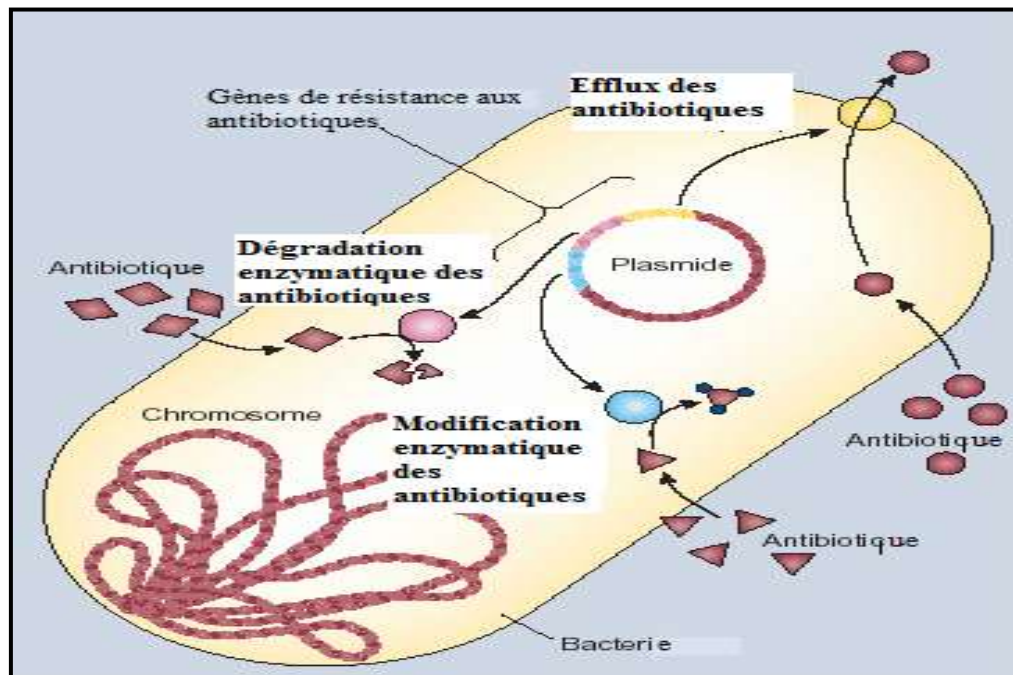


Figure 08 : Les différents modes d'acquisition des gènes de résistance (R) aux antibiotiques chez les bactéries (Levy et Marshall, 2004).

III.3. Mécanismes de la résistance

Les modes de résistance connus actuellement qui résultent de la pression de sélection exercée par les ATB sont au nombre de quatre. Une même bactérie peut présenter plusieurs de ces mécanismes de résistance (Bevilacqua, 2011).

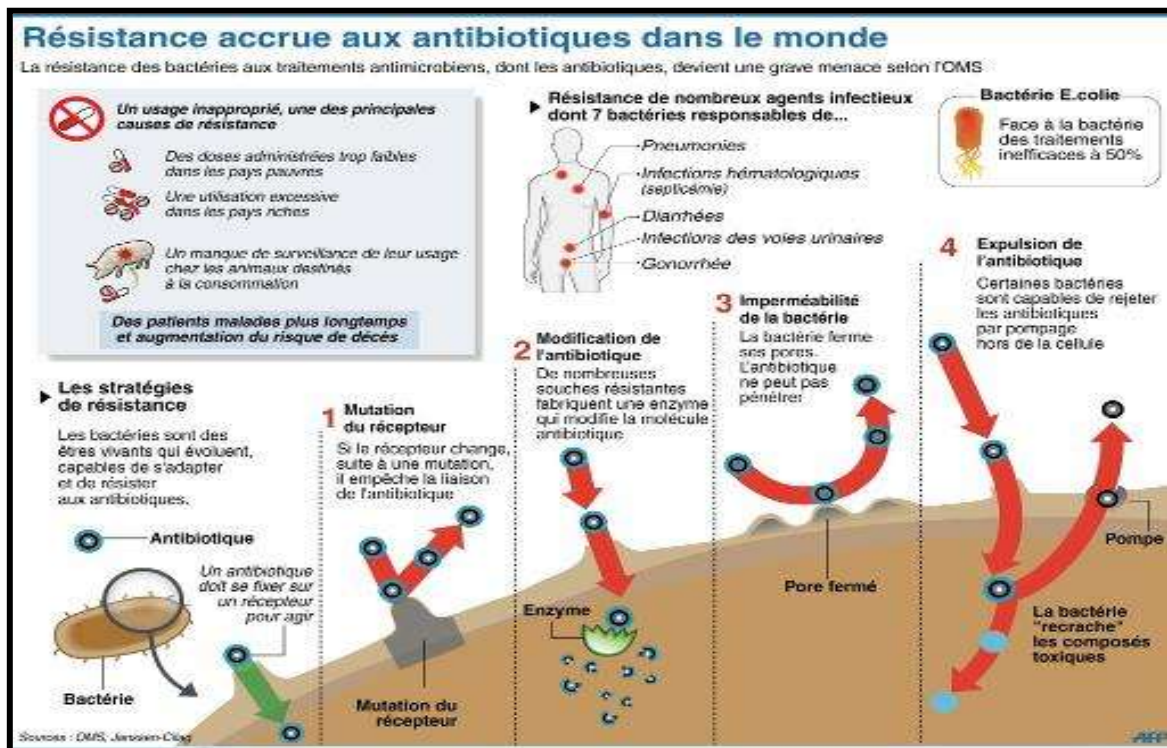


Figure 09 : Différents mécanismes de résistance des bactéries.

III.3.1. L'inactivation enzymatique

Par ce mécanisme, la bactérie acquiert la capacité d'inactiver l'action des ATB par la sécrétion d'enzymes avant même qu'ils n'aient pénétrés au sein du microorganisme (Babic, 2006). Les classes d'antibiotiques visées par ces enzymes sont les β -lactamines, les macrolides-lincosamimides-streptogramines (MLS), les aminosides et les phénicolés.

III.3.2. Le mécanisme d'Efflux actif

Ce sont des mécanismes de transport membranaire universellement répandus chez des organismes vivants. Ils ont un rôle clé dans la physiologie bactérienne : préserver l'équilibre physico-chimique du milieu intracellulaire en s'opposant à l'accumulation de substances naturelles ou synthétiques toxiques transport de substances nutritives et export de substances toxiques.

On différencie les pompes à efflux par :

- Spécificité ou non des molécules exportées
- Structure : une à trois protéines
- Type d'énergie nécessaire : ATP ou force proton-motrice
- Mode expression : inductible ou constitutif

III.3.3. Modification de la cible

- Modification d'affinité de la cible

Ce mécanisme est en relation avec une modification d'affinité d'une ou plusieurs cibles de type PLP ou PBP (Penicillin Binding Protein) comme chez *Streptococcus pneumoniae*. La résistance des entérocoques aux pénicillines telle l'ampicilline peut être en relation avec une hyperproduction de PLP d'affinité médiocre. Il est principalement présent chez les bactéries Gram négatif (Bobba, 2011 et Guinote, 2011).

- Substitution de cible

Ce mécanisme est de moindre importance dans le monde bactérien. Cependant, l'exemple majeur est la résistance intrinsèque ou méticillino-résistance de *Staphylococcus aureus* qui est liée d'une part, à la présence d'une nouvelle PLP de faible affinité, dénommée PLP2a et d'autre part à son hyperproduction. La conséquence clinique est importante, car il y aura résistance croisée entre β - lactamines.

- Altération des précurseurs de la paroi bactérienne

Les glycopeptides (vancomycine, et teicoplanine) ont une affinité pour les précurseurs du peptidoglycane comportant le dipeptide D-alanyl-D-alanine. Les cibles potentielles sont donc soit intra cytoplasmiques soit situées au niveau de la paroi en formation. Ces cibles ne sont pas toutes atteintes, car elles ne sont pas toutes accessibles aux glycopeptides. Aucune cible n'est atteinte chez les bactéries à Gram négatif, car ces antibiotiques ne peuvent pas traverser la membrane externe.

Chez les bactéries à Gram positif, ces antibiotiques diffusent librement à travers les mailles du peptidoglycane. En revanche, ils ne peuvent traverser la membrane cytoplasmique et leur action s'exerce sur la paroi en formation (Lessard *et al.*, 1999 et Wright, 2005).

- Altération de la synthèse des acides nucléiques

Des mutations dans le gène *gyrA* peuvent modifier la sous unité A de l'ADN gyrase (une des cibles des quinolones) et diminuer l'affinité des quinolones pour leur cible ce qui provoque une résistance croisée, à des degrés divers, pour l'ensemble des quinolones (Kim *et al.*, 2010).

- Altération des sites de liaison ribosomale

Des substitutions d'acides aminés dans la protéine S12 de la sous-unité 30 S du ribosome provoquent une résistance à la streptomycine. Ces mutations ont été caractérisées chez *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium tuberculosis*.

III.3.4. Diminution de la perméabilité de la membrane

Pour agir, les antibiotiques doivent pénétrer dans la cellule bactérienne. Beaucoup d'antibiotiques utilisent les systèmes de transport propres à la bactérie pour ses échanges avec l'extérieur (Marchou *et al.*, 1987). Pour résister, la bactérie contrecarre cette entrée de toxiques en diminuant la perméabilité de sa membrane par :

- Une altération des porines : ce mode de résistance n'affecte que les bactéries Gram négatif. Chez ces bactéries, la membrane externe constitue une barrière de diffusion très efficace. L'absence de passage ou l'augmentation du temps de passage protège les bactéries et les rend résistantes.
- Une inhibition du transport actif
- Une inhibition de la pénétration à travers les peptidoglycanes recouvrant la membrane plasmique chez les bactéries Gram positives.
- La modification de la composition du lipopolysaccharide (LPS), soit dans le polysaccharide, soit dans le core, peut aussi être à l'origine d'une diminution de la perméabilité.

Ce mécanisme n'est, cependant, pas très performant, car il suffit d'augmenter les doses d'antibiotiques pour faire face à cette baisse de la perméabilité membranaire. Néanmoins, ce système, lorsqu'il est associé à d'autres systèmes de résistance, peut protéger de façon efficace la bactérie même à des doses importantes d'antibiotiques (Pajes, 2004).

III.4. Cas de résistance de *Bacillus cereus* aux antibiotiques

Le traitement des infections à *B. cereus* chez l'humain est entravé par la résistance aux médicaments antimicrobiens. Les tests de sensibilité aux antibiotiques montrent que la résistance de *B. cereus* aux différents antibiotiques varie largement entre les souches (Bernhard *et al.*, 1978 et Weber *et al.*, 1988). La plupart des souches de *B. cereus* produisent de la bêta-lactamase et sont par conséquent considérées résistantes aux agents antimicrobiens à base de bêta-lactamines (Coonrod *et al.*, 1971). La plupart des souches de *B. cereus* sont résistantes à la pénicilline, à la pénicilline semi-synthétique, à la céphalosporine WEBER *et al.*, (1988), à l'ampicilline, à la colistine, à la polymyxine, à la kanamycine, à la tétracycline, à la bacitracine et à la céphaloridine (Wong *et al.*, 1988). MOLS *et al.*, (2007) ont rapporté que *B. cereus* ATCC 14579 était résistante aux antibiotiques ciblant les parois cellulaires, comme la céfazoline, le kétoprofène et le moxalactame. Même avec le régime antibiotique approprié, la documentation scientifique présente des exemples d'infections à *B. cereus* réfractaires conduisant à un résultat fatal (Musa, 1999 et Tuladhar, 2000). Les tests de susceptibilité aux antibiotiques menés par Santé Canada sur dix catégories d'antibiotiques a démontré que *B. cereus* ATCC 14579 présentait une résistance élevée à l'amoxicilline, à l'aztréonam et au triméthoprime, une sensibilité intermédiaire au céphotaxime et à l'acide nalidixique mais qu'elle est sensible à la doxycycline, à l'érythromycine, à la gentamicine et à la vancomycine.

III.5. Impact de l'antibiorésistance

Lorsqu'une infection ne peut plus être traitée par un antibiotique de première intention, on doit recourir à des médicaments plus coûteux. De plus, la prolongation de la maladie et du traitement, souvent dans le cadre d'une hospitalisation, accroît les dépenses de santé, ainsi que la charge financière pesant sur les familles et la société.

La résistance aux antibiotiques compromet les acquis de la médecine moderne. En l'absence d'antibiotiques efficaces pour prévenir et traiter les infections, les greffes d'organes, la chimiothérapie et certaines interventions chirurgicales telles que la césarienne deviendront beaucoup plus dangereuses (OMS, 2015).

Chapitre IV
Polyphénols et huiles
essentielles en
Phytothérapie

IV. Polyphénols et huiles essentielles en phytothérapie

Si l'on ne sait pas précisément ce que nos ancêtres mangeaient au début de l'humanité il y a 5 à 7 millions d'années, il est certain que les plantes faisaient partie de leur alimentation quotidienne. Ils découvraient très tôt dans leur évolution que ces plantes ne représentaient pas uniquement une source d'alimentation mais pouvaient également soulager voire guérir certaines maladies.

Aujourd'hui les principes actifs des plantes sont des composants essentiels d'une grande partie de nos médicaments et produits de soins (Hans, 2007). Malgré les multiples progrès de la médecine moderne, il y a un net regain d'intérêt vis-à-vis de la phytothérapie. Selon OMS plus de 80% de la population mondiale ont recours à la pharmacopée traditionnelle pour faire face aux problèmes de la santé (Farnsworth *et al*, 1986). En effet sur les 300 000 espèces végétales recensées sur la planète plus de 200 000 espèces vivent dans les pays tropicaux d'Afrique ont des vertus médicinales (Millogo *et al.*, 2005).

IV.1. Définition de la Phytothérapie

Traitement ou prévention des maladies par l'usage des plantes, la phytothérapie fait partie des médecines parallèles ou des médecines douces.

IV.2. Différents types de la Phytothérapie

- Aromathérapie : est une thérapeutique qui utilise les essences des plantes, ou huiles essentielles, substances aromatiques secrétées par de nombreuses familles de plantes, ces huiles sont des produits complexes à utiliser souvent à travers la peau.
- Gemmothérapie : se fonde sur l'utilisation d'extrait alcoolique de tissus jeunes de végétaux tels que les bourgeons et les racines.
- Herboristerie : correspond à la méthode de phytothérapie la plus classique et la plus ancienne. L'herboristerie se sert de la plante fraîche ou séchée; elle utilise soit la plante entière, soit une partie de celle-ci (écorce, fruits, fleurs). La préparation repose sur des méthodes simples, le plus souvent à base d'eau : décoction, infusion, macération. Ces préparations existent aussi sous forme plus moderne de gélule de poudre de plante sèche que le sujet avale.

- Homéopathie : a recours aux plantes d'une façon prépondérante, mais non exclusive; les trois quarts des souches sont d'origine végétale, le reste étant d'origine animale et minérale.
- Phytothérapie pharmaceutique : utilise des produits d'origines végétales obtenus par extraction et qui sont dilués dans de l'alcool éthylique ou un autre solvant. Ces extraits sont dosés en quantités suffisantes pour avoir une action soutenue et rapide. Ils sont présentés sous forme de sirop, de gouttes, de gélules, de lyophilisats... (Strang, 2006).

IV.3. Les avantages de la phytothérapie

Malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages. N'oublions pas que de tout temps à l'exception de ces cent dernières années, les hommes n'ont pas eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes, rhume ou toux ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria. Aujourd'hui, les traitements à base des plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît, les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus.

La phytothérapie qui repose sur des remèdes naturels est bien acceptée par l'organisme, et souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques comme l'asthme ou l'arthrite (Iserin *et al.*, 2001).

IV.4. Phytothérapie et composés phénoliques

IV.4.1. Généralités

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux. Ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires). Par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal, mais ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement. Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (Urquiaga et Leighton, 2000).

Le terme phénolique est utilisé pour définir des substances qui possèdent au moins un groupement hydroxyle (OH) substitué sur un cycle aromatique. Les polyphénols naturels peuvent donc être des molécules simples comme les acides phénoliques, mais aussi des composés hautement polymérisés comme les tanins (Rezaire ,2012).

IV.4.2. Principales classes des composés phénoliques

IV.4.2.1. Les acides phénoliques simples

➤ Les acides hydroxybenzoïques

Ce sont des dérivés de l'acide benzoïque, ils ont une structure générale de base de type (C6-C1) et existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides exp : acide benzoïque, acide gallique, acide vanillique..... (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

➤ Acides hydroxycinnamiques

Ils dérivent de l'acide cinnamique, ils ont une structure générale de base de type (C6-C3) et existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques exp : Acide caféïque, acide coumarique et acide cinnamique.

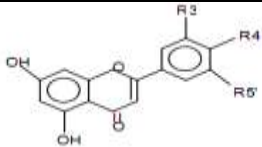
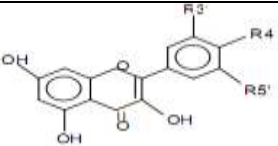
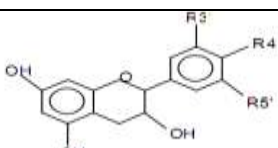
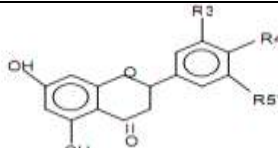
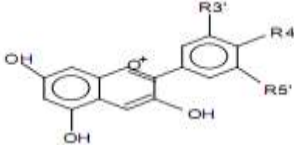
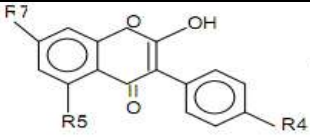
IV.4.2.2. Les Flavonoïdes

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange (Piquemal, 2008), cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus ; (flavus=jaune) (Karaali *et al.*, 2004 et Malesev et Kuntic,2007). Les flavonoïdes ont été isolés par le scientifique Chervreul en 1814, mais ont été réellement découverts qu'en 1930 par Albert Szent-Györgyui, désignés sous le nom de vitamine P, en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins, cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines, il devient clair que ces substances appartiennent aux flavonoïdes (Nijveldt *et al.*, 2001).

Les travaux relatifs aux flavonoïdes sont multiples depuis la découverte du célèbre "french paradox" correspondant à un bas taux de mortalité cardiovasculaire observé chez les habitants des régions méditerranéennes, associant une consommation de vin rouge à une prise importante de graisses saturées (Ghedira, 2005). Près de 4000 flavonoïdes ont été décrits (Medic-Šaric *et al.*, 2004).

➤ Classification

Tableau 05 : Principales classes des flavonoïdes (Narayana *et al.*, 2001) et W- Erdman *et al.*, 2007)

Classes	Structures chimiques	R 3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH3	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Proanthocyanidine (tannins condensés)		OH	OH	H	Cathéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodyctyol
Anthocyanidine		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Délphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genesteine
		H	O-Glu	OH	Daidezine

➤ Localisation et Distribution

Les flavonoïdes sont impliqués dans de nombreuses interactions des plantes avec les conditions biotiques et abiotiques de leur environnement, ces substances sont accumulées dans différentes parties cellulaires et tissulaires de la plante durant l'organogénèse et sous l'influence de plusieurs facteurs stimulants (Hutzler *et al.*, 1998). Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fruits, graines, bois, pollens (Verhoeven *et al.*, (2002).

Certaines classes de flavonoïdes sont présentes exclusivement chez certains végétaux, on trouvera par exemple, les flavanones dans les agrumes, les isoflavones dans le soja, les anthocyanes et les flavonols ont eu une large distribution dans les fruits et les légumes tandis que les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs, sont considérés comme des pigments naturels au même titre que les chlorophylles et les caroténoïdes (Lahouel, 2005) et Piquemal, 2008).

IV.4.2.3. Les Lignanes

Ils sont constitués de deux unités de phénylpropane. Bien qu'ils entrent dans la composition de certaines graines, céréales, fruits et autres légumes (El Gharras, 2009).

IV.4.2.4. Les stilbènes

Ces composés sont en très petites quantités dans notre alimentation. Le plus connu d'entre eux est le resvératrol qui a été largement étudié pour ses propriétés anti-cancéreuses mises en évidence lors de l'étude des activités biologiques de plantes médicinales (El Gharras, 2009).

IV.4.3. Propriétés des composés phénoliques

Les polyphénols possèdent plusieurs propriétés thérapeutiques qui sont résumées dans le tableau N°6.

Tableau 06 : Principales propriétés des polyphénols (Amie, 2003 ; Malesev et Kuntic, 2007) ; Gonzalez-Gallego *et al.*, 2007 et Tapas *et al.*, 2008)

Propriétés	Origine
Antiradicalaires	phénomène de résonance électronique exercé par les noyaux aromatiques
Chélatrices des ions métalliques	les flavonoïdes peuvent facilement chélater les ions métalliques en créant des composés complexes inactifs
Antibactériennes	les composés phénoliques sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes.
Anticancéreuses	piégeage des radicaux libres, Inhibition du métabolisme d'acide arachidonique, Formation d'un complexe inactif avec le carcinogène
Antiinflammatoires	ils peuvent moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation athérosclérotique en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires
Antivirales	Adsorption du virus sur la cellule hôte, au niveau de la pénétration du virus dans la cellule hôte, au niveau de la de réplication du virus et la synthèse des protéines virales, l'assemblage et de la sortie du virus hors de la cellule hôte.

IV.5. Phytothérapie et huiles essentielles

Les molécules actives, impliquées dans les mécanismes de défense des plantes, sont issues du métabolisme secondaire. Elles ne participent pas directement à la croissance des plantes, mais ont évolué pour leur fournir une protection naturelle contre les attaques de microbes ou d'insectes. Une partie de ces métabolites secondaires se concentre dans les sacs oléifères, qui sont des poches sécrétrices d'huiles essentielles. L'exploration des huiles essentielles pour la recherche de molécules à activité antibiotique semble donc être une voie intéressante.

IV.5.1. Définition

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatiles, isolées des plantes par hydrodistillation ou par expression mécanique (Kalemba et Kunicka, 2003). Elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs, de brindilles, d'herbes, d'écorces, de bois, de racines ou de fruits, mais également à partir des gommés qui s'écoulent du tronc des arbres. L'hydrodistillation reste le moyen le plus employé pour produire les huiles essentielles, en particulier à des fins commerciales (Burt, 2004). Les métabolites secondaires sont extraits des plantes par un entraînement à la vapeur d'eau. Le volume d'huile essentielle récupéré dépend du rendement de distillation, qui est variable, chez une même plante, en fonction de la saison (Gonny *et al.*, 2004).

Les huiles essentielles peuvent aussi être obtenues par expression à froid, comme pour les agrumes. De nouvelles techniques, permettant d'augmenter le rendement de production, ont été développées, comme l'extraction au moyen de dioxyde de carbone liquide à basse température et sous haute pression (Santoyo *et al.*, 2005) ou l'extraction assistée par ultrasons ou micro-ondes (Kimbaris *et al.*, 2006).

IV.5.2. Les constituants des huiles essentielles

Les huiles essentielles peuvent être classées en plusieurs familles biochimiques. L'activité thérapeutique d'une huile essentielle est liée à sa structure biochimique, aux groupes fonctionnels de ses composés principaux (alcools, phénols, composés terpéniques...) et à leurs actions synergiques. Les principales familles biochimiques sont présentées ci-dessous pour expliciter les diverses propriétés des huiles essentielles.

IV.5.2.1. Les composés aromatiques

Ils se distinguent entre eux selon la composition chimique, tableau n° 7.

Tableau 07 : Différentes classes de composés phénoliques (Mayer, 2012)

Composés aromatiques	Description	Exemple	Propriétés majoritaires
Phénols	Ce sont des composés chimiques aromatiques avec une fonction hydroxyle.	Eugénol, carvacrol et thymol	Activité anti-infectieuse puissante, stimulants immunitaires et antioxydants
Aldéhydes aromatiques	Ils comportent le groupe caractéristique –CHO.	Aldéhyde cinnamique	action anti-infectieuse puissante à large spectre d'action
Cétones	Sont des composés carbonylés, dont l'un des carbones porte un groupement carbonyle.	Carvone, verbenone	actions relaxantes, mucolytiques, antiparasitaires et antivirales
Esters	un groupement caractéristique formé d'un atome lié simultanément à un atome d'oxygène par une double liaison et à un groupement alkoxy du type -O-R'.	Acétate de linalyle	antispasmodiques, anti-inflammatoires et neurotoniques.
Coumarines	Ces composés possèdent des hydroxyles phénoliques qui peuvent être méthylés ou être engagés dans des liaisons hétérosides	bergaptène	calmantes du système nerveux

IV.5.2.2. La classe des terpénoïdes

La classe des terpénoïdes est la plus variée au niveau structural. Les terpénoïdes, dont 25 000 sont connus comme métabolites secondaires, dérivent du précurseur isoprénique à cinq carbones, l'isopentényl pyrophosphate. Les plus petits terpénoïdes sont les hémiterpénoïdes (C5), qui sont formés d'une seule unité isoprénique, tableau n° 8.

Tableau 08 : Différentes classes des terpénoïdes (Guignard, 1996)

Composés aromatiques	Description	Exemple	Propriétés majoritaires
Terpènes	Les monoterpènes sont les terpènes les plus communs et ont pour formule C ₁₀ H ₁₆ .	Alpha-pinène	actions drainantes lymphatiques, stimulantes, et anti-infectieuses
Alcools terpéniques	R-OH (alcool) dont R représente donc un terpène quelconque	Menthol, linalol	anti-infectieuses à large spectre d'action. stimulants immunitaires.
Aldéhydes terpéniques	Ils comportent le groupe caractéristique -CHO.	Néral, géranial	Propriétés anti-inflammatoire et relaxante

IV.6. Les critères de qualité des huiles essentielles (Franchomme, 2001) de (Pacchioni, 2014)

L'huile essentielle utilisée en thérapeutique doit posséder de nombreux critères de qualité :

➤ **L'espèce botanique**

La certification botanique doit apparaître selon la nomenclature internationale sous son nom latin précisant le genre, l'espèce et la sous-espèce.

➤ **L'organe producteur**

Selon la partie de la plante (feuilles, fleurs...) distillée (ou exprimée pour les zestes de Citrus), il peut exister plusieurs huiles essentielles pour la même plante avec des compositions chimiques et des activités différentes.

➤ **L'origine géographique**

Cela permet de connaître l'environnement dans lequel grandit la plante et de caractériser ainsi l'huile essentielle obtenue. Il y a des différences de composition chimique selon le pays d'origine.

➤ **Le mode de culture**

Il définit si la plante est cultivée ou sauvage. Il est souvent représenté par un label si la plante provient d'une culture biologique.

➤ **Le mode d'extraction**

Il existe plusieurs modes d'extraction des huiles essentielles comme la distillation, l'hydrodistillation, la percolation, l'expression qui peuvent faire évoluer la composition de l'huile essentielle.

IV.7. Les propriétés pharmacologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses propriétés (Purchon, 2001 et Willem, 2002).

IV.7.1. Propriétés anti-infectieuse

- **Antibactériennes** : Les molécules aromatiques possédant l'activité antibactérienne la plus importante sont les phénols contenus.
- **Antivirales** : Les virus sont assez sensibles aux huiles essentielles à phénol et à monoterpénol.
- **Antifongiques** : Les huiles essentielles utilisées pour leurs propriétés antifongiques sont les mêmes que celles citées précédemment cependant la durée du traitement sera plus longue
- **Antiparasitaires** : Les molécules aromatiques possédant des phénols ont une action puissante contre les parasites. Le thym à linalol, la sarriette des montagnes sont d'excellentes huiles essentielles antiparasitaires.
- **Antiseptiques** : Les propriétés antiseptiques et désinfectantes sont souvent retrouvées dans les huiles essentielles possédant des fonctions aldéhydes ou des terpènes
- **Insecticides** : Certaines huiles essentielles sont insectifuges ou insecticides comme celles possédant des fonctions aldéhydes.

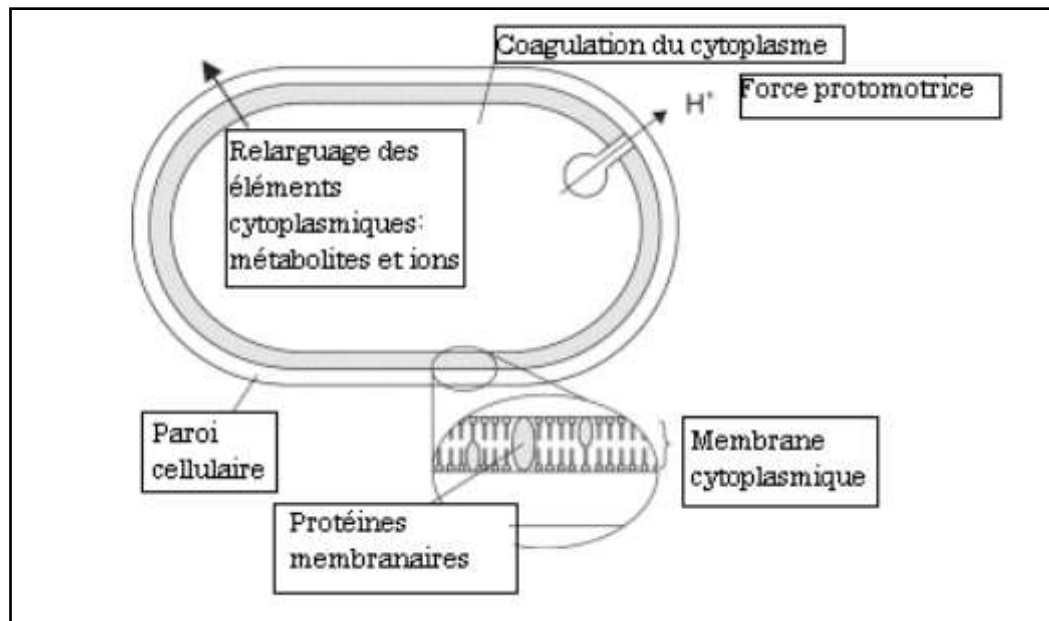


Figure 10 : Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne (Burt, 2004).

IV.7.2. Propriétés Anti-inflammatoires

Les huiles essentielles possédant des aldéhydes ont des propriétés actives contre l'inflammation par voie interne comme l'huile essentielle de Gingembre.

IV.7.3. Régulatrices du système nerveux

- Antispasmodiques : Les huiles essentielles possédant des esters ou des éthers possèdent une action sur les spasmes des muscles lisses ou striés comme l'huile essentielle d'Hélichryse
- Calmantes, anxiolytiques : Les aldéhydes type citrals contenu par exemple dans l'huile essentielle de Mélisse ou celle de Verveine citronnée favorisent la détente et le sommeil.
- Analgésiques, antalgiques : Les huiles essentielles les plus connues pour leur action antalgiques sont les huiles essentielles d'Eucalyptus citronné, de Gingembre, de Lavande vraie.

IV.7. 4. Drainantes respiratoires

- Expectorantes : Les huiles essentielles riches en oxyde (1, 8 cinéole) comme l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* ou de Romarin agissent sur les glandes bronchiques et sur les cils de la muqueuse bronchique.
- Fluidifiantes : Les huiles essentielles possédant des cétones (comme la verbénone contenu dans l'huile essentielle de Romarin) ont une action mucolytique en dissolvant les sécrétions accumulées au niveau de la muqueuse.

IV.7. 5. Digestives

Les huiles essentielles de cumin (avec la molécule de cuminal), d'anis étoilé ou par exemple d'estragon ont une action digestive et apéritive. Elles permettent la stimulation de la sécrétion des sucs digestifs.

IV.7.6. Cicatrisantes

Les huiles essentielles cicatrisantes sont les huiles essentielles de Ciste (*Cistus ladaniferus*), de Lavande vraie (*Lavandula vera*), d'Immortelle (*Helichrysum italicum*), de Myrrhe (*Commiphora myrrha*). On utilise souvent un mélange de plusieurs huiles essentielles cicatrisantes avec une huile végétale comme l'huile d'amande douce.

Partie Expérimentale

Matériels et méthodes

I. Introduction

La maîtrise des infections bactériennes devient complexe du fait que de nombreuses bactéries ont développé une résistance à la plupart des antibiotiques ce qui constitue un problème de santé important à l'échelle mondiale (Djahra, 2014). Toutefois, ces infections microbiennes et la réponse du système immunitaires s'accompagnent par la production des radicaux libres et la génération du stress oxydatif (Boukada, 2012). Suite à cette préoccupation concernant les effets indésirables des molécules synthétiques destinées à la lutte contre les infections bactériennes et le stress oxydant, il semble donc important de trouver une alternative à l'utilisation des antibiotiques et des antioxydants classiques.

Les remèdes à base de plantes constituent une alternative dans les systèmes de soins primaires et donc, une voie prometteuse pour le développement des médicaments traditionnellement améliorés. Récemment, de nombreux chercheurs s'intéressent aux plantes médicinales pour leur richesse en antioxydants naturels à savoir les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, ... etc. qui possèdent des activités antimicrobiennes. De ce fait, l'exploitation de nouvelles molécules bioactives ayant des effets secondaires limités ou inexistantes depuis des sources naturelles et leur adoption comme une alternative thérapeutique aux molécules synthétiques sont devenues des objectifs prioritaires pour les recherches scientifiques et les industries alimentaires et pharmaceutiques.

En se basant sur les études antérieures menées sur les effets bénéfiques de quelques plantes médicinales (Kangralkar *et al.*, 2010; Al - Sobarry *et al.*, 2013 et Alam et Galav, 2013). Nous nous sommes intéressés aux deux plantes *Zygodium album* et *Myrtus communis* poussant en Algérie, pour pouvoir évaluer leurs activités biologiques *in vitro* et *in vivo*.

II. Objectifs de l'étude

Cette étude est menée dans le cadre d'évaluation de l'activité antimicrobienne *in vitro* et *in vivo* et antioxydante des extraits polyphénoliques et des huiles essentielles de *Myrtus communis* (*Myrtaceae*) et *Zygophyllum album* (*Zygophyllaceae*).

Pour se faire, plusieurs étapes ont été suivies :

- Préparer des différents extraits polyphénoliques et des huiles essentielles des parties spécifique de *M. communis* et *Z. album* ;
- Caractériser dans les extraits polyphénoliques et huiles essentielles, les principaux groupes et composants chimiques ;
- Détermination de l'activité antioxydante *in vitro* des essences précédentes par différentes méthodes ;
- Evaluation de la toxicité aigüe des extraits de végétaux étudiés *in vivo*
- Tester *in vitro* et *in vivo*, l'effet antimicrobien des extraits polyphénoliques et huiles essentielles (voir leurs effets sur la translocation bactérienne comme étude complémentaire).

III. Matériel d'étude

III.1 Matériel végétal

III.1.1. Choix des plantes

Le choix des deux plantes utilisées dans ce travail était basé non seulement sur une enquête pharmaco-traditionnelle auprès d'une population ayant connaissance de leur usage traditionnelle mais aussi sur un choix spécifique de valorisation des plantes qui n'ont pas été étudiée à ce jour, pour essayer de contribuer à l'évaluation de d'autres activités biologiques non élucidées auparavant sur ces plantes surtout *in vivo*.

L'identification de nos deux plantes *Myrtus communis* et *Zygophyllum album* a été réalisée soigneusement par l'équipe des botanistes du département de biologie de l'université Mustapha Stambouli de Mascara.



	<p>Position systématique (Quezel et Santa, 1963)</p> <p><i>Règne</i> : Plantae <i>Sous-règne</i> : Eucaryotes <i>Embranchement</i> : Spermaphytes <i>Classe</i> : Dicotylédones <i>Ordre</i> : Myrtales <i>Famille</i>: Myrtaceae <i>Genre</i> : Myrtus <i>Espèce</i> : Myrtus Communis L. <i>Nom vernaculaire</i> : Rayhan, Mersin</p>
<p><i>Myrtus communis</i> récoltée de Tlemcen</p>	
	<p>Position systématique (Quezel et Santa, 1963 ; Dupont et Guignard, 2007)</p> <p><i>Embranchement</i> : Phanérogames ou Spermaphytes <i>Sous embranchement</i> : Angiospermes <i>Classe</i> : Endicots <i>Sous classe</i> : Rosidées <i>Ordre</i> : Sapindales <i>Famille</i> : Zygophyllacées <i>Genre Espèce</i> : Zygophyllum album L. <i>Noms vernaculaires</i> : Aggaya</p>
<p><i>Zygophyllum album</i> récoltée de Ouargla</p>	

Figure 11: Matériel végétal

III.1.2. Situations géographiques des stations d'étude

La récolte des différentes espèces a été effectuée dans l'Ouest (Tlemcen) et le Sud-Ouest de l'Algérie, dans différentes stations, à savoir : Honaine (Wilaya de Tlemcen) pour *Myrtus communis* et Sidi Khouiled (Sahara de Ouergla) pour *Zygophyllum album* (Tableau N° 9, Figure 12).

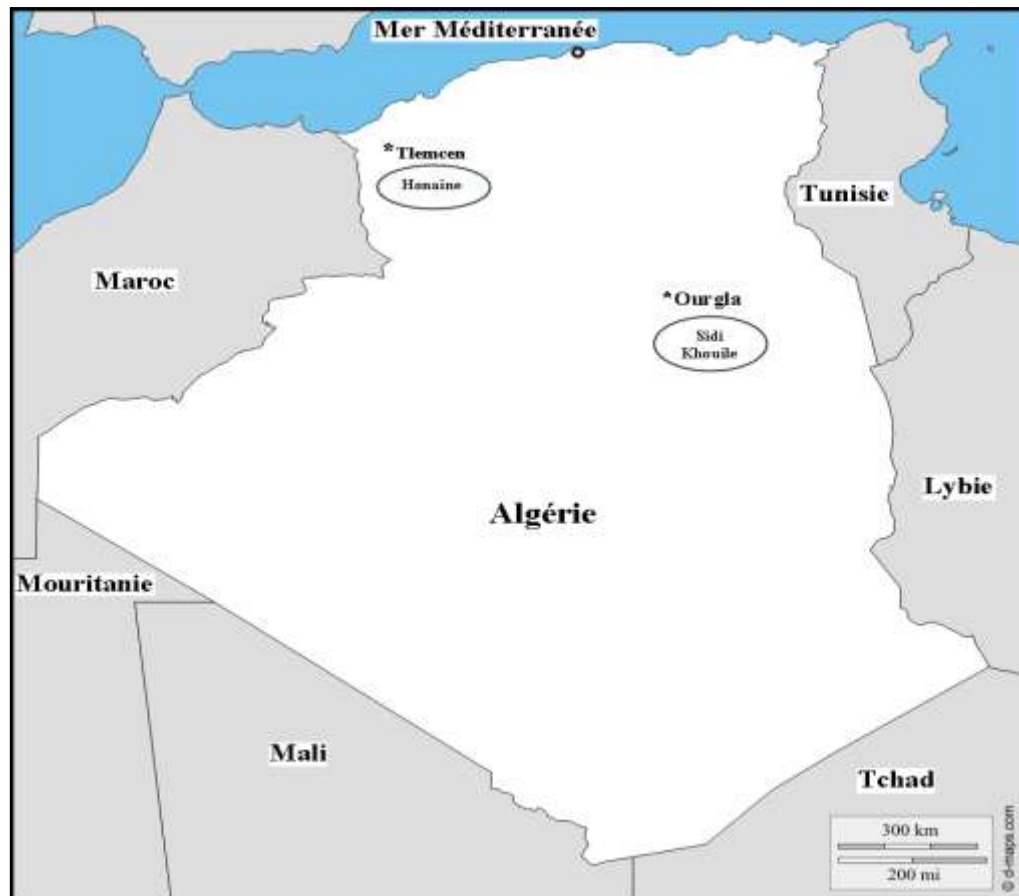


Figure 12: Carte géographique représentant les sites de récolte

Les situations géographiques ainsi les étages bioclimatiques des différentes stations sont représentés dans le tableau 9 (El Bouhissi *et al.*, 2014) et Rouvilois-Brigol, 1975).

Tableau 09 : Lieu de récolte des plantes et caractéristiques géographiques et bioclimatiques des stations d'étude

Plante	Station	Longitude	Latitude	Altitude	Etage bioclimatique
<i>Myrtus communis</i>	Honaine (Tlemcen)	1° 27'W	35°0,5'N	380 m	Semi-aride à hivers frais
<i>Zygophyllum album</i>	Sidi khouiled (Sahara de Ouergla)	0° 10'W	28° 50'N	300-400	Arde- chaud

III.1.3. Récolte du Matériel végétal

Les deux plantes étaient fraîchement utilisées pour l'extraction des huiles essentielles, par contre pour la préparation des différents extraits polyphénoliques, nous avons séché à l'ombre les parties cueillies des deux plantes, à l'abri de l'humidité et à une température ambiante. Le séchage est de 7 jours en moyenne pour les différentes plantes, puis conservées dans des sacs en papier.

III.2. Animaux d'expérimentation

Notre étude a porté sur les rats blancs « *Rattus norvegicus* », de souche Wistar, de sexe mâle et femelle, ayant un poids corporel de 150 ± 15 g. L'élevage des animaux s'est déroulé au sein de l'animalerie de la Faculté SNV de l'université Mustapha Stambouli de Mascara.

Les animaux sont soumis à l'alternance naturelle de jour et de nuit correspondant à 12 ± 1 h. La température ambiante dans l'animalerie était de 24 ± 2 °C et l'humidité comprise entre 35-60 %.

Ils sont nourris d'un régime complet standard sous forme de granules ("EL AALF"), composé de céréales, tourteaux de soja, issues de céréales, huile de soja, phosphate monocalcique, carbonate de calcium, lysine, méthionine, choline, plus un complexe minéralo-vitaminiques avec les pourcentages suivants : Glucides 55%, protéines brutes 18%, matière grasse brute 3,4%, cellulose brute 3%, cendre brute 4,9%, humidité 14%, vitamine 1,7%. L'eau et l'aliment leur sont fournis *ad libitum*.

III.3. Souches microbiennes

III.3.1. Les souches bactériennes

Neuf souches bactériennes pré-identifiées phonétiquement (Tableau 10) ont été apportées du laboratoire de BGMSS .Ce sont des espèces Gram négatif /ou Gram positif, pathogènes et responsables d'infections graves chez l'homme et dont la plupart sont résistantes aux antibiotiques. Elles sont revivifiées à 37 °C par repiquage sur gélose Muller-Hinton (MH).

Tableau 10 : Les bactéries utilisées pour l'étude de l'activité antibactérienne *in vitro*

Genre et espèce	Gram	Origine de prélèvement
<i>E.coli</i>	-	Infection des plaies
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Infection des plaies
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	Infection des plaies
<i>Salmonella typhi</i>	-	Eaux usées
<i>Shigella sp.</i>	-	Eaux usées
<i>Clostridium sp.</i>	+	Sabkha (Oran)
<i>Salmonella sp.</i>	-	Denrée alimentaire (viande rouge)
<i>Bacillus subtilis</i>	+	eaux usées
<i>Bacillus cereus</i>	+	Eaux usées (station d'épuration)

III.3.2. Souches fongiques

L'activité antifongique a été évaluée à travers *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus* (Tableau n°11) Elles sont activées par repiquage sur la gélose de Sabouraud favorable à la croissance des espèces fongiques pendant 24h à 37C°, les deux souches ont été fournis par le laboratoire des sciences alimentaire de l'université catholique de Murcie, Espagne.

Tableau 11 : L'ensemble des espèces fongiques utilisées dans l'étude

Famille	Genre et espèce	
<i>Saccharomycetacea</i>	<i>Candida albicans</i>	Denrée alimentaire
<i>Trichocomacea</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Denrée alimentaire

Ces souches ont été choisies pour leur haute pathogénicité et leur multi résistance aux antibiotiques. Avec la mesure du diamètre de la zone d'inhibition, on pourra classer la bactérie en sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R) selon (SFM-CA, 2015).

Tableau 12 : Profile d'antibiorésistance des souches bactériennes testées.

	P	AX	OX	CZ	SP	CN
<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	R
<i>Salmonella typhi</i>	R	R	R	R	R	R
<i>Shigella sp.</i>	R	R	R	R	R	R
<i>Bacillus subtilis</i>	R	R	R	R	R	R
<i>Clostridium sp.</i>	R	R	R	R	R	I
<i>Staphylococcus aureus</i>	R	R	R	R	R	I
<i>Enterococcus faecalis</i>	R	R	R	R	R	R

NB : pour les souches microbiennes provenant du laboratoire des aliments, de l'Espagne, étaient déjà confirmées d'avoir le caractère résistant vis à vis les antibiotiques et/ou antifongiques.

III.4. Produits consommables

❖ Solvants et réactifs chimiques d'extraction et de dosage

Le méthanol, éthanol, dichlorométhane, Hexane, sulfate de potassium (K_2SO_4), acide sulfurique (H_2SO_4), acide borique, phénol, glucose, HCl, chloroforme, formol, éther, Folin-Ciocalteu, l'acide gallique, le trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$), la Bicarbonate de sodium (Na_2CO_3) et la quercétine sont obtenus auprès de Prolabo, Sigma-Aldrich et Merck.

❖ **Réactifs chimiques utilisés dans l'étude de l'activité antioxydante**

Phosphate de sodium (Na_3PO_4), molybdate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$), acide ascorbique, AAPH, trolox, tampon phosphate, DPPH, fluorescéine.

❖ **Molécules de références (antibiotiques et antifongiques)**

Amoxicilline (AX, 30 μg), Oxacilline (OX, 5 μg), Cefazoline (CZ, 30 μg), Gentamycine (CN, 10 μg), penicilline (P, 30 μg), and Spiramycine (SP, 10 μg) et Vancomycin (Van, 5 μg).

Les antifongiques utilisés sont :

- la substance active miconazole (10 μg), appartenant à la famille des Imidazoles. Il est utilisé à large spectre pour le traitement des infections fongiques. Son spectre d'activité comprend les genres *Candida*, *Trychophyton*, *Aspergillus* et *Malassezia* BOSSCHE *et al.*, (2003).
- La griséofulvine (10 μg) se présente sous forme d'une poudre blanche cristalline de saveur amère. Pratiquement insoluble dans l'eau, elle est facilement soluble dans l'alcool et les solvants organiques. Elle est chimiquement stable à la température du laboratoire et à l'abri de la lumière. Son poids moléculaire est de 352,8 g (Vanden *et al.*, 2003).

❖ **Milieux de culture**

Le bouillon nutritif, la gélose Muller Hinton et le bouillon Muller Hinton, TGEA, VF, Mossel, MRS, Sabouraud, Hecktoen, BEA, SDA(Merck) et gélose au lait (préparée au laboratoire selon besoin).

IV. Méthodes appliquées

Partie 01 : Etude phytochimique

I. Etude Phytochimique quantitative du matériel végétal (métabolites primaires)

Les jonctions entre métabolisme primaire et secondaire sont nombreuses et parfois complexes. Car il est à l'origine biosynthétique des principales phytohormones. C'est pourquoi il serait nécessaire de vérifier la qualité de nos plantes avant extraction (APBV, 2009). De plus, il est important de savoir si les drogues peuvent être bien conservées (teneur en eau à l'état sec) et sa pureté (teneur en cendres) constitue des facteurs importants dans la détermination de sa composition chimique et de son intérêt pharmaceutique (Traore, 2009).

I.1. Détermination de la teneur en eau (Raffauf, 1996)

Elle est déterminée par la Méthode gravimétrique qui consiste en la détermination de la perte de masse par dessiccation à l'étuve dont nous avons pris 5g du matériel végétal qui est placé ensuite dans une étuve à 105 °C pd 24h jusqu'à obtention d'un poids constant.

$$\text{La teneur en eau (humidité)\%} = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \cdot 100$$

Dont M_1 : poids de la prise d'essai (matériel végétal) ; M_2 : Poids après dessiccation

I.2. Détermination de la matière organique et Minérale (AOAC, 1990)

Il consiste a un même principe que celui de la teneur en eau, c.à.d. la matière sèche obtenue après dessiccation est placée dans un four à moufle mais à 550C°/6h

$$\text{M.O (matière organique)} = \frac{M_1 - M_2}{PE} \text{ (prise d'essai)}$$

Dont : M_1 : poids de la capsule+ échantillon avant séchage ; M_2 : poids de la capsule +échantillon après séchage

$$\text{M.M (matière minérale)} = \text{M.S (matière sèche)} - \text{M.O (matière organique)}$$

I.3. Lipides (Naoki, 1984)

Le taux des lipides est déterminé en utilisant un appareil de type Soxhlet. La méthode de Soxhlet est la méthode de référence utilisée pour la détermination de la matière grasse dans les aliments solides déshydratés. C'est une méthode gravimétrique, puisqu'on pèse l'échantillon au début et la matière grasse à la fin de l'extraction.

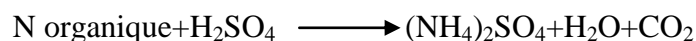
La poudre végétale est pesée (5g) et placée dans une capsule de cellulose. L'échantillon est extrait en continu par l'Hexane à ébullition qui dissout graduellement la matière grasse. Le solvant contenant la matière grasse retourne dans le ballon par déversements successifs causés par un effet de siphon dans le coude latéral. Comme seul le solvant peut s'évaporer à nouveau, la matière grasse s'accumule dans le ballon jusqu'à ce que l'extraction soit complète. Une fois terminée, l'hexane s'évapore par un évaporateur rotatif et la matière grasse est pesée.

I.4. Protéines : (Méthode de Kjeldahl, 1983) ; (Norme Algérienne, 1992)

Le dosage des protéines par la méthode de Kjeldahl est basé sur la minéralisation totale de la matière biologique en milieu acide, suivi de la distillation de l'azote sous forme d'ammoniac.

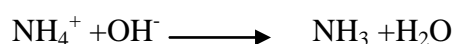
Minéralisation :

1g du matériel végétal broyé est introduit dans le matras de l'appareil de minéralisation, avec 15 g de sulfate de potassium et une quantité appropriée de catalyseur (1,2 g de sulfate de cuivre et le sélénium), et 25ml d'acide sulfurique pure, le chauffage est important jusqu'à obtention d'une solution limpide de couleur verdâtre, on laisse refroidir à la fin de l'étape.



Distillation :

Cette étape se fait en utilisant l'appareil distillateur (Gerhardt).Le contenu du matras est versé dans un ballon de distillation. Ensuite, on rajoute 80 ml d'eau distillée (goutte à goutte) et 80ml de solution d'hydroxyde de sodium (33%).Un bécher contenant 25ml d'acide borique (4%) est placé à l'autre extrémité de l'appareil. La distillation du mélange se fait par chauffage du ballon de façon à recueillir plus de 50ml de distillat.



Titration :

Le Titration se fait à l'aide de H₂SO₄ (0,1N) jusqu'à virage jaune clair du distillat à la rose pale. On mentionne le volume nécessaire pour la neutralisation

$$N\% = 0,014 \cdot 0,1 \cdot V \cdot 100 / P$$

V : Volume de H₂SO₄ versé lors du titration en ml ; **P** : Prise d'essai en g ; **0,014** : correspond à l'acide sulfurique ; **0,1** : Normalité de H₂SO₄ ; **N** : l'azote.

$$\text{Protéines \%} = N\% \cdot 6,25$$

6,25 : facteur de conversion pour les protéines végétales.

I.5. Sucres (Dubois *et al.*, 1956)

Principe

En présence de l'acide sulfurique à chaud, les glucides sont déshydratés en dérivés de furfural qui se combinent facilement avec le phénol pour donner une coloration rose-saumon (le glucose fournit de l'hydroxyfurfural). L'absorbance est lue à une longueur d'onde de 490nm. La coloration est permanente. Cette méthode permet de détecter des quantités de glucides pouvant atteindre 1µg.

Mode opératoire

Le protocole d'extraction consiste à faire bouillir 10g du matériel végétal sec pendant 20min dans 100ml d'éthanol (60%).Après refroidissement, cet extrait est soumis à une filtration (Langemeir et Rogers, 1995).

Pour nos deux échantillons, nous avons procédé de la manière suivante : à 1ml de phénol à 5% m/v (5g de phénols dans 100ml d'eau distillée glacé),1ml d'échantillon est ajouté. Le tout est homogénéisé, ensuite on rajoute 5ml de H₂SO₄ concentré. L'ensemble est incubé dans un bain marie à 100 °C pendant 5min. L'échantillon est réincubé pendant 30min à l'obscurité.

La lecture de l'absorbance de l'échantillon à une longueur d'onde de 490nm est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre (JANWAY 64505, UK) contre un blanc qui contient toutes les solutions sauf l'extrait.

Pour la courbe d'étalonnage, des concentrations différentes d'étalons à partir d'une solution de glucose sont préparées allant de 0 à 200µg/ml ; la quantité des sucres Q (mg) que renferme chaque échantillon est déterminée selon l'équation suivante :

$$Q=1.V.C/P$$

C : Concentration des sucres de l'échantillon déduite à partir de la courbe d'étalonnage ;

V : Volume d'échantillon ;

P : poids de l'échantillon.

II. Extraction des huiles essentielles et des composés phénoliques

II.1. Extraction des huiles essentielles

II.1.1. Protocole d'extraction

L'hydrodistillation de *Zygophyllum album* et de *Myrtus communis* a été accomplie à l'aide d'un dispositif de type Clevenger (Clevenger, 1928) (Figure 13). La distillation a été effectuée avec un recyclage communément appelé cohobage (La Pharmacopée Européenne, 2002).

II.1.2. Isolation des huiles essentielles

La vapeur condensée obtenue conduit à une phase organique (huile essentielle) qui est séparée de l'hydrolat par décantation et à laquelle on ajoute du sulfate de magnésium (MgSO₄) pour éliminer les traces d'eau. La quantité d'essence obtenue est pesée pour le calcul du rendement.

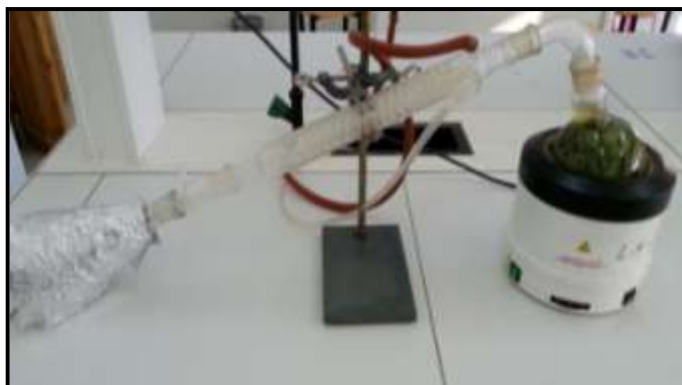


Figure 13 : Montage d'hydrodistillation (Clevenger, 1928)

II.2. Préparations des extraits polyphénoliques par différents méthodes

II.2.1. Extraction par macération avec l'eau (Décoction 10%)

Nous avons introduit 150 g de poudre de feuilles pour *Myrtus communis* et de la partie aérienne (feuilles et tiges) pour *Zygophyllum album* dans un ballon contenant 1500 ml d'eau distillée. Il s'agit d'une décoction à 10 %. L'ensemble a été maintenu en ébullition au bain-marie pendant trois heures figure n°14 Après refroidissement, nous avons filtré sur coton puis concentré le filtrat à l'aide du rota-vapeur sous vide à la température de 55 °C. Nous avons ensuite séché les extraits concentrés après 48 heures de congélation. Les poudres obtenues ont été conservées dans des flacons en verre, stériles et hermétiquement fermés (Boubacar Souley, 2005).

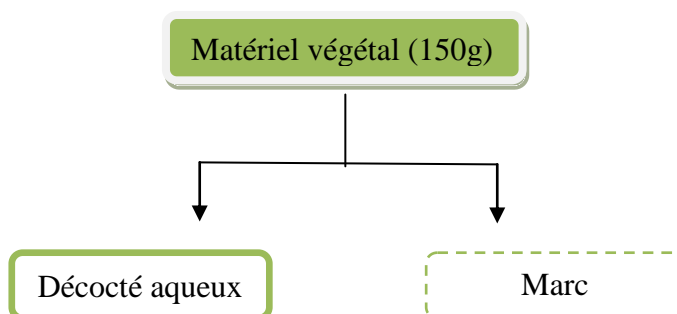


Figure 14 : Schéma d'extraction par Décoction à 10%

II.2.2. Extraction avec solvants organiques à polarité croissante

Pour réaliser l'extraction, nous avons suivi la méthode de (Ferrari, 2002) avec des modifications. Le principe de cette méthode est le contact successif de la plante avec deux solvants de polarité croissante : le dichlorométhane et le méthanol. La drogue broyée des deux plantes est d'abord mise en contact avec le dichlorométhane à raison de 300 ml de solvant pour 50 g de drogue en utilisant l'appareil de Soxhlet. Après plusieurs siphonage à température ambiante, le mélange hétérogène est filtré avec du papier filtre et le résidu est à nouveau extrait 2 fois 24 h dans les mêmes conditions. Les filtrats sont réunis, le solvant évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi Rotavapor ; max. 40 °C) et le résidu sec séché et pesé : on parle alors d'extrait brut dichlorométhanique (DCM).

Le résidu non extractible au dichlorométhane est traité de la même manière avec 3 extractions successives au méthanol. Après réunion des filtrats, évaporation du solvant et lyophilisation, on obtient l'extrait brut méthanolique (MeOH) qui est pesé à son tour.

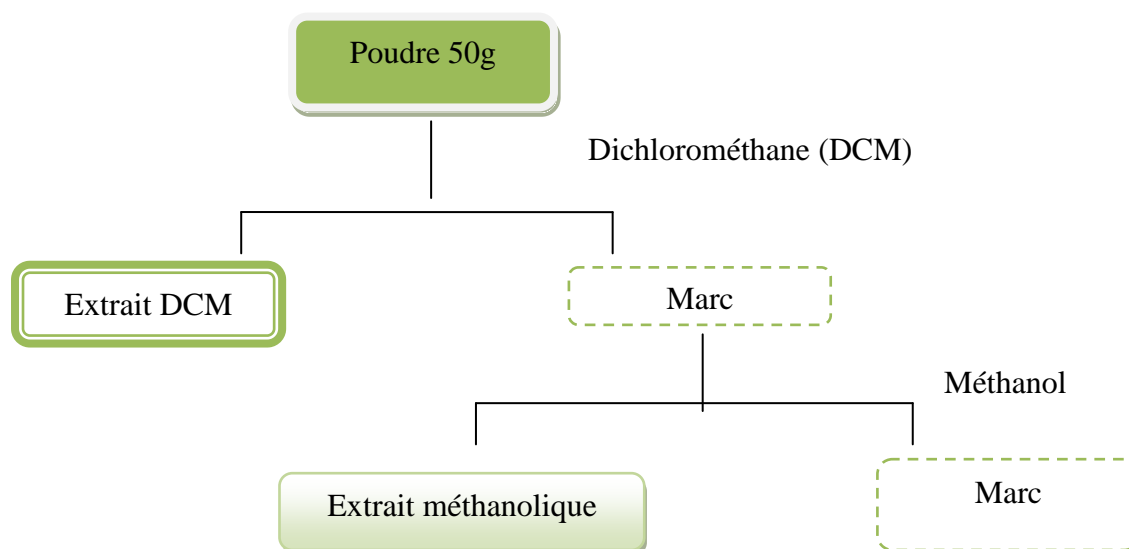


Figure 15 : Schéma d'extraction par les solvants organiques

II.2.3. Extraction par macération à l'Ethanol 80% (Amadou, 2005)

50 g de poudre ont été introduits dans un erlenmeyer et macérés dans 500 ml dans l'éthanol à 80 %, sous agitation magnétique, pendant 24 heures. Après filtration sur papier filtre, le filtrat a été concentré au rota-vapeur sous vide à la température de 50 °C. Nous avons répété cette opération trois fois successivement. Après concentration, les filtrats ont été repris avec un peu d'eau distillée puis séchés après 48 heures de congélation. Les poudres obtenues ont été conservées dans des flacons en verre, propres, stériles et hermétiquement fermés.

II.3. Calcul des rendements d'extraction

Le rendement des différents extraits obtenus est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait sec obtenue et la masse du matériel végétal traité. Ce rendement est calculé par l'équation :

$$R(\%) = (Me / Mv) \times 100$$

R (%) : Rendement en %, **Me** : Masse de l'extrait après l'évaporation du solvant, **Mv** : Masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction (Harborne, 1980).

III. Etude quantitative et qualitative de différentes essences et extraits obtenus

III.1. Les huiles essentielles

III.1.1. Etude analytique des Huiles essentielles

III.1.1.1. Propriétés organoleptiques des huiles essentielles

Les différentes caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) des essences de *Myrtus communis* et *Zygophyllum album* ont été notées.

III.1.1.2. Mesure des indices chimiques

- Détermination de l'indice d'acide : NF ISO 1242 : 1999 (T 75-103) ; (AFNOR,2000) : C'est le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'HE. Les acides libres sont neutralisés par une solution EtOH titrée de KOH.
- Mesure de la miscibilité à l'éthanol : NF T 75-101 (1999) ; (AFNOR,2000) : La miscibilité des HE a été déterminée dans de l'éthanol à 70%.
- Mesure du pH : Cette mesure a été effectuée à l'aide d'un pH-mètre.

III.1.1.3. Mesure des indices physiques

- Détermination de la densité relative à 20°C : C'est le rapport de la masse d'un certain volume d'HE à la masse d'un volume égal d'eau à 20°C.
- Détermination de l'indice de réfraction : (AFNOR NF ISO 280 : 1999 (75-112)) (AFNOR, 2000) : C'est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'HE maintenue à une température constante.

III.1.2. Analyse chromatographique de l'huile essentielle

Cette analyse a été effectuée au niveau du Laboratoire des Glucide, groupe THERA-FRE-CNRS 3517, Faculté de Pharmacie, Université de Picardie, Amiens, France.

L'analyse chromatographique de l'HE a été effectuée avec un chromatographe en phase gazeuse de marque SHIMADZU (QP2010SE) couplé à un spectromètre de masse (HP 5973).

La phase stationnaire est une colonne capillaire (SGE de type BPx5 C) de 50mm de long, d'un diamètre intérieur de 0.25mm et d'une épaisseur de film de 0,25µm alors que la température de la colonne est programmée de 50°C à 250°C à raison de 4°C. min⁻¹. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixé à 1,5 ml. min⁻¹. Le mode d'injection est du mode split (rapport de fuite : 1/70) c'est-à-dire 1µl de la substance à analyser a été réalisée à l'aide d'une micro- seringue. L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse NIST 98 et piloté par un logiciel « HP Chem Station » permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques. L'identification des composés a été obtenue en comparant les temps de rétention, les indices de rétention et les spectres de masse avec ceux des études menées sur les plantes de la même famille.

III.2. Les extraits polyphénoliques

III.2.1. Analyse qualitative des extraits polyphénoliques

Il s'agit d'une étude qualitative visant la recherche des principaux groupes chimiques (Alcaloïdes, polyphénols, flavonoïdes, tanins, saponosides, composés réducteurs...). Les tests de caractérisation sont basés sur des réactions de précipitation et de complexation avec formation de complexes insolubles et colorés. La coloration observée est provoquée par l'utilisation d'un réactif approprié et est due généralement à la formation d'une conjugaison ou d'une instauration dans une molécule.

Nous nous sommes servis des techniques standardisées de (Raffauf, 1996; Dohou *et al.*, 2003 ; Judith, 2005) ; Bruneton, 1993; Timbo, 2003; Diallo,2005; Bekro *et al.*, 2007; Houghton et Raman, 1998 et Kar,2007),Les détails sont présentés dans l'annexe n°01.

III.2.2. Les Analyses quantitatives des différents extraits polyphénoliques

Les méthodes colorimétriques basées sur l'utilisation du spectrophotomètre UV-visible, ont été utilisées pour évaluer la quantité des composés phénoliques dans la matière végétale.

III.2.2.1. Dosage des polyphénols totaux (PPT)

La teneur en phénols totaux des extraits des plantes a été déterminée par la méthode de (Benhamou, 2008 et Singleton et Ross, 1965) utilisant le réactif de Folin–Ciocalteu. Un volume de 200 µl pour chaque extrait est introduit dans des tubes à essais, le mélange (1 ml de Folin Ciocalteu dilué 10 fois et 0.8 ml de carbonate de sodium à 7.5 %) est additionné. Les tubes sont agités et conservés durant 30 min.

L'absorbance est mesurée à 765 nm en utilisant le spectrophotomètre Jenway 6405 UV/Vis. Une courbe d'étalonnage à différentes concentrations d'acide gallique a été préparée (figure n°16). Les teneurs en phénols totaux dans les extraits sont exprimées en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EAG/ g MS).

