REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DR. YAHIA FARES DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention de diplôme de Master en sciences agronomiques

Option : phytopathologie

Thème :

Activité de l'huile essentielle, des extraits aqueux flavonoidique et tannique de *Myrtus communis L.* de la région de (Blida) sur deux champignons de poste récolte *Penicillium sp.* et *Aspergillus niger*

Présenté par :

-BENGHERBIA Hassina

-KHALFAOUI Anfal

soutenu publiquement le : 20 juin 2018

Jury:-**M^{me} MOSTEFAOUI H.**	M.C.B	Univ.Médéa	présidente
-M^{me} CHEBAANI M.	M.A.A	Univ. Médéa	examinatrice
-M^{me} TCHAKER F.	M.A.B	Univ. Médéa	examinatrice
-M^{me} AFKIR K.	M.A.A	Univ. Médéa	promotrice

2017/2018

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

En second lieu, nous tenons à remercier notre promotrice ***M^{me} AFKIR Khadidja*** *pour ses précieux conseils et son aide durant toute la période du travail.*

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Un remerciement particulier s'adresse à M^{r} le président de provincial des forêts (Affroun) et ces collègues

Nos remerciements s'adressent également aux gens de SAIDAL –Médéa- pour leur aide durant la période de réalisation de ce travail.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à …

*Mes **chèrs parents**, qui n'ont pas cessé de me soutenir, de m'encourager et de prier pour moi.*

Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consenti pour mon éducation et ma formation. Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.

*Mon cher frère **Bachir** et ma petite sœur **Insaf,** Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.*

*Mon très cher mari **Abdelghani,** Que dieu réunisse nos chemins pour un long commun serein.*

*Toute ma grande famille paternel **KHALFAOUI***

*Toute ma grande famille maternel **BENREKIA***

*Ma belle-famille **OULD TAYEB***

*Mes cousines : **Kawther Marwa** et **Safi.***

*Mon binôme **Hassina**, nous somme enfin arrivées.*

*Mes chères amies : **Akila Hafsa Imene Karima Lamia et Zoulikha***

Tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin afin de réaliser ce travail.

Anfel

Dédicaces

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 mes parents,*

Pour vos mains qui ont tat travaillées

Pour votre cœur qui m'a tant donné

Pour votre sourire qui m'a tant réchauffé

Pour vos yeux qui furent parfois mouillés

Pour leur patience tout au long de ce cursus qui vous semblait interminable

Pour leur soutien et leur confiance en mes capacités

- *A ma petite sœur: Anfel*
- *A mes frères : Ali et El Mouâtassem*
- *A toute ma famille*
- *A ma meilleur amie : Nour El Houda*
- *Bien sur sans oublié ma chère binôme : Anfel*
- *A mes collègues de la promotion*
- *A tout qui me connaisse de près ou de loin*

Hassina

Sommaire

Introduction 1

Chapitre I : données bibliographiques

1.1. METABOLITES SECONDAIRES 3
1.1.1. Definition 3
1.1.2. Fonctions des metabolites secondaires.....3
1.1.3. Classification des metabolites secondaires 3
1.1.3.1. Les composes phenoliques 4
1.2. LES HUILES ESSENTIELLES 12
1.2.1. Definition 12
1.2.2. Localisation et lieu de synthese 12
1.2.3. Roles physiologiques des huiles essentielles 12
1.2.4. Composition chimique des huiles essentielles 13
1.2.5. Procedes d'obtenir des huiles essentielles 14
1.3. LA PLANTE ETUDIEE.....15
1.3.1. L'espèce *Myrtus communis L.* : le Myrte commun.....15
1.3.1.1. Historique 15
1.3.1.2. Classification 16
1.3.1.3. Description botanique.....16
1.3.1.4. Répartition géographique 18
1.3.1.5. Ecologie et multiplication de la plante 18
1.3.1.6. Usage et propriétés thérapeutiques 18
I.4. GENERALITE SUR LES SOUCHES TESTEES.....20
1.4.1. le genre Aspergillus 20
1.4.2. le genre Penicillium 20

Chapitre II : Matériel et méthodes

2.1. lieux d'experimentation 22
2.2. MATERIEL 22
2.2.1. Matériel biologique 22
2.2.1.1. Matériel végétal 22
2.2.1.2. Micro-organismes 23
2.2.2. Matériel non biologique 23
2.3. METHODES 23
2.3.1. Traitements préliminaires des rameaux feuillés et des fruits utilisés 23
2.3.2. Etude phytochimique 24
2.3.2.1. Caractérisation physico-chimique de la plante 24
2.3.2.2. Screening phytochimique des metabolites 26
2.3.3.Extraction et purification des flavonoides et des tanins 28
2.3.3.1. Extraction et purification des flavonoides 28
2.3.3.2. Extraction et purification des tanins 31
2.3.3.3. Preparation de l'extrait aqueux des flavonoides et des tanins 33
2.3.4. Extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation 33
2.3.4.1.Caracteristiques physico-chimiques de l'huile essentielle 35
2.3.5. Analyse des extraits obtenus par HPLC 37
2.3.6. Analyses de la cmposition de l'huile essentielle par CG/SM 39
2.3.7. Etude de l'activite antifongique 40
2.3.7.1. Methode de diffusion sur milieu solide 40
2.3.7.2. Determination de la concentration minimala inhibitrice (CMI) 42

Chapitre III : Résultats et discussion

3.1. Résultats de l'étude phytochimique de la plante étudiée 45
3.1.1. Résultats des caractérisations physico-chimiques 45
3.1.2. Résultats du screening phytochimique 46
3.2. Résultats de l'extraction des flavonoides et des tanins 48
3.2.1. Résultats de l'extrait sec des flavonoides 48
3.2.2. Résultats de l'extrait sec des tanins 48
3.3. Résultats de l'extraction de l'huile essentielle 49
3.3.1. Rendement de l'huile essentielle 49
3.3.2. Résultats des caracterisations physico-chimiques de l'HE 49

3.4. Résultats d'analyse des extraits par HPLC 50
3.5. Résultats de la composition de l'huile essentielle par CG/SM 52
3.6. Résultats des activites biologiques 54
3.6.1. Resultats de l'activite antifongique 54
3.6.1.1. Resultats de diffusion sur milieu solide 54
3.6.1.2. Resultats de la CMI 57
3.7. etudes statistiques 59

Conclusion 62

Résumé

Activité de l'huile essentielle, des extraits aqueux flavonoidique et tannique de *Myrtus communis L.* de la région de (Blida) sur deux champignons de poste récolte *Penicillium sp.* et *Aspergillus niger*

le présent travail porte sur l'étude phytochimique des HE, des flavonoïdes et des tanins extraits à partir des feuilles et des fruits (baies) de *Myrtus communis L.* afin d'identifier ses principaux composants et d'évaluer son effet antifongique sur *Penicillium sp* et *Aspergillus niger*.

L'extraction de l'huile essentielle du *Myrtus communis L.* par hydrodistillation a donné un rendement de 4,57%.

