



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  
جامعة زيان عاشور-الجلفة

Université Ziane Achour -Djelfa

كلية علوم الطبيعة و الحياة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

قسم العلوم الفلاحية و البيطرة

Département Science Agronomique et Vétérinaire

Projet de fin d'étude

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Sciences Alimentaire

Spécialité: Agroalimentaire et Contrôle de Qualité

Thème:

Contribution à l'étude phytochimique (par chromatographie à couche mince : CCM), des activités antibactériennes et des activités antioxydantes de l'extrait des feuilles de myrte (*Myrtus Cummnis L.*) de la région du nord constantinoise.

Présenté par : Boumidouna Abdelkrim

Kouar Abdelouahab

Soutenu devant le jury :

M <sup>f</sup> DAHIA M.	M.C (A)	Université de Djelfa	Président.
M <sup>f</sup> CHIEB T.	M.C (B)	Université de Djelfa	Promoteur.
M <sup>f</sup> BELMAHDI M.	M.A (A)	Université de Djelfa	Examineur 1.
M <sup>f</sup> KHIARI M.	M.C (B)	Université de Djelfa	Examineur 2.

Année Universitaire : 2018/201

# *Remerciement*

*Nous remercions d'abord, dieu tout puissant de nous avoir donné la santé, le courage, et la volonté Pour mener à terme ce travail.*

*À Mr.Chieb T pour nous avoir encadré et Orienté tout au long de ce projet.  
Nous tenons à adresser nos remerciements à :*

***Mr.Dahia M** docteur à la faculté SNV, Université de Djelfa pour l'honneur qu'il fait de présider le jury de ce mémoire.*

*Tous les membres du service de laboratoire.*

*Tous les enseignants qui nous ont enseigné au long de toutes les années d'étude.*

*Tous les membres du jury, d'accepter d'examiner notre travail.*

*Enfin, nous remercions tous ceux et celles qui étaient à nous côté durant  
La réalisation de notre projet.*

*Avec tous nos remerciements et croyez a notre sincère gratitude.*

# dédicace

- *A laide de dieu tout puissant, qui ma tracé le chemin de ma vie,  
J'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*
- *A la lumière de mes yeux, lombre de mes pas et le bonheur de ma  
vie ma mère qui ma apporté son appui durant toutes mes années  
détude, pour son sacrifice et soutien qui mont donné confiance,  
courage et sécurité.*
- *A mon cher père qui ma appris le sens de la persévérance tout au  
long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses  
encouragements.*
  - *A ma très chère sœur Rabia*
  - *A mes frères : Mohamed Amine et Ben Yahya*
    - *A toute la famille Boumidouna et Biaz*
    - *A mes amis : Abdo Fet et Hamza Mer*
    - *À ma copine Nour elhouda*

*Abdelkrim*

---

# dédicace

- *A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*
  
- *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 mon cher père qui ma appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements*
  
- *A Mes Très Chères Sœurs : Khadra et Nacira*
- *A mes Frères : Mohamed, Mostafa, Ismail, Khaled et Oussama*

***Abdelouahab***

---

# Sommaire

Introduction .....	01
--------------------	----

## *Première Partie : Etude Bibliographique*

### Chapitre I : Etude Climatique et Géographique de La Zone D'étude

1. Situation géographique.....	03
2. Etude géomorphologique.....	04
2.1. Relief.....	04
2.2. Climatologie.....	04
2.3. Les températures.....	05
2.4. Les précipitations.....	06
2.5. Les vents.....	07

### Chapitre II : Etude Botanique De La Plante

1 .L'importance des plantes médicinales.....	09
2. Histoire de la plante <i>Myrtus communis L</i> .....	09
2 .1. Utilisation médicinale et traditionnelle.....	09
2 .2. Aspect économique.....	09
2 .3. Travaux antérieurs.....	09
3. Etude botanique de <i>Myrtus communis L</i> .....	10
3.1. La famille des Myrtacées.....	10
3.2. Description botanique de la plante <i>Myrtus communis L</i> .....	10
3.2.1. Le genre <i>Myrtus L</i> .....	10
3.2.2. L'espèce <i>Myrtus communis L</i> .....	10
3 .2.3. Distribution géographique de la plante.....	12
3.2.4. Position systématique.....	13
3.2.5. Classification phylogénétique.....	13

## **Chapitre III : Les métabolismes primaires et secondaires**

<b>1. Métabolites primaires.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1. Les glucides.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2. L'amidon.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3. Les lipides.....</b>	<b>15</b>
<b>1.4. Les acides amines.....</b>	<b>15</b>
<b>2. Métabolites secondaires.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1. Définition.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2. Fonctions des métabolites secondaires.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3. Classification des métabolites secondaires.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3.1. Les composés phénoliques.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3.2. Classification des composés phénoliques.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3.2.1. Les acides phénoliques.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3.2.1.1. Les acides benzoïques.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3.2.1.2. Les acides cinnamiques.....</b>	<b>19</b>
<b>2.3.2.2. Les coumarines.....</b>	<b>19</b>
<b>2.3.2.3. Les quinones.....</b>	<b>19</b>
<b>2.3.2.4. Les tanins.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3.2.5. Les flavonoïdes.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3.2.5.1. Biosynthèse des flavonoïdes.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3.2.6. Les anthocyanes.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3.2.7. Les alcaloïdes.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3.2.8. Les isoprénoïdes (Terpénoïdes).....</b>	<b>23</b>

<b>3. Rôle des métabolites secondaires chez les végétaux.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1. Dissuader les prédateurs.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2. Attirer les pollinisateurs.....</b>	<b>23</b>

**Chapitre IV : activité biologique des extrais**

<b>1. Activité antioxydants.....</b>	<b>25</b>
<b>1.1. Les radicaux libres et le stress oxydant.....</b>	<b>25</b>
<b>1.2. Les radicaux libres dans les systèmes biologiques.....</b>	<b>25</b>
<b>2. Les antioxydants.....</b>	<b>26</b>
<b>3. Piègeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•).....</b>	<b>26</b>
<b>4. Réduction de fer: FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma).....</b>	<b>26</b>
<b>2. L'activité antibactérienne.....</b>	<b>27</b>

**Chapitre V : Méthodes d'extraction**

<b>1. Méthodes d'extraction.....</b>	<b>29</b>
<b>1.1. Extraction par les solvants.....</b>	<b>29</b>
<b>1.2. Extraction par la séparation des principes actifs.....</b>	<b>30</b>
<b>1.2.1. Décoction.....</b>	<b>30</b>
<b>1.2.2. Infusion.....</b>	<b>31</b>
<b>1.2.3. Macération.....</b>	<b>31</b>
<b>2. Les méthodes analytiques.....</b>	<b>31</b>
<b>2.1. Historique.....</b>	<b>31</b>
<b>2.2. Principes.....</b>	<b>32</b>
<b>2.2.1. Principe général de la chromatographie.....</b>	<b>32</b>
<b>2.2.2. Objectif d'une méthode chromatographique.....</b>	<b>32</b>
<b>3. Chromatographie en phase gazeuse.....</b>	<b>32</b>
<b>3.1. Principe d'une installation de CPG.....</b>	<b>33</b>
<b>4. Chromatographie sur couche mince.....</b>	<b>35</b>

<b>5.Chromatographie liquide a haute performance (HPLC).....</b>	<b>35</b>
<b>5.1.Principe de la HPLC.....</b>	<b>36</b>

## ***Deuxième partie : Travail expérimentale***

### **Matériel Et Méthodes**

<b>1. Matériel végétal.....</b>	<b>38</b>
<b>1. 1. Le moment de récolte.....</b>	<b>38</b>
<b>1.2. Le séchage.....</b>	<b>38</b>
<b>1.L'étude phytochimique.....</b>	<b>39</b>
<b>1.1.Epuisement du matériel végétal avec de l'eau chaude.....</b>	<b>39</b>
<b>1.1.1. Amidon.....</b>	<b>39</b>
<b>1.1.2. Saponosides.....</b>	<b>39</b>
<b>1.1.3. Tanins.....</b>	<b>39</b>
<b>1.2. Epuisement du matériel végétal avec l'éthanol.....</b>	<b>39</b>
<b>1.2.1. Flavonoïdes.....</b>	<b>39</b>
<b>1.2.2. Tanins.....</b>	<b>40</b>
<b>1.2.3. Composés réducteurs.....</b>	<b>40</b>
<b>2 Autres métabolites secondaires.....</b>	<b>40</b>
<b>2.1. Coumarines.....</b>	<b>40</b>
<b>2.2. Stérols et triterpènes.....</b>	<b>40</b>
<b>2.3. Alcaloïdes.....</b>	<b>40</b>
<b>2.4. Anthocyanes.....</b>	<b>40</b>
<b>3. Extraction des composés phénoliques.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1. Préparation des extraits bruts méthanoliques.....</b>	<b>41</b>
<b>3.2. Extraction des flavonoïdes (fractions acétate d'éthyle et 1-butanol).....</b>	<b>42</b>
<b>3.3. Extraction des tanins.....</b>	<b>43</b>

3.4. Extraction des anthocyanes.....	43
4. Activité antioxydante.....	44
4.1. Réduction du fer : FRAP (Ferric reducing antioxidant power).....	44
4.2. Piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl).....	44
Calcul des pourcentages d'inhibitions.....	45
Calcul des IC <sub>50</sub> .....	45
5. Etude de l'activité antibactérienne.....	46
5.1. Evaluation qualitative de l'activité antibactérienne.....	46
5.2. Préparation de l'inoculum.....	46
5.3.Méthode.....	46
Ensemencement.....	47
Dépôt des disques.....	47
Lecture.....	47
Les souches testées.....	47

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

1. Screening phytochimique.....	50
2. Les rendements en extraits secs.....	52
3. Etude de l'activité antioxydants.....	53
3.1. Réduction du fer : FRAP (Ferric reducing antioxidant power.....	53
3.2. Piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl).....	54
Calcul des IC <sub>50</sub> .....	54
4. Activité antibactérienne.....	55
Résultat.....	55
Discussion.....	59
Conclusion .....	62

**Références bibliographie .....65**

**Annexes.....71**

**Résumé**



# Liste des figures

## Liste des figures

<b>Figures</b>	<b>Titres</b>	<b>Pages</b>
<b>01</b>	Localisation géographique de Collo (Skikda) et ses principaux milieu insulaires.	<b>03</b>
<b>02</b>	les limites géographiques de la zone d'étude Carte administratif "Michelin.	<b>03</b>
<b>03</b>	Variation de la température moyenne mensuelle de la région de Skikda (1981-2010).	<b>05</b>
<b>04</b>	Variation de la moyenne mensuelle des précipitations (P) de la région de Skikda (1981-2010)	<b>06</b>
<b>05</b>	Distribution géographique de l'espèce <i>Myrtus communis</i> L. dans le monde d'après ( <b>Médail et al, 2009</b> )	<b>12</b>
<b>06</b>	Quelques dérivés de l'acide hydroxybenzoïque.	<b>18</b>
<b>07</b>	Quelques dérivés de l'acide hydroxycinnamique.	<b>19</b>
<b>08</b>	Structure de bas de coumarine.	<b>19</b>
<b>09</b>	Structure de bas de flavonoides.	<b>20</b>
<b>10</b>	Biosynthèse des flavonoïdes.	<b>21</b>
<b>11</b>	Une installation de CPG. Un chromatographe commercial, le modèle 6890 de la Société Agilent Technologies. L'instrument représenté comporte également un porteéchantillons et un injecteur automatique. Schéma fonctionnel d'un appareil de CPG. Chromatogramme d'un mélange de cétones.	<b>34</b>
<b>12</b>	une expérience de chromatographie.	<b>35</b>
<b>13</b>	Principe de fonctionnement d'une chaîne HPLC.	<b>36</b>
<b>14</b>	La plante <i>Myrtus communis</i> L.	<b>38</b>
<b>15</b>	Protocole d'extraction des extraits bruts.	<b>41</b>

<b>16</b>	Protocole d'extraction des flavonoïdes.	<b>42</b>
<b>17</b>	Protocole d'extraction des tanins.	<b>43</b>
<b>18</b>	Pouvoir réducteur des extraits bruts et de l'acide ascorbique par la méthode FRAP	<b>53</b>
<b>19</b>	Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH.en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'extrait décoctée de <i>Myrtus communis</i> L	<b>54</b>
<b>20</b>	les zones de l'inhibition après incubation pendent 24 heures	<b>55</b>

# Liste des tableaux

<b>Tableaux</b>	<b>Titres</b>	<b>Pages</b>
<b>01</b>	Températures mensuelles minimales, maximales et moyennes exprimées en degrés Celsius (° C) dans la région de Skikda (1981-2010).	<b>05</b>
<b>02</b>	Moyennes mensuelles des précipitations en (mm) dans la région de Skikda (1981-2010).	<b>06</b>
<b>03</b>	Les fréquences des vents enregistrés dans la région de Skikda.	<b>07</b>
<b>04</b>	Activités biologiques des composés polyphénoliques (bahorun, 1997).	<b>17</b>
<b>05</b>	Résultats des réactions de caractérisation des principaux métabolites secondaires contenus dans l'extrait de <i>Myrtus communis L.</i>	<b>51</b>
<b>06</b>	Les rendements en extraits obtenus à partir des trois parties de la plante.	<b>52</b>
<b>07</b>	valeur d'IC50 trouvées pour l'extrait décoctée et acide ascorbique.	<b>55</b>
<b>08</b>	Effets de l'extrait sur les souches bactériennes	<b>56</b>
<b>09</b>	Interprétation des effets de l'extrait sur les souches bactériennes en terme de la sensibilité.	<b>56</b>
<b>10</b>	Effets des antibiotiques sur les souches bactériennes.	<b>57</b>
<b>11</b>	l'interprétation des effets des les antibiotique sur les souches bactériennes en terme de la sensibilité.	<b>57</b>

# Liste des abréviations

- APG : Angiosperm Phylogeny,
- AA: Acide ascorbique,
- MV : Matérielle végétale,
- E.I : Extrait infusé,
- E.D : Extrait décocté,
- M : maxima moyen,
- m: minima moyen,
- CPG : chromatographie à phase gazeuse,
- CCM : chromatographie sur couche manse,
- HCL : Acide chlorhydrique,
- ml : millilitre,
- NaCl : Chloride sodium,
- Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : picrate de sodium,
- g : gramme,
- %: Pourcentage,
- DPPH· : Radical 2,2 diphényle-1-picrylhydrazyl,
- IC<sub>50</sub> : Concentration permettant d' inhiber 50 % du radical DPPH,

- NADPH : Nicotinamide-Adenine-dinucleotide-Phosphate,
- UV/VIS: Radiation ultraviolette/ Visible,
- v: Volume,
- Fe<sup>2+</sup> : Ions ferreux,
- Fe<sup>3+</sup> : Ions ferriques,
- Fe : Fer,
- FeCl<sub>3</sub>: Chlorure de fer,
- FRAP: Ferric reducing antioxidant power,
- O<sub>2</sub> : Oxygène moléculaire,
- CLHP : Chromatographie en phase liquide,
- R (%) : le rendement d'extrait en pourcentage.

## *Introduction*

---

On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques.

L'isolement de principes actifs datant du XIX<sup>ème</sup> siècle, en améliorant la connaissance des structures, a fait progressivement se séparer et parfois s'opposer une phytothérapie traditionnelle souvent empirique avec une thérapeutique officielle incluant les principes chimiques et végétaux dont la pharmacologie était mieux connue.

Cette thérapeutique officielle accepte parfois avec une certaine méfiance l'emploi des végétaux ou d'extraits complexes de végétaux dont l'action est confirmée par l'usage sans être attribuée de façon certaine à une molécule type (**Bahorun, 1997**).

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie. 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 des 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 vasculoprotecteurs, anti inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et antiradicalaires (**Bahorun, 1997**).

Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits. Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tannins (**Boizot et Charpentier, 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, Bouattoura, 1988, Maizaket al, 1993**).

Elles ont été utilisées dans de nombreux domaines incluant par exemple la médecine, la nutrition, l'assaisonnement, les boissons, les teintures et les cosmétiques. L'effet conservateur de plusieurs plantes aromatiques (épices, condiments) suggère la présence des constituants anti-oxydants et antimicrobiens (**Hirasa et Takemasa, 1998**).

Ces dernières années, nous avons assisté à un regain d'intérêt des consommateurs pour les produits naturels. C'est pour cela que les industriels développent de plus en plus des procédés mettant en œuvre des extraits et des principes actifs d'origine végétale.

## *Introduction*

---

Parmi ces nouveaux composés potentiellement intéressants, les antioxydants, tels que les flavonoïdes sont été particulièrement étudiés en raison de leur utilisation dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires pour leurs effets bénéfiques pour la santé **(Chebil, 2006)**.

L'intérêt accru des anti-oxydants d'origine naturelle dans le but d'augmenter la conservation des aliments s'explique par le fait que certains anti-oxydants synthétiques présentent des risques de cancérogénicité **(Velioglu et al, 1998)**.

De nombreuses plantes, alimentaires ou médicinales, renferment des constituants antioxydants. L'apport régulier en phytonutriments possédant des capacités anti-oxydantes significatives est associé à une faible prévalence de maladies liées au stress oxydatif (cancers, maladies cardiovasculaires et athérosclérose) **(Bravo, 1998)** et à un faible taux de mortalité **(Anderson et al, 2001)**.

C'est pourquoi nous nous sommes intéressé de faire une étude phytochimique de la plante *Myrtus communis* L. poussant à l'état spontané dans les monts de la région de skikda (nord de constnatine) et à évaluer l'activité anti oxydante de leur extraits.