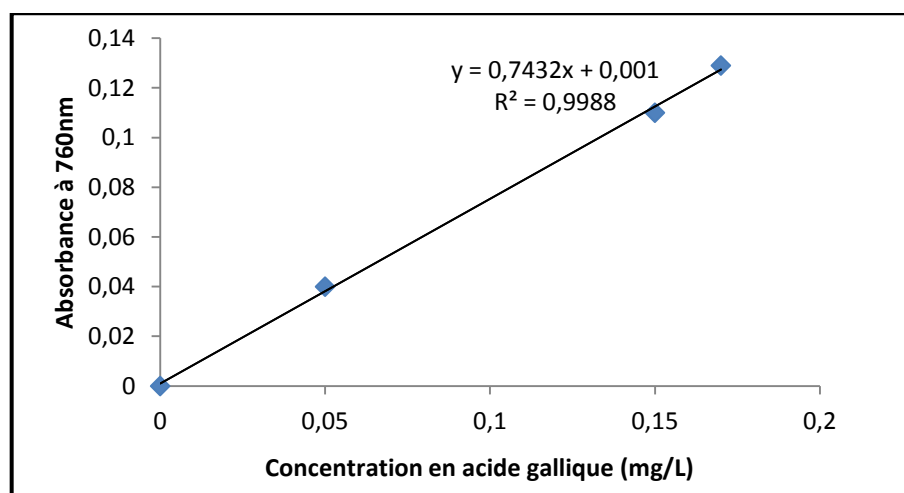


Figure 16 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

III.2.2.2. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode colorimétrique adaptée par Dewanto *et al.* (2002). Une quantité de 500 μl de solution méthanolique de catéchine à différentes concentrations ou de l'extrait méthanolique dilués est ajoutée à 1500 μl de l'eau distillée. Au temps zéro, 150 μl de nitrite de sodium (NaNO_2) à 5 % est ajouté au mélange. Après 5 min, 150 μl de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) à 10 % (m/v) est rajouté. Après l'incubation de 6 min à la température ambiante, 500 μl d'hydroxyde de sodium (NaOH) (1 M) est additionné.

Immédiatement, le mélange est complètement agité. L'absorbance de la solution de couleur rosâtre est mesurée à 510 nm contre le blanc. La teneur en flavonoïdes totaux des extraits des plantes médicinales est exprimée en milligramme (mg) équivalents de catéchine par gramme (g) du poids de la matière sèche (EC)/g) (figure n°17). Chaque échantillon est répété trois fois.

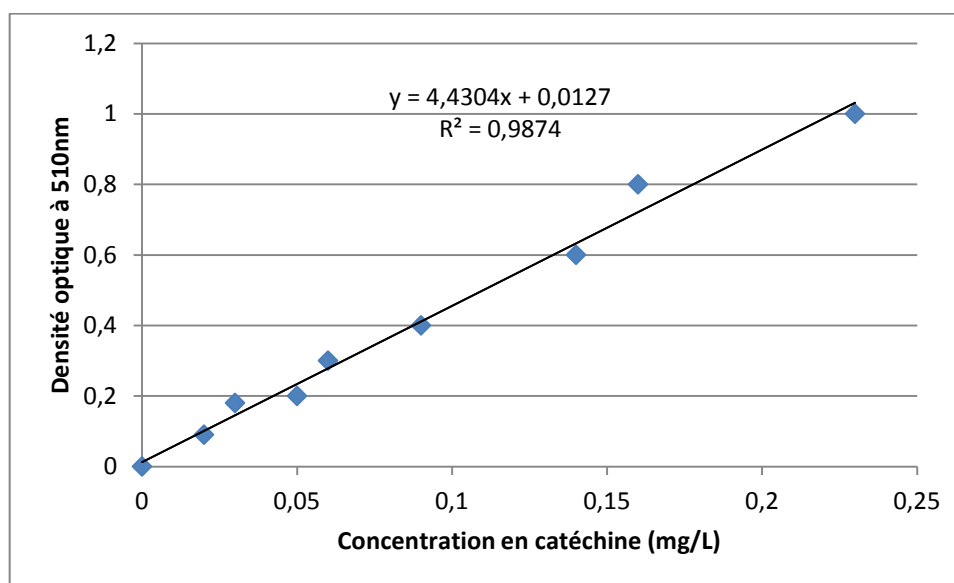


Figure 17 : Courbe d'étalonnage de catéchine

III.2.2.3. Dosage des Anthocyanines totaux(ATT)

Dosage des anthocyanines totaux (ATT) Les composés anthocyaniques totaux ont été évalués par colorimétrie en utilisant un spectrophotomètre UV-visible (Laouini ,2014).

La méthode utilisée est basée sur une différenciation des absorbances en utilisant deux tampons; KCl à pH 1.0 (0,025M) (1) et CH₃COONa à pH 4.5 (0.4M) (2). Pour cela 400 µl de chaque extrait de *Myrtus communis* et *Zygophyllum album* sont mélangés à 3,6 ml du tampon (1) ensuite 400 µl au tampon (2). Les solutions sont incubées pendant 30 minutes à l'abri de la lumière et les absorbances sont ensuite successivement mesurées à 510 et 700 nm. La variation des absorbance est calculée par la formule suivante:

$$\Delta A = (A_{510} - A_{700})_{pH1} - (A_{510} - A_{700})_{pH4.0}$$

La concentration de pigment d'anthocyanine dans l'extrait est exprimée en mg d'équivalent cyanidine-3 glucosé par litre de solution ou en mg d'équivalent cyanidine-3 glucosé/ g de matière sèche (Cg/ g dM) (figure 18).

D'où Cg (mg/ l) = $\Delta A \times Mm \times Df \times 1000 / (Ma)$ Avec ΔA : variation des absorbances, Mm: masse moléculaire (449,2); Df: facteur de dilution; Ma: absorptivité moléculaire (26900).

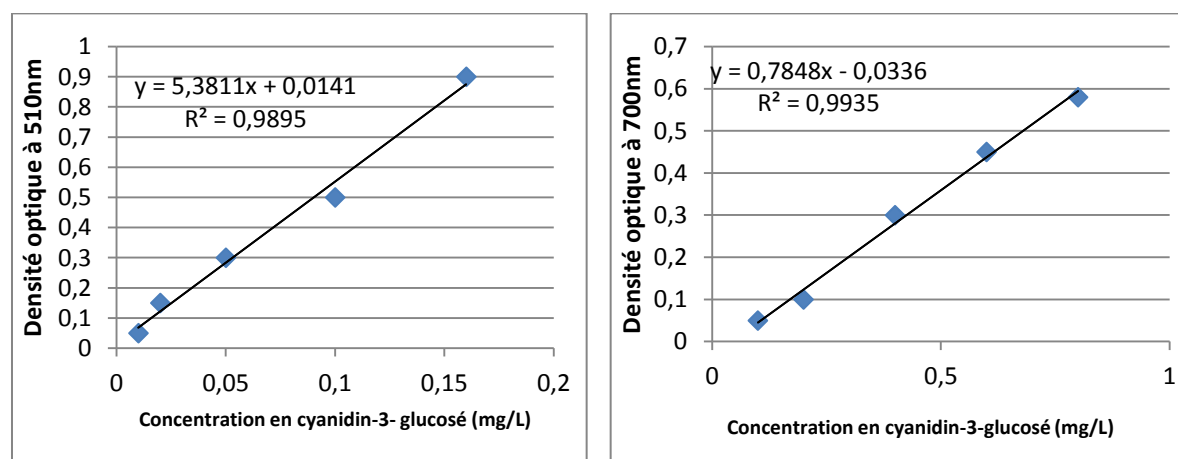


Figure 18 : Courbes d'étalonnage de la cyanidine

III.2.2.4. Dosage des tanins condensés (TC)

La détermination de la teneur en tanins condensés a été effectuée en utilisant la méthode spectrophotométrique (Julkunen-Titto, 1985). Un volume de 0.5 ml d'extrait polyphénolique ou standard (catéchine) ajouté au mélange de 3 ml au mélange 4% vanilline et de méthanol (v / v), 1.5 ml d'acide chlorhydrique puis homogénéisé.

Le mélange résultant a été laissé au repos pendant 15 min à température ambiante, l'absorbance de chaque calculée à 500 nm en utilisant le spectrophotomètre UV-Visible (Shimadzu UV-1800, Japon). La teneur totale en tanins condensés est calculée comme étant mg équivalent de catéchine (CTE mg / g) en utilisant l'équation obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (figure 19), les résultats présentés sous forme des moyennes (\pm SEM) et sont analysées avec trois expériences séparées.

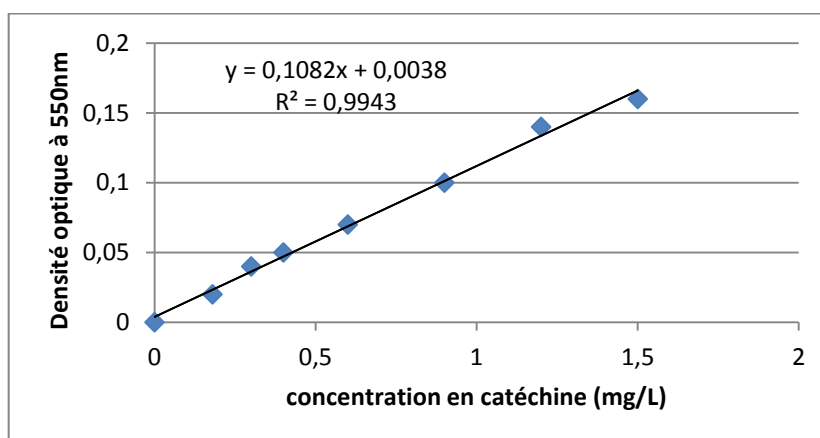


Figure 19 : Courbe d'étalonnage de catéchine

III.2.3. Analyse chromatographique des extraits polyphénoliques

La chromatographie est une technique d'analyse qualitative et quantitative de la chimie analytique dans laquelle l'échantillon contenant un ou plusieurs composés est adsorbé sur une phase stationnaire (papier, gélatine, silice, polymère, silice greffée), puis est désorbé par une phase mobile (liquide, gaz ou fluide supercritique). Les différents composés de l'échantillon sont séparés en fonction de leurs vitesses d'adsorption-désorption.

III.2.3.1. La chromatographie CCM

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique de chromatographie en phase liquide. Pour effectuer la séparation, une petite quantité de la solution à analyser est déposée sur le bord d'une plaque CCM ; c'est une analyse préliminaire dans notre étude, car elle permet d'avoir une idée globale, sur les métabolites présents dans nos différents extraits de plantes.

La plaque est ensuite trempée dans un éluant contenu dans une cuve fermée. L'éluant migre par capillarité, il rencontre l'échantillon et l'entraîne. Les différentes substances constituant l'échantillon migrent à différentes vitesses selon qu'elles interagissent plus ou moins fortement (Riov et Gottlieb, 1980). Les substances peuvent être identifiées en calculant la valeur Rf qui peut être comparée à celle de la littérature ou à celles des étalons. Cette valeur correspond à:

$$\text{Rf} = (\text{distance parcourue par l'échantillon}) / (\text{distance parcourue par le front solvant}).$$

L'analyse chromatographique sur couche mince de nos différents extraits était réalisée au niveau de notre Laboratoire de BGMSS, à l'université de Mascara et au niveau du Laboratoire des Glucides à l'université de Picardie, Amiens, France.

Phase mobile :

Système 1 (Chloroforme/acétate d'éthyle/acide formique) la proportion du mélange est de (50 :40 :10)

Système 2 (MetOH/DCM) avec des proportions comme suit : (20 :80), (25 :75), (30 :70), (40 :60)

Phase stationnaire : La CCM a été conduite sur des plaques de silice en verre 60 F-254 (Merck, Darmstadt, Allemagne).

Révélation :

Les plaques sont séchées à température ambiante, et observées sous lumière UV à 254 nm dans une chambre noire (Marston et Hostettmann, 2006). Dont on a marqué à l'aide d'un crayon les différents spots. Ces plaques sont ensuite révélées par révélateurs chimiques par technique de pulvérisation avec :

- pour le système 1 ; on a utilisé un mélange de vanilline sulfurique
- Pour le système 2 ; on a utilisé l'acétate de methoxypropanol 70%

III.2.3.2. Identification des polyphénols par LC-MS

Une méthode plus précise et détaillée vient compléter celle de la CCM et identifier la composition des différents extraits de nos deux plantes *Zygophyllum album* et *Myrtus communis*, c'est la technique LC-MS qui a été réalisée au niveau du laboratoire des Glucides, équipe THERA, Université d'Amiens, France.

L'appareillage de chromatographie de marque Shimadzu LC-MS/MS 8030 est équipé d'un détecteur UV à diode et d'un spectromètre de masse de type triple quadrupôle. La séparation des composés est réalisée sur une colonne Phenomenex Luna 3u C18, thermostatée à 40°C. Les solvants utilisés pour l'élution sont l'eau distillée ultra pure et l'acétonitrile, dont le solvant A est constitué de 50 % eau + 50% acétonitrile et le solvant B est composé de 25% eau+75% acétonitrile. L'élution est effectuée en mode gradient avec un débit de 0,4mL/min et le volume d'injection de 5,0 µL. La gamme de détection UV est comprise entre 190 et 800 nm. Les paramètres de détection MS sont : le gaz de nébulisation (N₂) avec un débit 3 L/min, le gaz de séchage avec un débit 15 L/min, le voltage d'interface : 4,5 Kv, la pression du gaz 230 kPa, la CDL température : 250 °C, « block heater temperature» 400°C, gamme m/z 100-2000.

L'identification se fait selon les temps de rétention et les spectres de masse de ces composés qui peuvent être comparés à ceux obtenus dans des travaux antérieurs avec les mêmes conditions d'analyse.

Partie 02 : Evaluation du pouvoir antioxydant des huiles essentielles et des extraits polyphénoliques des plantes

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes. il n'y a pas une méthode simple et universelle par laquelle l'activité antioxydante est évaluée qualitativement et quantitativement *in vitro* comme *in vivo* (Prior *et al.*, 2005). Pour cette raison, nous avons combiné trois techniques complémentaires.

I. Evaluation de l'activité antioxydante par technique ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Principe

Cette méthode évalue la capacité des antioxydants d'un échantillon à limiter l'oxydation de la fluorescéine, une sonde fluorescente sensible à l'oxydation, par des radicaux peroxydes générés par un composé oxydant thermolabile, l'AAPH. L'oxydation de la fluorescéine s'accompagne d'une diminution de fluorescence mesurée au cours du temps (excitation : 485 nm, émission : 520 nm). Les composés antioxydants intervenant dans cette réaction limitent ainsi, pendant un temps, la perte de la fluorescence. Le potentiel antioxydant de l'échantillon est déterminé par la différence d'aire sous courbe avec l'aire sous courbe d'un témoin sans antioxydant.

Le potentiel antioxydant est exprimé en concentration équivalente d'un antioxydant de référence, le Trolox, où 1 unité ORAC équivaut à 1 μ mole de Trolox par g ou pour 100 g (extraits et fruits) ou 1 μ mole de Trolox par μ mole de composé pur.

Mode opératoire

Cette technique a été réalisée au niveau du Laboratoire des Science et Technologie des Aliments à l'université catholique de Murcie, Espagne.

L'essai ORAC a été effectué essentiellement comme décrit par Lucas-Abellán *et al.*, 2008). En bref, AAPH (0.414g) ont été dissous dans 10 ml de 75 mM de tampon phosphate (pH 7,4) à une concentration finale de 153 mM et fraîche, Une solution de fluorescéine de stock (4×10^{-3} mM) a été faite dans 75 mM tampon phosphate (pH 7,4) et stocké enveloppé dans une feuille à 5 °C.

Immédiatement avant utilisation, le stock solution a été diluée à 1: 1000 mM avec un tampon de phosphate 75 (pH 7,4) Le sodium dilué solution fluorescéine a été fait frais tous les jours.

En ce qui concerne l'utilisation de la plaque, les puits extérieurs étaient non utilisé pour les déterminations expérimentales Ces murs ont été déposées avec 300 µl d'eau distillée, tandis que les puits intérieurs ont été utilisés pour les déterminations expérimentales.

Pour tous les puits expérimentaux, 150 µl de solution de travail fluorescéine de sodium a été ajouté. En plus des puits blancs ont reçu 25 µl de tampon phosphate 75 mM (pH 7,4), tandis que des normes ont reçu 25 µl de dilution et Trolox® échantillons reçus 25 µl d'échantillon. La plaque a ensuite été laissée à l'équilibre par incubation pendant minimum de 30 minutes dans le Synergy HT Multi-détection Lecteur de microplaques (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT) à 37 ° C.

Les réactions ont été initiées par l'addition de 25 µl d'une solution AAPH utilisant l'injecteur du lecteur de microplaque pour un volume réactionnel final de 200 µl. La fluorescence a ensuite été mesurée cinétiquement avec des données prises chaque minute (Figure n°20). Le la fluorescence de chaque puits a ensuite été mesurée à partir du bas toutes les 60 secondes à une sensibilité réglage 60. L'indice ORAC a été calculé comme décrit par Cao et Prior (1995).

L'AUC et de le net AUC des normes et des échantillons ont été déterminées en utilisant la réduction KC4™ de données Logiciels (BioTek Instruments, Winooski, VT) en utilisant les équations 1 et 2 respectivement.

$$\text{AUC} = 0.5 + (\text{R2/R1}) + (\text{R3/R1}) + (\text{R4/R1}) + \dots + 0.5 (\text{Rn/R1}) \quad (\text{Eq. 1})$$

Où R1 est la lecture de fluorescence au début de la réaction et Rn est la dernière mesure.

$$\text{Net AUC} = \text{AUC}_{\text{échantillon}} - \text{AUC}_{\text{blanc}} \quad (\text{Eq. 2.})$$

La courbe standard a été obtenue en traçant l'AUC net de différentes concentrations de Trolox ® contre les concentrations en extrait (1/50, 1/100 et 1/200). Les indices ORAC d'échantillons ont ensuite été calculées automatiquement à l'aide du logiciel Sigmaplot package (Jandel Scientific, German). pour interpoler les valeurs d'AUC net de l'échantillon contre la courbe standard Trolox ®.

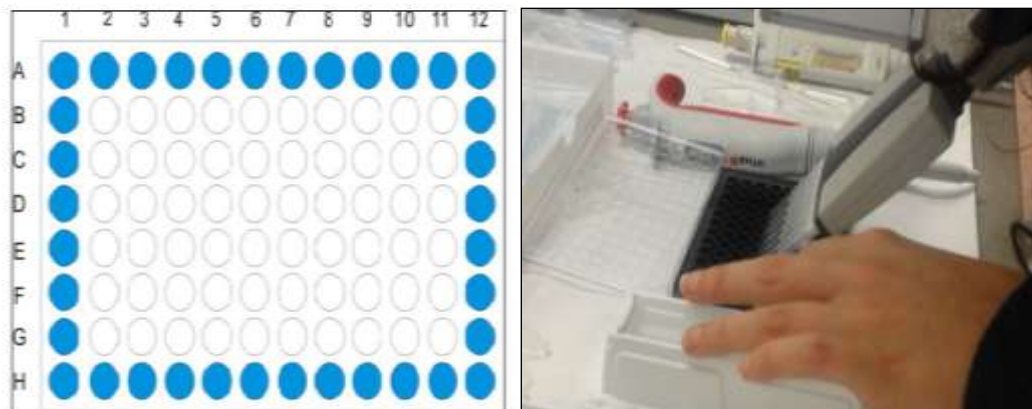


Figure 20 : Plaque utilisée pour la méthode ORAC (Held ,2015)

Les puits extérieurs (bleu-rempli) ont été remplis avec 300 μ l d'eau pour fournir une grande masse thermique. Seuls les intérieurs 60 puits ont été utilisés pour les déterminations expérimentales.

II. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil)

De point de vue méthodologique, le test du radical libre DPPH est recommandé pour des composés contenant SH, NH et OH groupes (Salah *et al.*, 1995). Il s'effectue à température ambiante, ceci permettant d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles. Le test est largement utilisé au niveau de l'évolution des extraits hydrophiles très riches en composés phénoliques (Yi-Zhong *et al.*, 2006 et Hatzidimitriou *et al.*, 2007).

L'activité antiradicalaire des différents extraits à tester a été déterminée selon la méthode de Sanchez-Moreno (2002) qui utilise le DPPH comme un radical libre relativement stable qui absorbe dans le visible à la longueur d'onde λ de 517 nm.

La technique consiste à mettre le radical libre DPPH (de couleur violette), en présence de l'antioxydant (extraits polyphénoliques ou huiles essentielles) va être réduit et vire vers le jaune. Ce changement se traduit par une diminution de l'absorbance. La réaction de DPPH est représentée dans la figure suivante :

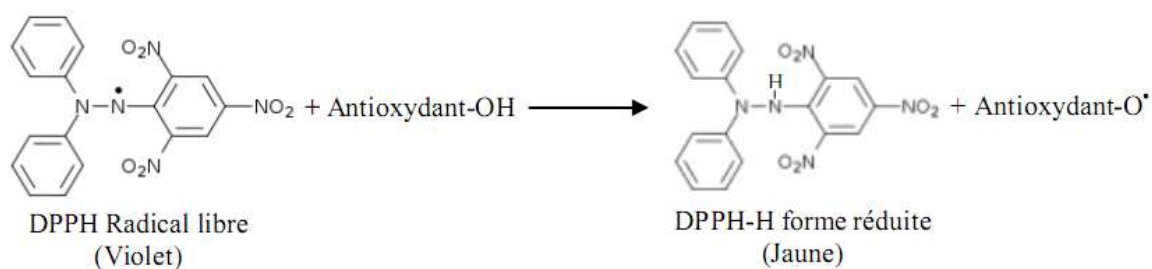


Figure 21: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH et un antioxydant.

La solution du DPPH est préparée à l'avance par solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100ml de méthanol absolu. 25 μ l de l'extrait à différentes concentrations sont ajoutés à 975 μ l de DPPH. Des solutions d'antioxydants de référence (acide ascorbique-BHT) sont également préparées dans les mêmes conditions pour servir de témoin positif. Le témoin négatif est constitué uniquement de DPPH et du méthanol. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min jusqu'à décoloration. Le dosage est réalisé par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 517 nm. Le pourcentage de l'activité antiradicalaire est estimé selon l'équation ci-dessous :

$$\% \text{ l'activité antiradicalaire} = [(A1-A2)/A1].100$$

A1 : Absorbance du témoin négatif sans extrait

A2 : Absorbance en présence de l'extrait.

- Evaluation du potentiel antiradicalaire par le calcul de l'IC50

L'IC50 (Concentration inhibitrice 50), appelée également EC50 (Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH. Les IC50 sont calculés graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés (Torres *et al.*, 2006). Pour toute l'expérimentation, chaque test est réalisé en triplicata et les résultats ont été calculés par la moyenne de trois essais.

III. Activité antioxydante totale (TAC)

La capacité antioxydante totale (TAC) (test du PPM (Phosphomolybdate)) est une variante du test au DPPH. Elle est évaluée par la méthode de phosphomolybdène de Prieto *et al.*, (1999). Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdène Mo (V) MoO^{2+} en présence de l'extrait ou de l'huile pour former un complexe vert à jaunâtre de phosphate/ Mo(V) à pH acide.

Un volume de 0.3 ml de chaque extrait méthanolique ou de l'huile essentielle est mélangé avec 3 ml de solution du réactif (0.6 M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM molybdate d'ammonium). Les tubes sont vissés et incubés à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 3 ml de la solution du réactif et 0.3 ml du méthanol et il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon. La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalents d'acide ascorbique par gramme de la matière sèche (mg EAA/ g MS). Les expériences sont répétées en 3 fois.

Partie 03 : Evaluation de l'activité antimicrobienne de *Zygophyllum album* et *Myrtus communis*

I. Etude *in vitro*

Nous envisageons dans ce présent travail, l'étude *in vitro* de l'activité antimicrobienne des différents extraits et des huiles essentielles isolés à partir de *M. communis* et *Z. album* et démettre par la mise en évidence de leurs pouvoirs inhibiteurs vis-à-vis des germes pathogènes pour l'homme.

I.1. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits et huiles essentielles

I.1.1. Préparation des extraits

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne nous avons mené nos extraits a des concentrations de (100mg/ml) pour les extraits polyphénoliques et de (250 µl/ml) pour les huiles essentielles de *M. communis* et *Z. album* .Les extraits (huiles essentielles et extrait phénoliques) sont dilués dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) à 2% sauf pour l'extrait aqueux qui est dilué dans l'eau distillée stérile .Ensuite filtrées à travers un filtre (PTTE) stérile de 0,22 µm. Les opérations se font sous un filtre à flux laminaire à fin d'éviter les contaminations extérieures et le plan du travail est préalablement stérilisé avec de l'alcool dénaturé NCCLS (2005).Les extraits ont été aussi pasteurisés à une température de 62 °C pendant 15mn (Almola, 2010).

I.1.2 Préparation de l'inoculum bactérien

A partir d'une culture de 18 h, une suspension bactérienne a été préparée de façon à obtenir une densité équivalente au standard de 0,5 Mac Farland. Cette densité correspond à une concentration de $10^6 - 10^8$ UFC/ml (Wade *et al.*, 2001).

I.1.3. Evaluation de l'activité antibactérienne par méthode de diffusion sur gélose

C'est une étape préliminaire aux études qui suivent permettant d'accéder à des résultats essentiellement qualitatifs. La technique utilisée est semblable à un antibiogramme standard (Hayes & Markovic, 2002). Elle consiste à déposer des disques de papier Wattman (6 mm de diamètre) imprégnés de 10 µl des différentes substances (200 mg/ml pour les EM et 500 µl/ml pour HE) à la surface d'une gélose Muller Hinton préalablement inoculée avec une suspension de la bactérie à étudier. Les zones d'inhibition formées après une incubation de 24 h à 37 °C ont été mesurées en mm (Kumar *et al.*, 2009).

➤ Test témoin négatif

Afin de se confirmer de l'efficacité des E.M et des HE, un antibiogramme a été réalisé en utilisant différents disques imprégnés de 10µl de solutions de méthanol à 80%, cyclohexane, DMSO et eau distillée.

➤ Test témoin positif

Il consiste à utiliser un milieu principal avec des antibiotiques actifs pour chaque germe.

I.1.4. Détermination de la CMI par micro-dilution en milieu liquide

La méthode de dilution en milieu liquide permet de déterminer les paramètres (CMI, CMB) d'inhibition de la croissance bactérienne par les extraits ou les composés actifs. La concentration minimale bactéricide (CMB) est définie comme étant la concentration minimale d'extrait (ou de composé) ne laissant pas de bactéries survivantes de l'*inoculum* après incubation à 37 °C pendant 18 à 24 heures. Nous avons utilisé cette méthode par dilution en milieu liquide de Mueller Hinton (MH). (Figure n°22) (Dramane, 2010).

Toutes les cupules de la microplaque (96) ont été remplies par 50 µl de bouillon de Mueller-Hinton. Un volume de 50µl de la solution mère des extraits testés (E. phénolique: 100 mg/ ml, HE : 250µl/ml) a été additionné aux cupules de la 2^{ème} colonne. Des dilutions binaires ont été ensuite réalisées. Enfin, 10µl d'inoculum bactérien a été ajouté. Les cupules de la 1^{ère} colonne contenant le milieu de culture et la suspension bactérienne serviront pour témoin. La microplaque a été ainsi incubée à 37 °C pendant 24 heures. Au cours de l'incubation, les densités optiques ont été mesurées à l'aide d'un lecteur de microplaque (TECAN) (Wade *et al.*, 2001 et Radojevic *et al.*, 2012).

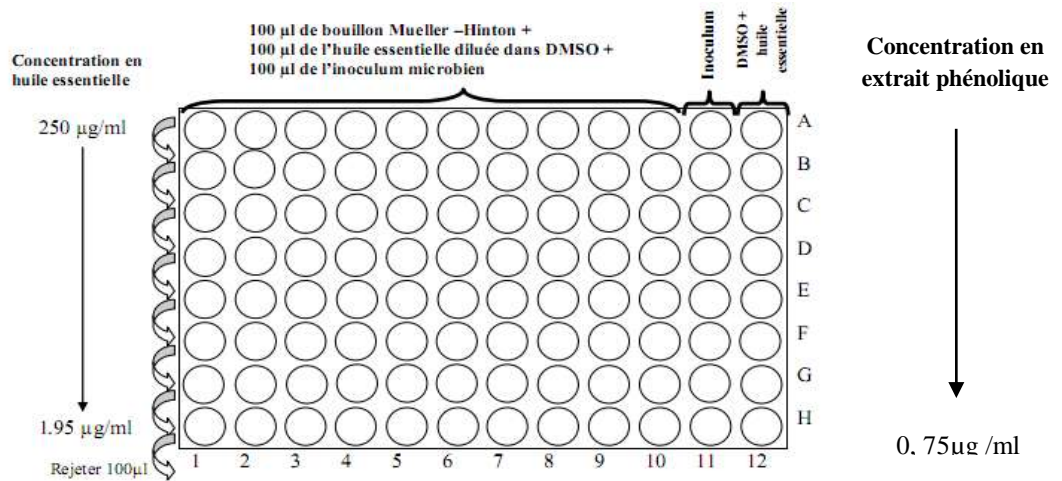


Figure 22 : Schéma d'utilisation de la microplaque

I.1.5. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

Pour déterminer la CMB, Le jour suivant lecture de la CMI, un ensemencement de 10µl de culture en stries de 5 cm chacune a été effectué à partir des cupules ne présentant pas de croissance visible à l'œil nu. Après 18h d'incubation à 37°C, le nombre de colonies a été déterminé. La CMB sera la plus faible concentration en extraits phénoliques ou en huiles essentielles où le pourcentage de bactéries survivantes est $\leq 0,01\%$ de l'inoculum initial (SFM, 2012).

I.1.6. Le rapport CMB/CMI

Le rapport CMB/CMI a été calculé pour chaque extrait. Dans la mesure où ce rapport est supérieur à 32, la souche bactérienne présente donc une tolérance à l'agent antibactérien testé (Jacquiera *et al.*,2007).

I.2. Evaluation de l'activité antifongique des extraits et huiles essentielles

Les infections à *Candida albicans* et à *Aspergillus fumigatus*, autrefois opportunistes, sont en passe de devenir une préoccupation majeure en raison de la multiplication du nombre de patients fragiles (multi-opérés, immunodéprimés, etc.) (Ascioglu *et al.*, 2002), des problèmes de résistance de certaines souches aux médicaments usuels (Ramage *et al.*,2002 et Granier, 2003) et de la cytotoxicité des antifongiques systémiques . Face à ces constats, la recherche de nouveaux antifongiques s'est avérée nécessaire et s'est orientée vers les molécules bioactives extraites de plantes médicinales et aromatiques (Newman *et al.* ,2003).

Pour cela, nous avons évalué l'activité antifongique vis-à-vis des deux souches fongiques ayant un profil résistant prouvé en amont (*Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus*), cette partie a été réalisée au niveau du laboratoire des aliments, à l'université catholique San-Antonio, à Murcie, Espagne.

I.2.1. Préparation de l'inoculum microbien

La mise en suspension des levures (*Candida albicans*) ou des conidies (*Aspergillus fumigatus*) a été réalisée dans de l'eau distillée stérile et ensuite comptabilisée sur cellule de Mallassez. Des suspensions de concentrations finales de l'ordre de 2×10^6 levures/ml pour *candida albicans* et de 2×10^4 conidies/ml pour *Aspergillus fumigatus* ont été réalisées.

I.2.2. Evaluation de l'activité antibactérienne par méthode de diffusion sur gélose

C'est une méthode qui a été proposée et standardisée en 2004 par Clinical and laboratory Standards Institute (CLSI). Le milieu de culture recommandé est Sabouraud, supplémenté de 2% de glucose et 0,5 mg/ml de bleu de méthylène, ce qui produit des zones d'inhibition bien visibles (ESPI-Nelingroff, 2007).

Les boîtes de Pétri contenant de la gélose Mueller Hinton ajoutée de 2% de glucose sontensemencées aseptiquement par écouvillonnage, elles sont ensuite séchées à proximité de la flamme. Des disques de 6 mm de diamètre sont préparés à l'aide de papier filtre (Glass microfibre filters) puis stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes. Ces derniers, sont ensuite imprégnés de 10 µl des différentes substances (200 mg/ml pour les EM et 500 µl/ml pour HE) et placés sur la gélose préalablementensemencée avec la souche à tester. Les disques sont préparés en extemporané. Les boîtes sont laissées pendant 15 minutes à la température ambiante avant d'être mises à incuber dans une étuve à 35°C pendant 20 à 24 heures. Après l'incubation, une zone ou un halo clair apparaît (Hayes et Ward, 1986).

I.2.3. Evaluation de la CMI par micro-dilution en milieu liquide

Nous avons utilisé la méthode décrite en 2006 par la CLSI. Cette méthode donne des résultats rapides, reproductibles et économiques. C'est la méthode de référence qui permet de tester l'efficacité des antifongiques et de déterminer les CMI correspondantes. La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la concentration la plus faible de la substance antimicrobienne qui inhibe la croissance des microorganismes.

Le milieu de culture préconisé pour cette technique est le bouillon Roswell Park Mémorial Institut (RPMI) ajouté de 2% de glucose et du rouge phénol comme indicateur coloré de pH. Ce milieu est tamponné à pH 7, l'application sur microplaque est la même décrite auparavant dans cette partie.

I.2.4. Evaluation de la Concentration Minimale Fongicide (CMF)

La CMF est définie comme la plus faible concentration de l'antifongique qui tue 99,9% de la concentration cellulaire finale. Pour la détermination de la concentration minimale fongicide, nous avons utilisé la méthode décrite par Canton *et al.*, (2003). Cette méthode est en accord avec les exigences de la CLSI.

Après la détermination de la CMI, les deux puits contenant les concentrations en substance antifongique strictement supérieures à la CMI serviront pour la détermination de la CMF. Pour ce faire, 20µl de chaque puits vont être transférés dans des boîtes de Pétri contenant du milieu SDA (Sabouraud, Dextrose Agar). Les boîtes sont incubées dans une étuve à 35°C pendant 24h. Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boîte correspondant à la CMF renferme un nombre de colonie inférieure à 3 (Majoros *et al.*, 2005).

II. Etude *in vivo*

Les principaux microorganismes incriminés dans la contamination des aliments sont les bactéries. La contamination des produits par les bactéries est un véritable fléau pour l'industrie agroalimentaire. En effet, en Algérie *Bacillus cereus* peut être déjà la cause de plusieurs cas de TIAC parmi les 60% des cas dont l'agent est inconnu (Ziane, 2015). Parmi les bactéries responsables, les 4 les plus incriminées sont les salmonelles, les staphylocoques, les Clostridium et les bactéries du groupe *Bacillus cereus* (Delmas *et al.*, 2010). L'implication des trois premières a été mise en évidence depuis de nombreuses années et dans le cas TIAC leur implication est systématiquement recherchée. En ce qui concerne les *Bacillus cereus* la preuve de leur implication dans les toxi-infections a été plus longue à être mise en évidence.

Vu sa pathogénicité et son implication dans deux pathologies distinctes de type émétique et diarrhéique d'une part, et Vu le problème d'antibiorésistance entamé précédemment qui risque de toucher l'efficacité de traitement de ce genre de pathologie par antibiothérapie, ce présent travail s'est focalisé dans la recherche de traitement alternatif naturel à base de plante *in vivo* via nos extraits et huiles essentielles déjà prouvé d'avoir un effet antibactérien modéré vis-à-vis l'ensemble des germes notamment *B. cereus in vitro*. Mais Afin d'appréhender ce chapitre dans de bonnes conditions, la vérification de la toxicité aigüe des différents extraits était indispensable.

II.1. Evaluation de la toxicité orale aigüe des extraits végétaux

L'étude de la toxicité aigüe est une analyse qualitative et quantitative de l'altération irréversible des fonctions vitales après administration unique d'une substance dans un délai de quelques minutes à quelques jours (2 semaines). Cette toxicité est évaluée en déterminant la dose létale 50 (DL₅₀) c'est-à-dire, la dose unique qui provoque la mort de 50 % des animaux traités.

L'évaluation de la toxicité aigüe a été réalisée selon les Directives du Journal Officiel des Communautés Européennes code 423 OECD (2001) et nous avons sélectionné un extrait polyphénolique pour chaque plante selon les résultats des analyses qualitatives et quantitatives d'une part, et l'huile essentielle d'autre part.

II.1.1. Préparation des extraits

Comme étant non toxique et permettant la solubilisation des extraits polyphénoliques et des huiles essentielles, l'eau physiologique (9 ‰ Na Cl) a été choisi pour la préparation des différentes doses. Les concentrations choisies sont :

- Extraits polyphénoliques : 100, 400, 800, 1000, 1200g/kg de poids corporel
- Huiles essentielles : 0.1, 0.5, 1, 1,5 et 2 ml/kg p.c.

II.1.2. Préparation des groupes

On a utilisé pour chaque plante 110 rats (mâles et femelles) pesant entre 150 – 200 g répartis en 22 lots de 5 rats chacun. Les lots sont rassemblés en trois groupes :

- **1^{er} Groupe** : Deux lots témoin, soumis à un gavage de 10ml/kg du sérum physiologique ;
- **2^{ème} Groupe** : Dix lots recevant les différentes doses croissantes de l'extrait polyphénolique ;
- **3^{ème} Groupe** : Dix lots recevant les doses croissantes en huiles essentielles.

Les rats Wistar ont été préalablement privés de la nourriture pendant 18 h, ils ont accès juste à l'eau. Ensuite, chaque animal est identifié par un numéro et pesé.

II.1.3. Administration des substances et suivi des animaux

Les différents extraits (polyphénols, HE) ont été administrés par voie orale aux différents lots de rats, à raison d'une dose par lot et de 1ml pour 100 g du poids corporel.



Figure 23 : Administration des substances par gavage

Après l'administration des substances, les animaux ont été observés individuellement toutes les 30 minutes pendant 6 heures le premier jour et tous les jours pendant 15 jours. Pendant cette période, nous avons enregistré le nombre des rats morts ainsi que le poids corporel et le comportement et les troubles symptomatologiques observés à l'œil nu.

Les principaux signes recherchés sont :(Tahraoui *et al.*, 2010).

- ❖ Contraction abdominale ;
- ❖ Activité : démarche anormale, activité réduite;
- ❖ Respiration : changement de rythme ;
- ❖ Convulsion ;
- ❖ Diarrhée ;
- ❖ Coma ;

S'il existe de mortalité, la dose médiane DL₅₀ de l'extrait doit être calculée. Elle peut en effet être déterminée par la méthode de Miller ET Tainter (1944) décrite par Randhawa en 2009 et par l'équation de Dragstedt et Lang (1957) citée par El Allaoui et ses collaborateurs (2011) après application de la relation :

$$DL_{50} = \frac{50 (X_2 - X_1) + (X_1 Y_2 - X_2 Y_1)}{Y_2 - Y_1}$$

X₂ : Dose supérieure encadrant DL₅₀;

X₁ : Dose inférieure encadrant DL₅₀;

Y₂ : Pourcentage de mortalité correspondant à X₂;

Y₁ : Pourcentage de mortalité correspondant à X₁.

II.2. Evaluation de l'activité antibactérienne vis à vis *B. cereus*

Cette partie est complexe, elle nécessite tant de paramètres à évaluer pour avoir des résultats plus précis et plus fiables.

II.2.1. Préparation de l'inoculum de *Bacillus cereus*

A partir d'une culture jeune de 18 à 24h isolée et identifiée auparavant, nous avons prélevé 3-5 colonies identiques à l'aide d'une pipette Pasteur, puis transférées dans un tube de 10ml de l'eau physiologique stérile (0,9% NaCl). Les tubes sont incubés à 37C° pendant 30min. Le criblage est effectué à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption moléculaire à une longueur d'onde de 580nm, afin d'obtenir une suspension ayant une concentration de 1,5.10⁸ UFC/ml, une dose susceptible de provoquer une infection intestinale chez les rats (Logan, 1988).

II.2.2. Préparation des extraits

Suivant les résultats de l'activité toxicologique aigüe trouvés auparavant, nous avons choisi des doses qui n'ont provoqué aucun signe toxicité grave ou de mortalité pour l'étude *in vivo* qui sont de 800 mg/kg pour l'extrait méthanolique de *Zygophyllum album*, de 1g/kg pour l'extrait aqueux de *Myrtus communis* et de 1 ml/kg. Les deux huiles essentielles de ces deux plantes ont été diluées dans l'eau physiologique stérile.

II.2.3. La répartition des groupes de rats

Dans notre étude, nous avons utilisés 55 rats Wistar qui sont répartis en 11 lots (5 rats /lot et 1 rat/cage), (tableau 13). Cette répartition est faite une semaine avant le début d'expérience.

Tableau 13 : La mise en lots des rats d'expérimentation *in vivo*

Désignation du lot	Définition du lot
Lot 1 témoin	Rats non traités et non infectés recevant 1ml de l'eau distillée.
Lot 2 INT	Rats infectés par <i>B. cereus</i> mais ne recevant aucun traitement.
Lot 3 témoin négatif	Rats infectés par <i>B. cereus</i> et traités avec ATB (Vancomycin 5µg).
Lot4 HMp	Rats infectés et prétraités par l'huile essentielle de <i>M. communis</i> .
Lot5 HMc	Rats infectés et traités par l'huile essentielle de <i>M. communis</i> .
Lot6 HZp	Rats infectés et prétraités par l'huile essentielle de <i>Z. album</i> .
Lot7 HZc	Rats infectés et traités par l'huile essentielle de <i>Z. album</i> .
Lot8 EMp	Rats infectés et prétraités par l'extrait aqueux de <i>M. communis</i>
Lot9 EMc	Rats infectés et traités par l'extrait aqueux de <i>M. communis</i>
Lot10 EZp	Rats infectés et prétraités par l'extrait méthanolique de <i>Z. album</i>
Lot11 EZc	Rats infectés et traités par l'extrait méthanolique de <i>Z. album</i>

II.2.4. Induction de l'infection et le traitement par les extraits

L'induction de l'infection intestinale par *Bacillus cereus* est réalisée selon la méthode de Pan *et al.*, (2014) par gavage et même pour les différents modes de traitement, sachant que les rats sont mis à jeun 18h avant l'expérimentation.

- Pour les rats prétraités : ils reçoivent un volume de 1ml d'extrait pendant 6 jours, le 7^{ème} jour, ils reçoivent 1ml d'extrait plus 1ml de l'inoculum de *Bacillus cereus*.
- Pour les rats traités : l'induction de *Bacillus cereus* se fait le 1^{er} jour, et après 24h d'incubation, l'extrait est administré quotidiennement (1ml) jusqu'à le 7^{ème} jour, en totalité l'expérimentation dure 9 jours.

II.2.5. Suivi des animaux

II.2.5.1. Symptomatologie, mortalité et température rectale

Le contrôle s'appuie sur l'observation du comportement des rats, de leur état de santé et de la nature de leurs crottes. La température rectale des rats est aussi mesurée chaque jours durant l'expérience en déposant un peu de vaseline sur le thermomètre et en l'insérant délicatement dans l'anus du rat (Itelima et Agina, 2014).

II.2 .5.2. Evolution pondérale

L'état physiologique des animaux influe sur leur apport en nutriments, ainsi leurs poids corporels. Une diminution de ces derniers peut donc traduire la présence de certains problèmes fonctionnels chez les animaux.

Les rats sont pesés quotidiennement tout au long de la période d'expérimentation à l'aide d'une balance électrique (Havelaar *et al.*, 2001).Le poids initial et le poids final de chaque groupe ont été enregistrés et le taux de croissance a été calculé par la formule suivante :

$$\text{Taux de croissance (\%)} = \frac{\text{Pf} - \text{Pi}}{\text{Pi}} \times 100$$

Dont :

- **Pf** : le poids final des rats
- **Pi** : le poids initial des rats

II.2 .5.3. Détection de *Bacillus cereus*

Après l'induction de l'infection, la matière fécale des rats expérimentaux est collectée chaque jours, jusqu'à la fin de l'expérimentation dans des sachets en plastique stériles à partir des cages individuelles pour déterminer le nombre des rats excréant *B. cereus* dans leurs crottes d'une part et de détecter un symptôme diarrhéique suite à la toxi-infection par la détermination d'humidité de la matière fécale d'autre part (Aranda et Gianella, 1999).

B. cereus dans chaque échantillon est quantifiée comme suite: 1.0 g of matière fécale et additionnée de 9 ml de d'eau physiologique, homogénéisée et incubée à 37C° pd 2 heures, la suspension diluée après en série (10^{-1} to 10^5) dans l'eau physiologique stérile. Chaque tube est mis dans un bain-marie à 80C°/10mn (Test de thermorésistance). Un Aliquote (0.1ml) de chaque dilution estensemencé en triplicata dans une gélose Mossel (milieu sélectif). Après incubation à 37C° pd 8-24 h, des colonies roses confirment la présence de *Bacillus cereus*.

II.2.6. Sacrifice des rats

A la fin des expérimentations, tous les rats ont été privés de la nourriture pendant 12h, ont été ensuite euthanasiés ,les différents organes internes de translocation (Foie, rate, rein, poumons, cœur, Intestin et colon) sont prélevés soigneusement dans des conditions d'aseptie, pesés, et divisés en deux parties, une partie pour l'analyse microbiologique est mise dans un pot stérile remplis de 9ml d'eau physiologique et l'autre partie est mise dans le formol(10%) pour une étude histologique, le sang est aussi prélevé.



Figure 24 : Prélèvement du sang



Figure 25 : dissection des rats et prélèvement des organes.

II.2.7. Poids relatif des organes internes

Comme étant, une maladie systémique, l'infection par *B. cereus* peut provoquer de sérieux problèmes non seulement au niveau des articulations mais également au niveau d'autres organes (Sany, 2003). Les traitements administrés (standards et substances naturelles) peuvent avoir des effets indésirables et atteindre ainsi le fonctionnement des organes internes. La détermination des poids de quelques organes vitaux demeure donc importante.

Les organes prélevés ont été examinés *in situ* et pesés immédiatement à l'aide d'une balance analytique. Le poids relatif de chaque organe a été ensuite calculé par rapport au poids corporel (g/100g de p.c).

II.2.8. Recherche et dénombrement des germes dans le sang et dans les organes de translocation

La translocation bactérienne est définie comme étant le passage des micro-organismes ou de leurs produits (endotoxines et exotoxines), à partir du tractus gastro-intestinal jusqu'à des sites extra-intestinaux les ganglions mésentériques, le foie, la rate ou le sang suite à une augmentation des complications infectieuses (Herek *et al.*, 2000).

Afin de mieux évaluer l'effet du germe pathogène *B. cereus* et des différents extraits de *Zygophyllum album* et *Myrtus communis* sur ce phénomène, nous avons trouvé utile de :

- voir l'effet des extraits et du pathogène sur le microbiote intestinal du rat, au niveau de l'iléon et colon ;
- rechercher les germes du tractus intestinal naturellement présents chez le rat dans d'autres organes de translocation (tableau qui suit).
- vérifier la présence du pathogène dans le sang et/ou dans les organes de translocation pour détecter une éventuelle septicémie.

Tableau 14 : Ensemble des germes recherchés dans les organes de translocation

Germes recherchés	Milieux sélectifs utilisés	Dilution
<i>Bacillus cereus</i>	Gélose Mossel ou gélose au lait	Solution mère
Flore totale aérobie	TGEA	10 ⁻⁵
Flore totale anaérobie	VF	10 ⁻⁴
Lactobacillus	MRS	10 ⁻³ , 10 ⁻⁴
Entérobactéries	Hektoen	10 ⁻³
Enterocoques	BEA	10 ⁻³ , 10 ⁻⁴
<i>Candida albicans</i>	Sabouraud	10 ⁻⁴

Pour des raisons statistiques et une meilleure interprétation mathématique, le dénombrement des bactéries viables dans un échantillon est exprimé en log Unité Formant Colonie (UFC) par gramme d'échantillon selon la formule suivante :

$$\text{Log UFC/g d'échantillon} = \text{Nombre de colonies/Dilution} \cdot \text{Volumeensemencé}$$

II.2.9. Etude histologique

II.2.9.1. Préparation des blocs

Les fragments de foie préalablement fixés dans le formol à 10 % sont disposés dans des cassettes qui sont ensuite placées dans un automate (Leica TP1020). Les fragments de l'organe sont d'abord déshydratés par submersion dans des bains d'éthanol à des concentrations croissantes (60 %, 70%, 80%, et 100%). les échantillons subissent deux bains de xylène et deux autres de paraffine fondue. Le xylène occupe la place de l'eau et par conséquent facilite la pénétration de la paraffine puisque cette dernière est hydrophobe. La durée des bains est de 24 heures. A l'aide d'un appareil d'inclusion, Les échantillons des différents sont placés dans des moules métalliques et recouverts de paraffine fondue. Après refroidissement, les blocs sont prêts à la coupe.

II.2.9.2. Réalisation des coupes et coloration

Les blocs sont placés dans le microtome afin de réaliser des coupes de 3µm d'épaisseur. A l'aide d'une pince très fine, les coupes sont placées sur des lames qui sont ensuite déparaffinées par chauffage à l'étuve pendant une heure. Pour mettre en évidence les hépatocytes, les coupes sont d'abord réhydratées par submersion successive dans les bains suivants : bain de xylène (5 min), bains d'éthanol (5 min). Après rinçage dans de l'eau distillée (5 min), les coupes réhydratées sont placées dans un bain d'hématoxyline (5 à 6 min) pour colorer les noyaux. L'excès de colorant est enlevé par un bain d'eau additionné de quelques gouttes de NH₄OH. Elles sont mises ensuite dans un bain d'éosine (5 min) pour colorer le cytoplasme et l'excès de colorant est enlevé par l'éthanol. Les lames ainsi colorées sont couvertes de lamelles et prêtent à l'observation microscopique (Lafond, 2006).

La préparation des blocs et des lames de nos échantillons a été réalisé au niveau de l'hôpital de Meslem Tayeb, Mascara (Service Anapathologie), et la lecture des lames a été faite au niveau du laboratoire d'Anapathologie de l'hôpital de Sidi Belabess.

II.3. Ethique

Cette étude *in vivo* est réalisée avec respect du bien-être des animaux, comme le recommande l'OMS (1993).

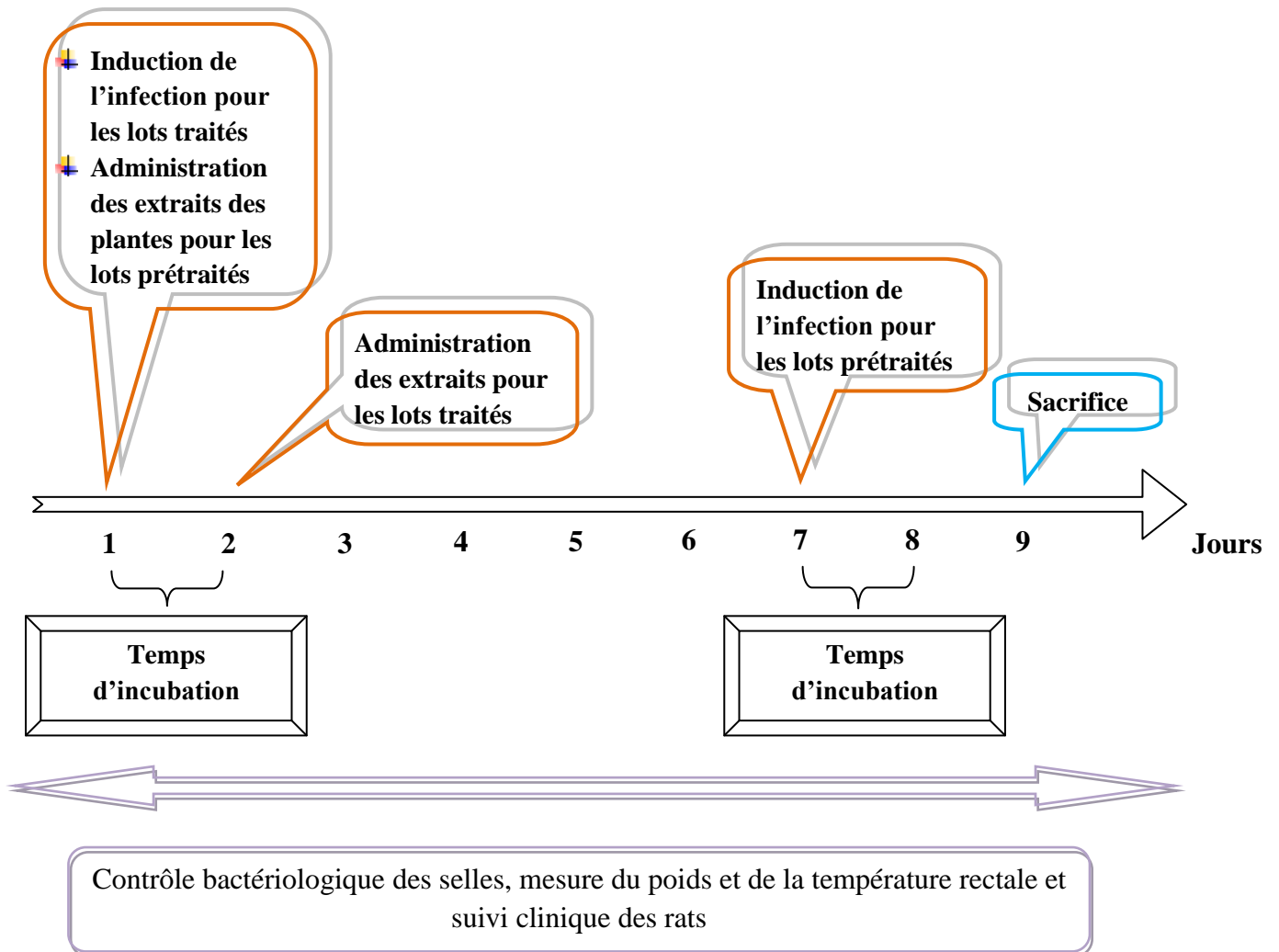


Figure 26 : Protocole expérimentale *in vivo*

Partie 04 : Analyses statistiques

Afin de valider les résultats, une analyse statistique est indispensable, pour cela toutes les expérimentations ont été réalisées en duplicata. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. L'analyse ANOVA a été réalisé, un test « t » de Student a été appliqué ; $P \leq 0,05$ est considéré comme significatif.

Résultats et discussion

PARTIE 01 : Résultats de l'étude phytochimique**I. Analyse quantitative du matériel végétal**

La composition chimique d'un végétal varie selon les espèces et au sein même d'une espèce. Elle dépend des conditions de culture (qualité du sol, climat, irrigation, traitements phytosanitaires), et de la période de récolte (précoce ou tardive).

L'ensemble des résultats de l'étude des métabolites primaires portée sur les deux plantes sélectionnées *Zygophyllum album* et *Myrtus communis* sont illustrés dans le tableau n° 15, Les résultats sont vérifiés par le test statistique à l'aide de l'analyse de la variance au seuil de 5 % montrent que les valeurs obtenues présentent une différence hautement significative ($P \leq 0,01$) entre les plantes étudiées.

Tableau n°15: Teneurs en métabolites primaires des deux plantes étudiées

Paramètre/Plante	<i>Myrtus communis</i>	<i>Zygophyllum album</i>	Analyse statistique
Teneur en eau	63,5±0,15 %	72,80±1%	hautement significatif (HS)
Matière minérale	42,4±1,15 mg (soit 6,74%)	58±1,50 (soit 13%)	Non significatif
Lipides	9,50±0,01%	3,28±0,01%	
Protéines	9,25±3%	34,8±1,5 %	
Sucres	87,7±0,01 mg/l	100,86± 0,01 mg/l	

Il apparait selon nos résultats que *Zygophyllum album*, est l'espèce qui possède la plus grande teneur en eau en comparant avec *Myrtus communis* (63,5%) puisqu'elle est une espèce succulente qui accumule l'eau dans ces feuilles d'une part. D'après Hernandez (1997) et Slimani (2008), La succulence est l'un des caractères les plus commun chez les halophytes, pour supporter la saison sèche et d'autre part elle se caractérise par une grande surface foliaire. Elles constituent une autre forme de résistance à l'aridité des végétaux croissants dans des zones désertiques. Elles se caractérisent par l'accumulation d'importantes réserves d'eau tissulaire et par une réduction extrême des pertes par transpiration (Ramade, 2003). Debussche *et al.*, (1987) indiquent également que les plantes à répartition strictement méditerranéenne sont moins aqueux que ceux à large répartition ou que ceux qui sont rares dans l'aire méditerranéenne comme c'est le cas de *Myrtus communis*.

D'une manière globale la teneur en eau des plantes est très variable selon les espèces, les organes et les stades végétatifs (Soltner, 2001).

Concernant la matière minérale, les résultats montrent que la teneur en cendre est aussi supérieure chez *Zygophyllum album* (13%) que chez *Myrtus communis* (6,74%), en effet, ces résultats sont confirmés par les travaux de Zerria en 2009, dans ce cas on parle d'un mode d'adaptation au milieu saharien (Lemee, 1978).

En comparant nos résultats avec ceux de Chidouh (2014), le taux de cendres trouvé (5,14%) de myrte est aussi inférieur néanmoins il reste limité car que cette plante affectionne énormément les sols pauvres ou caillouteux (Dinand, 1997).

En se basant sur les résultats, on remarque que nos deux plantes sont pauvres en fractions lipidiques, en effet *Zygophyllum album* ne contient que $3,28 \pm 0,01\%$ un total plus élevé que celui trouvé par Moustafa *et al.*, (2007) qui ont trouvé 2,33% pour une espèce égyptienne. De même pour *Myrtus communis* (Debussche et Isenmann, 1989) dans la région méditerranéenne remarquent que la teneur en lipides varie en fonction des familles botaniques. Ils trouvent un taux inférieur à 2% chez les *Rosaceae*, entre 2 et 10% chez les *Caprifoliaceae* et plus de 10% chez les Monocotylédones. Ces teneurs varient en fonction des régions biogéographiques.

Pour le taux de protéines, nous avons remarqué une différence entre les deux plantes, en effet *Zygophyllum album* est plus riches en protéines que *Myrtus communis* cela peut être expliqué par le fait qu'une réponse d'une plante à la chaleur se traduit par la production de protéines spécifiques que l'on appelle les « heat shock proteins » ou HSPs, cela est présent dans le cas de notre plante saharienne *Zygophyllum album* (Cornic, 2007).

Les résultats nous ont montré aussi que la teneur en sucre est bien élevée chez *Zygophyllum album* que *Myrtus communis*, en effet, Les sucres totaux sont accumulés dans les plantes en réponse au stress salin ou hydrique. Le taux de cette accumulation différent selon le degré de stress, Selon Arhab (2007), la teneur en sucres totaux varie en fonction du climat, la saison et le stade de développement des plantes, à titre d'exemple, les températures élevées et les faibles précipitations tendent à augmenter la fraction pariétale et à diminuer le contenu soluble des végétaux surtout pour *zygophyllum album* qui est un l'holophyte spontanée du Sahara Algérienne.

Donc pour ajuster le potentiel osmotique interne perturbé par l'absorption excessive des ions sodium ; la plante accumule dans son cytoplasme des solutés organiques principalement la proline (Handa *et al.*, 1986) et les sucres solubles (Rhodes, 1987) in (Regragui, 2005).

II. Les rendements d'extraction

II.1. Rendement d'extraction des huiles essentielles

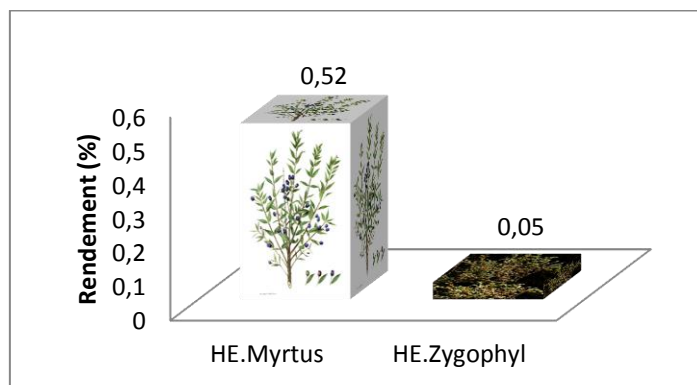


Figure n° 27: Résultats des rendements obtenus

Selon les résultats illustrés dans la figure n°27, nous observons une nette différence entre les deux rendements d'extraction des feuilles *Myrtus communis* ($0,52 \pm 0,03\%$) et *Zygophyllum album* ($0,05 \pm 0,8\%$).

Ceci est confirmé par les travaux de Wannes *et al.*, (2010) sur les différentes parties de *Myrtus communis*, et qui ont trouvé le plus grand rendement d'extraction des huiles essentielles au niveau des feuilles avec 0,61%, Il est aussi sensiblement plus élevé que celui du Myrte de Tunisie (Chalchat & Garry, 1992 et Lawrence, 1993) et le myrte du Maroc avec 0,3% (Satrani *et al.*, 2013). Pour *Zygophyllum album*, le rendement est moins élevé que celui de l'huile essentielle de *Zygophyllum eurypterum* provenant d'Iran (Akhgar et Poshteshirani, 2015), mais nettement plus grande que le rendement de l'huile essentielle de la même espèce provenant du Sahara algérienne qui est de 0,02% (Tigrine *et al.*, 2006). Au laboratoire, ce rendement est tributaire de plusieurs facteurs. Comme la saison de récolte, l'origine de la plante et la méthode d'extraction (Ismaili *et al.*, 2001). Plusieurs travaux aussi relatifs au séchage des plantes aromatiques et médicinales indiquent des modifications considérables, particulièrement sur le plan quantitatif au niveau des huiles essentielles.

Or, une plante si elle n'est pas séchée dans de bonnes conditions, elle risque de se dégrader et par suite, la perte de la totalité de ses huiles essentielles (Aghfir, 2007).

II. 2. Rendement d'extraction des différents extraits organiques

Après extraction, nous avons obtenus quatre (04) extraits organiques pour chaque plante, les rendements d'extraction de chaque extrait est illustré dans la figure n° 28.

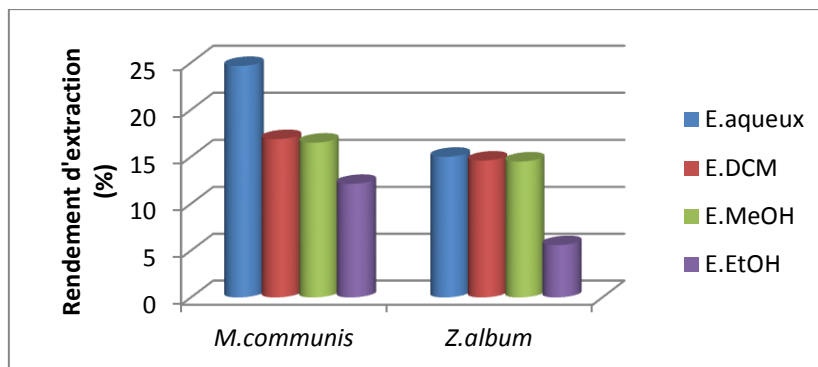


Figure n°28 : Les rendements d'extraction des différents extraits polyphénoliques

E.DCM : extrait dichlorométhanique ; E.MeOH : extrait méthanolique, E.EtOH : extrait éthanolique

D'après ces résultats, nous constatons que les extraits polyphénoliques des feuilles de *Myrtus communis* enregistrent de forts rendements par rapport à *Zygophyllum album* car les rendements sont plus élevés dans les feuilles par rapport aux autres parties de la plante ceci a été confirmé par Falla *et al.* (2008). surtout pour l'extrait aqueux (décocté) qui dote d'un rendement de l'ordre de 24,65%, il est proche de celui obtenu par Hosseinzadeh et ses collaborateurs en 2011 (24,50%) mais nettement plus grand pour le rendement en extrait éthanolique (7,66%). D'autres rendements plus au moins considérables ont été observés dans les extraits aqueux, dichlorométhanique et méthanolique de *Z. album* qui sont de l'ordre de 15, 14,6 et 14,5% respectivement, Les travaux antérieurs réalisés sur les espèces de cette plante ont enregistré des rendements plus faibles (Ghoul et Ben-Attia, 2014 ; Moustapha *et al.*, 2007 et Belyagoubi, 2011). En revanche, le rendement en extrait éthanolique était le moins élevé par rapport aux autres rendements enregistrés.

En général, la diversité des plantes est responsable de la grande variabilité des propriétés physico-chimiques influençant l'extraction des polyphénols (Mahmoudi *et al.*, 2013 et De Koffi *et al.*, 2010), Entre autre, la solubilité des composés phénoliques est affectée par la polarité du solvant utilisé.