Le rendement des flavonoïdes est plus élevé pour les baies (32.53%) par rapport à celui des feuilles (1%).

L'extraction des tanins à partir des baies et des feuilles du myrte nous a donné un rendement de 9% pour les baies et 8.03% pour les feuilles.

L'analyse des extraits aqueux du myrte par HPLC a permis de mettre en évidence la présence de certains composés phénoliques notamment l'acide gallique et la rutine.

L'analyse de l'HE de myrte par CG/SM a révélé la présence de 62 composés, caractérisée par 2 composés majoritaires : le limonène (16.22%), et l'alpha pinène (15.93%).

L'activité antifongique des différents extraits ainsi que HE de myrte commun sur deux champignons phytopathogenes (*Penicillium sp* et *Aspergillus niger*) a révélé la sensibilité de ces derniers à tous les extraits testes notamment l'extrait aqueux tannique des fruits de myrte ainsi que son huile essentielle.

La CMI de l'extrait aqueux des tanins des feuilles de myrte est 30% contre Penicillium sp. et celle d'HE est à 25%.

Mots clés : *Myrtus communis L.*, extrait aqueux, huile essentielle, flavonoïdes, tanins, activité antifongique.

Abstract

Activity of the essential oil, flavonoidal and tannic aqueous extracts of *Myrtus communis L.* from the region of (Blida) on two fungi harvest *Penicillium sp.* and *Aspergillus niger*

This work focuses on the phytochemical study of EO, flavonoids and tannins extracted from leaves and fruits (berries) of *Myrtus communis L.* to identify its main components and to evaluate its antifungal effect on *Penicillium sp*. and *Aspergillus niger.*

Extraction of the essential oil of *Myrtus communis L.* by hydrodistillation gave a yield of 4.57%.

The yield of flavonoids is higher for berries (32.53%) than for leaves (1%).

The extraction of tannins from the berries and leaves of the myrtle gave us a yield of 9% for berries and 8.03% for leaves.

Analysis of the aqueous extracts of the myrtle by HPLC made it possible to demonstrate the presence of certain phenolic compounds, in particular gallic acid and rutin.

Analysis of myrtle EO by GC / MS revealed the presence of 62 compounds, characterized by 2 major compounds: limonene (16.22%), and alpha pinene (15.93%).

The antifungal activity of the various extracts as well as common myrtle EO on two phytopathogenic fungi (*Penicillium sp* and *Aspergillus niger*) revealed the sensitivity of this fungi to all tested extracts including the aqueous tannic extract of myrtle fruits. as well as its essential oil.

The MIC of the aqueous extract of the tannins of myrtle leaves is 30% against *Penicillium sp.* and that of HE is 25%.

Keywords: *Myrtus communis L.,* aqueous extract, essential oil, flavonoids, tannins, antifungal activity.

ملخص

تاثير الزيوت الأساسية ، الفلافونيدات والتانينات المستخلصة من الريحان منطقة البليدة ضد نوعين من الفطريات *Penicillium sp* و *Aspergillus niger*

يركز هذا العمل على دراسة كيميائية للزيوت الأساسية ، الفلافونيدات والتانينات المستخلصة من أوراق وفواكه الريحان *Myrtus communis L.* لتحديد مكوناتها الرئيسية وتقييم تأثيرها المضاد على *Penicillium sp* و *Aspergillus niger*.

اعطى استخلاص الزيوت الأساسية للريحان مردود مقدر ب **4.57** ٪

بعد استخلاص فلافونويدات من ثمار وأوراق الريحان تحصلنا على مردود يقدر ب **(32.53٪)** بالنسبة لثمار الريحان مقارنة بمردود الأوراق **(1٪)**

أعطى استخراج العفص من ثمار وأوراق الآس مردود بنسبة **9** ٪ للثمار و **8.03** ٪ للأوراق.

من خلال تحليل المستخلصات المائية للريحان عن طريق الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء تمكنا من اثبات وجود مركبات فينولية معينة خاصة حمض الغال وروتين.

كشف تحليل الزيوت الأساسية للريحان عن طريق كروماتوغرافيا الغاز مطياف الكتلة عن وجود 62 مركبا أهمها **الليمونين (16.22** ٪) و**الفا بينين. (15.93** ٪**).**

المستخلصات المائية المستعملة وكذا الزيوت الأساسية المستخلصة من الريحان اثبتت فعالية عالية ضد كل السلالات الفطرية المستخدمة في هذا الاختبار

قدر التركيز المثبط الأدنى للمستخلص المائي للعفص لأوراق الريحان ب **30**٪ ضد البنسليوم، اما التركيز المثبط الأدنى للزيوت الأساسية المستخلصة من نبات الريحان فقدر ب **25** ٪.

الكلمات الرئيسية: الريحان، المستخلص المائي، الزيوت الأساسية، الفلافونويدات ,العفص, النشاط المضاد للفطريات.

Liste des tableaux

Tab.1 : Activités biologiques des composés polyphénoliques..... 4

Tab.2 : Structures chimiques des principales classes des flavonoïdes..... 6

Tab.3: Taxonomie de myrte commun 16

Tab.4: résultat du screening phytochimique de la poudre des feuilles et des baies. 47

Tab.5 : résultats du rendement de l'huile essentielle 49

Tab.6: composés majoritaires de l'huile essentielle de *Myrtus communis L*. obtenus par CG/SM 53

Tab.7: Résultats de l'activité antifongique de l'HE de *Myrtus communis L.* par diffusion sur milieu solide. 54

Tab.8: Résultats de l'activité antifongique de l'extrait aqueux des flavonoïdes des feuilles de *Myrtus communis L.* par diffusion sur milieu solide..... 54

Tab. 9 Résultats de l'activité antifongique de l'extrait aqueux des flavonoïdes des fruits de *Myrtus communis L.* par diffusion sur milieu solide..... 55

Tab 10 : Résultats de l'activité antifongique de l'extrait aqueux des tanins des feuilles de *Myrtus communis L.* par diffusion sur milieu solide..... 55

Tab 11 : Résultats de l'activité antifongique de l'extrait aqueux des tanins des fruits de *Myrtus communis L.* par diffusion sur milieu solide..... 55

Tab 12 :les CMI de l'extrait flavonoidique des feuilles vis-à-vis les souche fongiques testées 57

Tab 13 : Les CMI de l'extrait flavonoidique des fruits vis-à-vis les souches fongiques testées 57

Tab 14: Les CMI de l'extrait tannique des feuilles vis-à-vis les souches fongiques testées ... 58

Tab 15 : Les CMI de l'extrait tannique des fruits vis-à-vis les souches fongiques testées. 58

Tab 16: Les CMI de l'huile essentielle (HE) vis-à-vis les souches fongiques testées. 58