L'espèce *Myrtus communis*L., famille des myrtacées est connu par ces propriétés antiseptiques désinfectantes et astringentes (diarrhées, dysenterie) ainsi par leur effet hypoglycémique. Reconnu également dans le traitement des maladies des voies urinaires et respiratoires **(Mimica-Dukic et al, 2010 ; Baba Aissa, 1999)**.

Ce mémoire est composé de trois parties, nous abonderons dans une première partie une étude bibliographique qui regroupe cinq chapitres dont le premier concerne les études climatique et géographiques de la zone d'étude.

Le deuxième chapitre est consacré à l'étude botanique de la plante, nous donnerons dans le troisième chapitre un aperçu sur les métabolismes primaires et secondaires, et le quatrième chapitre concerne les activités biologiques des extraits et les méthodes d'extractions détaillée de la plante étudiée sera donnée dans le dernier chapitre.

La deuxième partie décrit le matériel et les méthodes utilisées dans la partie expérimentale, la troisième partie est consacrée aux résultats obtenus et les discussions. Une conclusion générale clôture ce manuscrit.



# Chapitre I : Etude climatique et géographique de la zone d'étude

## 2. Etude géomorphologique :

### 2.1. Relief :

La plaine de Collo apparaît comme un fossé d'effondrement limitée au Sud-Est par une scarpement de failles tectoniques. Au Nord-Ouest par un alignement de dômes éruptifs dégagés dans les marnes miocènes, redressés de 50 à 60 faces à la faille qui les borde. Au Sud-Ouest, la plaine de Collo se termine contre une série de Koudi ets plus ou moins importante.

Trois types de buttes peuvent être distingués, une première série dépasse les 2000 m (koudti et Badis 285m), et délimite verticalement l'espace dans lequel est installée la plaine, une deuxième série de buttes atteint les 150-180m (koudi et Zrikaiya 183m), enfin un troisième ensemble plus en avant avec des altitudes modestes (koudi et Dar Said).

Le modèle de ces buttes est directement guidé par la lithologie, ainsi trois types peuvent être distingués. Le premier type à sommet plat et bords escarpés est représenté uniquement par la koudi et Zrikaiya, un deuxième type est représenté par des buttes au versant au profil raide et rigide, comme koudi et Dar Said, le troisième type caractérise des collines généralement de faible altitude et aux formes molles comme koudi et El koubba.

Au centre de la plaine (koudi et Tellezza 191m) apparaît comme un horst de gneiss du socle kabyleen avant de l'escarpement de la faille de (koudi et Draa Boudis 219 m). **Allain M. (1981)**

Station	Altitude	Latitude	Longitude	Etage biochimique
Collo - القل	1 000 m	37°00'25"N	6°33'39"O	Chaud et tempéré

### 2.2. Climatologie :

Le climat joue un rôle fondamental dans la distribution et la vie des êtres vivants **Marre A. (1987)**, Les facteurs écologiques, en particulier ceux en rapport avec les climats, n'agissent jamais de façon isolée, mais simultanément, parmi ces facteurs, nous avons des facteurs énergétiques (lumière et température), des facteurs hydrologiques (précipitations et hygrométrie) et des facteurs mécaniques (vent et enneigement). **Ramade F. (2003)**

Le climat de la Wilaya de Skikda appartient au régime méditerranéen tel qu'il est défini par **Remenieras G**, Le climat méditerranéen est caractérisé par une saison froide relativement tempérée durant laquelle les perturbations cycloniques apportent des pluies souvent substantielles surtout sur les reliefs, suivie d'une période sèche et atmosphère calme.

La Wilaya appartient aux domaines bioclimatiques humides et subhumides. Il est à variante douce et tempérée au niveau du littoral et froid à l'intérieur. L'étage humide couvre la zone occidentale montagneuse ainsi que les sommets à l'Est et au Sud. Le domaine subhumide prévaut sur les 4/5ème du territoire de la wilaya avec une pluviométrie comprise entre 1000 et 1500 mm/an.

## Chapitre I : Etude climatique et géographique de la zone d'étude

Sous l'influence maritime. Les températures sont douces en hiver (11°C en Janvier) et chaude en été (24°C en Aout), sur le littoral où les amplitudes thermiques sont faibles. Elles sont moins douces en hiver (9°C) et plus chaudes en été (27°C) au niveau du territoire intérieur où les amplitudes sont plus marquées. **S.M.S. (2010)**

### 2.3. Les températures :

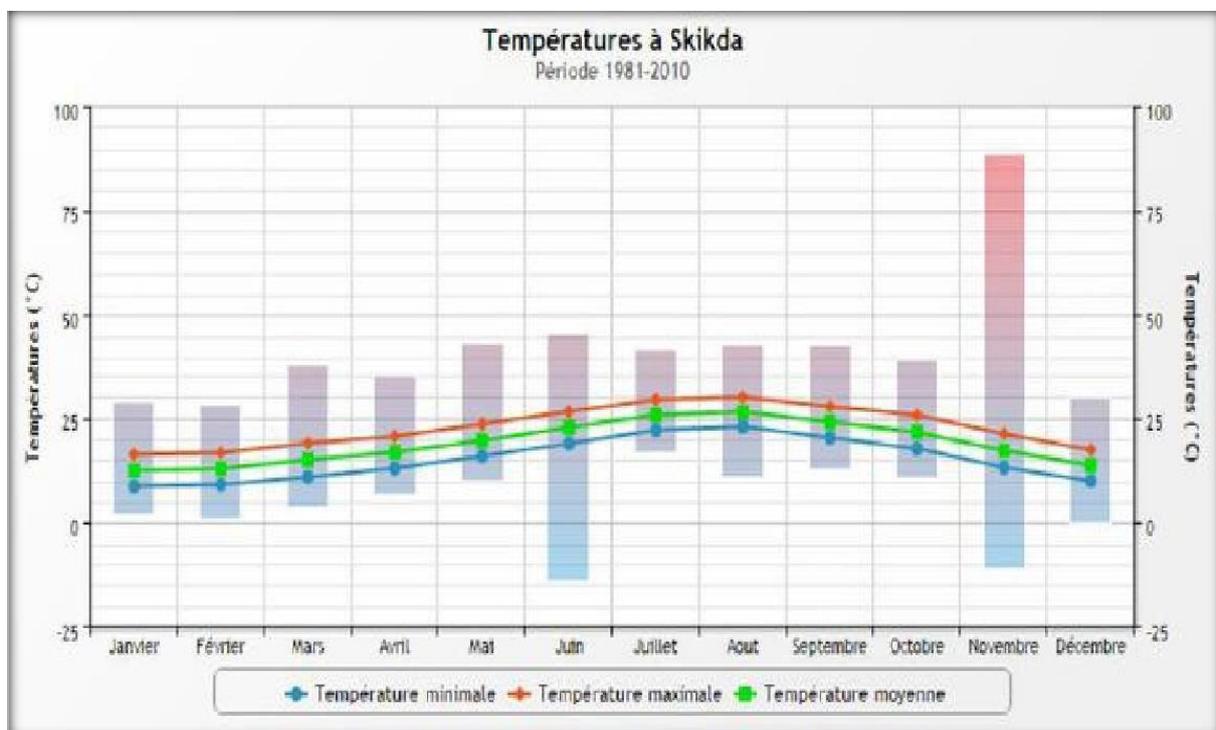
La température est l'un des facteurs majeurs de la répartition des êtres vivants **Angelie E. (2005)**. Elle a une action majeure sur leur fonctionnement **Barbault R. (2000)**.

Les valeurs mensuelles des températures maximales, minimales et les températures moyennes enregistrées dans la région de Skikda, durant une période de 29ans (1981-2010) sont représentées dans le (Tab : 01 et Fig : 03)

**Tableau 01:** Températures mensuelles minimales, maximales et moyennes exprimées en degrés Celsius (° C) dans la région de Skikda (1981-2010) **S.M.S. (2010)**.

Mois	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	Année
M	16.4	16.8	19.1	20.7	23.6	26.6	29.4	30.1	27.8	25.7	21.3	17.5	22.9
m	8.8	9.2	11.0	13.1	16.0	19.0	22.2	23.0	20.4	17.8	13.3	10.1	15.3
(M+m)/2	12.6	13.0	15.1	16.9	19.7	22.8	25.8	26.5	24.1	21.7	17.3	13.8	19.1

**M** : maxima moyen, **m** : minima moyen, **(M+m)/2**



**Figure 03:** Variation de la température moyenne mensuelle de la région de Skikda (1981-2010) **S.M.S. (2010)**.

## Chapitre I : Etude climatique et géographique de la zone d'étude

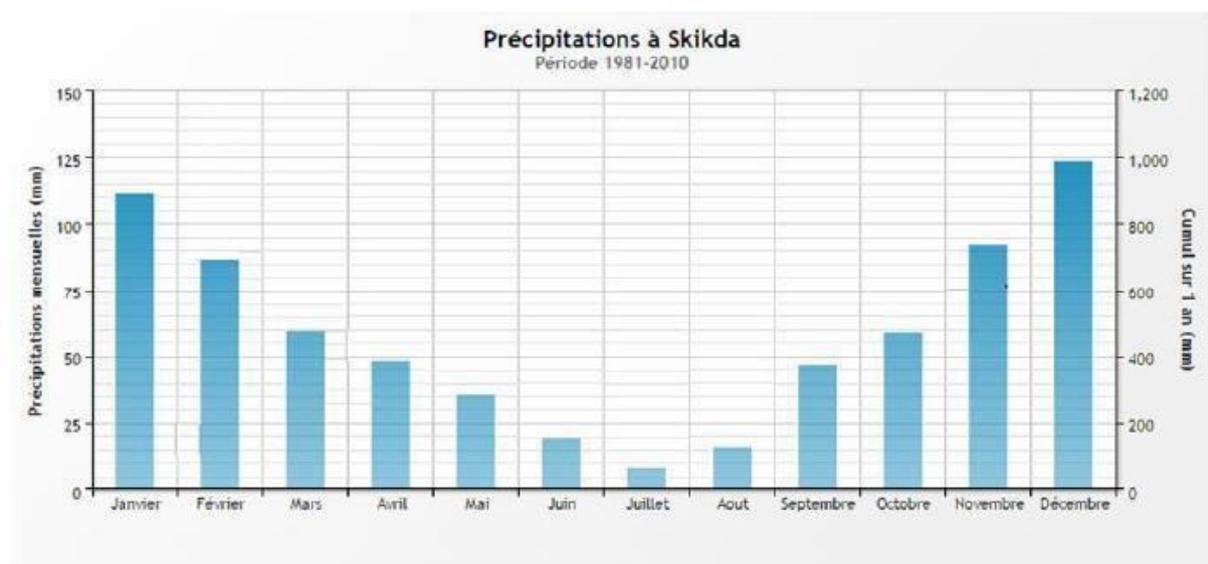
La région de Skikda est caractérisée par un climat chaud en été et frais en hiver. Les hautes valeurs estivales (températures) sont celles de Juillet et d'Aout avec respectivement 29.4°C et 30.1°C, par contre les basses valeurs d'hiver sont celles de Janvier et de Février respectivement avec 8.8°C et 9.2°C.

### 2.3. Les précipitations :

La pluviométrie constitue un facteur écologique d'importance fondamentale **Ramade F. (2003)**. Ainsi, elle exerce une influence sur la vitesse de développement des animaux, sur leur longévité et sur leur fécondité, car l'eau est indéniablement l'un des facteurs écologiques les plus importants **Stewart P. (1975)**, Les valeurs mensuelles des précipitations se sont enregistrées dans la région de Skikda, durant une période de 29 ans (1981-2010) sont représentées dans le (Tab 2 et Fig.04).

**Tableau 02** : Moyennes mensuelles des précipitations en (mm) dans la région de Skikda (1981-2010) **S.M.S. (2010)**.

Mois	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	Année
Pluies (mm)	111.5	86.4	59.4	49.2	36.2	20.3	8.3	16.4	46.8	59.2	92.3	124.0	710.2



**Figure 04** : Variation de la moyenne mensuelle des précipitations (P) de la région de Skikda (1981-2010) **S.M.S. (2010)**.

Les pluies représentent un apport très important en eau, la quantité moyenne de pluie annuelle reçue par la région de Skikda est de 710.2 mm soit une moyenne mensuelle de 59.18 mm, cette quantité est appréciable vu que la région est considérée comme l'une des plus arrosées du pays.

## Chapitre I : Etude climatique et géographique de la zone d'étude

---

### 2.5. Les vents :

Il exerce une grande influence sur les êtres vivants **Marre A. (1987)**, Les fréquences et directions des vents enregistrés pour la région de Skikda pour l'année 2013 sont données dans le tableau suivant :

**Tableau 03** : Les fréquences des vents enregistrés dans la région de Skikda **S.M.S. (2013)**.

Direction	N	NE	E	SE	S	SW	W	NW
7h	25	06	04	08	14	05	16	22
13h	26	06	03	07	15	05	17	21
18h	29	05	03	05	13	04	17	24

La direction dominante des vents au niveau de la station de la région de Skikda durant toutes les périodes de la journée est celle du Nord avec une Direction secondaire Nord-Ouest.

## Chapitre II : Etude botanique de la plante

---

### 1 .L'importance des plantes médicinales

Depuis plusieurs années, l'utilisation des plantes médicinales ou de préparations à base des 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.

### 2. Histoire de la plante *Myrtus communis* L.

#### 2 .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**).

#### 2 .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**).

#### 2 .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 poly phénoliques 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 poly phénols 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 anti oxydante des poly phénols extraits des baies du myrte pour la préparation des liqueurs en Sardaigne et en Italie.

## Chapitre II : Etude botanique de la plante

---

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 : Électrospray), en se plaçant à deux longueurs d'ondes caractéristiques de ces deux classes de composés poly phénoliques 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-Dalactoside 6-O-gallate et myricétine 3-O-a-L-rhamnoside).

### 3. Etude botanique de *Myrtus communis L.*

#### 3.1. 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.

#### 3.2. Description botanique de la plante *Myrtus communis L.*

##### 3.2.1. Le genre *Myrtus L.*

Arbuste à feuilles ovoïdes, 2à 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 Bale ovoïde 6-8 mm. Rameaux pubescents dans leur jeunesse. (**Quezel et Santa 1856**).

##### 3.2.2. 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.**

## Chapitre II : Etude botanique de la plante

---

### 3 .2.3. Distribution géographique de la plante

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



**Figure 05** : Distribution géographique de l'espèce *Myrtus communis* L. dans le monde d'après (Médail et al, 2009).

## Chapitre II : Etude botanique de la plante

---

### 3.2.4. 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

### 3.2.5. Classification phylogénétique :

**Clade :** Angiospermes

**Clade :** Dicotylédones vraies

**Clade :** Rosidées

**Ordre :** Myrtales

**Familles :** Myrtaceae

**Genre :** *Myrtus*

**Espèce :** *Myrtus communis* L.

## Chapitre III : Les métabolismes primaires et secondaires

---

### 1. 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).**

#### 1.1. 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).**

#### 1.2. 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.

#### 1.3. 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).**

#### 1.4. 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).**

### 2. 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**).

#### 2.1. 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**).

#### 2.2. 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**).

#### 2.3. 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:

##### 2.3.1. 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**).

## Chapitre III : Les métabolismes primaires et secondaires

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, méthylrique, 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 04).

**Tableau 04 : Activités biologiques des composés poly phénoliques (Bahorun, 1997)**

<b>POLYPHENOLS</b>	<b>ACTIVITES</b>
<b>Acides Phénols (cinnamiques et benzoïques)</b>	Antioxydants  Antibactériennes  Antifongiques
<b>Coumarines</b>	Protectrices vasculaires et anti œdémateuses
<b>Flavonoïdes</b>	Anti tumorales  Anti carcinogènes  Anti-inflammatoires  Hypotenseurs et diurétiques  Antioxydants
<b>Proanthocyanidines</b>	Effets stabilisants sur le collagène  Antioxydants  Antitumorales  Antifongiques  Anti-inflammatoires
<b>Tanins galliques et catéchiqes</b>	Antioxydants

### 2.3.2. Classification des composés phénoliques

#### 2.3.2.1. 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, anti radicalaires, 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 hydroxy cinnamiques (constitués d'une structure de type C6-C3) (**Barboni, 2006**).

##### 2.3.2.1.1. 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**).

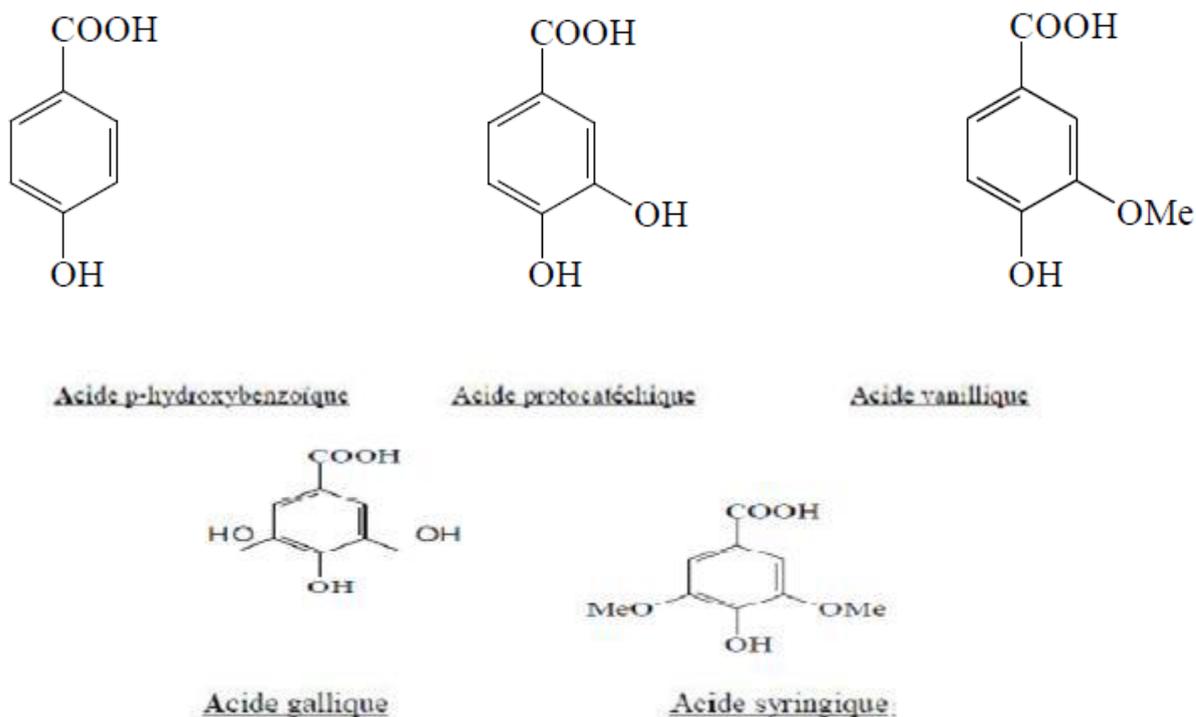


Figure 06 : Quelques dérivés de l'acide hydroxybenzoïque.