Par conséquent, il est très difficile de développer un procédé d'extraction approprié à l'extraction de tous les composés phénoliques de la plante (Jokic *et al.*, 2010 et Garcia-Salas *et al.*,2010).

III. Analyse des huiles essentielles

Les propriétés organoleptiques et physico-chimiques constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'HE. Nos essais ont été effectués selon un protocole précis et obéissent aux normes édictées par l'ISO. Pour l'HE de *Myrtus communis* c'est la norme AFNOR NF ISO 1242 (T 75-103), 1999 qui sont en vigueur, par contre, il n'est toujours pas établi de normes concernant les constantes de l'huile essentielle de *Zygophyllum album*.

III.1. caractérisation organoleptique des huiles essentielles

Les huiles essentielles analysées sont d'aspect, de couleur et d'odeur très variables (tableau n°16). Les huiles essentielles issues de la méthode d'hydrodistillation possèdent des notes olfactives proches des arômes originales des plantes fraîches utilisées avec des odeurs d'herbes aromatiques. L'odeur dégagée est agréable avec un caractère herbal rappelant les plantes fraîches.

Tableau n°16: Principaux critères organoleptiques des huiles essentielles des plantes étudiées

HE	Aspect	Couleur	Odeur	Saveur
<i>M. communis</i>	Liquide	Jaune orangé	Mentholée et camphrée	Huileuse
<i>Z. album</i>	pâteux	Blanche /jaune pale	Florale	herbeuse

Une étude analogue menée par Taleb-Toudert (2015) a indiqué que l'huile essentielle de *M. communis* de la Kabylie est liquide, jaune orangé avec une saveur mentholée, ces caractéristiques sont très proches de l'huile essentielle de *M. communis* de Tlemcen. de même pour l'huile essentielle de *Z. album*, qui est d'aspect, couleur et d'odeur aussi proche de celle extraite par Tigrine-Kordjani et ses collaborateurs en 2006, car la plante provient de la même région (Sahara de Ouergla), donc d'une façon globale, les minimales différences enregistrées peuvent être attribuées à l'origine géographique ou même au stade du cycle végétatif au moment de la récolte De Figueiredo *et al.*, (2008).

III. 2. Caractérisation physicochimique des huiles essentielles

Les indices physicochimiques de l'HE de chaque plante sont consignés dans le tableau n°17.

Tableau n°17 : Les constantes physico-chimiques des huiles essentielles obtenues

Paramètres	<i>M. communis</i>	<i>Z. album</i>
Indices d'acide	2,0	2,3
Miscibilité à l'EtOH	1,0 ml	3,0ml
pH	6,4	6,7
Densité relative à 20°C	0,873	0,906
Indice de réfraction	1,463	1,613

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que les indices d'acide calculés des deux plantes sont très proches mais sont globalement faibles, cela nous laissent penser qu'elles ne contiennent pas beaucoup d'acides libres et ne sont pas donc altérées, lors de leur extraction par hydrodistillation et leur conservation.

Les huiles essentielles extraites par Taleb-Toudert en 2015 à partir des feuilles de *M. communis* collectées dans la région de la Kabylie qui est géographiquement différente ont montré un indice d'acide plus élevé (3,366), De même Kordjani (2005) a déterminé un indice d'acide inférieur à 1 pour l'huile essentielle de *Z. album*. En effet l'acidité d'une huile essentielle est un critère d'estimation de sa qualité.

Un indice d'acide faible indique que les huiles essentielles sont stables et ne provoquent pas d'oxydation car l'huile, en s'oxydant, se dégrade rapidement et provoque une augmentation de l'indice d'acidité (De Cliff et Harerimana ,2013).

En général, il en ressort que toutes ces constantes étant influencées par les conditions édaphiques et climatiques ainsi que les pratiques culturelles (Demarne, 1985 ; Gilly, 1997 et Lis-Balchin, 2002). Cela fait partie de la complexité de la notion de chémotype.

III. 3. Analyse chromatographique des huiles essentielles

III.3.1. L'huile essentielle de *Myrtus communis*

Les résultats de l'analyse par Chromatographie gazeuse -Spectrométrie de masse de la composition chimique de l'HE sont présentés dans la figure n° 29 et le tableau n°18, dans lequel les composés identifiés sont listés suivant le temps de rétention.

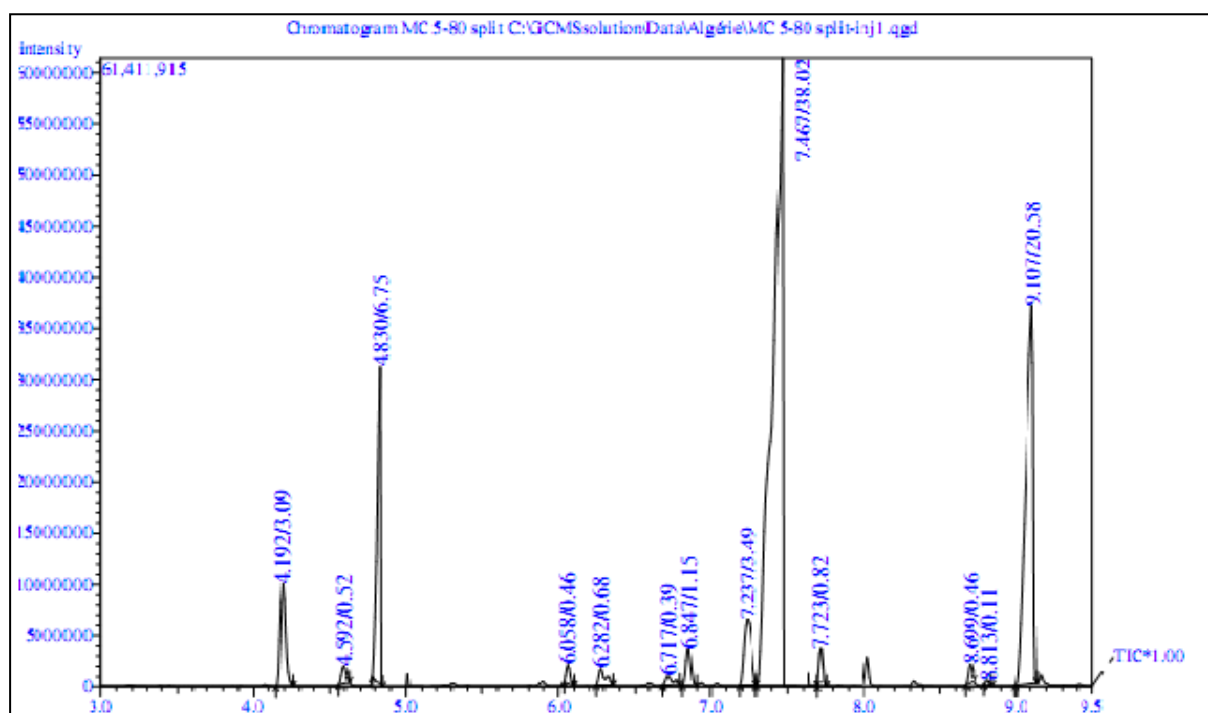


Figure n° 29: Chromatogramme de l'huile essentielle de *Myrtus communis*

Au total, 13 composés ont été identifiés ce qui correspond à un pourcentage de 92,52 % par rapport à l'ensemble des constituants isolés (tableau n°18). Le 1,8-Cineole apparaît comme le constituant majoritaire de l'HE (43,58%), suivi du formate de α -Pinene (39,02%) et de Limonene (7,75%). et qui représentent environ les trois quarts de la composition chimique totale. D'autres composés sont aussi présents avec un taux moyen comme α -Terpineol (3,49%), acétate de geranyl (3,02%), β -Myrcene (1,46%) et le Nerol (1,15%). Biochimiquement parlant, cette HE est composée essentiellement de quatre groupes de produits : les monoterpènes (α -pinene, sabinene, myrcene, camphène ...), les esters isobutyriques (Isobutylisobutyrate, les acétates de geranyl) et les alcools terpéniques (α -terpineol). L'huile est aussi caractérisée par l'absence de myrtenyl acetate.

Tableau n° 18: Composition chimique de l'huile essentielle de *Myrtus communis*

N°	Composant	Temps de rétention (min)	Indice de rétention	Pourcentage (%)
1	Acetate de geranyl	4,192	899	3,09
2	p-Cymene	4,592	936	0,52
3	Limonene	4,830	946	7,75
4	β -Myrcene	6,058	973	1,46
5	α -Murolene	6,282	991	0,68
6	δ -3-Carene	6,717	1010	0,39
7	Nerol	6,847	1020	1,15
8	α -Terpineol	7,237	1022	3,49
9	α-Pinene	7,467	1024	39,02
10	Camphene	7,723	1175	0,82
11	Isobutylisobutyrate	8,699	1185	0,46
12	Sabinene	8,813	1228	0,11
13	1,8-Cineole	9,107	1498	43,58

En Algérie, Akli *et al.*,(1998) ; Bouzabata *et al.*, (2013 et 2015) par l'examen de la composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de myrte ont trouvé aussi que l' α -Pinene (20-34), le cinéol 1,8 (15-23,2) et le linalol (3,6-10.1) est la principale composition essentielle de myrte et que cette huile se caractérise aussi par le manque d'acétate de myrtényl .D'autres recherches dans la région méditerranéenne (Satrani *et al.*, 2006 ; Wannes *et al.*,2009 ; Hassiotis et Lazari, 2010 ; Mimica-Dukie *et al.*, 2010 ; Berka-Zougali *et al.*, 2012 et Bradesi *et al.*, 2012) et par l'examen de l'huile essentielle de feuilles de myrte ont venu à cette conclusion que α -Pinene, cinéole 1,8 et Limonene sont les principaux constituants de l'huile essentielle de myrte.et même à travers le monde, les mêmes résultats ont été confirmés par (Ashnagar *et al.*, 2009; Pezhmanmehr *et al.*, 2009 ; Mirazadi *et al.*, 2011 ; Rowshan *et al.*, 2012 et Bajalan *et al.*, 2014.

III.3.2. L'huile essentielle de *Zygophyllum album*

Les résultats de l'analyse par Chromatographie gazeuse -Spectrométrie de masse de la composition chimique de l'HE sont présentés dans la figure n°30 et le tableau n°19, dans lequel les composés identifiés sont listés suivant le temps de rétention.

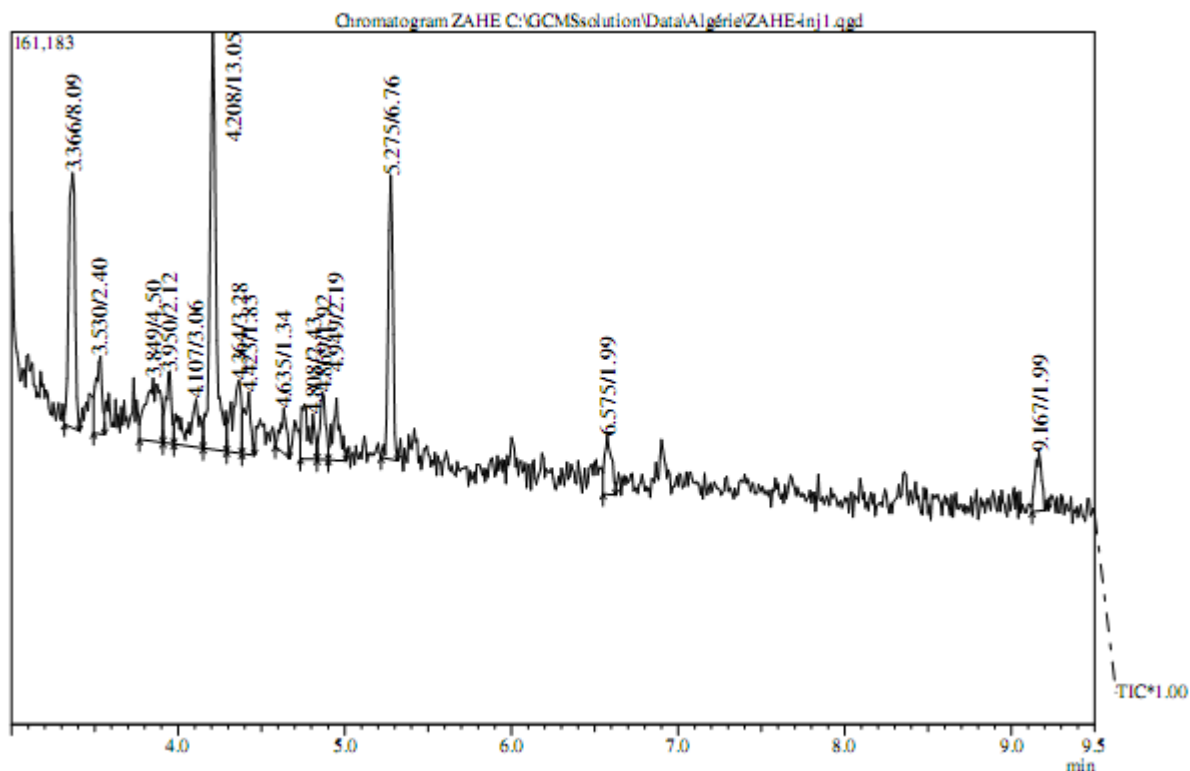


Figure n° 30: Chromatogramme de l'huile essentielle de *Zygophyllum album*

Les résultats regroupés dans le tableau n°20, montrent que 15 composés ont pu être identifiés, ce qui représente seulement 56,95 % de notre huile essentielle, cela pouvait être expliqué par le fait que *Z. album* contient plus de 60% d'eau donc il y a une forte perte diélectrique (Tigrine-Kordjani *et al.*, 2010c). Les composés majoritaires sont: Damascenone (E)- β (13.05%), Geraniol (8.09%) et le Verbenone (6.76%). La composition de l'huile essentielle de *Zygophyllum album* est marquée par la présence des composées oxygénée (plus de 58 %) et les hydrocarbones comme le cas de Caryophyllene (2,12%). Nos résultats sont comparables à ceux obtenus par KordjanI-Tigrine en 2006(b) et Akhgar *et al.*, (2015) sur la même espèce et même origine (Sahara de Ouergla) avec quelques minimes différences dans le pourcentage des composants.

Tableau n° 19: Composition chimique de l'huile essentielle de *Zygophyllum album*

N°	Composant	Temps de rétention (min)	Indice de rétention	Pourcentage (%)
1	Geraniol	3,366	1071	8,09
2	Liguloxide	3,530	1099	2,40
3	3-Nonen-2-one	3,849	1136	4,50
4	Caryophyllene (trans)	3,950	1203	2,12
5	2-Oxabicyclo [4,4,0] dec-9-ene-1,3,7,7-tetramethyl	4,107	1275	3,06
6	Damascenone (E)-β	4,208	1312	13,05
7	Eicosane	4,364	1379	3,28
8	Tricosane	4,423	1415	1,83
9	Linalool oxide-Cis	4,635	1483	1,34
10	Liguloxide	4,808	1531	2,43
11	Massoya lactone	4,869	1537	1,92
12	Isoamyl benzyl ether	4,949	1537	2,19
13	Verbenone	5,275	1657	6,76
14	β -Bisabolene	6,575	2002	1,99
15	Nonanal	9,167	2296	1,99

A titre indicatif, la composition chimique des huiles essentielles de l'espèce *Zygophyllum fabago* L. d'Ian qui de la même famille que *Z. album* (*Zygophyllaceae*), est caractérisée par les composés majoritaires : Z-lanceol acetate et geranyl valerate (20%), (E,Z)-geranyl linalool (5.2%), β -bisabolénol (4.9%), menthol (4.7%), α -cardinol (3.2%) (Mostafavi *et al.*, 2015). Cela confirme que la composition de l'huile essentielle de *Z. album* est caractérisée par un chémotype, dépendant de la partie de la plante utilisée, de son état de croissance ainsi que de la nature du sol. Il faut signaler que peu de travaux qui se sont investis dans la composition de *Z. album*, et que notre étude est la deuxième dans ce domaine en Algérie, après celle de Kordjani et ses collaborateurs menée en 2006.

IV. Résultats des analyses qualitatives et quantitatives des extraits polyphénoliques

IV.1. Analyse qualitative des extraits polyphénoliques

La mise en évidence des différentes classes des métabolites secondaires constituant une plante, nous permet d'avoir une bonne idée sur ses activités pharmacologiques. Le tableau n°20 regroupe les tests phytochimiques réalisés sur les deux plantes testées (extraits de feuilles de myrte, et extraits de la partie aérienne de *Zygodium*).

Tableau n°20: Résultats du screening Phytochimique des différents extraits de plantes

	<i>Myrtus communis</i>				<i>Zygodium album</i>			
	E.Aq	E.EtOH	E.DCM	E.MtOH	E.Aq	E.EtOH	E.DCM	E.MtOH
Alcaloïdes	+++	-	-	-	-	-	-	++
Dérivés anthracéniques libres	+	-	-	-	-	-	+	-
Anthraquinones	-	-	-	-	-	-	-	-
C-hétérosides	+	+	+	+	+	+	-	++
Anthocyanes	+++	+	+	+	-	-	+	+
Saponines	-	+++	-	-	+++	+	+	++
Tannins	+++	+	-	+	+	+	+	+
Flavonoïdes	+++	+	-	+	+	-	+	++

E.Aq : extrait aqueux ; **E.EtOH** : extrait éthanolique ; **E.DCM** : extrait dichlorométhanique ;
E. MtOH : extrait méthanolique

Ces tests sont en relation avec l'intensité du précipité et de turbidité ou la coloration est proportionnelle à la quantité de la substance recherchée. Ainsi :

- Une réaction franchement positive est représentée par : +++
- Une réaction moyennement positive est représentée par : ++
- Une réaction faiblement positive est représentée par : +
- L'absence de la substance est représenté par : -.

IV.1.1. *Myrtus communis*

Les résultats de la composition phytochimique préliminaire de différents extraits des *M. communis* par screening chimique sont repris dans le tableau 20. Dans lequel on remarque la présence de flavonoïdes, de tannins, d'alcaloïdes, de saponines (dans l'extrait éthanolique) et des anthocyanes. Par contre, les tests de recherche, de dérivés anthracéniques libres et combinés ont été minimes ou négatifs sur les échantillons.

Les résultats de l'étude de Kanoun (2011) ont montré des résultats comparables à notre étude, qui confirment que les tanins sont présents avec une intensité importante l'extrait aqueux des feuilles de *M. communis* provenant de la même région de honaine (Tlemcen). A l'exception des alcaloïdes qui sont révélées plus élevés dans notre extrait. De même les tests phytochimiques réalisés par (Baytop ,1999; Romani *et al*,1999 et Hosseinzadeh *et al.*,2011) ont montré également que les feuilles de *Myrtus communis L.* contiennent des tanins, des flavonoïdes et des huiles volatiles.

En revanche, dans les deux extraits restants (méthanolique et dichlorométhanique), la présence des principaux groupements chimiques était faible ,cela est confirmé par les travaux de (Hyder *et al.*,2004 et Chaouch, 2010).

La présence marquée des saponines dans l'extrait éthanolique de *M. communis* à la différence des autres extraits, pourrait être expliquée par l'extrême sensibilité de ces derniers à la chaleur, et que seul l'extrait éthanolique était préparé par macération à froid, les mêmes résultats sont trouvés dans l'étude de (Tatsuya *et al.*, 2008).

IV.1.2. *Zygophyllum album*

L'évaluation préliminaire de la composition phytochimique des extraits la partie aérienne de *Z. album* a donné des résultats résumés dans le tableau n°20 où plusieurs familles de composés phénoliques sont présentes. En effet, ces résultats montrent que l'extrait méthanolique de la plante est très riche en saponosides, hétéroside, anthocyanes et flavonoides, On note également la présence de faible quantité de tanins, et des alcaloïdes. Des résultats similaires ont été trouvés dans les études de (Ayad, 2008 et Boumaza, 2009) sur les métabolites secondaires de l'extrait méthanolique de *Zygophyllum cornutum* *ross* .

Les travaux de Ksouri *et al.*, en 2013 ont pu démontré l'absence des dérivés anthracéniques libres, et les anthraquinones dans l'espèce de *Z. album*, ce qui est en accord avec nos résultats. Par contre la présence des flavonoïdes dans les plantes testées est plus faible par rapport à celle retrouvée dans les travaux de Hussein *et al.* ,(2011) sur une même espèce en provenance d'Egypte.

D'une manière générale, l'extraction est une étape très importante avant l'analyse quantitative et qualitative proprement dite. Elle est influencée par la méthode d'extraction choisie en fonction des composés phytochimiques à étudier. D'autres facteurs, comme le pH, la température, le rapport quantité de matière au volume du solvant, les intervalles de temps, le nombre et les étapes d'extractions individuelles, jouent également un rôle important dans la variation de quantification des composés.

IV.2. Analyses quantitatives des différents extraits polyphénoliques

Les composés phénoliques végétaux, les tanins et les flavonoïdes représentent les principaux groupes de constituants de plantes qui sont principalement de puissants antioxydants ou piègeurs de radicaux libres. Ils jouent rôle bénéfique dans la santé humaine et la guérison, ils préviennent les maladies telles que les troubles inflammatoires, le cancer, les maladies cardiovasculaires et le diabète qui se produisent en raison de la déréglementation du libre génération de radicaux dans les cellules (Middleton *et al.*, 2000 et Chouhan et Singh, 2011).

Tableau n°21: Dosage des polyphénols dans les extraits phénoliques de *Myrtus communis* et *Zygophyllum album*.

polyphénols Extraits		Polyphénols totaux ((mg GAE/g PS) ^a	Flavonoïdes totaux (mg EC/g PS) ^b	Tannins condensés (mg EC/g PS) ^c	Anthocyan es (mg Cg E/ g dM) ^d
Z.album	Aqueux	10,83±0,601	1,06±0,102	1,403±0,2	/
	DCM	5,59±0,18	1,586±0,52	1,98±0,1	0,08±0,15
	MeOH	6,766±0,628	1,610±0,020	4,349±0,569	1,80±0,01
	EtOH	6,11±0,54	0,34±0,35	1,86±0,32	0,04±0,06
M. communis	Aqueux	121,23±0,77	7,256±0,57	18,78±0,86	11,79±0,30
	DCM	92,58±0,1	5,51±0,28	0,325±0,31	1,3±0,03
	MeOH	200,41±1,28	22,423±0,12	18,86±0,23	1,06±0,1
	EtOH	143,45±1,23	8,50±0,342	5,67±0,65	1,4±0,52

^a: mg acid galique equivalent/g poids sec. ^{b, c}:mg catechine equivalent/g poids sec. ^d:mg E cyanidine-3 glucose/ g poids sec (toutes les valeurs sont la moyenne de trois répétitions±écart type.

Le tableau n°21 présente le taux des composés phénoliques, des flavonoïdes totaux, des tannins et des anthocyanes contenus dans les différents extraits de *Z. album* et *M. communis*. Le taux des polyphénols totaux ainsi a été déterminés en équivalents gallique d'acide en milligrammes par gramme de matière sèche (mg GAE / g) tandis que le taux des flavonoïdes totaux et des tannins condensés ont été calculés en équivalents de catéchine en milligrammes par gramme matière sèche (mg CE / g), alors pour le dosage des anthocyanes, les resultants sont exprimés en mg d'équivalent de cyandine 3-gluse par g de matière sèche (mg Cg/ g dM).

Les résultats obtenus dans la présente étude a révélé que le niveau de ces composés phénoliques dans les diverses plantes extraits était intéressant.

IV.2.1. *Myrtus communis*

Les résultats des analyses quantitatives en composés phénoliques des extraits des feuilles de *M. communis* (tableau n°21) nous indiquent que les extraits des feuilles de *M. communis* étudiés sont majoritairement constitués des flavonoïdes et des polyphénols totaux. Sa composition en tanins condensés et en anthocyanines est très faible (PPT > FVT > TC > ATT).

Les teneurs en phénols totaux ont varié entre les différents extraits; l'extrait méthanolique et aqueux présentaient les valeurs les plus élevées (200, 41±1,28 et 121,23±0,77 mg GAE/g) respectivement, et cela pourrait être dû à différents degrés de polarité des solvants utilisés pour l'extraction des composés polyphénoliques. Ces résultats sont corroborés par les études de (Smain *et al.*, et Kanoun, 2011) sur des extraits aqueux des feuilles de Myrte du nord de l'Algérie avec des taux de (119,23 ± 0,77 et 117 mg GAE/g). par contre des taux plus élevés ont été trouvés par Bouaziz *et al.*, (2015a) et (Nassar *et al.*, 2010) sur les différentes fractions de cette plante à partir de différents régions agro-climatiques.

Des études réalisées par Gravot, *et al.*, (2008) et Wannes *et al.*, (2010) indiquent des teneurs en phénols totaux plus faibles dans les feuilles de Myrtus en provenance d'Italie et du Portugal.

Pour le dosage des flavonoides, tannins et anthocyanes, l'extrait aqueux de *M. communis* s'est révélé le plus riche (7,256±0,57; 18,78±0,86 mg EC/g et 11,79±0,30 mg CgE/g) suivi de l'extrait méthanolique par contre l'extrait dichlorométhanique possédait des teneurs minimales en polyphénols (5,51±0,28; 0,325±0,31 mg EC/g et 1,3±0,03 mg CgE/g) ce qui peut être expliqué par sa polarité qui peut extraire seulement des composés apolaires avec des traces de polyphénols (Bouaziz, 2015b). Des études entreprises par (Pereira *et al.*, 2012 et Touaibia et Chaouch, 2013) corroborent nos résultats.

IV.2.2. *Zygophyllum album*

D'après les résultats obtenus dans le tableau n°21 ,on constate une nette différence en taux de polyphénols par rapport à l'espèce *M. communis* ,mais cela n'empêche de remarquer que le taux le plus élevé en polyphénols est enregistré dans l'extrait aqueux et méthanolique ($10,83 \pm 0,601$, $6,766 \pm 0,628$ mg GAE/g), ces résultats sont comparables à ceux trouvés par (Benhamou,2011 et 2009) pour l'extrait aqueux et (Ksouri *et al.*, 2013) pour l'extrait méthanolique, mais les deux restent nettement supérieurs aux résultats trouvés par Belguidoum (2012) sur la même espèce provenant de la même région qui est Sahara de Ouergla.

Pour les flavonoïdes, tannins et anthocyanes, les valeurs obtenues sont généralement faibles, mais en comparant avec d'autres études, on constate que nos résultats sont supérieurs à ceux enregistrés par Belguidoum (2012) et plus au moins proches des valeurs enregistrées par Shehab *et al.*,(2015) sur des extraits éthanoliques et méthanolique de *Z. hamiense* en provenance du sahara de Muhaisnah à Dubai.

Toutefois, il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la bibliographie, car plusieurs facteurs peuvent influencer sur la répartition qualitative et quantitative des composés phénoliques dans nos extraits, essentiellement les facteurs climatiques et environnementaux: la zone géographique, sécheresse, sol. .etc (Ebrahimi *et al.*, 2008) ainsi que la période de récolte, le stade du développement et la partie de la plante utilisée (Miliauskas *et al.*,2004), de plus, la méthode d'extraction et de quantification. La sélectivité du solvant utilisée peuvent également influencer sur la teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux (Lee *et al.*, 2003).

IV.3. Analyses chromatographiques des extraits polyphénoliques

IV.3.1. Analyses chromatographiques sur couche mince (CCM)

Le tableau n°22 en indique le nombre, la couleur et le Rf des taches de chaque extrait pour chaque système, et ceux des étalons. Sachant que seuls les systèmes CAA et DCM/MeOH (v/v) (25/75) ont montré une bonne séparation,

Tableau n° 22: Les rapports frontaux (Rf) des composés phénoliques des différents extraits de plantes séparés par deux systèmes de solvants.

Extrait	Plante	Système de solvant	Nombre de taches	Valeur de Rf	Fluorescence (254nm)	
E. DCM	MC	CAA	/	/	/	
		DCM/Met	1	0,82	Violet	
	ZA	CAA	/	/	/	
		DCM/Met	/	/	/	
E.MeOH	MC	CAA	2	0,30 0,67	Marron Violet	
		DCM/Met	1	0,89	Violet	
		ZA	CAA	2	0,30 0,59	Marron Violet
		DCM/Met	2	0,82 0,75	Bleu Jaune	
	E. Aq	MC	CAA	4	0,30 0,59 0,67 0,66	Violet Violet Violet Violet
			DCM/Met	2	0,81 0,87	Rose Bleu
ZA			CAA	1	0,30	Marron
			DCM/Met	1	0,89	Violet
E.EtOH		MC	CAA	1	0,71	Violet
			DCM/Met	2	0,75 0,78	Jaune Mauve
	ZA		CAA	1	0,30	Marron
		DCM/Met	1	0,75	Jaune	

(CAA : Chloroforme/Acétate d'éthyle/Acide formique (v/v/v) :50/40/10, DCM/MeOH (v/v) :25/75).

Tableau n°23 : Rapports frontaux des étalons utilisés pour les deux systèmes.

		Acide gallique	Acide tannique (Zedde, 2009)	Acide caféique (Kebbab, 2014)	Catéchine	Quercetine (Zedde, 2009)
Rf	CAA	0,30	0	0,67	0,59	0,59
	DCM/MeOH	0,75	0,89	/	0,66	0,81

L'identification des composés phénoliques de nos plantes et à l'aide de quelques témoins utilisés, nous a permis de mettre en évidence la présence de l'acide gallique qui est un acide phénol dans les extraits aqueux et méthanolique des deux plantes (tableau 22) comme nous avons identifié aussi la présence de la catéchine, et Anthocyanidine 3,5-diglycosides seulement dans l'extrait aqueux de *Myrtus communis* d'après les suggestion des classes de flavonoïdes proposées par (Markham, 1982 et Riov et Gottlieb ,2006).

En effet, les chromatogrammes visualisés sous UV à 254 nm présentent des taches colorées en : violet, marron, bleu, rouge, gris, orange, qui peuvent correspondre à plusieurs classe de métabolites secondaire : bleu ou violet-gris à Rf moyen (stéroïde), rouge brique ou orange à Rf faibles (triterpène de type lupane), jaunâtres a Rf faibles (chalcon), marron à Rf élevé flavone), violette foncé (flavonone), bleu à bleu vert avec des Rf élevés (coumarines) (Chaaib, 2004).

Nous avons remarqué en particulier que certains flavonoïdes étaient très répandus chez les plantes étudiées comme les flavones et les flavonols par la présence abondante des taches mauves avec des rapports frontaux allant de (0,81-0,89) pour système 1 et (0,60-0,71) pour système 2. En effet, ces molécules pouvaient être présentes sous différentes formes (aglycones ou avec substitutions), soit chacune dans une plante, soit plusieurs formes dans la même plante (Markham, 1982 et Zedde, 2009).

Par contre, on a pu rien détecté dans les deux systèmes, pour l'extrait dichlorométhanique des deux plantes, cela est dû peut être au caractère apolaire du solvant (Lee *et al.*, 2003).

A titre comparatif, les extraits polyphénoliques de *M. communis* sont plus riches en composés phénoliques que ceux de *Z. album* par la détection de 13 spots dans les deux systèmes contre (8spots), ces résultats ont été confirmés en amont par le screening phytochimique et le dosage des polyphénols.

Des analyses similaires par chromatographie, spectrophotométrie et spectrofluorométrie réalisées par Diaz et Abeger (1987) des composés phénoliques simples et principalement les flavonoïdes et les acides phénoliques contenus dans les feuilles du Myrte, ont permis d'identifier les acides éllagique et gallique, la quercétine et la patulétine.

Une autre étude réalisée par Houssein *et al.*, (2011) a permis d'identifier l'acide gallique et la quercétine dans deux espèces de zygophyllaceae notamment *Z. album*.

En se basant sur les résultats préliminaires du criblage phytochimique, du dosage des polyphénols et de la CCM, on a pu sélectionner des extraits polyphénoliques qui sont qualitativement et quantitativement riche en polyphénols qualitativement et quantitativement il s'agit de l'extrait aqueux pour *M. communis* et de l'extrait méthanolique pour *Z. album*, pour la suite de l'étude consacrée à l'application thérapeutique.

IV.3.2. Analyse chromatographique des extraits polyphénoliques par LC-MS

La comparaison des pics et des m/z obtenus lors de l'analyse LC-MS (ESI) (tableau n° 24) et (figure n° 32) en mode positif et négatif des deux extraits polyphénoliques avec ceux des études antérieures, nous a permis d'identifier quelques composés. L'évaluation des effets biologiques de ces composés phénoliques, est décrite dans les chapitres suivants.

 Extrait aqueux de *Myrtus communis*

La figure qui suit représente le chromatogramme de l'extrait aqueux de Myrte par LC-MS

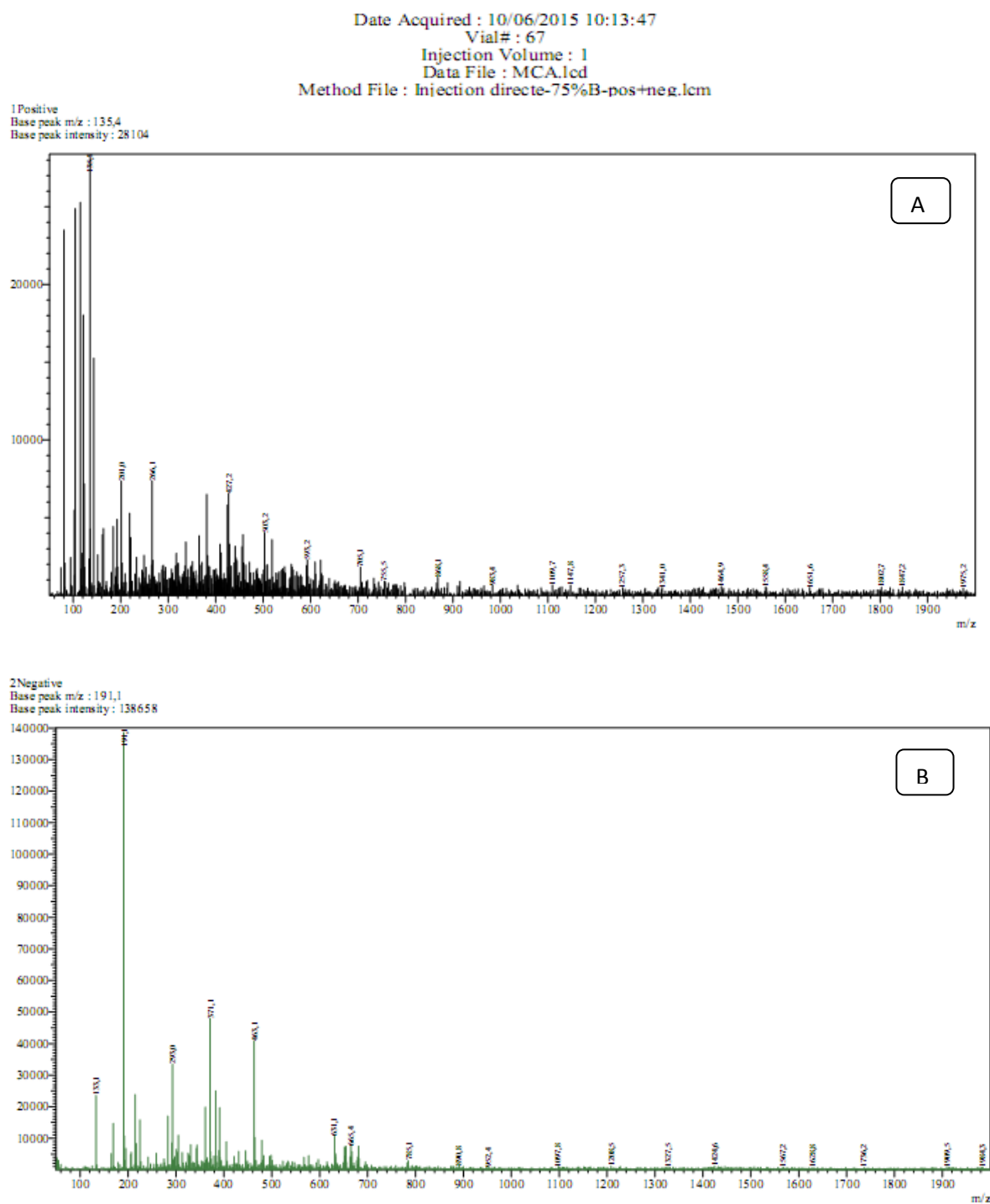


Figure n° 32: Spectres de LC-MS-ESI de l'extrait aqueux de *M. communis* (A :ESI+ ;B :ESI)

Les caractéristiques chromatographiques des principaux composés détectés et les hypothèses structurales issues d'elles sont représentées dans le tableau n°24.

Tableau n°24 : Identification par LC/MS des composés phénoliques de *M. communis*

Pic	m/z	Ions	Tentative d'identification	Formule	Référence
1	133,1	[M-H] ⁻	Acide malique	C ₄ H ₅ O ₅	(Piras <i>et al.</i> , 2009 et Taamalli <i>et al.</i> ,2014)
2	135,4	[M-H] ⁺	Acide syringique	C ₇ H ₆ O ₃	(Wannes <i>et al.</i> , 2010)
3	196,1	[M-H] ⁻	Acide ferullique	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	(Wannes <i>et al.</i> , 2010)
4	201,0	[M-H] ⁺	N.I	/	/
5	266,1	[M-H] ⁺	N.I	/	/
6	299,0	[M-H] ⁻	Acide Ellagique et /ou dérivés	C ₁₄ H ₆ O ₈	(Barboni <i>et al.</i> , 2010)
7	301,2	[M-H] ⁺	peonidin-3-O-glucoside	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁	(Montoro <i>et al.</i> , 2006)
8	371,1	[M-H] ⁻	Dérivés de galloyl	/	(Taamalli <i>et al.</i> , 2014)
9	427,2	[M-H] ⁺	N.I	/	/
10	464,1	[M-H] ⁻	Myricetin-3-O-rhamnoside	C ₂₄ H ₂₀ O ₁₂	(Romani <i>et al.</i> , 1999 ;Perkins <i>et al.</i> ,2005et Bouaziz <i>et al.</i> ,2015)
11	503,2	[M-H] ⁺	Quercetin-3-O-rutinoside/ acide oleanolique et ses isomères (cad acide ursolique et ses dérivés)	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	(Barboni <i>et al.</i> , 2010 et Wannes <i>et al.</i> ,2010)
12	593,2	[M-H] ⁺	N.I	/	/
13	631,1	[M-H] ⁻	N.I		
14	665,4	[M-H] ⁻	N.I		
15	785,1	[M-H] ⁻	N.I		
16	890,8	[M-H] ⁻	N.I		
17	952,4	[M-H] ⁻	Trigalloyl-HHDP-glucose	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₇	(Kabran ,2014)
18	1701,2	[M-H] ⁻	Gallotannins	C ₇₆ H ₅₂ O ₄₆	(Wannes <i>et al.</i> , 2010)

Grace à la LC-MS, 10 composés ont été identifiés dont 05 acides phénoliques (1, 2, 3, 6 et 11), trois flavonols glucoside (7, 10, 11) et deux tannins (17-18). Les principales composantes de ces trois groupes identifiés sont : Myricetin-3-O-rhamnoside (10) avec m/z $[M-H]^-$ de 464,1, ce composé en particulier semble être typique pour la famille des Myrtaceae (Romani *et al.*, 1999 ; Perkins *et al.*, 2005 et Bouaziz *et al.*, 2015). La peonidine-3-O-glucoside (7) m/z $[M-H]^+$ 301,2 est en accord avec l'étude de (MONTORO *et al.*, 2006) et Quercetin-3-O-rutinoside (11) avec m/z $[M-H]^+$ 503,2 qui a été déjà identifiée dans les feuilles de *M. communis* (Barboni *et al.*, 2010 et Wannes *et al.*, 2010) ceci est pour les flavonols glucoside. Les acides phénoliques sont représentés par L'acide malique (1), Syringique (2) férulique (3), éllagique (6) et oleanolique (11) et qui sont tous rapportés par l'étude de Piras *et al.*, (2009) ; de Taamalli *et al.*, (2014) et de Wannes *et al.*, (2010). Les tannins hydrolysables sont représentés le pic 17 et 18 en $[M-H]^-$ au nombre desquels se distinguent les gallotannins m/z $[M-H]^-$ de 1701,2 identifiés par Wannes (2014). Le Trigalloyl-HHDP-glucose avec m/z $[M-H]^-$ de 954,4 est tentativement identifié pour la première fois suite aux indications de Kabran (2014).

En général, la composition des extraits peut significativement varier, en fonction de la partie de la plante utilisée pour l'extraction, plusieurs études ont montré que les extraits des feuilles de myrte contiennent significativement la plus grande quantité de composés phénoliques totaux que les extraits de baies (Tuberoso *et al.*, 2010 ; Hayder *et al.*, 2008 ; Montoro *et al.*, 2006 ; Piras *et al.*, 2009 ; Romani *et al.*, 2004 et Amensour *et al.*, 2009).

Extrait méthanolique de *Zygophyllum album*

Le chromatogramme suivant est celui de l'extrait méthanolique de *Z.album* réalisé par LC.MS

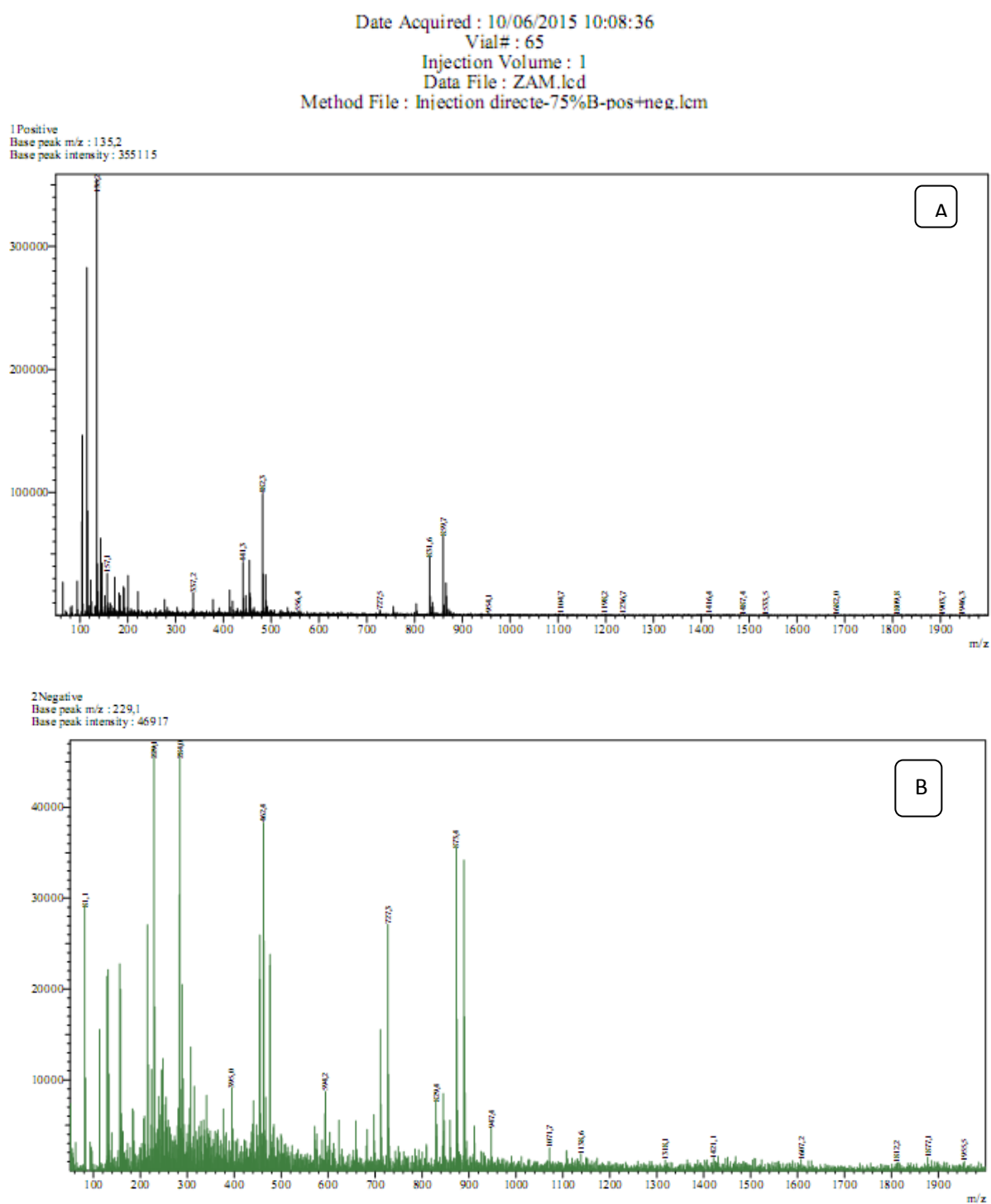


Figure n° 33: Spectres de LC-MS-ESI de l'extrait méthanolique de *Z.album*

(A :ESI+ ;B :ESI-)

Tableau n° 25: Identification par LC/MS des composés phénoliques de *Z. album*.

Pic	m/z	Ions	Tentative d'identification	Formule	Référence
1	135,2	[M+H] ⁺	N.I	/	
2	157,1	[M+H] ⁺	Gentisic acid 5-O-a-rhamnopyranoside	C ₇ H ₉ O ₄	(Shehab <i>et al.</i> , 2015)
3	229,1	[M-H] ⁻	Tomentosine	C ₁₀ H ₁₄ O	(Quacem, 2015)
4	284,0	[M-H] ⁻	N.I		
5	337,2	[M+H] ⁺	N.I	/	
6	380,8	[M-H] ⁻	Quercetin 3-sulfate	C ₁₅ H ₁₀ O ₁₀ S	(Saleh et El-Hadidi, 1977)
7	441,3	[M+H] ⁺	N.I	/	
8	462,4	[M-H] ⁻	Quinovic acid 3-O-rhamnoside	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	(Duke, 2009 et Hassaeen <i>et al.</i> , 1993)
9	482,4	[M+H] ⁺	Malvidin 3-rhamnoside	C ₂₃ H ₂₅ O ₁₁	(Ksouri <i>et al.</i> , 2013)
10	594,2	[M-H] ⁻	kaempferol 3-O-rutinoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	(Hassaeen et Desoky, 1992)
11	623,3	[M-H] ⁻	Isorhamnetin-3-O-rutinoside	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	(Hussein <i>et al.</i> , 2011)
12	809,4	[M-H] ⁻	3-O-[Glucuronic acid pyranosyl]-29-hydroxyoleanolic acid-28-o-[β-D-glucopyranosyl] ester (Zygophyloside K)	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₅	(Ksouri <i>et al.</i> , 2013)
13	831,6	[M+H] ⁺	N.I	/	
14	859,7	[M+H] ⁺	N.I	/	
15	873,4	[M-H] ⁻	3-O-[β-D-2-O-Sulphonylquinosyl]-quinovic acid-27-O-[β-D-glycopyranosyl] ester (Zygophiliside F)	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₇ S	Hassaeen <i>et al.</i> , 1993 et Ksouri <i>et al.</i> , 2013)
16	947,4	[M-H] ⁻	N.I	/	/

Au total 09 composés ont été identifiés y compris les saponines triterpénoïdes, les flavonoïdes et les stérols (tableau n°25). Trois flavonoïdes étaient identifiés de la partie aérienne de *Z. album* notamment : Isorhamnetine-3-O-rutinoside (11), Malvidine 3-rhamnoside (9), Quercitine-3-sulphate (6) et kaempferol 3-O-rutinoside (10), le spectre de masse à ions négatif exposait $[M-H]^-$ à m/z 623,3 ce qui permet de proposer la formule chimique $C_{28}H_{32}O_{16}$. Isorhamnetine-3-O-rutinoside est l'un des principaux composés phénoliques dans cette espèce, Il correspond à celle préalablement isolée de l'espèce égyptienne de *Z. l'album*. Ce composé semble être un marqueur chimio-taxonomique dans le genre de *Zygophyllum* (Hussein *et al.*, 2011).

Les composé flavonoïque (9) (m/z 482,4 $C_{23}H_{25}O_{11}$) est provisoirement déterminée dans cette espèce pour la deuxième fois après l'étude de KSOURI *et al.*, en 2013. pour les deux autres qui restent (6) et (10), ils étaient déjà identifiés et décrits plusieurs fois par SALEH and EL-HADIDI (1977) et HASSANEAN et DESOKY (1992) ; Par ailleurs, deux saponines triterpénoïdes composés (12 et 15) avec ions $[M-H]^-$ à m/z 809,4 ($C_{42}H_{66}O_{15}$), 873,4 ($C_{42}H_{66}O_{17}S$) étaient respectivement identifiés dans cette espèce, Zygophyloside K (12) et a été préalablement isolé et décrit à partir *Z. album* et *decumbens* (Pöllmann *et al.*, 1997 ; Hussein *et al.*, 2011 et Ksouri *et al.*, 2013). Zygophyloside F (15) était précédemment décrit par Hassaeen *et al.*, (1993) ; Elgamal *et al.*, (1995) et Ksouri *et al.*, (2013).

PARTIE 02 : Résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante

I. La technique ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

I.1. Extraits polyphénoliques

Selon les résultats obtenus, parmi les trois concentrations utilisées, seule la concentration (1/50) 50µg/ml couvrait une bonne activité antioxydante de la fluorescine pour les deux extraits ZAE et MCE.

La figure n°32 montre les courbes de décroissance de fluorescence FL en présence de l'extrait méthanolique de *Z. album* (ZAE) et l'extrait aqueux de *M. communis* (MCE) et l'AAPH. La relation linéaire entre la surface nette et la concentration en antioxydants a été calculée en utilisant Trolox C et l'extrait phénolique à différentes concentrations. L'analyse des régressions vers la réponse linéaire entre la concentration en extrait méthanolique et l'AUC net sont représentés en figure n°35.

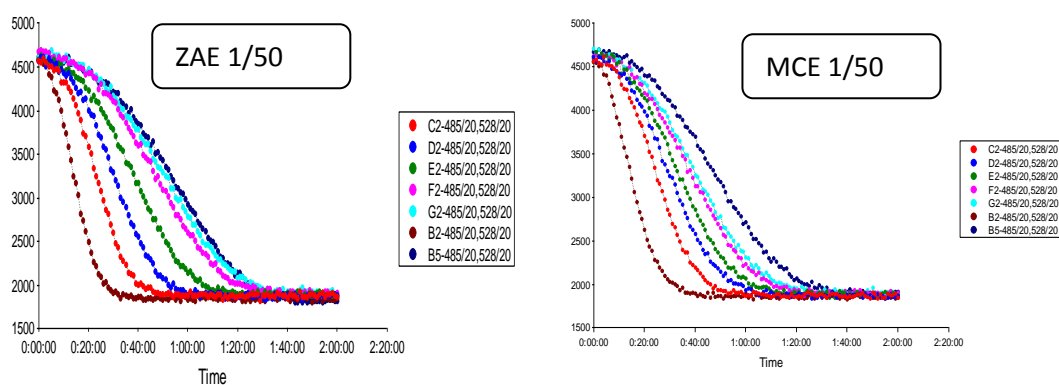


Figure n° 34: Intensité de fluorescence induite par AAPH en présence des extraits de *Z. album* et *M. communis* à différentes concentrations

(C :5µl,D :10µl,E :15µl,F :20µl,G :25µl,B :30µl,B5 :Blanc)

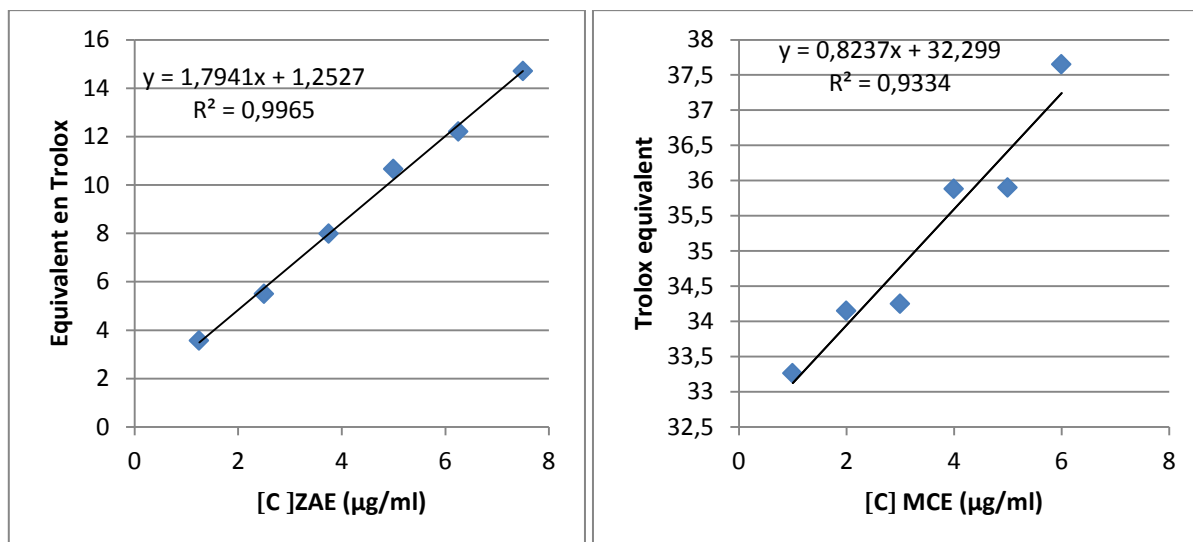


Figure n° 35: Relation linéaire entre les concentrations des extraits phénoliques et le Trolox

A partir des 02 figures précédentes, on peut déduire que les deux extraits présentaient une activité antioxydante remarquable néanmoins l'extrait aqueux de *M. communis* reste plus actif que l'extrait méthanolique de *Z. album* avec des valeurs ORAC de $1,21 \pm 0,07 \mu\text{mol ET/mg}$ et $0,55 \pm 0,01 \mu\text{mol ET/mg}$ respectivement, tableau n°26. Même si la valeur de R^2 (MCE)= 0,821 est pas aussi remarquable que celle trouvée précédemment, mais elle est toujours supérieure à la valeur de 0,75, ce qui indique une bonne relation entre le groupe expérimental et les valeurs prédites par le modèle.

Ces résultats démontrent clairement l'influence du solvant sur l'extractibilité des composés antioxydants, puisque l'extrait aqueux est plus polaire que le méthanol mais ça n'empêche que les antioxydants des deux plantes sont principalement polaires.

En effet, l'extraction des antioxydants, y compris des composés phénoliques par différents solvants organiques a été rapporté précédemment par Trabelsi *et al.*, (2010).

Très peu de travaux ont été réalisés sur l'étude des propriétés antioxydantes avec la méthode ORAC des plantes choisies. D'après nos connaissances et à ce jour, il y a que très peu de travaux qui reportent l'évaluation de l'activité antioxydante des plantes, Une de ces études est menée par Peirera *et al.* (2013) sur l'extrait phénolique des feuilles de *M. communis* dont les résultats sont moins fiables que les nôtres avec (ORAC=0,21 $\mu\text{mol ET/g}$ d'extrait).

Une deuxième étude a été réalisée sur l'extrait méthanolique de *Z. album* par méthode ORAC, cet extrait présentait le meilleur effet par rapport à d'autres extraits dichlorométhanique et hexanique avec (ORAC=1,19 $\mu\text{mol ET/g}$) (Ksouri *et al.*, 2013). Ce qui reste supérieure à nos résultats aussi.

A titre comparatif, Falleh *et al.*, (2011) affichaient que procyanidines et propylarigonidines (composés phénoliques) responsables de la forte activité antiradicalaire et antioxydante du halophyte comestible *Mesembry anthemum* L. été présent dans les fractions les plus polaires, qui ont été obtenus en utilisant 20% et 40% de méthanol aqueux.

Il a été démontré, que les flavonoïdes, caroténoïdes et des triterpènes (comme le cas de nos extraits, résultats LC-MS) peuvent inhiber la prolifération de cellules cancéreuses *in vitro* et présentent une activité anti-oxydante en piégeant les espèces réactives de l'oxygène, qui empêchent les dommages potentiels aux composants cellulaires tels que l'ADN, des protéines et des lipides (Dufour *et al.*, 2007 et Oueslati *et al.*, 2012).

Tableau n°26 : l'Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) des différents extraits

Extraits	ZAE	MCE	ZAH	MCH
Indice ORAC ($\mu\text{mol ET/g d'extract}$)	0,55	1,21	0,56	0,08

I.2.Huiles essentielles

Les différents résultats exprimant l'activité antioxydante par la méthode ORAC sont illustrés dans les figures qui suivent :

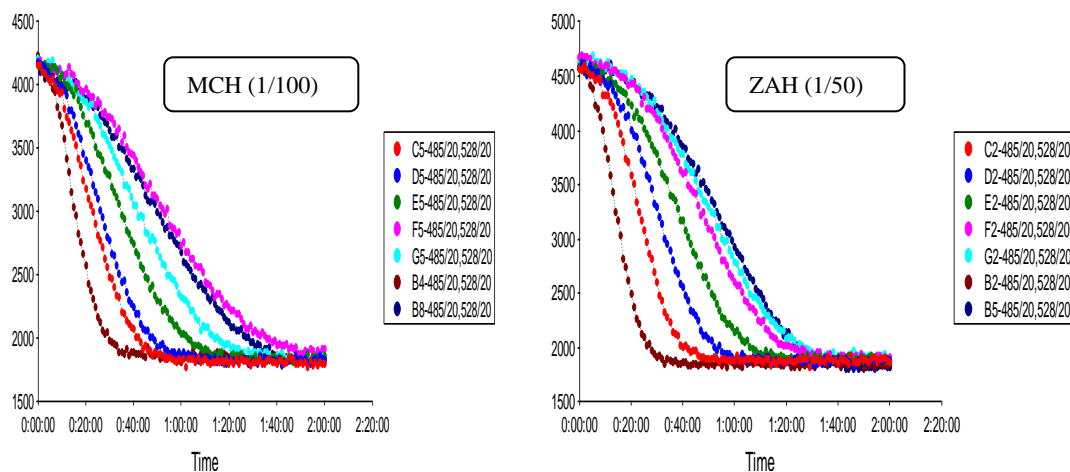


Figure n°36 : Intensité de fluorescence induite par AAPH en présence des huiles essentielles de *Z. album* et *M. communis* à différentes

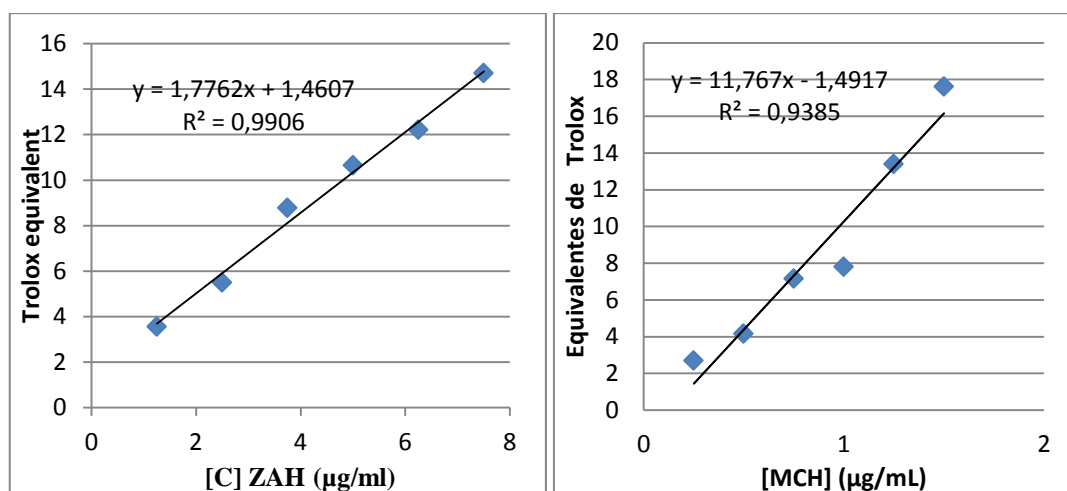


Figure n° 37: Relation linéaire entre les concentrations des huiles essentielles et le Trolox

A la lumière de ces résultats, nous pouvons constater une activité antioxydante moyenne à bonne des huiles essentielles, mais contrairement aux composés phénoliques de *Z. album* qui présente un meilleur effet par rapport à *M. communis*, avec une concentration de 10 µg /ml de ZAH de 0,55 µmol ET/g pour une concentration de 50 µg/ml de MCH de 0,08 µmol ET/g respectivement, notons que la relation entre le groupe expérimental et les valeurs prédites par le modèle est plus précise avec ZAH ($R^2=0,99$) qu'avec MCH ($R^2=0,93$).

Cette différence peut être attribuée à la composition des deux huiles. En effet une étude menée par Juliani et Simon en 2002, affirme l'effet de la caryophyllène sur l'activité antioxydante des huiles essentielles du basilic et de l'origan via ABTS, méthode dont l'expression des résultats est par (TEAC, Trolox equivalent antioxidant activity). ceci est un des composés majoritaires de l'huile essentielle de *Z. album*. La même étude reflète aussi l'effet anti-radicalaire de α -Pinène, et 1-8 Cineole, qui sont des constituants de l'huile essentielle de *M. communis*.

II. Résultats de l'activité antioxydante de DPPH

II.1. Extraits polyphénoliques

Les pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH par les différents extraits sont portés sur les figures n°38.

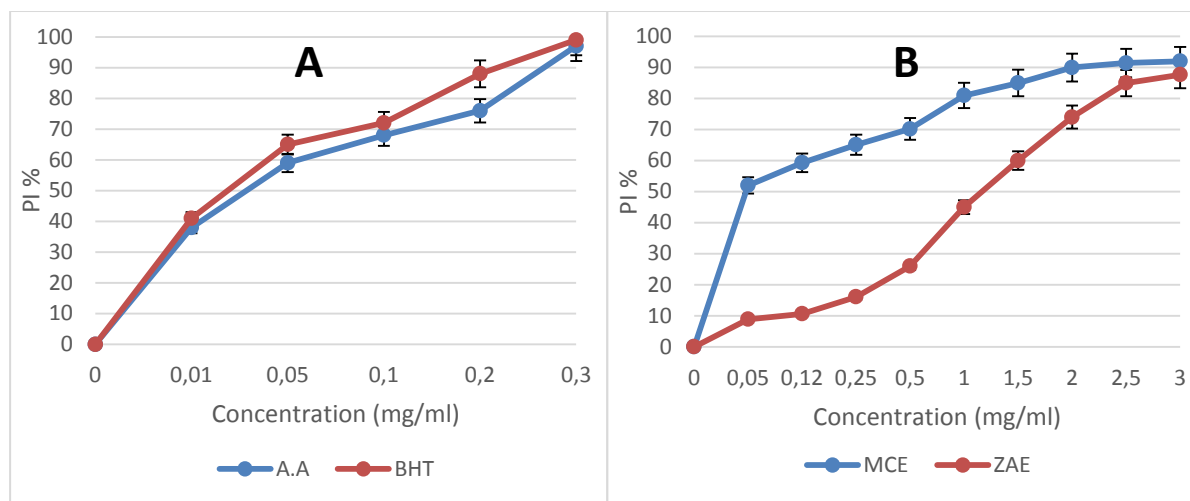


Figure n° 38: Pourcentage d'inhibition de DPPH (A : par l'acide ascorbique et le BHT (antioxydants synthétiques), B: par les extraits polyphénoliques de *M. communis* et *Z. album*)

D'après ces résultats, on remarque que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente significativement ($p \leq 0,05$) avec l'augmentation de la concentration. Les taux d'inhibition du DPPH enregistrés en présence des différents extraits de la plante sont inférieurs à ceux de l'acide ascorbique et du BHT.

L'extrait aqueux de *M. communis* (MCE) semble avoir une activité antioxydante meilleure que celle provoquée par l'extrait méthanolique de *Z. album* (ZAE). Cela est probablement lié à la complexité de l'extrait aqueux brut en substances polyphénoliques y compris les tanins et les flavonoïdes et la synergie entre eux pour une meilleure activité antioxydante (Vermerris et Nicholson, 2006).

Evaluation de l'IC 50

IC50 est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est élevée (Pokorny *et al*, 2001). La concentration de l'échantillon nécessaire pour inhiber 50% du DPPH radicalaire, a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibition calculés en fonction de différentes concentrations d'extraits préparés.

L'ensemble des extraits révèle des propriétés antiradicalaires intéressantes notamment l'extrait brut méthanolique, qui se manifeste par des faibles valeurs d'IC₅₀. Les IC₅₀ des extraits analysés sont indiquées dans la figure n° 39.

