



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية عاوم الطبيعة و الحياة

Département de Biologie et Ecologie Végétale

Mémoire présenté en vue de l'obtention

Du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie et physiologie végétale

Spécialité : Métabolisme secondaire et molécules bioactives

Intitulé :

**Etude phytochimique et évaluation des activités antioxydante et
anti-inflammatoire de l'espèce:**

Myrtus communis L.

Présenté et soutenue par :

MERABET CHIRINE

MENAIFI HIND

Le : 24/06/2015

Jury d'évaluation

Président du jury : Mme. BOUDOUR LEILA // Pr. Université des Frères Mentouri Constantine.

Rapporteur : Mr. CHIBANI SALIH // M.C.B. Université des Frères Mentouri Constantine.

Examineurs : Mr. KEBAILI ZOUBIR // M.A.A. Université des Frères Mentouri Constantine .

**Année universitaire
2014 – 2015**

Nom : MERABET MENAIFI

Soutenue Le : 24/06/2015

Prénom : CHIRINE HIND

Mémoire présenté en vue de l'obtention Du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie et physiologie végétale

Spécialité : Métabolisme secondaire et molécules bioactives

Thème : Etude phytochimique, évaluation des activités antioxydante et ant-inflammatoire de l'espèce :*Myrtus communis* L.

Résumé

Le but de ce travail était l'étude de la plante *Myrtus communis* L. appartenant à la famille (Myrtacées).

Pour cela nous avons réalisé des tests de screening sur l'extrait hydro-alcoolique, les tests sur la plante à l'étude nous ont donné une idée générale sur le métabolisme secondaire qu'elle contient. D'après les résultats la plante apparaît riche en flavonoïdes, les tanins, stérols, stéroïdes, en polyphénols et les terpènes.

Nous avons extraire huiles essentielles par la méthode de Clavenger, leur rendement est de 1,5%.

La détermination des composés phénoliques totaux via le test FC met en évidence que l'extrait méthanolique des feuilles est riche en composés phénoliques par rapport à l'extrait méthanolique des graines.

L'extrait acétate d'éthyle (feuilles) a montré une meilleure activité antioxydante par rapport à l'extrait butanolique(feilles) , en utilisant la méthode du DPPH.

Le dosage de polyphénols totaux dans l'extrait hydro-alcoolique des feuilles a révélé une plus grande richesse en polyphénols (en utilisant la méthode de Folein- Ciocalteu) comparé à l'extrait hydro-alcoolique des grains.

Notre investigation phytochimique et biologique a montré que *Myrtus communis* L. possède des potentialités anti-inflammatoires, anti-microbienne et anti-oxydante.

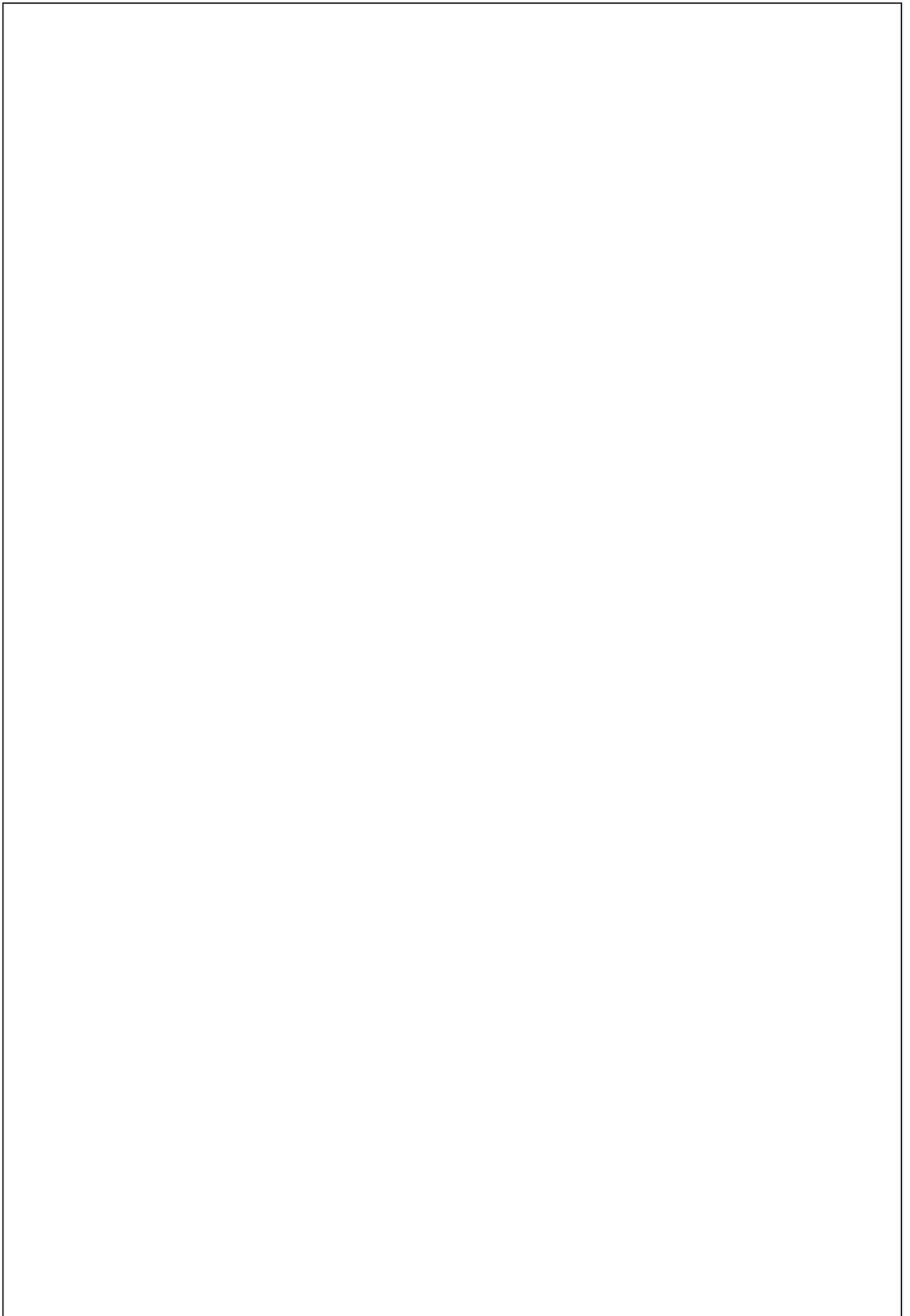
Mots clés : *Myrtus communis* L. flavonoïdes, les tanins, stérols, stéroïdes, polyphénols, terpènes.huiles essentielles, activité antioxydante, activité antibactérienne, activité anti-inflammatoire ,DPPH.

Jury d'évaluation

Président du jury : Mme. BOUDOUR LEILA // Pr. Université des Frères Mentouri Constantine.

Rapporteur : Mr. CHIBANI SALIH // M.C.B. Université des Frères Mentouri Constantine.

Examineurs : Mr. KEBAILI ZOUBIR // M.A.A. Université des Frères Mentouri Constantine .



Remerciements

*Nous somme particulièrement reconnaissantes envers **Mr Chibani Salih.**, docteur à la faculté des sciences, Université des Frères Mentourie de Constantine de nous avoir encadrées, pour l'aide scientifique et les conseils avisés qu'il nous a prodigués.*

*Nous exprimons nos sincères remerciements à **Mm Boudour Leila.**, professeur à la faculté des sciences, Université des Frères Mentourie de Constantine qui nous a fait honneur d'accepter de juger notre travail en qualité de président du jury et **Mr Kebaili Zoubir.**, maitre de conférence qui a également accepté d'examiner notre travail.*

Nombreuses sont les personnes qui nous ont aidé à l'élaboration de ce travail. C'est aussi à elles que s'adressent nos remerciements et notre sympathie.

Dédicaces

❖ *A l'aide de dieu tout puissant, qui nous tracé le chemin de nos vie, nous avons pu réaliser ce travail que nous avons dédié :*

❖ *A la mémoire de nos pères que dieu repose son âme en paix.*

❖ *A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère qui ma apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance ,courage et sécurité.*

❖ *A mes chers frères.*

❖ *A mes sœurs et tous mes chères.*

MENAIFI HIND

MEARABET CHIRINE

Liste des abréviations

AcoET : Acétate d'éthyle
AAs : Acide aminé
BuOH : Butanol
CHCl₃ : Chloroforme
°C : Degré celsius
Cc : Concentré
CCM : Chromatographie sur couche mince
COV : Composés organique volatile
CONV : Composés organique non volatile
DPPH : 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl
DL : toxicité moyenne
DO : Densité optique
EAMC : Extrait acétate d'éthyle de *Myrtus communis* L.
EBMC : Extrait butanolique de *Myrtus communis* L.
EMF : Extrait méthanolique des feuilles
EMFr : Extrait méthanolique des fruits
FeCl₃ : trichloride de fer
g : gramme
HCl : Acide chlorhydrique
HE : Huile essentielle
IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%
J : jours
KOH : Hydroxyde de potassium
L : litre
M : mase molaire
m : mètre
MeOH : Méthanol
mg : Milligramme
Mg : Magnésium
MHA : Muleur Hinton
min : Minute

ml : Millilitre

mm : Millimètre

MS : matière sèche

Na_2CO_3 : Bicarbonate sodium

NaCl : Chloride sodium

Na_2SO_4 : picrate de sodium

NaOH : Sodium hydroxide

nm : nanomètre

SM : Solution mère

UV : Ultra-violet

μg : Microgramme

μl : Microlitre

Liste des figures

Figure 1 : Distribution géographique de l'espèce <i>Myrtus communis</i> L.....	04
Figure 2 : Quelques dérivés de l'acide hydroxybenzoïque.....	08
Figure 3 : Quelques dérivés de l'acide hydroxycinnamique.....	09
Figure 4 : Structure de base de coumarine.....	09
Figure 5 : Structure de base de flavonoïdes.....	10
Figure 6 : Biosynthèse des flavonoïdes.....	11
Figure 7: Cicatrisation cutanée : les intervenants.....	18
Figure 8 : Cicatrisation cutanée : les étapes.....	18
Figure 9 : Protocole d'extraction des métabolites secondaires de l'espèce <i>M. communis</i> L.	27
Figure 10 : La courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	58
Figure 11 : Teneur en polyphénols totaux	59
Figure 12 : Evaluation de l'activité antioxydante de l'extrait butanolique.....	61
Figure 13 : Histogramme représentatif de % d'inhibition du DPPH par l'extrait n-butanolique en présence de standard (quercétine).....	61
Figure 14 : Evaluation de l'activité antioxydante de l'extrait Acétate d'éthyle.....	62
Figure 15 : Histogramme représentatif du pourcentage d'inhibition du DPPH par l'extrait acétate d'éthyle en présence de standard (quercétine).....	62
Figure 16 : Histogramme représentatif du pourcentage d'inhibition du DPPH par les extraits acétate d'éthyle et n-butanolique en présence de standard (quercétine).....	62
Figure 17: Comparaison des surfaces des plaies entre EMF, T et V du J ₁₂	
Figure 18: Comparaison des surfaces des plaies entre EMF, HE, T et V.....	65
Figure 19: Evaluation de la surface (%) des rats A : EMF et B : EH en fonction du temps (J)	
Figure 20: Comparaison des surfaces des plaies entre EMF et HE.....	66

Liste des tableaux

Tableau 1 : Activités biologiques des composés polyphénoliques.....	07
Tableau 2: Fonction de la peau et du pelage.....	17
Tableau 3 : Réactifs des sels minéraux.....	22
Tableau 4 : Les différentes concentrations des extraits.....	31
Tableau 5 : Quatre (04) lots d'animaux.....	33
Tableau 6: Résultats de mise en évidence des composés réducteurs.....	36
Tableau 7 : Résultats de mise en évidence d'amidon.....	37
Tableau 8: Résultats de mise en évidence des lipides.....	38
Tableau 9: Résultats de criblage des acides aminés.....	39
Tableau 10: Résultats de criblage des flavonoïdes.....	40
Tableau 11: Résultats de criblage des quinones	42
Tableau 12: Résultats de criblage des anthraquinones.....	43
Tableau 13: Résultats de criblage des tanins.....	44
Tableau 14: Résultats de criblage des anthocyanes.....	46
Tableau 15: Résultats de criblage des alcaloïdes.....	48
Tableau 16: Résultats de criblage des coumarines.....	49
Tableau 17: Résultats des plaques de CCM prise après la révélation à lumière UV (254 nm-366nm) pour des extraits de l'espèce <i>Myrtus comminus</i> L.....	49
Tableau 18: Résultats de criblage des triterpènes et stéroïdes.....	50
Tableau 19: Résultats de criblage des saponosides.....	52
Tableau 20: Résultats du test chimique des sels minéraux.....	53
Tableau 22: Les extraits obtenus à partir des deux parties de la plante.....	54
Tableau 23: Résultats des plaques de CCM prise après la révélation à lumière UV (254 nm-366nm) pour des extraits de l'espèce <i>Myrtus comminus</i> L.....	55
Tableau 24: CCM des extraits récupérés par décantation de l'espèce <i>Myrtus comminus</i> L.	
Tableau 25: Composés identifiés par CCM.....	56
Tableau 26: Résultats des plaques de CCM prise après la révélation à lumière UV (254 nm-366nm) pour des extraits de l'espèce <i>Myrtus comminus</i> L.....	57

Tableau 27: La DO des EMF et EMG.....	58
Tableau 28 : Le taux des polyphénols totaux calculés des feuilles et graines <i>M.communis</i> L.	
Tableau 29 : Les taux de polyphenols totaux existant dans les EMF et EMG.....	60
Tableau 30 : Taux d'inhibition de l'EMF et HE.....	60
Tableau 31 : Taux d'inhibition des extraits BuOH et AcOEt du DPPH.....	60
Tableau 32: Effet de la Cicatrisation et traités sur l'évolution des paramètres généraux, poids corporel (g) chez rats Wistar femelle adulte (T : contrôle, V :traité pare vaseline, A traités par extrait des feuilles et tiges; B traités par huile essentielle).....	64
Tableau 33: Des tableaux représentatifs l'évolution des surfaces des plaies en (%) des rats de différents groupes A, B, T et V en fonction du temps (J)	

Liste des photos

Photo 1 : <i>Myrtus communis</i> L.	03
Photo 2 : Les organes de la plante <i>Myrtus communis</i> L.....	04
Photo 3: La plante de <i>Myrtus communis</i> L.....	20
Photo 4: L'appareil utilisé pour broyer la plante.....	20
Photo 5: Chromatogramme des AA présents dans les fruits de <i>Myrtus communis</i> L22	
Photo 6: Hydrodistillation à l'aide d'un système de type Clevenger.....	23
Photo 7: Fixation de la colonne.....	29
Photo 7: Le test de l'activité antibactérienne.....	30
Photo 8: Le test de l'activité antioxydant par DPPH.....	33
Photo 9: Spectrophotomètre UV utilisé pour la lecture de l'absorbance	34
Photo 10: Les étapes d'anesthésié.....	35
Photo 11: Rasage des rats.....	35
Photo 12 : Les différentes étapes de plaies et traitements.....	36
Photo 13: Résultat des acides aminés présents dans l'extrait aqueux de <i>Myrtus communis</i> L.	
Photo 14: Chromatogramme des extraits BuOH, AcOEt, CHCl ₃ de <i>M.communis</i> L....	59
Photo 15: CCM des extraits obtenus après une chromatographie sur colonne des feuilles (A) et des graines (B).....	60

Sommaire

Introduction

1^{ère} partie : Etude bibliographique

Chapitre 1 : Etude bibliographique

I.L'importance des plantes médicinales.....	01
II. Histoire de la plante <i>Myrtus communis</i> L.....	01
II .1. Utilisation médicinale et traditionnelle.....	01
II. 2. Aspect économique.....	01
II. 3.Travaux antérieurs.....	01
III. Etude botanique de l'espèce <i>Myrtus communis</i> L.....	02
III 1- La famille des Myrtacées.....	02
III 2- Description botanique de la plante <i>Myrtus communis</i> L.....	03
III.1. Le genre <i>Myrtus</i> L.....	03
III.2. L'espèce <i>Myrtus communis</i> L.....	03
III.3. Distribution géographique de la plante.....	04
III .4. Position systématique.....	04

Chapitre II : Les métabolismes primaires et secondaires

I. Métabolites primaires.....	06
1.1. Les glucides.....	06
1.1.1. L'amidon.....	06
1.2. Les lipides.....	06
1.3. Les acides aminés.....	06
II. Métabolites secondaires.....	06
II.1. Définition.....	07
II.2. Fonctions des métabolites secondaires.....	07
II 3. Classification des métabolites secondaires.....	07

II.3.1. Les composés phénoliques.....	07
II.3.1.1. Classification des composés phénoliques.....	07
II.3.1.1.1. Les acides phénoliques.....	08
II.3.1.1.2. Les coumarines.....	10
II. 3.1.1.3. Les quinones.....	10
II.3.1.1.4. Les tanins.....	11
II.3.1.1.5. Les flavonoïdes.....	11
II.3.1.1.6.Les anthocyanes.....	12
II.3.2. Les alcaloïdes.....	13
II.3.3. Les isoprénoïdes (Terpénoïdes).....	13
II. 4. Huiles essentielles.....	14
II.4.1. Définition.....	14
II.4.2. Composition chimique des HE des plantes aromatiques.....	14
II.4.3. Techniques d'extraction des huiles essentielles.....	14
II.4.3.1. La distillation.....	14
II.4.3.2. L'hydrodistillation.....	15
II.4.3.3. La distillation par entraînement à la vapeur d'eau	15
II. 4.3.4. Extraction par micro-ondes	15
II.4.3.5. Extraction à froid.....	15
II. 4.4. Rôle des métabolites secondaires chez les végétaux.....	15
III. Activité antioxydants.....	16
III.1. Les radicaux libres et le stress oxydant.....	16
III. 2. Les radicaux libres dans les systèmes biologiques.....	16
III. 3. Les antioxydants.....	17
VI. Activité anti-inflammatoires.....	17
VI .1. la peau.....	17
VI. 1.2. Structure de la peau	18
VI. 1.3.Fonction de la peau	18
VI. 2. La cicatrisation cutanée.....	18

VI. 2.1. Déroulement de La cicatrisation normale	18
VI. 2.1.1. Phase initiale vasculaire et inflammatoire.....	19
VI. 2.1.2. Phase de réparation.....	20

2^{ème} partie : Travail experimental

Chapitre I : Matériels et méthodes

I. Matériel végétal.....	21
I.1. Préparation et conservation du matériel végétale.....	21
I.2. Criblage des métabolites primaires.....	22
I.2.1. Les composés réducteurs.....	22
I.2.2. Criblage d'amidon	22
I.2.3. Criblage des acides lipides	22
I.2.4. Criblage des acides aminés	22
I.2.5. Criblage des sels minéraux.....	23
I.3. Extraction	23
I.3.1. Extraction par macération	24
I.3.2. Extraction de l'huile essentielle.....	24
I.3.3. Conservation de l'huile essentielle obtenue.....	24
I.4. Analyse qualitatives	24
I.4.1. Criblage des métabolites secondaires	24
I.4.1.1. Criblage des flavonoïdes	24
I.4.1.2. Criblage des quinones.....	25
I.4.1.3. Criblage des anthraquinones	25
I.4.1.4. Criblage des tanins	25
I.4.1.5. Criblage de saponosides	25
I.4.1.6. Criblage des alcaloïdes	26
I.4.1.7. Criblage des coumarines.....	26

I.4.1.8. Criblage des Stérols et Triterpènes	26
I.5. Fractionnement de l'extrait méthanolique de l'espèce <i>Myrtus communis</i> L.....	27
I.5. 1. Etude analytique par chromatographie sur couche mince	28
I. 5.2. Séparation par chromatographie sur colonne.....	29
II. Evaluation des activités biologiques.....	29
II .1. Activité antibactérienne.....	29
II. 2. Activité antioxydant	30
II.2.1.Méthodes de détermination de l'activité antioxydante	31
II .2.2. Evaluation de l'activité antiradicalaire par le test de DPPH	32
II .4. Dosage de polyphénols totaux	33
II. 5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	34
II .5.1. Animaux	34
II .5.1.1. Animaux et conditions d'hébergement.....	34
II. 5.2. provocation des plaies	35

Chapitre II :Résultats et discussion

I. Métabolites primaires et secondaires.....	37
I.1.Métabolites primaires.....	37
I.1-1-Mise en évidence les glucides.....	37
I.1-2-Mise en évidence l'amidons.....	38
I. 1-3-Mise en évidence des acides aminées par CCM.....	39
I. 1-4-Mise en évidence des lipides.....	40
I. 2-Métabolites secondaires.....	41
I. 2-1-Criblage des flavonoides	41
I. 2-2-Criblage des quinones.....	43
I. 2-3-Criblage des anthraquinones.....	44

I. 2-4-Criblage des tanins.....	45
I.2-5-Criblage des anthocyanes.....	47
I.2-6-Criblage des Saponosides.....	49
I.2-7-Criblage des alcaloides.....	49
I.2-8-Criblages des coumarines.....	50
I.2-9-Criblage des Stérols et triterpènes.....	52
I. 2-10-Criblage des Sels minéraux.....	54
I.3-Obtention des extraits secs.....	55
I.4-Les analyses chromatographique.....	56
I.4-1-Chromatographie sur couche mince.....	56
I.4-2-Chromatographie sur colonne.....	57
II. Dosage des polyphénols.....	60
III-Evaluation des activités biologique.....	62
III.-1-Activités Antibactériennes.....	62
III-2-Activités Antioxydants.....	62
III-3-Activités Anti-inflammatoires.....	66

Conclusion

Références bibliographiques

Résumé

Introduction

Introduction

L'utilisation des plantes, à des fins thérapeutiques, est rapportée dans les littératures antique arabe, chinoise, égyptienne, hindou, grecque et romaine (**Anonyme, 1974**).