Liste des figures

Figure 1 : Structure générale des flavonoïdes. 5

Figure 2: structure chimique de l'acide gallique et l'acide ellagique 10

Figure 3 : Structure chimique des tanins condensés 11

Figure 4 : Caractéristiques morphologiques de *Myrtus communis* L. 17

Figure 5: Répartition géographique de *myrtus communis L.*.....18

Figure 6: Les rameaux feuillés et les baies de *Myrtus communis L.* 22

Figure 7: La poudre des feuilles (a), et des fruits (b) du Myrte.....23

Figure 8 : L'infusé 5%des feuilles (a) et des baies(b) du myrte.....26

Figure 9: Protocole d'extraction des flavonoïdes 30

Figure 10: Protocole d'extraction des tanins 32

Figure 11: Montage de l'hydrodistillation.....34

Figure 12: Dispositif utilisé et schéma du principe de fonctionnement d'une chaine d'HPLC 38

Figure 13: Protocole expérimental de la CMI 43

Figure 14: résultats du taux d'humidité dans la poudre végétale des feuilles et des fruits de *Myrtus communis L.* 45

Figure 15: résultats de la teneur en substances extractibles par l'eau et par l'éthanol 45

Figure 16: résultats du taux des cendres totales 46

Figure 17: le rendement des extraits secs obtenus.....48

Figure 18 : Spectre chromatographique de l'acide gallique obtenu par HPLC à 254nm. 50

Figure 19: Spectre chromatographique de la rutine obtenu par HPLC à 254nm.....51

Figure 20 : Spectre chromatographique de l'extrait aqueux des tanins des fruits de myrte obtenu par HPLC à 254nm. 51

Figure 21 : Spectre chromatographique de l'extrait aqueux des flavonoïdes des fruits de myrte obtenu par HPLC à 254nm.....51

Figure 22 : l'effet antifongique de HE, des extraits flavonoîdiques et tannique du myrte sur *Penicillium sp* 59

Figure 23 : l'effet antifongique de HE, des extarits flavonoidique et tannique du myrte sur *Aspergillus niger* 60

Figure 24 : activités antifongique des extraits et de HE de *Myrtus communis L.* en modèle GLM selon l'extrait, la dose et les souches fongiques testés 61

Liste des abréviations

AFNOR : Association Française de Normalisation.

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé.

CG/SM : Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

DO : Densité Optique.

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

$\mathbf{F_{fl}}$: Flavonoïdes des Feuilles.

$\mathbf{F_{fr}}$: Flavonoïdes des Fruits.

HE : Huile Essentielle.

HPLC : Hight Performance Liquid Chromatography (chromatographie liquide haute performance).

PDA : Potato Dextrose Agar.

pH : Potentiel Hydrogène.

PAM : plantes aromatiques et médicinales.

$\mathbf{T_{fl}}$: Tanins des Feuilles.

$\mathbf{T_{fr}}$: Tanins des Fruits.

TR : Temps de Rétention.

USTHB : Université de Science et Technologie Houari Boumediene.

UV : Ultra-Violet.

Introduction

L'utilisation des plantes, à des fins thérapeutiques, est rapportée dans les littératures antiques, arabes, chinoises, égyptiennes, hindoues, grecques et romaines.

Depuis quelques années, les plantes médicinales sont de plus en plus présentes dans la politique de développement. Leur utilisation et leur préservation sont un thème transsectoriel englobant, outre les soins de santé, la protection de la nature, la biodiversité, la lutte biologique, ainsi que la promotion économique, le commerce et divers aspects juridiques.

Pour assurer une meilleure intervention, tout en préservant au maximum le milieu naturel, de nouvelles méthodes préventives ainsi que de nouveaux produits sont constamment recherchés. Ainsi, pour contribuer à une gestion durable de l'environnement, la mise en place de nouvelles alternatives de lutte contre les ravageurs est davantage encouragée. Les substances naturelles qui présentent un large spectre d'action en pharmacologie, comme bactéricides, fongicides, acaricides, nématicides, etc., peuvent aussi être utilisées comme insecticides de remplacement.

La lutte biologique prend diverses formes, mais celles qui attirent l'attention des chercheurs à l'heure actuelle est la lutte biologique par l'utilisation de substances naturelles d'origines végétales comme insecticides **(Boutaleb Joutei, 2010).**

Les Plantes Aromatiques et Médicinales (PAM) constituent une véritable banque de ces molécules chimiques. L'utilisation des extraits de plantes comme fongicides est connue depuis longtemps, en effet le pyrèthre, la nicotine et la roténone sont déjà connus comme agents de lutte contre les champignons **(Crosby, 1966 ; in Diakite, 2008).** Dans des travaux encore plus récents, les propriétés fongicides de certaines plantes ont été testées sur les champignons.

La flore Algérienne avec ses 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15 % endémiques **(Quezel et Santa, 1963),** reste très peu explorée sur le plan phytochimique comme sur le plan pharmacologique.

Pour notre part, nous avons choisi d'étudier une espèce *de Myrtaceae « Myrtus communis* L. » en fixant comme premier objectif : l'étude de la composition chimique de l'HE et des

extraits aqueux des feuilles et des fruits de Myrte. Et comme second objectif, l'étude de ses propriétés fongicides contre des champignons phytopathogenes.

Les objectifs globaux du présent travail visent d'un côté, à valoriser nos ressources naturelles, et à améliorer et à préserver l'environnement d'un autre côté dont l'étude de l'effet des extraits aqueux (flavonoïdes et tanins) et de l'huile essentielle du Myrte sur les deux champignons phytopathogenes en poste récolte *Aspergillus niger* et *Penicillium sp*. Pour donner une plus ample lumière sur ce sujet, il s'avère essentiel de traiter un à un les trois chapitres qui le comportent :

- ✓ Le premier chapitre évoque les revues bibliographiques concernant la lutte biologique tout en présentant la monographie de la plante étudiée et une synthèse bibliographique sur les métabolites secondaires (flavonoïdes et tanins) comme modèle expérimental pour l'étude.
- ✓ Le deuxième chapitre décrit le matériel et les méthodes utilisés lors du travail expérimental.
- ✓ Le troisième chapitre expose l'ensemble des résultats obtenus avec leur discussion et enfin notre mémoire se termine par une conclusion générale

Chapitre I : Données bibliographiques

1.1. 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).**

1.1.1. 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).**

1.1.2 Fonctions des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires ne sont pas vitaux pour l'organisme mais jouent nécessairement un rôle important depart la machinerie enzymatique complexe nécessaire à leur production. 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).**

1.1.3. 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 :

1.1.3.1. Les composés phénoliques

Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires **(Lebham, 2005).** Ils constituent un des groupes le plus nombreux et largement distribué des substances dans le royaume des végétaux avec plus de 8000 structures phénoliques présents dans tous les organes de la plante. Ils résultent bio génétiquement de deux voies synthétiques principales : la voie shikimate et acétate **(Lugasi *et al,* 2003).** L'élément structural de base est un noyau benzoïque auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthylique, ester, sucre...) **(Bruneton, 1993, in Bruneton 1999).**

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 antifongiques. 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 pro-anthocyanidines) 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 ci-dessous.