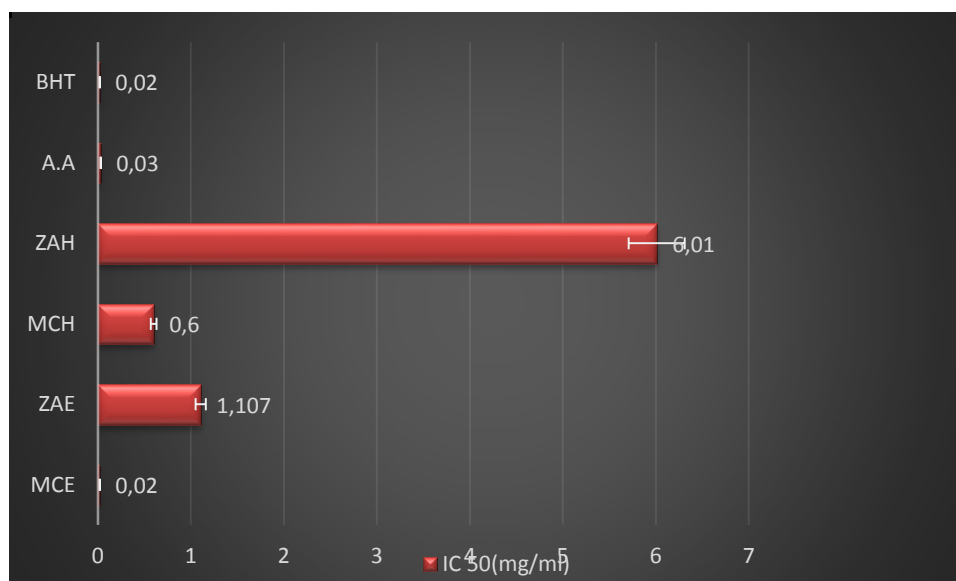


Figure n° 39: IC₅₀ des différents extraits de *M. communis* et *Z. album* en mg/ml.

D'après ces résultats, nous remarquons les valeurs des IC₅₀ des extraits s'échelonnent entre $0,029 \pm 0,01$ mg/ml pour MCE, et $1,10 \pm 0,1$ mg/ml pour ZAE. Un fort pouvoir antiradicalaire est noté pour l'extrait aqueux de *M. communis* se traduisant par un IC₅₀ assez bas, très proche même à ceux des composés standards l'acide ascorbique et le BHT. Les extraits peuvent être classés par ordre décroissant du pouvoir anti-radicalaire, comme suit : BHT > Extrait aqueux *M. communis* > Acide ascorbique > Extrait méthanolique *Z. album*. Ceci est en parfaite concordance avec les résultats de Bouaziz *et al.*, (2015), obtenus à partir de l'extrait aqueux des feuilles *Myrtus communis* d'Algérie qui a montré une activité antioxydante élevée aussi avec une valeur d'IC₅₀ de l'ordre de 0,02 mg/ml. Contrairement, les travaux réalisés par Amensour *et al.*, (2010) affirment que l'extrait aqueux des feuilles de myrte est moins actif que l'extrait méthanolique de la même espèce. et que les extraits des feuilles de *M. communis* présentent la meilleure activité antioxydante en général.

Dans cette méthode, la décoloration du DPPH en présence de l'antioxydante est réalisée en acceptant un électron ou un atome d'hydrogène cédé par un composé antioxydant (Apostolou *et al.*, 2013). Ainsi, la forte capacité d'élimination de l'extrait de *M. communis* est peut-être dû à la capacité d'hydrogène / donneur d'électrons des composés polyphénoliques présents dans cet extrait, ce qui les dotent d'un bon antioxydant agissant comme inhibiteur des radicaux libres.

Dans deux autres études entreprises par (Benhamou, 2011 et Belguidoum *et al.*, 2015) sur le piégeage du DPPH ou l'effet scavenger de l'extrait méthanolique de *Z. album* du sahara Algerienne. L'extrait a donné une très faible activité antioxydante par rapport à celle retrouvée dans notre étude avec des IC50 plus élevées (29,48 et 8,76 mg/ml) respectivement. A l'opposé, un puissant effet scavenger estimé à partir d'un IC50 de 0,03 et 0,05 mg/ml de l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *Z. album* provenant de la Tunisie et du sahara de Dubai respectivement a été retrouvé à partir du piégeage du DPPH lors des travaux réalisés par Kchaou *et al.*,(2016), Shehab *et al.*,(2015).

Comme cela est démontré dans plusieurs études, l'antioxydant la capacité des extraits de plantes est fortement liée au contenu phénolique (Wang *et al.*, 1999 ;Wang et Stretch,2001 et Zheng et Wang, 2003). Cette activité n'est pas une propriété d'un composé phénolique simple, mais elle est largement répartie entre les constituants phytochimiques phénoliques. En particulier, les anthocyanes, flavonoïdes et les acides phénoliques qui semblent être responsables de la capacité antioxydante. Comme le cas des tannins (gallotannins hydrolysables et proanthocyanidin comme la Peonidine-3-O-glucoside) et les acides phénoliques (acide syringique, acide vanillique et acide gallique) qui sont majoritairement composants de l'extrait aqueux des feuilles de *M. communis* sont dotés d'une activité antioxydante très remarquable (Montoro *et al.*, 2006 ;Fine, 2000 ; Othman *et al.*, 2007 et Okuda, 2005).

En effet, les flavonoïdes sont de puissants antioxydants vis-à-vis des radicaux libres dus à leurs propriétés de donation d'atomes d'hydrogène disponibles dans les substituants hydroxyles de leurs groupes phénoliques (Sandhar *et al.*, 2011). Leur capacité de donation d'hydrogène augmente avec l'augmentation de l'hydroxylation de leurs cycles phénoliques. Elle dépend essentiellement du nombre et la position des groupes hydroxyle phénoliques dans les fragments cycliques aromatiques (Tuberoso *et al.*, 2010). Cette caractéristique structurale peut être observée dans les flavonols comme le kaempférol quercétine et myricétine ou l'activité antioxydante est croissante en fonction du nombre des groupements OH dans la molécule.

II.2. Huiles essentielles

Les pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH par les différentes huiles essentielles sont portés sur la figure n°40.

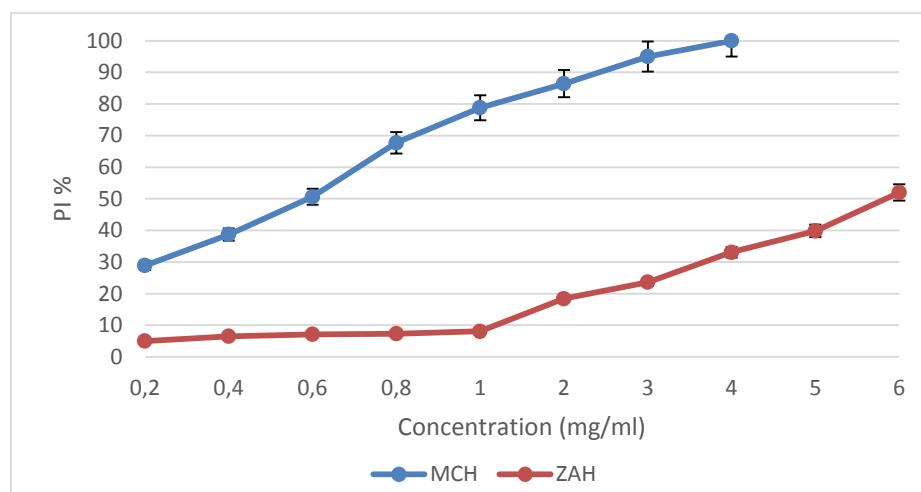


Figure n° 40: Pourcentage d'inhibition de DPPH par les huiles essentielles de *M. communis* et *Z. album*.

D'après ces résultats, on remarque que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente toujours avec l'augmentation de la concentration. Les taux d'inhibition du DPPH enregistrés en présence des différents extraits de la plante sont inférieurs à ceux de l'acide ascorbique et du BHT. Néanmoins, l'huile essentielle de *Z. album* représente l'extrait le moins actif dans l'élimination des radicaux libres. Avec une $IC_{50} = 6,01 \pm 1,21 \text{ mg/ml}$ par rapport à l'huile essentielle de *M. communis* qui est de $0,6 \pm 0,07 \text{ mg/ml}$. Ce résultat est en parfaite concordance avec ceux trouvés par Wannan *et al.*, (2010) car ils ont trouvé aussi une $IC_{50} = 0,6 \text{ mg/ml}$ pour l'huile essentielle extraite des feuilles de Myrte de la Tunisie, sachant que les caractéristiques géographiques et bioclimatiques de cette région se rapprochent à celles de l'ouest Algérien (région de récolte de notre échantillon).

Il est connu généralement que les plantes aromatiques et médicinales, comme le myrte, sont une source des antioxydants naturels en raison de l'activité de métabolites secondaires tels que les phénylpropanoïdes et les huiles essentielles. Ces huiles végétales essentielles et des extraits ont été utilisés pendant des milliers d'années dans la conservation des aliments, des produits pharmaceutiques, la médecine alternative et les thérapies naturelles (Reynolds, 1996; Lis-Balchin, 1997; Lis-Balchin et Deans, 199 et Burt, 2004).

En effet, en essayant d'établir une corrélation entre l'activité observée et la composition chimique des huiles essentielles, il est bien connu que les huiles essentielles de myrte contiennent des monoterpènes (α -pinène, β -pinène, limonène, 1,8-cinéole, linalol, ...) et ces composés ont tous été testés individuellement dans des études antérieures et ne présentent des activités antioxydantes fortes en utilisant la même procédure comme test de DPPH (Kelen et Tepe, 2008). En général, les huiles essentielles riches en composés phénoliques tels que le terpineol et le cineol ont des potentiels d'antioxydants puissants, qui sont le cas de *M. communis*. Une autre étude menée par Wei et Shibamoto (2007) a démontré la présence d'un significatif potentiel antioxydant des huiles essentielles riches en monoterpènes hydrocarbonés (limonène et-pinène) comme c'est le cas de notre huile.

Pour le cas de l'huile essentielle de *Z. album*, d'après nos connaissances c'est la première approche dans l'étude de son activité antioxydante par différentes méthodes surtout pour cette espèce saharienne, néanmoins plusieurs perspectives sont proposées à cet écart notamment celle de (Kordjani, 2006) pour l'espèce algérienne et (Mostafavi *et al.*, 2015) pour l'espèce provenant d'Iran. Cette faible activité antioxydante révélée par DPPH peut être expliquée par la présence de traces des composés non volatils dans notre huile, selon Kordjani (2006) car les composés volatils sont peu doués en cette activité. Néanmoins la présence de caryophyllène – trans est impliquée dans ce minime effet scavenger (Bouzabata *et al.*, 2015).

III. Activité antioxydante totale

La courbe ci-dessous représente la courbe d'étalonnage par laquelle sont exprimés nos résultats exprimés par le nombre d'équivalents de vitamine C. Dont les valeurs d'absorbance élevées indiquent que l'échantillon possède une activité antioxydante importante.

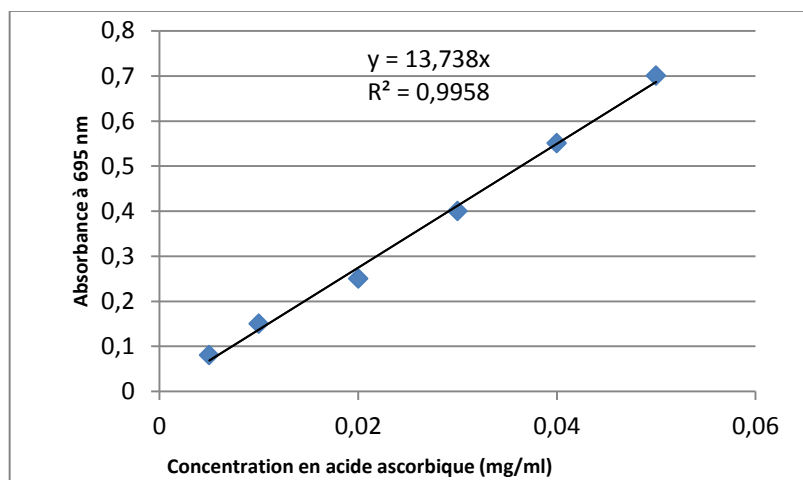


Figure n° 41: Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique (mg/ml)

La figure n°42 montre que tous les extraits présentent des activités antioxydantes différentes ($p \leq 0,05$). Les extraits peuvent être classés par ordre décroissant du pouvoir anti-radicalaire, comme suit : MCE > MCH > ZAE > ZAH.

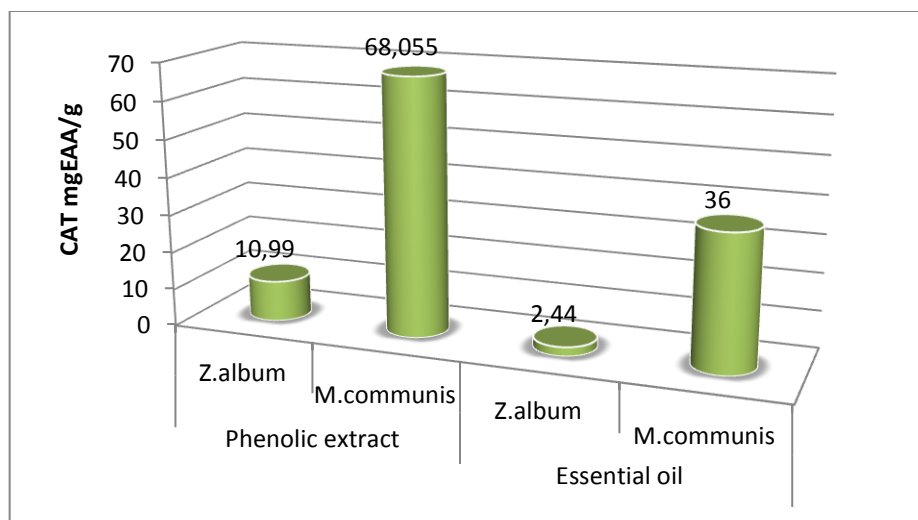


Figure n° 42: Résultats de l'activité antioxydante totale des différentes essences

On remarque que *M. communis* possède une activité antioxydante mieux que celle de *Z. album* par son extrait phénolique et son huile essentielle. En effet l'extrait aqueux des feuilles de *M. communis* couvre la meilleure capacité antioxydante totale de l'ordre de $68,05 \pm 0,01$ mg EAA/g MS. Et l'huile $36 \pm 1,99$ mg EAA/g MS. Ceci a été déjà prouvé par l'étude de Wannan *et al.*, (2010) et de Aleksic et Knezevic (2014).

Mais cela n'empêche de remarquer l'effet antioxydant de l'extrait méthanolique de *Z. album* ($10 \pm 0,11$ mg EAA/g MS) qui est deux fois supérieur que celui trouvé par Benhamou (2011) et dix fois plus supérieur que celui identifié par Kchaou *et al.*, (2016) pour la même espèce et la même méthode.

Concernant l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Z. album*, la méthode (PPM Test) confirme les résultats trouvés auparavant dans le test de DPPH, en effet cette huile possède un modeste effet inhibiteur des radicaux libres.

PARTIE 03 : Evaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits**I. Etude *in vitro*****I.1. Evaluation de l'activité antibactérienne**

L'activité antimicrobienne a été testée contre neuf bactéries pathogènes (*S. aureus*, *clostridium sp.*, *E. fecalis*, *S. typhi*, *E. coli*, *Shigella sp.*, *B. subtilis*, *B. cereus* et *Salmonella sp.*) qui possèdent différentes propriétés de croissance. Les résultats du test de diffusion sur disque et de la concentration minimale inhibitrice d'huiles essentielles sont énumérés dans les tableaux n° 27.

D'après les résultats, les témoins négatifs testés (eau, méthanol, DMSO et cyclohexane) n'ont aucun effet sur les souches étudiées. Cependant toute action inhibitrice observée est donc due aux substances actives contenues dans les extraits testés.

Tableau n°27 : Diamètres d'inhibition des différents extraits vis-à-vis les germes testés

		Diamètres d'inhibition (Ø mm)							
		<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>Shigella</i>	<i>S.typhi</i>	<i>Clostri</i>	<i>B.subt</i>	<i>B.cer</i>	<i>S.sp</i>
<i>M.communis</i>	H.E	07±0,2	07±0,01	07±0,2	09±0,02	09±0,01	08±0,3	7,5±0,02	9±0,05
	E.aq	10±0,07	09,5±0,02	10±0,1	08,5±0,03	10±0,01	11±0,01	10,5±0,01	9±0,01
<i>Z. album</i>	H.E	11±0,1	08±0,3	09±0,05	10±0,06	09±0,05	10±0,03	11±0,03	10,5±0,01
	E.met	09±0,06	15±0,05	10±0,03	09±0,03	11±0,2	14±0,01	14±0,01	9±0,01
Oxacillin 5µg		-	13±0,2	-	-	-	-	-	-
Gentamicin 10µg		20±0,1	30±0,02	9±0,002	-	10±0,001	10±0,001	-	18,5±0,3

Ce test a montré une grande hétérogénéité dans les résultats. L'extrait méthanolique de *Z. album* a présenté le meilleur effet dans cette méthode avec la plus grande zone d'inhibition enregistrée contre *E. coli*, de 15±0,05 mm, elle est plus supérieure au diamètre donné par l'action de l'Oxacilline (13±0,2) mais inférieure à celui enregistré par la Gentamycine (30±0,02mm).

Ceci est prouvé par l'étude de Khellil *et al.*, (2011) sur un écotype provenant du Sahara de Ouergla ou l'extrait méthanolique avait une activité inhibitrice intéressante d'un diamètre de 12mm sur *E. coli*.

L'effet antibactérien des deux extraits phénoliques de *Z. album* et *M. communis* a été remarqué vis-à-vis *B. subtilis* et *B. cereus* avec des diamètres d'inhibition de $14 \pm 0,01$ et $14 \pm 0,01$ mm respectivement pour *Z. album* et de 11 et $10,5 \pm 0,01$ mm respectivement, cet effet reste plus inhibiteur que celui trouvé par la Gentamycine $10 \pm 0,001$ mm. Une autre étude réalisée par Peirera *et al.*, (2013) sur l'effet antibactérien de l'extrait aqueux des feuilles de myrte a donné un effet remarquable de l'extrait vis à vis *B. subtilis* avec une zone d'inhibition plus grande comprise entre (22 et 15 mm) respectivement .De même pour *Zygophyllum*, l'étude menée par Mothanaa et Lindequist en 2005 a confirmé l'effet antibactérien de l'extrait méthanolique de *Zygophyllum quatarense* vis-à-vis *B. cereus* avec un diamètre d'inhibition de 10mm.

Par ailleurs, *S. aureus* était plus sensible en présence de l'extrait aqueux de *M. communis* que *Z. album* ($10 \pm 0,07$ mm). Ces résultats se rapprochent avec ceux trouvés par Gortzi *et al.*, (2008) puisque l'extrait aqueux des feuilles de myrte exerçait l'effet le plus fort sur *S. aureus* . L'inhibition de croissance de *S. aureus* en présence de l'extrait éthanolique de *M. communis* a été également rapporté par Mert *et al.*, (2008) .Nos résultats n'empêchent d'affirmer l'action modérée de *Z. album* sur la croissance de *S. aureus* avec un diamètre d'inhibition (9mm) plus grand que celui trouvé par Mothana et Lindequist (2005).

Pour les huiles essentielles, *Z. album* a montré et pour la première fois un effet antibactérien plus que *M. communis* surtout envers *B. cereus* avec des diamètres d'inhibition de ($11 \pm 0,03$ et $7,5 \pm 0,02$ mm) respectivement.

En général l'effet des deux huiles étaient modérée sur l'ensemble des souches testées, Ce résultat est en parfaite concordance avec ceux trouvés par Akin *et al.*, (2010) sur l'action antibactérienne de l'huile essentielle des feuilles de myrte sur *S. aureus*, *Salmonella typhi*, *E. coli* et *B. subtilis*.

Tableau n°28: Concentration Minimale inhibitrice (CMI (% ,v/v)).

	Polyphénols mg/ml		Huiles essentielles µl/ml		Antibiotiques µg/ml	
	<i>M. communis</i>	<i>Z. album</i>	<i>M. communis</i>	<i>Z. album</i>	OX	CN
<i>E. coli</i>	100	25	250	250		250
<i>S. typhi</i>	100	100	250	125		125
<i>Shigella sp.</i>	50	50	250	250		125
<i>B. subtilis</i>	100	50	250	250		62.50
<i>Clostridium sp.</i>	50	50	250	250		62.50
<i>S. aureus</i>	50	50	250	125	250	
<i>Enterococcus faecalis</i>	50	50	250	125		125
<i>Bacillus cereus</i>	100	50	250	125		62,50
<i>Salmonella sp.</i>	100	100	250	125		125

L'activité inhibitrice des extraits a été identifiée dans une large gamme de concentrations allant de 25 à 100 mg/ml pour les extraits polyphénoliques et de 125 à 250µl/ml. Parmi les quatre extraits testés, l'extrait méthanolique de *Z.album* ou la concentration minimale inhibitrice a été enregistrée chez *E.coli* pour cet extrait (25mg/ml), cet effet pourrait être dû à la polarité élevée du méthanol (El-Shora *et al.*, 2016).

extrait Souches	<i>Myrtus communis</i>	<i>Zygophyllum album</i>
<i>E. coli</i>		
<i>Salmonella typhi</i>		
<i>Salmonella sp.</i>		
<i>Shigella sp.</i>		
<i>Bacillus cereus</i>		

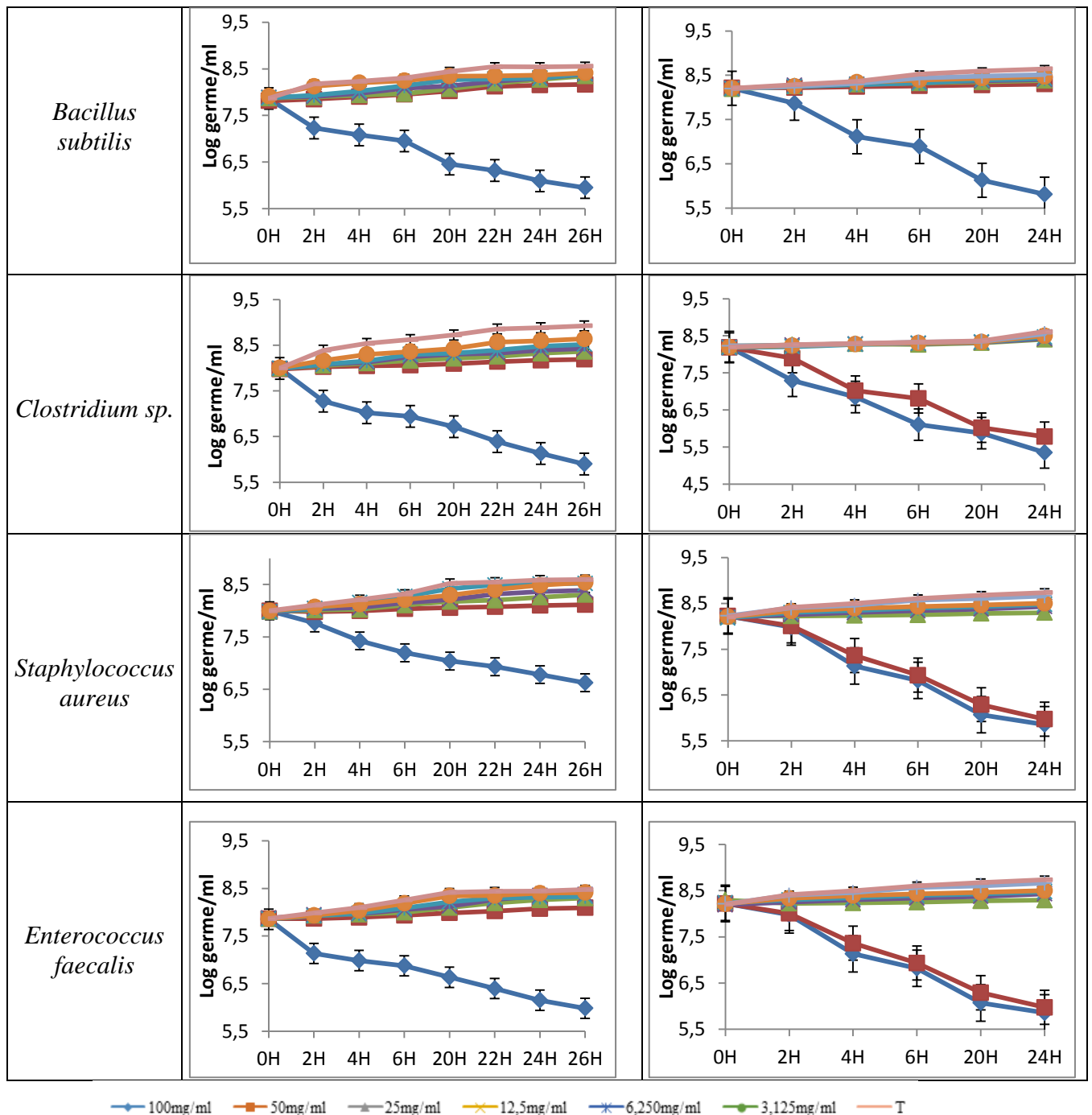
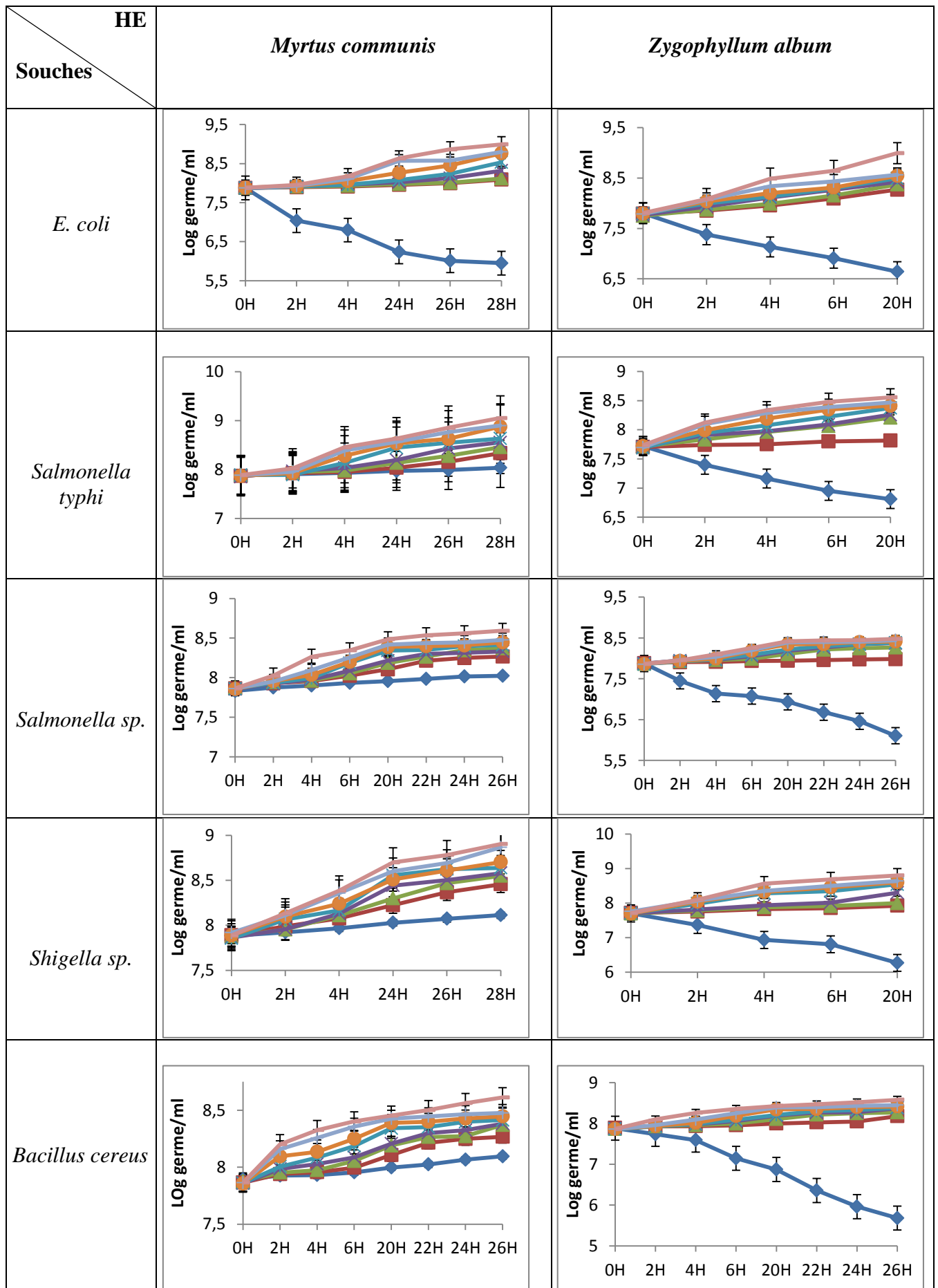


Figure n°43 : cinétique de croissance des souches en présence des extraits polyphénoliques (ZAM, MCA)

Vue les résultats phytochimiques qualitatifs et quantitatifs de l'extrait méthanolique de *Z. album* trouvés auparavant et la présence des Gallotannins dans cet extrait qui se lie à des protéines riches en proline et qui peuvent interférer avec la synthèse des protéines des parois bactériennes, ceci est proposé comme un mécanisme expliquant l'effet antibactérien de cet extrait SHIMADA *et al.*, (2006), Les flavonoïdes réagissent aussi et peuvent former des complexes avec des protéines solubles et des parois cellulaires des bactéries (Marjorie, 1999), les saponines présents dans l'extrait méthanolique de *Z. album* exercent un effet antibactérien qui peut être attribué à sa capacité à provoquer une fuite de protéines ainsi que certains enzymes de la cellule (Zablotowicz *et al.*, 1996). Alors que les alcaloïdes ont été suggérées pour fonctionner comme agents antibactériens (Mantle *et al.*, 2000).

Dans l'ensemble l'action inhibitrice est remarquée chez les bactéries à Gram + que celles à Gram -, pour *M. communis* ces résultats sont en accord avec les travaux de Adamez *et al.*, (2012) et Kao *et al.*, (2010). En effet, d'après leurs travaux, les extraits aqueux et méthanoliques des feuilles de Myrte n'avaient aucun effet sur les souches à Gram négatif, Les différences de sensibilité des bactéries à Gram-négatif et des bactéries Gram+ positif indiquées par la présence des substances antimicrobiennes vu à être liés à la structure et la composition de leurs parois cellulaires. En effet les bactéries Gram positif ont une couche externe plus perméable riche aux peptidoglycane alors que les bactéries à Gram-négatif ont une barrière extérieure plus rigide phospholipides (Grevenstuk *et al.*, 2009). Nos résultats suggèrent que les composés de ces extraits, aussi que des huiles essentielles endommageant la fonction de la paroi cellulaire des bactéries à Gram+ et à Gram- (Berka-Zougli *et al.*, 2012).



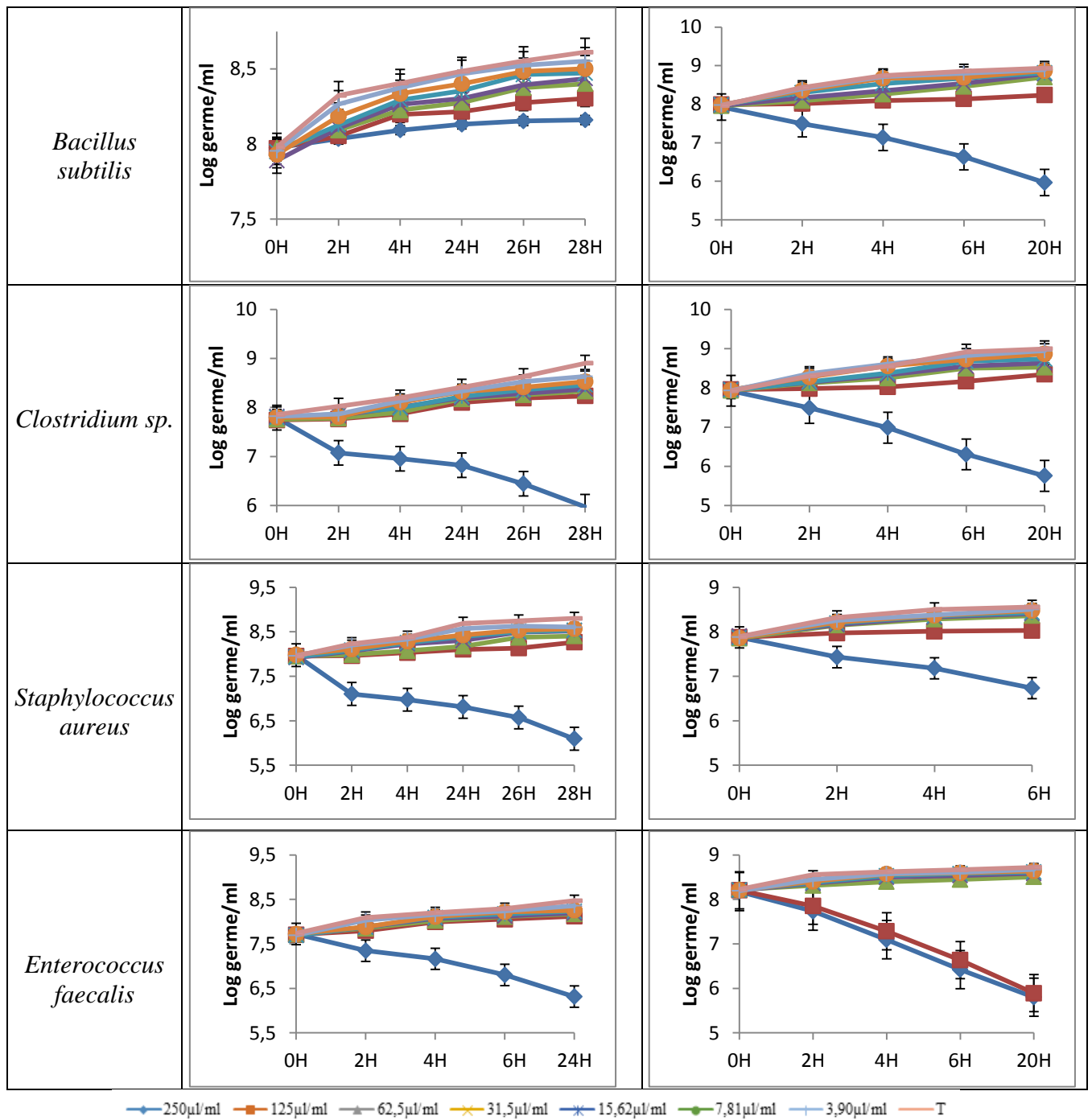


Figure n°44 : cinétique de croissance des souches en présence des huiles essentielles (ZAH, MCH)

D'après ces résultats, on a pu remarquer aussi une activité généralement faible des huiles essentielles par rapport aux extraits polyphénoliques des deux plantes allant jusqu'à 250 µl/ml pour la majorité des souches en présence de *M. communis* et 125µl/ml en présence de *Z. album*, ces résultats ont été déjà remarqué par Jouaut (2012) en isolants quelques composants de différentes huiles essentielles et testant leurs effet individuellement, ces composés ont été classés en ordre décroissant selon leur effet inhibiteurs des germes pathogènes :geraniol > nonanal > terpinèn-4-ol > linalol > 1,8-cinéole > limonene sachant que le Geraniol et le Nonanal sont majoritairement composants de l'huile essentielle de *Z. album* tandis que le reste compose l'huile essentielle de *M. communis*. Généralement, les huiles essentielles sont difficilement solubles dans l'eau, ce qui pose beaucoup de problèmes pour étudier leur activité antibactérienne, ceci a été déjà rapporté par Southwell *et al.*, (1993).

Selon Burt (2004) la grande résistance des bactéries à Gram négatif à l'huile essentielle est liée en partie à la complexité de l'enveloppe cellulaire de ces microorganismes qui contient une double membrane, contrairement à la structure membranaire simple des bactéries à Gram positif. Selon Oussalah *et al.*, (2006), l'activité biologique d'une huile essentielle est étroitement liée à sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, aldéhydes) et les effets synergiques entre les composants.

Comme le cas de *Myrtus communis*, le composé majoritaire de son huile essentielle est le 1,8-cinéole qui a été connu pour présenter une activité antimicrobienne contre les souches bactériennes (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Bacillus subtilis*) (Sivropoulou *et al.*, 1997).

Les minimales propriétés antibactériennes de nos huiles essentielles sont en partie liées à leurs caractères lipophiles menant à l'accumulation au niveau des parois bactériennes, perturbant ainsi le fonctionnement et la perméabilité des membranes cellulaire, dégradent de la paroi cellulaire (Helander *et al.*, 1998), endommagent la membrane cytoplasmique et les protéines membranaires ce qui traduit les fuites du contenu des cellules (Hellal, 2011).

Les résultats de l'évaluation des effets bactéricides des extraits végétaux sont repris dans le tableau n°29 ou sont incluses d'une part les concentrations minimales bactéricides (mg/ml, µl/ml) de l'ensemble des extraits et d'autre part les valeurs du rapport entre la CMB et la CMI.

Tableau n°29 : Concentrations minimales bactéricides des extraits végétaux et rapport CMB/CMI

	CMB (mg/ml, µl/ml)				RAPPORT CMB/CMI				
	Extraits polyphénoliques		Huiles essentielles		Extraits polyphénoliques			Huiles essentielles	
	E.aq M.c	E.M Z.a	HE Z.a	HEM.c	E.aq M.c	E.M Z.a	HE M.c	HE Z.a	
<i>E. coli</i>	100	25	125	250	1	1	1	1	
<i>S. typhi</i>	100	100	250	/	1	1	/	2	
<i>Shigella sp.</i>	100	50	250	/	2	2	/	1	
<i>B. subtilis</i>	100	100	250	/	1	2	/	2	
<i>Clostridium sp.</i>	100	50	250	250	2	1	1	1	
<i>St. aureus</i>	100	50	250	250	2	1	1	2	
<i>En. faecalis</i>	100	50	125	250	1	1	1	1	
<i>B.cereus</i>	/	100	250	/	/	2	/	1	
<i>Salmonella sp.</i>	100	100	250	/	1	1	/	2	

Selon le tableau n° 29 et donc le rapport CMB/CMI n'excède pas 32 pour la totalité des essais, nous pouvons conclure que les bactéries testées ne présentent pas une tolérance aux extraits polyphénoliques et aux huiles essentielles de *M. communis* et *Z. album*. Sur l'ensemble des souches, une concentration allant de 50 à 100 mg/ml de ZAE (E. méthanolique) est capable de tuer plus de 90% de la population bactérienne initiale. Pour MCE (E. aqueux), les CMB varient entre 250mg/ml contre les bactéries à Gram- (entérobactéries) et 125 mg/ml contre les bactéries à Gram+.

L'activité bactéricide de l'huile essentielle de *Z. album* a été évaluée à une concentration de 125 à 250 µl/ml selon la bactérie. Les CMB enregistrées pour *M. communis* dépassaient 250 µl/ml pour la plupart des souches. Cette sensibilité accrue est déjà confirmée par les résultats de la CMI. Les valeurs de la CMB étaient plus proches de celles des CMI pour tous les extraits. D'après Canillac & Mourey (2001), lorsque le rapport CMB/CMI est inférieur ou égal à 4, l'agent antibactérien est considéré comme bactéricide. Nous constatons que l'action de l'extrait méthanolique et l'huile essentielle *Z. album* est bactéricidique. Cependant, pour *M. communis* l'action varie selon le germe, l'huile essentielle possède une action statique sur les souches.

I.2. Activité antifongique des différents extraits

Les résultats des tests antifongiques et antibactériens des extraits sont consignés dans le tableau n°30. Les souches fongiques testées ont réagi selon la nature et la concentration de l'extrait.

Les diamètres des zones d'inhibition sont compris entre 7,5 et 14mm. Contrairement aux résultats précédents *M. communis* exerce un effet antifongique mieux que *Z. album* même si Khelil *et al.*, (2011) ont trouvé un effet négatif de l'extrait méthanolique sur cette levure, on a pu remarquer aussi que l'effet antibactérien est remarqué chez *Candida albicans* mieux que *Aspergillus fumigatus*, selon une relation dose-réponse.

Tableau n°30 : Diamètres d'inhibition des différents extraits de *M. communis* et *Z. album*

	<i>M. communis</i>		<i>Z. album</i>		Mic (10µg)	Gris (10µg)
	E. aq	HE	E. met	HE		
<i>Candida albicans</i>	14±0,02	10,5±0,01	8±0,02	7,5±0,2	24 ±0,6	0,8 ±0,3
<i>Aspergillus fumigatus</i>	10±0,5	8,5±0,3	7,2±0,5	7,5±0,01	26 ±0,15	-

Les valeurs représentent la moyenne ±écart type (n=3), - : aucune zone d'inhibition

De plus les extraits polyphénoliques sont dotés d'un pouvoir antifongique plus que les huiles Cette forte activité des dérivés phénoliques serait liée à une bonne solubilisation de ceux-ci dans le milieu aqueux du fait du groupement hydroxyle libre (Ben Arafa *et al.*, 2006), mais également à une action toxique de ces molécules vis-à-vis de la membrane cellulaire du micro-organisme (Ultee *et al.*, 2002 et Lambert *et al.*, 2001). Kurita et Koike (1982) ont étudié l'activité antifongique des alcools primaires, des composés phénoliques, des aldéhydes aromatiques et des acides organiques. Ils se sont rendu compte que celle-ci augmente avec l'hydrophobicité de ces composés, ce qui suggère des interactions hydrophobes entre ces composés et les cellules fongiques testées. Boochird et Flegel en 1982 se sont aussi penchés sur la question en étudiant l'action de l'eugénol et de la vanilline, qui sont des composés phénoliques. Selon ces auteurs, les cibles des phénols sont la paroi cellulaire, la membrane cytoplasmique et le cytoplasme. Leurs effets sur ces trois sites dépendent de la concentration utilisée : à de faibles concentrations, ils produisent des effets réversibles, alors qu'avec des concentrations élevées, ils produisent une coagulation générale suivie de la mort des cellules.

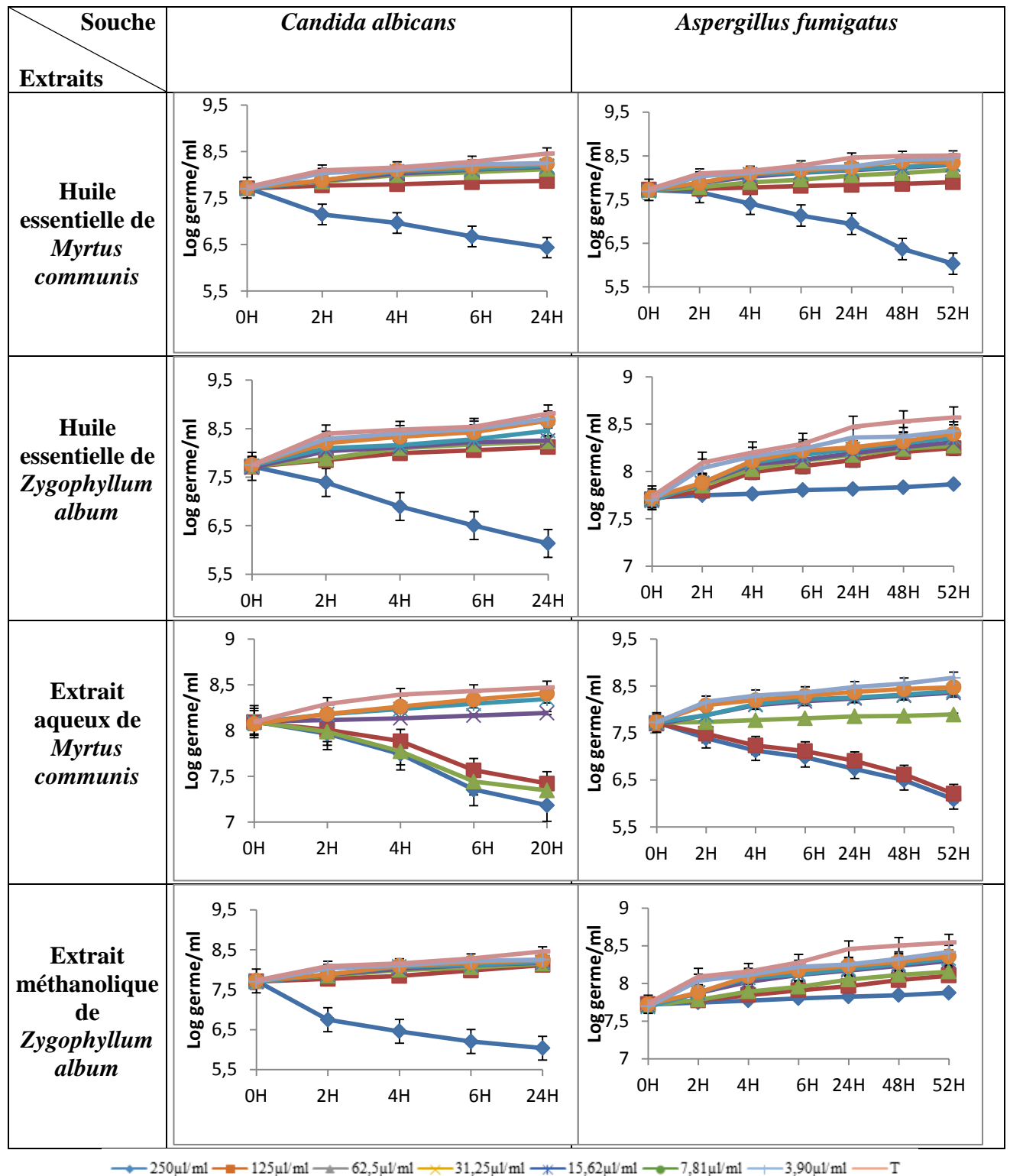


Figure n°45 : cinétique de croissance des souches en présence des extraits de plantes.

Le tableau n°31 et la figure n° 45 des CMF montre clairement qu'il y a une grande variabilité dans les résultats obtenus. On observe une activité antifongique significative des deux extraits étudiés (MCA et ZAE) sur *C. albicans*. De ces deux extraits, MCA s'est révélé le plus actif avec une valeur de CMF de 25 mg/ml contre 100 mg/ml pour ZAM. Néanmoins *Z. album* n'exerce aucune activité fongicide vis-à-vis *A. fumigatus*.

Tableau n°31 : Résultats de la CMI et CMF des différents extraits testés

	Extraits polyphénoliques (mg/ml)				Huiles essentielles (µl/ml)			
	<i>M.communis</i>		<i>Z.album</i>		<i>M.communis</i>		<i>Z.album</i>	
	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
<i>Candida albicans</i>	31.25	250	250	250	62,5	250	250	250
<i>Aspergillus fumigatus</i>	62,5	125	250	/	125	250	250	/

Sur la base de CMF, les rapports d'efficacité déterminés selon Drouhet et Dupont (1978), à savoir CMF_{MCA}/CMF_{MCZ} (pour *A. fumigatus*) et CMF_{MCA}/CMF_{MCZ} (pour *Candida albicans*) sont respectivement 100 et 25. Cela signifie que MCA est 100 fois plus actif sur *A. fumigatus* et 25 fois plus actif sur *C. albicans* que MCZ. De même pour les huiles essentielles, MCH est 40 fois plus actif pour *C. albicans* et 250 fois plus actif pour *A. fumigatus* que ZAH.

Le pouvoir antifongique de l'huile essentielle des huiles essentielles pourrait être attribué à la présence de composants antifongiques classés dans la liste des constituants à activité antifongique (Duke, 2009). Chu et Kemper (2001) ont signalé que le pouvoir antifongique d'huile essentielle du *Myrtus communis* est lié aux: β -pinène, p-cimène, 1,8 cinéole et α -pinène. Les composés majoritaires ou mineurs peuvent augmenter l'activité antifongique.

Pour *Z. album*, l'action du caryophyllène, qui un des composants de son huile essentielles est connu d'avoir des effets inhibiteurs vis-à-vis quelques souches fongiques notamment *C. albicans* (El-Shora, 2016).

Les modes d'actions antifongiques sont assez semblables à ceux décrits par les bactéries, concernant le dommage irréversible de la membrane cellulaire et la coagulation du contenu cellulaire. Si ce n'est pas les deux, il y a des phénomènes supplémentaires qui sont également importants lorsque les levures (cas de *C. albicans*) sont considérées. Le premier est l'établissement d'un gradient de pH à travers la membrane cytoplasmique, et le second phénomène consiste à bloquer la production de l'énergie des levures de qui se traduit par une perturbation de la membrane cellulaire (Djilani et Dicko, 2012).

II. Etude *in vivo*

II.1. Etude de la toxicité aigue

L'évaluation de la toxicité aiguë consiste à mesurer et enregistrer les différents effets adverses qui sont, immédiatement, apparus après l'administration d'une seule dose de la substance testée (Leblanc, 2010).

❖ Suivi de mortalité des rats

L'étude de la toxicité générale aiguë des extraits et des huiles essentielles est primordiale pour déterminer leur innocuité pour leur usage sans risque d'intoxication. Les résultats qui suivent (tableau n°32), illustrent le nombre de mortalité enregistrés durant les 72 heures qui suivent l'administration des différents extraits et huiles essentielles

Le premier rat mort est une femelle, à la dose de 1000mg/kg de l'extrait méthanolique de *Z. album*, après Presque 3jours suivant le gavage suite à des signes compliqués d'intoxication. En premier jour, la rate a montré une respiration difficile, une perte de locomotivité, des contractions musculaires lors du 3^{ème} jour, Elle meure après s'être allongée sur le ventre, alors que les derniers rats qui ont survécu jusqu'au 15^{ème} jours sont des males qui ont reçu doses de inférieurs à 800 mg/Kg pour les extraits phénoliques et 0,1ml/Kg pour les huiles essentielles. Après avoir calculé les pourcentages de mortalité dans chaque lot, la méthode de Dragstedt et Lang a permis de révéler une DL₅₀ pour l'extrait méthanolique de *Z. album* qui est de 1200 mg/kg et de l'huile essentielles de *Z. album* qui est de 1,68 ml/kg,

Dans la présente étude la DL₅₀ de l'extrait méthanolique de *Z. album* calculée est incluse entre 500mg/kg et 5000mg/kg (1200 mg/kg). On en conclut que l'extrait méthanolique de *Z. album* est considéré selon la classification de Diezi (1989) comme étant faiblement toxique chez les rats par voie orale et par conséquent cette plante mérite d'être utilisée avec précaution chez l'homme.

Une étude réalisée par Amal *et al.*, (2007) est en parfaite concordance avec nos résultats en effet, la DL₅₀ enregistrée par voie orale de l'extrait alcoolique de *Z. album* dépassait 2g/Kg de poids corporel.

Cependant, l'extrait peut provoquer de légers dommages du foie à des doses élevées selon (Steyn, 1929 ; Watt *et al.*, 1962 et Amal *et al.*, 2007) a aussi prouvé que *Zygophyllum microcarpum* était toxique et a causé des taux mortalité plus élevés chez le mouton avec des doses allant de 07.05 à 08.04 g kg⁻¹ de poids corporel .

Pour les huiles essentielles, il est remarqué qu'elles sont plus toxiques que les extraits phénoliques. Cette toxicité est dû à la composition de l'huile elle-même, effectivement, 1,8-Cinéole trouvé dans HE de *M. communis* s'est révélé toxique selon Traboulsi *et al.*, (2012).

Pour les doses de l'extrait aqueux et l'huile essentielle de de *M. communis*, ils sont loin de franchir la DL₅₀, cela nécessite d'autres essais préliminaires pour rechercher la DL 100 afin de délimiter la zone dans laquelle la DL₅₀ peut être calculée. Néanmoins, ces résultats affirment que l'extrait aqueux et l'huile essentielle ne présente pas de toxicité aigüe ni pour les rats, contrairement à l'étude de Hosseinzadeh *et al.*, (2007) qui ont trouvé que l'extrait aqueux de *M. communis* en provenance d'Iran était toxique avec une DL₅₀=400mg/g ,ceci implique l'origine botanique, la composition d'extrait pour expliquer cette différence. Melt *et al.*, en 2008 ont prouvé que la cytotoxicité de l'extrait aqueux est minime avec une LC₅₀=34µl/ml.

❖ Suivi du comportement des rats

Après l'administration de l'extrait polyphénoliques et des huiles essentielles par voie orale à des rats mâles et femelles, une augmentation régulière des signes d'intoxications en liaison avec la dose injectée a été remarquée. Les signes sont résumés dans le tableau n°33.

Les signes de toxicité sont les même pour les deux sexes mais ils apparaissent chez la femelle à des doses inférieures que celles chez les mâles. A partir de la dose non mortelle de 800mg/kg la fatigue et l'hypoactivité ont été remarquée en particulier chez les rats femelles.

Les signes commencent à augmenter à partir de la dose 1000mg/kg pour les extraits et 1ml/kg pour les huiles essentielles. Les animaux, à cette dose, montrent des signes de faiblesse associés à l'isolement individuel. Leurs mouvements et leurs appétits diminuent et la respiration devient difficile en particulier chez les femelles.

A la dose 1200mg/kg pour les extraits phénoliques et à 2ml/kg pour les huiles essentielles, la respiration devient laborieuse, les mâles et les femelle montrent des signes encore plus forts d'intoxication, leur rythme cardiaque s'accélère et après un quart d'heure, les rates commencent à souffrir des convulsions, des troubles involontaires de mouvements ce qui les conduisent à une démarche chancelante, certaines guérisses de ces troubles et d'autres finissent par mourir suite à des contractions musculaires, les mêmes symptômes ont été remarqués par Amal *et al.*, (2007) pour l'extrait alcoolique de *Z. album* prévenant d'Egypte .

Les convulsions, la respiration laborieuse et presque coupée, l'accélération du rythme cardiaque sont dus probablement à l'atteinte du système nerveux centrale. C'est ce qui est confirmé par notre étude phytochimique sur l'extrait aqueux de *M. communis* et l'extrait méthanolique de *Z. album* qui a révélé la présence des alcaloïdes qui sont connus par leurs effets neurologiques, en particulier les alcaloïdes quinolizidiniques, dont les effets sont associés à plusieurs activités telles que l'hypoglycémie, l'hypotension et la dépression respiratoire Kinghore et Balandrin (1984); Wink (1993). Pour les huiles essentielles ces effets sont dues à des composants spécifiques tels que la myricitine de l'HE de *M. communis* qui provoque une stimulation du SNC et des angoisses injustifiées (effet stupéfiant) Ben Amar et Louis (2002). Parmi les molécules convulsivantes aussi, le Verbanone présent dans l'HE de *Z. album* . Cette cétone provoque des risques de neurotoxicité minimales Paine *et al.*, (2008).

La diminution de la mobilité et de la fatigue nous laissent penser que ces plante auraient probablement des effets sédatifs Ondelee *et al.*, (2015).

Tableau n°32 : Taux de mortalité des rats après administration des extraits alcooliques et des huiles essentielles de *Z. album* et *M. communis*.

Mortalité des rats																			
Durée		24H		48H		72H		TOTAL										Total	
								24h		48h		72h							
Dose		No	%	No	%	No	%	No	%	Dose	No	%	No	%	No	%	No	%	
Doses (mg.kg ⁻¹)		Nbre des rats								Dose (ml.kg ⁻¹)									
100	Z	10	-	0	-	0	-	0	-	0	0,1	-	0	-	0	-	0	-	0
	M	10	-	0	-	0	-	0	-	0		-	0	-	0	-	0	-	0
400	Z	10	-	0	-	0	-	0	-	0	0,5	-	0	-	0	-	0	-	0
	M	10	-	0	-	0	-	0	-	0		-	0	-	0	-	0	-	0
800	Z	10	-	0	-	0	-	0	-	0	1	-	0	-	0	-	0	-	0
	M	10	-	0	-	0	-	0	-	0		-	-	0	-	0	-	0	
1000	Z	10	-	0	-	0	1	10,0	1	10	1,5	-	0	-	0	2	20	2	20
	M	10	-	0	-	0	-	0	-	0		1	10	-	0	-	0	1	10
1200	Z	10	1	10	3	33,3	1	16,66	5	50	2	2	1	10	11,1	3	37,5	6	62,5
	M	10	-	0	1	10	1	11,11	2	21,1		-	1	10	0	1	11,1	2	21,1
Total	Z	50	1	10	3	33,33	2	26,66	6	60	Total	1	10	2	11,1	5	57,5	5	82,5
	M	50	-	0	1	10,0	1	11,11	2	21,1		2	20	0	0	1	11,1	2	31,1

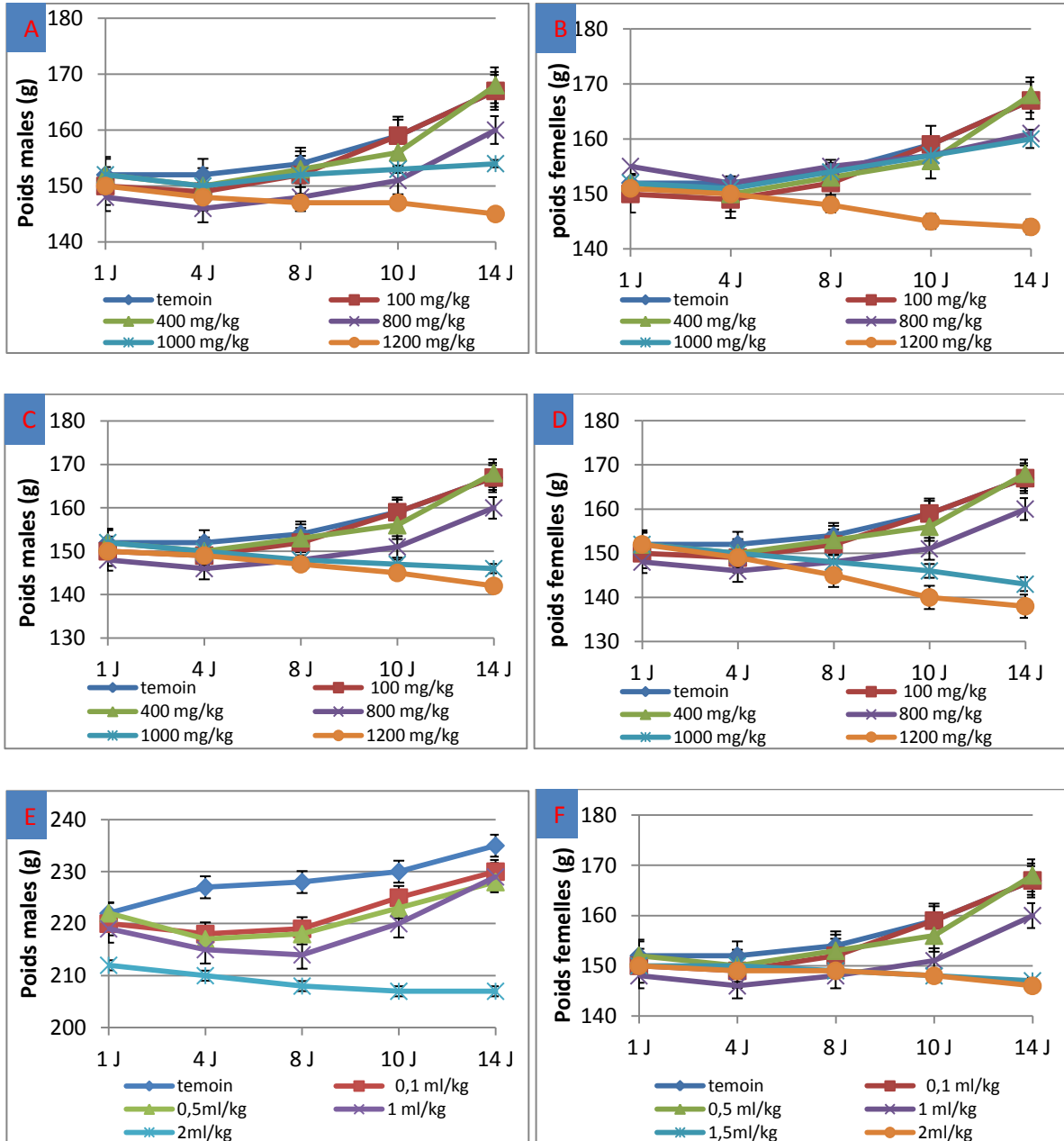
Tableau n° 33: L'effet toxique des extraits polyphénoliques et des huiles essentielles des plantes sur le comportement des rats traités oralement

Dose (mg/kg)	Sexe	Signes de toxicité	Latence (min)	Dose (ml/kg)	Signes de toxicité	Latence (min)
100	M	Normal		0,1	Normal	
	F	Normal			Normal	
400	M	Normal		0,5	Normal	
	F	Normal			Normal	
800	M	Normal	24h	1	Hypoactivité	3 – 24h
	F	Hypoactivité ¹ , isolement ¹			Hypoactivité ¹	3 – 24h
1000	M	Hypoactivité ^{1, 2} , isolement ^{1,2} , redressement des poils ¹ , somnolence ¹ et anorexie	1- 3h ¹ 3 h - 40h ²	1,5	Hypoactivité, fatigue, isolement	1 – 24h
	F	Hypoactivité ^{1,2} , isolement ¹ , redressement des poils ¹ , somnolence ¹ , anorexie ¹ et difficulté de respiration ^{1,2} .			Hypoactivité ^{1,2} , fatigue ^{1,2} , isolement, redressement des poils ¹ , difficulté de respiration ^{1,2}	40 min – 24h
1200	M	Somnolence ¹ , hypoactivité ^{1,2} , isolement ^{1,2} , redressement des poils ^{1,2} , bradycardie ¹ , difficulté de respiration ¹ , des tremblements légers du corps et dyspnée ¹ .	15min-1h ¹	2	Somnolence ¹ , hypoactivité ^{1,2} , isolement ^{1,2} , redressement des poils ^{1,2} , bradycardie ¹ , difficulté de respiration ¹ , des tremblements légers du corps et dyspnée ¹	30 min – 3h ¹ 3 h – 41h ²
	F	Somnolence permanente ¹ , anorexie ^{1,2} , hypoactivité ^{1,2} , isolement ^{1,2} , redressement des poils ^{1,2} , bradycardie ¹ , difficulté de respiration ¹ , des tremblements graves du corps ¹ , dyspnée et convulsions ¹ .	15 min - 1h ¹ 1 - 2h ²		Somnolence permanente ¹ , anorexie ^{1,2} , hypoactivité ^{1,2} , isolement ^{1,2} , redressement des poils ^{1,2} , bradycardie ^{1,2} , difficulté de respiration ^{1,2} , des tremblements graves du corps ¹ , dyspnée et convulsions ¹ .	30 min – 3h ¹ 3 h – 41h ²

F : femelle ; **M** : male ; **h** : heure ; **min** : minute ; ¹ : *Zygophyllum album* ; ² : *Myrtus communis*.

❖ **Suivi du Poids corporel**

Le suivi de la variation de la masse corporelle des animaux au cours de l'expérience de la toxicité subaiguë par des extraits polyphénoliques et huiles essentielles a indiqué qu'il y a une diminution du poids tout au long des 2 semaines pour les deux sexes, comparativement aux témoins (figures n°46).



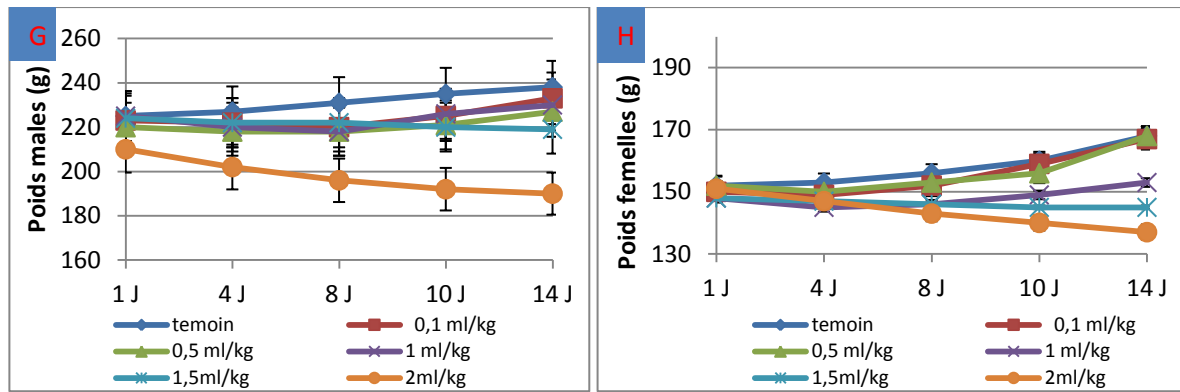


Figure n°46 : Evolution du poids corporel des rats traités avec les différents extraits (A, B : extrait aqueux de *M. communis*; C,D :extrait méthanolique de *Z. album*; E,F :huile essentielle de *M. communis*; G, H : huile essentielle de *Z. album*).