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, cosmétologie et en dermopharmacie. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. La Pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles, ou des matières premières pour la semi-synthèse (**Bahorun, 1997**).

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures *in vivo* et *in vitro* de tissus végétaux. Ceci est notamment le cas des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et antiradicalaires (**Bahorun, 1997**).

Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire. (**Boizot et al, 2006**).

En Algérie, l'industrie pharmaceutique, mais également des médecins et des chimistes cherchent à mieux connaître le patrimoine des espèces spontanées utilisées en médecine traditionnelle. Leurs modes d'utilisation, leurs indications dans diverses pathologies ainsi les principes actifs sont étudiés depuis une vingtaine d'années (**Djebaili, 1984**).

C'est pourquoi nous nous sommes intéressées de faire une étude phytochimique de la plante *Myrtus communis* L. et ses différentes activités antioxydant et anti-inflammatoires.

Nos travaux ont été divisé en deux parties, nous aborderons dans la première partie une étude bibliographique qui regroupe deux chapitres dont le premier concerne la présentation botanique de la plante *Myrtus communis* L, le deuxième chapitre est consacré aux substances naturelles, et leurs classifications. La deuxième partie comprend deux chapitres ; le premier chapitre concerne le matériel et les méthodes utilisées dans ce travail, et le deuxième chapitre les résultats obtenus et leurs discussions.

1ere PARTIE

Chapitre 1 :

Etude Botanique de *Myrtus communis* L.

I .L'importance des plantes médicinales

Depuis plusieurs années, l'utilisation de plantes médicinales ou de préparations à base de plantes connaît un succès croissant. Il est d'abord intéressant de remarquer que 30% environ des médicaments prescrits par le médecin sont d'origine naturelle, alors que cette proportion est de 50% pour les médicaments

II. Histoire de la plante *Myrtus communis* L.

II .1. Utilisation médicinale et traditionnelle

Le Myrte est utilisé pour lutter contre les bronchites et les dilatations bronchiques, les catarrhes muco-purulentes des voies respiratoires et urinaires, la tuberculose pulmonaire, la rhinorrhées, la sinusite, les otites, les diarrhées, les prostatites, et les hémorroïdes. Elle est connu également par leur effet hypoglycémique (**Baba Aissa, 1999, Mimica-Dukic et al., 2010**).

II .2. Aspect économique

Le Myrte commun est doté de vertus médicinales notamment utilisé comme antiseptique et désinfectant mais également pour ses propriétés balsamiques. Ce sont les qualités aromatiques et médicinales du myrte qui favorisent son utilisation dans les industries pharmaceutique, cosmétique et agroalimentaire. Dans les régions méditerranéennes, on fait fermenter et macérer les baies pour obtenir de la liqueur et du vin (**Barboni, 2006**).

II .3. Travaux antérieurs

Les principaux travaux relatifs à l'étude des composés phénoliques du *Myrte commun* L.ont été réalisées en 1967 par **El-Sissi et El-Ansary** et concernent l'analyse des flavonoïdes contenus dans les feuilles.

En 1987, **Diaz et Abeger** ont analysés les composés phénoliques simples et principalement les flavonoïdes et les acides phénoliques contenus dans les feuilles du myrte.

Plus récemment, les travaux de (**Martin et al, 1999**) sur les composés polyphénoliques du péricarpe du fruit du myrte indiquent une composition riche en myricétine, en hespéridine et en esculine. Les composés sont extraits par un mélange méthanol-eau (60 / 40) à température ambiante et séparés par chromatographie sur colonne ouverte. L'identification se fait par spectrométrie UV et par RMN du carbone-13 et du proton

(Romani et al, 1999) ont étudié la composition des polyphénols extraits au solvant (éthanol à 70 %) à partir des feuilles du myrte. L'extrait est purifié puis l'analyse qualitative et quantitative se fait par CLHP-DAD et CLHP/SM.

Récemment, en (Montoro et al., 2006a) ont travaillé sur la stabilité et l'activité antioxydante des polyphénols extraits des baies du myrte pour la préparation des liqueurs en Sardaigne et en Italie. Ils ont dosé les flavonoïdes et les anthocyanes par CLHP-UV-VIS et l'identification par LC/SM-ESI (couplage de la chromatographie en phase liquide à la spectrométrie de masse en mode ionisation : Electrospray), en se plaçant à deux longueurs d'ondes caractéristiques de ces deux classes de composés polyphénoliques à savoir 350 nm et 520 nm. La macération s'est déroulée en laissant les baies au contact de l'éthanol à 70% pendant 40 jours. Ils ont pu identifier 14 composés, parmi lesquels 08 anthocyanes et six (06) flavonoïdes.

(Montoro et al., 2006b) utilisent différentes techniques pour l'identification (RMN et LCES/MS) et la quantification (CLHP-UV-VIS en utilisant des standards internes) des anthocyanes présents dans les baies du myrte.

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

III. Etude botanique de *Myrtus communis* L.

III .1. La famille des Myrtacées

La famille des Myrtacées est une famille des plantes dicotylédones qui comprend plus de 5650 espèces réparties en 48 à 134 genres environ. Ce sont des arbres et des arbustes, souvent producteurs d'huiles aromatiques (Govaerts et al, 2008).

Selon (Quezel et Santa 1963), les Myrtacées sont des plantes à feuilles entières, opposées.

Fleurs axillaires hermaphrodites. Calice cupuliforme. Etamines très nombreuses, insérées avec les pétales au sommet du tube calycinal. Gynécée infère ou semi- infère à 5 carpelles uniloculaires, à ovules nombreux, à placentation axile. Fruits bacciformes bleuâtres globuleux, de 5-8 mm de diamètre.

III .2. Description botanique de la plante *Myrtus communis* L.

III. 2.1. Le genre *Myrtus* L.

Arbuste à feuilles ovoïdes, 2 à 3 fois plus longues que large, à nervation pennée. Fleurs grandes 10-15 mm, blanches, pourvues à la base de 2 bractées très petites, rapidement caduque. Baie ovoïde 6-8 mm. Rameaux pubescents dans leur jeunesse. (Quezel et Santa 1856).

III .2.2. L'espèce *Myrtus communis* L.

La famille des myrtacées pousse spontanément et en abondance dans les régions méditerranéennes, commune dans le Tell et sur le littoral du centre (Mimica-Dukic, 2010 ; Baba Aissa, 1999).



Photo 1: *Myrtus communis* L.

C'est un arbuste de un à deux mètres de hauteur ; en buissons denses d'un vert brillant.

Il se remarque par ses fleurs blanches très ouvertes et ses nombreuses étamines en touffe ébouriffée. Son odeur aromatique forte et particulière est l'un de ses traits de caractère.

La plante renferme de nombreuses poches sécrétrices surtout au niveau des feuilles.

Ces dernières sont ovoïdes lancéolées, 2 à 3 fois plus longues que larges, à nervation pennée persistante, opposées, à très court pétiole, coriaces et d'un vert brillant.

Les fleurs apparaissent au début de l'été ; elles sont grandes 10-15 mm ; solitaires sur un long pédoncule à l'aisselle des feuilles et très odorantes et pourvues à la base de bractées très petites, rapidement caduques.

Les fruits sortent à l'automne, ce sont des baies ovoïdes 6-8 mm noires bleuâtres à peau charnue, conservant à leur partie supérieure les restes du calice. Ces fruits sont comestibles mais âpres et astringents.

Les rameaux sont de taille fine de couleur verte qui se transforme rapidement en brun orangé, pubescents dans leur jeunesse (Barboni., 2006 ; Quezel et Santa., 1963).



a : Les feuilles



b : Les tiges



c : Les fruits

Photos 2 : Les organes de la plante *Myrtus communis* L.

III .2.3. Distribution géographique de la plante

Myrtus communis L. est une plante arbustive pousse sur le long du périmètre méditerranéen

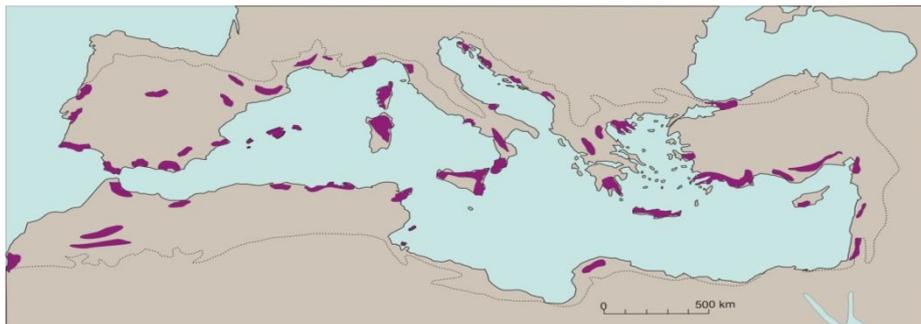


Figure 1 : Distribution géographique de l'espèce *Myrtus communis* L. dans le monde d'après (Médail et al, 2009)

III .2.4. Position systématique

Règne : Plantae

Sous-règne : Eucaryotes

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Myrtales

Famille : Myrtaceae

Genre : *Myrtus*

Espèce : *Myrtus communis* L.

Nom vernaculaire : Rayhan, Mersin

III .2.5. Classification phylogénétique :

Clade : Angiospermes

Clade : Dicotylédones vraies

Clade : Rosidées

Ordre : Myrtales

Familles : Myrtaceae

Genre : *Myrtus*

Espèce : *Myrtus communis* L.

Chapitre II :

Les Métabolites primaires et secondaires

I. Métabolites primaires

Un métabolite primaire est un type de métabolite qui est directement impliqué dans la croissance, le développement et la reproduction normale d'un organisme ou d'une cellule. Ce composé a généralement une fonction physiologique dans cet organisme, c'est-à-dire une fonction intrinsèque. Un métabolite primaire est typiquement présent dans de nombreux organismes taxonomiquement éloignés. Ils sont: les sucres, les acides aminés, les protéines et les acides nucléiques; **J BRUNETON., (2009).**

I. I. Les glucides

Les glucides sont une classe de molécules organiques, il existe plusieurs classes contenant un groupement carbonyle (aldéhyde ou cétone) et plusieurs groupements hydroxyle (-OH). Les glucides étaient historiquement appelés hydrates de carbone, et sont toujours appelés *carbohydrates* en anglais. Leur formule chimique est basée sur le modèle $C_n(H_2O)_p$. **R. MERGHEM., (2009).**

1.1. I. L'amidon

L'amidon (du latin *amylum*, non moulu) est un glucide complexe (polysaccharide) composé de chaînes de molécules de D-Glucose. Il s'agit d'une molécule de réserve pour les végétaux supérieurs et un constituant essentiel de l'alimentation humaine.

I. 2. Les lipides

Les lipides constituent la matière grasse des êtres vivants. Ce sont des molécules hydrophobes ou amphiphiles, molécules hydrophobes possédant un domaine hydrophile très diversifiées, comprenant entre autres les graisses, les cires, les stérols, les vitamines liposolubles, les mono,di-et triglycérides, ou encore les phospholipides. **J-L. GUIGNARD., (2000).**

I. 3. Les acides aminés

Les acides aminés sont des protéines qui fournissent de l'énergie, agissent comme catalyseurs (notamment dans l'hydrolyse), régularisent l'équilibre chimique, interviennent dans la régénération des tissus. **GERHARD R.,(1993).**

II. Métabolites secondaires

La plante est le siège d'une intense activité métabolique aboutissant à la synthèse de principes actifs les plus divers. Ce processus métabolique est lié aux conditions mêmes de vie de la plante : la plante doit faire face à de multiples agressions de l'environnement dans lequel elle vit : prédateurs, microorganismes pathogènes, etc. On conçoit donc que la plante puisse

développer un métabolisme particulier lui permettant de synthétiser les substances les plus diverses pour se défendre : les métabolites secondaires (**Kansole, 2009**).

II.1. Définition

Chez les plantes, il existe un métabolisme secondaire, c'est une exclusivité du monde végétal. Ces produits, à structure chimique souvent complexe, sont très dispersés et très différents selon les espèces (**Cuendet, 1999**).

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

II.2. Fonctions des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires ne sont pas vitaux pour l'organisme mais jouent nécessairement un rôle important de part la machinerie enzymatique complexe nécessaire à leur production. Ils ont des rôles écologiques (allomone, phéromone...). Ces molécules furent sélectionnées au cours de l'évolution pour l'interaction qu'elles ont avec un récepteur d'un autre organisme. Elles représentent donc une grande source potentielle d'agents thérapeutiques (**Thomas, 2009**).

Ils pourraient jouer un rôle dans la défense contre les herbivores, et dans les relations entre les plantes et leur environnement : plusieurs composés phénoliques participent à la filtration des UV, les pigments floraux sont essentiels aux processus de pollinisation (**Gravot, 2008**).

II.3. Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, il existe plus de 200 000 métabolites secondaires classés selon leur appartenance chimique en l'occurrence, les terpènes, les alcaloïdes, les composés acétyléniques, les cires, et les composés phénoliques (**Cuendet, 1999 ; Vermerris, 2006**). On distingue trois classes principales:

II.3.1. Les composés phénoliques

Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires. (**Lebham, 2005**). Ils constituent un des groupes le plus nombreux et largement distribué des substances dans le royaume des végétaux avec plus de 8000 structures

phénoliques présents dans tous les organes de la plante. Ils résultent bio génétiquement de deux voies synthétiques principales : la voie shikimate et acétate (**Lugasi et al, 2003**).

L'élément structural de base est un noyau benzoïque auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthylique, ester, sucre...) (**Bruneton, 1993**).

Les composés phénoliques sont des molécules hydrosolubles présentes dans tous les végétaux. Ils ont divers effets sur la physiologie végétale de part leurs actions antibactériennes et anti-fongiques. Ils participent à la pigmentation des fleurs, des légumes et de quelques fruits (raisins, agrumes, etc...). Certains d'entre eux sont responsables d'amertume et d'astringence (**Adrian et al, 1991 ; Milane, 2004**).

Les fonctions principales attribuées à ces composés chez les végétaux sont la protection contre les pathogènes et les herbivores ainsi que la limitation des dommages dus aux radiations UV. Dans ce cas, ils agissent par effet d'écran et par effet antioxydant (**Lebham, 2005**).

Les composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes simples et proanthocyanidines) forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes. (**Beta et al, 2005**). Ces substances sont dotées de certaines activités résumées dans le (Tableau 1).

Tableau 1 : Activités biologiques des composés polyphénoliques (Bahorun, 1997)

POLYPHENOLS	ACTIVITES
Acides Phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes Antifongiques Antioxydantes
Coumarines	Protectrices vasculaires et antioedémateuses
Flavonoïdes	Antitumorales Anticarcinogènes Anti-inflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydantes
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène Antioxydantes Antitumorales Antifongiques Anti-inflammatoires
Tanins galliques et catéchiques	Antioxydantes

II.3.1.1. Classification des composés phénoliques

II.3.1.1.1. Les acides phénoliques

Ils ne possèdent pas de squelette flavane. Ils sont solubles dans l'éther. Ils peuvent être associés à la lignine, présents sous forme d'ester, ou bien localisés dans la partie de la feuille insoluble dans l'alcool (**Barboni, 2006**). Ils présentent des propriétés biologiques intéressantes: anti-inflammatoires, antiseptiques urinaire, antiradicalaires, cholagogues, hépatoprotecteurs, cholérétiques, immunostimulants (**Bruneton, 1999**). On distingue : Les dérivés de l'acide benzoïque (constitués d'un squelette à sept carbones). Les dérivés d'esters hydroxycinnamiques (constitués d'une structure de type C6-C3) (**Barboni, 2006**).

➤ Les acides benzoïques

Les acides benzoïques sont formés d'un squelette à sept atomes de carbones. Ils sont principalement représentés par les acides p-hydroxybenzoïques, protocatéchiques, vanilliques, galliques, syringiques, salicyliques, o-hydroxybenzoïques et gentisiques. Les acides protocatéchiques et galliques (Figure4) ont probablement une origine et des fonctions différentes dans la plante. Le premier est très largement répandu, le second est plus rare, on le rencontre dans la nature surtout sous forme de dimère (**Ribereau, 1968**).

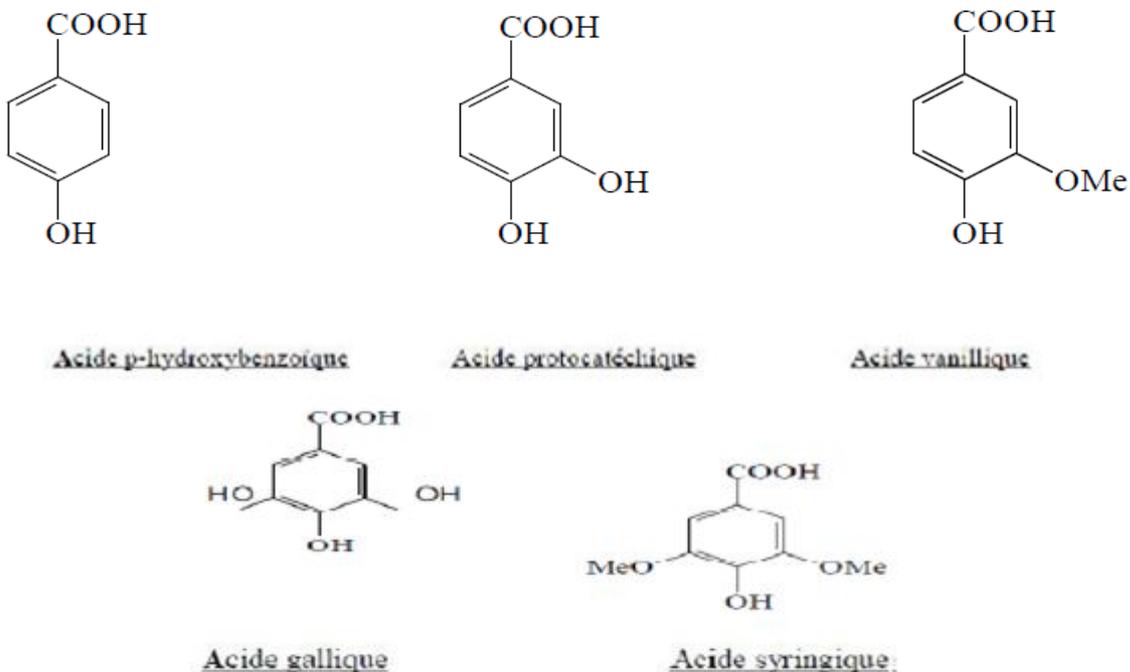


Figure 2 : Quelques dérivés de l'acide hydroxybenzoïque.