## Chapitre III : Les métabolismes primaires et secondaires

### 2.3.2.1.2. 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 férarique et l'acide cinnamique (Ribereau, 1968).

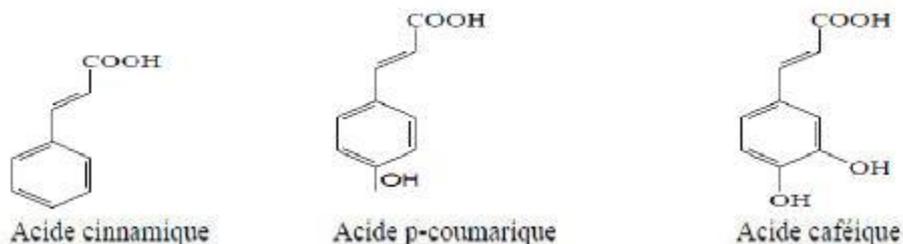


Figure 07: Quelques dérivés de l'acide hydroxycinnamique

### 2.3.2.2. 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).

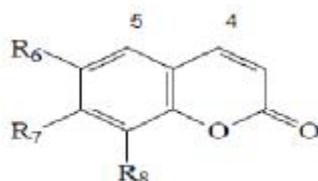


Figure 08 : Structure de base de coumarine

### 2.3.2.3. 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).

## Chapitre III : Les métabolismes primaires et secondaires

---

### 2.3.2.4. 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**).

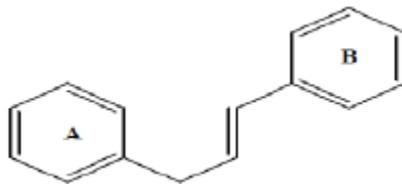
Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides (**Cavin, 1999**).

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.

### 2.3.2.5. 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 09** : Structure de base des flavonoïdes

### 2.3.2.5.1. 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 10.

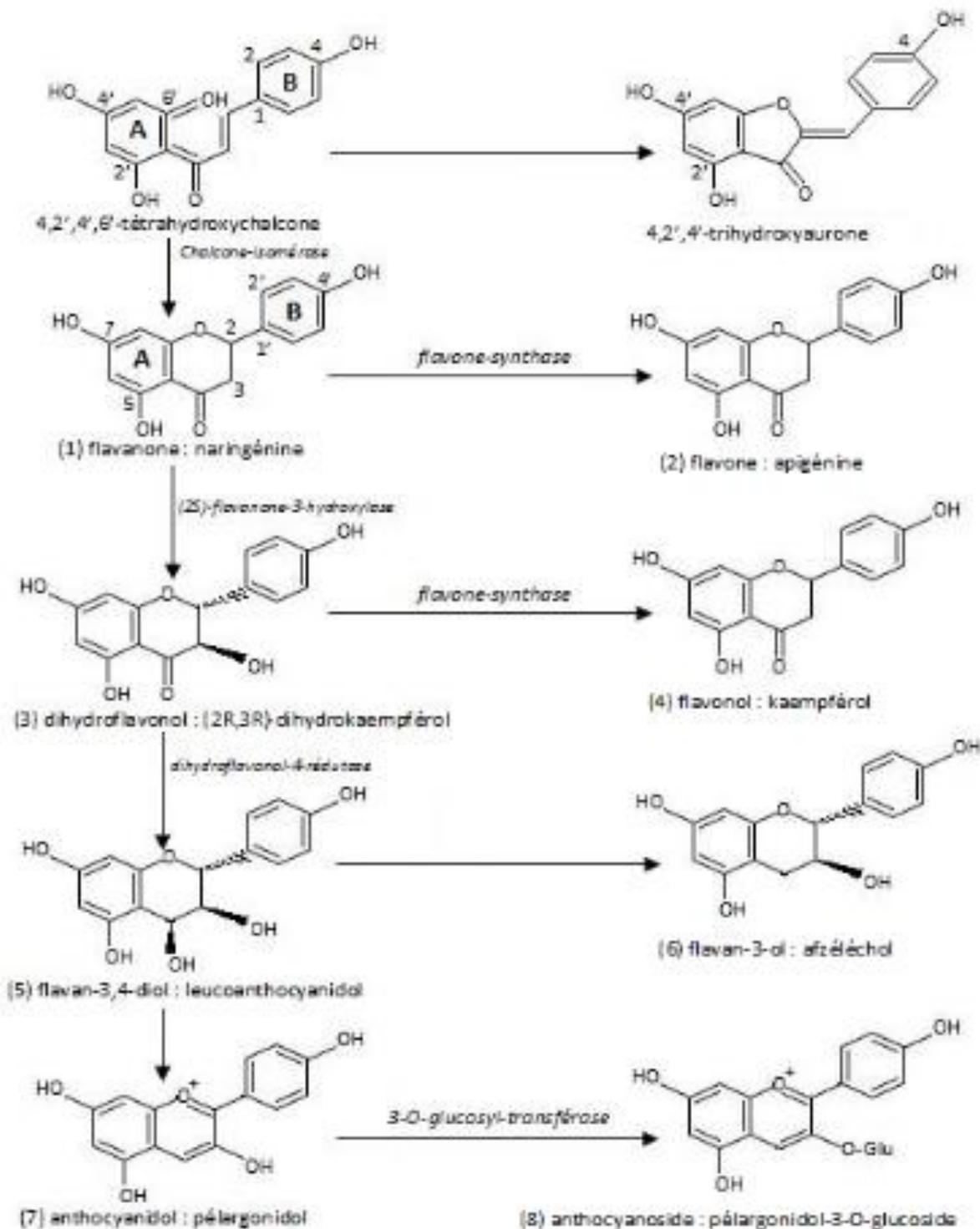


Figure 10: Biosynthèse des flavonoïdes.

## Chapitre III : Les métabolismes primaires et secondaires

---

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:

### 2.3.2.6. 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'oeil 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).

### 2.3.2.7. 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).

## Chapitre III : Les métabolismes primaires et secondaires

---

### 2.3.2.8. 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  $\beta$ -carotène, les chlorophylles, l'ubiquinone ou la plastoquinone, qu'on ne positionne généralement pas dans le métabolisme secondaire (Harbone, 1998 ; Bruneton, 1999).

### 3. 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 :

#### 3.1. Dissuader les prédateurs

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

#### 3.2. 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.

### 1. Activité antioxydants

#### 1.1. 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**).

#### 1.2. 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**).

### 2. 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 polyphénols, doivent être apportés par notre alimentation. (**Pincemail et Defraigne, 2004**).

### 3. Piègeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH●)

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ( $\alpha,\alpha$ -diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structureactivité antioxydant des composés phénoliques (**Blois, 1958 ; Brand-Williams et al, 1995**).

La réduction du radical DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517nm provoquée par la présence des extraits phénoliques. Le DPPH est initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie. Cette décoloration est représentative de la capacité des composés phénoliques à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques. Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir antiradicalaire direct de différentes substances phénoliques des extraits (**Molyneuxs, 2004**).

### 4. Réduction de fer: FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma)

Comme son nom l'indique, cette technique a été développée pour mesurer la capacité du plasma à réduire le fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) en fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ). En effet le  $Fe^{3+}$  participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. Le  $Fe^{2+}$  à un pH faible forme un complexe avec la 2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-s-triazine (TPTZ) de couleur bleue qui a une absorption maximale à 594 nm.

Ainsi, la formation de ce complexe indiquera un pouvoir réducteur et déterminera la capacité d'un composé à se comporter comme un anti-oxydant. Les valeurs sont obtenues par comparaison de l'absorbance à 594 nm du mélange réactionnel contenant l'échantillon à tester avec celle d'un mélange réactionnel contenant une concentration connue en  $Fe^{2+}$  (**Benzie et Strain, 1996 ; Pulido et al, 2000**). Ce test nous servira à évaluer l'activité anti-oxydante des composés purs uniquement.

### 2. L'activité antibactérienne :

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antibactérienne en milieu solide (MHA) dans des boites 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. **FLEMING T. et al (2000)**, L'évaluation de l'activité antibactérienne de notre extrait (décocté et infusé), ont été faite sur 6 souches bactériennes.

Les microorganismes testés sont:

*Enterococcus cloaceae*

*Staphylococcus coagulase positive*

*Enterococcus Faecalis ATCC 29212*

*Escherichia coli ATCC 25922*

*Staphylococcus aureus ATCC 25923*

*Escherichia coli (Isolée du Produit Alimentaire)*

### 1. Méthodes d'extraction :

Plusieurs méthodes sont connues pour extraire les essences aromatiques des végétaux. Les principales méthodes d'extraction sont basées sur l'entraînement à la vapeur d'eau, l'expression, la solubilité et la volatilité.

Chacune d'elles donne une image différente de la composition de l'arôme du produit. L'extrait volatil obtenu n'est jamais identique au mélange de constituants initialement présent dans les organes sécréteurs du végétal. Au mieux, il s'en rapproche.

De nos jours, il n'existe pas de méthode présentant le même degré d'efficacité à l'égard d'une part de molécules très volatiles ou peu polaires et d'autre part de molécules peu volatiles ou très polaires. **Richard H.M.J. et Etievant P. (1997).**

Le choix de la méthode la mieux adaptée à l'extraction des arômes d'un végétal se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, des caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire, de l'usage de l'extrait, de manière à pouvoir minimiser les distorsions inévitables entre l'extrait et l'arôme du départ au cours de l'extraction.

#### 1.1. Extraction par les solvants :

Elles sont basées sur le fait que les essences aromatiques sont solubles dans la plupart des solvants organiques. L'extraction se fait dans des extracteurs de construction variée, en continu, semi-continu ou en discontinu.

Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui sera ensuite éliminé par distillation sous pression réduite. L'évaporation du solvant donne la concrète: mélange odorant de consistance pâteuse. L'extraction de la concrète avec l'alcool conduit à l'absolue.

Le choix du solvant est effectué en tenant compte des paramètres techniques, économiques et des propriétés physico-chimiques des solvants, telles que : la température d'ébullition, la constante diélectrique, la miscibilité avec d'autres solvants, etc.

- La constante diélectrique est une bonne indication de la polarité du solvant.
- Le point d'ébullition ne devra pas être trop élevé pour faciliter l'élimination ultérieure à pression réduite tout en réduisant les pertes en arômes à leur minimum.
- Le pouvoir solvant: chaque solvant n'a pas la même affinité vis-à-vis de chacun des composés organiques participant à l'arôme. La conséquence est que le pourcentage de récupération de chacun des éléments du mélange et la qualité de l'extrait aromatique obtenu seront variables et fonction du type de solvant utilisé **Richard H.M.J. et Etievant P. (1997).**

D'autres critères comme la stabilité, l'inertie chimique, la sécurité de manipulation (Atoxicité ininflammabilité), etc., du solvant sont aussi importants. Les solvants les plus utilisés sont les hydrocarbures aliphatiques (éther de pétrole, hexane, pentane, butane liquide, etc.), les solvants halogénés (dérivés chlorés et fluorés du méthane et de l'éthane).

## Chapitre V : Méthodes d'extraction

---

L'extraction par les solvants est très coûteuse à cause du prix de l'équipement et de la grande consommation des solvants. Un autre inconvénient majeur de l'extraction par les solvants est leur manque de sélectivité de ce fait, de nombreuses substances lipophiles peuvent se retrouver dans les concrètes (huiles fixes, phospholipides, caroténoïdes, cires, coumarines, etc.) et imposer une purification ultérieure. <http://www.cevenat.fr>

Et d'autre méthode par exemple :

- Extraction par enfleurage
- Extraction par CO2 liquide **Bruneton J. (1993).**
- Extraction par expression

### 1.2. Extraction par la séparation des principes actifs :

Les principes actifs d'une plante médicinale sont des agents chimiques capables d'une activité. La présence de ces composants souvent en quantité extrêmement faible dans la plante impose des séparations généralement délicates.

La décoction, l'infusion et la macération sont les méthodes de séparation les plus utilisées pour l'extraction globale des principes actifs et qui sont suivies par des séries de séparation chromatographique pour atteindre une matière pure d'un principe actif.

#### 1.2.1. Décoction :

La décoction est une méthode d'extraction des principes actifs d'une préparation généralement végétale par dissolution dans un solvant approprié (généralement l'eau), ce qui suppose que ces substances ne soient pas thermolabiles.

Elle s'applique généralement aux parties les plus dures des plantes : racines, graines, écorce, bois. La décoction est utilisée en herboristerie, en teinture, en brasserie et en cuisine. Le terme désigne également les préparations obtenues par cette méthode, généralement des tisanes. La décoction consiste à chauffer l'élément avec de l'eau, jusqu'à ce que cette dernière soit bouillante, pour en extraire les principes actifs.

Pour réaliser une décoction, on prépare les parties de plantes recherchées, coupées et fractionnées si nécessaire, et on les place dans un récipient rempli d'eau. Le tout est porté à ébullition et maintenu à température pendant un temps variable, généralement entre deux et quinze minutes. À la fin, on laisse tiédir et on filtre le liquide à l'aide d'une passoire avant de l'utiliser. La décoction ne doit pas être confondue avec l'infusion ni avec la macération.

La décoction permet une extraction des principes actifs plus complète que l'infusion mais ne s'applique pas partout, la température modifiant ou dégradant certains principes. La décoction dure en moyenne quelques minutes. **Sophie.A , Eherhart.N (2003).**

## Chapitre V : Méthodes d'extraction

---

### 1.2.2. Infusion :

L'infusion est une méthode d'extraction des principes actifs ou des arômes d'un végétal par dissolution dans un liquide initialement bouillant que l'on laisse refroidir. Le terme désigne aussi les boissons préparées par cette méthode, comme les tisanes, le thé par exemple. Le solvant n'est pas nécessairement de l'eau, cela peut être également une huile ou un alcool. **Sophie.A , Eherhart.N. (2003).**

### 1.2.3. Macération :

La macération consiste à laisser tremper une plante sèche dans un solvant approprié pendant plusieurs heures, jours, voire semaines. L'intérêt de la macération est généralement la conservation des principes actifs durant le procédé. **Sophie.A , Eherhart.N. (2003).**

## 2. Les méthodes analytiques :

### 2.1. Historique :

C'est en 1906 que le terme de chromatographie (du grec *krôma*, couleur et *graphein*, écrire) est apparu suite à l'expérience du botaniste russe Mikhaïl Semenovitch Tswett qui sépara les pigments végétaux colorés d'épinard sur une colonne remplie de carbonate de calcium et d'alumine à l'aide d'éther de pétrole. **Tswett M. (1908)** Il a alors observé la formation de bandes de couleurs différentes (vert, orange, jaune...) sur la colonne. Il a également défini les termes : chromatogramme, élution et rétention.

En 1931, Khun et Lederer utilisent la méthode de Tswett, pratiquement oubliée, pour réaliser une séparation préparative des carotènes et des xanthophylles qui marque la redécouverte de la chromatographie, qui se développe ensuite rapidement grâce aux travaux de Brockmann, Karrer, Winterstein et Zechmeister. **Kuhn R., Lederer E et Kuhn R., Winterstein A., Lederer E.**

En 1941, Martin et Synge développent la pratique et la théorie de la chromatographie, **Martin A.J.P., Synge R.L.M. (1941)**, ils sont récompensés en 1952 par le Prix Nobel de Chimie pour leurs travaux sur la chromatographie de partage sur gel de silice.

Les techniques chromatographiques telles qu'on les connaît aujourd'hui ont été développées en 1952 pour la chromatographie en phase gazeuse par Martin et James, **Arpino P. et al (1995)** et en 1967 pour la chromatographie liquide haute pression, qui s'appellera ensuite chromatographie liquide à haute performance (HPLC), avec les travaux de Huber et Huzsman. **Rosset R., Caude M., Jardy A. (1991).**

Depuis la mise en place de ces techniques séparatives, les colonnes utilisées n'ont cessé d'évoluer : la première séparation chirale sur une colonne HPLC a été rapportée en 1979 ; la taille des particules des colonnes HPLC ne cesse de diminuer pour en accroître les performances **Richardin P.**

## Chapitre V : Méthodes d'extraction

---

### 2.2. Principes :

#### 2.2.1. Principe général de la chromatographie :

La chromatographie est une technique analytique qui permet la séparation des constituants d'un mélange en phase homogène liquide ou gazeuse. Le principe repose sur l'équilibre de concentrations des composés présents entre deux phases en contact : la phase stationnaire (emprisonnée dans la colonne) et la phase mobile qui se déplace.