En analysant ces résultats, et en comparant avec les témoins, on remarque une diminution du poids corporel dans tous les lots recevant les extraits phénoliques ou HE des deux plantes, toutefois la diminution est plus élevée chez les femelles que les mâles, de plus dans certaines doses (800mg/kg) pour les extraits et (1ml/kg) pour les huiles, la récupération du poids initial est remarquée dans la deuxième semaine d'expérimentation néanmoins pour les doses supérieures, la récupération est irréversible, ceci est confirmé par les symptômes enregistrés auparavant.

Le changement du poids corporel est utilisé comme un indicateur des effets indésirables des composés chimiques Hilaly *et al.*, (2004). La perte du poids est corrélée à l'état physiologique de l'animal. Cette réduction du poids peut être expliquée par une réduction de la consommation des aliments, mais aussi par les possibilités d'interactions dose/absorption et par la diminution de la quantité de nourriture absorbée. D'autres travaux ont démontrés une diminution du poids des rats après administration par voie orale de l'extrait de *Z. album* (El-Ghoul *et al.*, 2011) et celui de *M. communis* (Hosseinzadeh *et al.*, 2007).

II.2. Résultats de l'activité anti-infectieuse *in vivo*

II.2.1. Evolution des signes cliniques

Les différents symptômes remarqués après induction de l'infection intestinale sont illustrés dans le tableau n°34, le taux de mortalité et les manifestations pathologiques observées se diffèrent entre les groupes de rats. Le taux de mortalité était de 20% dans les lots 2 (INT) et 4(HMP), alors qu'aucune mortalité n'a été enregistrée chez les autres lots de l'expérience. cette mortalité est forcément du au rat lui-même qui n'a pas pu supporter cette dose d'un tel microorganisme étranger, car selon Backman *et al.*, (1997) une dose de $1,5.10^8$ UFC/ml est susceptible de provoquer une infection intestinale chez le rat.

Tableau n°34 : Différentes manifestations biologiques observées chez les rats en cours d'expérimentation.

	Nombre de rats infectés / Nombre total des rats dans chaque groupe										
	Témoin	INT	ATB	<i>Myrtus communis</i>				<i>Zygophyllum album</i>			
				HE		E.aq		HE		E.met	
				pre	cur	pre	cur	pre	cur	pre	cur
Rats morts	0/5	1/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Signe dirrhétique	0/5	5/5	3/5	3/5	2/5	2/5	1/5	2/5	1/5	1/5	1/5
Perte de poids	0/5	5/5	3/5	4/5	2/5	3/5	1/5	2/5	2/5	1/5	1/5
Fatigue /Hypoactivité	0/5	5/5	3/5	3/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	0/5

Il est aussi à préciser qu'aucun groupe de rat n'a souffert de diarrhée sanglante. Cependant 100% des infectés non traités (lot 2), 60% des rats (lots 4-5-6 et 8) et 20% des rats des lots (3-7-9-10 et 11) manifestaient respectivement du symptôme de diarrhée aqueuse un jour après l'inoculation avec *B. cereus*, ce symptôme diarrhétic est typique suite à une infection de ce genre Griess (2013). Il est lié à l'élaboration par la souche bactérienne d'une entérotoxine thermolabile, produite *in vivo* dans l'intestin grêle, et synthétisée au cours de la phase exponentielle de croissance à une température comprise entre 32 et 37°C (Teyssou *et al.*, 1998).

Il a été observé qu'il y avait plus de réduction du nombre de rats qui déféquaient les selles liquides sur le temps surtout pour les lots traités que prétraités, et spécialement les lots traités par les extraits polyphénoliques que les huiles essentielles plus le lot traité par l'ATB (Lot 3). Ainsi, la défécation de diarrhée aqueuse par les rats a duré entre quelques heures suivant l'induction de l'infection à 1 jour dans la majorité des groupes traités. Pour les autres, la diarrhée persistait jusqu'au 4^{ème} jour surtout pour les rats infectés non traités (lot2), Dans ces derniers groupes; les rats ont souffert d'une diarrhée abondante provoquant peu la faiblesse avec diminution de l'activité, perte d'appétit et la perte de poids ce qui concorde avec les symptômes s'associant à une diarrhée chronique (Tams,1986).

Alors qu'aucun changement pathologique n'a été observé dans d'autres groupes de rats pendant toute la durée de l'expérience. Globalement, les rats traités par les extraits polyphénoliques surtout pour le lot (11) ont été protégés contre la diarrhée qui est habituellement induite par l'infection de *Bacillus cereus*. Ce qui indique que ces extraits bloquent l'accumulation de liquide dans la paroi intestinale des rats. cet effet est dû à la composition chimique de l'extrait lui-même qui est doté d'un pouvoir anti-diarrhéique (Itelima et Agina, 2014). En effet quelques rapports antérieurs ont démontré l'activité antidiarrhéique des tanins Mukherjee *et al.*, (1998), flavonoïdes (Galvez *et al.*, 1993), des alcaloïdes (Gricilda et Molly, 2001), des saponines, des stérols, et des terpènes Otshudi (2000), en effet les analyses phytochimiques préliminaires des extraits de plantes surtout l'extrait méthanolique de *Z. album* ont montré la présence de tous ces composés.

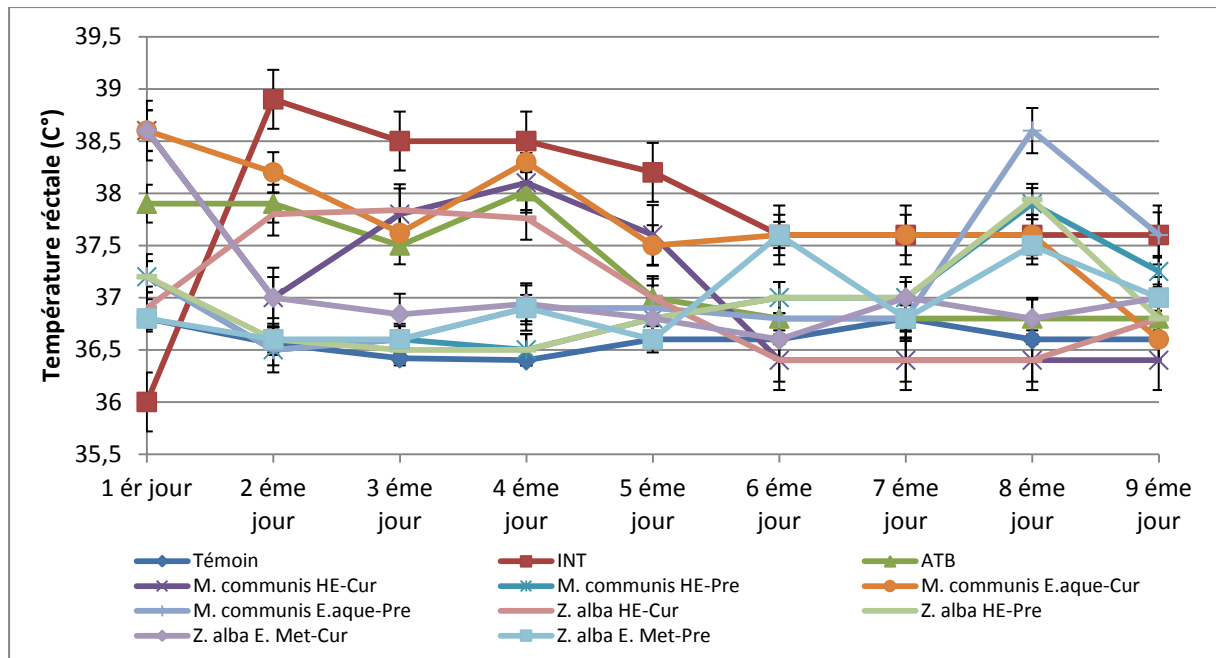


Figure n° 47: Température rectale quotidienne enregistrée ($P \leq 0.05$).

D'après les résultats la variabilité de la température rectale, marquée, par une augmentation après l'induction de l'infection à *B. cereus* par rapport aux témoins, c'est-à-dire le 2^{ème} jour pour les lots traités, et INT, et le 8^{ème} jour pour les rats prétraités correspondant à 24 heures après induction. ceci est tout à fait normal comme signe indicatif de la phase aiguë de réponse à cette infection (McCarthy *et al.*, 1985). Néanmoins cette augmentation s'est varié d'un lot à l'autre par le degré et les jours de persistance, en effet, pour les rats infectés non traités (Lot 2) la température s'est élevée jusqu'à $39 \pm 0,2$ C° les premiers jours de l'expérience, effectivement, Une étude réalisée par Asche et Butterfield (1974) indique que les rats infectés avec une souche *Bacillus sp.* subissaient une réduction significative de la production de leur acide gastrique avec une ligation du pylore. Et que ces changements ont été associés à la fièvre. Pour les lots traités l'augmentation était minime (± 1 C°) qui s'étend de baisser significativement ($p \leq 0,05$) à la température normale le 9^{ème} jour ($38,9 \pm 0,03$ C°). Le prétraitement n'a pas suffi pour baisser la température à la normale avant la fin de l'expérience (± 3 C°) de différence.

Pour les lots témoins, une légère élévation de température noté dans les groupes de contrôle ($\pm 0,5$ C+) reflète probablement thermogénèse induite par l'alimentation (McCarthy *et al.*, 1985), La propriété de thermorégulation des huiles essentielles est déjà prouvée par Schnebelen et Goetz (2007).

Les résultats de l'étude de Berzou (2013) ont aussi prouvé l'effet antipyrétique et anti-diarrhéique à la fois des extraits aqueux et éthanolique de *Zygophyllum gaetulum*. En général ce pouvoir serait lié à la présence des composés bioactifs, dans les deux extraits Deeni *et al.*,(1991);Kabore *et al.*, (1998).Néanmoins, les mécanismes de l'effet antipyrétique ne sont pas clairement élucidés.

II.2.2. Evolution pondérale

Le suivi de la variation de la masse corporelle des animaux au cours de l'expérience, ainsi que le gain ou la perte de poids de ces derniers sont résumés dans la figure n°48.

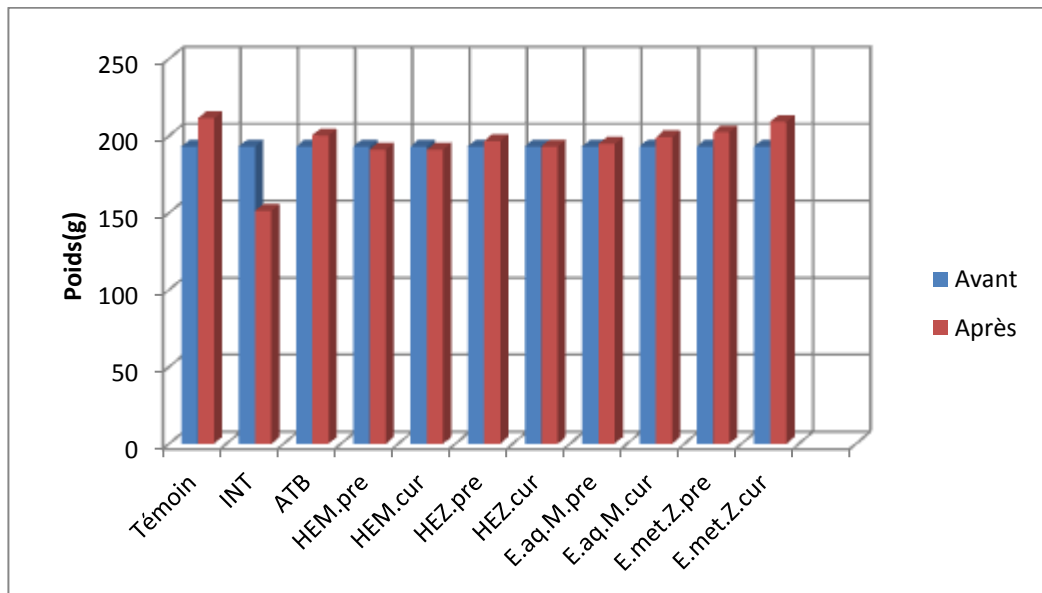


Figure n°48 : Poids corporels enregistrés avant et après l'expérience.

➤ Evolution pondérale chez les rats prétraités avec les extraits végétaux

Les masses corporelles des rats témoins et ceux prétraités avant induction de l'infection et après 9 jours variaient selon la figure n° 48. En effet, chez les rats recevant de l'eau physiologique (lot1), le poids ainsi que l'apport en nutriments évoluaient de façon normale enregistrant un gain de 18,46 g. En revanche, une perte massive et significative du poids a été déterminée chez les rats infectés non traités (lot 2) avec (-41,75g). Une légère diminution de la masse corporelle a été remarquée chez les groupes recevant l'extrait aqueux et l'huile essentielle de *M. communis*, par comparaison à ceux recevant la vancomycine et les substances issues de *Z. album*, les rats prétraités démontraient un gain de 9.2 g de poids

pour l'extrait méthanolique et 3,52 g pour l'HE. En effet, la perte de poids observée chez les rats infectés prétraités n'était pas significative.

➤ **Evolution pondérale chez les rats traités avec les extraits végétaux**

Chez les animaux traités à visée curative, les substances ont été gavées le 2^{ème} jour suivant l'induction de l'infection et durant une période d'une semaine. Tous les lots ont enregistré un gain pondéral à l'exception des rats traités par l'huile essentielle de *M. communis*, où une diminution légère de poids a été observée (-1,90g) car selon Festy (2013), le limonène et le sabinène ont un effet direct sur la perte du poids, ces composés sont abondants dans l'HE de *M. communis*. Parallèlement, aux rats prétraités, l'administration de ZAM provoque le gain de poids le plus élevé de la totalité des rats traités. Cependant, aucune différence significative n'a été notée dans l'évolution corporelle des rats traités comparés à ceux des animaux sains.

Le changement du poids est utilisé comme un indicateur général des effets indésirables des composés chimiques (El Hilaly *et al.*, 2004). Ainsi, la perte du poids est corrélée à l'état physiologique de l'animal et peut être expliquée par l'altération de son métabolisme (Mukinda et Syce, 2007). C'est le cas des rats infectés non traités, dont la perte de leur poids est probablement due à l'infection causée par *Bacillus cereus*. (Hamza, 2011) a pu constater aussi l'effet rapide des extraits polyphénoliques sur la prise alimentaire.

En contrepartie, l'évolution normale de la masse corporelle des animaux infectés ayant reçus les différentes substances testées témoigne la capacité de ces substances à maintenir constant le poids des rats. Cette capacité peut être corrélée à l'atténuation de l'infection à l'origine du déséquilibre de l'état physiologique des rats malades (Mc Carthy *et al.*, 1985).

II.2.3. Détection de *B. cereus*

La recherche du germe pathogène *B. cereus* a été effectuée dans les selles des animaux avant l'expérimentation et aucun rat n'est révélé porteur. Le pourcentage de rats wistar qui excrètent *B. cereus* dans les matières fécales après induction de l'infection et le traitement par des agents antimicrobiens a été présenté à la figure n°49.

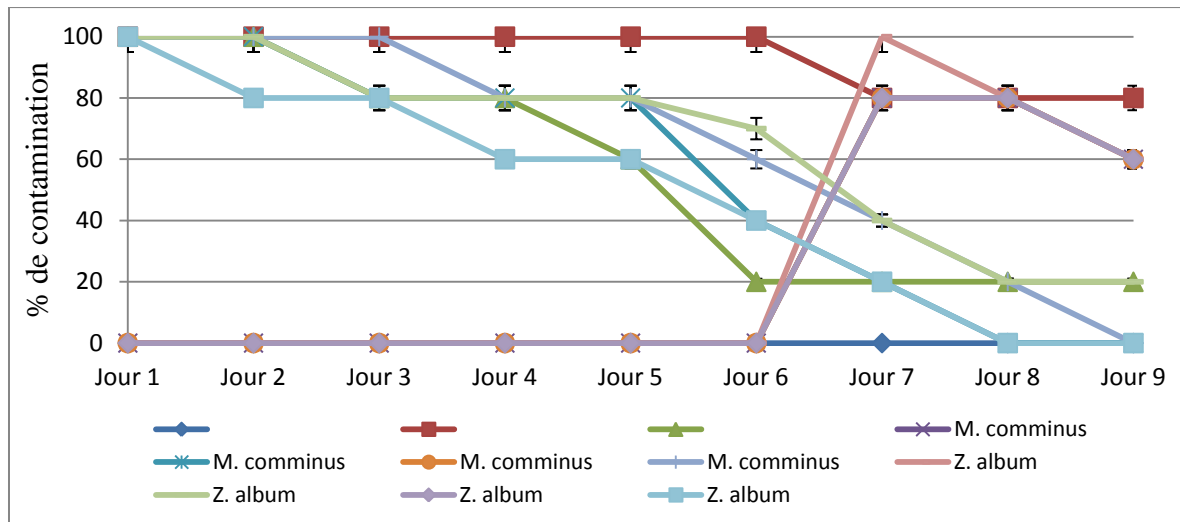


Figure n°49 :% des rats porteurs de *B. cereus* dans leurs matières fécales.

Selon les résultats, on remarque que le pourcentage des animaux contaminés par *B. cereus* après inoculation était très variable entre les rats, ce qui est en accord avec des études de nombreux auteurs (Cray et Moon, 1995 ; Hermon *et al.*, 1999 ; Itelima et Agina, 2014).

Le nombre des rats excréant *B. cereus* était plus élevé dans le lot n°2 car la quasi-totalité des rats infectés non traités témoignaient la présence de ce germe dans leurs selles, pendant les 6 jours qui ont suivi l'induction de l'infection pour atteindre 80% à la fin de l'expérience. Conformément à nos observations, d'autres études ont montré que les spores de *Bacillus sp.* sont capables de persister et parfois de germer dans le tractus intestinal. Trois souches de *B. cereus* ont montré cette persistance dans le tractus gastro-intestinal de la souris jusqu'à 18 jours de post-administration Duc *et al.*, (2004). Une étude plus poussée chez les animaux a montré que le nombre de spores de *B. cereus* excrété dans les fèces de souris dans certains cas, étaient plus élevés que l'inoculum original (Hoa *et al.*, 2001). Avec la présente étude, et à la lumière des travaux antérieures, nous constatons que les spores germent occasionnellement dans l'intestin grêle riche en éléments nutritifs, et la formation de spores subséquentes peut être une bonne stratégie pour survivre dans l'environnement plus hostile et en éléments nutritifs rares du grand intestin (Wilcks *et al.*, 2006). Comme une récente étude montre que les cellules végétatives de *Bacillus sp.* sont sensibles au fluide gastrique simulé avec un pH inférieur à 4,5 (Clavel *et al.*, 2004), tandis que les spores de la même souche sont résistants à un pH de 1,5 pendant plusieurs heures.

Cette résistance peut être expliquée par le fait que la surface est recouverte d'appendices qui peuvent permettre des spores du germe pathogène d'adhérer à la surface de l'épithélium (Husmark et Ronner, 1992) .ceci élucide le déversement continu de *B. cereus* dans le groupe infecté non traité tout au long de l'expérience.

Pour le lot control (rats traités par l'ATB standard), la défécation de 100% des rats était remarquée 24heures après induction de l'infection, le temps nécessaire pour l'incubation de *B. cereus*, qui a diminuait progressivement tout au long de l'expérience pour atteindre 20% (correspondant à 1rat) le 6eme jours suivant l'atteinte par l'infection, ce qui explique aussi par la durée de réaction de la Vancomycine (antibiothérapie) (Murray *et al.*, 2007).

En revanche, pour les lots prétraités et traités par des extraits de plantes dans cette étude supportaient mieux l'infection par ce qu'ils présentaient une activité antibactérienne significative contre *Bacillus cereus* inoculées dans les rats en réduisant la concentration du germe dans leurs matières fécales à des niveaux indétectables après l'inoculation.

En effet le pourcentage d'inhibition dans les lots traités était plus élevé que celui noté chez les lots traités. Une autre différence est le temps de réaction contre l'infection puisque l'extrait utilisé comme traitement en mode préventif éliminait la souche pathogène rapidement que celui du mode curatif car après l'administration de la souche pathogène chez ce groupe (6^{eme} jour d'expérimentation) une importante diminution est observée après deux jours d'induction de l'infection, mais pas en totalité, contrairement au groupe curatif; *Bacillus cereus* a été presque totalement éliminée chez tous les rats, mais dans un temps plus long. Cette différence dans le temps de la réaction pourrait être due à la quantité d'ingrédients bioactifs présents dans l'extrait de plante, car juste après l'inoculation de *B. cereus*, ces ingrédients étaient plus importants dans l'organisme des rats prétraités que ceux traités curativement. Il reste difficile toutefois de trouver un mécanisme précis entre deux modes de traitement expliquant cet effet puisqu'aucune étude n'a été entreprise dans ce domaine.

En général, les extraits polyphénoliques de *Z. album* et *M. communis* présentaient un meilleur effet que leurs huiles essentielles, et l'extrait méthanolique de *Z. album* présentait le meilleur effet inhibiteur vis-à-vis de cette infection, ce qui a été confirmé par les résultats trouvés *in vitro*.

II.2.4. Poids relatif des organes

A la fin du traitement, tous les rats ont été sacrifiés et les organes (foie, rate, reins, poumons et cœur) ont été prélevés, observés et pesés.

Les valeurs des masses relatives des organes internes prélevés des différents groupes de rats témoins et ceux recevant les différentes substances préparées sont élucidés dans la figure n°50.

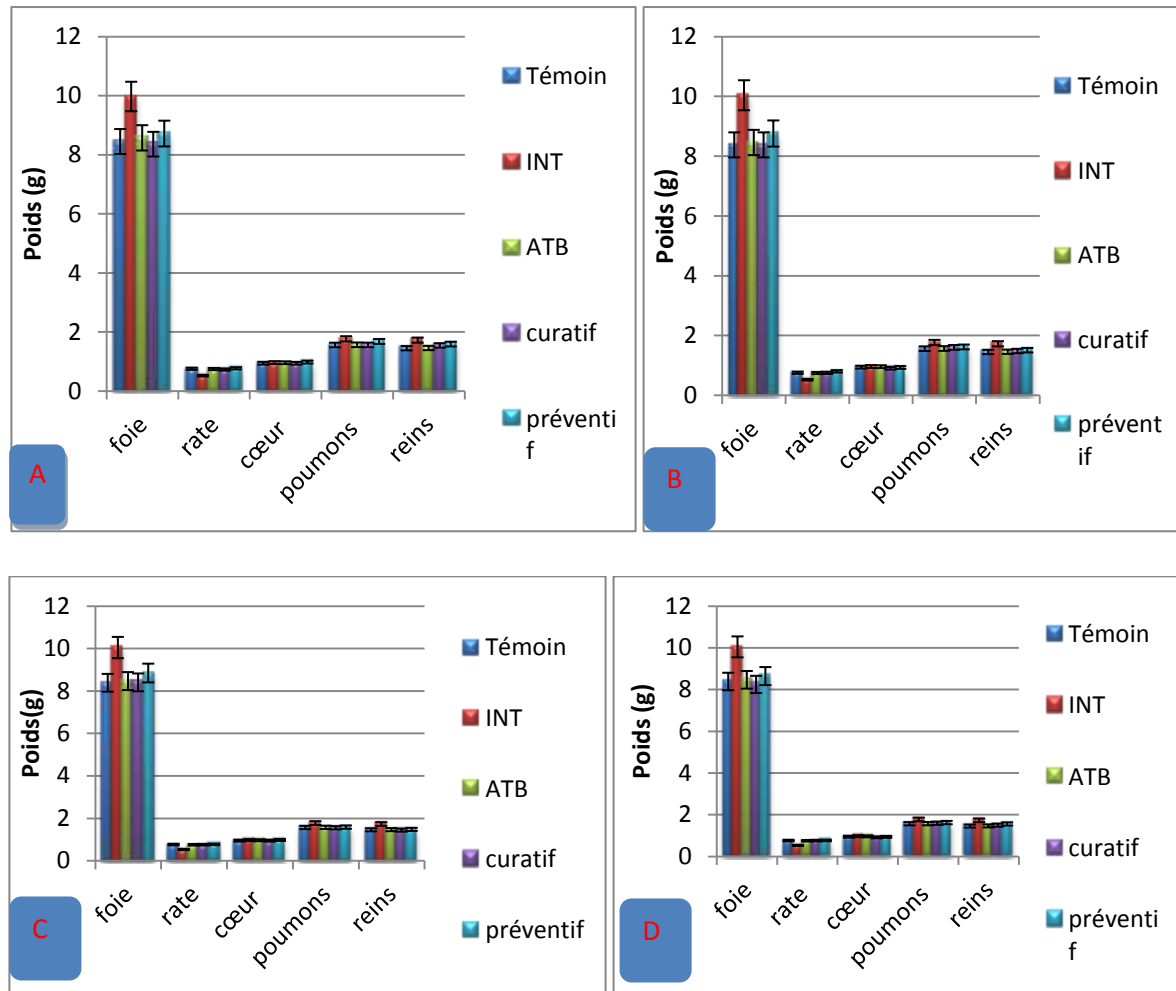


Figure n°50 : Poids relatif des différents organes chez les différents groupes de rats

(A: MCA, B: ZAM, C: HEM, D: HEZ) ($p \leq 0,05$)

De nombreuses études ont montré que, dans le cas d'une infection bactérienne voire intestinale, non seulement les intestins sont touchés, les organes viscéraux peuvent également être affectés par le processus pathologique (Schmidt *et al.*, 2011).

Dans le deuxième lot (rats infectés non traités), on remarque une augmentation hautement significative des poids des foies, rates et poumons par rapport aux témoins ce qu'on appelle phénomène d'hypertrophie, ces résultats sont en parfaite concordance avec ceux trouvés par Lima *et al.*, (2015) suite à une infection intestinale par *Schistosoma mansoni* sur des souris.

Ce qui peut être dû à l'effet des endotoxines produites par le germe pathogène *B. cereus*, en effet Jothy *et al.*, (2011) ont trouvé que les altérations de la masse relative des organes reflètent la toxicité après l'exposition à une substance toxique, le cœur, le foie, les reins, la rate et les poumons sont les premiers organes affectés par la réaction métabolique provoquée par le toxique.

A l'exception d'une augmentation de la masse relative des reins des rats prétraités avec l'extrait aqueux et l'huile essentielle de *M. communis* et l'huile essentielle de *Z. album* ($p < 0.05$), toutes les autres valeurs sont semblables à celles obtenues chez les rats sains c'est-à-dire les rats recevant un prétraitement avec l'extrait méthanolique de *Z. album* et tous les rats traités par les extraits végétaux et la vancomycine. Les valeurs que nous avons obtenues indiquent un effet bénéfique des préparations testées sur les organes internes, ceci pourrait donc compléter celui de l'étude de la toxicité aiguë des extraits car d'après Teo *et al.*, (2002), la variation du poids des organes internes serait un bon indice de l'évaluation de la toxicité d'une substance.

Les minimales élévations de la masse des reins dans les lots prétraités peut être liée à une congestion par la réservation du sang dans le tissu (Rasekh *et al.*, 2008), ou par la présence d'un infiltrat inflammatoire (Betti *et al.*, 2012).

II.2.5. Evaluation de la translocation bactérienne

II.2.5.1. Détection de *B. cereus* dans les différents organes de translocation

La recherche du germe pathogène *B. cereus* suite à l'infection, dans les organes internes était indispensable pour déceler d'éventuelles translocations bactériennes, les résultats trouvés sont illustrés dans le tableau qui suit.

Tableau n° 35: Détection de *Bacillus cereus* dans les organes internes

		organes	Sang	Foie	rate	poumons	reins	cœur	colon	intestin
		Lots								
<i>M. communis</i>	H.E	curatif	-	-	-	-	-	-	-	-
		préventif	-	-	-	-	-	-	+	+
	E.aq	curatif	-	-	-	-	-	-	-	-
		préventif	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Z. album</i>	H.E	curatif	-	-	-	-	-	-	-	-
		préventif	-	-	-	-	-	-	-	+
	E.met	curatif	-	-	-	-	-	-	-	-
		préventif	-	-	-	-	-	-	-	-
Témoin			-	-	-	-	-	-	-	-
INT (Infectés Non Traités)			++	++	++	++	++	++	++	++
ATB			-	-	-	-	-	-	-	-

(-) : Absence de *B. cereus*, (+): Présence de *B. cereus*

Ce qui a été remarqué en premier lieu est la propagation de *B. cereus* dans les différents organes de l'ensemble des rats infectés non traités, l'atteinte intestinale est associée parfois à des translocations et à des bactériémies (Merret *et al.*, 1994 ; Horgan *et al.*, 1994) ainsi la translocation bactérienne de ce germe a été dû à l'altération de la muqueuse intestinale (Plantefève et Bleichner, 2001). Pour le reste des lots, une absence du germe est mentionnée dans la majorité des lots, ce qui prouve son élimination par les extraits végétaux et l'antibiotique standard, sauf pour les lots prétraités avec l'extrait aqueux et huile essentielle de *M. communis* et l'huile essentielle de *Z. album*, *B. cereus* qui était présente dans l'intestin seulement ce qui confirme les résultats retrouvés lors de la détection de ce germe dans la matière fécale des rats.

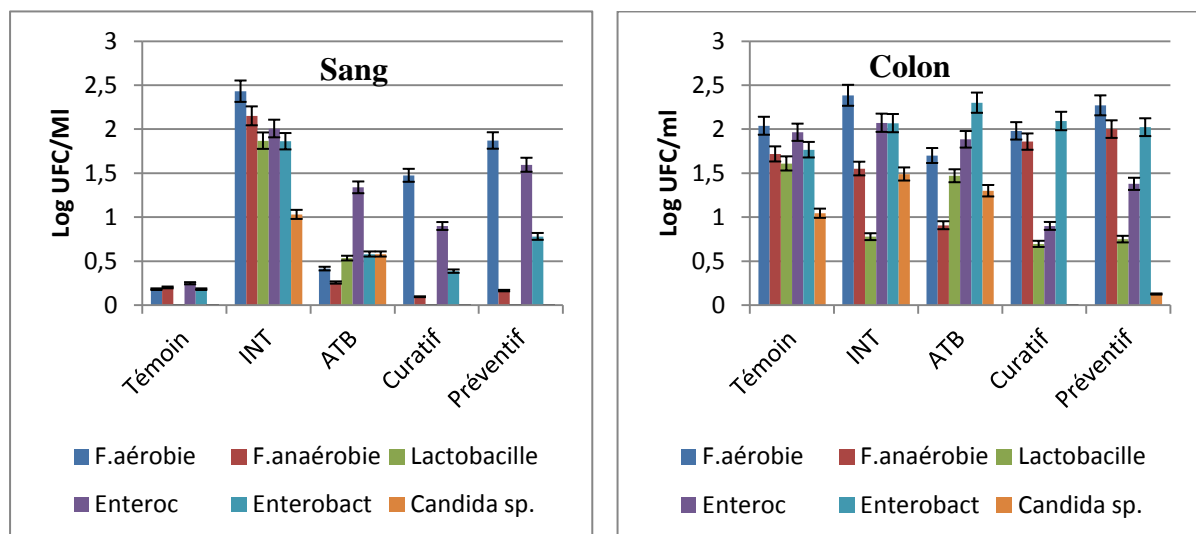
De plus la persistance du germe dans le colon indique qu'il n'est pas sous forme de cellules végétatives mais plutôt de spores qui ont germé à chaque fois les conditions redeviennent favorables car seulement ces derniers peuvent résister à l'acidité du fluide gastrique de l'appareil digestif avec un pH de 1,5 tout au long de l'expérimentation (Clavel *et al.*, 2004). Si les spores avaient traversé le tractus intestinal sous forme d'objets inertes, non soumis à la germination et à la prolifération, il est prévu qu'ils étaient complètement éliminés de l'intestin après environ 6 jours (Mather *et al.*, 1997).

Il a été montré que les spores de *B. cereus* sont plus hydrophobe que d'autres spores de Bacillus (Ronner *et al.*, 1990; Andersson *et al.*, 1998), et que la surface des spores est recouverte avec des appendices (Husmark & Ronner, 1992). Ceci peut activer les spores de *B. cereus* à adhérer à la surface de l'épithélium, expliquant ainsi la présence de *B. cereus* tout au long de l'expérimentation dans la majorité des rats prétraités.

D'une façon globale, les résultats montrent une absence totale de translocation bactérienne dans les différents lots traités préventivement et curativement.

II.2.5.2. Etude de la translocation bactérienne de flore résidante et transitoire du tube digestif

L'ensemble des résultats de dénombrement des germes résidents dans le tube digestif, le sang et les organes internes chez les rats avec ou sans traitement par les extraits végétaux sont illustrés dans les figures qui suivent :



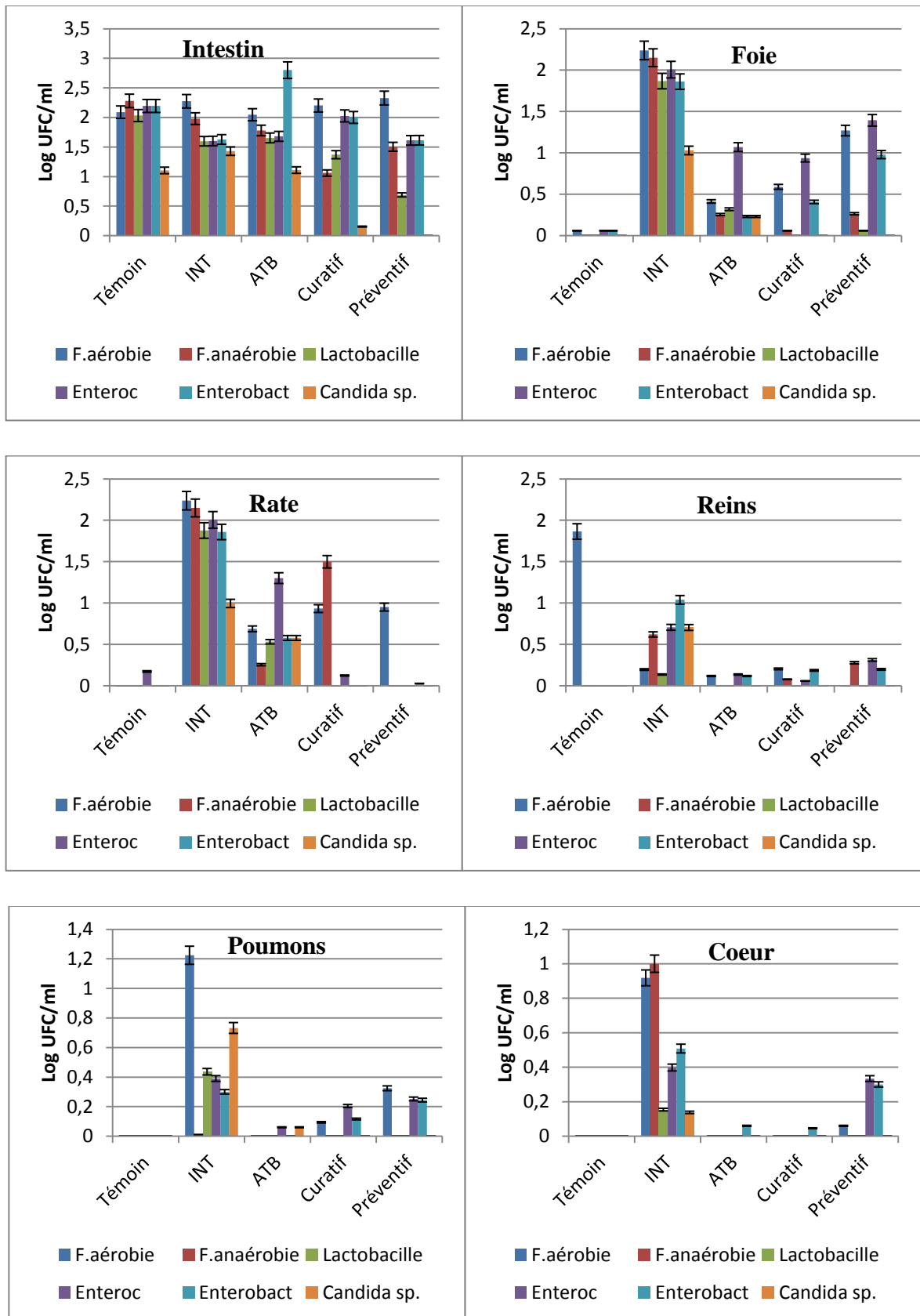
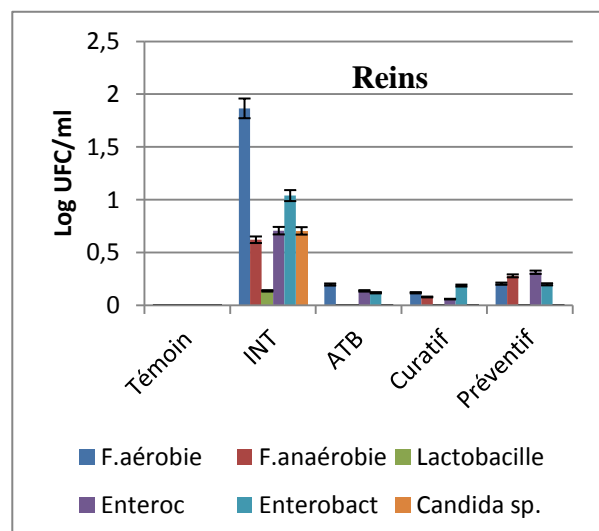
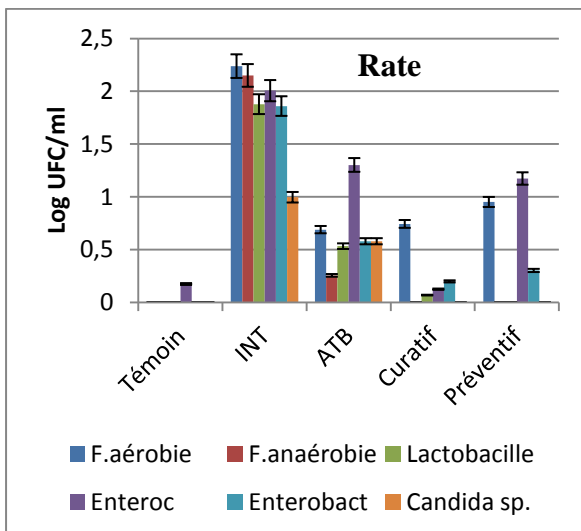
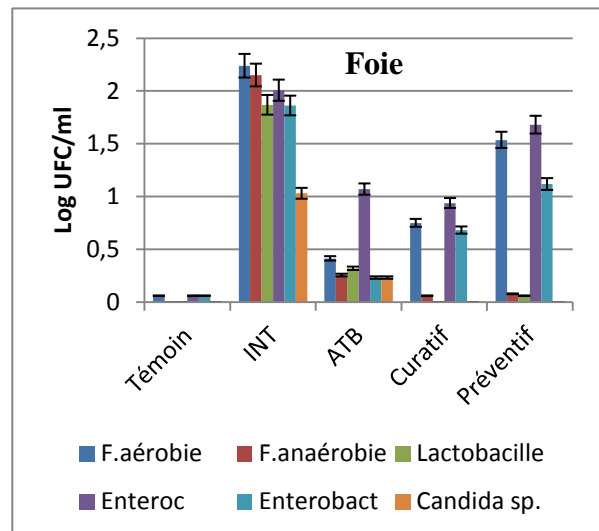
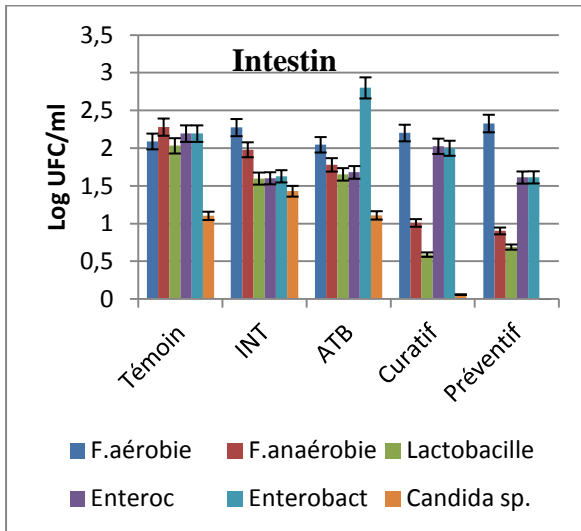
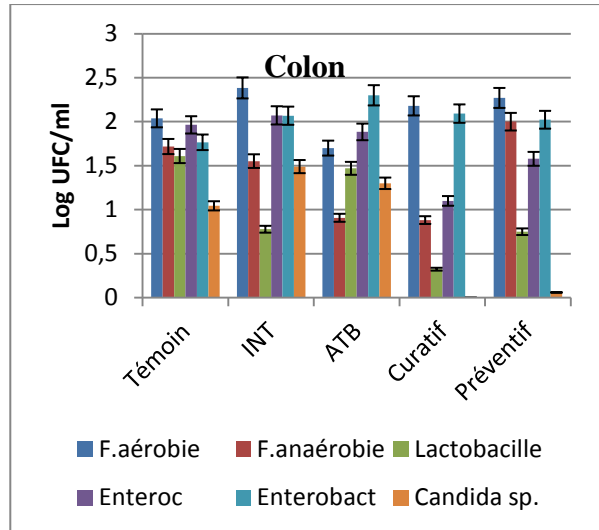
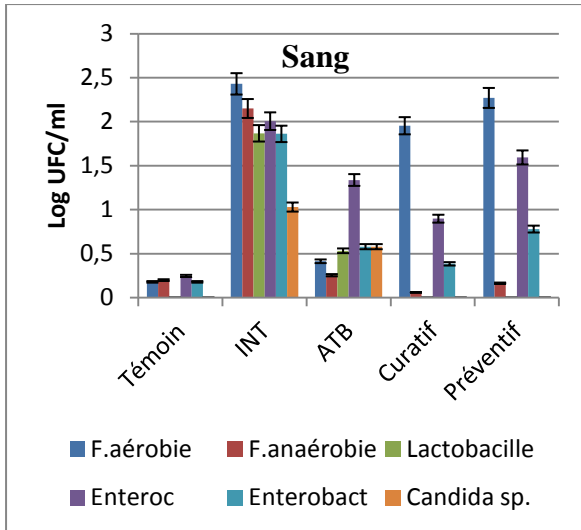


Figure n° 51: Etude de la translocation bactérienne dans les lots administrés de l'huile essentielle de *Z. album*.

En analysant ces résultats, le phénomène de translocation a été remarqué dans la plupart des lots et même dans le groupe de contrôle (Lot n°01), ces résultats sont en accord avec les études chez les rongeurs et les lapins en période néonatale (Ogra et Nasonky, 1984). Chez les mammifères, il semble aussi que la translocation bactérienne (TB) se produit spontanément au cours de la première semaine après la naissance, lorsque la colonisation de bactéries dans l'intestin aura lieu (Alverdy et Aoyes, 1991 ; Glod *et al.*, 1977; Van Camp *et al.*, 1993 ; Tir Touil Meddah *et al.*, 2001).

Dans le lot n° 2 (rats infectés non traités). La translocation bactérienne était abondante dans les différents organes internes et le sang ce qui peut être expliqué par les toxines de *B. cereus*, qui peuvent altérer les jonctions serrées de l'épithélium intestinal en modifiant les structures protéiques (153, 154) et ainsi augmenter la perméabilité para-cellulaire. Ainsi les démonstrations du passage de bactéries dans la circulation systémique depuis le tube digestif sont nombreuses. L'une des plus évidentes est l'étude de (Sori *et al.*, 1988) après administration des *Escherichia coli* marqués au ¹⁴C par voie entérale à des rats. Une hémorragie est survenue ou sept animaux sur 14 avaient des hémocultures positives à *E. coli* radiomarqué au carbone 14. Il semblerait que le degré de la translocation bactérienne de la lumière entérique est liée à la réponse inflammatoire et l'écoulement lent, mais pas au nombre de bactéries présentes dans la lumière. Cela indiquerait que la perturbation de la barrière intestinale est un facteur plus important que la croissance excessive de la microflore intestinale dans la survenue de la translocation bactérienne (Tir Touil Meddah *et al.*, 2001).

Pour les rats infectés et traités par l'antibiotique, on a pu remarquer une augmentation importante des entérobactéries surtout au niveau de l'intestin (iléon) et du colon, ceci est en parfaite concordance avec les travaux de Joubert (2015) qui ont confirmé que la prise d'ATB modifie la flore dominante normale par émergence et développement des bactéries endogènes et exogènes dans l'appareil digestif naturellement résistantes à l'ATB pris comme le cas de la vancomycine pour *E. coli* (Inserm, 2013).



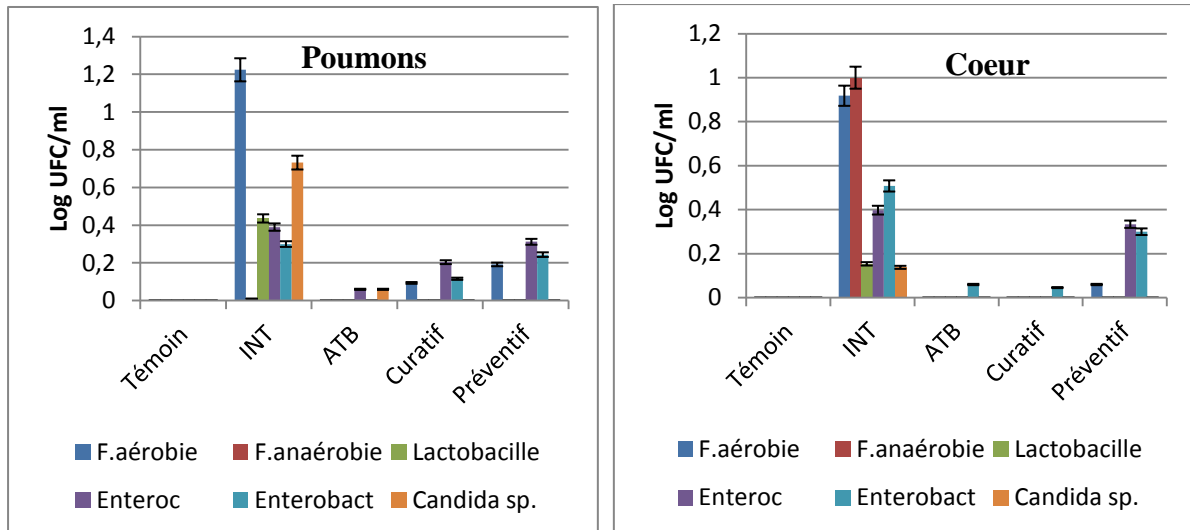
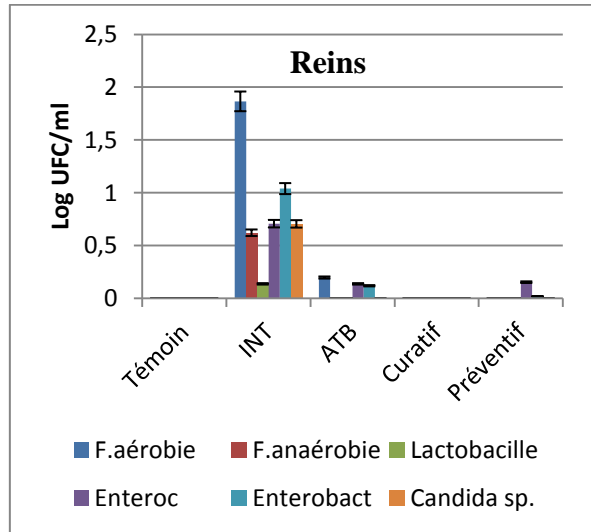
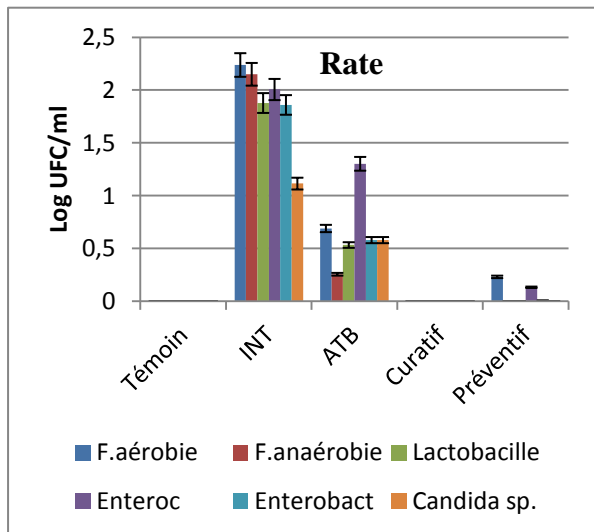
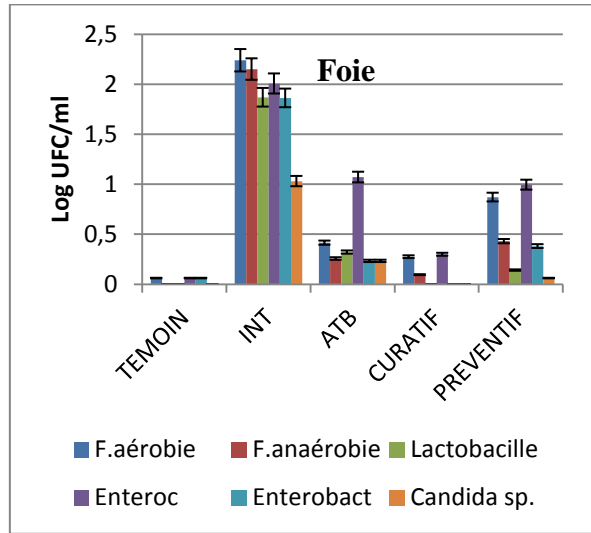
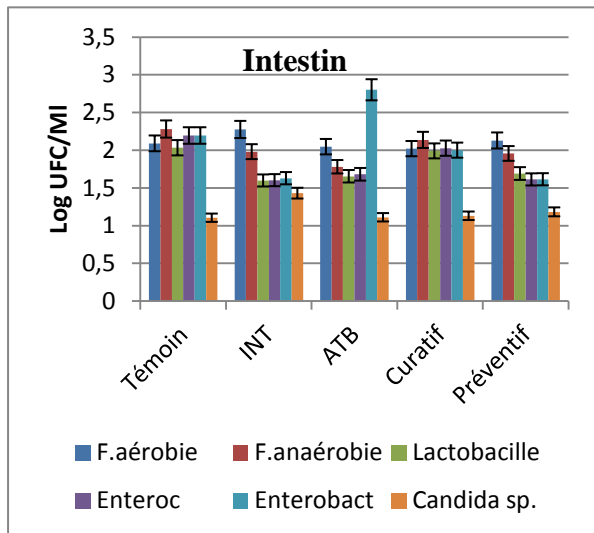
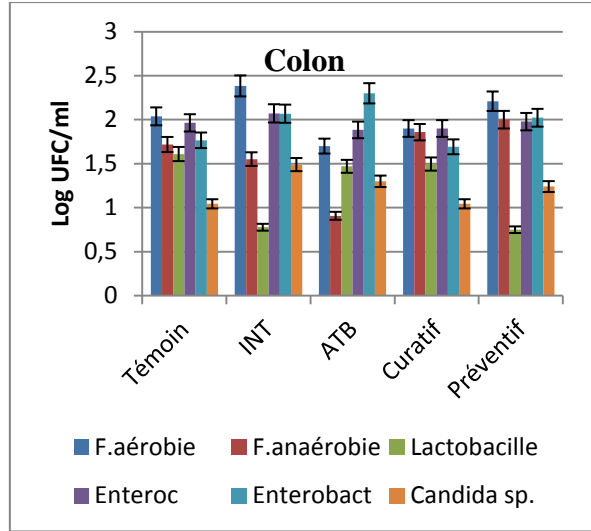
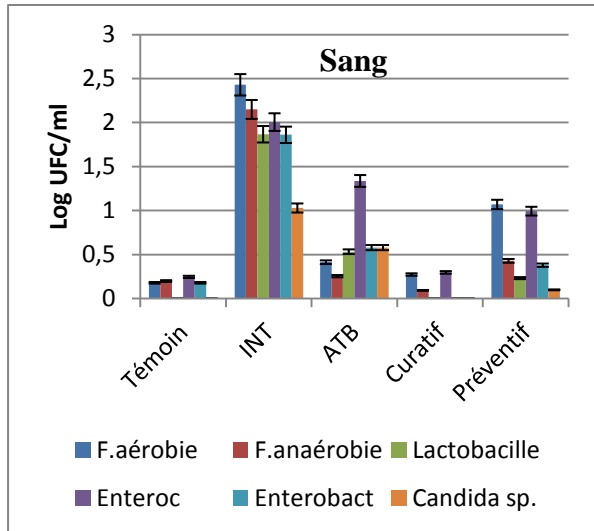


Figure n°52 : Etude de la translocation bactérienne dans les lots administrés de l'huile essentielle de *M. communis*

Par ailleurs la diminution significative ($p \leq 0,05$) chez la majorité des rats prétraités par les extraits de plantes surtout avec l'huile essentielle de *M. communis* (figure n°52) des germes de la flore résidante notamment les bactéries lactiques et les anaérobies stricts dans le tube digestif peut être expliqué par l'effet inhibiteur du germe pathogène sur la croissance de cette flore, en effet Stabb *et al.*, (1994) ont pu démontrer que si les spore de *B. cereus* sont capables de germer dans le tractus gastro-intestinal, ce qui pourrait expliquer l'effet sur la flore intestinale indigène, parce que les cellules végétatives sont connues pour avoir propriétés antibactériennes et antifongiques. Une autre étude intéressante à prouver que les spores de *B. cereus* ont le pouvoir de produire des bactériocines dans l'intestin grêle (Cherif *et al.*, 2003; Duc *et al.*, 2004).

L'augmentation du taux d'entérobactéries et d'entérocoques suite à l'infection par *B. cereus* est déjà démontré par une autre étude montrant que les coliformes étaient significativement importants en nombre dans les intestins de porcelets nourris par le probiotique *B. cereus* var. *toyoi* (Jadamus *et al.*, 2002).



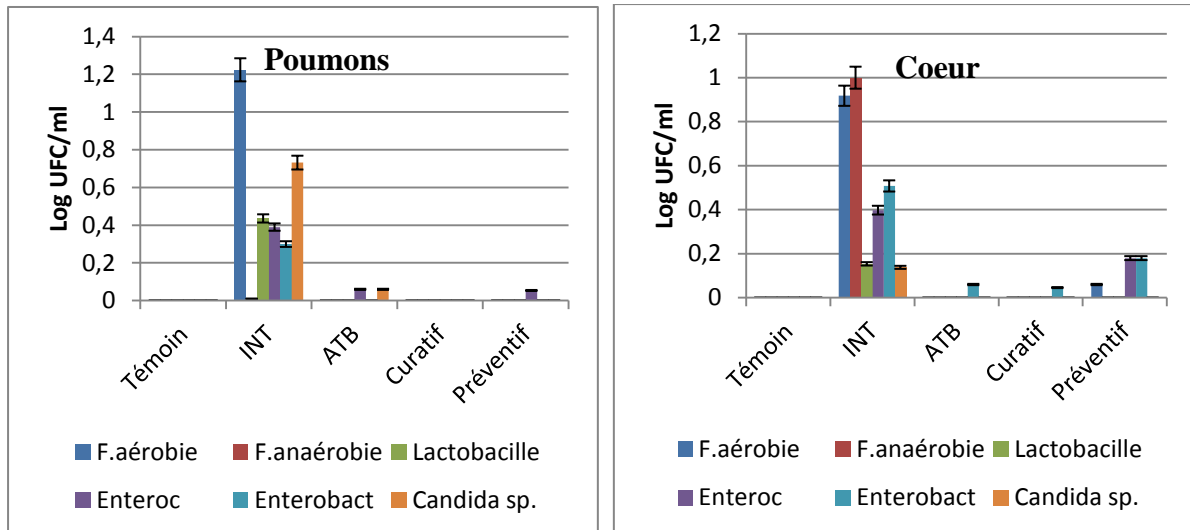
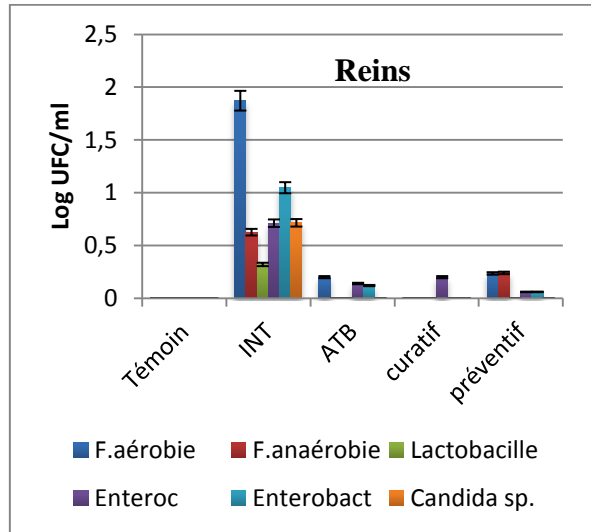
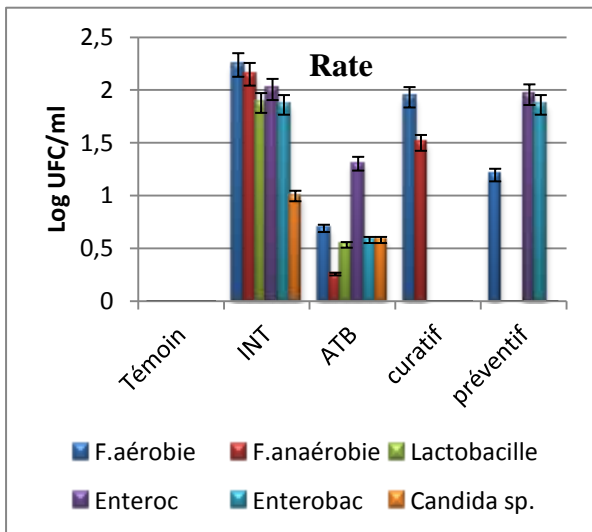
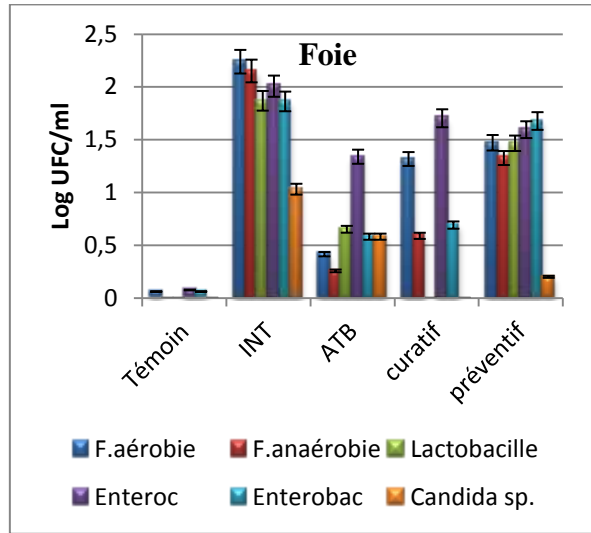
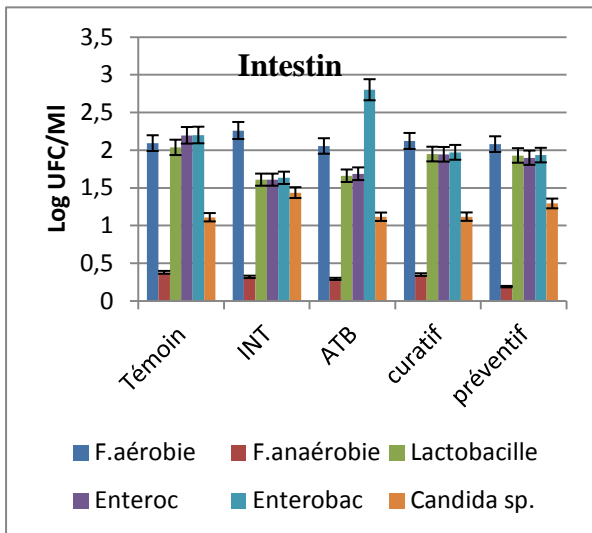
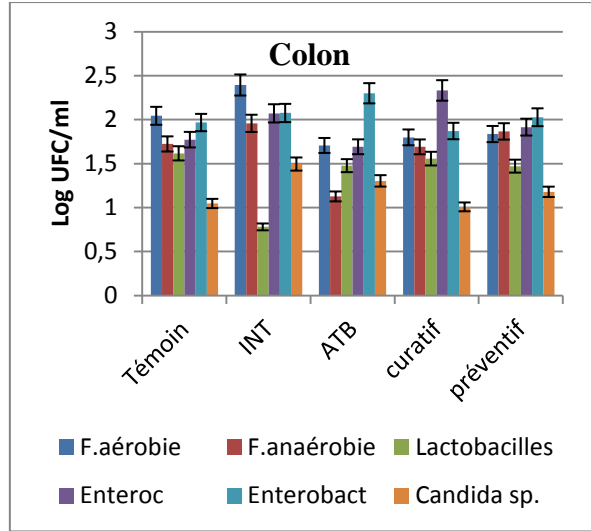
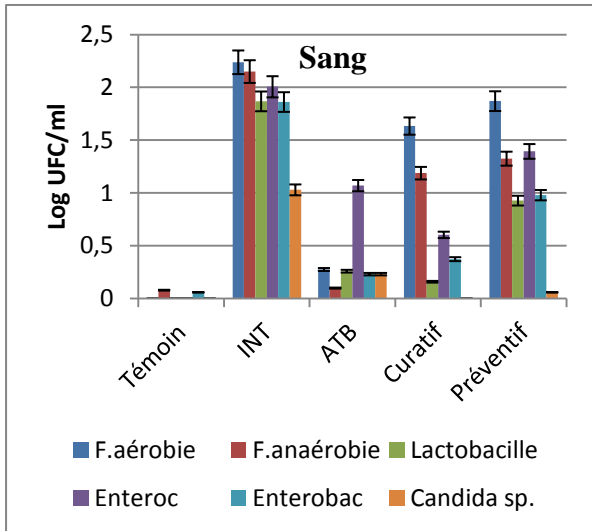


Figure n°53 : Etude de la translocation bactérienne dans les lots administrés de l'extrait méthanolique de *Z. album*

La contamination de la rate suite à la translocation bactérienne dans quelques lots prétraités par les extraits végétaux de *M. communis* est due à la fonction filtre de cet organe qui ne protège pas complètement des tube digestif (Baykal *et al.*, 1999). L'infection par *B. cereus* a toutefois conduit aussi à une augmentation de la taille de la rate, la contamination bactérienne du foie, et la colonisation des reins comme *Clostridium* protéolytiques (autre que *C. perfringens*), ceci a été prouvé par Tir Touil Meddah *et al.*, (2001). Contrairement à ça, l'extrait méthanolique de *Z. album* n'a pu démontré aucun effet sur la contamination des organes internes et même la sang par le germe pathogène et/ou la flore résidante par phénomène de translocation (figure n°53).



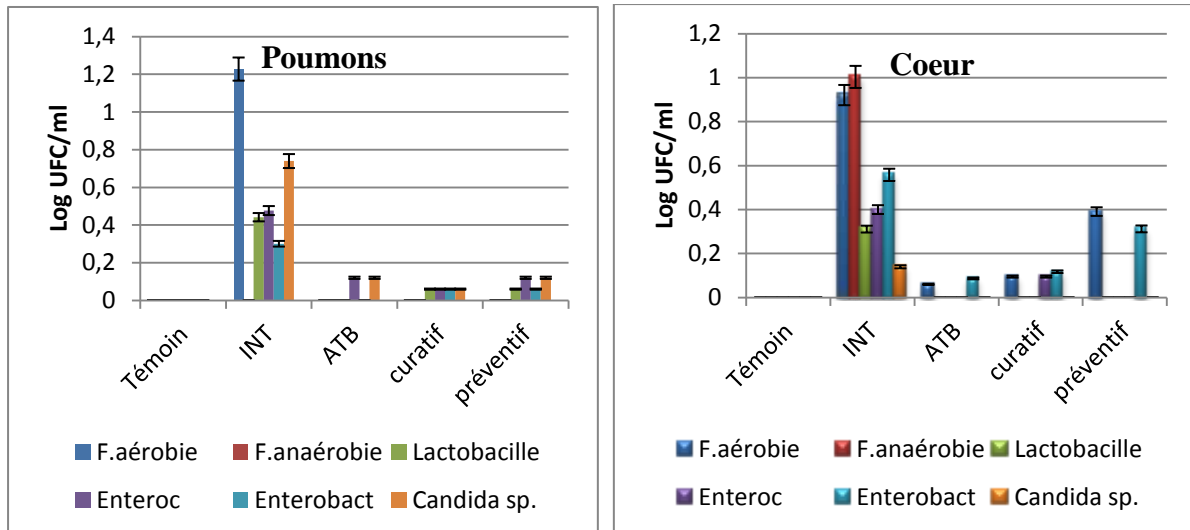


Figure n°54 : Etude de la translocation bactérienne dans les lots administrés de l'extrait aqueux de *M. communis*

D'une façon générale, trois facteurs sont réputés responsables de la translocation bactérienne: l'altération de la barrière muqueuse intestinale suite à des infections intestinales prouvée par la migration de l'ensemble des germes résidents vers d'autres organes internes, l'altération de la microflore intestinale aussi prouvée par la perturbation de quelques germes du tube digestifs et enfin les anomalies des défenses immunitaires qui ne sont encore pas élucidées dans notre travail. Sachant qu'un taux de TB élevé augmente la réponse métabolique, ainsi que le développement d'une septicémie, une prédisposition à des complications de la septicémie et la défaillance de plusieurs organes (Brooks *et al.*, 1993 et Haga *et al.*, 1997).