➤ Les acides cinnamiques

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

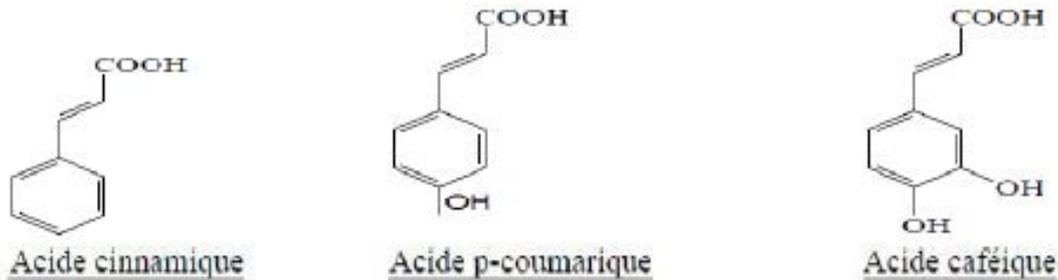


Figure 3: Quelques dérivés de l'acide hydroxycinnamique

II.3.1.1.2. Les coumarines :

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

Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Elles sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (Igor, 2002).

Les coumarines sont connues par leurs activités cytotoxiques, antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes (au niveau du cœur), hypotensives, elles sont également bénéfiques en cas d'affections cutanées (Gonzalez et Estevez-Braun, 1997).

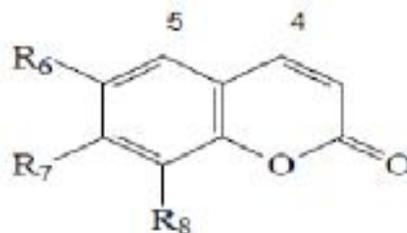


Figure 4 : Structure de base de coumarine

II.3.1.1.3. Les quinones

Ce sont des substances colorées et brillantes, en général rouges, jaunes ou orange et possédant deux fonctions cétones. On trouve les quinones dans les végétaux, les champignons, les bactéries. Les organismes animaux contiennent également des quinones, comme par exemple la vitamine K, qui est impliquée dans la coagulation du sang. Les quinones sont utilisées dans les colorants, dans les médicaments et dans les fongicides (**Kansole, 2009**).

II.3.1.1.4. Les tanins

Les tanins sont des polyphénols que l'on trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbre et les fruits (raisin, datte, café, cacao...). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation (**Hemingway, 1992**).

Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides (**Cavin, 1999**).

Les tanins sont divisés en deux groupes :

- Les tanins condensés, formés de proanthocyanidines (sous forme d'oligomères)
- Les tanins hydrolysables, esters des acides phénols et de glucose.

II.3.1.1.5. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des molécules très répandues dans le règne végétal. Ils font partie de la classe des polyphénols, principaux métabolites secondaires des plantes. Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, présentent le même élément structural de base (sauf exceptions : chalcones, aurones, isoflavones), à savoir quinze atomes de carbone constitués de deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3 (noyau 2-phényl-1-benzopyrane) (**Bruneton, 1999**).

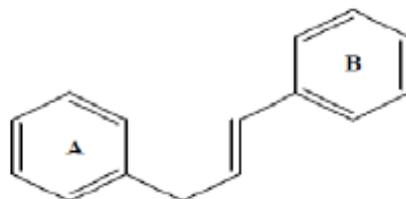


Figure 5 : Structure de base de flavonoïdes.

▪ Biosynthèse des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune dérivant de la voie de l'acide shikimique. Le précurseur de ces molécules est le 4-hydroxycinnamate-coenzyme A synthétisé à partir de la phénylalanine (Bruneton, 1999). La voie biosynthétique de ces polyphénols est présentée dans la figure 8.

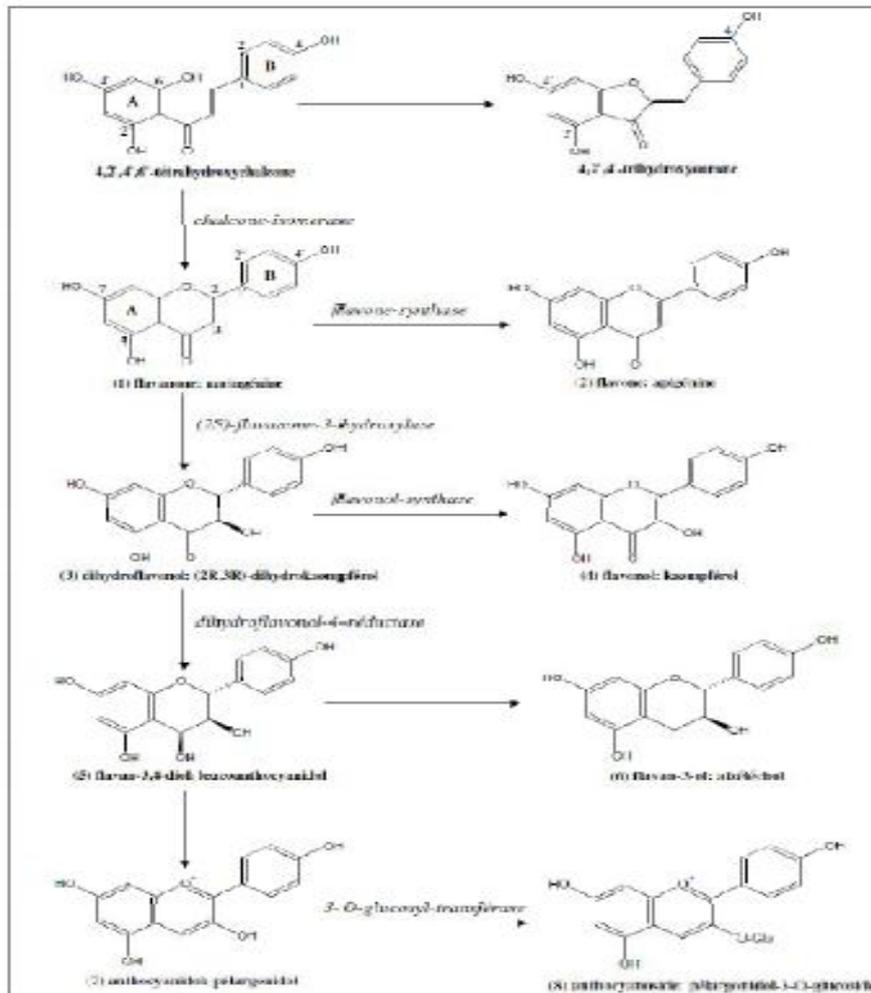


Figure 6: Biosynthèse des flavonoïdes

De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités antivirales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, antiallergiques, antioxydantes et anti-cancéreuses. (Middleton et al, 1993).

La famille des flavonoïdes peut se diviser en six classes qui diffèrent par leurs structures chimiques: flavanols, flavones, flavonols, flavanones, isoflavones et anthocyanidines.

Parmi les nombreux pigments dérivants de cette structure, il convient de citer notamment:

II.3.1.1.6. Les anthocyanes

Les anthocyanes (du grec *anthos*, fleur et *Kuanos*, bleu violet) terme général qui regroupe les anthocyanidols et leurs dérivés glycosylés. Ces molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes et capables d'absorber la lumière visible, ce sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange. Leur présence dans les plantes est donc détectable à l'œil nu. A l'origine de la couleur des fleurs, des fruits et des baies rouges ou bleues, elles sont généralement localisées dans les vacuoles des cellules épidermiques, qui sont de véritables poches remplies d'eau. On trouve également les anthocyanes dans les racines, tiges, feuilles et graines. En automne, les couleurs caractéristiques des feuilles des arbres sont dues aux anthocyanes et aux carotènes qui ne sont plus masqués par la chlorophylle (**Bassas et al., 2007**).

▪ Structures

Leur structure de base est caractérisée par un noyau "flavon" généralement glucosylé en position C₃. Les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule. L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment (**Bessas et al., 2007**).

II.3.2. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont un groupe de composés azotés et faiblement basiques issus principalement des végétaux. Ils présentent des réactions communes de précipitation. Après extraction, ils sont détectés par des réactions générales de précipitation fondées sur leur capacité de se combiner avec des métaux. La caractérisation de la présence d'alcaloïde peut se faire par précipitation à l'aide de : Réactif silicotungstique : réactif de Bertrand, Réactif Tétraiodomercure de potassium : réactif de Valser-Mayer, Iodobismuthate de potassium : réactif de Dragendorff (**Kansole, 2009**).

➤ Propriétés

Les propriétés toxiques ou médicamenteuses des alcaloïdes font de ce groupe de métabolites secondaires un intérêt particulier. Au niveau du système nerveux central ils agissent comme dépresseurs (morphine, scopolamine) ou comme stimulants (caféine, strychnine,...). Au niveau du système nerveux autonome comme sympathomimétiques (éphédrine), anticholinergiques (atropine). Certains jouent le rôle d'anesthésiques locaux (cocaïne), d'antipaludiques (quinine) (**Kansole, 2009**).

II.1.1. Les isoprénoïdes (Terpénoïdes)

Les isoprénoïdes sont des composés issus de la condensation d'unités de base à 5 carbones de type isoprène. On parle également de composés terpéniques ou terpenoïdes, l'unité monoterpène correspondant à des molécules à 10 carbones formées à partir de deux unités isoprènes.

De façon analogue à la famille des composés phénoliques, les isoprénoïdes regroupent à la fois des molécules de faibles poids moléculaires, volatiles et composants principaux d'huiles essentielles, et des molécules hautement polymérisées comme par exemple le caoutchouc. Cette voie de biosynthèse donne naissance à de très nombreux métabolites secondaires, mais participe également à la synthèse de composés comme le β -carotène, les chlorophylles, l'ubiquinone ou la plastoquinone, qu'on ne positionne généralement pas dans le métabolisme secondaire (Harbone, 1998 ; Bruneton, 1999).

II.4. Huiles essentielles

II.4.1. Définition

Le terme huile essentielle (HE) dérive de « quintaessentia ». un nom donné par le médecin suisse paracelsus aux extraits de plantes obtenues par distillation. (Hart *et al.* 2008).

Une huile essentielle est un liquide concentré en substances végétales, obtenu par extraction ou distillation de molécules volatiles de la plante d'origine. On retrouve majoritairement de terpénoïdes et des molécules aromatique. Les huiles essentielles issues de différentes plantes possèdent donc des propriétés différentes, dépendantes de la composition d'origine.

Les huiles essentielles sont des mélanges liquides très complexes. Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance d'une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie. (Sanon *et al.*, 2002).

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes, par exemple, dans les sommités fleuries, les feuilles, les rhizomes, les fruits et les écorce.

II.4.2. Composition chimique des HE des plantes aromatiques

La composition chimique des plantes aromatiques est complexe, Le nombre des molécules chimiquement différentes qui constituent une huile essentielle est variable, d'une grande diversité de composés. On retrouve composés majoritaires (entre 2 et 6 généralement), des composés minoritaires et un certain nombre de constituants sous forme de traces.

Huile essentielle est constitué de deux fractions. La première fraction dite volatile (COV) est présente dans différents organes de la plante selon la famille ; cette fraction est composée de métabolites secondaires qui constituent l'huile essentielle. La deuxième fraction dite non volatile de la plante, composés organiques non volatils (CONV), est composée essentiellement de coumarines, flavonoïdes (Cisowski, 1985), composés acétyléniques ainsi de lactones sesquiterpéniques phénols ou polyphénols jouant un rôle fondamental dans l'activité biologique de la plante (Kubeczka *et al.*, 1982).

II.4.3. Techniques d'extraction des huiles essentielles

II. 4.3.1. La distillation

La technique d'extraction des huiles essentielles utilisant l'entraînement des substances aromatiques grâce à la vapeur d'eau. Il existe précisément trois différents procédés utilisant ce principe: l'hydrodistillation, l'hydrodiffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau.

II.4.3.2. L'hydrodistillation

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Le matériel végétal est immergé directement dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau (sauf quelques rares exceptions), elle surnage au-dessus de l'hydrolat.

II.4.3.3. La distillation par entraînement à la vapeur d'eau

Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau. La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques: le matériel végétal ne baignant pas directement dans l'eau bouillante (Franchomme *et al.*, 1990).

II.4.3.4. Extraction par micro-ondes :

Au début des années 1990 est apparue une toute nouvelle technique appelée hydrodistillation par micro-ondes sous vide. Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle.

II.4.3.5. Extraction à froid

La pression à froid est le moyen le plus simple mais aussi le plus limité. Cette technique d'extraction est utilisée pour obtenir des essences d'agrumes contenues dans les zestes.

Autrefois, les fruits étaient frottés manuellement sur des parois garnies de picots d'une écuelle de bois. L'huile exprimée était recueillie à l'aide d'une éponge. Elle était ensuite soigneusement filtrée. Quatre à cinq heures sont nécessaires pour traiter une centaine de kilo d'écorces, sans compter les pertes de rendement.

II.4.4. Rôle des métabolites secondaires chez les végétaux

Les animaux sont mobiles pour chercher leur nourriture, pour échapper aux prédateurs et pour se reproduire. En revanche, les plantes sont immobiles ou presque, elles ont du alors, développer des stratégies pour survivre. Les métabolites secondaires sont donc probablement impliqués étroitement dans ces stratégies :

▪ Dissuader les prédateurs

- Les odeurs repoussent les herbivores.
- Les plantes toxiques « éduquent les herbivores à les éviter » pour ne pas être broutées.

▪ Attirer les pollinisateurs

Les couleurs et les odeurs attirent les insectes. Par exemple, certaines orchidées synthétisent des phéromones sexuelles qui sont des substances volatiles émises par les insectes femelles pour attirer les males.

III. Activité antioxydants**III.1. Les radicaux libres et le stress oxydant**

L'oxygène est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant de la matière organique. Mais nos cellules convertissent une partie de cet oxygène en métabolites toxiques : les radicaux libres organiques (**Lesgards, 2000**).

Un radical libre est une espèce, atome ou molécule, contenant un électron non apparié.

Ce déséquilibre n'est que transitoire et il est comblé soit par l'acceptation d'un autre électron soit par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule. Ces espèces radicalaires très instables et très réactives sont produites d'une manière continue au sein de notre organisme, dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques. Par exemple, lors de la respiration cellulaire, l'oxygène moléculaire se transforme en diverses substances oxygénées, communément appelées radicaux libres de l'oxygène ou espèces réactives oxygénées (Reactive Oxygen Species: ROS) (**Gutteridge, 1993**).

Dans certaines situations, cette production augmente fortement, entraînant un stress oxydatif que l'on définit comme un déséquilibre entre la production et la destruction de ces espèces (**Gutteridge, 1993**). Ce déséquilibre est à l'origine de nombreux facteurs, notamment les polluants présents dans l'air que nous respirons et l'eau et les aliments que nous consommons. Les rayons ultraviolets du soleil, d'autres radiations, la fumée de tabac et l'exercice excessif sont également des facteurs qui augmentent considérablement la présence des radicaux libres dans notre système (**Favier, 2003**).

En raison de leur capacité à endommager les cellules, les tissus et les organes, les espèces réactives de l'oxygène sont impliquées dans un grand nombre de pathologies, tant aiguës que chroniques (**Gutteridge, 1993**).

III.2. Les radicaux libres dans les systèmes biologiques

Parmi toutes les espèces susceptibles de se produire dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de ces composés qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Les radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tel l'anion superoxyde O_2^- et le radical hydroxyle OH^\cdot , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO^\cdot . D'autres espèces dérivées de l'oxygène tel que l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde ($ONOOH$) peuvent être des précurseurs de radicaux libres. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (**Favier, 2003**).

Les radicaux libres sont principalement produits par des sources endogènes, telles que les chaînes de transport d'électron, les peroxysomes et le système de cytochrome P-450. Ces radicaux sont responsables de l'altération de l'ADN, du vieillissement cellulaire qui est à la base de certaines maladies comme l'athérosclérose, le cancer, maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson (**Favier, 2003**).

III.3. Les antioxydants

De nombreuses espèces oxydantes sont produites et bien qu'elles soient souvent indispensables à l'organisme, elles ne sont pas moins responsables de dégâts importants.

Pour faire face à ces produits oxydants délétères, le corps humain possède tout un arsenal de défenses que l'on qualifie d'antioxydants. Mais bien que le terme « antioxydant » soit fréquemment utilisé, il est difficilement définissable car il couvre un large nombre de molécules et des domaines très divers comme l'alimentation, l'industrie chimique, l'industrie pharmaceutique (**Halliwell et Gutteridge, 1999**).

Un antioxydant est toute substance, présente à une concentration inférieure à celle du substrat oxydable, qui est capable de retarder ou de prévenir l'oxydation de ce substrat. (**Halliwell et Gutteridge, 1999**).

Les antioxydants sont des composés puissants qui peuvent neutraliser les radicaux libres impliqués dans la dégradation cellulaire, et nous aident ainsi à garder une vie active et saine. Quelques antioxydants sont fabriqués par le corps humain, d'autres telles les vitamines et poly phénols, doivent être apportés par notre alimentation. (**Pincemail et Defraigne, 2004**).

VI. Activité anti-inflammatoires

VI. 1.la peau

La peau protège l'organisme, contre le milieu extérieur et joue un autre fonction suit de variétés cellulaires (**Ann. Dematl, 2005**).

VI .1.2. Structure de la peau

La peau des Mammifères est constituée de deux couches :

- L'épiderme
- Le derme qui repose sur l'hypoderme.

VI .1.3.Fonction de la peau

La peau joue le rôle de barrière entre le milieu intérieur et l'environnement.

Protection mécanique, contre l'eau, contre la lumière. Thermorégulation, Homéostasie biochimique.

Fonctions métaboliques et immunologiques, sensorielles, dans la vie sociale (**Sandrine FOLLET, 2003**).

Tableau 2: Fonction de la peau et du pelage

Fonctions	Moyens mis en œuvre
Protection mécanique	- Pelage - Agencement des fibres de collagène
Protection contre l'eau	- Film hydrolipidique de surface - Orientation des poils
Protection contre la lumière	- Pelage - Pigmentation
Thermorégulation	- Pelage abondant : coussin d'air isolant stocké entre les poils - Système vasculaire dermique - Tissu conjonctif SC riche en adipocytes
Homéostasie biochimique	- Stockage d'électrolytes et d'eau dans la matrice dermique - Stockage de lipides et de molécules liposolubles dans le tissu adipeux SC
Fonctions métaboliques et immunologiques	- Synthèse de la vitamine D...
Fonctions sensorielles	- Terminaisons nerveuses dans l'épiderme - Vibrisses, follicules pileux...
Fonctions dans la vie sociale	- Mimétisme - Marquage territorial

VI .1.La cicatrisation cutanée

La peau isole et protège l'organisme contre le milieu extérieur .Lorsqu'elle subit une brèche (plaie aigue) ou une altération (plaie chronique) le processus de cicatrisation met en jeu un grand nombre de variétés cellulaires (Figure 7).