La séparation est basée sur l'entraînement différentiel des constituants présents dans la colonne. Ces derniers la parcourent avec des temps proportionnels à leurs propriétés intrinsèques (taille, structure...) ou à leur affinité avec la phase stationnaire (polarité...). A leur arrivée en bout de colonne, le détecteur mesure en continu la quantité de chacun des constituants du mélange. **Caude M., Jardy A. (1994).**

La chromatographie peut être analytique ou préparative. Dans le cas de la chromatographie analytique, l'objectif est d'identifier des solutés qualitativement et/ou quantitativement. Pour cela, on associe la chromatographie à d'autres techniques analytiques chimiques ou physicochimiques (la spectrométrie de masse dans notre cas) : c'est le couplage. La chromatographie préparatrice est utilisée lorsque l'on désire purifier un produit, soit à l'issue d'une synthèse, soit dans le but d'utiliser d'autres techniques analytiques, comme la RMN par exemple.

Il existe deux grands types de chromatographie, en fonction de la phase mobile utilisée : la chromatographie en phase gazeuse (GC) et la chromatographie en phase liquide (LC), qui regroupe la chromatographie sur colonne à pression atmosphérique, ou sous pression (communément nommée HPLC pour *High Performance Liquid Chromatography*), la chromatographie d'échange d'ions, d'exclusion stérique ou encore la chromatographie sur couche mince. **Bouchonnet S., Libong D. (2004).**

#### 2.2.2. Objectif d'une méthode chromatographique :

Lorsqu'il développe une méthode, l'objectif du chromatographe est triple : Obtenir des pics chromatographiques les plus fins possible (grande efficacité), les mieux séparés possibles (bonne résolution), en un temps d'analyse minimum. La notion de résolution est directement liée à celles d'efficacité et de séparation.

De l'efficacité de la colonne dépend la dispersion de l'ensemble des molécules d'un soluté autour de son temps de rétention : Meilleure est l'efficacité et plus fins sont les pics chromatographiques. La qualité de la séparation dépend également des rétentions relatives des différents Analytes en mélange. La résolution augmente **Rouessac F., Rouessac A., Cruché D**

### 3. Chromatographie en phase gazeuse :

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique très répandue, dont les premières applications sont maintenant vieilles de plus de 60 ans. Son développement qui n'a cessé depuis, est dû à son extrême sensibilité, à sa polyvalence, à la rapidité de mise au point des analyses nouvelles et aux possibilités d'automatisation, qui augmentent encore plus son intérêt.

## Chapitre V : Méthodes d'extraction

---

La séparation sur la colonne se faisant sur des composés qui doivent être à l'état gazeux, l'analyse des liquides ou solides impose de pouvoir les transformer à l'état de vapeur par chauffage. C'est sans doute la principale contrainte à laquelle il faut penser avant de choisir cette technique, puisqu'elle limite son emploi à l'étude des composés moléculaires thermostables et suffisamment volatils.

La très grande sensibilité des détecteurs permet de déceler des quantités de l'ordre du pico gramme pour certains composés. Les applications sont très nombreuses dans tous les domaines et les développements de la chromatographie gazeuse à grande vitesse ou multidimensionnelle rendent cette technique toujours plus attractive. **Antonot, E; Marchal, R. (1998).**

### 3.1. Principe d'une installation de CPG :

Un appareil de CPG réunit dans un bâti unique, outre les trois modules classiques, injecteur, colonne et détecteur, un four thermostaté qui permet de porter, si nécessaire, la colonne à une température élevée (fig. 1). La phase mobile qui entraîne l'échantillon dans la colonne est un gaz, appelé gaz vecteur. Les débits, contrôlés avec précision, permettent une grande répétabilité des temps de rétention.

L'analyse débute à l'instant où on introduit une très petite quantité de l'échantillon, sous forme liquide ou gazeuse, dans l'injecteur, qui a la double fonction de le porter à l'état de vapeur et de l'amener dans le flux gazeux en tête de la colonne. Celle-ci se présente comme un tube de faible section enroulé sur lui-même, de 1 à plus de 100 m de longueur suivant les cas et contenant la phase stationnaire.

Cette colonne est placée dans une enceinte à température régulée. Elle peut servir à des milliers d'injections successives. La phase gazeuse qui a traversé la colonne passe dans un détecteur avant de sortir à l'air libre.

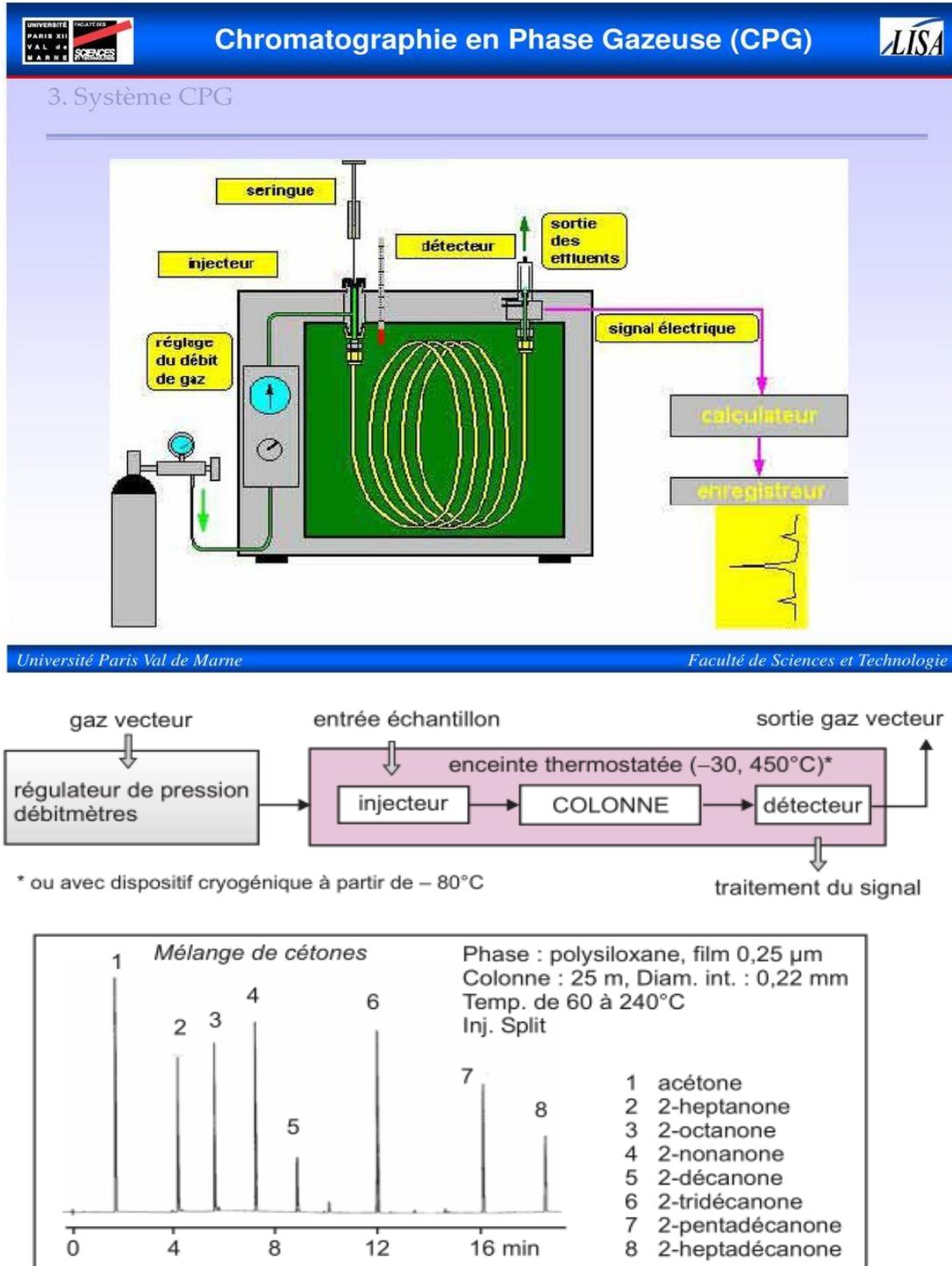
Certains modèles de chromatographes ont une alimentation autonome ainsi qu'une taille réduite pour faciliter l'emploi en milieu extérieur, sur le terrain. En CPG il y a quatre paramètres opérationnels pour une phase stationnaire donnée : L, longueur de la colonne et u, vitesse de la phase mobile (qui conditionnent N), T température de la colonne et b rapport de phase (qui conditionnent k). Les réglages du chromatographe permettent d'agir sur T et sur u, donc sur l'efficacité et sur les facteurs de rétention. **Antonot, E; Marchal, R. (1998).**

L'analyse débute à l'instant où on introduit une très petite quantité de l'échantillon, sous forme liquide ou gazeuse, dans l'injecteur, qui a la double fonction de le porter à l'état de vapeur et de l'amener dans le flux gazeux en tête de la colonne. Celle-ci se présente comme un tube de faible section enroulé sur lui-même, de 1 à plus de 100 m de longueur suivant les cas et contenant la phase stationnaire.

Cette colonne est placée dans une enceinte à température régulée. Elle peut servir à des milliers d'injections successives. La phase gazeuse qui a traversé la colonne passe dans un détecteur avant de sortir à l'air libre. Certains modèles de chromatographes ont une alimentation autonome ainsi qu'une taille réduite pour faciliter l'emploi en milieu extérieur, sur le terrain.

## Chapitre V : Méthodes d'extraction

En CPG il y a quatre paramètres opérationnels pour une phase stationnaire donnée :  $L$ , longueur de la colonne et  $u$ , vitesse de la phase mobile (qui conditionnent  $N$ ),  $T$  température de la colonne et  $b$  rapport de phase (qui conditionnent  $k$ ). Les réglages du chromatographe permettent d'agir sur  $T$  et sur  $u$ , donc sur l'efficacité et sur les facteurs de rétention. **Antonot, E; Marchal, R. (1998).**



**Figure 11 :** Une installation de CPG. Un chromatographe commercial, le modèle 6890 de la Société Agilent Technologies. L'instrument représenté comporte également un porteéchantillons et un injecteur automatique. Schéma fonctionnel d'un appareil de CPG  
Chromatogramme d'un mélange de cétones **Antonot, E; Marchal, R. (1998).**

## Chapitre V : Méthodes d'extraction

### 4. Chromatographie sur couche mince :

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse. Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption. Les principaux éléments d'une séparation chromatographique sur couche mince sont :

- La cuve chromatographique : un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche.
- La phase stationnaire.
- L'échantillon.
- L'éluant : un solvant pur ou un mélange : il migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon. **Lagnika, L. (2005)**.

Le rapport frontal (Rf) est déterminé pour chaque constituant comme suit :

$$R_f = d/D$$

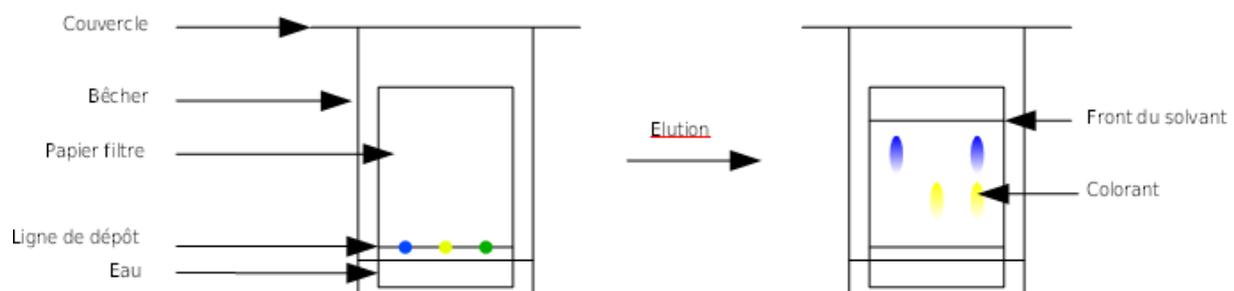
**d** : Distance parcourue par le constituant.

**D** : Distance parcourue par le front de l'éluant Le Rf est caractéristique d'une substance donnée pour un éluant déterminé sur un support « phase stationnaire » donné.

Le Rf est le même, que le constituant soit pur ou dans un mélange.

Le Rf ne dépend pas de la concentration du constituant dans le mélange

<https://fr.wikipedia.org/wiki/>



**Figure 12** : une expérience de chromatographie **Professeur Jean-Louis Cuq. (2001)**.

### 5. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) :

Parmi les techniques chromatographiques dont la phase mobile est un liquide, la chromatographie liquide haute performance (CLHP) est la plus connue. Son champ d'application recouvre une grande partie du domaine de la chromatographie en phase gazeuse auquel s'ajoute celui de l'analyse des composés thermosensibles ou de masses moléculaires à la fois très grandes et même polaires.

## Chapitre V : Méthodes d'extraction

Son succès est dû à la possibilité d'agir de manière très précise sur la sélectivité entre les composés par le choix de la colonne et de la composition de l'éluant, c'est-à-dire en exploitant les interactions soluté/phase mobile/phase stationnaire.

L'efficacité des colonnes est moindre qu'en CPG, mais l'utilisation de phases chirales ou des nouvelles phases stationnaires opérant suivant plusieurs modes, les techniques par appariement d'ions ainsi que d'interaction hydrophobe accroissent encore plus les possibilités de la CLHP. Enfin la miniaturisation de la technique (nano chromatographie) a facilité son association avec la spectrométrie de masse. **Antonot, E; Marchal, R. (1998).**

### 5.1. Principe de la HPLC :

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution d'abord, puis elle sera introduite dans la phase mobile liquide (éluant). Grâce à la répartition sélective des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire, chaque soluté est donc soumis à une force de rétention exercée par la phase stationnaire, et une force de mobilité due à la phase mobile. Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La phase mobile, poussée par une pompe sous forte pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté à travers le système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne, grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont représentés par des pics.

L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme. **Imane H. (2013).** Le mécanisme de la séparation chromatographique s'explique par les différences de répartition des molécules des composés d'un mélange entre deux phases non-miscibles : l'une mobile et l'autre stationnaire. Ce principe est traduit par le schéma suivant :

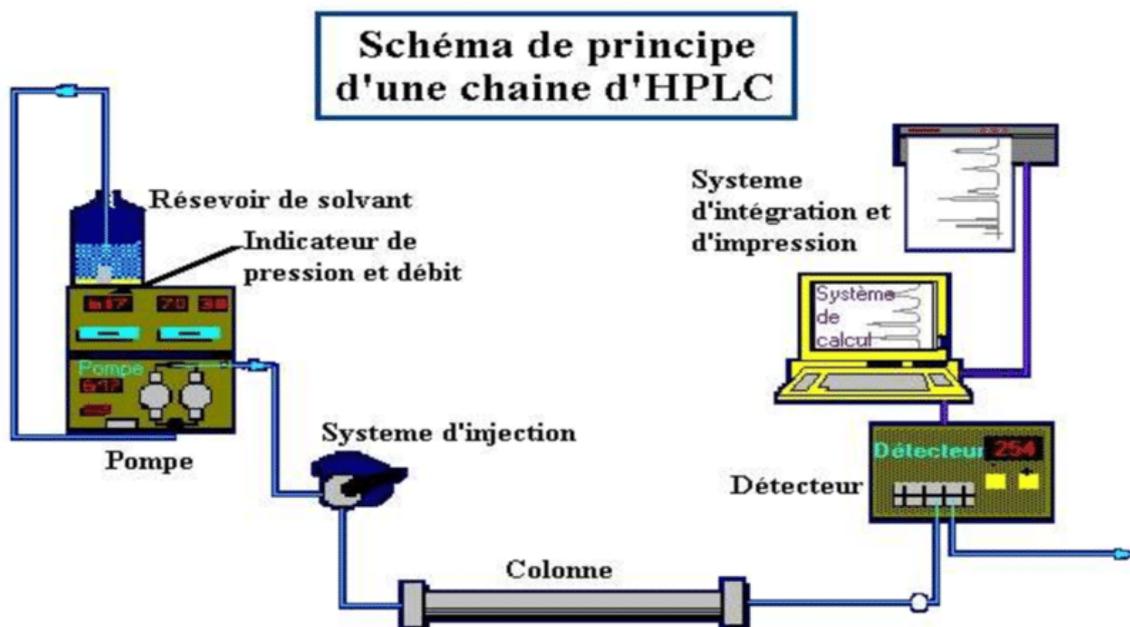


Figure 13 : Principe de fonctionnement d'une chaîne HPLC HOPKINS W. G. (2003)

### 1. Matériel végétal :

#### 1. 1. Le moment de récolte :

Les échantillons ont été récoltés dans la région de Collo wilaya de Skikda en Avril 2019.



**Figure 14 :** La plante *Myrtus communis L.*

#### 1.2. Le séchage :

Pour assurer une bonne conservation, afin de favoriser l'inhibition de toute activité enzymatique, d'éviter la dégradation de certains constituants, on a séché la plante à l'air libre, à l'abri de la lumière pendant quelques semaines. Le matériel végétal (feuilles) a été découpé en petits morceaux avant son utilisation.

Le matériel végétal a été broyé très finement à l'aide d'un broyeur jusqu'à l'obtention d'une poudre végétale, pour l'utilisation dans la partie de l'identification et de recherche de coumarine, et quinine cette dernière est conservé à température ambiante.

#### Les conditions de récolte et conservation :

- La conservation des substances actives est plus élevée dans les plantes jeunes que les plantes adultes.
- Récolter uniquement les belles saines plantes.
- Éviter le sac en plastique qui avec la vapeur d'eau émise par les plantes permettraient la prolifération de champignons.
- Il est préférable de stocker les plantes dans un endroit à une température et une humidité relativement constantes.