II.2.6. Résultats des analyses histologiques

Pour cette partie, nous avons préféré de présenter les résultats de l'étude anatomopathologique des tissus de foie, rate et intestins des rats sains, rats infectés par *B. cereus*, rats prétraités et rats traités oralement par l'ATB et par l'extrait méthanolique de *Z. album* qui s'est avéré comme le meilleur traitement vis-à-vis l'infection intestinale de *B. cereus*. Ils sont présentés sur les figures n°55,56,57.

➤ Foie

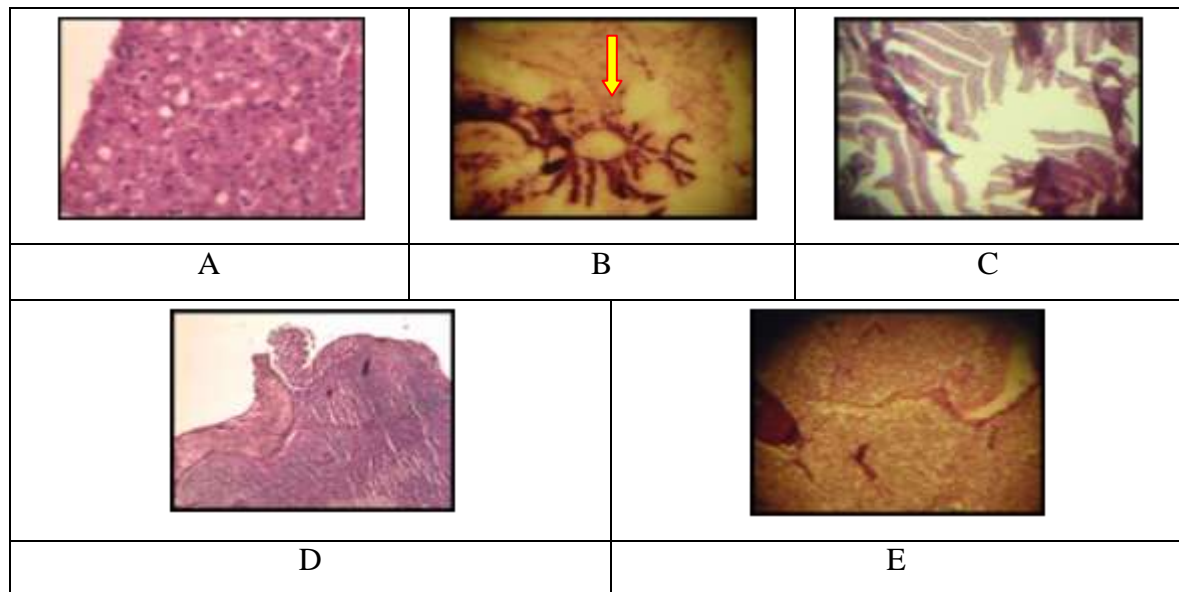


Figure n°55 : changements histopathologiques du foie dans les différents lots grossissement (100X)

(A: ZAMp; B: INT; C: ATB; D: T; E: ZAMc)

Pour le lot n°1(témoin), le foie des rats a montré généralement une architecture lobulaire Intact et hépatocytes normaux contrairement aux rats présent le lot INT(2), on a pu remarquer lors de la lecture des coupes des hépatocytes élargies avec de nombreuses vacuoles et les través hépatiques dissociées qui est une atteinte tissulaire grave due à la persistance de *B. cereus* dans le corps. En effet, l'apoptose ou une nécrose des hépatocytes reste l'un des principaux signes de lésions hépatiques dues à des composés toxiques (Gricilda et Molly, 2000).

Pour les rats infectés et traités par la vancomycine, l'histologie de leur foie est marquée par la présence des cellules légèrement inflammatoires avec infiltration et congestion vasculaire en ce qui concerne le lot prétraité par l'extrait méthanolique de ZAM, le Foie était caractérisé par des ports d' infiltration, et enfin et ce qui nous intéresse le plus , dans le lot infecté et traité par ZAM, le foie présentait des Hépatocytes avec une ration cytoplasmique nucléaire bien conservée et très légère inflammation.

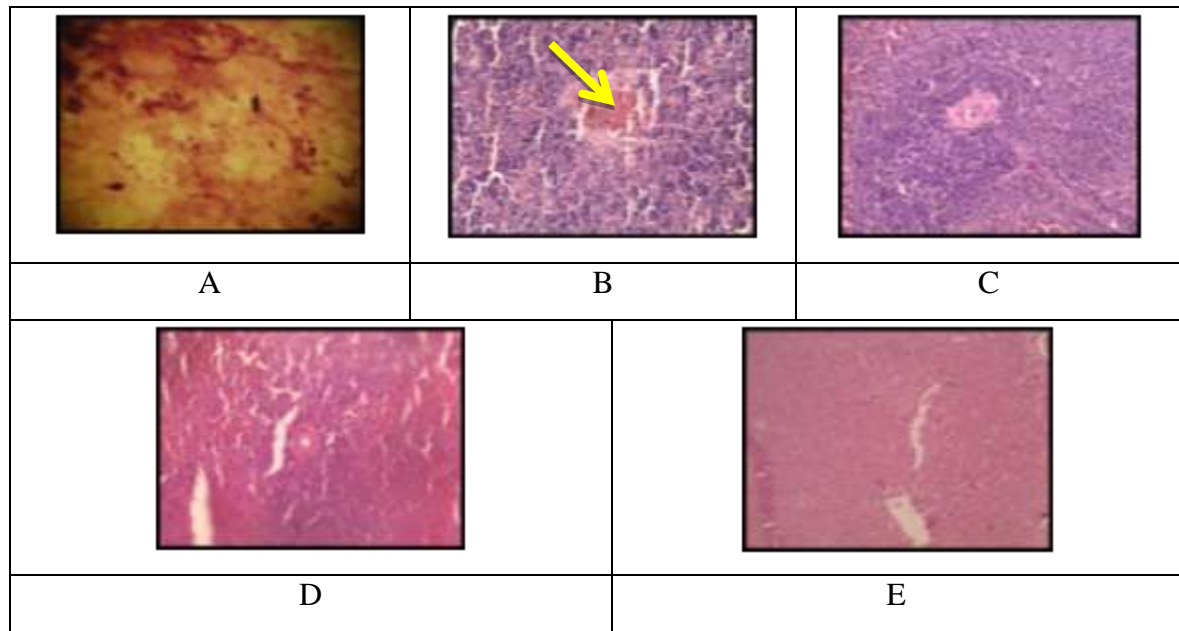
➤ **Rate**

Figure n°56: changements histopathologiques de la rate dans les différents lots
grossissement (100X)

(A:ZAMp;B:INT;C:ATB;D:T;E:ZAMc) (tri jaune:pulpe blanche,le reste c'est des pulpe rouges).

C'est une structure homogène issue du mésoderme, constituée d'une pulpe rouge vasculaire et une pulpe blanche, elle est branchée sur la circulation veineuse tout autour, notamment grâce à ses cellules tueuses normales (Natural Killer ou NK). Elle détruit aussi bien les germes que les éléments figurés dans le sang ce qui explique les fortes réactions envers certaines maladies, notamment les infections intestinales (Voigt, 2000).

Les observations microscopiques des lames du lot2 (INT) ont montré une réaction inflammatoire d'histiocytose dans la pulpe rouge des histiocytes arrondies à cytoplasme contenant des débris d'hématies ou de polynucléaires phagocytées (Possibilité de foyers suppuratifs ou d'abcès) d'une part, et une réduction de pulpe blanche d'autre part, pour les autres lots, on a remarqué une architecture histologique normale comparant au témoin.

➤ L'iléon

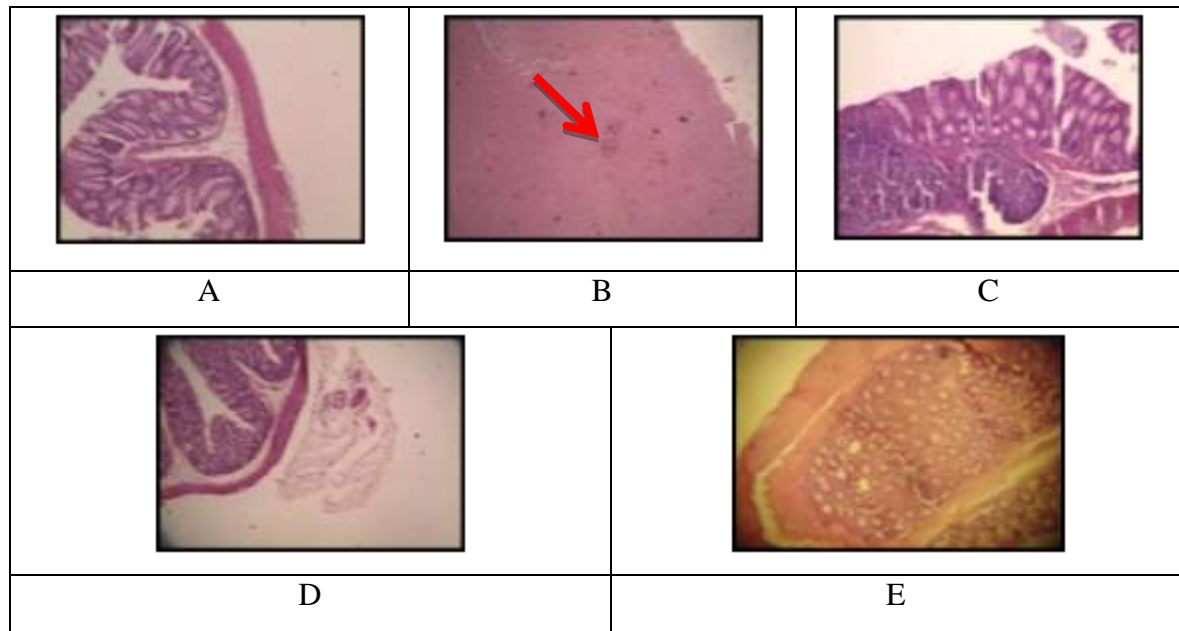


Figure n°57: changements histopathologiques de l'iléon dans les différents lots grossissement (100X) (A:ZAMp;B:INT;C:ATB;D:T;E:ZAMc)

L'iléon est la portion terminale de l'intestin, *B. cereus* ont une grande affinité pour le tissu lymphoïde de l'iléon terminal. La localisation initiale du germe se fait au niveau des plaques de Payer avec une bactériémie fréquente et importante (Stecher, 2007). l'examen histologique des rats infectés non traités (lot2, photo B) a démontré des modifications architecturales de la muqueuse intestinale par l'apparition des follicules lymphocytaires (hyperplasiques) principalement dans les cellules M des plaques de Peyer, Une exonécrose et une absence d'épithélium conduisent à un arrêt d'absorption des aliments.

L'examen histologique a révélé aussi dans plusieurs coupes et dans plusieurs secteurs du tissu intestinale des foyers inflammatoires : infiltrat riche en polynucléaire. Les follicules lymphocytaires apparaissent même chez les rats infectés prétraités et traités (lot 10,11 ; Photos E,A) qui peut expliquer que la durée de traitement ne suffisait pas.

Discussion Générale

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques, dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires (Popovici *et al.*, 2009).

En effet, par le présent travail, on a pu constater la relation proportionnelle entre la composition des extraits végétaux de nos de plantes (à savoir les extraits polyphénoliques et les huiles essentielles) et leur effet pharmacologique.

Ces résultats ont démontré clairement l'influence du solvant sur l'extractibilité des composés antioxydants, ceci a été déjà rapporté par Trabelsi *et al.* (2010). ce qui nous amène à confirmer que le méthanol est généralement considéré comme le solvant le plus efficace pour l'extraction antioxydants polaires. De plus, un remarquable effet antiradicalaire est élucidés par les extraits polyphénoliques que les huiles essentielles, certainement car les extraits polaires présentent une forte activité antioxydante que les extraits non polaires.

Donc la plus forte activité inhibitrice du DPPH de *M.communis* doit être liée à sa teneur en composés phénoliques plus élevée. Nos résultats sont en accord avec celui obtenu par Hayder *et al.*, (2001) qui ont étudié l'effet du solvant d'extraction sur DPPH activité de piégeage des extraits de feuilles de myrte de la Tunisie. La même remarque est faite pour les huiles essentielles, car la méthode d'extraction influe sur l'extractibilité de composants précis, prenant l'exemple de la méthode d'extraction des huiles essentielles lors de ce travail par entrainement à la vapeur produit généralement des composé volatils non antioxydants ce qui a été trouvé comme résultats par la DPPH test surtout pour l'huile esentielle de *Z.album*,néanmoins, Kordjani *et al.*, (2006) a pu démontré le contraire car l'extraction de cette huile par MAD et HD méthodes, elle a pu produire le 2,6-di-(tert-butyl)-para-benzoquinone qui montrait une activité antioxydante élevée.

Il n'y a pas que les solvant et la méthode d'extraction qui influencent sur la qualité des substance extraites,mais la méthode d'analyse de ces substance a aussi un impact sur le sélectionnement de tels composants, ceci a été prouvé par les travaux de Tuberosso *et al.*, (2006),en effet, Les chromatographies ne sont que des indicateurs de qualité : elles servent à connaître les concentrations des HE en principes actifs, mais ne permettent pas de déduire leurs propriétés sur la seule base de ces compositions.

Elles sont indispensables pour connaître leur profil phytochimique, et pour pouvoir différencier les chémotypes des plantes de base, leur origine géographique, leur condition de culture, de récolte et de distillation.

L'estimation correcte d'une activité antioxydante de l'huile essentielle nécessite une évaluation de sa concentration optimale. Parce que la spécificité et la sensibilité sont différents pour chaque méthode utilisée, il était impossible d'utiliser des quantités égales d'antioxydants pour chaque test. D'autre part, l'effet de l'utilisation de différents montants d'antioxydants dans les tests rend difficile la comparaison des résultats obtenus. Cependant. En conclusion, comme écrit précédemment Koleva *et al.*, (2002), le pouvoir anti-oxydant est fonction de la méthode choisie, la concentration et la nature et les propriétés physico-chimiques des antioxydants étudiés. Et Il est important de parvenir à une multitude des mesures de concentration différents pour éviter la conclusion erronée dans ces cas (Kulisic *et al.*, 2004).

L'ensemble de ces résultats a permis d'évaluer les activités antioxydantes des plantes choisies particulièrement sahariennes et de sélectionner les familles des composés phénoliques d'intérêts biologiques afin de mieux connaître, de valoriser et d'utiliser ces ressources dans le domaine thérapeutique. Pour plus d'efficacité, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées d'élargir le panel des activités antioxydantes *in vitro* et *in vivo* et d'autres tests biologiques : antitumorale, anticancéreuse et anti-inflammatoire et Caractériser et d'isoler les principes actifs responsables à ces propriétés pharmacologiques.

Pour la partie microbiologique, les résultats intéressants de l'activité biologique des extraits végétaux contre les bactéries testées peut être attribuée à la leur propriétés physicochimiques et à la présence des flavonoïdes; des acides phénoliques et des terpénoïdes (Laghrifi *et al.*, 2013). Ces travaux mettent en évidence le fait que c'est bien de l'ensemble des molécules que vient la totalité de l'efficacité de l'extrait végétal (HE ou E.polyphénolique), et non d'un seul « principe actif » qu'il est illusoire de vouloir l'isoler.

La toxicité aigüe des huiles essentielles remarquée chez le rat est à prendre en considération car le nombre de cas d'intoxications des HE au sens global du terme : allergies, sensibilisation, projection oculaire, ou application pure sur la peau ou les muqueuses, ingestion d'une trop grande quantité.... Il existe de nombreuses HE dangereuses de par leur

Discussion générale

composition qui ne figurent pas dans cette liste car bien moins démocratisées, à commencer par celles figurant sur la liste des HE réservées au monopole pharmaceutique.

Bien que la majorité des extraits végétaux ait montré un pouvoir antimicrobien important *in vitro*, cela demeure plus compliqué *in vivo*, car c'est tout un mécanisme complexe qui s'applique lors du traitement de l'infection par *B.cereus*.

Conclusion Générale

Et

Perspectives

Conclusion générale et perspectives

Etant donné la toxicité et/ou les effets secondaires indésirables des molécules de synthèse ainsi que la résistance de certains germes microbiens face aux médicaments existants, l'utilisation des plantes qui contiennent des composés bio-actifs est en progression constante.

En effet, compte tenu de leur meilleure biocompatibilité on observe une demande croissante des produits d'origine naturelle.

De plus, les polyphénols sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de plusieurs fonctions des fleurs, des fruits et parfois des feuilles ; près de 6500 flavonoïdes repartis en 12 classes sont connus, ils ont trouvé une large application comme antioxydants, anti-inflammatoires, antitumoraux, etc...

Par ailleurs, les huiles essentielles et les arômes extraits de plantes aromatiques et d'épices sont le résultat d'un mélange complexe de substances volatiles. Elles sont largement appliquées en agro-alimentaire et en phytothérapie.

L'objet de notre travail a porté sur l'étude phytochimique de *Myrtus communis* et *Zygophyllum album* qui sont des plantes utilisées en médecine Algérienne traditionnelle.

Une étude bibliographique réalisée sur ces espèces a montré que l'on ne disposait que de peu d'informations de nature chimique et/ou biologique. Pour pallier ce manque d'informations, notre étude s'est focalisée en première partie sur les analyses qualitative et quantitative de leurs extraits polyphénoliques (décocté aqueux, extrait dichlorométhanique, méthanolique et éthanolique) et leurs huiles essentielles puis sur des applications biologiques qui s'entourent vers une évaluation de l'activité antioxydante par différentes méthodes et aussi à l'évaluation de l'activité antimicrobienne de ces extraits *in vitro* et *in vivo* ;

D'après les résultats, on peut conclure que l'étude phytochimique qualitative et quantitative a démontré une richesse des deux plantes en composés bioactifs que ce soit dans leurs extraits polyphénoliques ou même dans les huiles essentielles, ce qui reste prometteur pour la valorisation de ces plantes à large spectre dans le domaine de la phytothérapie.

Conclusion générale et perspectives

De même, les extraits des composés phénoliques et des huiles essentielles de *M.communis* et *Z.album* ont révélé une activité antimicrobienne importante. En outre, les extraits examinés ont une activité antiradicalaire importante mais qui varie d'une méthode à une autre. Ces activités ont été trouvées sont probablement en relation navire avec la structure des composés phénoliques et la composition des huiles essentielles.

D'autre part, l'étude de la translocation bactérienne souligne la nécessité de prendre plus au sérieux les patients atteints de toxi-infections alimentaires pour la détection d'une septicémie précoce. Elle met également en évidence la nécessité d'enquêter sur l'amélioration des modalités thérapeutiques.

En perspectives, l'effet antimicrobien *in vivo* observé pourrait être amélioré par l'utilisation des concentrations plus faibles que celles testées, voire même inférieures à 100 mg/kg/j mais aussi l'investigation de mélanges d'extrait à base de plusieurs plantes. D'autre part, les résultats obtenus de l'étude de l'activité antimicrobienne *in vitro*, confirment que les extraits tanique et flavonoïdique pourraient bien rivaliser les produits chimiques synthétiques. Néanmoins, la purification et l'identification des flavonoïdes et des tanins ayant une activité antiseptique restent fortement recommandée pour approfondir non seulement les connaissances sur les différentes molécules pourvues de cette activité mais aussi pour cerner d'une manière plus fine les différentes actions possibles de ces composés et leur synergie. Ceci permettra dans le futur l'isolement de molécules potentiellement actives et des applications *in vivo* dans le traitement des certaines pathologies qui pourraient être envisagées pour valider ces premiers résultats.

Les résultats globaux de la présente étude *in vivo* fournissent des informations de base pour l'utilisation possible de l'extrait méthanolique de *Z.album* dans le traitement des infections intestinale , en particulier l'infection causée par *B.cereus*. En outre les données rapportées de toxicité aiguë ont montré que l'extrait peut être non toxiques. Ces observations peuvent justifier l'utilisation traditionnelle de la plante dans le traitement de la fièvre typhoïde alors *Z.album* a été trouvé pour être sur jusqu'à la dose de 800mg / kg, la marge de l'extrait méthanolique des plantes visées par l'enquête de sécurité et très encourageant pour l'évaluation biologique.

*Références
bibliographiques*

-A-

- **Abedini A., 2013.** Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes, thèse de doctorat en science des médicaments, Pp12, Université de Lille, France.
- **Adámez J.D., Samino E.G., Sánchez E.V., González-Gómez D., 2012.** *In vitro* estimation of the antibacterial activity and antioxidant capacity of aqueous extracts from grape-seeds (*Vitis vinifera* L.), Food Control 24 : 136–141.
- **AFNOR NF ISO 1242 (T 75-103), 1999.** Huiles essentielles. - Détermination de Huiles essentielles -- Détermination de l'indice d'acide - Méthode de référence (homologuée le 5 septembre 1994). Journal officiel du 23 février 1999, Num. 147 : Avis relatifs à l'homologation et à l'annulation de normes. NOR: ECOI9910009V.
- **AFNOR., 2000.** « Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 2. Monographies relatives aux huiles essentielles ». AFNOR, Paris, 661-663.
- **AFSSA, 2009.** Avis du 10 avril 2009 de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la demande d'avis complémentaire concernant les références applicables aux denrées alimentaires en tant que critères indicateurs d'hygiène des procédés.
- **Aghfir M., Kouhila A., et Ait M.L., 2007.** Séchage solaire convective pour la conservation des feuilles du romarin (*Rosmarinus officinalis*). 13eme journée internationale de séchage thermique. Albi, France.
- **Agroalimentaire,** synthèse bibliographique en biologie et biotechnologie.
- **Akhgar M. R., Rajaei P., and Poshteshirani F., 2015.** Composition of the Essential Oil of *Zygophyllum eurypterum* from Iran, Journal of Chemistry of Natural Compounds, 51:1351
- **Akin M., Aktumsek A., Nostro A., 2010.** Antibacterial activity and composition of the essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. and *Myrtus communis* L. growing in Northern Cyprus. Afr J Biotechnol;9(4):531–5.
- **Akli O., Beddar K., Djamel D., 1998.** Chemical composition and Antifungal activity of the *Myrtus communis* and *Pistacia lentiscus* essential oils of Mediterranean regions in laboratory medium and Strawberry fruit, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Volume 41, Issue 1 Pp. 123-125.
- **Alverdy J, Aoyo E., 1991.** The effect of glucocorticoid administration on bacterial translocation. Ann Surg 214,, 719–723

- **Amal M.Y., Khodair A.I., Hammouda F.M., and Hussein A.,2007.** Phytochemical and Toxicological Studies of *Zygophyllum album* L.f.: Journal of Pharmacology and Toxicology, 2: 220-237.
- **Amensour M., Sendra E., Abrini J., Bouhdid S., Pérez-Alvarez J.A., Fernández-López J., 2009.**Total phenolic content and antioxidant activity of myrtle (*Myrtus communis*) extracts. Nat Prod Commun.4(6):819-24.
- **Amie, D., 2003.** Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. Croat Sica Chemica Acta 76:55-61.
- **An G., Wei B., Xia B., Ju T., 2007.** Increased susceptibility to colitis and colorectal tumors in mice lacking core 3-derived O- glycans. J. Exp. Med. 204: 1417-1429.
- **Andersson A, Granum PE & Ronner U ,1998.** The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism. Int J Food Microbiol 39: 93–99.
- **AOAC, 1990.** In: Williams S. (Ed.), Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist International, 15th AOAC International, Arlington, Virginia,(USA).
- **Apostolou A., Stagos D., Galitsiou E., Spyrou A., Haroutounian S., Portesis N., et al. 2013.**Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts. Food Chem Toxicol; 61: 60-68.
- **APVB,2009.** Association de protection et de valorisation du patrimoine végétale et biologique, rédigé par Nawal Saïchi - Sophie Chaveroux, Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse).
- **Aranda M.J., Gianella R.A., 1999.**Acute diarrhoea: A practical review. Ame. J. Med., 106:670-676.
- **Arhab R., 2007.** Etude de la fermentescibilité in vitro et de la digestibilité *in vivo* de végétaux des zones arides et de sous-produits de l’agronomie saharienne par l’estimation de l’activité métabolique du microbiote ruminal d’ovins. Thèse de Doctorat. Université Mentouri Constantine. Algérie. 204 p.
- **Asche E., Butterfield W.C., 1974.** The effect of sepsis on acute gastric ulcerations in the rat. Surgery; 76: 764-70. 87

- **Ascioglu S., Rex J.H., de Pauw B., et al., 2002.**Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants an international consensus. Clin Infect Dis 34: 7–14
- **Ashnagar A., Gharib Naseri N., 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, 4969-4975.
- **Atta A.H., Mouneir S.M., 2004.**Journal of Ethnopharmacology 92, 303–309.
- **Ayad R., 2008.**Recherche et Détermination structurale des métabolites secondaires de

-B-

- **Baba Aissa F., 1999.**Encyclopédie des plantes utiles. Flore d’Algérie et du Maghreb. Substances végétales d’Afrique d’orient et d’occident, p 181.
- **Babic M, Hujer AM, Bonomo RA, 2006.** What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. Drug Resist Updat. Jun; 9(3):142-56.
- **Backman PA, Wilson M., and Murphy J. F., 1997.** Bacteria for Biological Control of Diseases in Rechcigl and Rechcigl, eds., Environmentally Safe Approaches to Crop Disease Control. pp. 95-109. CRC Press.
- **Bahorun T., 1997.** Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d’approvisionnement potentielle. Food and agricultural resarch council 83-94.
- **Bahri,F.,2014.** Isolement et caracterisation des souches de lactobacilles a caracteres probiotiques a partir de selles d’enfants,thèse de doctorat en Microbiologie appliquée,Université de Constantine .
- **Bajalan I., Akbarzadeh M., and Veysanlu F.,2014.**Chemical Composition of Myrtle Essential Oil (*Myrtus Communis L.*) in Gilane Gharb from Iran, Volume: 1 Issue: 5(2) Pages: 59-65.
- **Baliga M. S., 2004.** Piper Betel Linn (Betel Vine), the Maligned Southeast Asian Medicinal Plant Possesses Cancer Preventive Effects: Time to Reconsider the Wronged Opinion. Asian Pacific J Cancer Prev, 12, 2149-2156
- **Ballongue J., 1988.** Bifidobacteria and probiotic action. Chapter 17. In: lactic acid bacteria, New York, pp: 519-587.
- **Barboni T., 2006.** Contribution de méthodes de la chimie analytique à l’amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d’incendie. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l’université de Corse, p26.

- **Barboni T., Venturini N., Julien Paolini J., Desjobert M., Chiaramonti N., Costa B., 2010.** Caractérisation of volatiles and polyphenols for quality assessment of alcoholic beverages prepared from Corsican *Myrtus communis* berries. Food Chemistry 122: 1304–1312.
- **Barouki, R., 2006.** Stress oxydant et vieillissement, Med Sci (Paris), Vol. 22, N° 3; p. 266-272
- **Bayala, B., 2014.** Etude des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-prolifératives et anti-migratoires des huiles essentielles de quelques plantes médicinales du Burkina Faso sur des lignées cellulaires du cancer de la prostate et de glioblastomes, thèse de doctorat en physiologie et génétique moléculaire, Clermont-Ferrand.
- **Baykal A, Aydin C, Haşcelik G, Ayhan A, Korkmaz A, Sayek I, 1999.** Experimental study of the effects of splenectomy and partial splenectomy on bacterial translocation. J Trauma ; 46 : 1096-9.
- **Baytop T., 1999.** Therapy with medicinal Plants in Turkey (Past and Present), Nobel Tıp Kitapevleri Press, Istanbul.
- **Bekro Y.A. et al., 2007.** Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia*.
- **Belguidoum M., Dendougui H., and Kendour Z., 2012.** In vitro antioxidant properties and phenolic contents of *Zygophyllum album* L. from Algeria. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 7(1):510-514.
- **Belyagoubi N., 2011.** Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien, Thèse de doctorat en Biologie, Université de Tlemcen, Algérie.
- **Ben Amar M., Louis L, 2002.** Les psychotropes: pharmacologie et toxicomanie. Éditions Les Presses de l'Université de Montréal.
- **Ben Arfa A, et al. 2006.** Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. Lett Appl Microbiol 43(2):149-54
- **Benhammou N., Atik Bekkara F., Kadifkova Panovska T., 2008.** Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. C. R. Chimie, 12: 1259–1266
- **Benhamou N., 2011.** Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien, Thèse de doctorat, Université de Tlemcen, Algérie.

- **Béraud N.,2001.** Le technicien d'analyses biologiques,guide théorique et pratique.Tec Doc,Lavoisier,988-990,Paris.
- **Berg R.D., 1983.** Translocation of certain indigenous bacteria from the intestinal tract. In human intestinal microflora in health and diseases. *Hentges. J. Academic Press, New York*: 333-351.
- **Berg R.D., 1992.** Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *J. Med.* 23:217-244.
- **Berka-Zougali B., Ferhat M.-A., Hassani A., Chemat F., Allaf K.S.,2012.** Comparative study of essential oils extracted from Algerian *Myrtus communis L.* leaves using microwaves and hydrodistillation, *International Journal of Molecular Science*,13 : 4673–4695.
- **Bernhard, K., Schrempf, H., Goebel, W. 1978.** Bacteriocin and antibiotic resistance plasmids in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*.*J. Bacteriol.* 133:897-903.
- **Berzou,S.,2013.** Effets d'un extrait aqueux lyophilisé de *Zygophyllum gaetulum* sur le profil lipidique et le statut redox, chez des rats soumis à un régime enrichi en cholestérol,thèse de magister en Biologie,Université d'Oran.
- **Betti H.A., Stein A.C., Dallegrave E. et al.,2012.** Acute and repeated-doses (28 days) toxicity study of *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt (Guttiferare) in mice. *Food and Chemical Toxicology* (In press).
- **Bevilacqua,S.,2011.** Évaluation de l'impact d'une équipe opérationnelle en infectiologie sur la consommation et le coût des antibiotiques au CHU de Nancy. (Essai d'intervention contrôlé), thèse de doctorat en science de la vie et de la santé, Université de Nancy.
- **Bidie,P.,Banga,B.,Guessan,N.,Adou,F.,2011.**Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne, *Sciences & Nature* Vol. 8 N°1: 1 – 11
- **Bielskx, B. H. J., Richter, H. W. & Chan, P. C. 1975.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 258, 231.
- **Bisso J., Poupard P., Pawlus A.D., Pons A., Darriet P., Mérillon J.M. & Waffo-Téguo nP., 2011.**Development of hybrid elution systems for efficient purification of stilbenoids using centrifugal partition chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218, p.6079-6084.
- **Bobba S, Ponnaluri VK, Mukherji M, Gutheil WG, 2011.** Microtiter Plate-Based Assay for Inhibitors of Penicillin-Binding Protein 2a from Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* Jun; 55(6):2783-7.
- **Boclé J.C., Baelde D., Brassart D., 2005.** Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte, pp : 1-128.

- **Boochird C., & Flegel M.W., 1982.** In vitro antifungal activity of Eugenol and Vanillin against *candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. Can.J. Microbiol., 28: 1235-1241.
- **Bossche ,V., Dochy, F., Segers, M.,P., & Gijbels, D. 2003.** Effects of problem-based learning: a meta-analysis. Learning and Instruction, 13, 533-568.
- **Bouaziz A.,2015 b.**Screening of the antioxidant and hypotensive activities of some medicinal plants in relation to their polyphenolic contents,thèse de doctorat en biology,Université de Sétif,Algérie.
- **Bouaziz A.,khenouf,S.,Abuzarga M., Abdalla S., Baghiani A., Charef N.,2015.**Phytochemical analysis, hypotensive effect and antioxidant properties of *Myrtus communis L.* growing in Algeria,Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 5(1): 19-28
- **Boubacar S.A., 2005.** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Combretum glutinosum* Perr.ex DC (COMBRETACEA),Thèse de doctorat en Pharmacie,Université de Bamako,Mali.
- **Boubekri C., 2014.** Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques,Thèse de doctorat en science,Université de Biskra,Algérie.
- **Boukada ,F.,2012** Etude phytochimique,activité antioxydante et antibactérienne d'*Ajuga iva*,*Adiantum capilus-veneris* et *Lavandula stoechas*,thèse de magister en Biologie,Université de Mascara.
- **Boumaza A., 2009.** Effet de l'extrait méthanolique de *Zygophyllum cornutum* coss contre le stress oxydant associé au diabète sucré et les organes en relation,these de magister en biologie cellulaire te moléculaire,Université de Constantine,Algérie.
- **Bouzabata A., Cabral C., Goncalves M., Cruz M., Bighelli A., Cavaleiro C., Casanova J., Tomi F., Salgueiro L.,2015.***Myrtus communis* as source of bioactive and safe essential oil,J of food and chemiacal toxicology,75 :166-172.
- **Bouzabata A., Castola V., Bighelli V., Abed L., Casanova J., Tomi F.,2013.**Chemical variability of Algerian *Myrtus communis L.* Chem.Biodivers.10,129-137.
- **Bradesi P., Tomi F., Casanova F., Bernardini F.A.,2012.**Chemical Composition of Myrtle Leaf Essential Oil from Corsica (France), Journal of Essential Oil Research, 9:3, 283-288.
- **Brooks SG, May J, Sedman P, Tring I, et al.,1993.** Translo- cation of enteric bacteria in humans. Br J Surg 80,, 901–902

- **Bruneton J., 1993.** Pharmacognosie, Phytochimie: Plantes médicinales ; Ed 2: TEC et DOC.
- **Bruyère F., 2010.** Maîtrise de la diffusion des bactéries multirésistantes aux antibiotiques. CHU de Tours. 104^{ème} édition du congrès de l'Association Française d'Urologie. Pp : 01 - 05.
- **Bugnon-Reber A.V., 2004.** Etude d'observation de l'utilisation des antibiotiques en milieu hospitalier ROMAND. Faculté de Médecine. Université de Genève. Pp : 6.
- **Buronzo ,A.,2016.** Anti-âge : choisissez-vous les « bons » antioxydants ?,Plante et Bien-etre,n°26.
- **Burt S., 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. A review. International Journal of Food and Microbiology. 94: 223-253.
- **Burton. G.W., and Ingold, K.U. 1984.** J. Am. Chem. Soc. 103, 6472-6477.

-C-

- **Canillac, N., Mourey, A., 2001.** Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. Food Microbiology 18, 261–268.
- **Canton E., Pema N., Viudes G., Gobernado M. and Espinel-Ingroff A., 2003.** Minimum fungicidal concentration of amphotericin B for bloodstream *Candida* Species. Diagn. Microbial. Infect. Dis ; 45 :203-206.
- **Cao,G., and Prior,L.,;1995.** Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum, Clinical Chemistry 44:6:1309–1315.
- **Centre d'analyse stratégique, novembre 2012.** Présentation de la Note d'analyse « Les bactéries résistantes aux antibiotiques », France.
- **Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique (CTCB),2007.** FICHE TECHNIQUE : *Bacillus cereus*, Fiche technique _ Bactériologie 71.
- **Chaaib K. F., 2004.** Investigation phytochimique d'une brosse à dents africaine *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler (Syn. *Fagara zanthoxyloides* L.) Rutaceae. Thèse de doctorat Université de Lausanne (Suisse), 199 p.
- **Chalchat J.C. & Gary P., 1992.** Les huiles essentielles du Myrte du pourtour méditerranéen. Rivista Ital. EPPOS, no special 10"5 journées internationales des huiles essentielles, Digne-les-Bains, 5-7/9/1991, 524- 532.

- **Chaouch M., 2010.** Recherche et Détermination Structurale des Composés Flavoniques de l'espèce : *Myrtus communis L.* (Myrtaceae), thèse de magister en chimie organique, Constantine, Algérie.
- **Cherif A, Chehimi S, Limem F, Hansen BM, Hendriksen NB, Daffonchio D & Boudabous A., 2003.** Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis ssp. entomocidus* HD9. *J Appl Microbiol* 95: 990–1000.
- **Chérif M., Arfaoui A. et Rhaiem A., 2003.** Phenolic compounds and their role in biocontrol and resistance of chickpea to fungal pathogenic attacks. *Tunisian Journal of Plant Protection* (2): 7-21.
- **Cheung L. M., Cheung P. C. K., & Ooi V. E. C., 2003.** *Food Chemistry*, 81, 249–255.
- **Chidouh A., 2014.** Caractérisations chimiques et physico-chimiques des extraits hydrosolubles du myrte (*Myrtus communis*). thèse de doctorat LMD, Université de Annaba, Algérie.
- **Choe E. et Min D. B., 2005.** Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods.
- **Christophe P. & Christophe S., 2011.** Physiologie, pathologie et thérapie de la CLEVENGER JF. « Apparatus for volatile oil determination, Description of New Type ». *American Perfumer & Essential Oil Review*, 1928, 467-503.
- **Chu C. J. et Kemper K. J. 2001.** Lavender (*Lavandula spp.*). Longwood Herbal Task Force. 32p.
- **Chutia M., Deka Bhuyan P., Pathak M. G., Sarma T. C et Boruah P., 2008.** East India. *Food Science and Technology*. 3, 777- 780.
- **Cibik R., Marcille F., Corthier G., Doré J., 2004.** Bacterial intestinal flora: development, characteristics and influence of the type of feeding. *Arch pédiatrie*. 11: 573-575.
- **Cinical and Laboratory Standars Institute, 2004.** Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved standard, M2-A9, 9th ed., CLSI, Wayne, PA.
- **Cinical and Laboratory Standars Institute, 2006.** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, approved standard, M2-A9, 9th ed., CLSI, Wayne, PA.
- **Clavel T., Carlin F., Lairon D., Nguyen C., and Schmitt P., 2004.** Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach: *J Appl Microbiol* 97:214–219.

- **Cocconier M.H., Bernet M.F., Kerneis S., Chauviere G., Fourniat J., Servin A.L., 1998.** Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal caco2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion. *FEMS Microbiol Lett.* 110: 299-305.
- **Conway PL., 1995.** Microbial ecology of the human large intestine. In: human colonic bacteria: role in nutrition, physiology and pathology, pp: 1-18.
- **Coonrod, J.D., Leadley, P.J., Eickhoff, T.C. 1971.** Antibiotic susceptibility of *Bacillus* species. *J. Infect. Dis.* 123:102-105.
- **Cooper J.C., 1979.** Isolated duodenal varices as a cause of massive gastrointestinal bleeding. *Br. J. clin. Pract.* 47: 111.
- **Cornic G., 2007.** Effet de la température sur la photosynthèse, P53, Paris.
- **Cray W.C, Moon H.W., 1995.** Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7: *Applied and Environmental Microbiology*, 61:1586-1590.
- **Cummings, J. H., Gibson, G. R. & Macfarlane, G. T., 1989.** Qualitative Estimates of Fermentation in the Hind Gut of Man. *Acta Veterinaria Scandinavica Suppl.* Vol. 86,pp. 76-82.

-D-

- **De Cliff S., et Harerimana P.C., 2013.**Extraction de l'huile essentielle complète des fleurs de *Cananga odorata* de la pleine de l'Imbo : vers la vulgarisation d'une nouvelle filière de plantes industrielles au Burundi.Revue de l'université de Burundi,Série sciences exactes V :28 :1-17.
- **De Figueredo A.C.,Barosso J.G., Pedro L.G., et Scheffer J.C.,2008.** Factory effecting secondary metabolites production in plant : volatils components and essential oils, *Flavour Fragrance Journal*,Vol.23 :213-226.
- **Debussche M., and Isenmann P., 1989.** Fleshy fruit characters and the choices of bird and mammal seed dispersers in a Mediterranean region. *Oikos*, vol.56 (3): 327-338.
- **Debussche M., Cortez J., and Rimbault I., 1987.** Variation in fleshy fruit composition in the Mediterranean region: the importance of ripening season, life-forme, fruit type and geographical distribution. *Oikos*, vol. 49 (3): 244-252.
- **Deeni Y.Y., Hussain H.S., 1991.** Screening for antimicrobial activity and for alkaloides. *J Ethnopharmaol* 35: 91-96

- **Delattre J., Beaudoux J.-L., et Bonnefont- Rousselot D., 2005a.** "Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques." 1- 23.
- **Delattre J., Beaudoux J.-L., et Bonnefont- Rousselot D., 2005b.** "Radicaux libres et stress oxydant, Aspects biologiques et pathologiques." 87-108.
- **Delattre J., Beaudoux J.-L., et Bonnefont- Rousselot D., 2005c.** "Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques." 45-60.
- **Delmas G., Jourdan da Silva N., Pihier N., Weil F. X., Vaillant V., De Valk H., 2010.** Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 2006 et 2008. Bulletin épidémiologique hebdomadaire 31-32, 344-348
- **Demarne F.E., 1985.** « Le géranium rosat ». Parfums, Cosmétiques et Arômes, n°62.
- **Derwich E., Manar A., Benziane Z et Boukir A., 2010.** GC/MS Analysis and In vitro Antibacterial Activity of the Essential Oil Isolated from Leaf of *Pistacia lentiscus* Growing in Morocco. World Applied Sciences Journal. 8, 1267-1276.
- **Dewanto V., Wu X., Adom K.K., Liu R.H., 2002.** J. Agric. Food Chem. 50 :3010–3014.
- **Diallo A., 2005.** Etude de la phytochimie et des activités biologique de *Syzygium guineense*.
- **Diaz A.M., Abeger A., 1987.** Myrtus communis composition quimicay actividad biologica de sus extractos, Una revision, Fitoterapia 8: 167 – 174.
- **Dietch AE., maejima K., berg RD., 1984.** Effect of oral antibiotic and bacterial overgrowth of the translocation of the gastrointestinal tract microflora in burned rats. *J. trauma.* 25: 325-392.
- **Diezi J., 1989.** Toxicologie: principes de base et répercussions cliniques. in "pharmacologie. Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques". Ed. Slatkine-Geneve, pp. 3344.
- **Dinand E., 1997.** Microfibrilles de cellulose. Isolement à partir de pulpes de betterave, caractérisation et propriétés. Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier-Grenoble I. Pp. 22-80.
- **Djahra A.B., 2014.** Etude phytochimique et activité antimicrobienne,antioxydante, antihepatotoxique du Marrube blanc,Thèse de doctorat en Biologie,Université de Annaba.
- **Dohou N., et al., 2003.** Screening Phytochimique d'une Endémique IBÉRO-MAROCAINE.
- **Dramane S., et al ; 2010.** Evaluation des activités antimicrobiennes et antiradicaux libres de quelques taxons bioactifs de Côte d'Ivoire ; Euro Journal of Scientific Research 40 (2) ; p: 307-317.

- **Dubois M., 1956.** Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical chemistry*, 28:350-356. Étude de l'activité antiradicalaire et antioxydante, fractionnement des substances actives et effet de la glycation." Microbiologie Doctorat.
- **Duc L.H., Hong H.A., Barbosa T.M., Henriques A.O.,Cutting S.M.,2004.** Characterization of Bacillus probiotics available for human use: *Appl Environ Microbiol* 70: 2161–2171.
- **Dufour D., Pichette A., Mshvildadze V., Hébert M. E. B., Lavoie S., Longtin A., et al.,2007.**Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum Retzius*. *Journal of Ethnopharmacology*, 111,22–28.
- **Duke J., 2009.** The Healing Cat's Claw, Amazonian Ethnobotanical Dictionary.
- **Duncan SH., Louis P., Flint H.J., 2007.** Cultivable bacterial diversity from the human colon. *Lett. Appl. Microbiol*, 44: 343
- **Duong, H.A., Nagaraj, R., Wang, C.W., Ratnaparkhi, G., Sun, Y.H., Courey, A.J. 2008.** Non-cell-autonomous inhibition of photoreceptor development by Dip3. *Dev. Biol.* 323(1): 105--113.
- **Dupont F., Guignard J.L., 2007.** Abrèges botanique systématique moléculaire. 14 éditions révisées, Masson.
- **DuPont H.L., 2005.** What's new in enteric infectious diseases at home and aboard. *Curr opin. Infect Dis.* 18: 407-412.

-E-

- **Ebrahimi N.S., Hadian J., Mirjalili M.H., Sonboli A., et Yousefadi M., 2008.**Essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food chemistry*. 110: 927-931.
- **El Bouhissi,H.,2014.** Contribution à l'étude de la biodiversité floristique dans un écosystème montagneux Cas de versant sud de monts de Tessala (Algérie occidentale).
- **El Gharras, H., 2009.**"Polyphénols: food sources,properties and applications,international journal of food science and technology 44(12):2512-2518.
- **El Ghou J., Ghanem-Boughanmi B., Ben-AttiaM., 2011.** Biochemical study on the protective effect of ethanolic extract of *Zygophyllum album* on streptozotocin-induced oxidative stress and toxicity in mice,*Biomedicine & Preventive Nutrition* 1:79–83
- **El Hilaly J., Israili Z.H., & Lyoussi B., 2004.** Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 91: 43-50.

- **Elgamal M. H. A., Shaker K. H., Pöllman K., & Seifer K., 1995.** Triterpenoid saponins from *Zygophyllum* species. *Phytochemistry*, 40(4), 1233–1236.
- **El-Shora Hamed M., Yaser El-Amier A., and Menna Awad H., 2016.** Antimicrobial Activity and Allelopathic Potential of *Zygophyllum coccineum L.* on *Chenopodium album L.* *British Journal of Applied Science & Technology* 15(5): 1-10.
- **El-Sissi H.I., El-Ansary H., 1967.** *Planta Medica*, 1: 41-51.
- **Eman M.A, Hoda M.Z., 2008.** Studies on the effect of garlic preparation on *Escherichia coli* O157:H7 causing enteritis in lambs. :Egy. *J. Clinical Pathol.* 21(4):102-129.
- **Eroschenko V.P., Williams and Wilkins. 2000.** Di Fiore's atlas of histology with functional correlations. 9th ed. Philadelphia.
- **Espinel-Ingroff A., 2007.** Standardized Disk Diffusion Method for Yeasts with the National Committee for Clinical and Laboratory Standards institute (CLSI formerly F8 J, - Références bibliographiques NCCLS) M44-A reference method for testing *Candida* spp. *Clin. Microbiol. New*; 29 (13): 97-100.
- **Euzéby J.P., 2010.** *Bactériologie Générale et Médicale.* Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.
- **Evans P., et Halliwell B., 1999.** "Free radicals and hearing: Cause, consequence, and criteria." *Annals of the New York Academy of Sciences* 884: 19-40.

-F-

- **Falla H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C., 2008.** Phenolic composition of *Cynara cardunculus L.* organs, and their biological activities. *C. R. Biol.* 331 (5): 372-379.
- **Falleh H., Oueslati S., Guyot S., Ben Dali A., Magné C., Abdelly C., et al., 2011.** LC ESI-MS/MS characterisation of procyanidins and propelargonidins responsible for the strong antioxidant activity of the edible halophyte *Mesembryanthemum edule L.* *Food Chemistry*, 127, 1732–1738.
- **Farnsworth N.R., Akerele O., Bingel A. S., Soejarto D. D., et Guo Z., 1986.** Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bulletin de l'organisation mondiale de la santé.* 64 (2) : 159-164.
- **Fasano A., 2001.** Bacterial infections: small intestine and colon. *Curr opin gastroenterol.* 17: 4-9.

- **Ferrari J., 2002.** Contribution à la connaissance du métabolisme secondaires des Thymelaceae et investigation phytochimique de l'une d'elle: *Gnidia involucrata* Steud. ex A. Rich. Thèse de doctorat. Lausanne. 242p
- **Festy D., 2013.** Comment perdre du poids avec les huiles essentielles ?, Guide complet d'aromathérapie.
- **Fine AM., 2000.** Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications. *Altern Rev*; 5:144–51.
- **Fooks L.J., et Gibson GR., 2002.** Probiotics as modulators of the gut flora. *Br J Nutr.* 88: S39-S49.
- **Franchomme, P., Jollois, R., Penoel, D., 2001.** L'aromathérapie exactement : Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles Editions Jollois,.
- **Frank DN., Feldman RA., Harpaz N., 2007.** Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 104: 13780-13785.

-G-

- **Gadewar S., et Fasano A., 2005.** Current concepts in the evaluation, diagnostic and management of acute infectious diarrhea. *Curre opin Pharmacol.* 5: 559-565.
- **Galvez J., Crespo M.E., Jimenez J., Suarez A., Zarzuelo A., 1993.** Anti-diarrhoeic activity of quercitrin in mice and rats: *J. Pharmacol.*, 45:157-159.
- **Garcia-Salas P., Morales-Soto A., Segura-Carretero A. and Fernández-Gutiérrez A., 2010.** Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules.* Vol. 15. pp. 8813- 8826
- **Gaudreuil S., 2007.** Infections nosocomiales et bactéries multirésistantes. Faculté de Médecine Montpellier - Nîmes. Pp : 01 – 02.
- **Ghoul JEI, Ben-Attia M., 2014.** Vasorelaxant Effects of Aqueous Extract of *Zygophyllum Album* and Antihyperglycemic Activities in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *J Diabetes Metab* 5: 426 doi:10.4172/2155-6156.1000426
- **Gibson GR., Beaumont A., 1996.** An overview of human colonic bacteriology in health and disease. In: Gut flora and health. Past, present and future. Leeds AR and Rowland IR (Eds), the royal society of medicine press, London pp.3-11.
- **Gill H.S., 2003.** Probiotics to enhance anti-infective defenses in the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterology.* 17: 755-773.

- **Gilly G., 1997.** « Les plantes à parfum et huiles essentielles à Grasse ». L'HARMATTAN, Paris, pp : 11-19.
- **Girardot,F.,2014.** Diététicienne Nutritionniste- Espace Belle Etoile- 38920 Crolles.
- **Glod MP, Sutton A, Moxon ER, et al.,197 .** Pathogenesis of neonatal *Echerichia coli* meningitis,, induction of bacteremia and meningitis in infants rats fed F. coli H1. Infect Immun 16,, 75–80
- **Gortzi O., Lalas S., Chinou J., J. Tsaknis, 2008.**Reevaluation of bioactivity and antioxidant activity of *Myrtus communis* extract before and after encapsulation in liposomes, European Food Research Technology 226: 583–590.
- **Goudable J. & Favier A., 1997.** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. Nutrition
- **Goulet, O., 2015.** Le microbiote intestinal: un monde vivant à connaître et à respecter, Service de Gastroentérologie, Hépatologie et Nutrition pédiatriques, Hôpital Necker-Enfants malades, Université Paris 5 René Descartes, PARIS
- **Granier F., 2003.** Antifongiques, classes thérapeutiques, mécanisme d'action, problèmes de résistance. Antibiotiques 5: 39–48
- **Grasset PP., 1973.** Traité de zoologie. Masson edition, Paris, tome 6, 2 :34-42.
- **Gravot A., 2008.** Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Equipe pédagogique Physiologie Végétale, UMR 118 APBV. Université de Rennes 1 – L2.
- **Grevenstuk T., Gonc S., Almeida S., Coelho N., Quintas C., Gaspar M.N., Romano A.,2009.**Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Properties of *in vitro* cultured *Drosera intermedia* Extracts, Natural Product Communications 4:1–6.
- **Gricilda S.F., Molly T., 2001.** Study of anti-diarrhoeal activity of four medicinal plants in castor oil induced diarrhoea : J. Ethanopharmacol., 76:73-76.
- **Griess S., 2013.** Les problèmes posés par *Bacillus cereus* dans l'industrie
- **Guarner F., 2006.** Enteric flora in health and disease. Digestion. 73: S5-S12.
- **Guinote IB, Matos RG, Freire P, Arraiano CM, 2011.** BolA affects cell growth, and binds to the promoters of penicillin-binding proteins 5 and 6 and regulates their expression.J Microbiol Biotechnol. Mar; 21(3):243-51.

-H-

- **Haase, R., Sauer, H., Dagwadordsch, U., Foell, J., & Lieser, U., 2005.** Successful treatment of *Bacillus cereus* meningitis following allogenic stem cell transplantation. *Pediatric Transplantation*, 9(3), 338-341.

- **Hadj Salem J., 2009.** Extraction, Identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique. Thèse de Doctorat : Université de LORRAINE.
- **Haga Y, Beppu T, Houichi D, et al., 1997.** Systemic inflammatory response syndrome and organ dysfunction following gastrointestinal surgery. *Crit Care Med* 25, 1994–2000
- **Hagiage M., 1994.** La flore intestinale de l'équilibre au déséquilibre. Edition Vigot, Paris: 45-46.
- **Halliwell and. Guteridge J. M. C., 1999.** Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Methods of Enzymology*. 186: 1–85.
- **Hamliche V., Maiza, K., 2006.** Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *J. Ethnopharmacol*, 105: 358–367.
- **Hamza N., 2011.** Effets préventif et curatif de trois plantes médicinales utilisées dans la Wilaya de Constantine pour le traitement du diabète de type 2 expérimental induit par le régime « high fat » chez la souris C57BL/6J, thèse de doctorat en sciences alimentaires, Université de Constantine, Algérie.
- **Handa P.D., and Cress W.A., 1986.** Metabolic implications of stress-induced prolinaccumulation in plant. *Plant growth regul.* 21 : 79-102.
- **Hans D.N., 2000.** African Traditional Medicine. A Dictionary of Plant Use and Application, Medpharm Scientific, Stuttgart, p. 589.
- **Hans W. K., 2007.** 1000 plantes aromatiques et médicinales. Terre édition. p6-7.
- **Harborne J.B., 1980.** Plant Phenolics: Encyclopedia of Plant Physiology, New series. p8, 329-402.
- **Harborne J.B., 1980.** Plant Phenolics: Encyclopedia of Plant Physiology. New series. Vol. (8): 329-402.
- **Hassanean H., Desoky E. K. and El-Hamoul M. M. A., 1993.** Quinovic acid glycosides from *zygophyllum album* *Phytochemistry*, Vol. 33, No. 3, pp. 663-66
- **Hassanean H.A., Desoky E.K., 1992.** An acylated isorhamnetine glucoside from *Zygothymum Simplex*. *Phytochemistry*, 31: 3293-3294.
- **Hassiotis C.N., Lazari D.M., 2010.** Decomposition process in the Mediterranean region. Chemical compounds and essential oil of *Myrtus communis*, *International Biodeterioration & Biodegradation journal*, 64:356-362.
- **Hatzidimitriou E.F., Nenadis N., Tsimidou M.Z., 2007.** Changes in the catechin and epicatechin content of grape seeds on storage under different water activity (aw) conditions. *Food Chemistry*. 105: 1504-1511.

- **Havelaar A.H., Jgarssen K., Takumi M.A., Koedam J.B., Dufrenne F.M., Bousema J.T., and Vos J.G., 2001.** A rat model for dose-response relationships of *Salmonella enteridis* infection: Journal of applied Microbiology, 91, (442-452).
- **Hayder N., Bouhlef I., Skandrani I., Kadri M., Steiman R., Guiraud P., Mariotte AM., Ghedira K., Dijoux-Franca MG., Chekir-Ghedira L., 2004.** 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. Toxicol in Vitro;22(3):567–81.
- **Hayes M.V., and Ward J.B., 1986.** The role of penicillin proteins in the antibacterial activity of β -lactam antibiotics, in antibiotic in laboratory medicine.
- **Hayes, A., et Markovic, B., 2002.** Toxicity of Australian essential oil *Bakhouisia citriodora* Part, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity, Food, Chem, Toxicol., 4:949-964.
- **Heazlewood CK., Cook M.C., Price GR., Tauro SB., 2008.** Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. Med. 5: 54-59.
- **Helander I.M., Alakomi H.L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E.J., Gorris L.G.M., Von Wright A. 1998.** Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 3590–3595.
- **Hellal Z., 2011.** Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de Magister. Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou.
- **Hennebelle T., 2006.** "Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants." Chimie Organique et Macromoléculaire Docotrat.
- **Herek, G. M., 2000.** Sexual prejudice and gender: do heterosexuals' attitudes toward lesbians and gay men differ?. Journal of Social Issues, 56(2), 251-266.
- **Hermon B.G., Brown C.A., Tkalcic S., Mueller P.O.E, Doyle P., 1999.** Faecal shedding and rumen growth of *Esherichia coli* in fasted calves: J. Food Protection, 62: 574-574.
- **Hernandez, G., Diez del Corral, R., Santoyo, J., Campuzano, S., Sierra, J.M. 1997.** Localization, structure and expression of the gene for translation initiation factor eIF-4E from *Drosophila melanogaster*. Mol. Gen. Genet. 253(5): 624--633.
- **Hilaly J.E., Israili Z.H., Lyouss B., 2004.** Acute and chronic toxicological studies of *Ajuva Iva* in experimental animals. Journal of Ethnopharmacology 91, 43–50.

- **Hill C, Guarner F, Reid G et al., 2014.** Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*;11:506-514
- **Hirsch H. A., Gynakol R., 1985.** Vulvovaginal candidosis: definition of the disease and its special problems and treatment in pregnancy. *Journal of Clinical Microbiology.* 25:5–11.
- **Hoà T.T., Duc L.H., Isticato R., Baccigalupi L., Ricca E., Van P.H., Cuttings M., 2001.** Fate and dissemination of *Bacillus subtilis* spores in a murine model: *Appl Environ Microbiol* 67: 3819–3823.
- **Hodille, E., 2015.** Les diarrhées bactériennes, AHU Faculté de Médecine Lyon-Sud Charles Mérieux.
- **Hooper L.V., and Gordon J.I., 2001.** Analyzing the molecular foundations of commensalism in the mouse intestine. *Curr Opin Microbiol*, 3: 79-85.
- **Horgan AF, Stuart RC, O’Shaughnessy EM, Cryan B, Kirwan WO., 1994.** Bacterial translocation during peroperative colonic lavage of the obstructed rat colon. *Br J Surg*; 81 : 1796-8.
- **Huang D., Ou B., Hampsch-Woodill M., Flanagan J., and Prior R., 2002.** High-throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *J. Agric. Food Chem.* 50:4437-4444.
- **Husmark U., and Ronner U., 1992.** The influence of hydrophobic, electrostatic and morphologic properties on the adhesion of *Bacillus* spores: *Biofouling* 5: 335–344.
- **Hussein Hosseinzadeh 1., Mohammad K., Maryam G., 2011.** Antinociceptive, Anti-inflammatory Effects and Acute Toxicity of Aqueous and Ethanolic Extracts of *Myrtus communis* L. Aerial Parts in Mice, *J Acupunct Meridian Stud*;4(4):242e247.
- **Hussein S., Marzouk M., Ibrahim F., Kawashty S., Saleh N., 2011.** Flavonoids of *Zygophyllum album* L.f. and *Zygophyllum simplex* L. (Zygophyllaceae), *Biochemical Systematics and Ecology* 39:778–780.
- **Hyder N., Abdelwahed A., Kilani S., Ben Ammar R., Mahmoud A., 2004.** Antigenotoxic and free-radical scavenging activities of extracts from (Tunisian) *Myrtus communis*, 564: 89 – 95.
-

-I-

- **Inter Clin des Hauts Cantons, 2009.** Guide pratique de la maîtrise des bactéries multirésistantes aux antibiotiques.
- **Iserin P., Masson M., Restellini J. P., Ybert E., De Laage de Meux A., Moulard F., Zha E., De la Roque R., De la Roque O., Vican P., Deesalle –Féat T., Biaujeaud M., Ringuet J., Bloth J. et Botrel A., 2001.** Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins. Ed Larousse. p10-12.
- **Isolauri E., Arvola T., Sutas Y., Moilanen E. and Salminen S., 2002.** Probiotics in the management of atopic eczema. *Clinical and experimental allergy*. 30 (11): 1604-1610.
- **Itelima J.U., and Agina S.E.,2014.** In vivo antimicrobial activity of plant species on *Escherichia coli* O157:H7 inoculated into albino rats: *World Journal of Microbiology* Vol. 1(1), pp. 002-009.

-J-

- **Jacquiera H., Cruaud P., Poilane I., Lachassinne E., Gaudelus J., Collignon A., 2007.** Activité in vitro de la moxifloxacine (8-méthoxyquinolone) seule ou en association avec le céfotaxime sur les streptocoques du groupe B, *ScienceDirect. Pathologie Biologie* 55. 412–417.
- **Jadamus A, Vahjen W, Schafer K & Simon O ,2002.** Influence of the probiotic strain *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the development of enterobacterial growth and on selected parameters of bacterial metabolism in digesta samples of piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 86: 42–54.
- **Jarlier V et Nordmann P. 2000.** Entérobactéries et β -lactamines. *ESKA 2000-Précis de bactériologie clinique*.
- **Jokić S., D. Velić, M. Bilić, A. Bucić-Kojić, M. Plan inić and Tomas S., 2010.** Modelling of the Process of Solid-Liquid Extraction of Total Polyphenols from Soybeans. *J. Food Sci.* vol. 28. (). pp. 206- 212.
- **Jones W.J., Minet J.P., And Barber A.E., 1989.** Elemental diet promotes spontaneous bacterial translocation and alters mortality after endotoxin challenge. *Clin. Plast. Surg.* 9:20-21.
- **JORADP N°35, 1998.** modifiant et complétant l'arrêté du 23 juillet 1994, relatif aux critères microbiologiques de certaines denrées alimentaire.

- **Jothy, S.L. Lee, W.et al. 2011.** Phytochemicals screening, dpph free,radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activities of *Cassia fistula* seeds extract journal of medicinal plants research, v.5, n.10, p.1941-1947.
- **Jouaut S., 2012.** la qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité, thèse de doctorat en pharmacie,P 91,Université de Lorraine,France.
- **Joubert,H.,2015.** Les antibiotiques, quel impact sur nos "gentilles" bactéries ?, <http://www.davolterra.com/>.
- **Judith M.D., 2005.** Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans*.
- **Juliani H.R., 2002.**Simon Antioxidant Activity of Basil, Trends in new crops and new uses.J. Janick and A. Whipkey (eds.). ASHS Press, Alexandria, VA.
- **Julkunen-Titto R., 1985.** Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods.