Tableau1 : Activités biologiques des composés polyphénoliques **(Bahorun, 1997).**

Polyphénols	**activités**
Acides phénoliques	-Antibactériennes -antifongiques -antioxydants
coumarines	-Protectrices vasculaires -antiœdémateuses
flavonoïdes	-Anti tumorales -anti carcinogènes -antiinflammatoires -antioxydants -hypotenseurs et diurétiques

anthocyanes	-Protectrices capillaro-veineux -antioxydants
Tanins	-Antioxydants -antibactériennes -antifongiques

Source : Bahorun, 1997.

a. Classification des composés phénoliques

- Les acides phénoliques
- Les coumarines
- Les quinones
- Les tanins
- Les flavonoïdes

➢ **Les Flavonoïdes**

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette de quinze atomes de carbones, constitué de deux cycles aromatiques(A) et(B), qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle (C) **(Erdman et al, 2007).**

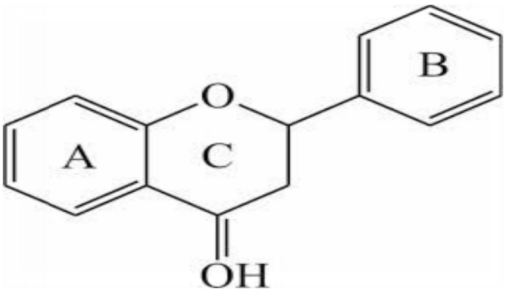


Figure 1 : Structure générale des flavonoïdes **(Romani et al, 1999)**

Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C6-C3-C6 **(Emerenciano et *al*, 2007),** en formant une structure de type diphényle propane dont des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule **(Narayana, 2001 ;Malešev et Kuntić,2007).**

- **Classification** :il existe environ 12 groupes connus de flavonoïdes qui ne diffèrent les uns des autres que par l'état d'oxydation de ce noyau hétérocyclique, les trois princi-

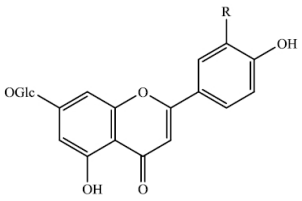
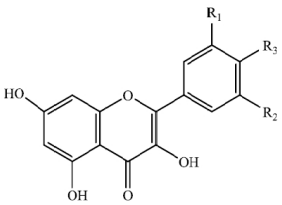
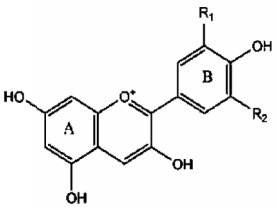
paux groupes (**Tableau 2**) sont les flavones, flavonols et les anthocyanes **(Hitara et *al*.,2009).**

- **Flavones** : elles sont abondantes chez les plantes supérieures sous forme aglycone ou glycosylée, certaines comme la lutéoléine sont en partie responsables de l'aspect blanc ou ivoire de certaines fleurs, comme les roses et les œillets **(Fleuriet *et al.,* 2005).**

- **Flavonols** : ils sont très répandus dans le règne végétal ; de ce fait, les flavonols sont abondants dans l'alimentation, nous citerons le kæmpferol, la quercétine, la morine et la myricétine **(Aherne et O'Brien, 2002).**Ils peuvent participer à la couleur jaune de certaines fleurs (primevère, chrysanthème jaune, fleur du cotonnier) et se retrouvent principalement sous forme glycosylée dans les fruits et les légumes **(Dawidar *et al.,* 1974).**

- **Anthocyanes** : sont des pigments colorés produits par les Angiospermes responsables de la pigmentation des fleurs, des fruits et des graines. Ils forment une vaste famille de molécules aux formules chimiques très diverses, dépendent de leur structure et du pH du milieu intracellulaire. Les anthocyanes sont synthétisées par les cellules épidermiques ou sous-épidermiques de différents organes **(Samouelian et *al.,* 2009).** 90% des anthocyanes sont construites autour de six anthocyanidines naturelles qui sont : la pelargonidine, la cyanidine, la péonidine, la pétunidine, la malvidine et la delphinidine **(Hitara *et al*.,2009).**

Tableau 2 : Structures chimiques des principales classes des flavonoïdes **(Hitara *et al*.,2009)**

Classes	Structures chimiques	Exemples
Flavones		Forme glycosylées : - Apigenine-7-O-glucoside : R=H - Luteoline-7-O-glucoside : R=OH
Flavonols		- Structure générale : R_1=R_2=R_3=H - Quercétine : R_1=OH ; R_2=H ; R_3=OH - Kaempferol : R_1=R_2=H ; R_3=OH - Myricétine : R_1=R_2=R_3=OH
Anthocyanes		- Malvidine : R_1=O-CH_3 ; R_2=O-CH_3 - Péonidine : R_1=O-CH_3 ; R_2=H - Delphinidine: R_1=OH ; R_2=OH - Pétunidine : R_1=O-CH_3 ; R_2=OH - Cyanidine: R_1=OH ; R_2=H

Source :Hitara *et al*.,2009.

- **Localisation et distribution des flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont impliqués dans de nombreuses interactions des plantes avec les conditions biotiques et abiotiques de leur environnement, ces substances sont accumulées dans les différentes parties cellulaires et tissulaires de la plante durant l'organogénèse et sous l'influence de plusieurs facteurs stimulants **(Hutzler et al ,1998)**

Sur le plan cellulaire, les flavonoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes puis migrent et se dissolvent dans les vacuoles **(Piquemal, 2008).** La répartition de ces composés montre des accumulations très localisées, généralement en relation avec une fonction physiologique ou avec l'interaction de la plante avec son environnement. Ainsi, les flavonoïdes qui ont une localisation épidermique ont un rôle d'écran vis-à-vis des rayonnements solaires, tandis que ceux qui sont impliqués dans les mécanismes de défense ont plutôt une localisation sous-épidermique **(Boudet, 2000, in Beta et *al.*, 2005).**

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieur (racines, tiges, feuilles, fruits, graines, bois, pollens) **(Verhoeyen et *al.*, 2002).** certaines classes de flavonoïdes sont présentes exclusivement chez certaines végétaux, on trouvera par exemple, les flavanones dans les agrumes, les isoflavones dans le soja, les anthocyanes et flavols ont eu une large distribution dans les fruits et les légumes, tandis que les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs, ils sont considérés comme des pigments naturels au même titre que les chlorophylles et les caroténoïdes .**(Lahouel ,2005 ;Piquemal,2008).**

- **Propriétés physico-chimiques des flavonoïdes**

- **Solubilité** :

La solubilité des flavonoïdes dépend, en grand parties, de la nature et du nombre des substituant : plus le nombre d'hydroxyles libres est élevé, plus ils sont solubles dans les solvants polaires et vis-versa **(Harborne et cool, 1975).**

Si en règle générale, les hétérosides sont solubles dans les alcools et l'eau, les aglycones sont solubles dans les solutions aqueuses d'hydroxydes alcalins **(Bruneton, 1987, in Bruneton, 1999).**