### 1. L'étude phytochimique :

#### 1.1. Epuisement du matériel végétal avec de l'eau chaude

Dans un ballon monocol, surmonté d'un réfrigérant, 10 g de matériel végétal est mis en présence de 60 ml d'eau. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Ensuite, le mélange est filtré et l'extrait aqueux est soumis aux tests suivants :

##### 1.1.1. Amidon

Le test effectué consiste :

✓ Chauffer 5 ml de l'extrait aqueux avec 10 ml d'une solution de NaCl saturée dans un bain-marie jusqu'à ébullition.

✓ Ajouter quelques gouttes du réactif d'amidon.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue violacée (**Bruneton, 1999**).

##### 1.1.2. Saponosides

La détection des saponosides est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2 ml de l'extrait aqueux, puis la solution est fortement agitée. Ensuite, le mélange est laissé pendant 20 minutes et la teneur en saponosides est évaluée :

✓ Pas de mousse = test négatif

✓ Mousse moins de 1 cm = test faiblement positif

✓ Mousse de 1-2 cm = test positif

✓ Mousse plus de 2 cm = test très positif (**Trease et Evans, 1987**)

##### 1.1.3. Tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, 1 ml de l'extrait aqueux, 1 ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de  $FeCl_3$  diluée. L'apparition d'une coloration vert foncée ou bleu-vert indique la présence des tanins (**Trease et Evans, 1987**).

#### 1.2. Epuisement du matériel végétal avec l'éthanol

Dans un ballon monocol, surmonté d'un réfrigérant, 10 g de matériel végétal est mis en présence de 60 ml d'éthanol. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Ensuite, le mélange est filtré et l'extrait éthanolique est soumis aux tests suivants :

##### 1.2.1. Flavonoïdes

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5 ml de l'extrait éthanolique avec 1 ml d'HCl concentré et 0,5 g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe après 3 minutes (**Debrayb et al., 1971 ; Paris et al, 1969**).

## Deuxième Partie : Matériel et Méthodes

---

### 1.2.2. Tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, à 1 ml de l'extrait éthanolique, 2 ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de  $\text{FeCl}_3$  diluée. Un test révélé par l'apparition d'une coloration bleu- noire (tanins galliques), bleu-verte (tanins cathéchiques) (**Trease et Evans, 1987**).

### 1.2.3. Composés réducteurs

Leur détection consiste à traiter 1 ml de l'extrait éthanolique avec 2 ml d'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling, puis chauffer. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge-brique (**Trease et Evans, 1987**).

## 2 Autres métabolites secondaires

### 2.1. Coumarines

1 g d'échantillon de la poudre végétal est placé dans un tube à essai en présence de quelques gouttes d'eau distillée. Le tube est recouvert avec un papier imbibé d'une solution de  $\text{NaOH}$  et porté dans un bain marie pendant quelques minutes. Puis on ajoute 0,5 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  dilué (10%) et on va mettre deux taches sur un papier filtre qui sont examinées sous la lumière ultraviolette. La fluorescence des taches confirme la présence des coumarines (**Rizk, 1982**).

### 2.2. Stérols et triterpènes

Elle se fait sur une macération de 24 h à 5 % dans l'éther. L'extrait éthérique est ensuite évaporé à sec et repris avec de l'anhydride acétique puis du chloroforme. Déposer au fond du tube contenant l'extrait de l'acide sulfurique. En cas de réaction positive il se forme un anneau rouge-brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides, la couche surnageante était verte ou violette (**Trease et Evans, 1987**).

### 2.3. Alcaloïdes

Nous avons procédé à une macération sous agitation pendant 24 h de 10 g de la poudre végétale dans 50 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dilué au 1/10 à la température ambiante du laboratoire. Après filtration sur un papier lavé à l'eau distillée et de manière à obtenir environ 50 ml de filtrat, 1 ml du macéré est introduit dans deux tubes à essai puis 5 gouttes de réactif de Mayer ont été ajouté dans le premier tube et 5 gouttes de réactif de Wagner ont été ajouté dans le deuxième. La présence d'une turbidité ou d'un précipité, après 15 minutes indique la présence d'alcaloïdes (**Paris et al, 1969**).

### 2.4. Anthocyanes

2 ml d'infusé aqueux sont ajoutés à 2 ml de  $\text{HCl}$  2N. L'apparition d'une coloration rose- rouge qui vire au bleu violacé par addition d'ammoniac indique la présence d'anthocyanes (**Debrayb et al, 1971 ; Paris et al, 1969**).

### 3. Extraction des composés phénoliques

#### 3.1. Préparation des extraits bruts méthanoliques

1g de matériel végétal de chaque partie de la plante (feuille, tige et fruit) est placé dans un erlenmeyer dans 20 ml de méthanol pendant 24 h, après filtration, les solutions méthanoliques sont évaporées à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif type Buchi R-200 à 60°C. Les résidus secs pesés sont repris par 3 ml du méthanol (Figure 15). Avant l'extraction des différents composés phénoliques, les feuilles de *Myrtus communis* L., vont subir une macération dans le chloroforme pendant 6 heures afin d'éliminer la chlorophylle (Matkowski et Piotrowska, 2006).

- **Calcul des rendements en extraits secs**

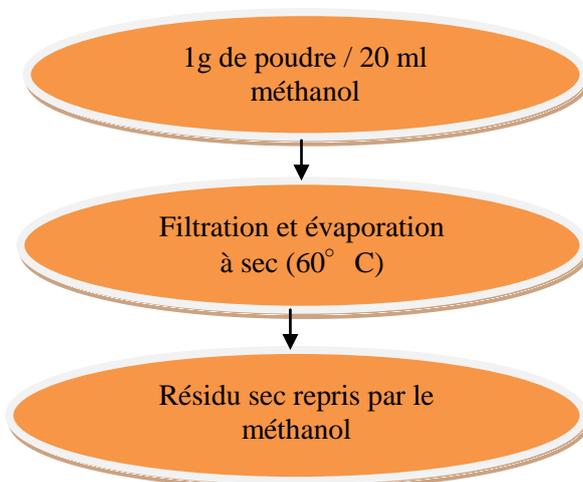
Nous pouvons déterminer le rendement de la plante en extrait sec en calculant le rapport suivant :

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{P1 - P2}{P3} \times 100$$

**P1** : poids du ballon après évaporation ;

**P2** : poids du ballon avant évaporation ;

**P3** : poids de la matière végétale de départ.



**Figure 15** : Protocole d'extraction des extraits bruts

## Deuxième Partie : Matériel et Méthodes

### 3.2. Extraction des flavonoïdes (fractions acétate d'éthyle et 1-butanol)

L'extraction des flavonoïdes a été réalisée par la méthode décrite par **Bekkara et al, 1998**. Les solvants que nous avons employé pour le partage liquide-liquide sont : l'acétate D'éthyle et le 1-butanol.

Les résidus secs obtenus par évaporation du filtrat méthanolique de chaque partie de la plante étudiée, sont partagés entre 10 ml d'acétate d'éthyle et le même volume d'eau distillée dans une ampoule à décanter. Après agitation et décantation des deux phases, la phase d'acétate d'éthyle est récupérée et la phase aqueuse est à nouveau partagée avec 10 ml d'acétate d'éthyle. La phase d'acétate d'éthyle est récupérée, additionnée à la précédente et séchée par un évaporateur rotatif sous pression réduite à 60°C.

Le résidu sec est repris par quelques millilitres de méthanol et conservé à 4°C. Cette fraction est la phase d'acétate d'éthyle. La phase aqueuse issue de l'extraction avec l'acétate d'éthyle est, quant à elle partagée avec 10 ml du 1-butanol. L'opération est répétée deux fois et la phase 1-butanol est séchée au rotavapeur à 60°. Le résidu sec est repris par quelques millilitres du méthanol et conservé à + 4°C. Cette fraction est la phase butanolique (Figure 16).

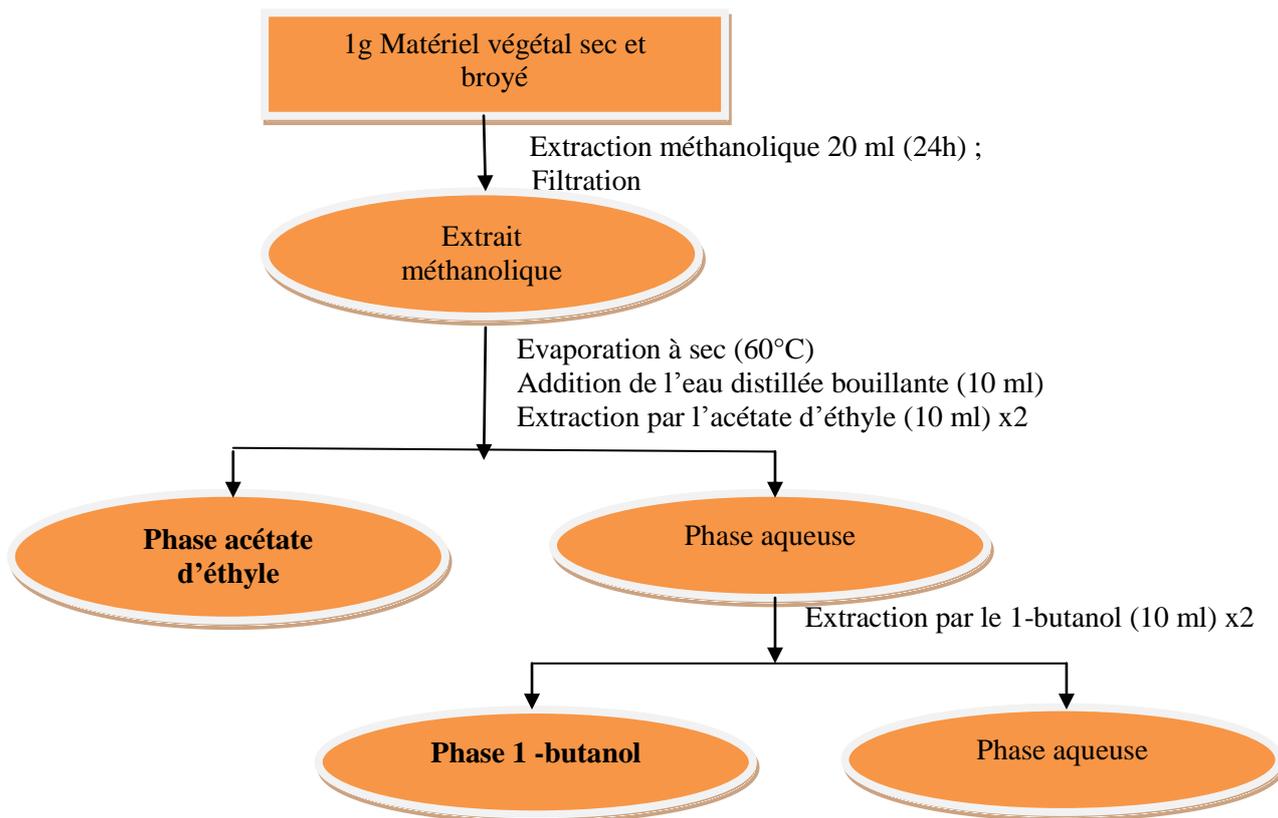
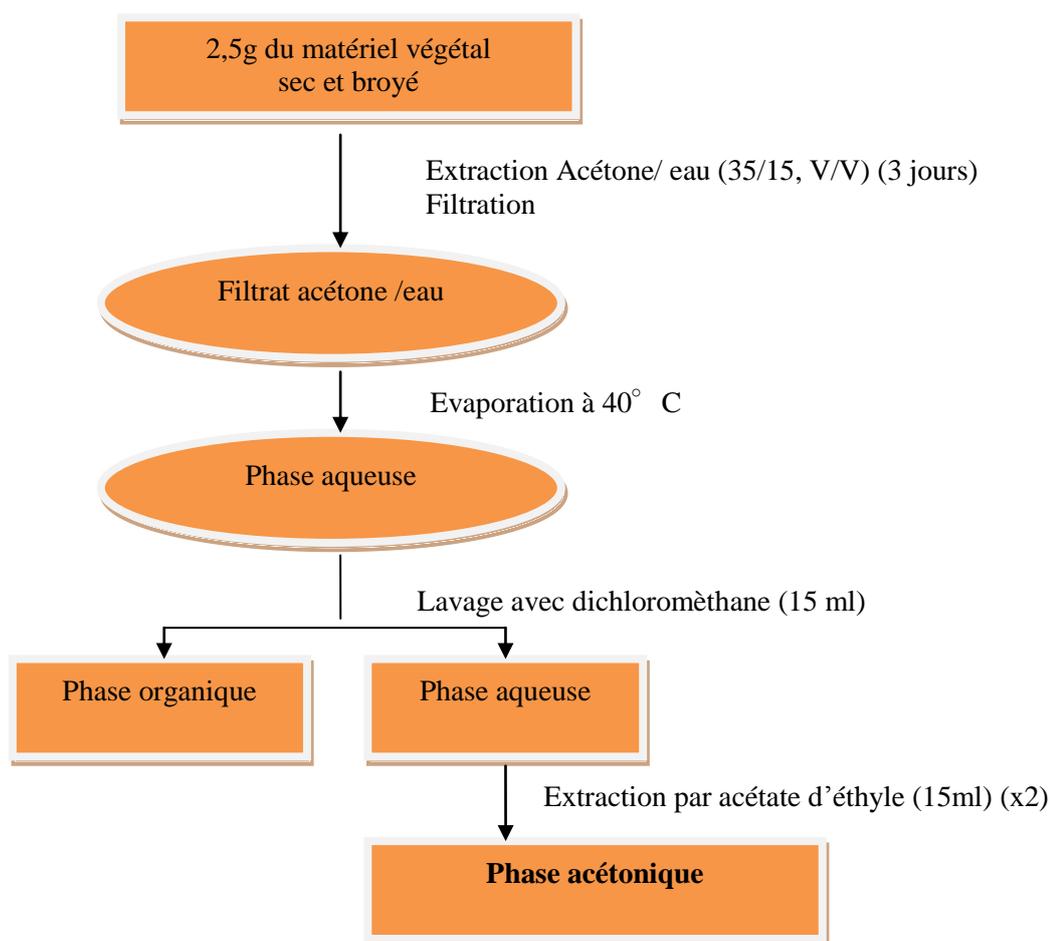


Figure 16 : Protocole d'extraction des flavonoïdes

### 3.3. Extraction des tanins

L'extraction des tanins a été effectuée selon la méthode adaptée par **Zhang *et al*, 2008**. 2,5g de poudre de matériel végétal (feuille, tige et fruits) a été extraite par 50 ml du mélange acétone/eau distillée (35/15, V/V) durant trois jours à une température ambiante. La solution est filtrée et évaporée à 40°C par un rotavapeur type buchi r-200 pour éliminer l'acétone puis, la phase aqueuse est lavée par 15 ml de dichlorométhane afin d'éliminer les pigments et les lipides. Après la séparation de la phase organique, la phase aqueuse a été extraite deux fois avec 15 ml d'acétate d'éthyle. Le mélange des deux phases est évaporé à sec à 40°C par un rotavapeur type Buchi R-200 puis pesé et repris par 3 ml de méthanol (Figure 17).



**Figure 17:** Protocole d'extraction des tanins

### 3.4. Extraction des anthocyanes

L'extraction des anthocyanes a été réalisée selon la méthode décrite par **Longo *et al*, 2007**. Après la mise en évidence des anthocyanes dans les fruits de Myrte, l'extraction a été faite par une macération de 2,5 g des fruits en poudre dans 12,5 ml d'une solution de d'HCl/méthanol (v/v) à 0,1% pendant 20 h à une température ambiante. Après filtration le résidu ainsi obtenu est lavé avec 12.5 ml de d'HCl/méthanol (v/v) à 0,1%, puis l'extrait a été évaporé à sec par un rotavapeur type Buchi R-200 à 30°C. Le résidu sec est repris par 3 ml du méthanol .

### 4. Activité antioxydante

#### 4.1. Réduction du fer : FRAP (Ferric reducing antioxidant power) :

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) présent dans le complexe  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). En effet le  $\text{Fe}^{3+}$  participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm (**Oyaizu, 1986**). Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Hubert, 2006**).

##### ➤ Mise en œuvre pratique

Le pouvoir réducteur a été déterminé suivant la méthode préconisée par **Oyaizu (1986)**. En effet, 1 ml de différentes concentrations de chaque extrait (0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 mg) dilué dans l'eau distillée est mélangé avec 2,5 ml de la solution tampon phosphate (0,2 M ; pH 6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) à 1%. Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 30 min. après, 2,5 ml de l'acide trichloracétique (10%) est additionné. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. 2,5 ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml  $\text{FeCl}_3$  (0,1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience dans les mêmes conditions opératoires.

##### ➤ Expression des résultats

Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée par la majorité des auteurs est de tracer les graphes des absorbances obtenues en fonctions des différentes concentrations utilisées pour les différentes fractions des trois parties de la plante étudiée. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des fractions testées.

#### 4.2. Piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) :

Le DPPH• (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH• est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH•, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon (Figure 16). (**Parejo et al, 2002**).

## Deuxième Partie : Matériel et Méthodes

---

### ➤ Mise en œuvre pratique

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par **Benhammou et al, (2007)**.

Un volume de 50 µl de différentes concentrations de chaque extrait est ajouté à 1,950 ml de la solution méthanoïque du DPPH (0,025 g/l) fraîchement préparée. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 50 µl du méthanol avec 1950 ml d'une solution méthanoïque de DPPH à la même concentration utilisée.

Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à la température ambiante la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

### ➤ Expression des résultats :

#### ✓ Calcul des pourcentages d'inhibitions :

Nous calculons ainsi les pourcentages d'inhibition par la formule suivante :

$$I \% = ((A_c - A_t) / A_c) * 100$$

**A<sub>c</sub>** : absorbance du contrôle ;

**A<sub>t</sub>** : absorbance du test effectué

#### ✓ Calcul des IC<sub>50</sub> :

IC<sub>50</sub> ou concentration inhibitrice de 50 % (aussi appelée EC<sub>50</sub> pour Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH. Les IC<sub>50</sub> sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées

### 5. Etude de l'activité antibactérienne :

#### 5.1. Evaluation qualitative de l'activité antibactérienne :

Pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits , nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques stériles en cellulose

##### **Dilution du produit dans le DMSO :**

La dilution est faite par ce que les extraits sont solides, nous les avons dilué dans le DMSO(dimethylsulfoxide),vu qu'il n'a aucun pouvoir antibactérien.

#### 5.2. Préparation de l'inoculum :

- **Préparation de pré-culture :**

Les tests antibactériens doivent être réalisés à partir des cultures jeunes de (18 à 24 heures) en phase de croissance exponentielle. La réactivation des souches est effectuée par ensemencement de l'espèce bactérienne dans un milieu liquide (BHIB).

Après incubation pendant 24 heures à 37°C, un deuxième repiquage est réalisé dans des boîtes de Pétri contenant de la gélose Muller Hinton (MH) puis, incubées à 37°C pendant 18 heures.

- **Préparation de la suspension bactérienne :**

A partir des cultures jeunes sur (MH). On prélève 3 à 5 colonies bien isolées et identiques dans 5 ml d'eau physiologique stérile, on agite au vortex pendant quelques secondes.

La standardisation de la suspension se fait par ajout d'eau physiologique si la densité est supérieur ou par ajout de colonies bactériennes si la densité est inférieure.

#### 5.3. Méthode :

La méthode d'aromatogrammeest la technique choisie pour déterminer l'activitéantibactérienne des différentes molécules .

Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des produits à l'intérieurd'une boîte de Pétri, dans un milieu nutritif solide.

- **Protocole expérimental :**

Couler aseptiquement le milieu de culture gélosé Mueller Hinton (M.H) en surfusion ; dans des boîtes de Petri à raison de 15 ml par boîte. On laisse refroidir et solidifier sur la pailleasse.

## Deuxième Partie : Matériel et Méthodes

---

- **Ensemencement :**

L'ensemencement se fait par écouvillonnage : un écouvillon stérile est plongé dans l'inoculum de 0.5 Mc Farland de densité. Il est essoré doucement sur les parois du tube. Par la suite, il est passé sous forme de stries sur la surface de la gélose Mueller Hinton, en tournant la boîte 3 fois de 60° afin d'assurer une bonne distribution des bactéries.

- **Dépôt des disques :**

A l'aide d'une pince stérile, prélever un disque de cellulose (papier Whatman N°3) préalablement stérilisé à la chaleur humide et l'imbiber avec le produit à tester (extrait décocté) en mettant seulement en contact le bout du disque, celui-ci va absorber progressivement jusqu'à l'imprégnation totale du disque (5 µl), puis déposer sur la gélose. Les boîtes de Pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 30 mn, et mises à l'étuve à la température de 37°C pendant 24h.

Chaque boîte de pétri, contient en plus du disque imprégné du produit , un disque imprégné de DMSO.

Toutes les manipulations ont été faites sous hotte à flux laminaire pour éviter toute contamination éventuelle due à la virulence des souches testées.

- **Lecture :**

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition (halo clair) autour de chaque disque à l'aide d'un pied à coulisse ou une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peuvent être symbolisés par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des H.E.

Non sensible (-) ou Résistante: Diamètre < 8mm.

Sensible (+): Diamètre compris entre 9 à 14 mm.

Très sensible (++) : Diamètre compris entre 15 à 19 mm.

Extrêmement sensible (+++) : Diamètre > 20 mm.

### Les souches testées :

Souche	Gram
<i>Enterococcus cloaceae</i>	-
<i>Staphylococcus coagulase positive</i>	+
<i>Enterococcus Faecalis ATCC 29212</i>	+
<i>Escherichia coli ATCC 25922</i>	+
<i>Staphylococcus aureus ATCC 25923</i>	+
<i>Escherichia coli</i>	-

*Escherichia coli* : isolée du produit alimentaire

## Troisième partie : Résultats et Discussion

---

### 1. Screening phytochimique :

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur l'extrait Décoctée des différentes parties de la plante (tiges, feuilles et fruits) de la plante *Myrtus communis L.*

Le Screening phytochimique consiste à détecter des métabolites secondaires dans notre extrait par des réactions qualitatives. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité, un changement de couleur spécifique ou un examen sous la lumière ultraviolette.

Les résultats sont mentionnés dans le tableau 05

Les travaux antérieurs sur les tests phytochimiques de *Myrtus communis L.* ont démontré la présence des flavonoïdes, des tanins et des coumarines et des Stéroïdes et des terpènes et les anthocyanes (**Diaz et Abeger, 1987 ; Hinou et al, 1988 ; Hyder et al, 2004**).

De même les tests phytochimiques réalisés par **Baytop, 1999 ; Romani 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)**,

## Troisième partie : Résultats et Discussion

**Tableau 05** : Résultats des réactions de caractérisation des principaux métabolites secondaires contenus dans l'extrait de *Myrtus communis L*

Espèce	Extrait + réactif	Teste	Réaction	Coloration
<i>Myrtuscommunis L</i>	Extrait décoctée + Liqueur du Fehling (A+B)	Amidon	-	/
	Extrait décoctée + eaux distillé	Saponosides	++	mousse
	Extrait décoctée + FeCL3	Tanines galliques	++	bleue noire
		TaninesCatéchique	++	bleue verte
	Extrait décoctée + Hcl + MgSO4H2O	Flavonoides	+++	rouge intense
	Extrait décoctée + Hcl + Mgcl2		++	rouge clair
	Extrait décoctée + Hcl + Capeaux de Megnisuim		+	rouge
	Extrait décoctée + Gouttes de Fegling	Composés réducteurs	-	/
	Extrait décoctée 5% + NH4OH 10%	Coumarines	+	des taches
	MV + éther de pétrole + H2SO4	Stérols et triterpènes	+++	rouge brun une couche surnageant de couleur verte
	Extrait décoctée + Réactif de Mayer	Alcaloïdes	-	/
Extrait décoctée + Méthanol + Hcl	Anthocyanes	+++	rouge bleu-violet	

- Réaction fortement positive : +++
- Réaction moyennement positive : ++
- Réaction faiblement positive : +
- Réaction négative : -

## Troisième partie : Résultats et Discussion

### 2. Les rendements en extraits secs

Les extractions des différents composés phénoliques les plus abondants dans notre plante nous a permis de calculer le rendement de chaque extrait notamment les extraits bruts méthanoliques, les flavonoïdes (fraction acétate d' éthyle et 1-butanol), les tanins et les anthocyanes. Le rendement qui a été déterminé par rapport à 100 g de matériel végétal sec et broyé est exprimé en pourcentage. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 06:

**Tableau 06:** Les rendements en extraits obtenus à partir des trois parties de la plante

Les extraits	Les solvants utilisés	utilisés Rendements%		
		Feuilles	Tiges	Fruits
Extrait brut	Méthanol	25,03	12,27	28,83
Flavonoïdes : fraction acétate d'éthyle	Acétate d'éthyle	4,58	2,18	2,51
Flavonoïdes : fraction butanolique	1-butanol	3,68	1,50	2,44
Tanins	Acétone/Eau	8,26	7,46	1,86
Anthocyanes	Hcl/Méthanol	-	-	18,26

- ✓ Les résultats obtenus pour les extraits bruts méthanoliques, montrent que le rendement le plus élevé est celui de l'extrait brut des fruits de *Myrtus communis* L. (28,83%) suivi des feuilles (25,03%) et des tiges (12,27%).
- ✓ Cependant nous avons remarqué que le rendement en extrait sec des anthocyanes des fruits est celui le plus élevé par rapport aux autres composés phénoliques des trois parties de la plante, notamment les flavonoïdes et les tanins (18,26%).
- ✓ Nous avons observé aussi que le rendement trouvé dans l'extraction des tanins est plus important dans les feuilles (8,26%) suivi des tiges et des fruits, (7,46%) et (1,86%) respectivement.
- ✓ De même la fraction acétate d'éthyle des feuilles dans l'extraction des flavonoïdes adonné un meilleur rendement par rapport aux autres parties de la plante. Les résultats obtenues de chaque partie sont donnés par l'ordre décroissant suivant : feuilles > fruits > tiges qui sont de l'ordre de 4,58 ; 2,51 et 2,18 % respectivement dans la fraction d'acétate d'éthyle et 3,68 ; 2,44 et 1,50 % respectivement dans la fraction 1-butanol.

### 3. Etude de l'activité antioxydants

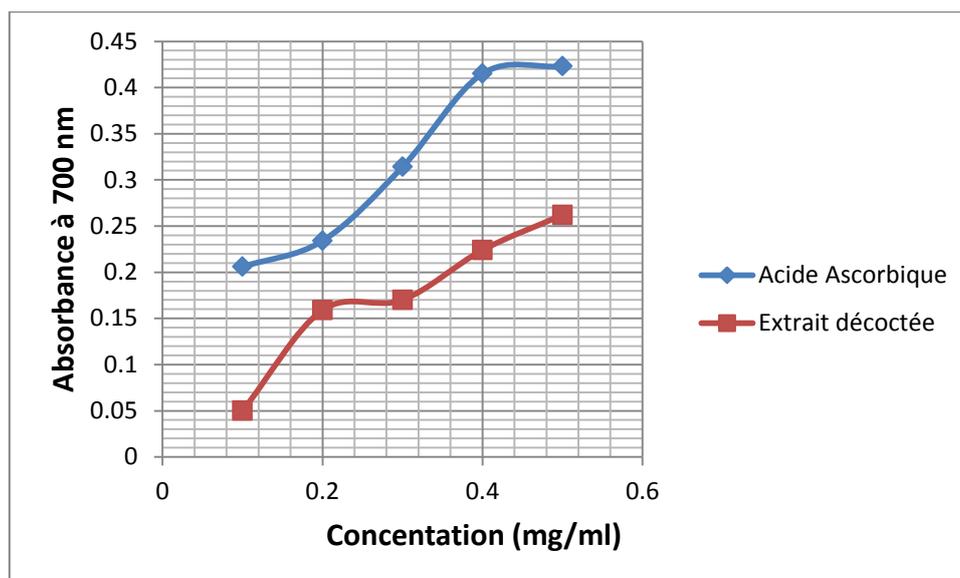
Les composés qui ont été testés par la méthode de réduction de fer et celle de DPPH sont :

- L'extrait brut des feuilles
- L'acide ascorbique, connu pour ses propriétés antioxydants est utilisé comme contrôle positif.

#### 3.1. Réduction du fer : FRAP (Ferric reducing antioxidant power) :

C'est une analyse de l'activité antioxydant qui est rapide, reproductible, et facile à exécuter. Cette méthode est basée sur la capacité des polyphénols à réduire le fer ferrique  $Fe^{3+}$  en fer ferreux  $Fe^{2+}$ . La puissance de réduction est l'un des mécanismes antioxydants (Karagozler et al, 2008).

Dans notre travail nous avons opté pour tester les extraits de la plante étudiée. Les valeurs obtenues ont permis de tracer la courbe pour l'extrait. Les résultats représentés dans les figures nous ont montré que la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos échantillons (Ozturk et al, 2007 ; Su et al, 2008 ; Liuk et al, 2009).



**Figure 18 :** Pouvoir réducteur des extraits bruts et de l'acide ascorbique par la méthode FRAP

Les résultats obtenus dans la figure 21 ci-dessus montre que l'extrait de la plante a la capacité de réduire le fer, comme le montre la tendance selon laquelle l'absorbance de l'extrait est bien inférieure à celle de l'acide ascorbique.

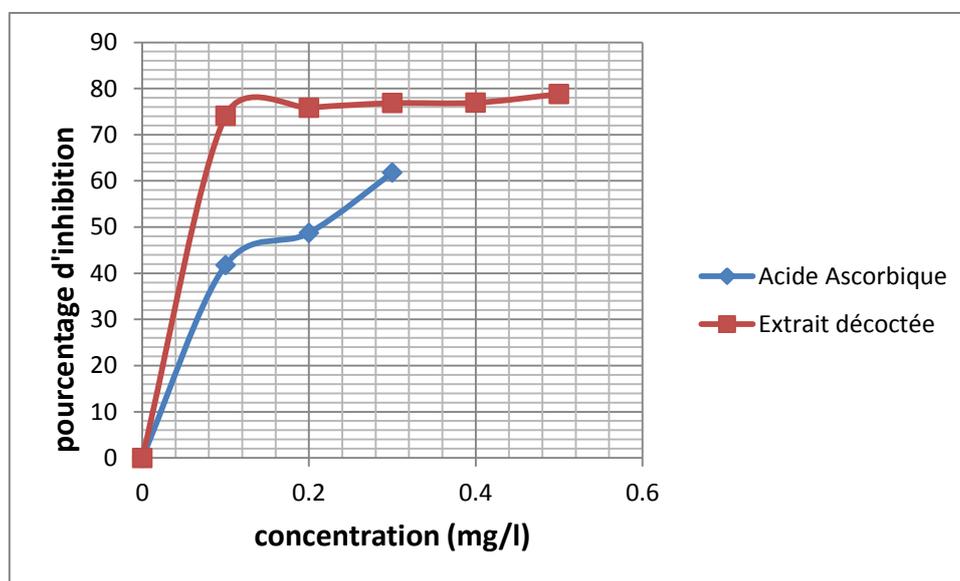
## Troisième partie : Résultats et Discussion

### 3.2. Piégeage du radical libre DPPH· (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl) :

Le radical DPPH· est l'un des substrats les plus utilisés généralement pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydant en raison de sa stabilité en forme radicalaire et la simplicité de l'analyse (Bozin et al., 2008). L'activité antioxydant est déterminée par la diminution de l'absorbance d'une solution alcoolique de DPPH· à 515 nm, qui est due à sa réduction à une forme non radicalaire DPPH-H par les antioxydants (AH) donneurs d'hydrogènes présent dans l'extrait végétal ou par une autre espèce radicalaire comme le montre les équations suivantes (Maisuthisakul et al., 2007, Da Silva Pinto et al., 2008).



Dans notre travail nous avons étudié l'activité antioxydant des extraits de la plante étudiée afin de préjuger et localiser la fraction la plus active.



**Figure 19 :** Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH· en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'extrait décocté de *Myrtus communis* L.

Les valeurs obtenues ont permis de tracer de courbe ayant une allure exponentielle avec présence d'une phase stationnaire qui signifie la réduction presque totale du DPPH· en sa forme non radicalaire. à partir de courbe nous pouvons déterminer le pourcentage d'inhibition obtenus en fonction des concentrations utilisées ainsi la valeur d'IC<sub>50</sub> de l'extrait.

#### ➤ Calcul des IC<sub>50</sub> :

La capacité antioxydant de l'extrait décocté a été déterminée à partir d'IC<sub>50</sub>, c'est la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH·. Plus la valeur d'IC<sub>50</sub> est petite, plus l'activité de l'extrait testé est grande (Pokorny et al, 2001).

## Troisième partie : Résultats et Discussion

Les valeurs des IC<sub>50</sub> trouvées pour tous les extraits testés sont représentées dans le tableau 07.

**Tableau 07 :** valeur d'IC<sub>50</sub> trouvées pour l'extrait décoctée et acide ascorbique

	IC <sub>50</sub> exprimées en mg/ml
Extraits bruts	0,05
Acide ascorbique	0,2

La valeur d'IC<sub>50</sub> de l'acide ascorbique que nous avons trouvé (0.2 mg/ml).

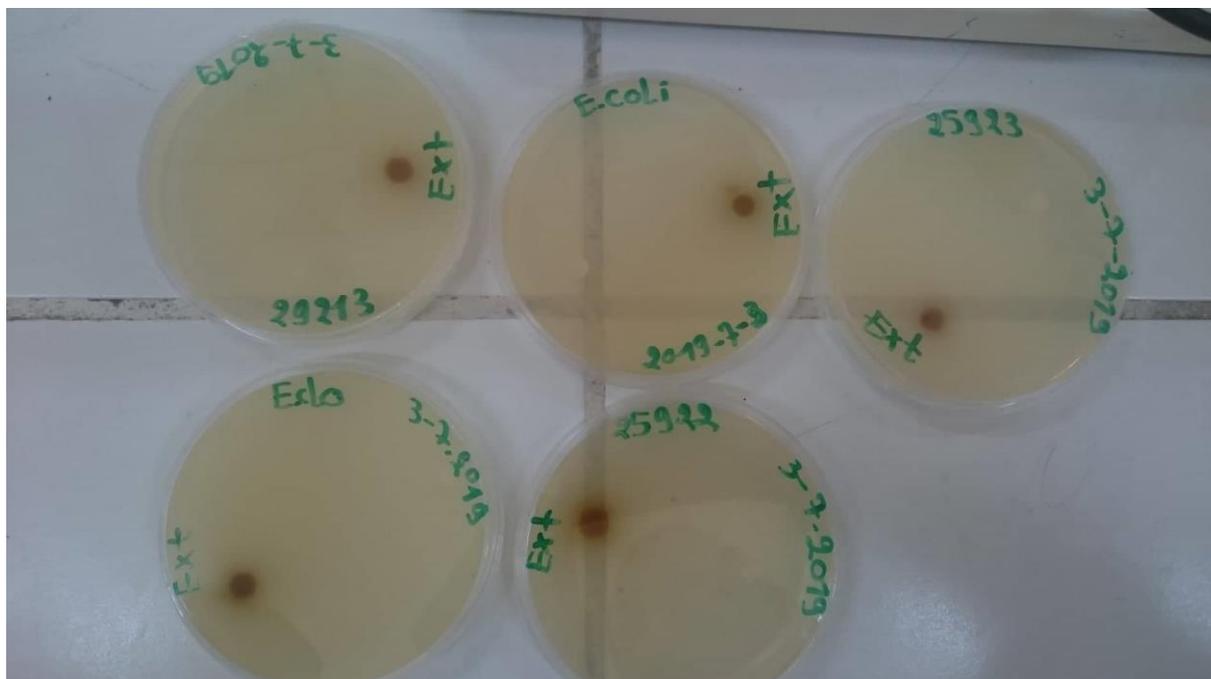
En comparant l'IC<sub>50</sub> de l'extrait testé de *Myrtus communis L.* par rapport à celle de l'acide ascorbique, nous avons remarqué une activité antioxydant élevée de la fraction acétate d'éthyle des feuilles qui est supérieur à la capacité du piégeage du radical DPPH.de l'acide ascorbique.