-K-

- **Kabore IZ, Guissou IP, Sourabie S, Gngangao G, 1998.** Eléments de monographie sur *Nauclea latifolia* Smith (Rubiaceae) : chimie, activité biologiques, toxicité. Pharm Med Trad Afr 10: 42-54
- **Kabran R., Janat Akhanovna M.B., Jean-Luc P., Yves-Alain B., Nicolas S., Arnaud V., Emmanuelle M., 2014.** Identification de composés phénoliques extraits de deux plantes de la pharmacopée ivoirienne,Guy,Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie ,J. Soc. Ouest-Afr. Chim. 038: 57 - 63.
- **Kadaoui K.A., and CorthésyB., 2007.**Secretary IgA Mediates Bacterial Translocation to Dendritic Cells in Mouse Peyer's Patches with Restriction to Mucosal Compartment. *J. immunol.* 179, 51-57.
- **Kagnoff M.F., and Eckmann L., 1997.** Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest*, 100: 6-10.
- **Kalemba D. & Kunicka A., 2003.** Antibacterial and antifungal properties of essential oils.
- **Kanoun K., 2011.** Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine), thèse de magister en biologie, Tlemcen, Algérie.
- **Kao T.-T. , Tu H.-C., Chang W.-N., 2010.**Grape seed extract inhibits the growth and pathogenicity of *Staphylococcus aureus* by interfering with dihydrofolate reductase

- activity and folate-mediated one-carbon metabolism, *International Journal of Food Microbiology* 141 :17–27.
- **Kar A., 2007.** *Pharmacognosy and Pharmabiotechnologie*; Ed 2: New Age International Publishers; p: 1-30.
 - **Karaali A., Boyacioğlu D., Günez G. et Özçelik B., 2004.** Flavonoids in fruit and vegetables: their impact on food quality, nutrition and health–STREP or CA. European commission's the 6th framework programme for research. Istanbul technical university. Turkey.
 - **Kchaou M., Ben Salah H., Mhiri R., and Allouche N., 2016.** Anti-oxidant and anti-acetylcholinesterase activities of *Zygophyllum album*, *Bangladesh J Pharmacol*; 11: 54-62.
 - **Kebbab, R., 2014.** Etude du pouvoir antioxydant des polyphénols issus des margines d'olives de la variété *chemlal*, évaluation de l'activité avant et après déglycosylation. thèse de Magistère en biologie, université de Tizi-Ouzou.
 - **Kelen M., 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.
 - **Khelil A., Boumehras Z., Bouzaher S., Moulay Lakhdar R., Telli A., Kemassi A. et Ould El-Hadj D. M., 2011.** Activité antimicrobienne des extraits phénoliques de trois ecotypes de *zygophyllum album* récoltés dans les ecotopes de ghardaïa, ouargla et touggourt, Le 2ème Séminaire International sur les Plantes Médicinales SIPM'2.
 - **Kim MS, Jun LJ, Shin SB, Park MA, Jung SH, Kim K, Moon KH, Jeong HD, 2010.** Mutations in the *gyrB*, *parC*, and *parE* genes of quinolone-resistant isolates and mutants of *Edwardsiella tarda*. *J Microbiol Biotechnol.* Dec; 20.
 - **Kinghore A.D., Balandrin M.F., 1984.** Quinolizidines alkaloids of the leguminosae: structural types, analysis, chemotaxonomy, and biological activities. Willey, New York, pp. 105-148.
 - **Koffi E., T. Sea Y. Dodehe and Soro S., 2010.** Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty three Ivorian plants. *J. Animal & Plant Sci.* Vol. 5. pp. 550-558.
 - **Koopmans M., Von Bonsdorff CH., Vinjé J., Et Monroe S., 2002.** Foodborne viruses. *FEMS Microbiol Rev.* 26: 187-205.
 - **Kordjani, T.N., Meklati, B.Y. Chemat, 2006.** Analysis by gas chromatography-mass spectrometry of the essential oil of *Zygophyllum album L.*, an aromatic and medicinal plant growing in Algeria, *International Journal of Aromatherapy*, 16, 187-191.

- **Krinsky N. I., 1992.** Mechanism of action of biological antioxidants. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 200:248–254.
- **Ksouri W., Medini F., Mkadmini K., Legault J., Magné C., Abdelly C., Ksouri R., 2013.** LC–ESI–TOF–MS identification of bioactive secondary metabolites involved in the antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of the edible halophyte *Zygophyllum album Desf.*, Food Chemistry 139:1073–1080.
- **Kumar M., Agarwala R., Deyb K., Raib V., Johnsonc B., 2009.** Antimicrobial Activity of Aqueous Extract of *Terminalia chebula* Retz. on Gram positive and Gram negative Microorganisms. International Journal of Current Pharmaceutical Research Vol. 1 (1): 56-60.
- **Kurita N. & Koike S., 1982.** Synergetic antimicrobial effect of sodium chloride and essential oils components. Agric. Bil. Chem. 46: 159-165.

-L-

- **Lafond C., 2006.** atlas comparatif d'histologie et de cytologie des tissus sains chez le chat, thèse de doctorat, l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE.
- **Lahouel M., 2005.** Interaction flavonoides-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat de l'université Mentouri de Constantine.
- **Lambert, E. G., Hogan, N.L., & Barton, S. M. 2001.** The impact of job satisfaction on turnover intent: a test of a structural measurement model using a national sample of workers. The Social Science Journal, 38(2), 233–250.
- **Lamps L.W., 2007.** Infective disorders of the gastrointestinal tract. *Histopathology*. 50: 55-63.
- **Langemeir J.M., Rogers D.E., 1995.** Rapid method for sugars analysis of Doughs and Baked Products. American Association of Cereal Chemists, Cereal Chem., 72(4) :349-351.
- **Laouini, S.E., 2014.** Etude phytochimique et activité biologique d'extrait de des feuilles de *Phoenix dactylifera L* dans la région du Sud d'Algérie (la région d'Oued Souf), Thèse de doctorat en chimie industrielle, Université Mohamed Khider Biskra.
- **Lavigne J.P., 2007.** Effets des antibiotiques et mécanismes de résistance. Antibiotiques et résistance. Faculté de médecine Montpellier- Nîmes. Pp :
- **Lawrence B.M., 1993.** Progress in essential oils: Myrtle oil. *Perfum. Flavor*. 18 (2), 52-55.

- **Leblanc, B., 2015.** Les plantes comme sources de nouvelles molécules bioactives & chimie du végétal, dossier de presse, Signature d'une convention de partenariat entre le Conseil Régional de Lorraine – BASF.
- **Lee K.H., 2004.** Current developments in the discovery and design of new drug candidates from plant natural product lead, *Journal of Natural Products* 67: 273-283.
- **Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J., et Lee C.Y., 2003.** Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Food chemistry*, 51: 7292-7295.
- **Leighton F., et Urquiaga I. 2000.** Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research*. 33 (2): 55-64.
- **Lemee A., 1978.** Laboratory and Field Evaluation of the Properties of *Phytolacca Dodecandra*. *Bull. World Health Organ.*, 42: 597-612.
- **Lessard IA, Walsh CT. VanX, 1999.** A bacterial D-alanyl-D-alanine dipeptidase: resistance, immunity, or survival function? *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 28; 96(20):11028-32.
- **Levy B.S., 1999.** Le paradoxe des antibiotiques. Edition Belin. Pp : 61 – 85.
- **Liévin V., Peiffer I., Neeser JR., 2000.** Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut*. 47: 646-652
- **Liévin-Le Moal V., et Servin A.L., 2006.** The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: Mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin Microbial Rev*. 19: 315-337.
- **Lima, K., Melissa Negro-Dellacqua, Victor Emmanuél Fernandes Apolônio dos Santos and Célia Maria Machado Barbosa de Castro, 2015.** Post-splenectomy infections in chronic schistosomiasis as a consequence of bacterial translocation, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 48(3):314-320
- **Lis-Balchin M., 1997.** Essential oils and 'aromatherapy': their modern role in healing. *J R Soc Promo Health*; 117:324–9.
- **Lis-Balchin M., Deans S.G., 1997.** Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *J Appl Bacteriol*; 82:759–62.
- **Lis-Balchin M., 2002.** « Geranium and pelargonium: the genera Geranium and Pelargonium ». CRC Press, Taylor & Francis, London, , pp: 116-131, 147-165, 184-217.
- **Logan N. A., 1988.** Bacillus species of medical and veterinary importance, *J. Med. Microbiol*. Vol. 25, 157-165.

- **Logan N.A.,2011.** Bacillus and relatives in foodborne illness. *J. Appl. Microbiol.* 112, 417-429.
- **Ismaili R., Fechtal M., Zine El Abidine A., Hachimi M. & Sesbou A., 2001.** Effet de la transplantation sur le rendement et la composition chimique du Myrte (*Myrtus communis* L.) *Ann. Rech. For. Maroc*, 34, 87-93.
- **Lucas-Abellán C., Mercader-Ros M.T.,Zafrilla M.P.,Fortea M.I.,Gabaldón J. A., And Núñez-Delicado E.,2008.**ORAC-fluorescein assay to determine the oxygen radical absorbance capacity of resveratrol complexed in cyclodextrins,*J. Agric. Food Chem*, 56, 2254–2259.
- **Lyscom N., et Brueto M.J., 1982.**Intra-epithelial, Lamina propria and Peyer's patches lymphocytes of the rat small intestine. *Immunology.* 45: 775-783.

-M-

- **Ma L., Specian RD., Berg RD., Dietch A., 1989.** Effect of protein malnutrition and endotoxin on the intestinal mucosal barrier to the translocation of indigenous flora on mice. *J. parent. Ent. Nutr.* 13: 572-578.
- **Macfarlane S., 2004.** Bacterial diversity in the human gut. *Adv Appl Microbiol.* 54: 261-289.
- **Macheix J J., Fleuriet A. et Jay-Allemand C., 2005.** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes. p4-5.
- **Machlin LJ et al., 1987.** Sites de production intracellulaire des ERO.
- **Mackie RI., Sghir A., Gaskin HR., 1999.** Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr.* 69: 103-104.
- **Magalhaes JG., Tattoli I., Girardin SE., 2007.**The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin Immunol.* 19: 106-115.
- **Mahmoudi S., Khali M. et Mahmoudi N., 2013.** Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus L.*),*Journal of Nature and Technologie*
- **Majoros L., kardos G., Szabo B. and Sipiczki M., 2005.** caspofungin susceptibility testing of *Candida inconspicua*: correlation if different methods with the minimal fungicidal concentration (MFC). *Antimicrobial agents and Chemotherapy*; 49(8) 3486-3488.

- **Malešev D., et Kuntić V., 2007.** Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the serbian chemical society.* 72 (10): 921-939.
- **Mantle D., Eddeb F., Pickering AT., 2000.** Comparison of relative antioxidant activities of British medicinal plant species in vitro. *J. Ethnopharmacol;* 72:47-51.
- **Marchou B, Bellido F, Charnas R, Lucain C, Pechère JC, 1987.** Contribution of betalactamase hydrolysis and outer membrane permeability to ceftriaxone resistance in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother.* Oct; 31(10):1589-95.
- **Marjorie M.C., 1999.** Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:564-582.
- **Markham K.R., 1982.** Paper chromatography and the recognition of flavonoids, flavonoid structure information from p.c. data, *Technique of flavonoid identification, Biological Techniques Series,* 135-189.
- **Marston A., Hostettmann K., 2006.** Separation and quantification of flavonoids. In OYvind MA, Markham KR. *Chemistry, biochemistry and application.* Ed. CRC Press Taylor and Francis group, 2-20.
- **Martinoli C., Chiavelli A., Rescugno M., 2007.** Entry route of *Salmonella thyphimurium* directs the type of induced immune response. *Immunity,* 27: 975-984.
- **Mates JM, Perez-Gomez C, De Castro IN., 1999.** Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 32:595–603.
- **Mathers JC, Smith H & Carter S., 1997.** Dose–response effects of raw potato starch on small-intestinal escape, large-bowel fermentation and gut transit time in the rat. *Br J Nutr* 78:1015–1029.
- **McCall M. R., et Frei B., 1999.** "Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative
- **McCarthy D., Matthew Kiuger J., and Arthur J., 1985.** Suppression of food intake during infection: is interleukin-1 involved?
- **McCracken V. J., and Gaskins H.R., 1999.** Probiotics and the immune system. In *Probiotics a Critical Review.* Tannock, G.W. (ed.). Norfolk, England: Horizon Scientific Press, pp. 85-111.
- **Mead PS., Slutsker L., Dietz V., Mccaig LF., Bresee JS., Shapiro C., Griffin PM., et Tauxe RV., 1999.** Food related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis.* 5: 607-625.

- **Medic-Saric M., Jasprica I., Smolcic – Bubalo A., Mornar A., 2004.** Optimization of Chromatographic Conditions Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic acids. *Croatica Cihmica Acta*.77 (1 – 2), 361 – 366.
- **Merret ND, Jorgenson J, Schwartz P, Hunt DR.,1994.** Bacteremia associated with operative decompression of a small bowel obstruction. *J Am Coll Surg* ; 179 : 33-7.
- **Mert T.T., Fafal B., Kivc ak., Öztürk H.T., 2008.** Antimicrobial and cytotoxic activities of *Myrtus Communis L*, *Journal of Faculty Pharmacy Ankara* 37:191–199.
- **Middelton I.J.,Kandaswami,C.,Theoharide,T,C.,2000.**The effects of plants flavonoids on mammalian cells:implication for inflammation,heart desieaes and cancer,*Pharmacological reviews*;52:673-751.
- **Miliauskas G., Venskutonis P.R., et Van Beek T.A., 2004.** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food chemistry*. 85:231-237.
- **Millogo H., Guisson I. P., Nacoulma O. et Traore A. S., 2005.** Savoir traditionnel et médicaments traditionnels améliorés. Colloque du 9 décembre. Centre européen de santé humanitaire –Lyon.
- **Mimica-Dukić N.,Vuković-Gačić B., Orčić D., Jovin E., et Couladis M., 2010.**Essential Oil of *Myrtus communis L*. As a Potential Antioxidantand Antimutagenic Agents, 15: 2759-2770.
- **Mirazadi Z., Pilehvar B., Meshkat Alsadat MH. and Karamian R., 2011.** Site quality and Essential oil composition of *Myrtus Communis L*. (case study: Cham moord site in Lorestan province). *Journal of agricultural biotechnology*, Vol.3, No.2, pp. 71-79.
- **Mols, M., de Been, M., Zwietering, M.H., Moezelaar, R., Abee, T. 2007.** Metabolic capacity of *Bacillus cereus* strains ATCC 14579 and ATCC 10987 interlinked with comparative genomics. *Environ. Microbiol.* 9:2933-2944.
- **Montoro P., Tuberoso C.I.G., Piacente S., Perrone A., De Feo V., Cabras P., Pizza C., 2006.**Stability and antioxidant activity of polyphenols in extracts of *Myrtus communis L*. berries used for the preparation of myrtle liqueur. *J Pharm Biomed*; 41:1614–20.
- **Montoro P., Tuberoso C.I.G., Piacente S., Perrone A., De Feo V., Cabras P., Pizza C., 2006.** Characterisation by liquid chromatography-electrospray tandem spectrometry of anthocyanins in extracts of *Myrtus communis L*. berries used for the preparation of myrtle liqueur, *Journal of Chromatography A*, 1112:232–240.

- **Moore W.E., and Holdeman L.V., 1974.** Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl Microbiol*, 27: 961-979.
- **Mostafavi H., Vahiddost M., Solimanzadeh R.,2015.** Chemical composition of essential oil of *Zygophyllum fabago L.* from North-West Iran, *International Journal of Herbal Medicine*; 2 (6): 34-37.
- **Mothanaa Ramzi A.A., et Lindequistb U., 2005.**Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. *Journal of Ethnopharmacology* 96 : 177–181
- **Mouffok F.,2011.** Situation en matière de TIA en Algérie de 2010 à 2011. 2eme congres Maghrébin sur les TIA, Tunis le 14-15 décembre, 2011.
- **Muanda F.N.,2010.** Identification De Polyphenols, Evaluation De Leur Activite Antioxydante Et Etude De Leurs Proprietes Biologiques, thèse de doctorat, Université Paul Verlaine-Metz.
- **Mukherjee P.K., Saha K., Murugesan T.,Mandal S.C., 1998.** Screening of anti-diarrheal profile of some plant extracts of a specific region of WetBengal, Indian. *J. Ethnopharmacol.*, 60:85-89.
- **Mukinda J.T.,& Syce J.A., 2007.** Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 112: 138-144.
- **Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Landry M. L., & Pfaller M. A., 2007.** *Manual of Clinical Microbiology* (9th ed.) American Society of Microbiology Press.
- **Musa, M.O., Al Douri, M., Khan, S., Shafi, T., Al Humaidh, A., Al Rasheed, A.M. 1999.** Fulminant septicaemic syndrome of *Bacillus cereus*: three case reports. *J. Infect.* 39:154-156.
- **Muzzi A., Masignani V., Rappuoli R., 2007.**The pan-genome: Towards knowledge based discovery of novel targets for vaccines and antimicrobials. *Drug discovery.* 12: 429-429.

-N-

- **Nair R., Chanda S., 2005.** Anticandidal activity of *Punica granatum* exhibited in different solvents. *Pharmaceutical Biology.* 43: 21-5.

- **Naoki S., 1984.** The composition of lipids and fatty acids determined at various stages of haploid and diploid generations in the fern *Adiantum capillus-veneris*. *Physiologia plantarum*, 62(2):139-147.
- **Naqvi A., Pulcini C., 2009.** Résistance bactérienne et prescription antibiotique : perceptions, attitudes et connaissances des médecins hospitaliers. *Médecine et maladies infectieuses* 40 (2010) 625–631. Elsevier Masson France.
- **Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R. et Krishna D. R., 2001.** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology*. 33: 2-16.
- **Nassar MI., Aboutabl El-SA., Ahmed RF., El-Khrisy ED., Ibrahim KM., Sleem AA., 2010.** Secondary metabolites and bioactivities of *Myrtus communis*. *Pharmacognosy Res*; 2: 325-329.
- **Nathan,P.,2013.** FLORE INTESTINALE Les probiotiques et les prébiotiques, *Journal de diététique*, N°09, P :67-72.
- **Nauciel C., 2000.** Bactériologie médicale. Edition Masson. Paris, pp: 27-33.
- **NCCLS. 2005.** Seventeenth Informational supplement. NCCLS document, M100-S17. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pennsylvania, USA, 271.
- **Newman D., Cragg G., Snader K., 2003.** Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *J Nat Prod* 66: 1022–37.
- **Nijveldt R, Van Nood E, Van Hoorn E, Boelens P, Van Norren K, Van Leeuwen PAM (2001)** Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal Clinical Nutrition* 74:418-425.

-O-

- **Ogra PL, Losonky GA., 1984.** Defense factors in products of lactation. In Ogra PL (ed) Neonatal infection. Nutritional and immunologic interactions. Grune and Stratton, Orlando, pp 205–219
- **Okuda T., 2005.** Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry* ; 66:2012–20.
- **OMS, 2015.** Organisation Mondiale de Santé, « Antibiotiques : à manipuler avec précaution ».
- **Othman A., Ismail A., Ghani NA., Adenan I.,2007.** Antioxidant capacity and phenolic content of *Cocoa beans*. *Food Chem*; 100:1523–30.

- **Otshudi A.L., Foriers A., Vercruyse A., Van Zeebroeck A., Lauwers S., 2000.** *In vitro* antimicrobial activity of six medicinal plants traditionally used for treatment of dysentery and diarrhoea in Democratic Republic of Congo: journal of Phytomedicine, 7.167-177.
- **Ouarsas L., Fasla F., Kirami M., Fathi R. and Barkia A., 2008.** Investigation d'une toxi-infection alimentaire collective en milieu étudiant à Ait Melloul, Maroc, 2006. Bulletin épidémiologique, Royaume du Maroc, ministère de la santé. ISSN 0851 8238, N° 65-66 67-68.
- **Oueslati S., Ksouri R., Falleh H., Pichette A., Abdelly C., & Legault, J., 2012.** Phenolic content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of the edible halophyte *Suaeda fruticosa* Forssk. Food Chemistry, 132, 943–947.
- **Ould El Hadj M.D., Hadj-Mahammed M., Zabeirou H., 2003.** Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région d'Ouargla (Sahara septentrional Est). Courrier du Savoir – N°03, 47-51
- **Oussalah M, Caillet S; Saucier L, Lacroix M. 2006.** Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of *Pseudomonas putida* strain isolated from meat, Meat-sci.73 :236-244.
- **Ouwehand A.C., Salminen S., 2003.** Probiotics: an overview of beneficial effects. Anton Leeuw. 82: 279-289.

-P-

- **Pacchioni I., 2014.** Aromathérapie : Tout sur les huiles essentielles, Broché.
- **Packer, L., K. Kraemer et G. Rimbach, 2001.** "Molecular aspects of lipoic acid in the
- **Packer, J. E., Mahood, R. S., Mora-Arellano, V. O., Slater, T. F., Willson, R. L. & Wolfenden, B. S., 1981.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 98, 901-906
- **Pages JM, 2004.** Porines bactériennes et sensibilité aux antibiotiques. Med Sci (Paris). Mar; 20(3):346-51.
- **Paine M. F., Widmer W. W., Hart H. L., et al., 2008.** Further characterization of a furanocoumarin-free grapefruit juice on drug disposition: studies with cyclosporine. Am J Clin Nutr, vol. 87, n°4, pp. 863-871.
- **Palmer C., Bik E.M., Relman DA., 2007.** Development of the human infant intestinal microbiota. *Plo. S. biol.*5.
- **Pan X.L., Yang Y., Zhang J.R., 2014.** Molecular basis of host specificity in human pathogenic bacteria. Emerg Microbes Infect; 3: e23.

- **Papazian L. & Roch A., 2008.** Packer J. E., Mahood J. S., Mora-Arellano V. O., Slater T. F., Willson R. L. & Le syndrome de détresse respiratoire aiguë, Edition prevention of diabetes complications." Nutrition 17(10): 888-895.
- **Papo J., et Ermak E., 1986.** Computed tomographic demonstration of intramural colonic air (*Pneumatosis coli*) as a feature of severe ulcerative colitis. Gastro. Radiol. 12: 169-171.
- **Parck D.A., Bukley G.B., Granger D., Hamilton S.R., Mc Cord., 1982.** Ischemic injury in the cats small intestine: role of superoxyde radical. Gastroenterology. 82: 9-15.
- **Penchev, P.I., 2010.** Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions, thèse de doctorat en Génie des procédés et de l'environnement, Toulouse.
- **Pereira P., Cebola M.J., Bernardo-Gil M.J., 2012.** Comparison of antioxidant activity in extracts of *Myrtus communis L.* obtained by SFE vs. solvent extraction. J Environ Sci Eng A; 1: 115-120.
- **Pereira P.b., Gabriela Bernardo-Gil M., Romanoc A., 2013.** Supercritical fluid extracts with antioxidant and antimicrobial activities from myrtle (*Myrtus communis L.*) Leaves. Response surface optimization, J. of Supercritical Fluids 83 (2013) 57–64.
- **Perelman R., Lagardere B., Gallet JP., Durquet- Perelman C., 1990.** Pédiatrie pratique II. Maladie infectieuses. Edition Maloine. Paris. 2 : 1313-1337.
- **Perez C., Paul M., Bazerque P., 1990.** An antibiotic assay by the agar-well diffusion method. ACTA Bio-Medica Experimental. 15: 113-5.
- **Perez-Cobas AE, Gosalbes MJ, Friedrichs A et al., 2013.** Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach. Gut; 62:1591-1601.
- **Perkins M.C., Roberts C.J., Briggs D., Davies M.C., Friedmann A., 2005.** Planta 221:123–134.
- **Pezhmanmehr M., Dastan D., Ebrahimi S.N., Hadian J., 2009.** Essential oil constituents of leaves and fruits of *Myrtus communis L.* from Iran. Planta Medica 75, 1071-1079.
- **Picard C., Fioramonti J., Francois A., Robinson T., 2005.** Bifidobacteria as probiotic agents-physiological effects and clinical benefits. *Aliment Pharmacol Ther.* 22: 495-512.
- **Piquemal G., 2008.** Les flavonoïdes (en ligne) : <http://www.detoursante.com/index.php?>
- **Piras M., Dettori, M.F., Magnani A., 2009.** ToF-SIMS PCA analysis of *Myrtus communis L.* Applied Surface Science 255:7805–7811

- **Pirhonen T., Andersson M., Jääskeläinen E., Salkinoja-Salonen M., Honkanen-Buzalski T. and Johansson T., 2005.** Biochemical and toxic diversity of *Bacillus cereus* in a pasta and meat dish associated with a food poisoning. *Food Microbiol.* 22,
- **Plantefève, G., Bleichner, G., 2001.** Translocation bactérienne : mythe ou réalité ?,
- **Pokorny J, Korczak J, 2001.** Preparation of natural antioxidant, in *Antioxidants in Food: Practical Applications*, 1st ed., Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M., Eds., Woodhead Publishing Limited, Abington, Cambridge, England, pp. 311-330.
- **Pöllmann K., Gagel S., Elgamal M. H. A., Shaker K. H., & Seifert K., 1997.** Triterpenoid saponins from the roots of *Zygophyllum* species. *Phytochemistry*, 44, 485–489.
- **Prieto P., Pineda M., & Aguilar M., 1999.** Spectrophotometric quantitation of antioxidant.
- **Prior R.I., Wu X.L., Schaich K., 2005.** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric Food Chem*, 53 (10): 4290-4302.
- **Purchon, N., 2001.** La bible de l'aromathérapie Edition Marabout.

-Q-

- **Qasem Jamal R., 2015.** Prospects of wild medicinal and industrial plants of saline habitats in the Jordan valley. *Pak. j. bot.*, 47(2): 551-570.
- **Quezel P., et Santa S., 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionale. Tome II Edition. CNRS. Paris.

-R-

- **Rabaud G.M., 2008.** Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas putida* producing VIM-1 metallo- β -lactamase. *J. Clin. Microbiol.* 2, 40(11). Pp: 4051-4055.
- **Radojević I., Stanković O., Topuzović M., Čomić L. and Ostojić A., 2012.** Great Horetail (*Equisetum telmateia* Ehrh.): Active Substances Content and Biological Effects. *Experimental and Clinical Sciences International Journal*, Vol. 11:59-67.
- **Raffauf R. F., 1996.** *Plant Alkaloids: A Guide to their Discovery and Distribution*; Ed: Food Products Press; p: 189- 190.

- **Ramage J.K., Hunt R.H., Perdue M.H., 1988.** Changes in intestinal permeability and epithelial differentiation during inflammation in rat. *Gut* 29:57-63.
- **Ramzi A.A., Mothanaa and Lindequist U., 2004.** Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra, *Journal of Ethnopharmacology* 96 (2005) 177–181.
- **Randrianarivelo R., Sarter S., Odoux E., Brat P., Lebrun M., Romestand B., Menut C., Andrianoelisoa H. S., Raherimandimby Met Danthu P., 2008.** Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. *Food Chemistry*. 114, 680-684.
- **Rasekh H.R., Nazari P., Kamli-Nejad M., & Hosseinzadeh L. ,2008.** Acute and subchronic oral toxicity of *Galega officinalis* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 21 -26.
- **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.* 4, 127-133
- **Raymond J., Bergeret M., Gendrel D., 2001.** Impact de la résistance bactérienne sur les infections graves. *Arch Pédiatr* 2001; 8 Suppl 4: 697-704. Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS.
- **Reguragui O., 2005.** La réponse physiologique et biochimique de la pomme de terre, Thèse de Master académique, Université de Ouergla, Algérie.
- **Reynolds JEF., 1996.** Martindale – the extra pharmacopeia. 31st ed. London: Royal Pharmaceutical Society of Great Britain; p. 1681–2.
- **Rezaire A., 2012.** Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa). Thèse doctorat Université des Antilles et de la Guyane. 208p.
- **Riov J., Gottlieb H E., 1980.** Metabolism of auxin in pine tissues: Indole-3-acetic acid conjugation. *Physiologia Plantarum*, 50: 347-352.
- **Robert J., 2006.** Résistance associée chez les cocci Gram positif ; pour le conseil Scientifique de l'ONEBRA.
- **Rollinger JM., Haupt S., Stuppner H., Langer T.J., 2004.** Combining ethnopharmacology and virtual screening for lead structure discovery: COX-inhibitors as application example, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 44: 480-488.
- **Romani A., Pinelli P., Mulinacci N., 1999.** Identification and quantitation of polyphenols in leaves of *Myrtus communis L.* *Chromatographia* 49: 17–20.

- **Ronner U, Husmark U & Henriksson A ,1990.**Adhesion of Bacillus spores in relation to hydrophobicity. J Appl Bacteriol ,69: 550–556.
- **Rouvillois-Brigol M., 1975.** Le pays de Ouargla (sahara Algérien) variation et organisation d'un espace rural en milieu désertique Ed.dep. de garg. Université de sorbonne, Paris, 202p.
- **Rowshan V., Najafian S., and Aarakemeh A., 2012.** Essential oil chemical composition changes affected by leaf ontogeny stages of myrtle (*Myrtus Communis L.*). Int. J. Med. Arom. Plants, Vol. 2, No.1, pp. 114-117.

-S-

- **Saad S.F., Saber A.H., Scott P.M., 1967.**Pharmacological studies on zygophillin and quinovic acid. Bulletin of the Faculty of Pharmacy, Cairo University, 6: 253–263.
- **Salah Eddine L., 2014.** Etude phytochimique et activité biologique d'extrait de des feuilles de *Phoenix dactylifera L* dans la région du Sud d'Algérie (la région d'Oued Souf),Thèse de doctorat en chimie industrielle, Université Mohamed Khider Biskra.
- **Salah N., Miller N.J., Paganga G., Tijburg L., Bolwell G.P., Rice-Evans C.A., 1995.** Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. Archives of Biochemistry and Biophysics. 339-346.
- **Saleh N.A.M., El-Hadidi M.N., 1977.** Biochem. Syst. Ecol. 5, 121
- **Salminen S., Bouley C., Franck A., 1998.**Functional food science and gastrointestinal physiology and function.Br J Nutr. 80: 147-171.
- **Salvagnini LE., Oliveira JRS., dos Santos LE., Moreira RR., 2008.**J. Pharmacog. 18, 241-244.
- **Sanchez-Moreno C., 2002.** Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. Food Science and Technology International. 8: 121-137.
- **Sandhar H.K., Kumar B., Prasher S., Tiwari P., Salhan M., Sharma P., 2011.** A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. International Pharmaceutica Scientia. 1 (1): 25-41.
- **Santoyo S, Cavero S, Jaime L, Ibanez E, Senorans FJ, Reglero G., 2005.** Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis L.* essential oil obtained via supercritical fluid extraction. J. Food Protect. 68 (4):790-795.

- **Sany J., 2003.** Treatment of rheumatoid polyarthritis. The revolution of biotherapies. Rev Prat (Paris) ; 53 : 1755-6.
- **Sarni-Manchado P, Cheynier V. 2006.** Les polyphénols en agroalimentaire, Ed. Lavoisier (Tec & Doc), Paris, , 300-398.
- **Satrani B., Farah A. et Talbi M., 2006.** Effet de la distillation fractionnée sur la composition chimique et l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du Myrte (*Myrtus communis L.*) du Maroc, Acta Botanica Gallica journal, 153:2, 235-242.
- **Scalbert A., 1991.** Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry. 30: 3875-3883.
- **Schmidt R, Lang F, Heckmann M.,2011.***Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie.* Heidelberg: Springer.
- **Schnebelen B.,Goetz P.,2007.** A` propos de quatre plantes se ´datives dans le traitement du stress feminin, Journal de Phytothérapie clinique,Numéro 2: 76-82
- **Sergent D., 1998.** Résistance aux β -lactamines. Service de Bactériologie-Hygiène – Pitié - Salpêtrière. Faculté de Médecine Université Pierre et Marie Curie. Paris. Pp 32-62.
- **Servin AL., 2004.** Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* 28: 405-440.
- **SFM, 2015.** Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie,P 04.
- **SharmaP., JhaA. B., Dubey R. SetPessaraki M., 2012.** "Reactive Oxygen Species,
- **Shehab N.G., Gharbieh E., Bayoumi F., 2015.**Impact of phenolic composition on hepatoprotective and antioxidant effects of four desert medicinal plants, BMC Complementary and Alternative Medicine ,15:401
- **Shimada T., Koumoto Y., Li L., Yamazaki M., Kondo M., Nishimura M., Hara-Nishimura. 2006.**A putative component of a retromer complex, is required for the efficient sorting o seed storage proteins. *Plant Cell Physiol*; 47:1187–1194.
- **Singleton V. L., Rossi J. R., 1965.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic –phosphothungstic acid. *Am. J. Enol. Vitic*, 16: 144–158.
- **Sivropoulou A, Nikolaou C, Papanikolaou E, Kokkini S, Lanars T, Arsenakis M. 1997.** Antimicrobial, cytotoxic and antiviral activity of *Salvia fruticosa* essential oil. *Jorurnal of Agricultural and Food Chemistry.* 45: 3197–3201.
- **Slimani,I.,Hrouk ,H.,Daoui,A., et Belaidi,R.,2008.**Valorisation de *Ruta montana* :étude ethnobotanique,screening phytochimique et pouvoir antibactérien.
- **Smain A., Martin D., Schinella G., Ríos J.L.,2011.**Anti-inflammatory, anti-oxidant, and apoptotic activities of four plant species used in folk medicine in the Mediterranean basin

- **Smati D., Longeon A., Guyot M., 2004.** 3-(3,4-Dihydroxycinnamoyl)-erythrodiol, acytotoxic constituent of *Zygophyllum geslini* collected in the Algerian Sahara. *J Ethnopharmacol*, 95: 405–407.
- **Smith A. R., Shenvi S. V., Widlansky M., Suh J. H., et Hagen T. M., 2004.** "Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress." *Current Medicinal Chemistry* 11(9): 1135-1146.
- **Soltner, D. 2001.** Les bases de la production végétale : Tome 3 ; la plante et son amélioration, Science et techniques agricoles, P303.
- **Sori A, Rush JB, Lysz T, Smith S, Machiedo G., 1988.** The gut as source of sepsis after hemorrhagic shock. *Am J Surg* ; 155 : 187-92.
- **Southwell ; BR, Duan W ; Alcorn D ; Brack C, Richardson SJ, Kohrle J, Schreiber G, Thyroxine, 1993.** Transport to the brain : Role of protein synthesis by the choroid plexus. *Endocrinology*, 133: 2116-2126.
- **Stabb EV, Jacobson LM & Handelsman J., 1994.** Zwittermicin A-producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. *Appl Environ Microbiol* 60: 4404–4412.
- **Stecher B, Robianni R, Walker AW, Westedorf A, Barthel M, Kremer M, Chaffron S, Macpherson AJ, Buer J, 2007,** intestinal microbiota, *Biol*, 5 : 2177-89.
- **Steer T., Carpenter H., Tuohy K., Gibson Gr., 2000.** Perspectives on the role of the human gut microbiota and its modulation by pro and prebiotics. *Nutr Res Rev.* 13: 229-254.
- **Steyn D.G., 1929.** Recent investigations into the toxicity of known and unknown plants of the Union of South Africa: *Ann. Rep. Division Vet. Serv.*, 15: 777-803.
- **Strang C., 2006.** Larousse medical. Ed Larousse.
- **Sumaya Martinez M. T., 2004.** "Valorisation d'hydrolysats de co-produits de crevettes :
- **Suomi J., H. Sirén K. Hartonen and Riekkola M.L., 2000.** Ethnopharmacology of the plants of the genus *Ajuga*. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 22(4): 425-462.
- **Sylvie C., 2009.** La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important. Le parrainage des antimicrobiens. *Pharmactuel Vol. 42* ; Pp : 09 – 17.

-T-

- **Taamalli A., Iswaldi I., Arráez-Román D., 2014.** UPLC–QTOF/MS for a Rapid Characterisation of Phenolic Compounds from Leaves of *Myrtus communis* L., *Phytochemical Analysis journal*, Volume 25, Issue 1, pages 89–96.
- **Tahraoui A., Israili ZH., & Lyoussi B., 2010.** Acute and sub-chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of *Centaurium erythraea* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 132: 48-55.
- **Taleb-Toudert K., 2015.** Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région de la Kabylie (Nord Algérien). Evaluation de leur effets sur la bruche du niébé *Callosobruchus maculatus* (Choleoptera :Bruchidea), Thèse de doctorat en sciences biologiques, Tizi-Ouzou, Algérie.
- **Tams TR., 1986.** Chronic feline inflammatory bowel disease. Part I: Idiopathic inflammatory bowel disease. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, 8, 371-376.
- **Tapas et al., 2008.** A.R. Tapas, D.M. Sakarkar, R.B. Kakde Flavonoids as nutraceuticals: a review *Trop. J. Pharm. Res.*, 7 (3) (2008), pp. 1089–1099
- **Tatsuya H., Fumihide T., Takanobu T., Masato N., Tomihisa O., 2008.** *Phytochemistry* 69, p. 747-753.
- **Tauxe RV., 2002.** Emerging foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol.* 78: 31-41.
- **Teyssou P., Hance E., Nicand J.Y., Nizou Y., 1998.** Les infections à *Bacillus cereus* : bactériologie, clinique et traitement, *La Lettre de l'Infectiologue - Tome XIII*.
- **Tigrine-Kordjani N, Meklati BY, Chemat F. 2006b.** Analysis by gas chromatography–mass spectrometry of the essential oil of *Zygophyllum album* L. an aromatic and medicinal plant growing in Algeria. *Int J Aromather* 16: 187–191.
- **Tigrine-Kordjani N, Meklati BY, Chemat F. 2010c.** Contribution of Microwave Accelerated Distillation in the Extraction of the Essential Oil of *Zygophyllum album* L., *journal of phytochemical analysis*
- **Tigrine-Kordjani N, B.Y. Meklati and Chemat F., 2006.** Analysis by gas chromatography–mass spectrometry of the essential oil of *Zygophyllum album* L., an aromatic and medicinal plant growing in Algeria, *The International Journal of Aromatherapy*, 16, 187–191.
- **Tigrine-Kordjani, N., 2007a.** Apport de la technique du chauffage micro-ondes dans l'extraction et l'analyse des huiles essentielles algériennes *zygophyllum album l.* et *Rosmarinus officinalis*, Thèse de doctorat en Chimie, Université d'Alger, Algérie.

- **Timbo B., 2003.** Etude phytochimique et des activités biologiques de *Trichilia emetica* ;
- **Tir Wouil Meddah, T., L. Leke · M. B. Romond, E. Grenier · C. Cordonnier · B. Risbour, J. P. Canarelli, 2001.** The effect of mesenteric ischemia on ileal colonization, intestinal integrity, and bacterial translocation in newborn, *pediatr surg int*, 17:515–520
- **Tiwari O. N., and Rohinikumar Singh M., 2005.** Biodiversity, occurrence and succession of Cyanobacteria. *Journal of Industry and Botanical Society*. 84 (1-4); 107-110.
- **Torres R., Faini F., Modak B., Urbina F., Labbe´ C., Guerrero J., 2006:** Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudate of *Haplopappus multifolius*. *Phytochemistry*. 67: 984–987.
- **Touaibia M., CHAOUCH F., 2013.** Pouvoir antioxydant des extraits de *Myrtus communis* L. obtenus in situ et in vitro, *Nature and Technology Journal*.
- **Trabelsi N., Megdiche W., Ksouri R., Falleh H., Oueslati S., Bourgou S., et al., 2010.** Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT – Food Science and Technology*, 43, 632–639.
- **Traoré dossahoua, Koffi n’guessan, Beugré kadja, Guédé n. zirihi, & Laurent aké-assi, 2009.** Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d’Ivoire), *Sciences & Nature* Vol. 6 N°1 : 1 – 15.
- **Tuberoso C., Barra B., Angioni A., Sarritzu E., and Pirisi F., 2006.** Chemical Composition of Volatiles in Sardinian Myrtle (*Myrtus communis* L.) Alcoholic Extracts and Essential oil, *J. Agric. Food Chem.* 54, 1420–1426.
- **Tuberoso CIG., Rosa A., Bifulco E., Melis MP., Atzeri A., Pirisi FM., et al., 2010.** Chemical composition and antioxidant activities of *Myrtus communis* L. berries extracts. *Food Chem*; 123: 1242-1251
- **Tuladhar, R., Patole, S.K., Koh, T.H., Norton, R., Whitehall, J.S. 2000.** Refractory *Bacillus cereus* infection in a neonate. *Int. J. Clin. Pract.* 54:345-347.

-U-

- **Ultee A., M.H.J. Bennink and R. Moezelaar 2002.** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (4): 1561–1568. PhD thesis, ISBN 90- 5808-219-9.

-V-

- **Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M. et Mazur M., 2006.** "Free radicals, metals.
- **Van Camp JM, Tomaselli V, Drongowski R, Coran AG (1993)** Bacterial translocation in the newborn, the effect of age on frequency of translocation. *Circ Shock* 2,, 42–43
- **Van Den Eeden SK1, Tanner CM, Bernstein AL, Fross RD, Leimpeter A, Bloch DA, Nelson LM. 2003 Jun** .Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epi.demiol.* 1;157(11):1015-22.
- **Ventura M., 2004.** Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Anton leeuw.* 86: 205-223.
- **Verhoeven M. E., Bovy A., Collins G., Muir S., Robinson S., De Vos C. H. R. et Colliver S., 2002.**Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthesis pathway. *Journal of experimental botany.* 53 (377): 209 -210.
- **Vermerris W., Nicholson R., 2006.** Phenolic compound chemistry. Ed: SPRINGER. p: 1-70.
- **Vincent JL, Brealey D, Libert N, Abidi NE, O'Dwyer M, Zacharowski K, 2013.** Rapid diagnosis of infection in the critically ill, a multicenter study of molecular detection in bloodstream infections, pneumonia, and sterile site infections. *Crit Care Med.*;43:2283–91.
- **Voigt J.,2000.**Anatomie pathologiques.PICCIN,Nuova Libreria SPA,Italie,Pp :44-48

-W-

- **W –Erdman J., Balentine J. D., Arab L., Beecher G., Dwyer J. T., Folts J., Harnly., Hollman J. P., Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., Williamson G. et Burrowes J., 2007.** Flavonoids and heart health: Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, may 31-june 1, 2005, Washington. *Journal of Nutrition.* 137 (3 supp 1): 718 s-737 s.
- **W.H.O. 2015.** A report of the consultation meeting on traditional and modern medicine: Harmonizing two approaches, Beijing, Geneve: 22-26.
- **Wade D., Silveira A., Rollins-Smith L., Bergman T., Silberring J., Lankinen H.,2001.** Hematological and antifungal properties of temporin A and a cecropin A-temporin a hybrid. *Acta Biochim Pol.* Vol. 48. Pp: 1185 – 1189.

- **Wang H., Nair MG., Strasburg GM., Chang YC., Booren AM., Gray JL., Dewitt DL. 1999.**Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon,cyanidin, from tart cherries. *J Nat Prod*; 62:294–6.
- **Wang S.Y., Stretch A., 2001.**Antioxidant capacity of cranberry is influenced by cultivar and storage temperatures. *J Agric Food Chem*; 49:969–74.
- **Wannes W., Mhamdi B., Sriti J., Ben Jemia M., Ouchikh O., Hamdaoui G., Elyes Kchouk M., 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.
- **Wannes W.A., Mhamdi B., Marzouk B., 2009.** GC comparative analysis of leaf essential oils from two myrtle varieties at different phenological stages. *Chromatographia* 69,145-150.
- **Watt J.M., and Breyer-Brandwijk M.G., 1962.** The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa : 2nd Edn., E and S Livingstone Ltd., P : 1457. London, UK.
- **Weber, D.J., Saviteer, S.M., Rutala, W.A., Thomann, C.A. 1988.** *In vitro* susceptibility of *Bacillus* spp. to selected antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:642-645.
- **Wei A., Shibamoto T., 2007.** Antioxidant activities and volatile constituents of essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 54, 1737–1742.
- **Wilcks A., Bjarne M.H., Hendriksen N.B., Licht T.R., 2006.** Fate and effect of ingested *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in the intestinal tract of human-flora-associated rats: *FEMS Immunology and Medical Microbiology journal*, Volume 46, Issue 1 Pp :70-77.
- **Willem, J.P. 2002.** Le guide des huiles essentielles pour vaincre vos problèmes de santé Editions LMV.
- **Wink M., 1993.** Allelochemical properties or the raison d'être of alkaloids. Academic Press, San Diego, pp. 118-119.
- **Wong, H.C., Chang, M.H., Fan, J.Y. 1988.** Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:699-702.
- **Wright GD. 2005** .Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev.* Jul 29;57(10):1451-70.

-Y-

- **Yala D., Merad A.S., Mohamedi D., Ouar Korich M.N., 2001.** Résistance bactérienne aux antibiotiques. Médecine du Maghreb N° 91.
- **Yi-Zhong C., Mei S., Jie X., Qiong L., Corke H., 2006.** Structure-radical scavenging activity (Paris); p: 91478(25): 2872-2888.

-Z-

- **Zablotowicz RM., Hoagland RE., Wagner SC., 1996.** Effect of saponins on the growth and activity of rhizosphere bacteria. Adv. Exp. Med. Biol; 405:83 -95.
- **Zedde C., 2009.** La purification dans le laboratoire de synthèse, service hplc spcmib/ict/pict toulouse iii.
- **Zheng W., Wang SY. 2003.** Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries and lingonberries. J Agric Food Chem; 51:502–9.
- **Ziane, M., 2015.** Caractérisation, identification et étude de la thermorésistance de souches de *Bacillus cereus* isolées de semoule de couscous, these de doctorat en microbiologie, Pp 07, Tlemcen.
- **Zoetendal, E.G., Cheng, B., Koike, S., and Mackie, R.I. 2004.** Molecular microbial ecology of the gastrointestinal tract: from phylogeny to function. Curr Issues Intest Microbiol 5: 31–48.

Annexes

1-Les Alcaloïdes

- Macération

La poudre des extraits obtenus (10 g) de chaque plante est mise dans un erlenmeyer de 250 ml+ 50 ml de H₂SO₄ diluée au 1/10 (50 ml). Ensuite une agitation et macération pendant 24 heures à la température ambiante du laboratoire est faite. Enfin une filtration sur papier lavé à l'eau distillée est appliquée de manière à obtenir environ 50 ml de filtrat.

- Réactions de caractérisation

- 1 ml de filtrat + 5 gouttes du réactif de MAYER (5 g de KI et 1,358 g de HgCl₂ solubilisés dans 100 ml d'eau distillée), s'il apparaît un précipité c'est qu'on est en présence d'alcaloïdes. (Précipité blanc-jaunâtre)

2- Les Dérivés Anthracéniques: y compris les quinones et les anthraquinones

- Extrait chloroformique : A 1 g de l'extrait en poudre, on ajoute 10 ml de chloroforme et on chauffe au bain-marie pendant 3 mn, puis on filtre à chaud et on complète à 10 ml si nécessaire.
- Hydrolysât : A une partie du résidu de la poudre épuisée par le chloroforme, on rajoute 10 ml d'eau distillée et 1 ml d'acide chlorhydrique concentré. On doit maintenir le tube à essai dans le bain-marie bouillant pendant 15 mn. Ensuite on refroidit sous un courant d'eau et on filtre. Et enfin on complète à 10 ml avec l'eau distillée.
- Caractérisation :
 - ' Dérivés anthracéniques libres :

1 ml d'extrait chloroformique + 1 ml de NH₄OH dilué puis agitation; la coloration plus ou moins rouge indique la présence d'anthraquinones libres.

- ' Dérivés anthracéniques combinés:

- a) anthraquinone ou O-hétérosides:

Prélever 5 ml d'hydrolysât et agiter avec 5 ml de chloroforme, soutirer la phase organique et l'introduire dans un tube à essai, ajouter 1 ml de NH₄OH dilué. Agiter, la présence d'anthraquinones est révélée par la coloration rouge plus ou moins intense.

- b) C-hétérosides

Reprendre la phase aqueuse qui a été conservée au cours de la caractérisation des O-hérosides par 10 ml d'eau distillée et ajouter 1 ml de FeCl₃ à 10%. Maintenir le tube à essai dans un bain-marie bouillant pendant 30 mn, refroidir et agiter avec 5 ml de chloroforme, soutirer la phase chloroformique dans un tube à essai. Ajouter 1 ml de NH₄OH dilué et agiter. Une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence de génines de C-hétérosides.

3- Flavonoïdes (Anthocyanes)

A 5 ml d'infusé à 5% présentant une coloration plus ou moins foncée ; ajouter 5 ml d'acide sulfurique puis 5 ml de NH₄OH. Si la coloration s'accroît par acidification puis vire au bleu violacé en milieu basique, on peut conclure la présence d'anthocyane.

4- Tanins

La préparation de l'infusé : l'extrait sec (5 g) dans de l'eau distillée bouillante (100 ml) contenue dans un erlenmeyer de 250 ml puis infusion pendant 15 mn (infusé à 5%). A 30 ml d'infusé à 5%, nous avons ajouté 15 ml de réactif de Stiasny (10 ml de formol à 40% plus 5 ml HCl concentré) et chauffé au bain-marie à 90°C pendant 15 mn. L'obtention d'un précipité montre la présence de tanins catéchiques. Filtrer et saturer le filtrat d'acétate de sodium pulvérisé. Ajouter 1 ml d'une solution de FeCl₃ à 1%. Le développement d'une teinte bleu noire indique la présence de tanins non précipités par le réactif de Stiasny : ce sont les tannins galliques.

5- Saponosides

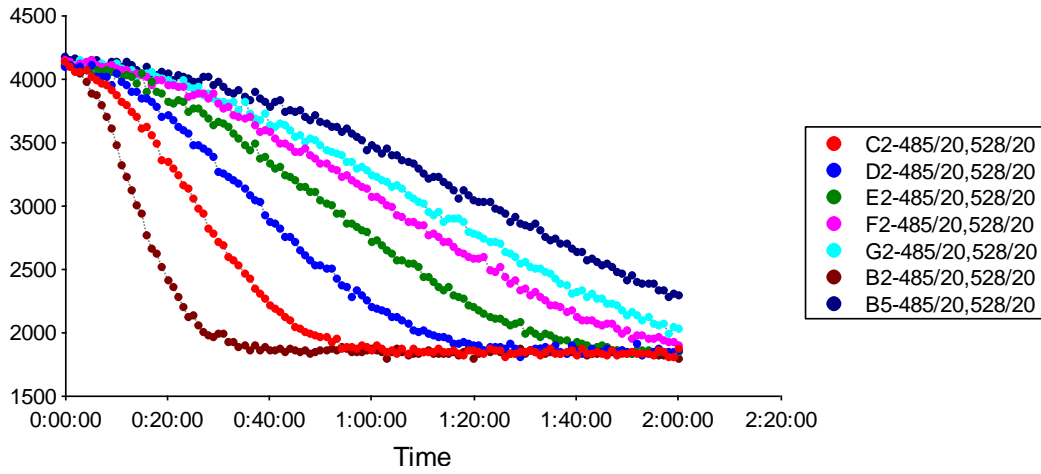
Elle se fait sur le décocté à 10% de la drogue. Dans une série de 10 tubes à essai de 160 × 16mm, répartir 1, 2, ..., 10ml d'extrait et ajuster le volume à 10 ml dans chaque tube.

Agiter ensuite dans le sens de la longueur pendant 15 secondes en raison de 2 agitations par seconde, laisser reposer 15 mn et mesurer la hauteur de la mousse dans chaque tube. Celui (X) dans lequel la hauteur fait 1cm indique la valeur de l'indice de mousse.

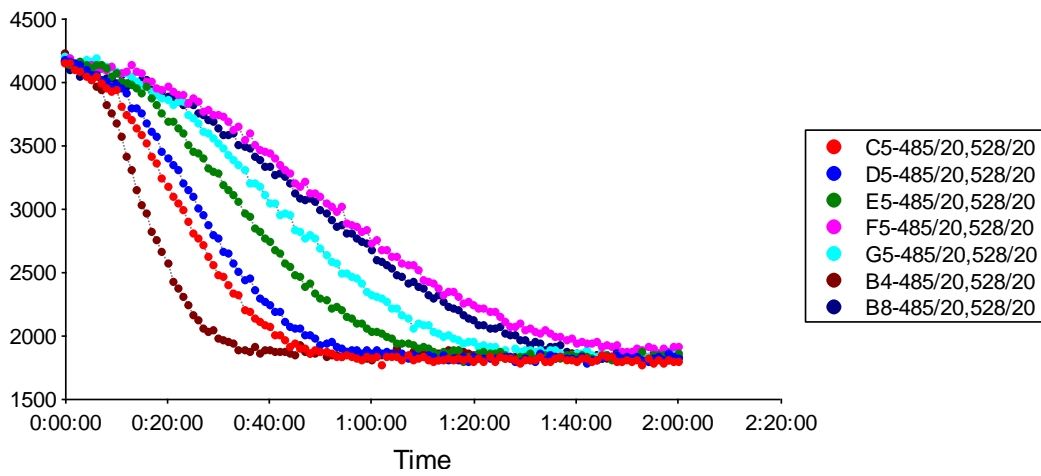
6- Stérols et Triterpènes : réaction de Lieberman-Burchard

Elle se fait sur une macération de 24h à 5% dans l'éther. L'extrait éthérique est ensuite évaporé à sec et repris avec 1 ml de l'anhydride acétique puis 1 ml de chloroforme. Déposer au fond du tube, contenant l'extrait, de l'acide sulfurique. En cas de réaction positive il se forme un anneau rouge-brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides, la couche surnageante étant verte ou violette.

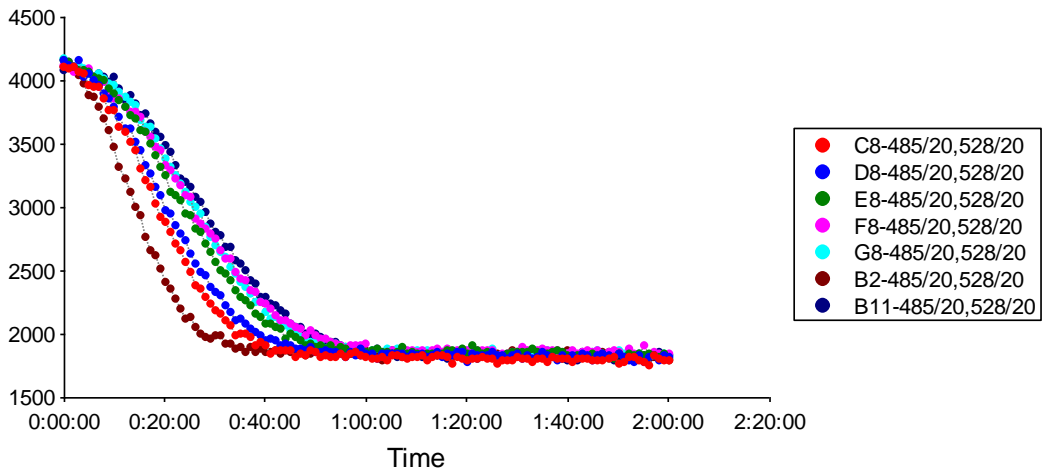
-Résultats des net AUC calculés pour tous les extraits végétaux à différentes concentration (Méthode ORAC)



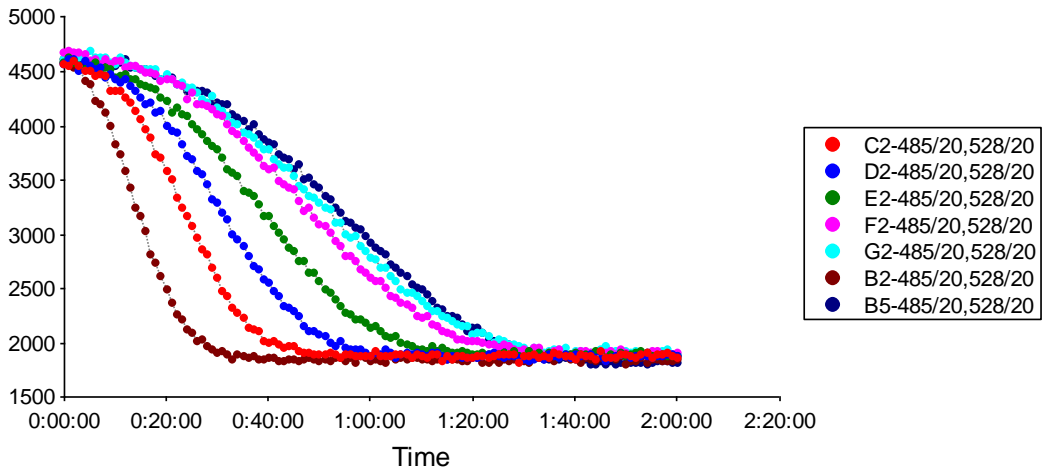
MCH 1/50



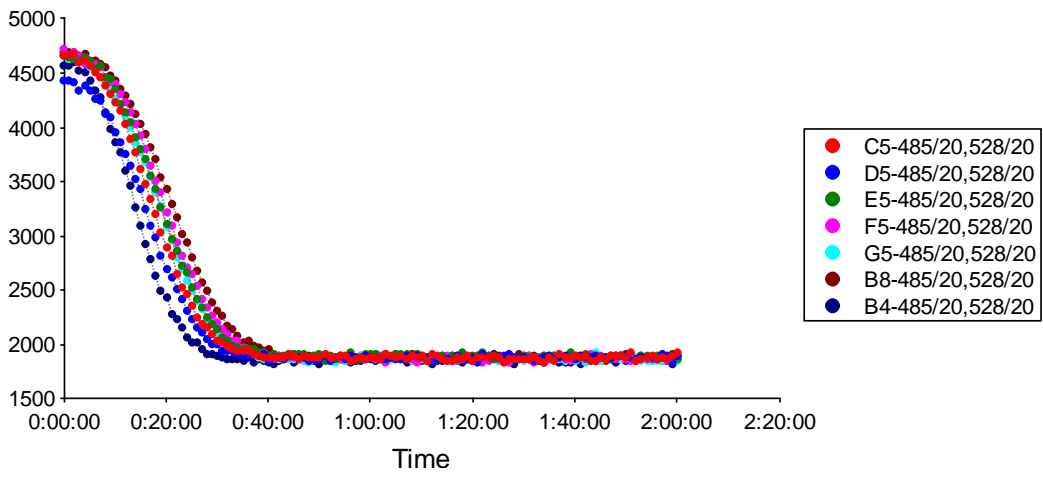
MCH 1/100



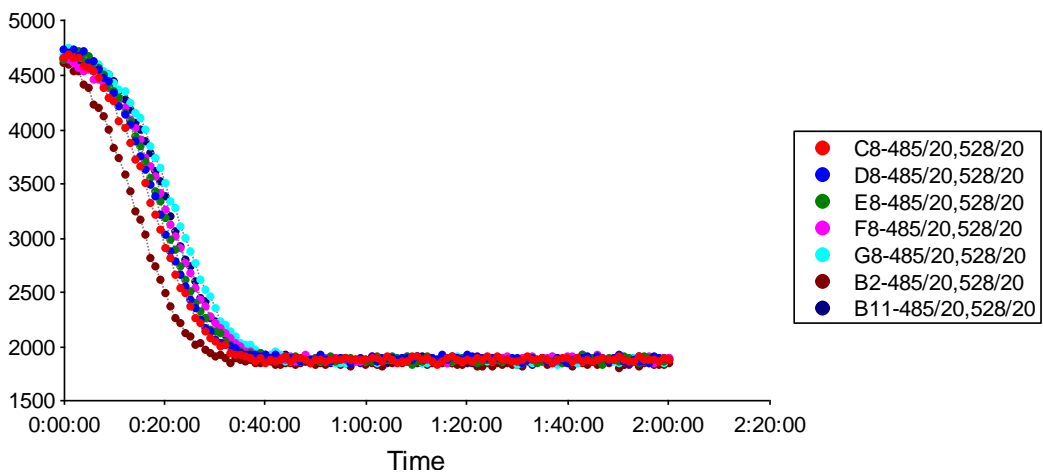
MCA 1/200



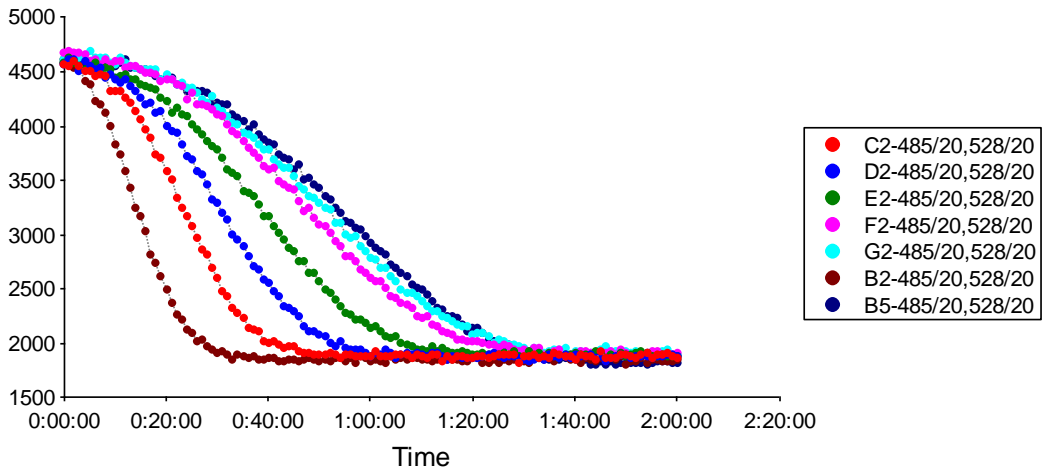
MCA 1/50



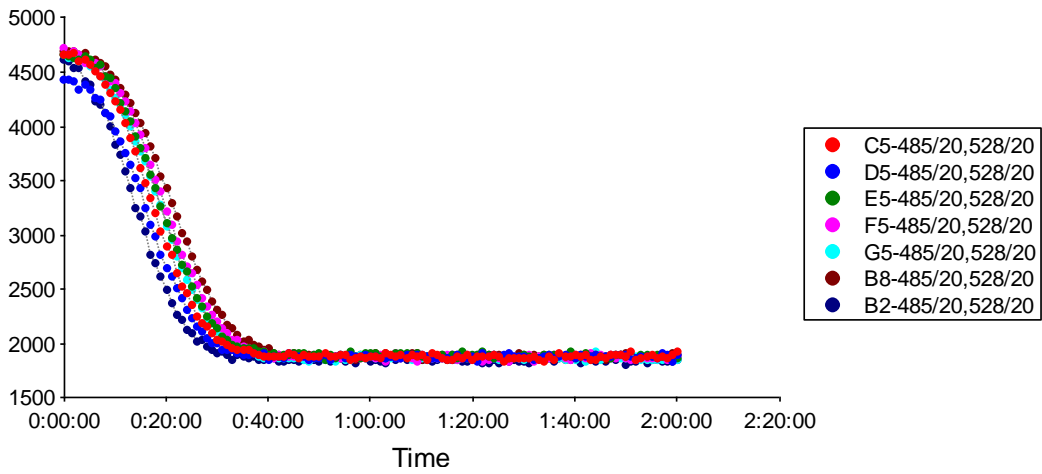
ZAH 1/100



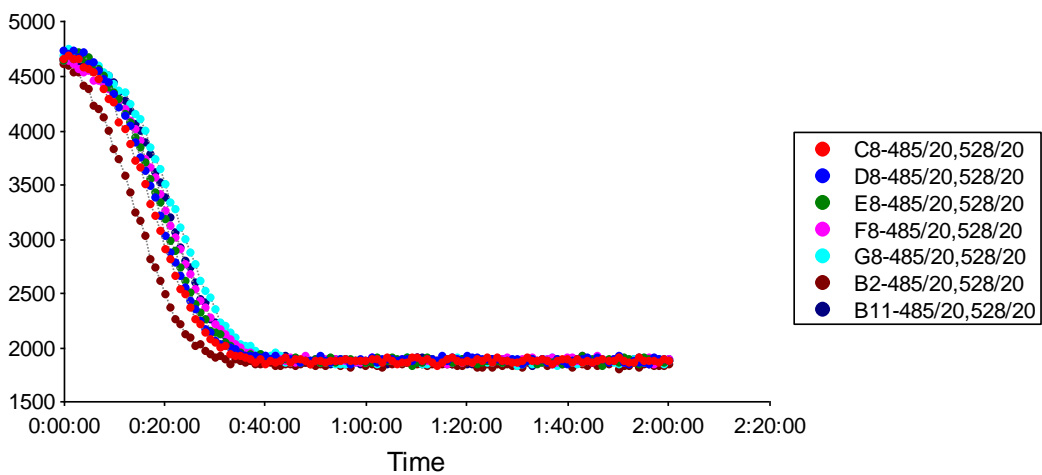
ZAH 1/200



ZAM1/50



ZAM 1/100



ZAM 1/200

1-Analyse statistique des résultats phytochimiques et activité antioxydante

➤ Dosage des polyphénols

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	2590,0798	3	863,359934	0,1855783	0,9041605	
A l'intérieur des groupes	55827,1847	12	4652,26539	9	5	3,49029482
Total	58417,2645	15				

➤ DPPH test (IC50)

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	82,6208849	5	16,524177	66,927019	2,4124E-	
A l'intérieur des groupes	2,96278135	12	0,24689845	1	08	3,10587524
Total	85,5836662	17				

➤ TAC test

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	7810,04849	3	2603,3495	2607,3909	2,6804E-	
A l'intérieur des groupes	7,9876	8	0,99845	5	12	4,06618056
Total	7818,03609	11				

2-Analyse statistique de l'étude *in vivo*

➤ température rectale :Significatif Avec P (0.05)

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	11,5651576	10	1,15651576	3,3457788	0,0009969	1,94004422
A l'intérieur des groupes	30,4184444	88	0,34566414			
Total	41,983602	98				

➤ Poids des organes

-MCH (Significatif AVEC P(0.05))

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	0,54367616	4	0,13591904	0,0114617	0,99971623	2,8660814
A l'intérieur des groupes	237,170733	20	11,8585366			
Total	237,714409	24				

-MCA (Significatif AVEC P (0.05))

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	0,46583416	4	0,11645854	0,00988019	0,9997886	2,8660814
A l'intérieur des groupes	235,741389	20	11,7870694			
Total	236,207223	24				

-ZAH (Significatif AVEC P (0.05))

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	0,56414656	4	0,14103664	0,0121228	0,9996828	2,8660814
A l'intérieur des groupes	232,679434	20	11,6339717	3	8	
Total	233,24358	24				

-ZAM (Significatif AVEC P (0.05))

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	0,53313056	4	0,13328264	0,0113116	0,9997235	2,8660814
A l'intérieur des groupes	235,65575	20	11,7827875	4	4	
Total	236,18881	24				

➤ **Translocation bactérienne****-MCH (significatif(p(0,05))**

ANALYSE DE VARIANCE

Foie

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	11,7530566	4	2,93826416	13,3364005	5,9883E-06	2,75871047
A l'intérieur des groupes	5,50797827	25	0,22031913			
Total	17,2610349	29				

ANALYSE DE VARIANCE

Rate

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	2,9099648	4	0,7274912	9,96471558	5,7976E-05	2,75871047
A l'intérieur des groupes	1,825168	25	0,07300672			
Total	4,7351328	29				

ANALYSE DE VARIANCE

Reins

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	1,18829947	4	0,29707487	9,13114512	0,00010877	2,75871047
A l'intérieur des groupes	0,813356	25	0,03253424			
Total	2,00165547	29				

ANALYSE DE VARIANCE

Poumons

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	1,07989813	4	0,26997453	6,65932482	0,00085952	2,75871047
A l'intérieur des groupes	1,01352067	25	0,04054083			
Total	2,0934188	29				

ANALYSE DE VARIANCE

Colon

Non significatif

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	1,50965067	4	0,37741267	0,88641948	0,48638934	2,75871047
A l'intérieur des groupes	10,644302	25	0,42577208			
Total	12,1539527	29				

ANALYSE DE VARIANCE

Intestin

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	1,50965067	4	0,37741267	0,88641948	0,48638934	2,75871047
A l'intérieur des groupes	10,644302	25	0,42577208			
Total	12,1539527	29				

ANALYSE DE VARIANCE

Sang

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	2,51433253	4	0,62858313	1,69407912	0,18285403	2,75871047
A l'intérieur des groupes	9,27617733	25	0,37104709			
Total	11,7905099	29				

-MCE

Foie

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	1,28109698	4	0,32027424	10,2338014	4,7622E-05	2,75871047
A l'intérieur des groupes	0,78239315	25	0,03129573			
Total	2,06349013	29				

Rate

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	3,33926668	4	0,83481667	13,2250737	6,4152E-06	2,75871047
A l'intérieur des groupes	1,57809455	25	0,06312378			
Total	4,91736123	29				

Reins (Non significatif)

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	0,23897945	4	0,05974486	0,40132621	0,80580825	2,75871047
A l'intérieur des groupes	3,72171439	25	0,14886858			
Total	3,96069384	29				

Poumons (non significatif)

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	0,22426443	4	0,05606611	0,117883	0,9749027	2,75871047
A l'intérieur des groupes	11,8901117	25	0,47560447	9	3	
Total	12,1143761	29				

Cœur

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	1,19308071	4	0,29827018	8,16320788	0,00023517	2,75871047
A l'intérieur des groupes	0,91345885	25	0,03653835			
Total	2,10653956	29				

Colon

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	12,1324526	4	3,03311315	13,9931753	4,0191E-06	2,75871047
A l'intérieur des groupes	5,4189151	25	0,2167566			
Total	17,5513677	29				

Intestin

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	0,23897945	4	0,05974486	0,4013262	0,8058082	2,75871047
A l'intérieur des groupes	3,72171439	25	0,14886858	1	5	
Total	3,96069384	29				

-ZAH

Foie

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	13,1625446	4	3,29063616	35,8843924	5,0899E-10	2,75871047
A l'intérieur des groupes	2,29252604	25	0,09170104			
Total	15,4550707	29				

Rate

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	3,25396533	4	0,81349133	11,7885039	1,6155E-05	2,75871047
A l'intérieur des groupes	1,72517933	25	0,06900717			
Total	4,97914467	29				

Reins

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	1,24073813	4	0,31018453	8,81090584	0,00013967	2,75871047
A l'intérieur des groupes	0,88011533	25	0,03520461			
Total	2,12085347	29				

Poumons

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	1,20645653	4	0,30161413	10,365136	4,331E-05	2,75871047
A l'intérieur des groupes	0,72747267	25	0,02909891	3		
Total	1,9339292	29				

Colon

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	0,2085072	4	0,0521268	0,2555311	0,9035245	2,75871047
A l'intérieur des groupes	5,09984867	25	0,20399395	1	2	
Total	5,30835587	29				

Intestin

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
				0,8706768	0,4952623	
Entre Groupes	0,43851467	4	0,10962867	7	2	2,75871047
A l'intérieur des groupes	3,1478	25	0,125912			
Total	3,58631467	29				

- ZAM

Foie

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
				9,1311451	0,0001087	
Entre Groupes	1,18829947	4	0,29707487	2	7	2,75871047
A l'intérieur des groupes	0,813356	25	0,03253424			
Total	2,00165547	29				

Rate

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	1,07754613	4	0,26938653	6,54501074	0,00095362	2,75871047
A l'intérieur des groupes	1,02897667	25	0,04115907			
Total	2,1065228	29				

Reins (Non significatif)

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	0,9061048	4	0,2265262	0,56387168	0,69106065	2,75871047
A l'intérieur des groupes	10,04334	25	0,4017336			
Total	10,9494448	29				

Poumons

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
				1,2657058	0,3097090	
Entre Groupes	1,68328613	4	0,42082153	2	1	2,75871047
A l'intérieur des groupes	8,31199333	25	0,33247973			
Total	9,99527947	29				

Colon

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	11,9927693	4	2,99819233	17,968557	6	4,554E-07
A l'intérieur des groupes	4,1714427	25	0,16685771			2,75871047
Total	16,164212	29				

*Publications
internationales*

**ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF THE ESSENTIAL OILS
AND PHENOLIC EXTRACTS OF MYRTUS COMMUNIS AND ZYGOPHYLUM
ALBUM FROM ALGERIA**

A. Belmimoun^{1,*}, B. Meddah¹, A.T.Meddah¹ and P.Sonnet²

¹Laboratory of Research, Bioconversion, Engineering Microbiology and Health Safety,
University of Mascara, Algeria

²Laboratory of Glucides- Team Thera- FRE-CNRS 3517, Faculty of Pharmacy, University of
Picardie, Amiens, France

Received: 03 December 2015 / Accepted: 23 April 2016 / Published online: 01 May 2016

ABSTRACT

The present study deals with the evaluation of the in vitro antioxidant and antibacterial activity of phenolic extracts and essential oils of two medicinal and aromatic plants *Zygophyllum album* and *Myrtus communis* by using the 2,2- diphenyl-2-picrylhydrazyl radical ,total antioxidant power and agar diffusion methods and minimum inhibitory concentration (MIC) determination. Moreover, the extracts were investigated for their polyphenolic, flavonoids, tannins and anthocyan content by using the Folin-Ciocalteu assay, the aluminium trichlorid method, reaction with vanillin and colometer method based on differentiation of absorbance, respectively. The results showed that the highest antioxidant capacity was exhibited by the aqueous extract of *Myrtus communis* with IC₅₀= 29,080mg/ml. All extracts possessed more or less antibacterial activity against the tested Gram- positive and Gram – negative bacteria *Bacillus subtilis* and *E.coli* were the more susceptible microorganisms to all extracts and essential oils. Pronounced antibacterial activity was observed by the methanolic extract of *Zygophyllum album* (MIC value=25 µg/ml). Moreover, the results showed that the phenolic compounds and flavonoids were abundant in Myrtle aqueous extracts.