- **Propriétés pharmacologiques des flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont des pigments poly phénoliques qui sont responsables de la plupart des colorations des fleurs et des fruits .ils possèdent de nombreuses vertus thérapeutiques ; et

sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne circulation sanguine. Certains ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et antivirales, d'autre ont des effets protecteurs sur le foie, ils ont également des propriétés : antiallergiques, antimicrobiennes, anti-cancérogènes, anti-thrombotiques, cardioprotectives et vaso-dilatatrices **(Middleton et *al.*,2000 ; Ksouri et *al*,.2009).**

- **Les tanins**

Le mot "Tanin" fait référence à un large groupe de composés poly phénoliques naturellement produits par les plantes. Ces composés, solubles dans l'eau, se caractérisent par leur faculté à se combiner aux protéines et à d'autres polymères organiques tels que des glucides, les acides nucléiques, les stéroïdes et les alcaloïdes, pour former avec eux des complexes stables. Ce sont des molécules assez volumineuses avec un poids moléculaire généralement compris entre 500 et 3000 Dalton **(Khababaee.et Van Ree.2001).**

- **Distribution et localisation des tanins**

Les tanins peuvent se produire dans la quasi-totalité des parties de la plante, on les trouve depuis les racines jusqu'aux fruits, en passant par les poils, les tiges, le tronc ,le bois, les écorces et les feuilles .ils peuvent se produire dans des cellules individuelles isolées, en groupes ou en chaînes de cellules ,ce qui est le cas le plus commun. Ces cellules spéciales sont appelés idiblastes tannifères et sont disséminées dans le parenchyme **(Barry et Forss, 1983).**

Les tanins se localisent également dans des cavités spéciales et parfois dans des vacuoles .dans les tissus vivants de la plante, ils se trouvent principalement en solution colloïdale dans le suc vacuolaire. Lorsque les cellules vieillissent et perdent leurs contenus protoplasmique, les tanins sont, par conséquent, absorbés par la paroi cellulaire. Les tanins se trouvent souvent dans les cellules des glandes et dans les tissus atteint d'une pathologie parasitaire, comme les galles du chêne qui contiennent 30 à 70% de tanins. De ce fait, certaines galles de plantes constituent la meilleure source de tanins. Les jeunes tissus activement croissants des plantes sont également très riches en tanins. Quelque espèces peuvent contenir jusqu'à 50% de tanins dans leurs matières sèches. Cependant, la plus haute concentration de tanins dans les plantes saines et normales se trouve généralement dans les écorces. **(Jean-Blain, 1998).**

Selon **(Barry et Forss, 1983),** les principaux tissus qui contiennent des tanins sont :

- ❖ Les tissus du bourgeon : ils sont plus communs dans la partie externe du bourgeon, probablement comme protection contre la congélation.

- ❖ Les tissus des feuilles : ils sont plus communs dans l'épiderme supérieur. Cependant, les tanins sont distribués dans tous les tissus des feuilles des plantes vivaces qui possèdent des feuilles persistantes. Ils servent également à réduire l'appétence et donc à protéger la plante des prédateurs.
- ❖ Les tissus des racines : ils sont plus communs dans l'hypoderme . ils agissent probablement comme une barrière chimique contre la pénétration et la colonisation des racines par les plantes pathogènes.
- ❖ Les tissus des graines : ils sont principalement localisés dans la couche située entre le tégument externe et la couche de l'aleurone. Leur action est associée au maintien de l'état de latence de la plante. ils possèdent des propriétés allélopatiques et bactéricides.

- ❖ Les tissus de la tige : ils se trouvent souvent dans les surfaces actives de la croissance des arbres, telles que le phloème secondaire, le xylème et la couche situé entre l'épiderme et le cortex. les tanins peuvent avoir un rôle dans la régulation de la croissance de ces tissus.

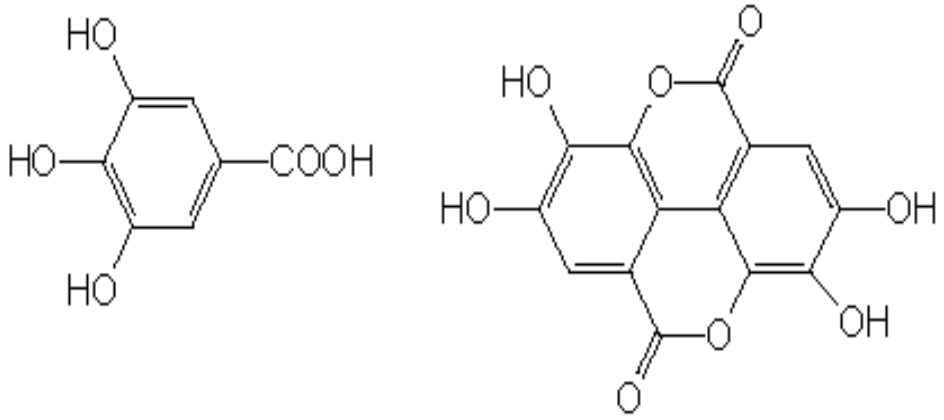
- ❖ Ils se trouvent également dans le cœur du bois des conifères et peuvent ainsi contribués à la durabilité naturelle du bois en inhibant l'activité microbienne. Ces substances localisées dans les différents sites, n'interfèrent pas avec le métabolisme de la plante. ils ne peuvent avoir d'effets métaboliques qu'après la dégénérescence cellulaire et la mort de la plante.

- **Classification des tanins**

Les tanins sont des poly phénols classés en deux catégories : les tanins hydrolysables et les tanins condensés, qui diffèrent par leur structure chimique et leur origine biogénétique **(Jean-Blain, 1999).**

Les tanins hydrolysables (TH)

Ce sont des hétéro polymères possédant un noyau central constitué d'un polyol. Il s'agit souvent d'un D-glucose sur lequel les groupements hydroxyles sont, une partie ou en totalité, estérifiés avec l'acide gallique (cas des gallo tanins) ou un dimère de l'acide gallique qui est l'acide hexahydroxydiphénique (cas des ellagitanins) **(Figure 2)**. Comme leur nom l'indique, ces substances s'hydrolysent facilement en milieux acides et alcalins ou sous l'action d'enzyme (telle que la tannasse), pour donner des glucides et des acides phénoliques **(Kumaret D'mello, 1995).** Certain auteurs définissent deux classes supplémentaires de tanins hydrolysables : les taragotanins (l'acide gallique et l'acide quinique comme noyau) et les caféta-nins (intégrant l'acide caféique et l'acide quinique). **(Cannas, 2006).**



A B

Figure 2: structure chimique de l'acide gallique (A) et l'acide ellagique (B)

Les tanins condensés (TC)

Ces derniers sont fondamentalement différents tanins hydrolysables, car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule, et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes **(Figure 3).** Il s'agit des polymères flavaniques constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone. Les proanthocyanidols ont été isolés ou identifiés dans tous les groupes végétaux : Gymnospermes et Fougères **(Bruneton, 1999).**