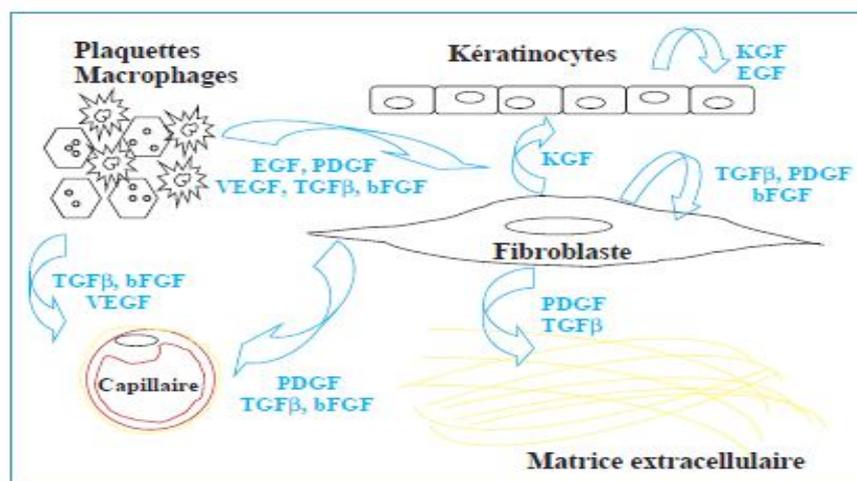


Figure 7: Cicatrisation cutanée : les intervenants

VI .2.1. Déroulement de La cicatrisation normale

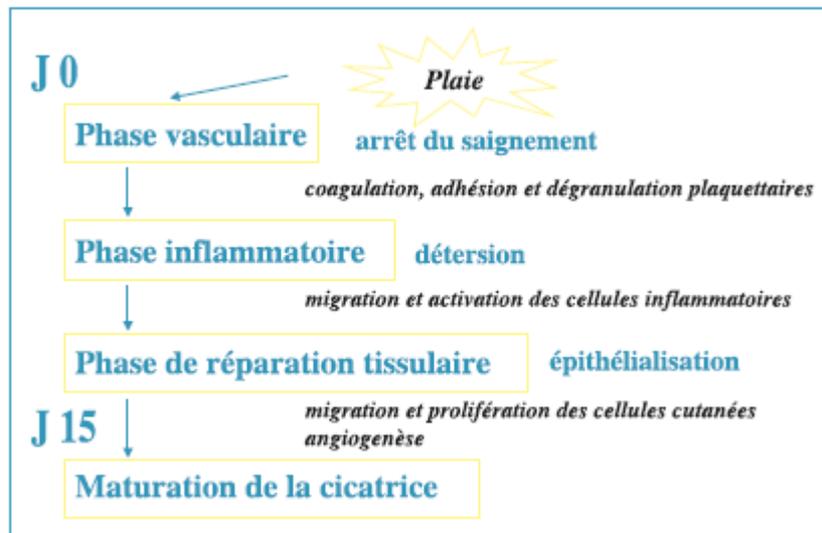


Figure 8 : Cicatrisation cutanée : les étapes

VI .2.1.1. Phase initiale vasculaire et inflammatoire

Le clou plaquettaire arrête le saignement, rapidement consolidé par la formation du caillot dit "thrombus blanc". La migration des cellules participant à la réaction inflammatoire va ensuite s'effectuer.

VI .2.1.2. Phase de réparation

Elle dure 10 à 15 jours et correspond à la prolifération des fibroblastes, à l'angiogenèse et à la synthèse de la matrice extracellulaire. Cette phase est largement dépendante des cytokines. La migration des fibroblastes dans la plaie est précoce (48e heure), favorisée par l'expression sur la membrane des fibroblastes de récepteurs de la famille des intégrines pour les composants de la matrice extracellulaire (fibronectine, vitronectine, collagène, etc.).

VI .2.1.3. Phase de maturation.

Le remodelage de la matrice extracellulaire passe par une phase inflammatoire et proliférative durant jusqu'à 2 mois après la fermeture de la plaie, suivie par une phase de régression qui peut persister jusqu'à 2 ans. Peu à peu, le tissu de granulation se raréfie en fibroblastes, une structure collagénique plus dense apparaît, tandis que le réseau vasculaire s'organise.

2eme PARTIE

Chapitre 1 :

Matériels et méthodes

I. Matériel végétal

Dans le but de caractériser les extraits préparés à partir des organes de la plante *Myrtus communis* L. La plante étudiée *Myrtus communis* L., a été récolté durant le mois de Mai 2014 et Mai 2015 dans la région de Sidi Maarouf, à l'Est de la wilaya de Jijel. Des analyses qualitatives et quantitatives ont été effectuées.



Photo 3 : La plante *Myrtus communis* L.

I. 1. Préparation et conservation du matériel végétale

Toutes les parties de la plante ont été nettoyé et séché à l'air et ombre, puis, broyé finement à l'aide d'un broyeur jusqu'à l'obtention d'une poudre végétale, cette dernière est conservé à température ambiante.



Photo 4 : L'appareil utilisé pour broyer la plante

I.2. Criblage des métabolites primaires

I.2.1. Les composés réducteurs

Leur détection consiste à traiter 1ml de l'extrait méthanolique avec 2 ml d'eau distillée puis on ajoute liqueur de Fehling (liqueur de Fehling 5% de solution A et 5% de solution B), puis on chauffe. Le caractère réducteur des aldoses ou des cétones est révélé par la transformation du couleur aux rouge ou rouge brique. (*Trease et Evans, 1987*).

I.2.2. Criblage de l'amidon

Le test effectué consiste à ajouter le réactif d'amidon qui est: l'eau iodée (dissoudre dans 20 ml d'eau distillée 1,5g d'iodure de potassium (KI) puis 0,5g d'iode (I) et compléter avec de l'eau distillée jusqu'à 100 ml), sur le matériel végétale qui sera étudié. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue violacée (*Guignard, 1979*).

I.2.3. Criblage des lipides

Leur détection consiste à mettre la substance à tester en solution aqueux dans un tube ou dans un verre de montre, après on ajoute quelques gouttes de rouge Soudan III. Le rouge Soudan III met en évidence les lipides par une coloration Rouge intense.

I.2.4. Criblage des acides aminés

Préparation de l'éluant : butanol 70 ml + acide acétique 18 ml + eau 12 ml à placer dans un flacon hermétiquement fermé.

Solutions d'AA : 2 à 5 mg d'AA (glycine, proline, lysine, arginine, tyrosine, méthionine, isoleucine, glutamine, alanine, cystéine, phénylalanine,) dans 1 ml d'eau distillée, à placer dans des microtubes.

Révéléateur : solution de ninhydrine à 5% dans acétone, à placer dans un flacon pulvérisateur à parois opaques (la ninhydrine s'altère à la lumière).

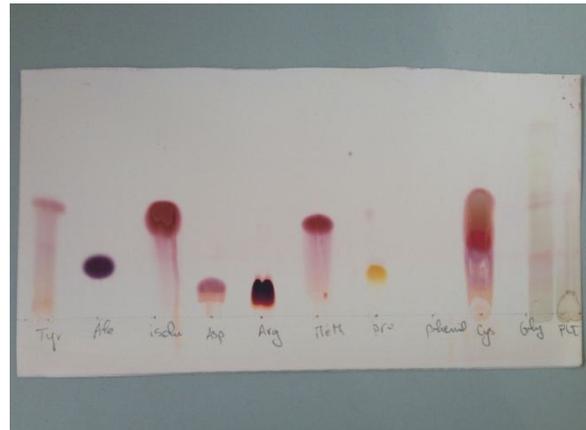
les cuves à CCM : verser le solvant au fond dans la cuve sur une épaisseur de 1cm. Fermer hermétiquement.

- les plaques CCM : tracé, à l'aide d'un crayon un trait à 2 cm du bas de la plaque, marquant la ligne sur laquelle se feront les dépôts.

Sur la plaque CCM on a déposé successivement les différentes substances (Les AA de référence et l'extrait de la plante). Après on place la plaque dans la cuve et la ligne des dépôts doit être située au dessus du solvant. Laisser migrer environ 30 min. Puis on retire la plaque et pulvérisé le révéléateur sous la hôte sur la plaque CCM.



A : avant pulvérisation de révélateur



B : après pulvérisation de révélateur

Photo 5 : Chromatogramme des AA présents dans les fruits de *Myrtus communis* L

I.2.5. Criblage des sels minéraux

La détection des sels minéraux du fruit de *Myrus communis* L. sont réalisé à partir de l'extrait aqueux, selon les réactifs indiqués dans le tableau 3.

Tableau 3 : Réactifs des sels minéraux

Réactifs	Résultats
Acide picrique	cristaux en aiguille de couleur jaune
Nitrate d'argent	précipité de chlorure d'argent en présence de chlorures
Oxalate d'ammonium	précipité blanc
Thiocyanate de potassium	coloration rouge
Chlorure de baryum	précipité bleu

I.3. Extraction

I.3.1. Extraction par macération

2 g de la poudre végétale de chaque organe (tiges, feuilles, fruits) de la plante sont macéré à température ambiante en utilisant les solvants suivants : méthanol (MeOH : H₂O) (7:3), étherique et chloroformique pendant 24 heures. Les extraits sont récupérés par filtration sur papier Wattman. Le filtrat a été récupéré dans des flacons en verres hermétiquement fermés et conservé.

I.3.2. Extraction de l'huile essentielle

L'huile essentielle est extraite à partir de *Myrtus communis* L. La récolte destinée à la distillation est effectuée au début de la floraison. (19 mai 2015).

100 g de matériel végétal (parties aériennes) fraîche de la plante *Myrtus communis* L. ont été hydrodistillés dans un appareil de type Clevenger pour une durée de 3 heures. Le rendement en huile essentielle a été déterminé par rapport à la matière fraîche, évalué à partir de 3 échantillons.

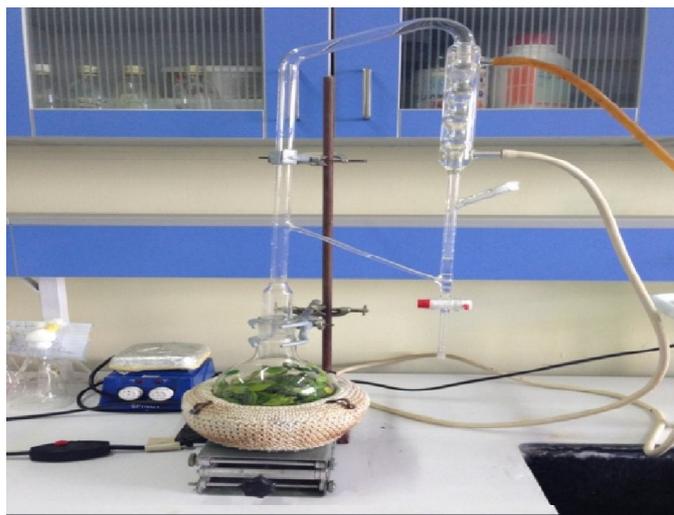


Photo 6: Hydrodistillation à l'aide d'un système de type Clevenger

I.3.3. Conservation de l'huile essentielle obtenue

L'huile essentielle est conservée dans un tube en verre fermé hermétiquement et couvert par du papier d'aluminium pour préserver de l'air et de la lumière et mise à 4°C.

I.4. Analyse qualitatives

I.4.1. Criblage des métabolites secondaires

I.4.1.1. Criblage des Flavonoïdes

Se réalise à partir de 10 ml d'extrait hydrométhanolique repartie dans 3 tubes, le premier tube servant de témoin, les deux autres tubes servant les deux tests (test de Wilstater et test de Batesmith) :

Test de Wilstater : HCl concentré + trois ou quatre tournures de Mg. Le changement de coloration est observé. (*Karumi, 2004*).

Test de Bate-smith : additionner dans le 3^{ème} tube quelques gouttes d' HCl concentré porté au bain marie trente minutes. L'apparition d'une coloration rouge dénoté la présence de leucoanthocyanes.

I.4.1.2. Criblage Des Quinones

Un gramme de matériel végétal sec et broyé est placé dans un tube avec 15 à 30 ml d'éther de pétrole. Après agitation et un repos de 24 heures. La présence de quinones libre est confirmée par l'ajout de quelque goutte de NaOH 1%, lorsque la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet. (Ribérreau, 1968).

I.4.1.3. Criblage des Anthraquinones

A l'extrait chloroformique de chacun des organes, on ajoute du KOH aqueux 10%. Après agitation, la présence d'anthraquinones est confirmée par un virage de la phase aqueuse au rouge. (Ribérreau, 1968).

I.4.1.4. Criblage des Tanins

100 mg d'extrait hydrométhanolique sont dissout dans 25 ml d'eau distillée chaude puis additionné de trois à quatre gouttes de NaCl 10%. La solution ainsi obtenue est filtrée. Le filtrat est ensuite reparti dans quatre tubes à ainsi, le 4^{ème} tube servant de témoin :

- ✓ **Tube n°1** : addition de quatre à cinq gouttes de gélatine à 1%.
- ✓ **Tube n°2** : addition de quatre à cinq gouttes de gélatine salée (gélatine 1% + NaCl 10%)
l'apparition d'une précipitation par la gélatine salée signifie la présence de Tanins.
- ✓ **Tube n°3** : addition de quatre à cinq gouttes de FeCl₃ en solution hydrométhanolique.

La couleur vire au bleu noirs en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchique (Rizk, 1982).

I.4.1.5. Criblage de saponosides

Pour identifier rapidement un orange à saponosides, il suffit de mettre en évidence leur pouvoir aphotogène en observant la mousse très fine qui se forme après une simple agitation énergique (pendant 15 secondes) de cette poudre en présence d'eau distillé et sa persistance au moins 10 min.

Préparation de l'extrait

On pèse 2 g du materiel végétal de chaque partie de la plante (feuilles, tiges, graines) et l'introduit dans des tubes avec 10 ml d'eau distillée puis en chauffe l'extrait au bain marie à 85°C pendant 30 min. après on agite vigoureusement chaque tube, en position horizontale pendant 15

secondes environ et on abandonne le tube dans son portoir, après 10 min au repos on compare les hauteurs des mousses. (*Vigor claire et al, 2010*).

I.4.1.6. Criblage des alcaloïdes

Préparation des réactifs

1- Dragendorff

0,85 g sous nitrate basique de bismuth + 8 g d'Iodure potassium + 100 ml d'Acide acétique glaciale + 70 ml d'eau distillée.

2- Mayer

1,35 g Chlorure mercurique + 5 g d'Iodure potassium + 30 ml d'eau distillée.

Agiter jusqu'à dissolution puis ajouter l'eau distillée jusqu'à 100 ml.

Pour faire les tests d'identification rapides des alcaloïdes on peut préparer un extrait selon le procédé suivant :

Dans un tube à essai de 16 ml, on introduit 200 mg de poudre végétale avec 10 ml d'Acide sulfurique on agite pendant 2 min et on filtre sur papier, après on partage le filtrat entre trois (03) tubes, et on ajoute respectivement au :

- ✓ **Tube n°1** : quelques gouttes de réactif Dragendorff.
- ✓ **Tube n°2** : quelques gouttes de réactif Mayer.
- ✓ **Tube n°3** : reste comme témoin.

La précipitation et la coloration de tube 1 en orange et le tube 2 en jaune confirme la présence des alcaloïdes. (*Vigor claire et al, 2010*).

I.4.1.7. Criblage des coumarines

Protocol: Test de détection: 2 g de matériel végétal en poudre mélangés à 10 ml de CHCl₃. Après un chauffage de quelques min et une filtration, les extraits chloroformiques sont soumis à une CCM, et le solvant étant le mélange toluène / AcEt (36:14). La visualisation du chromatogramme, après migration, se fait à 365 nm.

I.4.1.8. Criblage des Stéroïls et Triterpènes

Dépigmenter 100 mg d'extrait hydrométhanolique par addition de 10 ml de cyclohexane et agitation pendant 5 min. dissoudre le résidu dépigmenté dans 10 ml de Chloroforme.

Sécher la solution obtenue sur Na₂So₄ Anhydre, puis filtrer. Répartir le filtrat dans quatre tubes à essais et le 4^{ème} tube servira de témoin.

Tube n°1 : test de Salkowski : incliner le tube à 45°, ajouter 1 à 2 ml de H₂SO₄. Le changement de la coloration est noté immédiatement. Agiter le mélange légèrement et noter le changement graduel de coloration : une coloration rouge indique la présence des Stérois insaturés.

Tube n°2 : test de Libermann-Burschard : additionner trois gouttes d'Anhydride acétique puis agiter légèrement. Ajouter une goutte de Na₂SO₄ concentré. Le changement de la coloration est observé pendant un heure : une coloration bleu-vert indique la présence des Stéroïdes tandis que rouge-violet à rose dénote la présence de triterpène.

Tube n°3 : test de Badjet-Kedde : additionner quelques grains d'Acide picrique. L'apparition d'une coloration orange est due aux stéroïdes lactoniques. (*Bruneton, 1993*).

I.5. Fractionnement de l'extrait méthanolique l'espèce *Myrtus communis* L.

La quantité du matériel végétal obtenue (243g) a subi une macération dans un mélange hydroalcoolique (Méthanol / eau : 70 / 30 : V / V).

Cette macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant, pendant 24 heures. Après concentration sous vide, l'extrait méthanolique a subi des extractions successives de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le n-butanol. Chaque extraction est répétée trois fois. Le protocole d'extraction est résumé dans la figure 15.

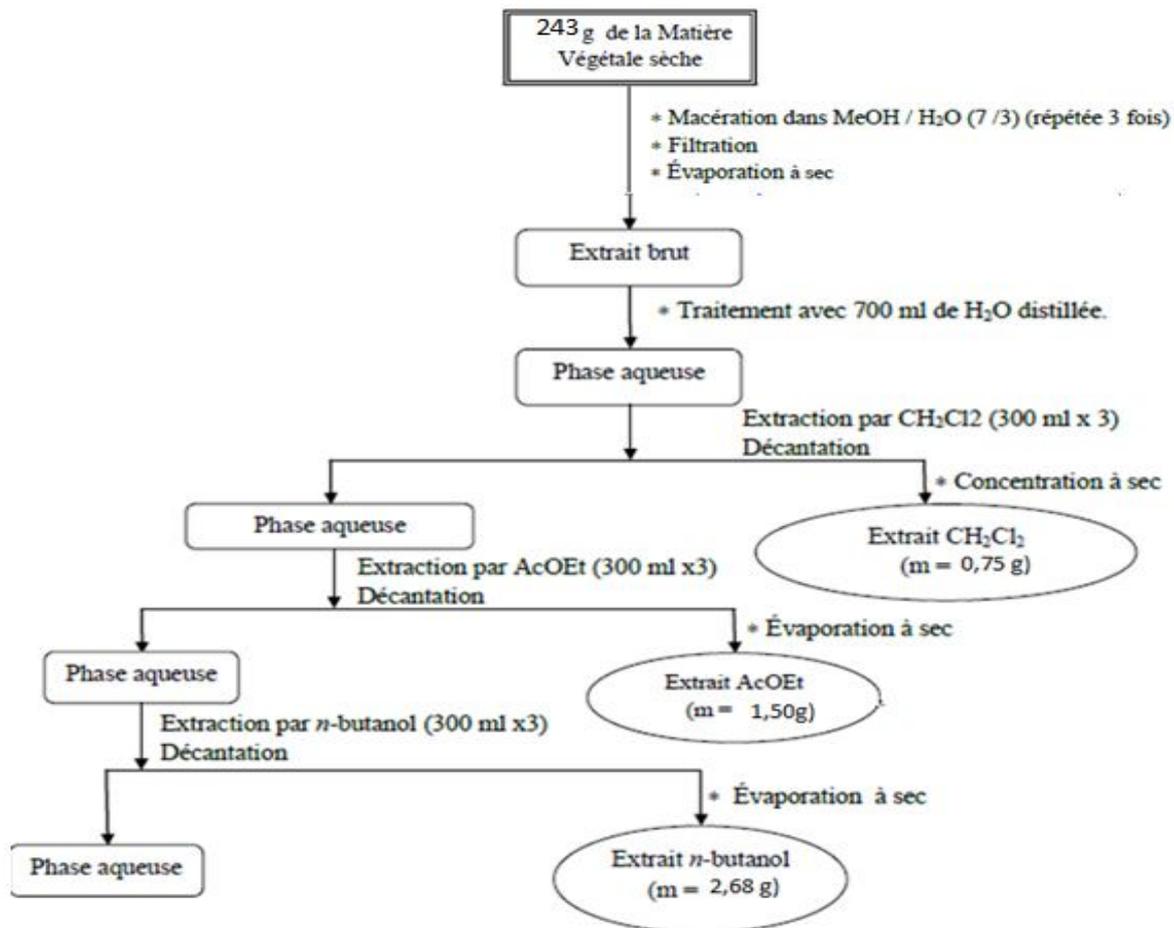


Figure 9 : Protocole d'extraction des métabolites secondaires de l'espèce *Myrtus communis* L.

I.5.1. Etude analytique par chromatographie sur couche mince (CCM) :

Protocole expérimentale

On a utilisé 3 systèmes solvants (S1, S2, S3) de différentes polarités pour mieux connaître le contenu flavonique de ces extraits chloroformique, acétate d'éthyle, n- butanol et méthanolique de l'espèce *M.communis* L.

Système 1: Chloroforme / Méthanol (9:1).

Système 2: Acétate d'éthyle / Méthanol / Eau (10: 1: 0,5).

Système 3: Hexane / Acétate d'éthyle (8: 2).