Key Words: antimicrobial; antioxidant; plant; essential oil; phenolic extract.

Author Correspondence, e-mail: belmimoun_asmaa@yahoo.fr

doi: <http://dx.doi.org/10.4314/jfas.v8i2.22>



1. INTRODUCTION

There is a popularity and scientific interest to screen essential oils and extracts of plants used medicinally in all over the world [1]. The main volatile constituents of the essential oils have been used historically in the pharmaceutical, food and perfume industries because of their antibacterial properties, culinary and fragrance, respectively. Antioxidants have been widely used as additives to avoid the degradation of foods. Also, are compounds that react with free radicals, neutralizing them and thereby preventing or reducing their damaging effects in the human body [2]. Lipid oxidation is so responsible for deterioration of fats and oils resulting in change color, flavor and nutritive value, while oxidative stress is involved in the pathogenesis of numerous diseases.

The problems regarding application of conventional antibiotics, including antimicrobial resistance, environmental problems, cancerogenicity, side effects and high costs, have reinforced a tendency to replace synthetic antimicrobials with natural alternative agents [3]. Plant based products are among the alternative agents examined in order to replace conventional antibiotics. Accordingly, extensive research has been carried out in order to evaluate the antimicrobial effect of the essential oils and extracts which showed the ability to inhibit the growth of various pathogenic microorganisms [4].

With that in mind, the halophyte *Zygophyllum album* L. (Zygophyllaceae) might be of interest. This species has long been used in traditional medicine as a remedy for rheumatism, gout, asthma and as diuretic. Nowadays, it is still used against aches and thirst, for wound care or treatment of dental caries, and to wash clothes and hair. Some phytochemical data on *Z. album* have been reported [5], although the chemical composition and biological activities of *Z. album* have not been fully elucidated.

Myrtus Communis L. is an evergreen shrub belonging to the Myrtaceae family that grows wild around the Mediterranean region. It is commonly known as myrtle. Its leaves are pleasantly scented making it valuable for the perfume industry. It has white star-like delicate flowers and the fruit is a round, dark-blue berry containing the seeds. Many medicinal and nutraceutical properties have been attributed to myrtle, which has been used since ancient times in folk medicine. It is traditionally used as an antiseptic and wound healing, disinfectant, hypoglycaemic agent, with anti-hemorrhagic, antimicrobial and antioxidant properties [6].

Here, we report the composition and antibacterial and antioxidant activity of the essential oil and various extracts of *Myrtus communis* and *Zygophyllum album* from Algeria as well as total phenolics, total flavonoids, condensed tannins, and total anthocyanins of these plants.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Plant material

Myrtle (*M. communis* var. *italica* L.) aerial parts were collected at the flowering stage in July 2014 from Honaine region (North East of Tlemcen-west of Algeria. In the case of *Z.album*; fresh aerial parts were collected in August 2014 from Sidi Khouiled region (sahara of Ouargla).

The sampling was done by a randomized collection of 15–20 shrubs and sub-shrubs in an area of about 200 m² each. Myrtle leaves, and areal parts of *Z.album* were isolated manually in our laboratory to obtain a weight of 500–700 g of each part. Botanical identification of this species was carried out according to African flowering plants database and by local experts.

2.2. Bacterial strains

The bacteria used in the antibacterial tests were: Gram-positive (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *clostridium sp.*) and Gram-negative (*E.coli*, *salmonella typhi* and *Shigella sp.*)

All strains isolates from different environment, all bacterial strains have been provided by Laboratory of Microbiology, Faculty of Biology, and University of Mascara, Algeria.

2.3. Essential oil isolation

The plant samples were separately water distilled in a Clevenger type apparatus for 3 h (time fixed after a kinetic survey during 30, 60, 90,120, 150, 180 and 210 min). According to the method recommended by the French standard method AFNOR (2000), all experiments were done in triplicates and results were expressed on the basis of dry matter weight. The essential oil was stored at 4 C in the dark.

2.4. Polyphenols extraction

The plant materials was dried at ambient temperature and stored in a dry place prior to use. The plant was washed well with water, dried at room temperature in the dark, and then ground in an electric grinder to give a coarse powder. In this study, samples were extracted by decoction (10%), maceration with ethanol (8%) and by extraction with solvents of increasing polarity (Dichloromethan and methanol/soxhlet) methods.[7,8].

2.5. Phytochemical screening by colometer method

All plant extract were tested for the presence of different families of compounds according to methods reviously described [9], [10].

Table 1. Phytochemical screening of phenolic extracts of *Zygophyllum album* and *Myrtus communis*

	<i>Myrtus communis</i>				<i>Zygophyllum album</i>			
	Aqu.E	Eth.E	DCM.E	Met.E	Aqu.E	Eth.E	DCM.E	Met.E
Alcaloids	+++	-	-	-	-	-	-	++
Free anthraceniq derived	+	-	-	-	-	-	+	-
anthraquinons	-	-	-	-	-	-	-	-
C-hétérosides	+	+	+	+	+	+	-	++
Anthocyanes	+++	+	+	+	-	-	+	+
Saponins	-	+++	-	-	+++	+	+	++
Tannins	+++	-	-	-	+	+	+	+
Flavonoids	+++	-	-	-	+	-	+	++

According to the screening results and based on the richness on compounds, two phenolic extracts were selected for study; aqueous extract of *Myrtus communis* and methanolic extract of *Zygophyllum album*

2.6. Polyphenols analysis

The total phenolic in extracts content was determined by spectrometry using “Folin-Ciocalteu” reagent assay [11]. Gallic acid was used as a standard for the calibration curve. The total phenolic content was expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of dry weight (mg GAE/g DW).

2.7. Condensed tannin content

Condensed tannins were transformed by the reaction with vanillin to anthocyanidols. Condensed tannin contents of each organ (three replicates per treatment) were expressed as mg catechin equivalents per gram (mg CE/g) through the calibration curve with catechin.

2.8. Total flavonoid content

Total flavonoid content was measured according to [12]. Total flavonoid contents were expressed as mg catechin equivalents per gram (mg CE/g).

2.9. Total anthocyanins content

Total anthocyanins content was evaluated by colorimetry using a UV-visible spectrophotometer

The concentration of anthocyanin pigment in the extract is expressed in mg equivalent cyanidin-3 glucose per liter of solution or mg of cyanidin-3 equivalent glucose / g dry matter (Cg / g dM) [13].

2.10. Antioxidant activity assays

DPPH scavenging assay

The hydrogen atom donation ability of chemical compounds in leaves and stems was measured on the basis to scavenge the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil free radical [21]. Fifty microliter of various concentrations of the extracts in methanol were added to 1950 μ l of a 0.025 g/l methanol solution DPPH. After a 30-min incubation period at room temperature, the absorbance was read against a blank at 515 nm. DPPH free radical scavenging activity in percentage (%) was calculated using the following formula:

$$\text{DPPH scavenging activity (\%)} = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}/A_{\text{blank}}) \cdot 100$$

Where: A_{blank} is the absorbance of the control reaction (containing all reagents except the test compound), A_{sample} is the absorbance of the test compound.

Extract concentration providing 50% inhibition (EC_{50}) was calculated from the graph plotted of inhibition percentage against extract concentrations. The ascorbic acid methanol solution was used as positive control.

Total antioxidant power

During this test, hydrogen and electron is transferred from the reducing compound (antioxidant extract) to the oxidant complex (PPM). This transfer depends on the redox potential of pH of the medium and the structure of the antioxidant compound.

The method comprises introducing 300 μ l of the extract of the leaves mixed with 2.7 ml of a reagent consisting of H_2SO_4 (0.6 M), NaH_2PO_4 (28 mM) and ammonium molybdate (4 mM).

The tube is then incubated at 95 ° C for 90 minutes. After being cooled, the absorbance is measured at 695 nm. The control consisted of 300 μ l of methanol mixed with 2.7 ml of the reagent mentioned above; the calibrators, controls and samples are incubated under the same conditions. The results are expressed in mg of gallic acid equivalents per gram of dry material (mg E AG/g Ms).

2.11. Antibacterial activity assays

- **Bacterial strains and Antibiotic susceptibility test**

The antibiotic discs Amoxicillin (AX 30 μ g) several bacterial strains were isolated from different environments and subjected to disk diffusion method using 06 different antibiotics according to [14]. The antibiotic discs Amoxicillin (AX, 30 μ g), Oxacillin (OX, 5 μ g),

Cefazolin (CZ, 30µg), Gentamycin (CN, 10µg), penicillin (P, 30 µg), and Spiramycin (SP, 10 µg) were used and the susceptibility was determined by the inhibition zone in mm [14]. In the end, seven strains were selected for their antibiotic resistance According to the standardization of susceptibility in human medicine at the national level, and the recommendations of the Committee on Antimicrobial the French Society for Microbiology (2008): three of them from Meslam Taib Hospital, Mascara (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*), three from wastewater (*Salmonella typhi*, *Shigella sp*, *Bacillus subtilis*) and the last one (*Clostridium sp.*) from the great Sabkha Oran.

Table 2. Antibiotic resistance profile of tested bacterial strains

	P	AX	OX	CZ	SP	CN
<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	R
<i>Salmonella typhi</i>	R	R	R	R	R	R
<i>Shigella sp.</i>	R	R	R	R	R	R
<i>Bacillus subtilis</i>	R	R	R	R	R	R
<i>Clostridium sp.</i>	R	R	R	R	R	I
<i>Staphylococcus aureus</i>	R	R	R	R	R	I
<i>Enterococcus faecalis</i>	R	R	R	R	R	R

R: resistant;I:intermediate

- **Disc diffusion test**

Antimicrobial activity was determined by the agar disc diffusion assay [15]. Inoculum for the assays were prepared by diluting scraped cell mass in 0.85% NaCl sterile solution, adjusted to McFarland scale 0.5 and confirmed by spectrophotometric reading at 580 nm. Cell suspensions were finally diluted to 10⁶ CFU /ml. The extracts were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) or distilled water. Petri plates were prepared with 20 ml of sterile Mueller Hinton agar (Sigma, Paris, France) surface inoculate by suspension of cell (200 µl). The test cultures were swabbed on the top of the solidified media and allowed to dry for 10min. The tests were conducted at a concentration of the sterile phenolic extract (100mg/ml) and essential oils (250 µl/ml) of *M.communis* and *Z.album* in Sterile filter paper discs (6 mm). The loaded discs were placed on the surface of the medium and left for 30 min at room temperature for compound diffusion. The plates were incubated at 37C for 24 h. Gentamicin (10µg) and oxacillin (30µg) was used as positive controls. Negative controls were performed using paper discs loaded with 20 µl of the aqueous DMSO.

The antimicrobial activity was evaluated by measuring the zone of growth inhibition surrounding the discs. After that, the inhibition zones were measured in millimetres by Vernier callipers. All tests were repeated two times to minimize test error. An inhibition zone of 14 mm or greater (Including diameter of the disc) was considered as high antibacterial activity [16].

- **Determination of MIC by Microdilution Method**

MIC of the compounds under study was determined by the microdilution method as described by [17]. All wells were filled with 50 μL of Muller Hinton broth (MHB). Extracts were dissolved in DMSO and added to the first well (50 μL). Serial two-fold dilutions were made then. An over-night culture of bacteria suspended in MHB was adjusted to turbidity equal to 0.5 McFarland standards so 10^4 CFU⁻¹ of bacterial inoculum size. Each test included two growth controls consisting of the medium with the solvent (DMSO) and medium with bacterial suspension. Each plant extract was run in duplicate. The test plates were incubated at 37°C for 18 h. Then the turbidity was measured every two hours using micro-plate reader (TECAN brand) at 620 nm wavelength. The MIC was taken as the minimum concentration of the dilutions that inhibited the growth of the test microorganism.

2.12. Statistical analyses

All extractions and determinations were conducted in triplicates and results were expressed on the basis of dry matter weight. Data are expressed as mean \pm SD. The means were compared by using the one-way and multivariate analysis of variance (ANOVA). The differences between individual means were deemed to be significant at $p < 0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Extraction yields

The yield of decoction for aqueous extract of *M.communis* was 24.65% (w/v) and was about $0.52 \pm 0.03\%$ (w/v) for the essential oil which is very higher than the yields of methanolic extract of *Z.album* $25.03 \pm 0.1\%$ and $0.05 \pm 0.8\%$ for The essential oil, it had a pale white/yellow color with a strong musk and floral odour. It was difficult to recover it because of its doughy and grassy aspect.

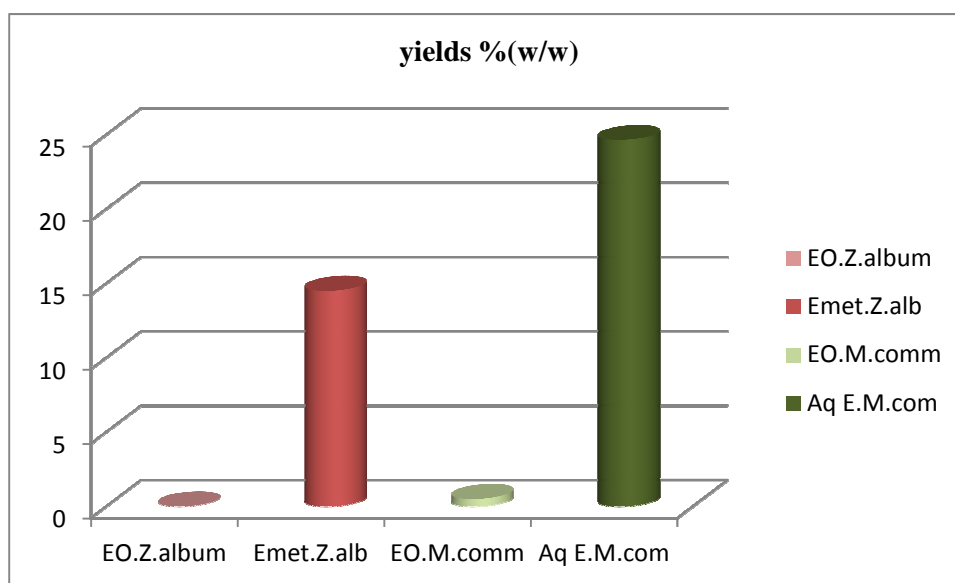


Fig.1. the yield of different extracts of plants

3.2. Phenolic compound content

Table 3. Total phenolic, flavonoids, tannins and anthocyan content

		Total Phénols (mg GAE/g DW) ^a	Total flavonoids (mg EC/g DW) ^b	Condensing tannins(mg EC/g DW) ^c	Anthocyan (mg Cg/ g dM) ^d
Z.album	Met.E	6,766±0,628	1,610±0,020	4,349±0,569	1,80±0,01
M.communis	Aqu.E	121,23±0,77	7,256±0,57	18,78±0,86	11,79±0,30

^a: mg acid galic equivalent/g dry weight. ^{b, c}:mg catechin equivalent/g dry weight. ^d: mg E cyanidine-3 glucose/ g dry weight

Table 03 summarises the results from the quantitative determination of the tannins, flavonoids and proanthocyanidins of the different phenolic extracts of *Z.album* and *M.communis* and their respective total phenol contents. Total phenol and total tannin contents were determined as gallic acid equivalents in milligrams per gram (mg GAE/g) while total flavonoid and condensed tannin contents were calculated as catechin equivalents in milligrams per gram (mg CE/g). The total phenol contents varied between the two plants: Myrtle aqueous extract had higher total phenol content (121.67 mg GAE/g) than methanolic extract of *Z.album* (6.766 mg GAE/g).

A study by [18] shows that the content of the higher total phenols was noticed in the leaves of *myrtus var. italica* (33.67 mg GAE / g), These levels are lower than our results against by the

content of total phenols leaves Myrtle Greece is much higher compared to our plant, it is of the order of 373 mg GAE / g

Concerning total flavonoid and condensed tannin contents, the highest values were observed in *M.communis* (7.25 and 18.78 mg CE/g, respectively). Significant differences were also found in anthocyanins contents among different plants, representing 11.79 mg Cg/ g dM) in *M.communis*, 1,80 mg Cg/ g dM) in *Z.album*.

3.3. Antioxidant activity

Table 4. antioxidant activities of the essential oils and phenolic extracts of plants

		DPPH (IC ₅₀ , µg/ml)	Total antioxidant power (mg /g DW)
Phenolic extract	<i>Z.album</i>	1107,031±1,55	10,99±11,43
	<i>M.communis</i>	29±0,80	68,05±7,55
Essential oil	<i>Z.album</i>	6018±0,20	2,44±9,14
	<i>M.communis</i>	615±1,13	36±1,22
Synthetic antioxidant	Ascorbic acid	39,53±0,05	-
	BHT	25±0,20	-

IC₅₀ value: the effective concentration at which the antioxidant activity was 50%; ; 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals were scavenged by 50%; ; values are given as mean ± SD (n = 3); means with different capital letter within a row are significantly different (P < 0.05).

Free radical scavenging properties of phenolic extracts and essential oils from the two plants are presented in Table 3. Lower IC₅₀ value indicated higher antioxidant activity. The aqueous extract of myrtle leaves (IC₅₀ = 29±0, 80) showed higher scavenging ability on DPPH radicals when compared to those reported for essential oils of leaf (IC₅₀ = 600 lg/ml). In addition, DPPH scavenging ability of the aqueous extracts of myrtle leaf was approximately same with that of synthetic antioxidant BHT (IC₅₀ = 25 µg/ml). Unlike to *Z.album*, its represent a very lower antioxidant activity (IC₅₀=6016, and 1017,031) for the essential oil and methanolic extract respectively. The antioxidant activity of phenolic extracts and essential oils of the two plants was also evaluated by the total antioxidant power method (Table 4). As for antiradical scavenging activity, all phenolic extracts of plants (IC₅₀ = 29±0,80 µg/ml for *M.communis*,

IC₅₀ = 1107,031 µg/ml for *Z.album*) showed higher of the total antioxidant power than that of essential oil.

The stronger activity of *M.communis* should be related to its higher phenolic content (121.23mg/l) as measured by gallic acid test (Table 3). Antioxidant activities of the essential oils and the phenolic extracts from myrtle and zygophyllum plants were tested by the DPPH radical scavenging, and total antioxidant power assays. Our results showed that all phenolic extracts of plants showed higher scavenging ability on DPPH radicals when compared to those reported for essential oils. In addition, DPPH scavenging ability of *M.communis* was higher than that of *Z. album* plant suggesting the presence of specific bioactive components in these two organs that may be responsible for the antioxidant activity. Thus, it has been reported that free radical-scavenging activity is greatly influenced by the phenolic composition of the sample [19].

3.4. Antimicrobial activity

Antimicrobial activity was assayed against seven pathogen bacteria (*S. aureus*, *clostridium sp.*, *E. fecalis*, *S. typhi*, *E. coli*, *shigella sp.*, and *B. subtilis*). These microorganisms have different growth properties. The results of disc diffusion test and minimum inhibitory concentration of essential oils are listed in Tables 3-4 and figure 2. *Z.album* showed some activity on Gram positive and Gram negative bacteria while *M.communis* was found to have a low activity. The higher efficacy of *Z.album* was confirmed by the agar dilution method.

Table 5. Disc diffusion test

		Inhibition diameter (Ø mm)					
		S. aureus	E. coli	Shigella	Salm.typhi	clostri	B.subt
<i>M. communis</i>	E.O	07±0,2	07±0,01	07±0,2	09±0,02	09±0,01	08±0,3
	AQ.E	10±0,07	09,5±0,02	10±0,1	08,5±0,03	10±0,01	11±0,01
<i>Z. album</i>	E.O	11±0,1	08±0,3	09±0,05	10±0,06	09±0,05	10±0,03
	Met.E	09±0,06	15±0,05	10±0,03	09±0,03	11±0,2	14±0,01
Oxacillin 5µg		-	13±0,2	-	-	-	-
Gentamicin 10µg		20±0,1	30±0,02	9	-	10	10

- :No inhibition zone.

All phenolic extracts and essential oils showed a varying degree of antimicrobial activity against bacteria. For *Z.album* ; the methanolic extract was the most effective on the different strains than the essential oil and exhibited a stronger antibacterial activity against *E.coli* and

B.subtilis (11-14mm repectively) this can be proved by the study of [20] witch found that the methanolic extract of *Zygophyllum quatarense* exhibited the highest antibacterial effect followed by the chloroform extracts, In the case of *M.communis*, this plant had a variable and significant antibacterial activity. Selon [21,22], predominant materials of the essential oil are also known for their antimicrobial activity. Alcohols, aldehydes and esters can contribute to the overall antimicrobial effect of essential oils [23]. Monoterpenes such as α -pinene and limonene are among the major components that contribute to high antimicrobial activity of *myrtus communis* [24].

These activities are related to their contents in active compounds, which had a wide range of biological and pharmacological activity. The plant contains also, a class of secondary metabolites which are produced by plants primarily as a defence against herbivores or against infection by microorganisms [25,26].

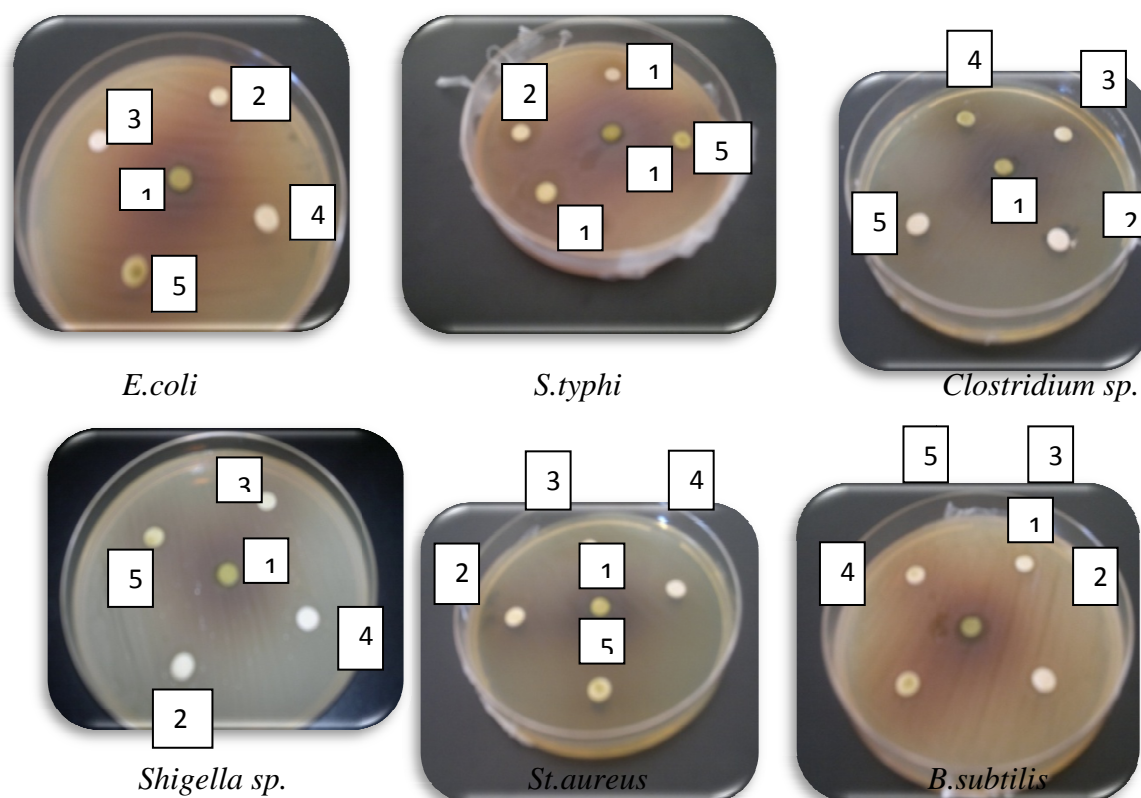


Fig.2. Antibacterial activity of *Z. album* and *M. communis*

1 : Methanolic extract of *Z. album*, 2 : Eseeential oil of *Z. album*, 3 : Aqueous extract of *M. communis*, 4 : Essential oil of *M. communis*, 5 : ATB (OX5 μ g /CN 10 μ g).

Table 6. Minimum inhibitory concentration (MIC %,v/v)

	Polyphenols mg/ml		Essential Oils µl/ml	
	M.com	Z.alb	M.com	Z.alb
<i>E. coli</i>	100	25	250	250
<i>S. typhi</i>	100	100	250	125
<i>Shigella sp.</i>	50	50	250	250
<i>B. subtilis</i>	100	50	250	250
<i>Clostridium sp.</i>	50	50	250	250
<i>St. aureus</i>	50	50	250	125

The MIC was (25-100) mg/ml for methanolic extract of *Z.album*, a significant reduction in growth was revealed after 18 h of incubation. Strains were also susceptible to the aqueous extract concentration of the *M.communis* (50-100mg/ml). However *Z.album* was more active than *M.communis* against all strains especially against *E.coli* (25 mg/ml) for methanolic extract.and phenolic extracts were more actifs than essential oils with higher MIC.

The results presented in this study (Tables 2 and 3) are in line with the small number of published papers on the effects on bacterial growth of *M. Communis* and *Z.album*, With regard to the *M. communis*, have reported the antimicrobial activity of essential oil of leaves against *S. Aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *B. Subtilis* and *Serratia Marcescens* [27,28] have demonstrated the activity of *Z.album* extract against *E. Coli S Aureus* and *Candida albicans*. However, it is difficult to compare the data with the literature because several variables influence the results, such as the different chemical composition due to the environmental factors (such as geography, temperature, day length, nutrients, etc) of the plants.

4. CONCLUSION

According to the results, it may be concluded that the extracts of the phenolic compounds and essential oils of *M.communis* and *Z.album* revealed considerable antimicrobial activity. Furthermore, the examined extracts have a high reducing activity and scavenging activity for DPPH radical in vitro.

These activities were found are probably in relationship with the structure of the phenolic compounds and the composition of the essential oils.

5. ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research for financial support.

6. REFERENCES

- [1] Heath H.B., Source Book of Flavours, Westport, Avi, 1981.
- [2] Pereira H.M, Navarro L.M, Martins I. S, Scholes R.J. *Curr. Opin. Environ. Sustain.*, 2012, 4, 139.
- [3] O. Gortzi, S. Lalas, I. Chinou, J. Tsaknis J. *Food Protect.*, 2006, 69, 2998-3000.
- [4] Ayatollahi-Moosavi S.A., Abdollahi H., N. Kazemipour, *Kerman Med J. Univ Sci.*, 1996, 3, 115-122.
- [5] Megdiche Ksouri W, Medini F, Mkadmini K, Legault J, Magné C, Chedly Abdely, Ksouri R. *Food Chemistry.*, 2013, 139, 1073-1080.
- [6] Bouzabata A, Castola V, Bighelli A, Abed L, Casanova J, Tomi F. J. *Chemical variability of Algerian Myrtus communis L. Chem Biodivers.*, 2013, 10, 29-37.
- [7] Souhila M, Khali M and Mahmoudi N. *Revue : Nature & Technologie. B-Sciences Agronomiques et Biologiques.*, 2013, 9, 35- 40.
- [8] Aidi Wannes W, Mhamdi B, Sriti J, Ben Jemia M, Ouchikh O, Hamdaoui G, Mohamed Kchouk E, Marzouk B. *Food and Chemical Toxicology.*, 2010, 48, 1362-1370.
- [9] Raffauf R.F. *Plant Alkaloids: A Guide to their Discovery and Distribution*; Ed: FOOD Products Press., 1996, 189-190.
- [10] Dohou N, Yamni, K., Tahrouch, S, Idrissi Hassani, L.M, Badoc, A, Gmira, N, *Soc. Pharm. Bordeaux.*, 2003, 142, 61-78.
- [11] Benhamou N, *Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien, Thèse de doctorat en biologie, Tlemcen, Algeria.*, 2012.
- [12] Dewanto V, Wu X, Adom K K, Liu R H, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, 3010-3014.
- [13] Laouini S.E. *Etude phytochimique et activité biologique d'extrait des feuilles de Phoenix dactylifera dans la région du Sud d'Algérie (la région d'Oued Souf), Thèse de doctorat en chimie industrielle, Université Mohamed Khider Biskra, Alegria.*, 2014.

-
- [15] NCCLS., Seventeenth Informational supplement. NCCLS document, M100-S17. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pennsylvania, USA., 2005, 27, 1.
- [16] Koshy P, Srinurestri A, Wirakarnain S, Simkae S, Saravana K, J. Appl. Sci., 2009, 6, 1613-1617.
- [17] Eloff J.N. *Planta Medica.*, 1998, 64, 711-13.
- [18] Chutia M, Deka Bhuyan P, Pathak M.G, Sarma T.C and Boruah P. *East India. Food Science and Technology.*, 2008, 3, 777- 780.
- [19] Cheung, L.M, Cheung P.C.K., and Obi, V.E.C. *Food Chemistry.*, 2003, 81, 2496255.
- [20] Ramzi A.A. Mothanaa and Ulrike Lindequist. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra, *Journal of Ethnopharmacology.*, 2005, 96, 177-181.
- [21] Randrianarivelo R., Sarter S., Odoux E., Brat P., Lebrun M., Romestand B., Menut C., Andrianoelisoa H. S., Raherimandimby M and Danthu P. Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. *Food Chemistry.*, 2008, 114, 680-684.
- [22] Bajalan I, Akbarzadeh M and Veysanlu F. Chemical Composition of Myrtle Essential Oil (*Myrtus Communis L.*) in Gilane Gharb from Iran, 5(2), 59-65.
- [23] Derwich E, Manar A, Benziane Z and Boukir A. GC/MS Analysis and In vitro Antibacterial Activity of the Essential Oil Isolated from Leaf of *Pistacia lentiscus* Growing in Morocco. *World Applied Sciences Journal.*, 2010, 8, 1267-1276.
- [24] Rasooli I, Moosavi M.L, Rezaee M.B and Jaimand K. Susceptibility of Microorganisms to *Myrtus Communis L.* Essential Oil and its Chemical Composition. *J. Agric. Sci. Technol.*, 2002, 4, 127-133.
- [25] Suomi J, Sirén H, Hartonen K and Riekkola M.L. *J.Chromatography.*, 2000, 868, 73-83.
- [26] Ethnopharmacology of the plants of the genus *Ajuga*. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 22(4), 425-462.
- [27] Salvagnini L.E, Oliveira J.R.S, dos Santos L.E, Moreira R.R, Pietro. *J. Pharmacog.*, 2008, 18, 241-244.
- [28] Atta, A.H, Mouneir, S.M, *Journal of Ethnopharmacology.*, 2004, 92, 303-309.

How to cite this article:

Belmimoun A, Meddah B, Meddah A.T.T and Sonnet P. Antibacterial and antioxidant activities of the essential oils and phenolic extracts of myrtus communis and zygophyllum album from Algeria. *J. Fundam. Appl. Sci.*, 2016, 8(2), 510-524.

In Vivo* Antimicrobial Activity of Methanolic Extract of *Zygophyllum album* against *Bacillus cereus

BELMIMOUN Asmaa^{1*}, MEDDAH Boumediene¹, MEDDAH TIR TOUIL Aicha¹, TOU Abdenacer²
and SONNET Pascal³

¹Laboratory of Research, Bioconversion, Engineering Microbiology and Health Safety,
University of Mascara, Algeria

²Professor at UHC Sidi Belabess, Algeria

³Laboratory of glucides- Team Thera.- FRE-CNRS 3517, Faculty of Pharmacy,
University of Picardie, Amiens, France

Received: March 17, 2016

Accepted: May 5, 2016

ABSTRACT

The principal objective of our study was to investigate the *in vivo* anti-*Bacillus* activity and the safety of methanolic extract of *Zygophyllum album* (*Z. album*), a plant commonly used in Algeria by traditional healers. The methods use *Bacillus cereus*-infected rat model was used for the study. The physiological, and histopathological markers of possible side effects of this extract were studied using standard methods. The extract had a significant effect on the number of viable *Bacillus cereus* recovered from faeces, and could stop Bacillosis after 8 and 10 days of treatment for male rats, with non-toxic dose. However, the histopathological analyses revealed that at the same dose (800 mg/kg) the curatif technique with methanolic extract could induce better antibacterial effect than the preventif one, so all the overall results indicate that the methanolic extract of *Z. album* has the potential to provide an effective treatment for bacillosis. However, it is necessary to extrapolate these results in large animals, in further studies.

KEYWORDS : *Zygophyllum album* ; *Bacillus cereus* ; infection ; safety.

INTRODUCTION

They are some works done which aimed at knowing the different antimicrobial and phytochemical constituents of medicinal plants and using them for the treatment of microbial infections (specially food infection like bacillosis) as possible alternatives to chemically synthetic drugs to which many infectious microorganisms have become resistance [1]. Literature reports and ethno-botanical record suggest that plants are the sleeping giant of pharmaceutical industry. They may provide natural source of antimicrobial drugs that will provide novel or lead compounds that may be employed in controlling some infections globally.

Zygophyllum album L. is one of the large world of beneficts plants belongs to *Zygophyllaceae* family, genus *Zygophyllum*. Four species of *Zygophyllum* are recorded in Algeria [2]. This plant used in traditional medicine as a remedy for rheumatism, gout, asthma and as a diuretic and antidiabetic drug. Some Bedouins used it as hay or added it to the dry ration. However, it was found to be toxic to the sheep and caused high mortality [3]. The aim of this study deals with the antibacterial study of the plant as regards their effect *in vivo* and it is the first approach. The acute toxicity of the methanolic extract of the plant was studied to determine the safety margin, qualitative features and quantitative assessment of toxic over dosage. This study was carried out using oral and intraperitoneal administration.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Plant material

Fresh upper parts from *Zygophyllum album* (leaves, flowers and stems) were collected in April during the flowering stage 2014 from Sidi Khouiled region, Sahara of Ouargla, Algeria.

The sampling was done by a randomized collection of 15–20 sub-shrubs in an area of about 200 m² each areal parts of *Z. album* were isolated manually in our laboratory to obtain a weight of 500–700 g of each part. Botanical identification of this species was carried out according to African flowering plants database and by local experts.

2.2. Test bacterium and culture medium

The bacterial strain used in this study was *Bacillus cereus*, which was obtained from Microbiology Lab/ Department of Biology- University of Mascara, Algeria. Bacterial strain was maintained on agar slant at 4 °C and

*Corresponding author: BELMIMOUN Asmaa, Laboratory of Research, Bioconversion, Engineering Microbiology and Health Safety, University of Mascara, Algeria. E-mail: belmimoun_asmaa@yahoo.fr

sub-cultured on a fresh appropriate agar plate 24 h prior to antimicrobial test. Mossel agar was used for the activation of *B. cereus*, and during *in vivo* assays in rats for bacterial counts and identification.

Antimicrobial Resistance Testing: The resistance of the *Bacillus cereus* strain to different antimicrobial agents was determined using the disk-agar method standardized in our laboratory of biology. The quality control strain used was *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

2.3. Experimental animals

The Wistar rats used in these experiments were provided by the laboratory of the University of Mascara. Animals were housed at the cage, with water and food *ad libitum*, and the animal room temperature was kept at constant temperature of 20 ± 1 °C on a 12-hour light/12-hour dark cycle. Adequate measures were taken to minimize pain or discomfort of the animals, and all experimental procedures were performed in accordance with the ethical guidelines of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD).

2.4. Preparation of plant extract

The upper parts of the plant (leaves, flowers and stems) were air dried and ground all together as a fine powder, The methanolic extract was prepared using the extraction with organic solvents of increasing polarity method [4]; 180 g of powder divided over cartridge were extracted with 300 ml of dichloromethan until exhaustion under reflux condenser, the same operation was repeated with methanol except that it was applied to the marc. The extract collected in a flask was concentrated using the rotary evaporator, the extract was stored in a glass bottle, clean, sterile and sealed.

2.5. Acute toxicity test

To assess the acute toxic effects of the methanolic extract, a measure of the lethal dose 50 (LD50) is required. Mature male albino rats have an average weight of 190-210± 5g were used which were obtained from the experimental farm of the faculty of sciences of nature and life, University of Mascara, Algeria. Rats are selected according to sex in cages each carries 5 animals. Different doses were used which were estimated to cause 0-100% deaths in the final test (100-400-800-1000-1200 mg / kg). The extract of the plant was suspended in physiological Water 9% of NaCl for 1 g of alcohol extract.

Rats were distributed in 06 groups of 10 animals (05 males and 05 females) who received 1 ml of the single doses of of the extract of *Z. album* and 9 ‰ NaCl (control) by gavage. After the oral administration of the extract, the rats were continuously monitored in the first, sixth and 24th hour after treatment, for any death or change in behavior. Deaths occurring during this period were recorded in 24, 48 and 72 h for each group. The number of dead animals is calculated and converted into a percentage [5].

2.6. In vivo assay using rats:

Male Wistar Albino rats were used for this study. They were divided into 5 groups of 5 animals each. The rats were acclimatized [room temperature (23 ± 2 °C), and a 12 h photoperiod] in cages (1 rat/cage) for one week before the commencement of the experiment. Throughout the experiment, rats were provided with water that contained streptomycin (5 mg.mL^{-1}) in order to reduce the level of facultative anaerobic bacteria that normally colonize the mouse intestine [6].

Bacillosis was induced using the method proposed by Pan, *et al* [7], the rats were fasted overnight in the day before the experiment and given, by gavage, 1 mL of saline solution (0.9% NaCl) containing 1.5×10^8 CFU of *Bacillus cereus*, except animals of group 1 (which were neither infected nor treated, and used as neutral control; they received distilled water). Animals of group 2 (which were infected, but not treated) received distilled water during the treatment period, hence were used as negative control groups; and those of group 3 received a vancomycin, and thus were used as positive control groups. The two remaining groups, one of them (group 4) is the preventive group which receives treatment 7days before induction of *B. cereus* and 2days after appearance of the infection, the last group 5 is the healing one which animals were infected and treated with methanolic extract in 7days, time of incubation bacillus was a 18h 24h, it means that treatment was beginning 24 hours after the administration of the germ.

2.7. Detection of *Bacillus cereus*:

The faeces of the test animals were collected from transparent plastic dishes placed beneath the individual rat cages daily until 1 week after inoculation to determine the number of rats shedding the pathogen and the faecal counts shed [8]. *B. cereus* in each faecal sample was quantified as follows: 1.0 g of faeces was added to 9 ml of physiological water, vortexed and incubated at 37°C for 2 hours, after which the suspension was serially diluted (10^{-1} to 10^{-5}) in physiological water. Each tube is heated in a water bath at 80°C/10mn (heat resistance test).

Aliquots (0.1ml) from each dilution were plated in triplicate by the spread-plate method onto Mossel agar. After incubation at 37°C for 8-24 hrs. Ten colonies were randomly selected from each plate and confirmed as *Bacillus cereus* by biochemical test.

2.7. Mortality Rate and Pathological Manifestations

The mortality rate of the rats in the different groups was calculated as numbers of the rats that died during the course of the experiment in relation to all rats used in each group [9]. The animals were observed for consistency of faecal material. The frequency of defecation was noted from the transparent plastic dishes placed beneath the individual rat cages for up to 4 hours. Diarrhea was noted and scored based on consistency, color and the number of defecation. A daily score of water content that was >water content of neutrol group considered proof of diarrhea, while a score that was = or <water content was not. Cages and bedding were changed on a daily basis during collection of faecal samples to avoid cross-contamination. The animals were also observed for any abnormalities and pathological manifestation, and their weight was monitored daily during the period of the experiment [10].

2.8. Histopathological analysis:

After sacrificing the animals, small pieces of liver was fixed in 10% formalin, dehydrated in ascending grades of alcohol and cleared in xylene. The fixed tissue were embedded in paraffin wax and sectioned into five micrometres thick with the rotary microtome, then stained with hematoxylin and eosin. Then the sections were examined with light microscope and photographed using a microscopic camera.

2.9. Statistical analysis

All extractions and determinations were conducted in triplicates and results were expressed on the basis of dry matter weight. Data are expressed as mean ± SD. The means were compared by using the one-way and multivariate analysis of variance (ANOVA). The differences between individual means were deemed to be significant at $p < 0.05$.

2.10. Ethics

This work was carried out with respect for the welfare of animals, as recommended by WHO [11].

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Extraction yield

Methanolic extract of *Z. album* has a dark color and a strong odor, with a viscous aspect, it registered a higher yield (25,03±0,1%), this result is higher than that quoted by [12]. (14,30%); This may be due to the climatic conditions of the plant. The yield depends on the geographical origin of the plant, the season of harvest, method and conditions of the extraction. It is only relative [13].

3.2. Acute toxicity

After administration of phenolic extract of *Z. album* with gradual doses, observations over a period of 3 days (Table 01) showed no severe clinical symptoms of pain, despite some common signs seen as anorexia, hypoactivity, which are reversible and have appeared in rats for a short time and then they returned to their activity in the first three doses(100-400-800) The absence of mortality and clinical signs therefore indicates that the methanolic extract of *Z. album* devoid of acute toxicity in rats. but for doses of 1000 and 1200 mg/kg,

Table 01: Oral toxicity of the total alcoholic extract of *Zygophyllum album* L.f. in adult normal rats showing the number of animals that died during 72 h after oral administration of the extract. Each group consists of 10 rats.

Acute Dose levels (mg.kg ⁻¹)	Delay No of tested rats	Mortality rate							
		24H		48H		72H		N	%
		No	%	No	%	No	%		
100	10	-	0	-	0	-	0	-	0
400	10	-	0	-	0	-	0	-	0
800	10	-	0	-	0	-	0	-	0
1000	10	-	0	-	0	1	10.0	1	10.0
1200	10	1	10.0	3	33.33	1	16,66	5	50.0
Total	50	1	10.0	3	33,33	2	26,66	6	60.0

Moreover, the *in vivo* antibacterial activity revealed that the dose of extract (800mg/kg wb) obtained from (or used by the) traditional healer may be considered as relatively safe, as shown by the results of subacute toxicity evaluation. However, the extract may induce slight liver damage at high doses wich is in agreement with [14] and [15] who recorded that, *Zygophyllum microcarpum* was toxic and caused higher mortality in sheep. About 7.5-8.4 g kg⁻¹ b.w. of crude powdered plant was found to be toxic to the sheep and caused high

mortality [5]. Subchronic and chronic toxicity studies are necessary to further support the safe use of this plant. It is also necessary to extrapolate these results in large animals.

3.3. *In vivo* antibacterial activity of methanolic extract of *Z. album* in rat

All the rats were found negative for *Bacillus cereus* in faeces before inoculation and treatment with plant extracts and an antibiotic drug (Vancomycin) for the positive control group. The percentage of albino rats that shed *B. cereus* in their faeces after inoculation and treatment with antimicrobial agents was presented in Figure 1.

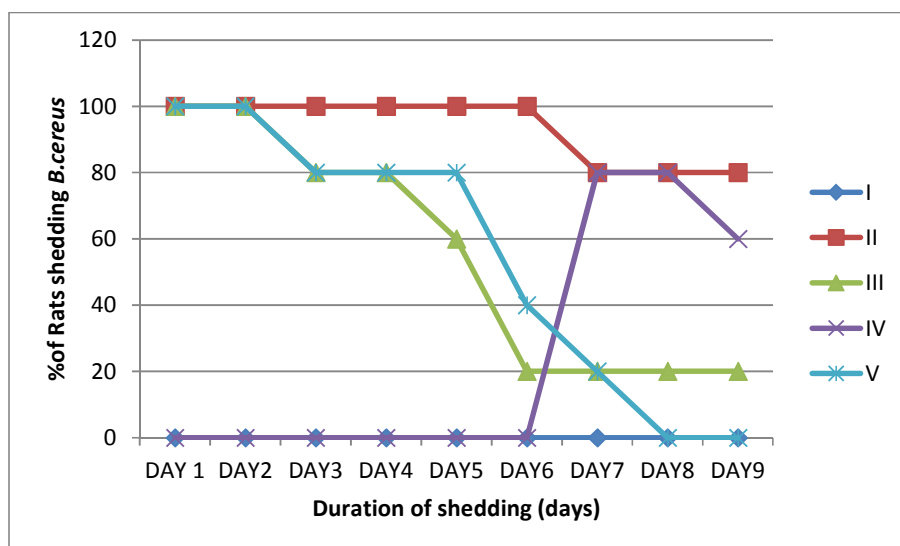


Figure.1 The Percentage of Rats that Shed *Bacillus cereus* in their Faeces after Inoculation and Treatment with or without Plant Extracts

I = Rat group not infected and not treated, II = Rat group infected but not treated, III = Rat group infected and treated with antibiotic (positive control), IV = Preventif rat group infected and treated with methanolic extract of *Z. album*, V = Curatif rat group infected and treated with methanolic extract of *Z. album*.

The percentage faecal shedding of *B. cereus* following inoculation was highly variable among the individual rats, which is in agreement with previous studies [10, 16, 17].

The number of the albino rats shedding *B. subtilis* was higher in the infected non treated group (group I) during some of the sampling periods in this study. Consistent with our observations, other studies have shown that *Bacillus* spores are able to persist and occasionally germinate in the intestinal tract. Three *B. cereus* strains were shown to persist in the mouse GI tract up to 18 days postadministration [18]. Further one animal study showed that the number of spores of *B. cereus* excreted in faeces of mice in some case were higher than the original inoculum [19]. Together with the present study, these studies indicate that spores do occasionally germinate in the nutrient-rich small intestine, and subsequent spore formation may be a good strategy for survival in the more hostile and nutrient-scarce environment of the large gut [20]. Because a recent study shows that vegetative cells of *Bacillus* sp. are sensitive to simulated gastric fluid with a pH below 4.5 [21], whereas spores of the same strain are resistant to pH 1.5 for several hours. This resistance can be explained that the spore surface is covered with appendages that may enable spores to adhere to the epithelial surface [22]. Thus explaining the continuous shedding of bacillus in the infected non treated rats group throughout the experiment.

In the other hand, the preventif and curatif extracts of *Zygophyllum album* employed in this study exhibited significant antimicrobial activity against *Bacillus cereus* inoculated into the albino rats by reducing the concentration of the organism in their faeces to undetectable levels at different days after inoculation but not better than the positive control which shows an important antibacterial activity against *B. cereus*. There were differences in percentage of inhibition which the curatif extract were the most inhibitor and another difference in time because the preventif methanolic extract eliminated the pathogenic strain quickly than the curative one because after administration of the pathogenic strain in this group in the day 6 we observed a important diminution since two day after but not completely eliminated, in contrary with the curative group; *Bacillus cereus* was completely eliminated in all rats of group V but in a longer period of time. This difference in time of reaction could be due to the quantity bioactive ingredients present in the plant extract because just after inoculation of *B. cereus* these ingredients were more important in the organism of rats treated prevently than those treated curately. So, it is difficult to judge between the two mode of treatment with the methanolic extract,

Therefore, our study was the first approach testing the antibacterial effect *in vivo* of the plant used (*Z. album*) and the two ways of treatment extracts.

3.4. Mortality rate and pathological manifestations

Table 2: Mortality Rate/Pathological Manifestations observed in Rat Groups during the Course of the Experiment

	Number of rats affected / total number of rat in each group				
	I	II	III	IV	V
Mortality rate	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5
Watery diarrhoea	0/5	5/5	3/5	1/5	1/5
Loss of weight	0/5	5/5	3/5	1/5	1/5
Body weakness /slow movement	0/5	5/5	3/5	1/5	0/5

The results in Table 2 show the mortality rate and pathological manifestation observed in the different rat groups respectively. Mortality rate in group II and was 20%, while zero mortality rates was recorded among rats of the other groups of the experiment. None of the rat group suffered from bloody diarrhoea. However 100% of the infected non treated group (group II) and 60% and 20% of the infected antibiotic treated group (group III), preventif and curatif group respectively manifested the symptom of watery diarrhea a day after inoculation with *B. cereus* cells (Table 2). It was observed that there was more reduction in the number of rats defecating watery stool over time among the infected and treated groups of rats than the infected not treated and antibiotic treated groups. Thus, the defecation of watery diarrhea by the rats lasted between some hours to 1 day in group IV and V and 4 to 5 days in group II and III. In this two last groups; the rats that suffered from diarrhea and abnormalities such as general weakness with slow movement, loss of appetite and loss of weight were observed in them. No pathological changes were observed in other rat groups all through the course of the experiment. Thus all the rats treated in methanolic extract of *Z. album* were protected against diarrhoea that is usually induced by *Bacillus cereus* infection. This suggests that the extracts at a dose of 800 mg per kg of rat body weight suppressed the accumulation of fluid in the intestinal wall of the rats. Previous reports have demonstrated the anti-diarrhoeal activity of tannin [23], flavonoid [24], alkaloids [25], Saponins, sterols, and terpenes [26] containing plant extracts.

Preliminary phytochemical analyses of the plant extract used in this experiment showed the presence of all these compounds. These constituents may be responsible for the anti-diarrheal activity of the plant extracts [10].

3.5. Histopathological analysis

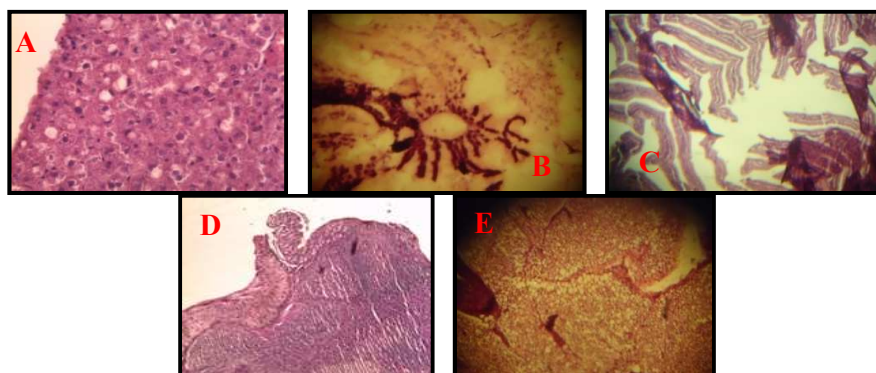


Figure02: Histopathological changes in liver of infected rats after the period of treatment (100X)

- A: a section of methanolic extract -treated male rat's liver showing excess portal tract infiltration group 4
- B: enlarged hepatocytes with numerous vacuoles and dissociated hepatic cords in group 2; C: Slightly inflammatory cells infiltration and vascular congestion in group 3;
- D: Intact lobular architecture and normal hepatocytes of neutral control group 1; E: Hepatocytes with well-preserved nuclear to cytoplasmic ratio and very slight inflammation in group 5

The histological architecture of liver sections of the animals treated with doses of 800 mg/kg of methanolic extract of *Z. album* showed injury pattern like significant inflammation of the parenchyma and the portal space, and vascular congestion. This may be explained by the fact that at relatively high doses, the extract had the ability to induce liver damage. Portal tract infiltration by lymphocytes and a focus of dysplasia with atypic cytology were observed in preventif-treated liver of rats(A) while curatif group at the same dose solely caused

mild portal tract infiltration by lymphocytes(B). However, the apoptosis or necrosis of hepatocytes remains one of the major signs of liver damage due to toxic compounds [27], and this was not observed in this study

Conclusion

The overall results of the present work provide baseline information for the possible use of the methanolic extract of *Z. album* in the treatment of Bacillosis, especially infection caused by *B. cereus*. In addition to antibacterial activity, the data reported from acute toxicity showed that the extract may be non toxic. These observations can justify the traditional use of the plant in the treatment of typhoid fever so *Z. album* was found to be safe up to dose 800mg/kg ,The safety margin of the methanolic extract of the plants under investigation is highly encouraging the biological evaluation.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Directorate for post graduation. The Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research are also highly appreciated for their financial support.

REFERENCES

1. Akinpelu, DA., TM. Onakoya 2006. Antimicrobial activities of medicinal plants used in folklore remedies in South-Western States of Nigeria : Afri. J. Biotechnol., 5(11): 1078 – 1081.
2. Tackholm, V., 1974. Students Flora of Egypt. 2nd Edn., Cairo University, Egypt.
3. Attyia, S.H.H. and S.M. Ashour, 2002. Biodegradation of agro-industrial orange waste under solid state fermentation and natural environmental conditions : Egypt. J. Biol., 4: 23-30.
4. Amadou, B. S., 2005. Etude de la phytochimie et des activit2s biologiques de Combretum glutinosum Perr.ex DC (COMBRETACEAE), thèse de doctorat en pharmacie, Université de Bamako., Mali.
5. Amal, M.Y., A.I.Khodair, F.M. Hammouda and A. Husseiny,2007. Phytochemical and Toxicological Studies of *Zygophyllum album* L.f. : Journal of Pharmacology and Toxicology, 2: 220-237.
6. Myhal, M. L., D. C. Laux, and P. S. Cohen,1982. Relative colonizing abilities of human fecal and K-12 stains of *Escherichia coli* in the large intestines of streptomycin treated mice : European, Journal of Clinical Microbiology, vol. 1, pp. 186–192.
7. Pan,X.L, Y. Yang, J.R, Zhang,2014. Molecular basis of host specificity in human pathogenic bacteria. Emerg Microbes Infect ; 3: e23.
8. Aranda,M. J, R.A. Gianella, 1999. Acute diarrhoea: A practical review. Ame. J. Med., 106:670-676.
9. Eman, M.A, M.Z .Hoda ,2008. Studies on the effect of garlic preparation on *Escherichia coli* O157:H7 causing enteritis in lambs. :Egy. J. Clinical Pathol. 21(4):102-129.
10. Itelima,J.U. and S.E.Agina,2014. In vivo antimicrobial activity of plant species on *Escherichia coli* O157:H7 inoculated into albino rats :World Journal of Microbiology Vol. 1(1), pp. 002-009.
11. World Health Organization. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. Geneva: World Health Organization; 1993. [Online] Available from: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jh2946e/> [Accessed on 20th May, 2014].
12. Benhamou,N.,2011. Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien,Thèse de doctorat en biologie, Université de Tlemcen, Algérie.
13. Smith, R.L., S.M. Cohen, J. Doull, V.J. Feron, J.I. Goodman and al., A procedure for the safety evaluation of natural flavour complexes used as ingredients in food essential oils:*Food Chemistry. Toxicol* 43, 2005, 345-363.
14. Steyn, D.G., 1929. Recent investigations into the toxicity of known and unknown plants of the Union of South Africa :Ann. Rep. Division Vet. Serv., 15: 777-803.
15. Watt, J.M. and M.G. Breyer-Brandwijk, 1962. The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa : 2nd Edn., E and S Liningstone Ltd., P : 1457. London, UK.
16. Cray, W.C, H.W.Moon, 1995. Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7 :Applied and Environmental Microbiology, 61:1586-1590.
17. Hermon, B.G., C.A Brown, S .Tkalcic, P.O.E Mueller, A .Parks, A.V Jain, T .Zhao, M.P. Doyle, 1999. Faecal shedding and rumen growth of *Escherichia coli* in fasted calves : J. Food Protection, 62: 574-574.
18. Duc,L.H., H.A.Hong ,T.M.Barbosa ., A.O.Henriques ,S.M.Cutting ,2004.Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use: Appl Environ Microbiol 70: 2161–2171.
19. Hoa, T.T., L.H.Duc , R. Isticato , L. Baccigalupi, E.Ricca , P.H.Van ,S.M. Cutting , 2001. Fate and dissemination of *Bacillus subtilis* spores in a murine model : Appl Environ Microbiol 67: 3819–3823.
20. Wilcks, A., M.H. Bjarne, N.B. Hendriksen, T.R. Licht, 2006. Fate and effect of ingested *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in the intestinal tract of human-flora-associated rats :FEMS Immunology and Medical Microbiology journal, Volume 46, Issue1 Pp :70-77.

21. Clavel, T, F. Carlin, D. Lairon, C. Nguyen-The and P. Schmitt, 2004. Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach: *J Appl Microbiol* 97:214–219.
22. Husmark, U., and U. Ronner, 1992. The influence of hydrophobic, electrostatic and morphologic properties on the adhesion of *Bacillus* spores: *Biofouling* 5: 335–344.
23. Mukherjee, P.K., K. Saha, T. Murugesan, S.C. Mandal, M. Pal, B.P. Saha, 1998. Screening of anti-diarrheal profile of some plant extracts of a specific region of West Bengal: *Indian J. Ethnopharmacol.*, 60:85-89.
24. Galvez, J., M.E. Crespo, J. Jimenez, A. Suarez, A. Zarzuelo, 1993. Anti-diarrhoeic activity of quercitrin in mice and rats: *J. Pharmacol.*, 45:157-159.
25. Gricilda, S.F., T. Molly, 2001. Study of anti-diarrhoeal activity of four medicinal plants in castor oil induced diarrhoea: *J. Ethnopharmacol.*, 76:73-76.
26. Otshudi, A.L., A. Foriers, A. Verduyck, A. Van Zeebroeck, S. Lauwers, 2000. In vitro antimicrobial activity of six medicinal plants traditionally used for treatment of dysentery and diarrhoea in Democratic Republic of Congo: *Journal of Phytomedicine*, 7:167-177.
27. Eroschenko, V.P., Williams and Wilkins 2000. *Di Fiore's atlas of histology with functional correlations*. 9th ed. Philadelphia.