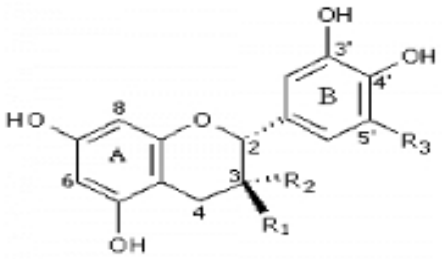


Figure 3 : Structure chimique des tanins condensés **(Sami-Manchado et Cheynier, 2006).**

- **Propriétés physico-chimiques des tanins**

Les tanins étaient anciennement utilisés dans l'industrie du cuir (tannage) car en se liant aux protéines constitutives des peaux d'animaux, les tanins rendent le cuir solide, imputrescible et résistant aux microorganismes. Ils sont généralement non cristallisables , solubles dans l'eau, l'alcool, l'acétone et peu ou pas soluble dans l'éther. Ils précipitent en présence de protéines (gélatine et albumine), d'alcaloïdes et de certains colorants.

Les tanins forment avec les métaux lourds, et notamment les sels de fer, des précipités de couleur très foncée : noirs, bruns ou bleus sombres, utilisés pour cette raison dans la fabrication de certaines encres .ils sont également utilisés comme coagulants dans le caoutchouc. Les propriétés biologiques des tanins sont principalement liées à leur capacité à former des complexes avec les macromolécules, en particulier les protéines. C'est pourquoi ils sont utilisés dans le traitement des aliments et la clarification des vins, des bières et des jus de fruits. Ils font également partie des formulations des agents de conservation du bois. En solutions alcooliques, ils donnent avec le chlorure ferrique, très dilué, une coloration bleue (tanins galliques) ou verte (tanins catéchiques). Certain tanins, comme ceux de la noix de galle, sont hydrolysables par les acides ou par la tannasse. **(FAO ,2000).**

- **Propriétés pharmacologiques des tanins**

Toutes les plantes contiennent des tanins à des degrés différents .Ces composés poly phénoliques permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections. Les plantes riches en tanins sont utilisées pour retendre les tissus souples, comme dans le cas des veines variqueuses, pour drainer les sécrétions excessives, comme la diarrhée et pour réparer les tissus endommagés par eczéma ou une brûlure **(Domart, 1981).**

1.2. Les huiles essentielles

1.2.1 Définition

Le terme huile essentielle(HE) dérive de « quintaessentia ». Un nom donné par le médecin suisse Paracelsus aux extraits de plantes obtenues par distillation. **(*Hart et al*., 2008).**
Les huiles essentielles (HE) sont des mélanges de composés aromatiques, issues de métabolisme secondaires de la plante **(Bardeau ,2009).** Le terme huile provient du fait, que les substances volatile, sont visqueuses et hydrophobe et qu'elles ont la propriété de solubiliser dans l'alcool et huile grasse, mais pas dans l'eau. La dénomination « essentielles » reflète le caractère principal des plantes à dégager des odeurs agréables **Al Abed et Kambouche,(2003).**

1.2.2 Localisation et lieu de synthèse

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les plantes supérieurs **(Bruneton, 1993, in Bruneton, 1999).** la synthèse et l'cumulation de ce métabolite est généralement associée à des structures histologiques spécialisées, localisées sur ou à proximité de la surface des organes de la plante**.(Garnéro,1991).** Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une même espèce, voire dans un même organe **(Fahn,1979).**

1.2.3 Rôles physiologiques des huiles essentielles

Pour la plante

Beaucoup des plantes produisent des huiles essentielles, leur mode d'action exact demeure encore obscure **(Rai et *al,*. 2003),** mais de nombreux travaux tentent de dévoiler leur rôle dans la vie d'une plante, il semble qu'elles :

- Favorisent la pollinisation en attirant les insectes pollinisateurs **(Sallé ,1991)**
- Représentent une source énergétique facilitant certains réactions chimiques et conservent l'humidité des plantes poussant des régions arides **(Belaîche, 1979)**
- Protègent la plante contre la flore microbienne par leurs propriétés fongicides et bactéricides, et contre les herbivores par leur goût amer et leurs effets défavorables sur leur système nerveux **(Porter ,2001).**
- Sont responsables du parfum des fleurs et jouent parfois le rôle d'insecticide. **(Pharmacopée européenne)**

Pour l'Homme

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

- En pharmacie, elles sont utilisées pour la préparation des médicaments, infusion ou dans l'aromatisation des formes médicamenteuses par voie orale, elles sont parfois utilisées comme suppléments diététiques **(smallfield ,2001)** sans oublier qu'elles constituent le support de l'Aromathérapie **(Bruneton 1993, in Bruneton, 1999).**
- En parfumerie, c'est le débouché principal des huiles essentielles, la cosmétologie et le secteur des produits d'hygiènes sont également des consommateurs, mais vu que les produits naturels sont souvent très chers, certaines industries privilégient les produits synthétiques**. (Porter ,2001).**
- En industrie alimentaire, elles sont responsables de l'amélioration de la saveur et de la couleur de nombreux produits de consommation (produit laitiers, boissons, soupes, confiserie, boulangerie,…etc.) **(Takeoka ,1998)**
- Dans divers industries, surtout chimiques, qui utilisent des isolats pour la synthèse des vitamines et des substances odorantes **(Bruneton 1993, in Bruneton, 1999).**

Pour la nature

- Les fonctions écologiques des huiles essentielles demeurent le plus souvent mal connues **(Bruneton 1993, in Bruneton, 1999).** il est parfois vraisemblable qu'elles aient un rôle aussi bien dans le domaine des interactions végétal –végétal en tant qu'agents allélopathiques **(Porter ,2001),** que dans celui des interactions végétal-animal **(Bruneton 1993, in Bruneton, 1999).** le rôle attractif ou répulsif des huiles essentielles, vis à vis des prédateurs, les conduits à une localisation épidermique, soit sous forme de cellules isolées sécrétrices, soit le plus souvent sous forme de poils sécréteurs. Les essences sont fréquemment un effet télétoxique sur la germination des graines. Par leur odeur, elles interviennent dans la pollinisation et dans la dispersion des diaspores **(Guinard, 2000).**

1.2.4 Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes renfermant des constituants très variables, qui appartiennent de façon quasi-exclusive à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpènes d'une part et le groupe des composés

aromatiques, dérivés du phénylpropane d'autre part. Elles peuvent aussi renfermer des composés divers, issues de processus de dégradation, mettant en jeu des constituants non volatils **(Ritcher, 1993)**

- **Terpènes**

Les terpènes, sont des hydrocarbures naturels, de structure généralement cyclique. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unités isoprénique à atomes de carbone (C_5 H_8) **(Hernandez-Ochon, 2005).** Parmi les quels en distingue les mono terpènes et les sesquiterpènes.