Visualisation sous UV à longueur d'onde: 254 nm et 366 nm.

On prépare la phase mobile et on met dans la cuve chromatographique et on ferme la cuve avec un couvercle pour la saturation par la vapeur des solvants.

Chaque constituant migre d'une certaine distance, caractéristique de la substance, que l'on appelle rapport frontal ou rétention frontale (Rf) :

$$R_f = \frac{\text{Distance de la tache}}{\text{Distance du front du solvant}}$$

Chaque tache correspond à un constituant et on l'identifie par comparaison du R_f avec un témoin.

I. 5.2. Séparation par chromatographie sur colonne

3g de l'extrait méthanolique ont été chromatographié sur une colonne de gel de silice, éluée avec le système : toluène / Acétate d'éthyle (36 :14) avec un gradient croissant d'acétate d'éthyle. Le suivi de la composition est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice. Les plaques sont visualisées sous lumière Wood (254 et 366 nm), puis révélées par l'acide acétique avec chauffage.

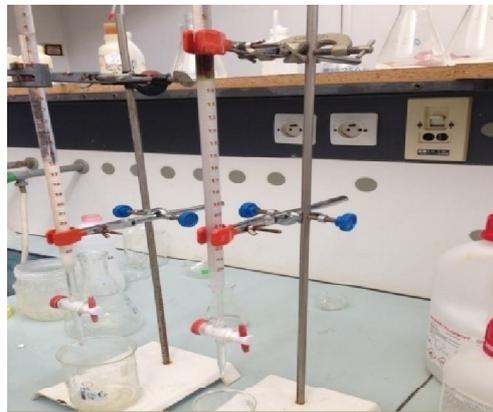


Photo 7 : Fixation de la colonne

II. Evaluation des activités biologiques

II.1. Activité antibactérienne

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antibactérien en milieu solide (MHA, Chapman..) dans des boîtes de pétrie, après un certain temps de contact entre le produit et les microorganismes cible. L'effet du produit antibactérien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. (Hellal, 2011).

L'évaluation de l'activité antibactérienne de notre extrait de l'huile essentielle et les extraits de la plante ont été faite sur 4 souches bactériennes.

Les microorganismes testés sont:

Escherichia coli : Gram négative.

Staphylococcus aureus : Gram positive.

Pseudomonas aeruginosa : Gram négative.

Klebsiella pneumoniae : Gram négative.

On a réalisé l'activité au niveau d'hôpital Universitaire de Constantine au service bactériologie.

Protocole expérimentale

Des disques de 5 mm de diamètre, préparés avec des papiers Whatman n°1 puis sont placés dans l'autoclave pendant 20 min à 120°C, et stockés à une température ambiante (le tube à essai est hermétiquement fermé), ces disques stériles sont prolongés dans l'extrait hydrométhanolique.

Dans des boites de pétri stériles le milieu Muller Hinton est coulé puis laissé 15 min pour se solidifier. Les bactéries sont déposées et ensemencées à l'aide d'un écouvillon stérile, l'ensemencement s'effectue de telle sorte pour assurer une distribution homogène des bactéries.

Les disques remplis d'extrait sont déposés à la surface de la gelose contaminée et l'antibiogramme est fixé au milieu de la boite de pétrie. L'activité antimicrobienne se manifeste par l'apparition d'une zone d'inhibition de la croissance microbienne produite autour des disques après 24 heures d'incubation à 37°C (Treki, 2002).

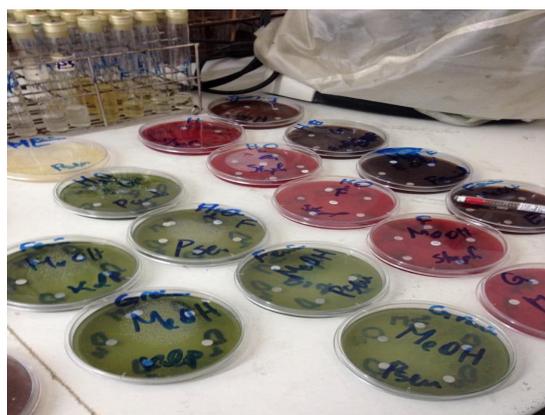


Photo 8 : Le teste de l'activité antibactérienne

II.2. Activité antioxydante

Les antioxydants sont définis comme étant des substances qui peuvent retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques (McAnalley, 2003), ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs (Vansant,G. 2004).

Plusieurs substances pouvant agir en tant qu'antioxydants in vivo ont été proposées, elles incluent le bêta-carotène, l'albumine, l'acide urique, les œstrogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide ascorbique, les composés phénoliques, la vitamine E, etc. ...

Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres (**Hampson, 1999**).

II.2.1.Méthodes de détermination de l'activité antioxydante

Il existe une grande diversité de méthodes physico-chimiques pour évaluer l'activité antioxydante des extraits naturels. Plusieurs méthodes s'intéressent à l'analyse des étapes distinctes du processus d'oxydation comme par exemple la mesure :

- a) Affaiblissement du substrat, et /ou la consommation de l'oxygène au cours de l'oxydation.
- b) La formation des produits d'oxydation ;
- c) La capacité à piéger les Radicaux libres en différentes phases.

Citons quelques méthodes connues :

- ✓ Méthode TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity)
- ✓ Méthode de SR - TBA (Substances Reactive Acid Thiobarbuturic)
- ✓ Méthode par résonance paramagnétique électronique (RPE)
- ✓ Test DPPH (1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)
- ✓ Test de Crocine
- ✓ Détermination de l'indice de peroxyde (IP)
- ✓ Détermination des diènes conjugués
- ✓ Test DPPH (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl)

Le potentiel antiradicalaire d'une substance peut être évalué à l'aide d'une méthode colorimétrique en utilisant des radicaux de substitution tels que le radical 1,1-diphényl-2- picrylhydrazyl appelé DPPH.

En effet, à température ambiante et en solution, le radical DPPH • présente une coloration violette intense. Son passage à la forme non radicalaire, après saturation de ses couches électroniques s'accompagne d'une disparition de la coloration violette (figure 18).



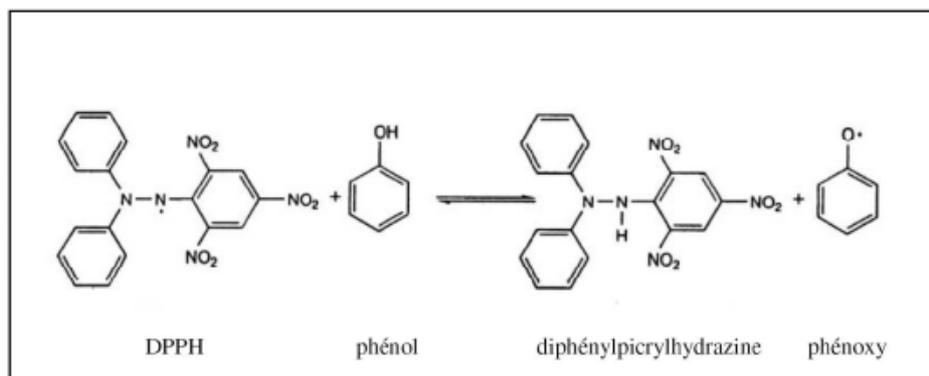


Figure 10 : Réduction du DPPH par le phénol (Hilali, 2006).

Par cette méthode, on considère que l'activité antioxydante n'est autre que la capacité des antioxydants d'agir comme piègeurs des radicaux libres. Ils agissent en transférant un atome d'hydrogène ce qui conduit à la réduction du DPPH au cours de la réaction et à un changement de coloration dans la solution initiale qui devient jaune pâle. L'avancement de la réaction est suivi par spectrophotométrie à 517 nm (Linssen, 2002).

II.2.2. Evaluation de l'activité antiradicalaire par le test de DPPH

Protocole expérimental

a. Préparation de la solution DPPH

0.049g de DPPH ($C_{18}H_{12}N_5O_6$; Mr : 394.33), est solubilisé dans 122.5ml de MeOH absolu pour avoir la concentration de 0.4g/l.

b. Préparation des solutions mères de concentration 5mg/ml

On mélange 0.05g de chaque phase (Acétate d'éthyle et le n-Butanol), avec 10 ml de MeOH absolu dans 03 tubes à essais (Solutions mères).

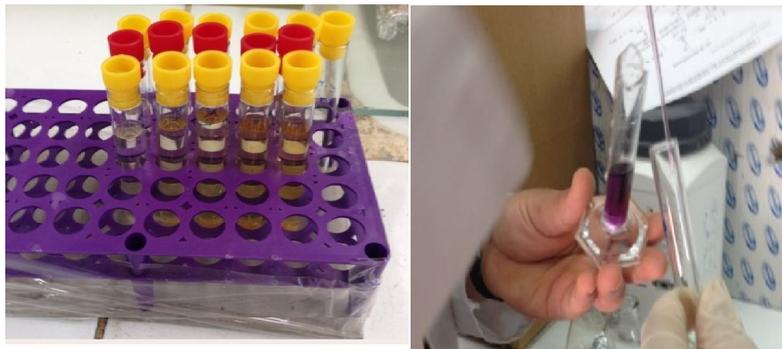
c. Préparation des dilutions des extraits

L'expérience effectuée sur 5 concentrations différentes d'échantillon de l'ordre décroissant, dilués dans le méthanol Tableau 4 :

Tableau 4 : Les différentes concentrations des extraits

Concentration finale (mg/ml)	V de SM (ml)	V de MeOH (ml)
3	3	2
2	2	3
1	1	4
0.5	0.5	4.5
0.25	0.25	4.75

- ✓ On mélange 03ml de la solution méthanolique du DPPH préparé avec 30 μ l de chaque extrait.
- ✓ Laisser a l'abri de la lumière et a température ambiante pendant 30 minutes.
- ✓ On mesure l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre à 517nm.
- ✓ Finalement on mesure l'absorbance de chaque concentration par rapport à un blanc constitué uniquement par le méthanol pur (30 μ l) et le DPPH (3ml).
- ✓ On trace la courbe de la cinétique de disparition du DPPH en présence de l'échantillon à tester en fonction du temps pour déterminer le temps de stabilisation de la réaction et pour effectuer la



l'ecture de l'absorbance du produit.

Photo 10 : Le test de l'activité antioxydant par DPPH

II.4. Dosage des composés phénoliques totaux :

A partir de la solution mère (1 mg/ml) des extraits méthanoliques des feuilles/Tiges et des fruits de plante *Myrtus communis* L. Nous avons préparé deux répétitions d'une même concentration (125 μ l) avec la méthode suivante :

Une prise de 125 μ L de l'extrait dilué (SM) est mélangée avec 500 μ L d'eau distillée et 125 μ L de réactif de Folin-Ciocalteu. Après une agitation vigoureuse du mélange suivie d'un repos de 3 minutes, une prise de 1250 μ L de Na_2CO_3 de 2 à 7% est additionnée. Enfin le mélange obtenu est ajusté par de l'eau distillée à 3 ml.

Après un repos de 90 minutes à l'obscurité, la lecture de l'absorbance est effectuée à une longueur d'onde de 760 nm (**Heilerová et al, 2003**).

La gamme étalon est préparée avec de l'acide gallique a des concentrations variables de 50, 100, 200, 300, 400, 500 mg.l^{-1} . Les teneurs en polyphénols sont exprimées en mg d'équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg/EAG.g^{-1} MS), (**Singleton et al, 1999**).



Photo 11: Spéctrophotomètre UV utilisé pour la lecture de l'absorbance

II.5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

Notre étude consiste à démontrer l'effet cicatrisant de l'extrait méthanolique Feuilles/Tiges et huile essentielle des feuilles de la plante *Myrtus communis* L. *in vivo* sur des rats.

II.5.1. Animaux

II.5.1.1. Animaux et conditions d'hébergement

L'étude a été déroulée sur des rats femelles adultes (de poids entre 140 mg et 200 mg), de souche *Wistar albinos*, animaux ont été entretenus dans des cages individuelles en polypropylène munies d'une porte-étiquette où est mentionné le nom du lot, pendant une période de 02 semaines avant l'essai afin de s'adapter à leur nouvel entourage et à leur nouvel environnement. Ils sont libre d'accès à la nourriture et à l'eau. La température de l'animalerie varie entre 18-25°C. L'éclairage et la ventilation étaient ceux du milieu ambiant. La litière utilisée est la sciure, elle est renouvelée chaque jour ou chaque deux jour pour tous les groupes de rats. On répartit les rats sur «4 lots de un rat chacun (Tableau 5).

Tableau 5 : Quatre (04) lots d'animaux répartis comme suit :

N° de lots	Traitement
Lot 1	Les quatre plaies de Rat non traités (NT)
Lot 2	Les quatre plaies de Rat traités par la vaseline (V)
Lot 3	Les quatre plaies de Rat traités par l'extrait méthanolique des feuilles et tiges A)
Lot 4	Les quatre plaies de Rat traités par l'huile essentielle B (B)

Les rats reçoivent le régime standard utilisé pour l'élevage. Ce régime est composé de Mais, Son, Remoulage, Soja, CMV (complément minéral vitaminé). Et provient de l'usine LA RATION, Bouzaréah, Alger.

II.5.2. provocation des plaies

a. Anesthésie les rats

Rats animale stressé

a) tranquillisation : L'injection en intramusculaire de Acépromazine 3 mg/Kg

b) anesthésie fixe : L'anesthésie en intra péritonéale

Kétamine → 20 à 30 mg/Kg Ip → DL50 : 60 mg/Kg IV.



A-tranquillisation

B- anesthésie fixe

Photo 12: Les étapes d'anesthésié

b. Provocation des plaies

Une fois que les rats sont correctement anesthésiés, on rase le haut du dos manuellement à l'aide d'un rasoir pour assurer une blessure facile et bien clair que l'on peut diagnostiquer tout au long de l'essai.



Photo 13: Rasage des rats

Après avoir nettoyée la partie rasée avec de l'alcool chirurgical, sur lequel on va tracer Quatre cercles pour chaque rat au niveau des omoplates afin d'obtenir des plaies homogènes.

On provoque une perte de substance pour les 4 groupes en coupant le pourtour des cercles avec des ciseaux stériles. Après provocation des plaies, ce jour est noté J_0 et le traitement à base d'huile

essentielle d'B sera quotidien pendant tout la durée de l'expérimentation. La surface des plaies est représentée sur une feuille transparente pour chaque groupe le J₀, J₃, J₆, J₉, J₁₂ et J₁₅ afin de pouvoir suivre l'évolution des plaies et les comparée par rapport au groupes traité et non traité. Pour mesurer les surfaces des plaies on a recours au logiciel AUTOCAD.



Photo 14: Les différentes étapes de plaies et traitements

La partie enlevée de la peau est coupée puis conservée dans des tubes à essais contenant du formol pour réaliser une analyse histologique ultérieure.

Après traitement avec l'HE "B" et extrait des feuilles tiges "A" les rats doivent être déposés près d'un chauffage électrique car l'anesthésie provoque une baisse de température.

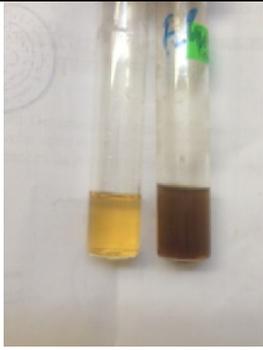
Chapitre II :

Résultats et discussion

I. Métabolites primaires et secondaires:**1.1.Métabolites primaires****I.1.1. Mise en évidence des glucides****Les composés réducteurs :**

L'absence d'une couleur rouge brique avec la liqueur de Fehling dans les trois parties de la plante étudié de *Myrtus communis* L.

Tableau 6: Résultats de mise en évidence des composés réducteurs.

Espèce	Extrait et réactif	Organes	Réactions	Photographié des résultats
<i>Myrtus communis</i> L.	Extrait aqueux + Liquor du Fehling	Feuilles	–	
		Tiges	–	
		Fruits	–	

Réaction fortement positive: +++

Réaction moyennement positive: ++

Réaction faiblement positive: +

Réaction négative: -

I.1.2. Mise en évidence de l'amidon

L'absence d'amidon dans les trois parties de l'espèce étudiée de *Myrtus communis* L. **Tableau 7: Résultats de mise en évidence d'amidon.**

Espèce	Extrait et réactif	Organes	Réactions	Photographié des résultats
<i>Myrtus communis</i> L.	Extrait aqueux + Lugol	Feuilles	-	
		Tiges	-	
		Fruits	-	

Réaction fortement positive: +++

Réaction moyennement positive: ++

Réaction faiblement positive: +

Réaction négative: -

I.1.3. Mise en évidence des lipides

L'apparition de gouttelettes rouge et violet, dans les extraits méthanoliques, chloroformiques et étheriques, de l'espèce étudiée *Myrtus communis* L. indiquent la présence des lipides. (Tableau 8)

Tableau 8: Résultats de mise en évidence des lipides

Espèce	Extrait et réactif	Solvant	Réactions	Photographié des résultats
<i>Myrtus communis</i> L.	Extrait Des graines + Black Soudan Ou Soudan III (Rouge)	Methanol	–	
		Chloroforme	–	
		Ether de pétrole	–	

Réaction fortement positive: +++

Réaction moyennement positive : ++

Réaction faiblement positive: +

Réaction négative : -

I.1.4. Détection des acides aminés par CCM

L'étude analytique sur CCM, des acides aminés de l'espèce *Myrtus communis* L. Les AA présentes dans les grains de la plante *Myrtus communis* L. sont les suivants: Alanine, Proline, Cysteine et Glycine (Tableau 9).

Tableau 9: Résultats de criblage des acides aminés

Espèce	Extrait d'organe	Try	Ala	Ile	Asp	Arg	Met	Pro	Phe	Cys	Gly
<i>Myrtus communis</i> L.	L'extrait aqueux	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+

Réaction positive: + (présence)

Réaction négative : - (absence)

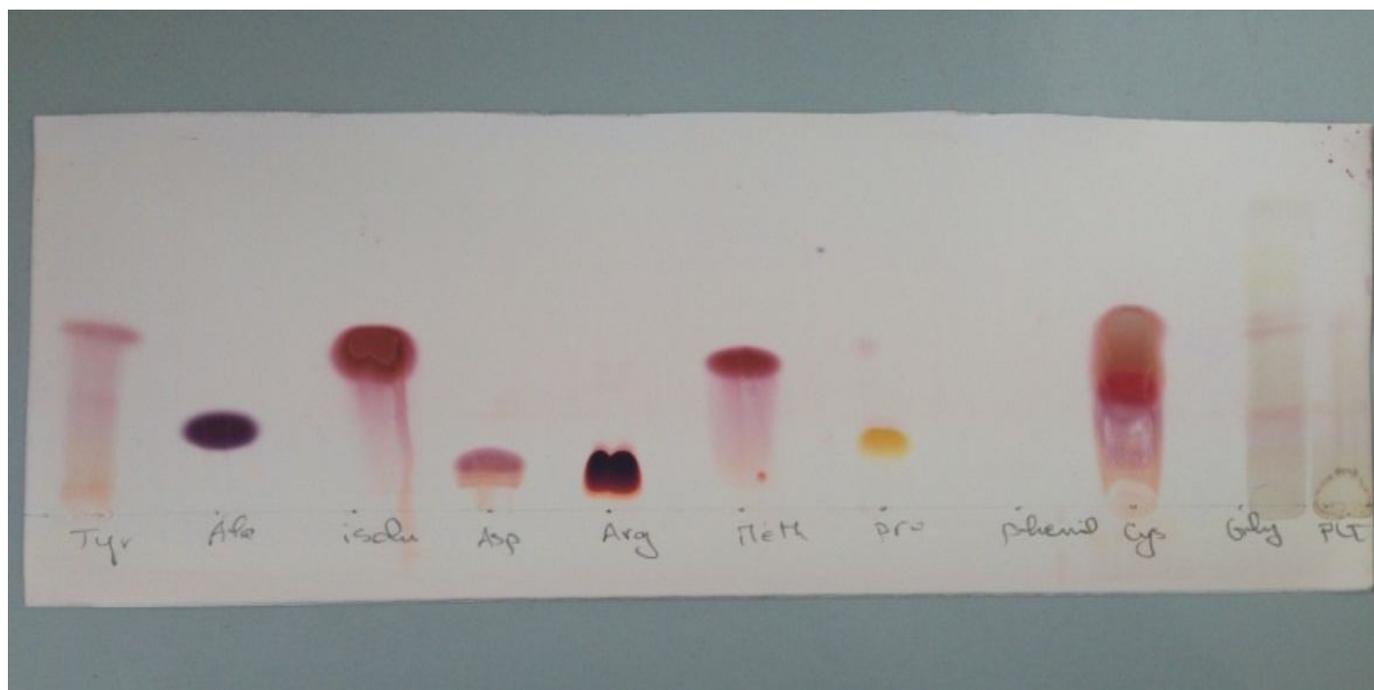


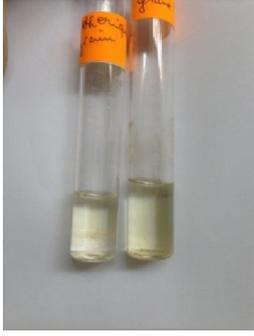
Photo 13: Résultat des acides aminés présents dans l'extrait aqueux de *Myrtus communis* L.