### 4. Activité antibactérienne :

#### 4.1. Résultats :

L'activité antibactérienne des extraits décoction de *Myrtus communis L.* est testée vis-à-vis de cinq souches bactériennes via la méthode de diffusion sur disque. L'activités antibactérienne des deux extraits sont estimées par le diamètre de la zone d'inhibition autour des disques (Méthode de diffusion sur gélose), exprimée en mm. Les résultats sont présentés dans la Figure suivante :

1- Test de diffusion en milieu MH des extraits de *Myrtus communis L.* :



**Figure 20 :** les zones de l'inhibition après incubation pendant 24 heures.

## Troisième partie : Résultats et Discussion

**Tableau 08 :** Effets de l'extrait sur les souches bactériennes

Les souches	Témoin	Extrait
<i>Enterococcus cloaceae</i>	<8	<8
<i>Staphylococcus coagulase</i> positive	<8	<b>11.01mm</b>
<i>Enterococcus Faecalis</i> <b>ATCC 29212</b>	<8	<8
<i>Escherichia coli</i>	<8	<8
<i>Staphylococcus aureus</i> <b>ATCC 25923</b>	<8	<b>10 mm</b>
<i>Escherichia coli</i> <b>ATCC</b> <b>25922</b>	<8	<b>9 mm</b>

**Tableau 09 :** Interprétation des effets de l'extrait sur les souches bactériennes en termes de la sensibilité

Les souches	Témoin	Extrait
<i>Enterococcus cloaceae</i>	-	-
<i>Staphylococcus coagulase</i> positive	-	+
<i>Enterococcus Faecalis</i> <b>ATCC 29212</b>	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> <b>ATCC 25923</b>	-	+
<i>Escherichia coli</i> <b>ATCC</b> <b>25922</b>	-	+

- Résistante (-)
- Sensible (+)

**On remarque que :**

- *Staphylococcus coagulase* positive a présenté un diamètre égal à 11,01mm, la souche est dite sensible au produit à tester (extrait).
- *Staphylococcus aureus* a présenté un diamètre égal à 10 mm, la souche est dite sensible au produit à tester (extrait).
- *Escherichia coli* a présenté un diamètre égal à 9 mm, la souche est dite sensible au produit à tester (extrait).
- *Enterococcus cloaceae*, *Enterococcus Faecalis* et *Escherichia coli* a présenté inférieur à <8, Les souches *Enterococcus cloaceae*, *Enterococcus Faecalis* et *Escherichia coli* est dite résistante au produit à tester (extrait).

## Troisième partie : Résultats et Discussion

**Tableau 10 :** Effets des antibiotiques sur les souches bactériennes

<b>Les souches</b>	<b>Témoin</b>	<b>gentamycine</b>	<b>Ampicilline</b>	<b>Amikacine</b>
<i>Enterococcus cloacae</i>	<8	24mm	<8	20mm
<i>Staphylococcus coagulase positive</i>	<8	20mm	18mm	20mm
<i>Enterococcus Faecalis ATCC 29212</i>	<8	28mm	25mm	10mm
<i>Escherichia coli ATCC 25922</i>	<8	30mm	20mm	27mm
<i>Staphylococcus aureus ATCC 25923</i>	<8	29mm	33mm	29mm
<i>Escherichia coli</i>	<8	23mm	<8	20mm

**Tableau 11:** l'interprétation des effets des antibiotiques sur les souches bactériennes en terme de la sensibilité

<b>Les souches</b>	<b>Témoin</b>	<b>Gentamycine</b>	<b>Ampicilline</b>	<b>Amikacine</b>
<i>Enterococcus cloacae</i>	-	+++	-	++
<i>Staphylococcus coagulase positive</i>	-	++	++	++
<i>Enterococcus Faecalis ATCC 29212</i>	-	+++	+++	+
<i>Escherichia coli ATCC 25922</i>	-	+++	++	+++
<i>Staphylococcus aureus ATCC 25923</i>	-	+++	+++	+++
<i>Escherichia coli</i>	-	+++	-	++

- Non sensible (-) ou Résistante
- Sensible (+)
- Très sensible (++)
- Extrêmement sensible (+++)

## Troisième partie : Résultats et Discussion

---

### On a remarqué que :

- *Enterococcus cloaceae* a présenté un diamètre égal à 24 mm pour le gentamycine et un diamètre égal à 20 mm pour le amikacine et pour le ampicilline présentée à inférieure à <8, les antibiotiques gentamycine et ampicilline est dite très sensible au les souches bactériennes.
- *Staphylococcus coagulase* positive a présenté un diamètre égal à 20 mm pour le gentamycine et un diamètre égal à 18 mm pour l'ampicilline et un diamètre égal à 20 mm pour le amikacine, les antibiotiques gentamycine, ampicilline et amikacine est dite sensible au les souches bactériennes.
- *Enterococcus faecalis* a présenté un diamètre égal à 28 mm pour le gentamycine et un diamètre égal à 25 mm pour l'ampicilline et un diamètre égal à 10 mm pour le amikacine, les antibiotiques gentamycine, ampicilline et amikacine est dite extrêmement sensible et sensible au les souches bactériennes.
- *Escherichia coli* ATCC25922a présenté un diamètre égal à 30 mm pour le gentamycine et un diamètre égal à 20 mm pour le ampicilline et un diamètre égal à 27 mm pour le amikacine, les antibiotiques gentamycine , ampicilline et amikacine est dite extrêmement sensible et très sensible au les souches bactériennes.
- *Staphylococcus aureus* présentée un diamètre égal à 29 mm pour le gentamycine et un diamètre égal à 33 mm pour le ampicilline et un diamètre égal à 29 mm pour le amikacine, les antibiotiques gentamycine , ampicilline et amikacine est dite extrêmement sensible au les souches bactériennes.
- *Escherichia coli* a présenté un diamètre égal a 23 mm pour le gentamycine et un diamètre égal a 20 mm pour le amikacine et pour le ampicilline présentée a inférieure a <8, les antibiotiques gentamycine et ampicilline est dite extrêmement sensible et très sensible au les souches bactériennes.

### ➤ Résultat :

- ✓ *Enterococcus cloaceae* et *Escherichia coli* sont résistante à l'extrait et une même résistance c'est apparu avec l'antibiotique l'ampicilline.
- ✓ Le non sensibilité d'*Escherichia coli* à l'ampicilline est une antibioresistance qui est dû à un mécanisme donné tel que la mutation de la bactérie ou son non perméabilité membranaire aux antibiotiques testés tout comme l'extrait.
- ✓ Le résultat de l'effet de l'extrait est positif pour les 3 souches avec les deux types de Gram, Gram positif (+) pour *Staphylococcus coagulase* positive + *Staphylococcus aureus* et Gram négatif (-) pour *Escherichia coli*.
- ✓ Le résultat de l'effet de l'extrait est positif pour les 3 souches *Enterococcus faecalis*, *Escherichiacoli* et *Staphylococcus aureus*.

## Troisième partie : Résultats et Discussion

---

### ➤ Discussion :

- En résumé, nous avons pu mettre en évidence les effets antibactériens des extraits de myrte sur les trois souches, à savoir : *Staphylococcus coagulasse* positive, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*
- L'absence de l'activité antibactérienne pour le *Enterococcus cloaceae*, *Enterococcus faecalis* et *Escherichia coli* peut être due au :

- Problème climatique.
- Problème de saison de récolte.
- les souches sont plus résistantes.
- l'état physiologique de la bactérie.
- le procédé et les conditions d'extraction.
- la nature du matériel d'extraction (risque d'oxydation).
- les conditions de conservation, de stockage et de transport.
- la diffusion des extraits à travers la gélose.

On peut conclure que les extraits décoctés du *Myrtus communis* L. sont actifs sur trois germes de six germes testés. Ce qui nous mène à confirmer leur pouvoir antibactérien avec une faible activité.

### *Conclusion*

Les plantes aromatiques et médicinales sont la source de la majorité des antioxydants naturels et elles restent encore sous exploitées dans le domaine médicale.

Dans l'industrie pharmaceutique, sachant que les antioxydants sembleraient de manière significative à la prévention des maladies, le développement de nouveaux médicaments à base d'antioxydants d'origine naturelle doit être à l'ordre de jour.

Dans ce contexte nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et au pouvoir antioxydant et l'activité antibactérienne des extraits de *Myrtus communis* L de la région de Collo (nord de Constantine).

Les tests phytochimiques réalisés par les réactions de caractérisation ont permis de mettre en évidence des flavonoïdes, des tanins, des stérols et triterpènes, anthocyanes dans les trois parties de la plante (tiges, feuilles et fruits).

Les extractions des différents composés phénoliques les plus abondants dans notre plante nous a permis de calculer le rendement de chaque extrait notamment les extraits bruts méthanoliques, les flavonoïdes (fraction acétate d'éthyle et 1-butanol), les tanins et les anthocyanes, dont le rendement le plus remarquable est celui des fruits (28,83 %).

Concernant l'activité antioxydant, nous avons étudié le pouvoir antioxydant de tous les extraits des différentes parties de la plante par la capacité de piégeage de radical DPPH● et de réduction du fer, afin de localiser la fraction qui représente l'activité la plus élevée.

Nous avons constaté pour l'activité antioxydant par la méthode FRAP, que tous les extraits de la plante étudiée ont la capacité de réduire le fer qui augmente en fonction de la concentration. Comme nous avons remarqué que l'extrait des anthocyanes des fruits et les flavonoïdes de la fraction 1-butanol et acétate d'éthyle des feuilles présentent une capacité intéressante pour réduire le fer par rapport aux autres extraits, mais cette capacité est faible à celle de l'acide ascorbique.

Cependant, pour le piégeage du radical libre DPPH● et en comparant les IC<sub>50</sub> des différents extraits testés des trois parties de *Myrtus communis* L par rapport à celle de l'acide ascorbique, nous avons remarqué une activité antioxydant très importante de la fraction acétate d'éthyle des feuilles (IC<sub>50</sub> = 0,05 mg/ml) qui est supérieur à la capacité du piégeage du radical DPPH● de l'acide ascorbique (IC<sub>50</sub> = 0,2 mg/ml).

Il en est de même pour la fraction butanolique des feuilles, des anthocyanes des fruits, des tanins des feuilles et l'extrait brut des tiges qui représentent une activité antioxydant presque similaire et intéressante. L'étude du pouvoir antioxydant par la méthode de DPPH a confirmé les propriétés puissantes que possèdent les flavonoïdes à piéger les radicaux libres.

L'évaluation de l'activité antibactérienne montre que notre extrait a une activité antimicrobienne variable entre les différentes souches microbiennes testées.

## Conclusion

---

L'inhibition de la croissance des souches (*Enterococcus cloaceae*, *Enterococcus faecalis* et *Escherichia coli*) de l'extrait décocté est faible d'après notre étude, Peut-être la plante elle a une activité antibactérienne sur d'autres souches.

Selon les résultats obtenus dans cette étude, nous pouvons dire que les extraits de *Myrtus communis* L ont une bonne activité antioxydant et une capacité de piégeage de radicaux libres intéressante en particulier la fraction acétate d'éthyle des feuilles et bonne activité antibactérienne.

Cette analyse trouve une importante application dans l'industrie pharmaceutique comme elle peut trouver aussi une application dans l'industrie alimentaire.

### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

- 1] **Anderson, K.J; Teuber, SS; Gobeille, A; Cremin, P; Waterhouse, A.L; Steinberg, F.M.(2001)**. Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. Biochemical and molecular action of nutriments. *J Nutrition*, 131: 2837-42.
- 2] **Allain M. (1981)**. Le Tell Oriental Algérien de Collo à la frontière Tunisienne (Etude géomorphologique),
- 3] **Angelie E. (2005)**. Introduction à l'écologie, Des écosystèmes naturels à l'écosystème humain. Ed. Tec & Doc, Paris, 230 p
- 4] **Adrian, J ; Frangne, R (1991)**. La science Alimentaire de A à Z, Ed. *Lavoisier, Paris*.
- 5] **Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Wittier P. (1995)**. Manuel Pratique de Chromatographie en Phase Gazeuse. Ed. Masson, Paris.
- 6] **Antonot, E; Marchal, R. (1998)**.Chromatographie. Stage MAPEN, p 5.
- 7] **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.
- 8] **Boizot, N ; Charpentier, J.P. (2006)**. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour d'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, *INRA*, 79-82.
- 9] **Bravo, L. (1998)**. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance, *Nutr Rev*, 56: 317- 33.
- 10] **Barbault R. (2000)**. Écologie générale, Structure et fonctionnement de la biosphère. Ed. Dunod, Paris, 326 p.
- 11] **Baba Aissa, F. (1999)**. Encyclopedie des plantes utiles. Flore d' Algérie et du Maghreb. Substances végétales d' Afrique d' orient et d' occident, p 181.
- 12] **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.
- 13] **Bruneton, J., (1993)**. Pharmiognosie et phytochimie, plantes médicinales, *Tec et Doc Lavoisier*. Paris, p 278-279.
- 14] **Bruneton J. (1993)**. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales, Tec &Doc. Lavoisier, Paris, 2ème édition, 915 p.
- 15] **Bruneton, J., (1999)**. Pharmiognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2eme édition, Paris : Editions médicales internationales, *Tec et Doc Lavoisier*, p 1120.

- 16] Bruneton J., (2009).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales (4ème édition) : 1288 pages.
- 17] Beta, T; Nam, S; Dexter, J.E; Sapirstein, H.D., (2005).** Phenolic content and antioxidant activity of pearled ulreat and roller – milled fractions, *Creat Chem*: 390 -393.
- 18] 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.
- 19] Bouchonnet S., Libong D. (2004).** Le couplage chromatographie en phase gazeusespectrométrie de masse. L'Actualité Chimique, 275, pp. 7-14.
- 20] C.G.G. (1965).** Rapport de l'étude géophysique dans la plaine de Collo
- 21] 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.
- 22] 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 .
- 23] Caude M., Jardy A. (1994).** Chromatographie en phase liquide - Théorie et méthodes de séparation. In Techniques de l'Ingénieur, P1 456.
- 24] Chebil, L. (2006).** Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* : études cinétique, structurale et conformationnelle. Thèse en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'institut national polytechnique de Lorraine. INPL, Nancy.
- 25] Djebaili, S ; (1984).** Steppe algérienne. Phytosociologie et écologie. Ed. OPU, Ben-Aknoun,Alger, p177.
- 26] Fleming T. et al (2000).** PDR for HerbalMedicines; Ed: MEDICAL ECONOMICS COMPANY; p: 648-649.2
- 27] Favier, A. (2003).** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité en chimie*,108-115.
- 28] Gonzalez, A. G ; Estevez-Braun, A., (1997).** Coumarins, *Nat. Prod. Reprod*, 14 : p 465-475.
- 29] Gutteridge, J.M. (1993).** Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence, *Free Radic Res Commun*, 19:141-158.
- 30] Guignard.J-L.,(2000).** Biochimie végétale. Edition Dunod .

- 31] **Gravot, A., (2008)**. Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Equipe pédagogique Physiologie Végétale, UMR 118 APBV. Université de Rennes 1 – L2.
- 32] **Govaerts, R; Lucas, E. (2008)**. World Checklist of Myrtaceae, Royal Botanic Gardens, Kew.Xv, p 455.
- 33] **<http://www.cevenat.fr>**
- 34] **Halliwell, B; Gutteridge, J.M.C. (1999)**. Free radicals in biology and medicine, Oxford, UK.
- 35] **Harborne, J.B. (1998)**. Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants
- 36] **Harborne, J.B,** Chapman and Hall, London,p 617-652 .analysis. Third Edition. ISBN: 0-412-57260-5 (HB) and 0-412-57270-2 (PB).
- 37] **Hemingway, R.W., (1992)**. Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives.In: Lpant polyphenols: synthesis, proprieties, significande. Laks P.E, Hemingway R.W NewYork.
- 38] **Hamian H. (1981)**. Modélisation de la plaine de Collo (Thèse de Magister- université de
- 39] **Hirasa, K; Takemasa, M; (1998)**. Spice science and technology. New York: Marcel Dekker.
- 40] **Kansole, M.M.R., (2009)**. Etude ethnobotanique, phytocuimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de *Leucas martinicansis (Jacquin) R. Brown*, *Hoslundia oppossta 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.
- 41] **Kuhn R., Lederer E. (1931)**. Zerlegung des Carotins in seine Komponenten. (Überdas Vitamin des Wachstums, I. Mitteil). Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 64(6), pp. 1349-1357.
- 42] **Kuhn R., Winterstein A., Lederer E. (1931)**. Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie, 197, pp. 141-160.
- 43] **Lebham, (2005)**. Thèse au laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues au sein de l'Institut Universitaire Européen de la Mer. (IVEM). Université de Bretagne Occidentale (UBO).
- 44] **Lugasi, A ; Hovari, J ; Sagi, K.V ; et Biro, L. (2003)**. The role of antioxidant phytonutriments in the prevention of diseases. *Acta. Biologica Szegedientsis* 1-4: 119-125.
- 45] **Lesgards, J.F. (2000)**. Contribution à l' étude du statut antioxydant de l' homme ; aspect chimiques et biochimique. Thèse de doctorat, 19-20.