-Monoterpènes C_{10}, sont des composés plus volatiles, ils sont les principaux composés rencontrés dans les huiles essentielles **(Bellakhdar ,1997).**

-Sesquiterpènes C_{15}, sont des composés caractéristiques, des arômes produit par les plantes et donnent à celles –ci leur goût amer. Ce sont des composés généralement d'hydrocarbures **(Azoudj ,1999).**

- **Composés aromatiques**

Les dérivés de phénylpropane (C_6 –C_3), sont moins abondants que les terpénoides .cette classe comprennent des composés odorants comme la vanille, l'eugénol, l'anéthol et bien d'autre **(Richter ,1993).**

- **Composés d'origines divers**

Il existe un nombre non négligeable se produits résultant de la transformation de molécule non volatile, issus de la dégradation des terpènes non volatils, qui proviennent de l'auto-oxydation par exemple des carotènes ou des acides gras **(Piochon ,2008).**

1.2.5 Procèdes d'obtenir des huiles essentielles

L'extraction des huiles est une opération capitale qui doit permettre d'obtenir des produits volatils, particulièrement fragiles, sans altérer la qualité **(Roux et *al.,* 2008).**

Selon **Azoudj(1999),** le procède d'extraction dépend de la localisation histologique de l'essence dans le végétal, de son utilisation dans les diverses industries et surtout dans la fragilité et la sensibilité de celle –ci aux températures élevées.

Selon **Peyreffite et Martini (2008),** il existe plusieurs méthodes qui, permettent d'extraire les huiles essentielles, les plus utilisées sont l'extraction par hydro distillation, entrainement à la vapeur, l'expression à froid et l'extraction par solvants.

1.3 Plante étudiée

La plante étudiée *Myrtus communis L.* est une angiosperme dicotylédone appartenant à la famille des *Myrtaceae.*

La famille des Myrtacée est une famille de plantes dicotylédones qui comprend plus de 5650 espèces réparties en 48 à 134 genres environs. Ce sont des arbres et des arbustes de un à deux mètres de hauteur, souvent producteurs d'huiles aromatiques **(Govaerts et Lucas, 2008).**

Le genre Myrtus comporte deux espèces spermaphytes, il s'agit d'arbustes caractérisés par une huile essentielle très aromatique dans leurs feuilles. Les pièces florales stériles (pétales et sépales) sont multiples de cinq avec un nombre très important d'étamines. Les fleurs sont pollinisées par les insectes et les baies sont bleu-noirâtres **(Bianchini , 1975).**

1.3.1 L'espèce *Myrtus communis L.* : le Myrte commun

1.3.1.1 Historique

Le myrte est connu depuis l'antiquité, dans la mythologie de la Grèce antiquité, on l'utilisait pour couronner les guerriers glorieux, et les vainqueurs aux jeux olympiques, tout comme le laurier et l'olivier, le myrte est le symbole de la Déesse Venus**,** il est également le symbole de la paix pour les hébreux, ses feuilles sont utilisées pour célébrer leurs prières **(Bianchini , 1975).**

La médecine égyptienne est très riche en prescriptions des plantes, on utilisait le myrte pour l'embaumement des morts **(Sallé, 1991).**

1.3.1.2 Classification

Selon **Quezel et santa(1963),** le myrte commun est classé comme suit **(tableau3) :**

Tabeau3 : Taxonomie de myrte commun

domaine	eucaryotes
Règne	*plantae*
Sous règne	tracheophytes
Embranchement	Spermaphytes
Sous Embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Myrtales
Famille	*Myrtaceae*
Genre	*Myrtus*
Espèce	*Myrtus communis L.*

Source : Quezel et santa, 1963

Il est connu sous plusieurs appellations :

- En Arabe : الريحان, الآس
- Appellations populaires en Algérie : Chelmoun (,شلمون) Halmouch (حلموش) Tarihant (تاريحانت).
- En Français :Myrte commun
- En Anglais:Common myrtle, Greekmyrtle, Sweetmyrtle.
- En Allemand : Myrte
- En Italien :Mirto
- En Espagnole : Mirto, Mortella.

1.3.1.3 Descriptions botaniques

C'est un arbrisseau à tige assez régulière, toujours vert, à écorce rousse, exhalant par toutes ses parties un parfum très frais, fort agréable et des plus estimés.

Les rameaux sont quadrangulaires à légère pubescence les deux premières années.

Les feuilles sont opposées, ovoïdes lancéolées, 2 à 3 fois plus longues que larges, à nervation pennée, munies d'un pétiole très court, à extrémités aiguës-pointues, d'une consistance fermée, en étant lisses, coriaces, et d'un vert foncé brillant (**Figure 4-A**). Les feuilles renferment de nombreuses petites glandes translucides qui secrètent les huiles essentielles les rendant très aromatiques au froissement **(Quezel et santa,1962, in Quezel et santa,1963).**

La floraison peut débuter à partir de mai- juin et s'étale jusqu'en août. Les fleurs sont odorantes, solitaires, aux pétales d'un blanc éclatant **(Figure 4-B)** ou tâché de rose, jusqu'à 3 cm de diamètre, pourvues à la base de 2 bractées très petites, rapidement caduques, isolées à l'aisselle des feuilles et portées par de longs pédoncules. Les fleurs sont régulières, de type 5, et abritent un bouquet d'étamines proéminentes **(Quezel et santa,1963),** Le pistil est constitué de deux ou trois carpelles soudés, et l'ovaire est surmonté d'un très long style, qui traverse un disque nectarifère blanc et pentagonal. La pollinisation est effectuée par les insectes **(González-Varoet *al*., 2009).**

Le fruit est une baie ovoïde de 6 à 8 mm de diamètre, de couleur noir-bleuâtre au sommet d'un pédoncule ténu, couronnée par le calice, quelquefois blanche de saveur âpre, résineuse et astringente. Les graines sont réniformes, luisantes, de couleur ivoire, et de saveur résineuse avec des irrégularités de formes et de tailles **(Figure4, C/D). (Migliore, 2011)**



Figure 4 : Caractéristiques morphologiques de *Myrtus communis* L.
A : feuilles, **B :** fleurs, **C :** fruits type bleu foncé, **D :** graines **(Migliore, 2011)**

1.3.1.4 Répartition géographique

Le myrte est une plante spontanée typique des régions méditerranéennes **(Figure 5)**, bien que son aire de diffusion s'étende également en Asie **(Paris et Moyse, 1967 ; Bianchini, 1975).**

D'après **(Quezel et Santa ,1963),** on la rencontre souvent dans les garrigues et les broussailles. Très commune dans le Tell et plus précisément dans le littoral Algéro-Constantinois, elle parait manquer ailleurs.