I.2. Métabolites secondaires

I.2. 1. Criblage des Flavonoïdes

La mise en évidence des flavonoïdes dans l'extrait méthanolique de trois parties de la plante est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge intense en contact avec les tournures de Mg.

Tableau 10: Résultats de criblage des flavonoïdes.

Espèce	Tests	Organes	Réactions	Photographié des résultats
<i>Myrtus communis</i> L.	Test de Wilstater: Extrait m étherique + HCl Cc.et Mg	Feuilles	+++	
		Tiges	++	
		Fruits	+	
	Test de Wilstater modifié: Extrait chloroformique	Feuilles	++	

	+ Alcool isoamylique	Tiges	+++	
		Fruits	+	
	Test de Bate-Smih: Extrait methanolique + HCl Cc. Baine marie 30 min	Feuilles	+	
		Tiges	+++	
		Fruits	++	

Réaction fortement positive: +++

Réaction moyennement positive: ++

Réaction faiblement positive: +

Réaction négative: -

I.2.2. Criblage des Quinones

Le criblage phytochimique des Quinones a montré que l'espèce étudiée *Myrtus communis* L. ne contient pas des quinones (Tableau 12)

Tableau 12: Résultats de criblage des Quinones

Espèce	Extrait et réactif	Organes	Réactions	Photographié des résultats
<i>Myrtus communis</i> L.	Extrait etherique + NaOH	Feuilles	–	
		Tiges	–	
		Fruits	–	

Réaction fortement positive: +++

Réaction moyennement positive: ++

Réaction faiblement positive: +

Réaction négative: -

I.2 .3.Criblage des Anthraquinones

Le réactif KOH utilisé pour la détection des Anthraquinones a démontré que toutes les organes de la plante *Myrtus communis* L. ne contient pas des anthraquinones. (Tableau 11)

Tableau 11: Résultats de criblage des Anthraquinones

Espèce	Extrait et réactif	Organes	Réactions	Photographié des résultats
<i>Myrtus communis</i> L.	Extrait méthanolique et eau distillée + KOH	Feuilles	–	
		Tiges	–	
		Fruits	–	

Réaction fortement positive : +++

Réaction moyennement positive : ++

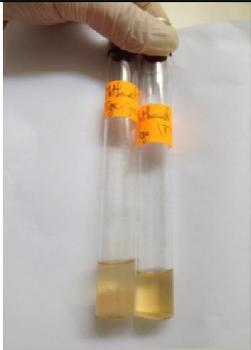
Réaction faiblement positive : +

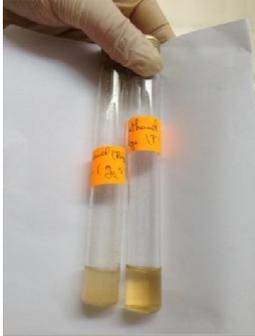
Réaction négative : -

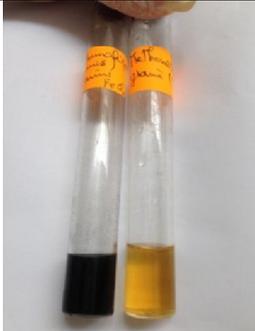
I.2 .4. Criblage des Tanins

Les tanins sont présents avec une intensité importante dans l'extrait méthanoliques. Sa présence est confirmée par une réaction positive avec la solution de chlorure ferrique en donnant une coloration bleu verdâtre dans les feuilles, les tiges et les fruits, il s'agit donc des tanins catéchiques.

Tableau 13: Résultats de criblage des Tanins

Espèce	Extrait et réactif	Organes	Réactions	Photographié des résultats
<i>Myrtus communis</i> L.	Extrait méthanolique + gélatine à 1%	Feuilles	+++	
		Tiges	++	
		Fruits	+	

	Extrait méthanolique + gélatine salé (gélatine à 1% +NaCl à 10%)	Feuilles	+++	
		Tiges	++	
		Fruits	+	
	Extrait méthanolique + Fe Cl ₃	Feuilles	+++	
		Tiges	++	

		Fruits	+	
--	--	--------	---	---

Réaction fortement positive: +++

Réaction moyennement positive: ++

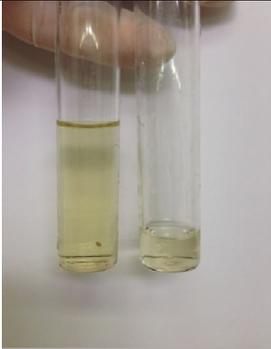
Réaction faiblement positive: +

Réaction négative: -

I.2 .5. Criblage des Anthocyanes

Les tests phytochimiques réalisés montre la présence des anthocyanes mais uniquement dans les fruits de *Myrtus communis* L. L'apparition d'une couleur rouge qui vire au bleu-violacé par l'addition d'ammoniac a confirmé leur présence.

Tableau 14: Résultats de criblage des Anthocyanes

Espèce	Extrait et réactif	Organes	Réactions	Photographié des résultats
<i>Myrtus communis</i> L.	Extrait methanolique + HCl Cc. (Incubation 30 min)	Feuilles	-	
		Tiges	-	

		Fruits	+++	
--	--	--------	-----	---

Réaction fortement positive: +++

Réaction moyennement positive: ++

Réaction faiblement positive: +

Réaction négative: -

I.2.6. Criblage des saponosides :

On remarque la présence des saponosides dans les tiges et les fruits mais avec une quantité faiblement importante

Tableau 19 : Résultats de criblage des saponosides

Espèce	Photographie du résultat		
	Fruits	Tiges	Feuilles
<i>Myrtus communis</i> L.			
Résultats des réactions	++	+	-

Réaction fortement positive: +++

Réaction moyennement positive: ++

Réaction faiblement positive: +

Réaction négative: -

I.2.7. Criblage des Alcaloïdes

L'absence totale des alcaloïdes dans les trois parties de la plante *Myrtus communis* L.

Tableau 15: Résultats de criblage des Alcaloïdes.

Espèce	Extrait et réactif	Organes	Réactions	Photographié des résultats
<i>Myrtus communis</i> L .	Extrait méthanolique + Mayer	Feuilles	–	
		Tiges	–	
		Fruits	–	

Réaction fortement positive: +++

Réaction moyennement positive: ++

Réaction faiblement positive: +

Réaction négative: -

I.2 .8. Criblage des coumarines:

L'apparition d'une fluorescence sous une lumière ultra-violet indique la présence des coumarines uniquement dans les tiges mais à une faible intensité.

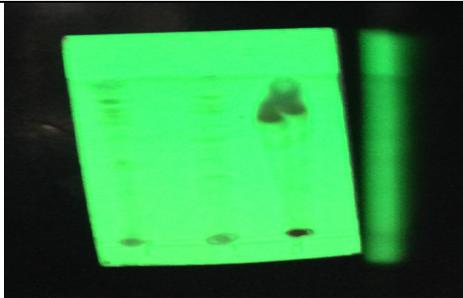
Tableau 16: Résultats de criblage des coumarines

Espèce	Organes	Résultats
<i>Myrtus communis</i> L.	Feuilles	-
	Tiges	+
	Fruits	-

Résultat positive: + (présence)

Résultat négative: - (absence)

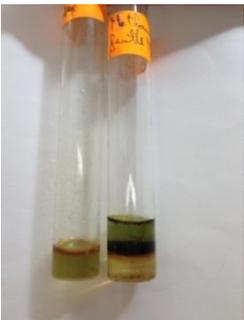
Tableau 17: Résultats des plaques de CCM prise après la révélation à lumière UV (254 nm-366nm) pour des extraits de l'espèce *Myrtus communis* L.

Espèce	Photographie du résultat	
	Observation par UV 254	Observation par UV 366
<i>Myrtus communis</i> L.		

I.2 .9. Criblage des stérols et triterpènes

Le test positif des stérols et triterpènes nous a montré leur présence dans chaque partie de la plante avec une apparition d'un anneau rouge brun et une couche surnageant de couleur verte.

Tableau 18: Résultats de criblage des triterpènes et stéroïdes

Espèce	Tests	Organes	Réactions	Photographié des résultats
<i>Myrtus communis</i> L.	Test de Salkawski: Extrait chloroformique + H ₂ SO ₄ (incliné à 45°)	Feuilles	+++	
		Tiges	+++	
		Fruits	+++	
	Test de Libermann-Burschard: Extrait chloroformique +	Feuilles	+++	

	H_2SO_4 Cc.(pendant 1 h)	Tiges	+++	
		Fruits	+++	
	Extrait chloroformique + Acide pécrique	Feuilles	+++	
		Tiges	+++	
		Fruits	+++	

Réaction fortement positive: +++

Réaction moyennement positive: ++

Réaction faiblement positive: +

Réaction négative: -

Discussion

Les travaux antérieurs sur les tests phytochimiques de *Myrtus communis* L. ont démontré la présence des flavonoïdes, des tanins et des coumarines (**Diaz et al, 1987 ; Hinou et al, 1988 ; Hyder et al, 2004**) ce qui est comparable à nos résultats, à l'exception des coumarines qui sont révélées faible dans nos extraits des trois parties de la plante.

De même les tests phytochimiques réalisés par (**Baytop, et al, 1999**) ont montré également que les feuilles de *Myrtus communis* L. contiennent des tanins, des flavonoïdes et des huiles volatiles. Selon (**Martiin Lopez et al, 1999**), les fruits de myrte se composent dans la plupart du temps de composés volatiles, de tanins, de sucres, de flavonoïdes, et d'acides organiques dont les anthocyanes et les flavonols représentent les composés les plus important (**Alamanni et al, 2004; Franco et al, 2002; Montoro et al, 2006a, Montoro et al, 2006b**).

I.2 .10. Criblage des sels minéraux:

La plante étudiée *Myrtus communis* L. constitué de sel minéraux qui sont:

Potassium, Chlorure, Calcium Nitrate, Cuivre, Sulfate sauf le Thioxyde de potassium il est présenté à une faible quantité (Tableau 20).

Tableau 20: Résultats du test chimique des sels minéraux

Espèce	Photographie du résultat					
	Cuivres	Thioxyde de potassium	Sulfates	Potassium	Calcium	Chlorures
<i>Myrtus communis</i> L.						

Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques réalisés sur le matériel végétal broyé de différentes parties de *Myrtus communis* L. mentionnés dans le tableau 21, montrent la présence des flavonoïdes, des tanins, des stérols et triterpènes dans les fruits, les tiges, et les feuilles ainsi que la présence des anthocyanes que dans les fruits avec des intensités variables.

I.3.Obtention des extraits secs

Les extractions des différents composés phénoliques les plus abondant dans notre plante nous permis de déterminé la quantité de chaque extrait notamment les extraits méthanoliques, acétate d'éthyle et 1-butanol par rapport à 40 g de matériel végétal sec et broyé. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 22:

Tableau 22: Les extraits obtenus à partir des deux parties de la plante.

Les extraits	Les solvants utilisés	Quantité (g)	
		Feuilles	Fruits
Extrait brut	Méthanol	17,03	5,83
Flavonoïdes	Acétate d'éthyle	1,50	-
	1-butanol	2,68	-

Les résultats obtenus pour les extraits méthanoliques, montrent que la quantité la plus élevé est celui de l'extrait des feuilles de *Myrtus communis* L. (17,03g) qu'a des fruits 5,83g.

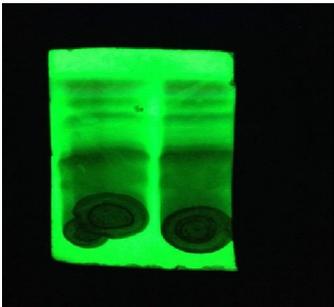
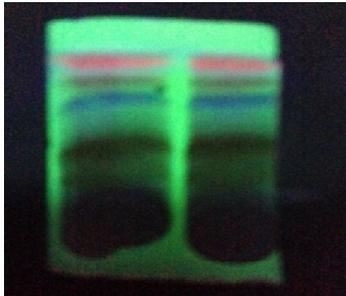
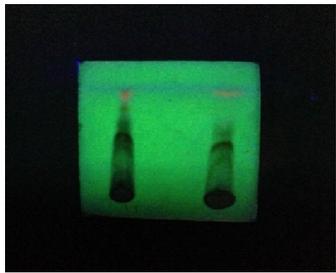
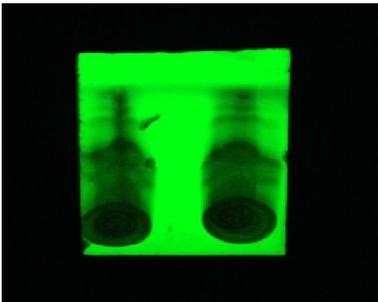
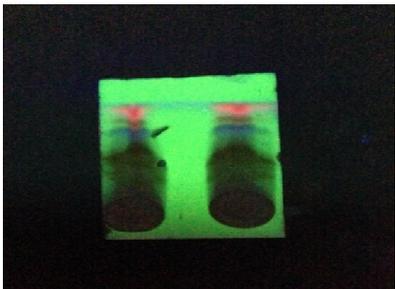
Cependant nous avons remarqué que la quantité en extrait sec méthanolique des feuilles est celui la plus élevé par rapport aux autres extraits (Acétate d'éthyle à 1,50g et 1-butanol à 2,68 g).

I.4.Les analyses chromatographique

I. 4.1.Chromathographie sur couche mince :

CCM de l'espèce *Myrtus communis* L.

Tableau 23: Résultats des plaques de CCM prise après la révélation à lumière UV (254 nm-366nm) pour des extraits de l'espèce *Myrtus communis* L.

Système solvant	Photographie des résultats	
	Observation par UV 254	Observation par UV 366
<p>S₁ :</p> <p>Acétate /MeOH/eau</p> <p>10/1/0,5</p>		
<p>S₃ :</p> <p>Chloroforme/ MeOH</p> <p>9/1</p>		
<p>S₅ :</p> <p>BuOH/AcOH/H₂O</p> <p>4/1/5</p>		

L'étude analytique des extraits méthanolique par CCM de l'espèce *Myrtus communis* L .on a utilisé les systèmes suivants (Tableau 23) visualisée avec la lompeUV : 254 et 366 nm, montre que tous les organes de *Myrtus communis* L. sont riche en métabolites secondaire surtout flavonoïdes et terpènes ce qui confirme les résultats obtenu par les criblages précédents.

La CCM des différents extraits butanolique, acétate d'éthyle et chloroformique de l'espèce *Myrtus communis* L.

I.4.2. Chromatographie sur colonne :

Chromatographie sur colonne de l'espèce *Myrtus communis* L.

Tableau 26: Résultats des plaques de CCM prise après la révélation à lumière UV (254 nm-366nm) pour des extraits de l'espèce *Myrtus communis* L.

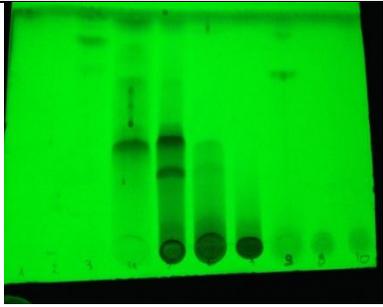
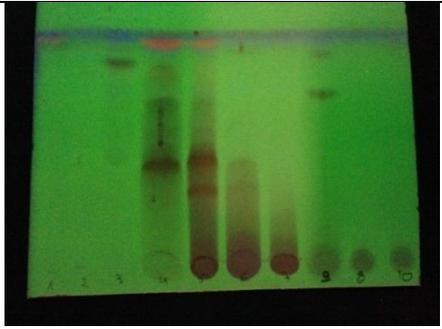
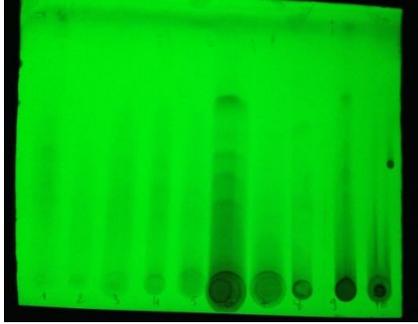
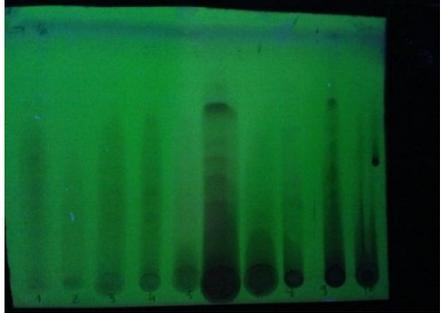
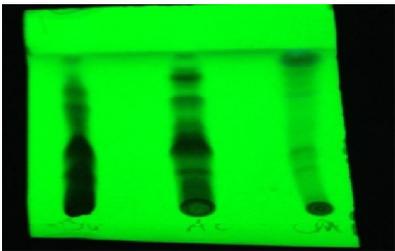
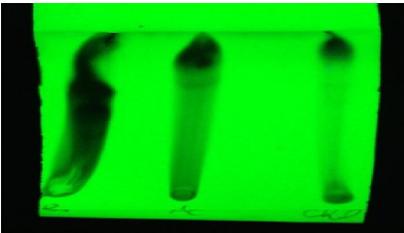
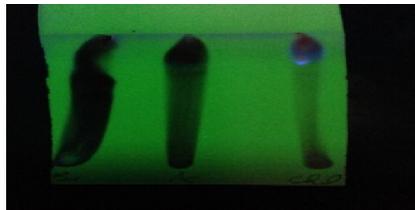
		Photographie du résultat	
Espèce	Extrait des molécules	Observation par UV254	Observation par UV366
<i>Myrtus communis</i> L.	Feuilles		
	Fruits		

Tableau 24: CCM des extraits pérès par décantation de l'espece *Myrtus communis* L.

		Photographie du résultat	
Espèce	Extraits	Observation par UV 254	Observation par UV 366
<i>Myrtus communis</i> L.			
			

L'étude analytique des extraits butanolique, chloroformique et acétate d'éthyle par CCM de l'espece *Myrtus communis* L. on a utilisé les systemes suivants (Tableau 23) visualisée avec lompe UV: 254 et 366 nm, montre que presque toutes les organes de *Myrtus communis* L. sont très riches en métabolites secondaire surtout les flavonoïdes et terpènes ce qui confirme les résultats obtenue par les criblages.