- 46] Montoro, P; Tuberoso, C.I.G; Piacente, S; Perrone, A; De Feo, V; Cabras, P; Pizza, C.(2006b).** Stability and antioxidant activity of polyphenols in extracts of *Myrtus communis* L.berries used for the preparation of myrtle liqueur, *J. Pharm. Biomed. Anal*, 41: 1614-1619.
- 47] Mimica-Dukić, N ; Bugarin, D ; Grbović, S ; Mitić-Ćulafić, D ; Vuković-Gačić ,B ; Orčić, D ; Jovin, E ; et Couladis, M. (2010).** Essential Oil of *Myrtus communis* L. As a Potential Antioxidant and Antimutagenic Agents, 15: 2759-2770.
- 48] Merghem.R.,(2009).** Eléments De Biochimie Végétale, 171 Pages, Bahaeddine Editions
- 49] Martin- Lopez, T; Rubio, B; Villaescusa, L; Fernandez, L; Diaz A.M., (1999).** polyphenolic compounds from pericarps of *Myrtus cummunis*, *Pharmaceutical Biology*, 37, 28-31.
- 50] Mimica-Dukić, N ; Bugarin, D ; Grbović, S ; Mitić-Ćulafić, D ; Vuković-Gačić ,B ; Orčić, D ; Jovin, E ; et Couladis, M. (2010).** Essential Oil of *Myrtus communis* L. As a Potential Antioxidant and Antimutagenic Agents, 15: 2759-2770.Constantine),
- 51] Marre A. (1987).** Etude géomorphologique du tell oriental algérien : de Collo à la frontière Tunisienne. O.P.U, Tome 1, Thèse Doct. Univ. Aix Marseille II. 411p.
- 52] 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.
- 53] Meddleton, E; Kardasami, J.C. (1993).** The flavonoids Advances. In: research since 1986.
- 54] Martin A.J.P., Synge R.L.M. (1941).** A new form of chromatogram employing two liquide phases - 1. A theory of chromatography - 2. Application of the microdetermination of the higher monoaminoacids in proteins. *Biochemistry Journal*, 35, pp. 1358-1368.
- 55] Pincemail ,J ; Defraigne, J.D. ( 2004).** Les antioxydants un vaste réseau de defenses pour lutter contre les effets toxiques de l'oxygène. Service de Chirurgie Cardio-vasculaire, Pro biox SA. Sart Tilman 4000 Liège, Belgique.
- 56] Quezel, P ; et Santa, S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des regions désertiques méridionale. Tome II Edition. CNRS. Paris.
- 57] Ramade F. (2003).** Élément d'écologie, écologie fondamentale. Ed. Dunod, Paris, 688 p
- 58] Remenieras.G. (1972).** L'hydrologie de l'Ingénieur, Eyrolles. Coll. Du centre de recherche et d'essais de CHATOU. EYROLLES Ed : 456p.
- 59] Ribereau ,G.P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux, Dunod, Paris, p254.
- 60] Richard H.M.J. et ETIEVANT P. (1997).** Représentativité des extraits d'arômes réalisés au laboratoire, RivistaIta/iana EPPOS, Numero spécial, p. 306-325.
- 61] Richardin P.** La chromatographie.  
<http://www.culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/methodes/chromato.htm>

- 62] Romani, A ; Pinelli, P ; Mulinacci, N ; Vincieri, F.F ; Tattini, M ; (1999).** Identification and quantitation of polyphenols in leaves of *Myrtus communis* L, *Chromatographia* 49: 17-20
- 63] Rosset R., Caude M., Jardy A. (1991).** Chromatographies en Phase Liquide et Supercritique. Ed. Masson, Paris.
- 64] Rouessac F., Rouessac A., Cruché D., Méthodes et techniques instrumentales modernes., ANALYSE CHIMIQUE., 6ed. Dunod p 36., p61-62**
- 65] S.M.S. (2010).** Station météorologique de Skikda. Rapport interne, Skikda.
- 66] Stewart P. (1975).** Un nouveau climagramme pour l' Algérie et son application aubarrage vert. Bull. Soc. hist. natu. Afr. Nord, 65, Vol. 1-2 : 239 - 245
- 67] Sophie.A, N. Eherhart. (2003).** La phytothérapie se soigner par les plantes, ed.Eyrolles
- 68] Thomas, O.P. (2009).** Métabolisme secondaire et Biosynthèse. Master 2 VEM. Univesité Nice Sophia Antipolis.
- 69] Velioglu ,Y.S; Mazza, G; Gao ,L; Oomah, B.D. (1998).** Antioxidant activity and total phenolics in; selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agric Food Chem*, 46: 4113–17.
- 70] Vermerris, W. (2006).** Phenolic compound biochemistry, Springer, Dordrecht. ISBN-10 1-4020-5163-8 (HB).
- 71] Wannes ,W.A; Mhamdi, B; Sriti ,J; Ben Jemia ,M; Ouchikh ,O; Hamdaoui ,G; Kchouk,me; Marzouk, B. (2010).** Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf stem and flower, *Food and Chemical Toxicology*, 48: 1362-1370.



## Abstract :

Most of the current research is working on natural antioxidant molecules.

This work contains a study of phytochemical and antibacterial activity of *Myrtus communis* for the alkal area.

Results obtained from the study of plant chemistry of basil Le Myrte (boiling extract)

it showed that it is very low in terms of starch, kaloid, Coumarines, Quinones, rich in flavonoids, tana catechic, tana gallic, saponin, sterol and tritarban.

Antioxidant activity of various extracts was studied by two methods : Iron Return and Free Root Inhibition DPPH The leaf ethyl acetate extract represents a significant antioxidant activity (0.05 mg / ml) and its ability to inhibit the free DPPH is high compared with ascorbic acid (IC50 = 0.2 mg / ml).

Results obtained by antibacterial activity of basil (boiling extract) showed that it affected three types of intestinal bacterial strains, fecal intestines, *Escherichia coli* and for the other three strains there was no effect on them.

**Keywords:** *Myrtus communis* L, Phytochemical Study, Flavonoids, tannins, Saponin, Sterol Tritarban, Antioxidant and DPPH.

## Résumé :

Une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude de molécules antioxydants d'origine naturelle.

Ce travail consiste à l'étude de phytochimique et de l'Activité Anti bactérienne de "*Myrtus*

*Communis L*" de la région de collo. Les résultats qu'on a obtenus de l'étude

phytochimique du myrte (extrait décocté) montrent qu'il est très faible en Amidon, alcaloïde, Coumarines, Quinones et riche en Flavonoïde, Tanins Catéchique et Tanins galique, Saponines, Stéroïls et tri terpènes.

L'activité antioxydant des différents extraits a été évaluée par deux méthodes ; la

réduction du fer et le piégeage du radical libre DPPH. La fraction acétate d'éthyle des feuilles a présenté une activité antioxydant intéressante (IC50 = 0.05 mg/ml) et qui est supérieur à la capacité du piégeage du radical DPPH· de l'acide ascorbique dont l'IC50 = 0.2 mg/ml.

les résultats qu'on a obtenus de l'activité antibactérienne du myrte montrent qu'il existe un effet de

l'extrait décocté sur trois souches *Staphylococcus coagulase* positive, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* ATCC et pour les trois autres souches *Enterococcus cloaceae*, *Enterococcus Faecalis* et *Escherichia coli* aucun effet n'a été fait par l'extrait sur eux, Cette variation peut être due aux différents paramètres géographiques, climatiques.

**Mosts clés :** *Myrtus communis* L., étude phytochimique, flavonoïdes, tanins, Saponines, Stéroïls et tri terpènes, antioxydant, DPPH.

## المخلص :

جزء كبير من البحوث المهمة حالياً تعمل على دراسة الجزئيات الطبيعية المضادة للأكسدة.

هذا العمل يحتوي على دراسة فيتوكيميائية و النشاط المضاد للبكتيريا ل *Myrtus communis* لمنطقة القل

النتائج التي تم الحصول عليها من خلال دراسة الكيمياء النباتية للريحان (*Le Myrte*) (المستخلص المغلي)

أظهرت انه منخفض جدا من حيث النشا و الكالويد (شبه قلوي) و كومارين و الكينون و غني بالفلافونويد و تانا كاتيشيك و تانا غاليك و صابونين و ستيرول و تريباربان.

تمت دراسة النشاط المضاد للأكسدة لمختلف المستخلصات بواسطة طريقتين , إرجاع الحديد و تثبيط الجذر الحر DPPH يمثل مستخلص خلات الإيثيل للأوراق نشاط مضاد للأكسدة ذو أهمية كبيرة (0.05 مغ/مل) و قدرته على تثبيط الجذر الحر DPPH عالية مقارنة مع حمض الاسكوربيك (IC50=0.2 مغ / مل).

النتائج التي تم الحصول عليها من خلال النشاط المضاد للبكتيريا للريحان (المستخلص المغلي) أظهرت انه اثر على ثلاث أنواع من السلالات البكتيرية المعوية , المعوية البرازية , الإشريكية القولونية و بالنسبة للثلاث السلالات الأخرى فلا يوجد تأثير المستخلص عليهم.

**الكلمات المفتاحية :** *L* , دراسة فيتوكيميائية , فلافونيدات , تانا , صابونين , ستيرول و تريباربان, المضاد للاكسدة DPPH



### Annexe 1 : Réactifs de caractérisation

#### ➤ Amidon

- ✓ L'amidon est caractérisé par un réactif spécifique connu sous le nom d'amidon. Ce dernier a été préparé comme suit :
- ✓ Dissoudre 1,2 g d'iode dans 50 ml d'eau distillée contenant 2,5 g d'iodure de potassium ;
- ✓ Chauffer pendant 5 minutes ;
- ✓ Diluer jusqu'à 500 ml.

La détection d'amidon s'effectue comme suit :

- ✓ Chauffer 5 ml de la solution à tester avec 10 ml d'une solution de NaCl saturée dans un bain-marie jusqu'à ébullition
- ✓ Ajouter le réactif d'amidon
- ✓ Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-violacée.

#### ➤ Alcaloïdes

La caractérisation des alcaloïdes se fait par :

- **Réactif de Mayer** : la préparation de ce réactif s'effectue comme suit :

- ✓ Dissoudre 1,358 g de  $\text{HgCl}_2$  dans 60 ml d'eau ;
- ✓ Dissoudre 5 g de KI dans 10 ml d'eau ;
- ✓ Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100 ml d'eau.  
Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un précipité blanc

- **Réactif de Wagner** : ce réactif a été préparé comme suit :

- ✓ Dissoudre 2 g de KI et 1,27 de  $\text{I}_2$  dans 75 ml d'eau ;
- ✓ Ajuster le volume total à 100 ml d'eau.

Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un précipité brun.

## Annexes

### Annexe 1 : Les éléments d'étude phytochimique



Photo 01 : Echantillonnage



photo 02 : Décoction



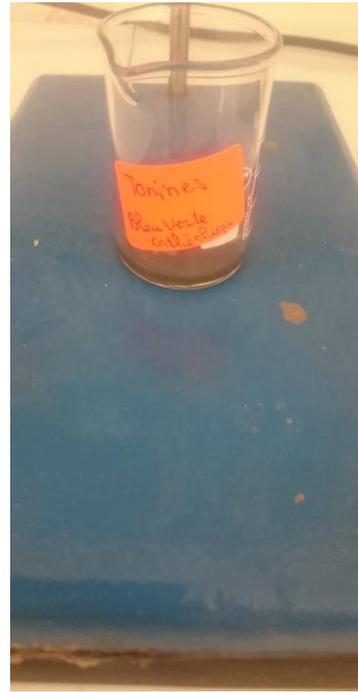
Photo 03 : Extrait décoctée



Photo 04 : Extrait Tanins

# Annexes

## Quelques Screening phytochimique



## Annexes

### Annexe 2 : Les éléments d'étude de l'activité antioxydant



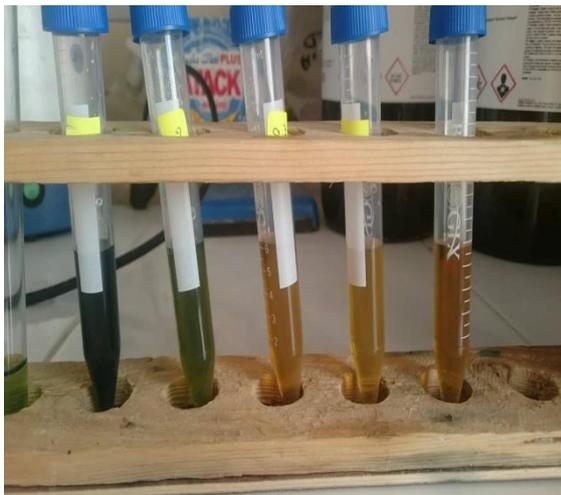
Teste de Coumarines (ultraviolette UV)



Teste de FRAP



Spectrophotomètre (517 nm)



Teste de DPPH



Spectrophotomètre (700 nm)

## Annexes

### Annexe 3 : Les éléments d'étude de l'activité antibactérienne



Milieu gélosée



Boites pétri



Disque antibiotique

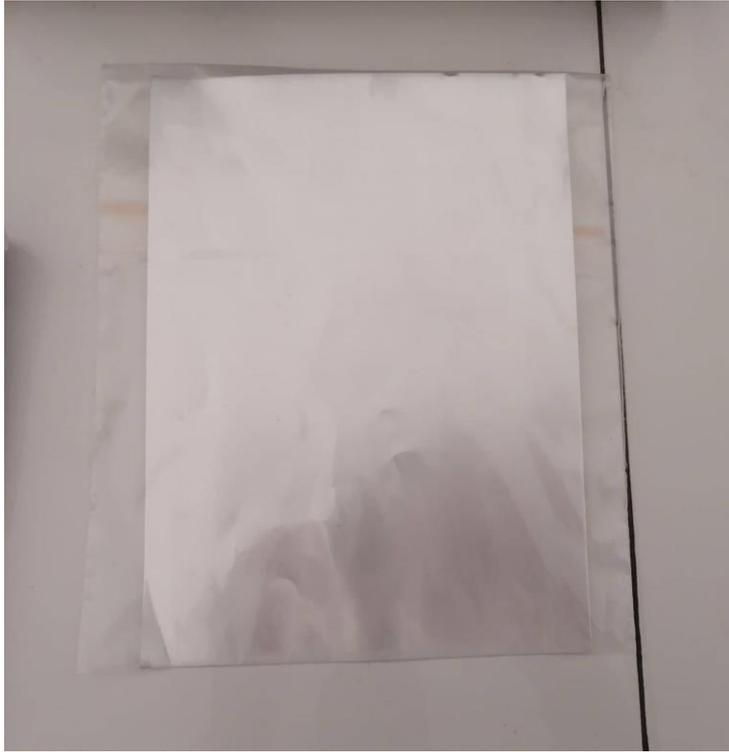


Disque Stérile

## Annexes

---

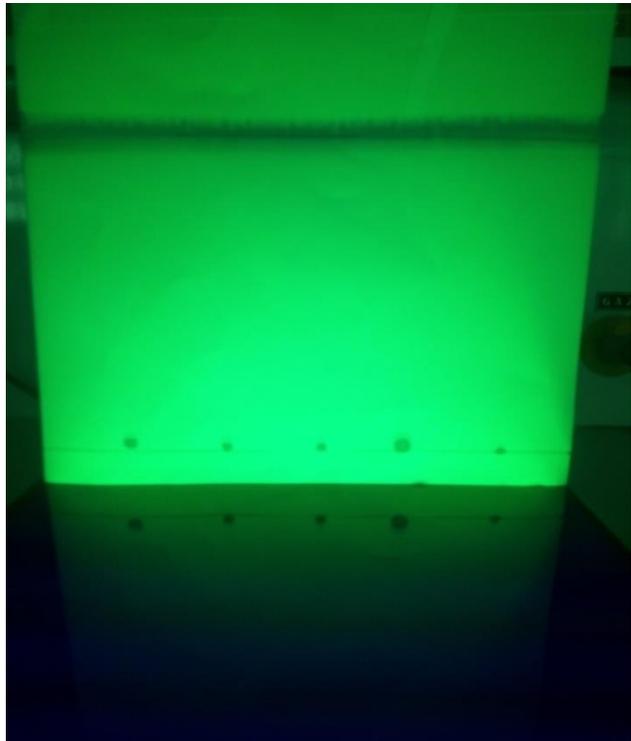
### Annexe 3 : Les éléments d'étude de la chromatographie (CCM)



Plaque CCM



Cuve CCM



La lumière ultraviolette (UV 365 nm)

# *Introduction*

***Première Partie : Etude Bibliographique***

## **Chapitre I : Etude Climatique et Géographique de la Zone D'étude**

## ***Chapitre II : Etude Botanique de La Plante***

***Chapitre III : Les métabolismes primaires et secondaires***

## *Chapitre V : Méthodes d'extraction*

## *Chapitre IV : Activité Biologiques des Extraits*

## *Matériel et Méthodes*

## Références Bibliographiques

*Conclusion*

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

# *Annexes*

## ***Deuxième partie : Travail expérimentale***