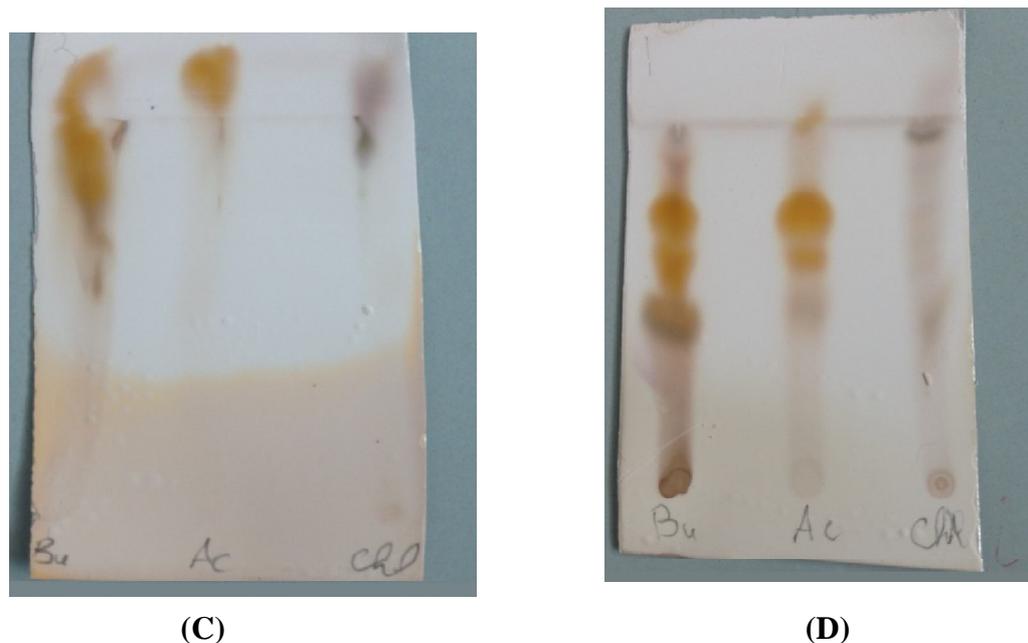


Figure 25: Chromatogramme des extraits BuOH, AcOEt, CHCl₃ de *M.communis* L.

I.5.Essai d'identification des composés par CCM :

Nous avons pu mettre en évidence quelques composés par le biais des témoins utilisés. Pour l'essai d'identification des composés par CCM.

Tableau 25: Composés identifiés par CCM

Parties étudiées	Phase acétate d'éthyle		Phase 1-butanol	
	Composé	Rf	Composé	Rf
Feuilles/Tiges	Acide gallique	0,90	Catéchine	0,87
	Catéchine	0,87	Acide gallique	0,90

Les analyses chromatographiques, spectrophotométriques et spectrofluométriques réalisées par (Diaz et al 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 ellagique et gallique, la quercétine et la patulétine.

En comparant nos résultats avec ces travaux, quelques composés comme l'acide gallique, la catéchine et la quercétine sont également identifiés dans notre plante

III. Dosage des polyphénols :

Le dosage des phénols totaux a été effectué par la méthode spectrophotométrique adaptée de **Singleton et Ross (1965)** avec le réactif de Folin-Ciocalteu.

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg GAE/g), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique.

La courbe d'étalonnage de l'acide gallique est représentée dans la figure 27 :

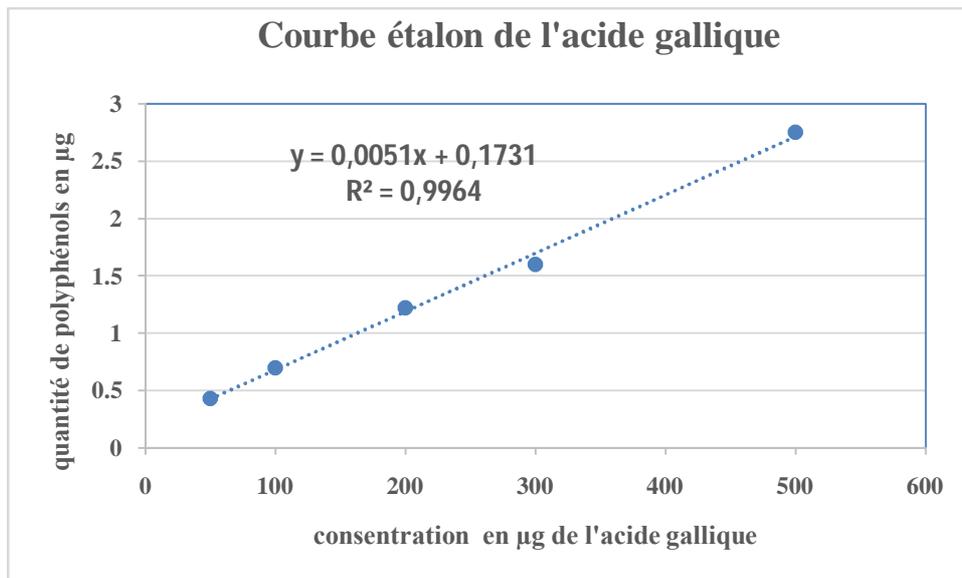


Figure 11 : La courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

La valeur de la densité optique (DO) mesurée de chaque échantillon est mentionnée dans le tableau :

Tableau 27: La DO des EMF et EMG.

		EMF	EMG
DO (nm)	1 ^{ère} expérience	0,746	0,710
	2 ^{ème} expérience	0,619	0,777

Le pourcentage des composés polyphénoliques indiqué dans le tableau 27 est calculé selon la relation suivante :

Y= 0.0051X+0.1731 **Tableau 28 :** Le taux des polyphénols totaux calculés des feuilles et graines de *M. communis* L.

	mp (mg)	DOext (nm)	Quantité de polyphenols en (mg/g d'extrait)
EMF	1	0,746	112,33
	1	0,619	87,43
EMFr	1	0,710	105,27
	1	0,777	118,41

La figure 28 montre les résultats de la quantité des polyphénols, ces quantités sont exprimées en mg d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait.

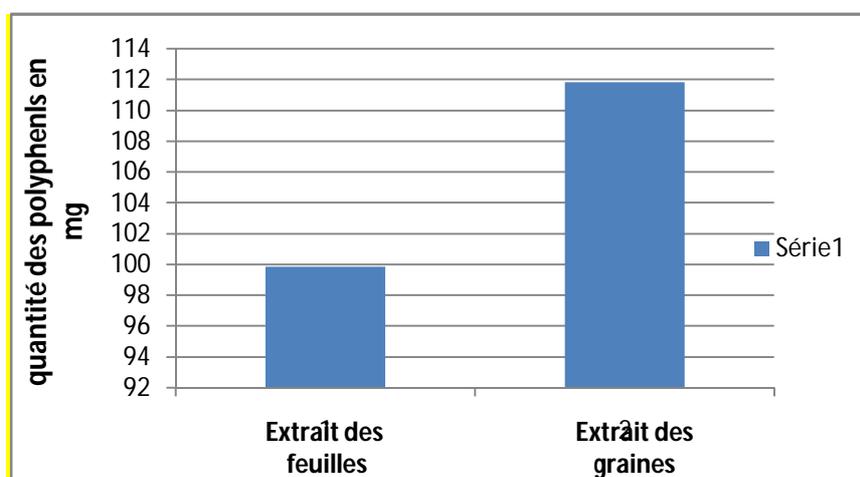


Figure 12 : Teneur en polyphénols totaux(en mg/g d'extrait)

Ces résultats indiquent que la richesse de la plante en polyphénols est importante.

On remarque que la teneur en polyphénol la plus élevée a été enregistrée avec les deux extraits EMF et EMFr. Mais elle est supérieure dans l'extrait EMFr ce qui est en accord avec les résultats de l'activité antioxydante où l'extrait EMF a montré une meilleure activité antioxydante.

Les taux de polyphénols totaux existant dans les extraits méthanoliques de feuilles et fruits calculés sont présents dans le tableau 29 :

Tableau 29 : Les taux de polyphénols totaux existant dans les EMF et EMG

Echantillon	Taux de polyphénols
EMF	99,88 ± 17,60
EMFr	111,84 ± 9,29

Il apparaît que les deux extraits sont riches en polyphénols totaux

III. Evaluation des activités biologique

III.1. Activité antibactérienne

Tableau 30 : Taux d'inhibition de l'EMF et HE

	Antibiogramme	SM	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄
<i>E.coli</i>	-	7 mm	8 mm	7 mm	14 mm	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	25 mm	-	-	10 mm	10 mm	6 mm

1

Les tests préliminaires de l'activité antibactériennes test par la méthode de la diffusion sur disque et puits en montré que les extrait méthanolique des feuilles en un effet antibactérienne très puissants sur la croissance d'E.Coli et S.aureus.

III.2. Activité antioxydante

Selon les mesures effectuées sur les deux extraits butanolique et acétate d'éthyle de la plante *Myrtus communis* L. On calcule le pourcentage d'inhibition de DPPH selon la formule indiquée dans la partie précédente.

Les pourcentages d'inhibition sont présentés dans le tableau 30.

Tableau 31 : Taux d'inhibition des extraits BuOH et AcOEt du DPPH

Concentration (µg/ml)	1	10	50	100	200	500
% d'inhibition EBMC	35,58	50,72	65,24	92,63	94,29	94,91
% d'inhibition EAMC	0,72	46,57	71,36	92,42	94,91	95,33

Extrait butanolique

Détermination de l'IC₅₀

La détermination de l'IC 50 à partir du graphe (Figure 26) à la concentration correspondante à 50% d'inhibition, ou bien, on peut la calculer à partir de l'équation du graphe suivant :

$y = 3699,9x - 4,6864$ Alors pour $y = 50\%$, l'IC50 sera comme suit : $50 = 3699,9x - 4,6864$

Donc : $x = (50 + 4,6864) / 3699,9 = 0,01478051\text{mg/ml}$ Donc : IC 50 = $14,78051\mu\text{g/ml}$.

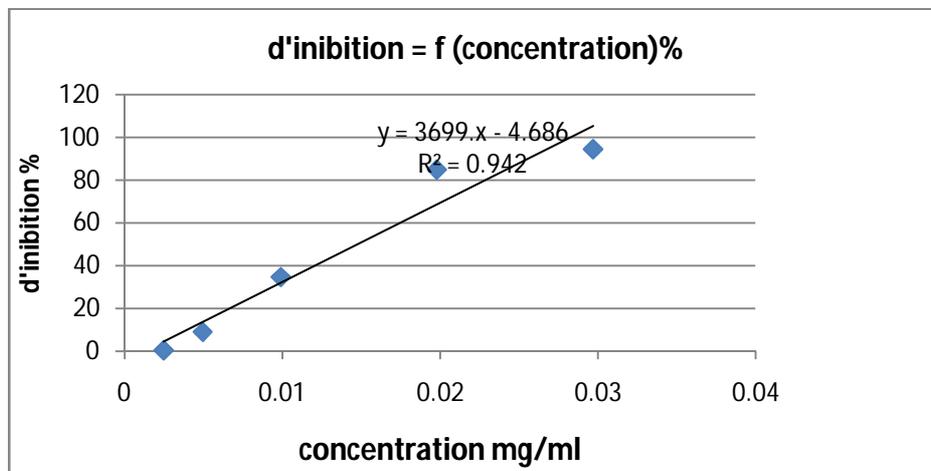


Figure 13 : Evaluation de l'activité antioxydante de l'extrait butanolique.

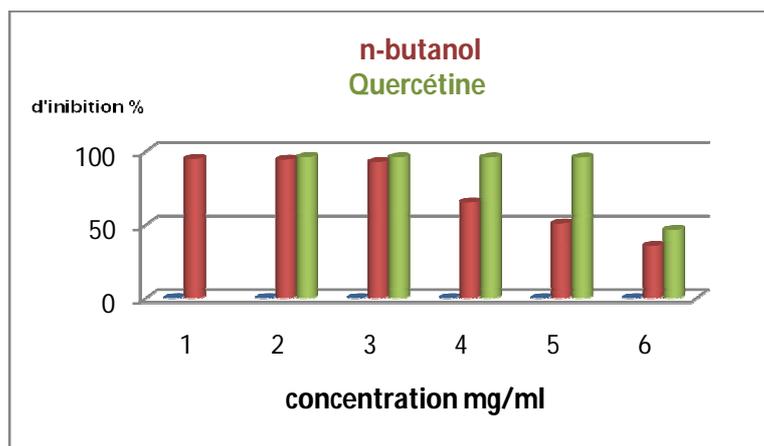


Figure 14 : Histogramme représentatif de % d'inhibition du DPPH par l'extrait n-butanolique en présence de standard (quercétine).

Extrait d'Acétate d'éthyle

Détermination d'IC 50

L'IC 50 se détermine à partir de l'équation du graphe (Figure 28) de la même manière :

$y = 1580,8x + 36,235$

Alors pour $y = 50\%$ l'IC 50 sera comme suite :

$50 = 1580,8x + 36,235$

Donc : $x = (50 - 36,235) / 1580,8 = 0,00870761$ mg/ml

Donc : IC 50 = 8,70761 µg/ml.

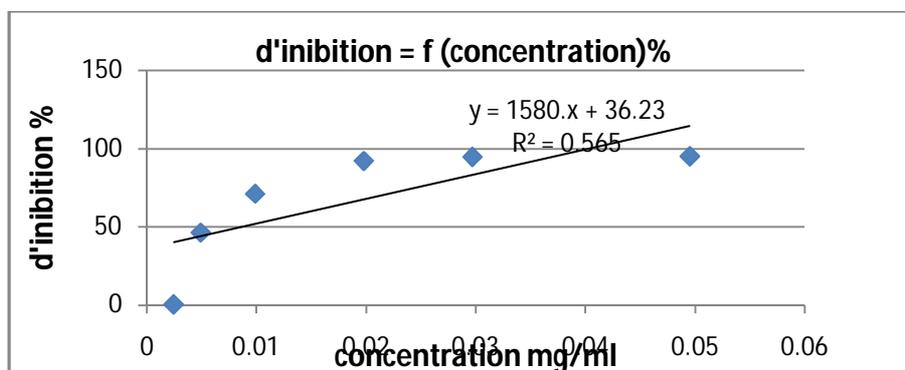


Figure 15 : Evaluation de l'activité antioxydante de l'extrait Acétate d'éthyle

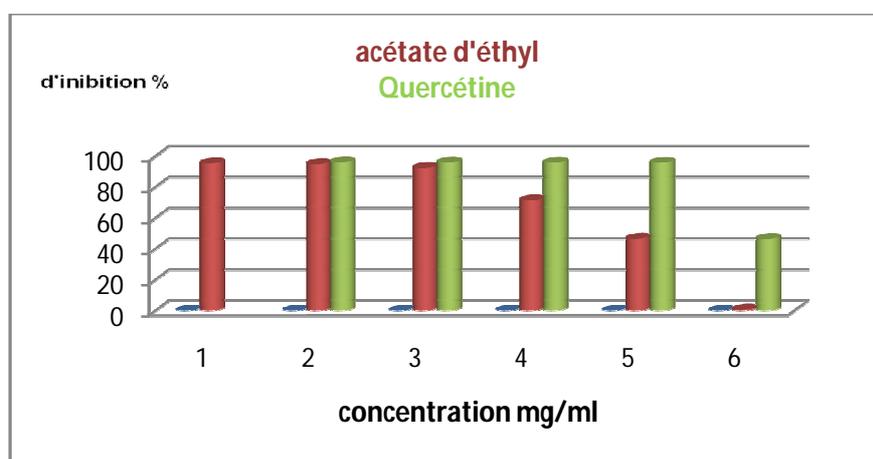


Figure 16 : Histogramme représentatif du pourcentage d'inhibition du DPPH par l'extrait acétate d'éthyle en présence de standard (quercétine).

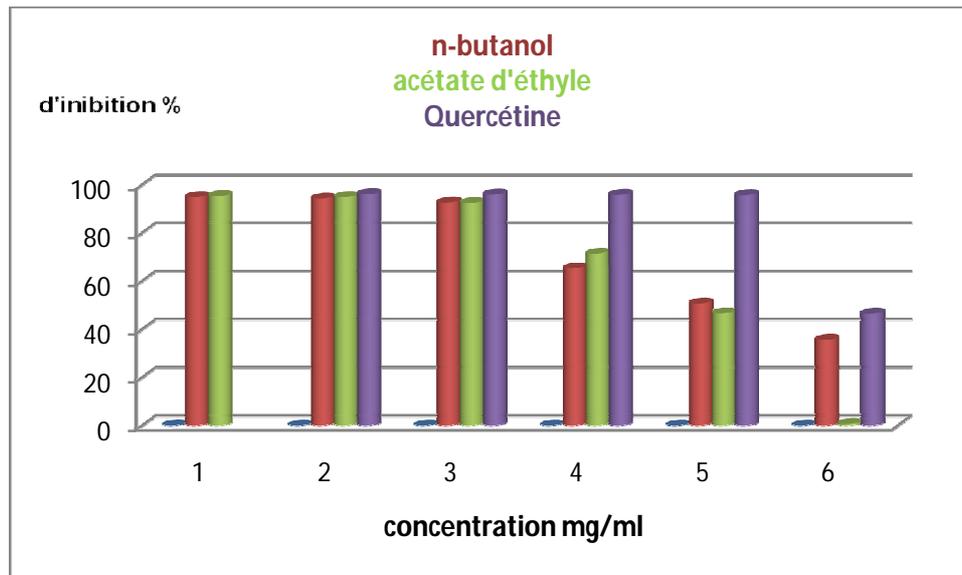


Figure 16 : Histogramme représentatif du pourcentage d'inhibition du DPPH par les extraits acétate d'éthyle et n-butanolique en présence de standard (quercétine).

Une concentration de 8,70761 $\mu\text{g/ml}$ de l'extrait d'acétate d'éthyle, et de 14,78051 $\mu\text{g/ml}$ de l'extrait n-butanolique inhibe 50% de DPPH (Tableau 28).

L'IC 50 de l'extrait butanolique (14,78051 $\mu\text{g/ml}$) est plus grande que celle de l'extrait d'acétate d'éthyle (8,70761 $\mu\text{g/ml}$), montrant que ce dernier possède une meilleure activité anti-radicalaire meilleure que celle de la vitamine E (25 $\mu\text{g/ml}$) et de celle de la quercétine (12 $\mu\text{g/ml}$).

Ces résultats montrent un meilleur effet antioxydant de l'EBMC et EAMC à une concentration de 500 mg/ml car environ 14,78 $\mu\text{g/ml}$ et 8,70 $\mu\text{g/ml}$ du DPPH sont inhibés respectivement. Comparativement à la vitamine E et à la quercétine, la valeur de la CI50 de l'EBMC (14,78 $\mu\text{g/ml}$) et EAMC (8,70 $\mu\text{g/ml}$) permet de conclure que ces extraits possèdent une assez bonne activité antioxydante. Ce qui va en accord avec la richesse des 2 extraits.

III.3. Activité Anti-inflammatoire

Tableau 32: Effet de la Cicatrisation et traités sur l'évolution des paramètres généraux, poids corporel (g) chez rats Wistar femelle adulte (T: contrôle, V: traité pare vaseline, A traités par extrait des feuilles et tiges; B traités par huile essentielle).

Période	Groupe (N=4)	Glycémie (mg/dl)	Poids corporel (g)
J -0	T	111	0,185
	V	98	0,178
	A	145	0.129
	B	157	0.136
J 3	T	120	0,178
	V	105	0,171
	A	72	0.130
	B	101	0.138
J 6	T	108	0,179
	V	114	0,174
	A	114	0.139
	B	113	0.143
J 9	T	98	0,181
	V	121	0,173
	A	108	0.139
	B	129	0.153
J 12	T	112	0,180
	V	104	0,175
	A	84	0.146
	B	46	0.158
J 15	T	107	0,181
	V	105	0,173
	A	96	0,140
	B	115	0,151

A : extrait méthanolique des feuilles, B : huiles essentielles, T : témoin, V : vaseline.

Le tableau 32 montre L'état de santé des rats pendant de la période de l'expérience est bonne parce que la glycémie est stable et le poids. Donc on dit que le groupes des rats sont en bonne santé

La figure 35 montre l'évolution des surfaces des plaies des rats des groupes pendant toute la périodes expérimentale (J₀,.....,J₁₅) présente une réduction constante dès le premier jour jusqu'à le dernier jour j₁₂ chez les rats du groupe A,V et T. Si ont compare la cicatrisation des paies du groupes V et T avec le groupes A, la surface des plaies de ces deux groupes (V et T) est ralenti (15 jours) pour la guérison ou contraction des plaies par rapport aux groupes qui sont traité par l'extrait des feuilles qui présentent de meilleur résultats.

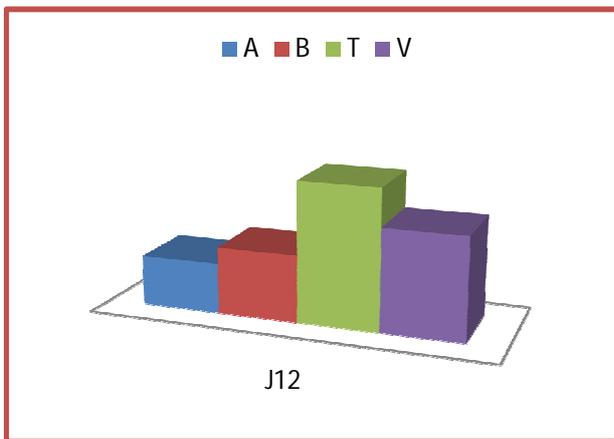


Figure 17: Comparaison des surfaces des plaies entre EMF, HE, T et V du J₁₂

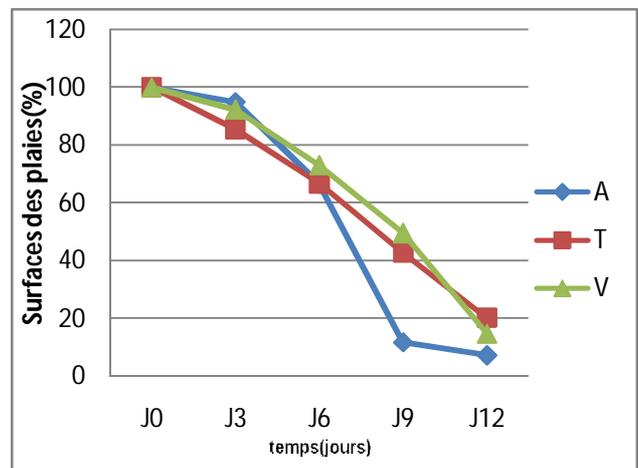


Figure 18: Comparaison des surfaces des plaies entre EMF, T et V

A : EMF : extrait méthanolique des feuilles, T : témoin, V : vaseline.

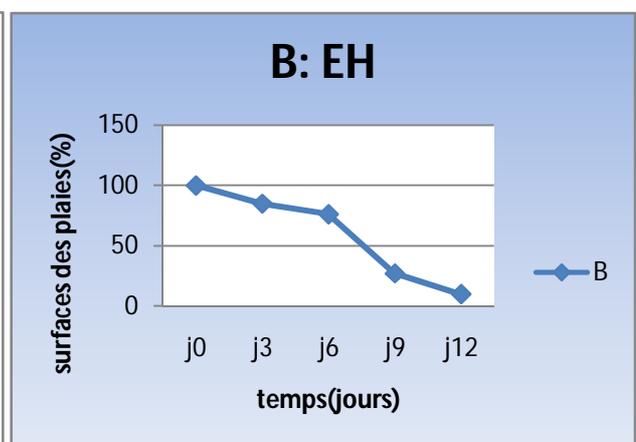
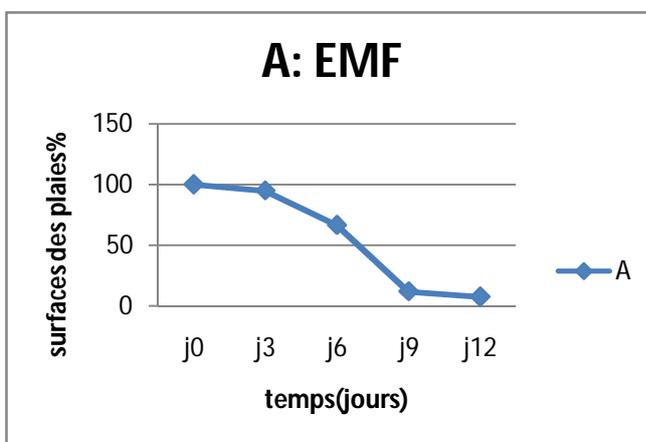


Figure 19: Evaluation de la surface (%) des rats A : EMF et B : EH en fonction du temps (jours)

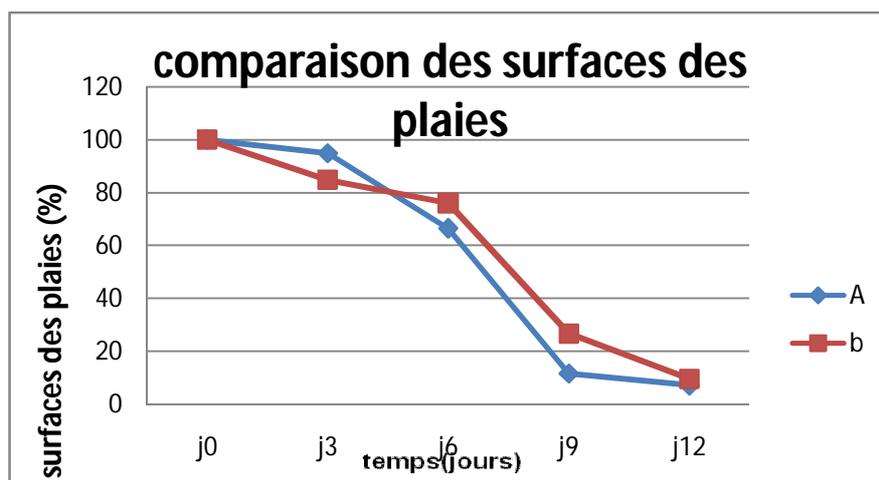


Figure 20: Comparaison des surfaces des plaies entre EMF et HE

EMF : extrait méthanolique des feuilles, HE : huiles essentielles

La courbe est divisée en deux phases. La première phase est vasculaire du premier jour jusqu'à troisième jour et la deuxième phase est la phase de répartition, on dit que la surface des plaies du J₀-J₆ est au début de la contraction la surface des plaies de l'HE est plutôt bien que la surface des plaies des feuilles. Du J₆ au J₁₂ la surface des plaies chez les deux groupes groupe de feuilles et groupe de l'HE elles diminuent de façon parfaite par rapport au témoin. On peut dire que sont parfaitement guérisons les deux groupes dans cette période.

La cicatrisation des plaies à J₁₅ entre les différents groupes

La figure 34 montre les différences des surfaces entre les groupes en fin des essais. On constate qu'il y a une différence très hautement significative de la cicatrisation des plaies chez les rats (A, B et V) comparés au témoin (T)

Une amélioration significative de 7,26% pour le groupe A(EMF) ; 9,67% pour le groupes B (EMFr) et 14,72% pour V (vaseline) par rapport au T control.

La figure 37 montre une évolution des surfaces des plaies entre les trois groupes (A et B), ou elle présente une similarité entre J₀ et J₆, qui peut être expliquée que le traitement par HE et EMF pendant cette période n'a aucun effet. Puis on constate une accélération de la cicatrisation des plaies de J₆ et J₁₂ du groupe A par rapport au groupe B, ce qui peut être expliqué par le fait que EMF et HE stimule la formation du tissu. En fin EMF et HE accélère la cicatrisation des plaies en favorisant la prolifération et la division des cellules de réparation

Tableau33: Des tableaux représentatifs l'évolution des surfaces des plaies en (%) des rats de différents groupes A, B, T et V en fonction du temps (J)

A																			
j0				J3				J6				J9				J12			
D1	G1	D2	G2	D1	G1	D2	G2	D1	G1	D2	G2	D1	G1	D2	G2	D1	G1	D2	G2
73,47	84,24	119,19	100,07	68,22	80	110,31	99	17,74	81,8	73,51	77,65	2,97	9,7	10,92	20,51	0,85	11,76	4,47	10,32
		94,2425				89,3825				62,675			11,025			6,85			
19,898	0	100		18,852	4,86	94,8431		30,147 237	31,567 5	66,5038		7,2253	83,2175	11,6985		5,0929	87,3925	7,2684	

B																			
j0				J3				J6				J9				J12			
D1	G1	D2	G2	D1	G1	D2	G2	D1	G1	D2	G2	D1	G1	D2	G2	D1	G1	D2	G2
52,72	117,57	106,51	97,94	46,42	82,8	100	89	37,44	76,15	93,68	77,76	8,26	11,45	50,86	30,05	10,46	5,59	13,42	6,79
		93,7		23,206	45,145	79,555			22,4	71,257			25,155			9,065			
28,43		100				84,903		23,892	4	76,048		19,646	68,545	26,846		3,5666	84,635	9,6744	

T																			
j0				J3				J6				J9				J12			
D1	G1	D2	G2	D1	G1	D2	G2	D1	G1	D2	G2	D1	G1	D2	G2	D1	G1	D2	G2
98,22	110,57	101,51	97,34	88,42	80,8	90	89	57,44	66,15	80,68	67,76	8,26	11,45	50,86	30,05	10,46	5,59	13,42	6,79
		101,91				87,055				68,007			43,655			20,565			
6,045		100		4,220	14,85	85,423		9,587	33,904	66,732		8,980	58,255	42,836		3,688	81,345	20,179	

V																			
j0				J3				J6				J9				J12			
D1	G1	D2	G2	D1	G1	D2	G2	D1	G1	D2	G2	D1	G1	D2	G2	D1	G1	D2	G2
101,37	98,14	121,9	109,07	97,22	90,45	110,31	99	77,74	81,33	79,51	75,65	50,97	63,7	57,92	40,51	19,85	21,76	11,47	10,32
		107,62				99,245				78,557			53,275			15,85			
10,566	0	100		8,245	8,375	92,217		2,430	29,062	72,995		9,975	54,345	49,502		5,793	91,77	14,727	

Conclusion

Conclusion

Au terme de ce travail concernant à la caractérisation de métabolites primaires et secondaires et les activités biologique de l'espece *Myrtus communis* L. nous pouvons dire que :

La plante est riche en Flavonoïdes, Tanins, Saponosides, stérols et et triterpènes dans les trois parties de la plante ainsi que la présence des anthocyanes dans les feuilles et fruits.

Le dosage de polyphénols totaux dans l'extrait hydro-alcoolique des feuilles a révélé une plus grande richesse en polyphénols comparé à l'extrait hydro-alcoolique des grains.

Le rendement de l'huile essentielle obtenue par l'hydrodistillation est 1.5 de l'espèce *M.communis* L.

L'évaluation de l'activité biologique de l'extrait hydro-alcoolique et l'huile essentielle nous a montré :

L'inhibition de la croissance des souches *E.coli* et *Staphylococcus sp* de l'extrait hydrométhanolique et l'HE est moyenne.

Une amélioration très hautement significative de la cicatrisation des groupes des feuilles, huiles essentielles et vaseline par rapport au T contrôle (de 7,26%, 9,67et 14,72%) respectivement. Alors on peut dire les feuilles et huiles essentielles présentent une activités cicatrisante.

On peut conclure que les feuilles et les tiges étaient particulièrement riches en tanins par rapport aux fruits qui représentent une teneur moyennement faible, tandis que les fruits apparaissent pauvres en flavonoïdes par rapport aux tiges et feuilles qui présentent des teneurs plus ou moins importantes. Ces résultats importants reflètent les rendements élevés et la richesse de chaque partie de la plante en polyphénols à savoir les flavonoïdes, les tanins et les anthocyanes.

Références bibliographiques

Bibliographie

- [1] **Boyd, B., Ford, C., Koepke Michael, C., Gary K., Horn, E., McAnalley, S. et McAnalley, B., (2003).** Étude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *Glyco.Sci & Nutr.* 4 (6),p 7.
- [2] **Vansant, G.,(2004).** Radicaux libres et antioxydants: principes de base. Symposium «Antioxydants et alimentation ». Institut Danone.p
- [3] **Svoboda, K.P., Hampson, J.B. (1999).** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW.p
- [4] **Maataoui, B.S., Hmyene, A., Hilali, S., (2006).** Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Sci. J.* 7(1), p 3-8.
- [5] **Koleva, Van Beek T., A., Linssen, J. P. H., (2002).** Extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem. Analysis.* 15, 8-17.
- **Alamanni, M.C., Cossu, M., (2004).** Radical scavenging activity and antioxydant activity of liquors of Myrtle (*Myrtus communis* L) berries and leaves Italian, *Journal of Food Science*, 16: 197 – 208.
- Ann Dermatol,V.(2005).**Les grand fotion de la peau.132:8S49-68.
- **Bahorun, T., (1997).** Substances Naturelles actives: La flore mauricienne une source d'approvisionnement potentielle. Université de Maurice. AMAS, *Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius* , p 83.
- **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.
- **Baytop, T., (1999).** Therapy with medicinal Plants in Turkey (Past and Present), *Nobel Tip Kitapevleri Press, Istanbul*.p
- **Bessas, A; Benmoussa, L; Kerarma, M., (2007).** Dosage biochimique des composés phénoliques dans les dattes et le miel récoltés dans le sud Algérien. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en biologie.p

- **Beta, T; Nam, S; Dexter, J.E; Sapirstein, H.D., (2005).** Phenolic content and antioxidant activity of pearled ulreat and roller – milled fractions, *Creal Chem*: 390 -393.
- **Bruneton, J., (1993).** Pharmiognosie et phytochimie, plantes médicinales, *Tec et Doc Lavoisier*. Paris, p 278-279.
- **Bruneton, J., (1999).** Pharmiognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2eme édition, Paris : Editions médicales internationales, *Tec et Doc Lavoisier*, p 1120.
- **Cavin, A., (1999).** Investigation phytochimique de trios plantes Indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires: *Tinos poracispa* (Menispermacées), *Merremia emarginata* (Convolvalacées) et *Oropea enneanda* (Annonacées). Thèse de doctorat Lausanne, p 241 .
- **Cuendet, M., (1999).** Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie : « *Fagraea blumei* » (Loganiaceae) et de trois plantes d'altitude : « *Bartsia alpina* » (Scrophulariaceae), « *Loiseleuria procumbens* » (Ericaceae) et Camp, Thèse de doctorat, p 24.
- **Diaz, A.M ; Abeger, A., (1987).** Contribution à l'étude des composés phénoliques des graines de *Myrtus communis* L. *Plantes médicinales et phytothérapie*, 21(4) : 317-322.
- **Diaz, A.M; Abeger, A., (1987).** *Myrtus communis* composition quimicay actividad biologica de sus extractos, *Una revision, Fitoterapia* 8: 167 – 174.
- GERHARD R.,(1993).**Métabolisme des végétaux. Physiologie et biochimie, 526 pages, Presses polytechniques et universitaires Romandes. Lausanne
- **Gonzalez, A. G ; Estevez-Braun, A., (1997).** Coumarins, *Nat. Prod. Reprod*, 14 : p 465-475.
- **Gravot, A., (2008).** Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Equipe pédagogique Physiologie Végétale, UMR 118 APBV. Université de Rennes 1 – L2.
- **Hemingway, R.W., (1992).** Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In: *Lpant polyphenols: synthesis, proprieties, significande*. Laks P.E, Hemingway R.W New York.
- J BRUNETON., (2009).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales (4ème édition) : 1288 pages.
- **J-L. GUIGNARD.,(2000).** Biochimie végétale. Edition Dunod .

- **Kansole, M.M.R., (2009).** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia opposita* Vahl et *Orthosiphon pallidus* Royle ex Benth. Mémoire pour obtenir un diplôme Diplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso.
- **Longo, L; Scardino, A; Vasapollo, G., (2007).** Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L, *Phillyrea latifolia* L. and *Rubia perigrina* L. *Innovative, Food Science and Emerging Technologies*, 8: 360-364.
- **Martin- Lopez, T; Rubio, B; Villaescusa, L; Fernandez, L; Diaz A.M., (1999).** polyphenolic compounds from pericarps of *Myrtus communis*, *Pharmaceutical Biology*, 37, 28-31.
- **Milane, H ; (2004).** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres, études et applications thérapeutiques. Thèse en vue de l'obtention du grade de docteur en science. Université Louis Pasteur. Strasbourg.
- **Quezel, P ; et Santa, S., (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionale. Tome II Edition. CNRS. Paris. P 636- 637.
- **R. MERGHEM.,(2009).** Eléments de biochimie végétale, 171 pages, Bahaeddine éditions.
- **Singleton, V.L ; Rossi, J.A., (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158.

Etude phytochimique , évaluation des activités antioxydante et anti-inflammatoire de l'espèce: *Myrtus commuins L.*

Résumé

Le but de ce travail était l'étude de la plante *Myrtus communis L.* appartenant à la famille (Myrtacées).

Pour cela nous avons réalisé des tests de screening sur l'extrait hydro-alcoolique, les tests sur la plante à l'étude nous ont donné une idée générale sur le métabolisme secondaire qu'elle contient. D'après les résultats la plante apparait riche en flavonoïdes, les tanins, stérols, stéroïdes, en polyphénols et les terpènes.

Nous avons extraire huiles essentielles par la méthode de Clavenger, leur rendement est de 1,5%.

La détermination des composés phénoliques totaux via le test FC met en évidence que l'extrait méthanolique des feuilles est riche en composés phénoliques par rapport à l'extrait méthanolique des graines.

L'extrait acétate d'éthyle (feuilles) a montré une meilleure activité antioxydante par rapport à l'extrait butanolique(feilles) , en utilisant la méthode du DPPH.

Le dosage de polyphénols totaux dans l'extrait hydro-alcoolique des feuilles a révélé une plus grande richesse en polyphénols (en utilisant la méthode de Folein- Ciocalteu) comparé à l'extrait hydro-alcoolique des grains.

Notre investigation phytochimique et biologique a montré que *Myrtus communis L.* possède des potentialités anti-inflammatoires, anti-microbienne et anti-oxydante.

Mots clés : *Myrtus communis L.* flavonoïdes, les tanins, stérols, stéroïdes, polyphénols terpènes.huiles essentielles, activité antioxydante, activité antibactérienne,activité anti-inflamatoire ,DPPH.

Etude phytochimique , évaluation des activités antioxydante et antti-inflammatoire de l'espèce: *Myrtus commuins L.*

المخلص:

الهدف من دراستنا للصف *Myrtus communis L.* الذي ينتمي لعائلة Myrtacées هو: إجراء تجارب على هذا النبات و هذه التجارب تعطينا فكرة عامة حول مركبات الأيض الثانوي التي تحتويها هذه النباتة. من خلال هذه الدراسة وجدنا أن هذه النباتة غنية ب الفلافونويدات ، التانينات، التربينات،ستيروول، ستيرويد و بوليفينول.

لتحديد المركبات الفينولية من المستخلص الكحولي المائي للأوراق بيّنت أن الأوراق غنية بالمركبات الفينولية مقارنة بالمستخلص الكحولي للتّمار.

قمنا باستخلاص الزيوت الأساسية عن طريق Clavenger، والمردود كان 1,5 %.

مستخلص خلاص الإيثيل للأوراق بيّن أنها مضادة للأكسدة افضل مقارنة بمستخلص البيتانولي للأوراق. قمنا باستعمال الطريقة DPPH.

التحديد الإجمالي لعديد الفينول من المستخلص الكحولي المائي للأوراق بيّن أنها غنية جدا بعديد الفينول و هذا مقارنة بالمستخلص الكحولي المائي للثمار. (استعملنا طريقة Folein- Ciocalteu).

أظهر لنا التحقيق الكيميائي النباتي و البيولوجية *Myrtus communis L* أنها مضادة لالتهابات، مضادة للميكروبات ومضادة للأكسدة.

الكلمات المفتاحية: *Myrtus communis L.* الفلافونويدات ، التانينات، التربينات،ستيروول، ستيرويد و بوليفينول.الزيوت

الطيارة،مضادة لالتهابات، مضادة للميكروبات ومضادة للأكسدة. DPPH

Etude phytochimique , évaluation des activités antioxydante et antti-inflammatoire de l'espèce: *Myrtus commuins* L.

Abstract:

The goal of conducting this research on *Myrtus communis* L. plant which belong to Myrtacees family is :

Making experiments on this plant to gain a general understanding about which secondary metabolism complexes it contains . Thus, it is found to be rich in flavonoids, tanins, sterols ,steroids, in polyphenol and terpene.

Essential oils have been extracted using Clavenger method whit 1,5%.

While investigation phenoliques using FC test, the leafs have been found to be richer in phenoliques complex in comparison to its percentage in the fruits.

The ethyle acetate extract from leafs have a higher antioxydant activity in comparison with the butanolique extract from the leafs. DPPH method has been used for this purpose.

The total dosage of the phenoliques complex derived the extract from the hydroalcolic of the fruits (the Folein Ciocalteu method has been utilized).

Our investigation show that *Myrtus communis* L. has anti-inflammation, antimicrobial and antioxydant potentials.

Key word: *Myrtus communis* L.,flavnoids, tanins, stérols, stéroïds,poluphenols and terpenes, essential oil, antioxydant activity, anti-inflammatory and antimicrobial,DPPH;