Figure 5 : Répartition géographique de *myrtus communis L*. **(Miglore, 2007)**

1.3.1.5 Écologie et multiplication de la plante

Le myrte pousse en pleine soleil ou en mi- ombre, supporte assez bien le froid et s'adapte très bien aux conditions d'aridité. Cette plante préfère un terrain argilo-siliceux bien drainé, elle a donc besoin d'un arrosage régulier mais pas trop fréquent **(Ramdani, 1994).**

La multiplication du myrte se fait, soit par bouturage en juin avec des rameaux semi-lignifiés, soit par marcottage en début d'automne, ou alors, par semis en septembre. **(Bianchini et Azzura, 1975)**

1.3.1.6 usage et propriétés thérapeutiques

D'après **Morigane (2010),** le myrte est doté des vertus médicinales qui favorisent son utilisation dans :

- ✓ Les industries pharmaceutiques
- ✓ Parfumerie /cosmétique (utilisation de l'eau d'ange, essence aromatique)

- ✓ Agroalimentaire (Fabrication de boisson par fermentation des baies pour obtenir de la liqueur et du vin)
- ✓ Horticulture (On retrouve le myrte dans beaucoup e bouquets des fleurs de mariées)

Les emplois du myrte sont multiples, toutes ces parties (fleurs, fruits, feuilles) possèdent des propriétés thérapeutiques. Elles sont employées en infusion, sous forme de poudre ou d'huiles essentielles. **(Beloued, 2001).**

a- Usage interne :

Toutes les organes de cette plante sont utilisés comme remède populaire et se sont avérés utiles pour lutter contre de nombreuses maladies selon l'administration :

Les feuilles en décoction sont utiles pour traite les troubles gastrique, c'est un excellent antihémorragique et anti-malaria. **(Ogure, 1994).**

Les fleurs en décoction sont utiles contre les affections hépatiques et pour remédier aux troubles de la circulation sanguine **(Beloued, 2001).**

Les fruits sont soit consommés frais ou séchés pour fortifier le cœur **(Beloued, 2001).**

b- Usage externe :

Le myrte est recommandé dans le traitement des abcès et furoncles, en utilisant des compresses imbibées de décocté, à raison de 2 à 3 applications par jour. **(Goetz et Ghédira ; 2012).**

Les feuilles broyées sont employées dans le traitement des cheveux en association avec le henné pour noircir ainsi que contre les piqures des scorpions **(Ramdani, 1994).**

L'huile essentielle est recommandée en inhalation et massage des plexus, elle est très bien tolérée par la peau. **(Ramdani, 1994).**

c- Propriétés Médicinales de la plante

Le myrte a une action vulnéraire, cicatrisante, astringente, antiseptique et hémostatique. **(Bianchini ,1975).**

Cette plante est également utilisée contre les leucorrhées, les hémorroïdes et les affections pulmonaires **(Paris et Moyse, 1967).**

D'après **(Valnet,1985) ,** le myrte exerce un effet tonique, balsamique , antiseptique , bronchique , antiputride , astringent , hémostatique , et il a recommandé également l'huile de myrte pour le traitement des bronchites , des catarrhes-purulents des voies respiratoire et uri-

naires , de la tuberculose pulmonaire , rhinorrhée , sinusite, otite, diarrhées , prostate et les hémorroïdes.

1.4 Généralité sur les souches testées

1.4.1 Le genre *Aspergillus* :

Le genre *Aspergillus* fait partie de la classe des *Ascomycètes*. Il comprend environ 185 espèces reparties en 18 groupes morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches **(Raper et Fennell,1965).** Une vingtaine d'espèces sont impliquées dans des pathologies animale et humaine. Par contre, certaines d'espèces d'*Aspergillus* sont utilisées dans l'industrie agroalimentaire et dans l'industrie des produits biotechnologiques notamment pour la production d'enzymes et d'acides organiques **(Afssa,2006).**

1.4.2 Le genre *Penicillium*

Ce genre, appartenant au phylum des *Ascomycètes*, comprend environ 227 espèces définies essentiellement d'après les caractères du thalle, des pénicilles et des spores **(Pitt,1988).** Les *Penicillium* sont des champignons pour la plupart très communs dans l'environnement, polyphages, pouvant être responsables de nombreuses dégradations. Ils sont présent dans le sol, les matières organiques en décomposition, les denrées alimentaires, les graines, les céréales et le compost.

Les espèces du genre *Penicillium* se développent normalement dans des milieux ou l'activité de l'eau est plus élevée que celle permettant la croissance des *Aspergillus*, à des températures plus basses. Il s'agit de contaminants fréquemment retrouves dans les régions tempérées.

Chapitre II : Matériel et méthodes

2.1 Lieux d'expérimentation

Notre travail a été réalisé au niveau de trois structures scientifiques :

- ✓ l'extraction de l'huile essentielle et son analyse par (CG/SM) ont été réalisés au niveau du laboratoire de Biologie végétale à l'université des sciences et de la technologie Houari Boumediene (USTHB) -Bab Ezzouar, Alger- .
- ✓ L'extraction des polyphénols (tanins et flavonoïdes) et l'étude phytochimiques des extraits aqueux ont été réalisé au niveau de laboratoire Chimie 2 Hall technologique université Yahia fares –Médéa- .
- ✓ l'étude antifongique et l'analyse par HPLC ont été réalisées au niveau des laboratoires du complexe antibiotical -SAIDAL- Médéa.
- ✓ Durée de stage : le stage a eu lieu durant la période allant du mois de janvier au début d'avril 2018.

2.2Matériel

2.2.1Matériel biologique

2.2.1.1 Matériel végétal

Notre étude a été réalisée sur le myrte (*Myrtus communis L.*), les rameaux feuillés et les baies (fruits) **(figure6)** ont été récoltés le 25 octobre 2017dans la région Aîn Rommana (daïra de Mouzaïa) situé au sud –ouest de wilaya de Blida.



Figure 6 : les rameaux feuillés et les baies de *Myrtus communis L.* **(Original, 2018)**

2.2.1.2. Micro-organismes

Pour évaluer l'activité antifongique des extraits aqueux et HE de myrte, nous avons utilisés des souches fongiques (*Penicillium sp, Aspergillus Niger*) fournies par le laboratoire de microbiologie de groupe antibiotical Saidal -Médéa- et laiterie Arib - Ain defla - Les souches ont été reçues dans des boites de pétri sur milieu PDA.

2.2.2 Matériel non biologique

Le matériel et l'équipement utilisés au laboratoire (la verrerie, les appareils, les réactifs) sont mentionnés en **Annexe I**.

2.3 Méthodes

2.3.1 Traitements préliminaires des rameaux feuillés et des fruits utilisés

- **Récolte** : nous avons recueilli les rameaux feuillés et les fruits du *Myrtus Communis L.* durant le matin.
- **Séchage** : après lavage, notre matériel végétal a été séché à l'abri de la lumière et de l'humidité, à une température ambiante (25 à 28 °C) pendant deux mois afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules.
- **Broyage** : les rameaux feuillés et les fruits sont d'abord broyés grossièrement dans un moulin électrique puis à l'aide d'un broyeur électrique, une poudre de couleur verdâtre (feuilles) et de couleur violet à marron fruits) plus au moins fine est obtenue **(Figure 7)**.

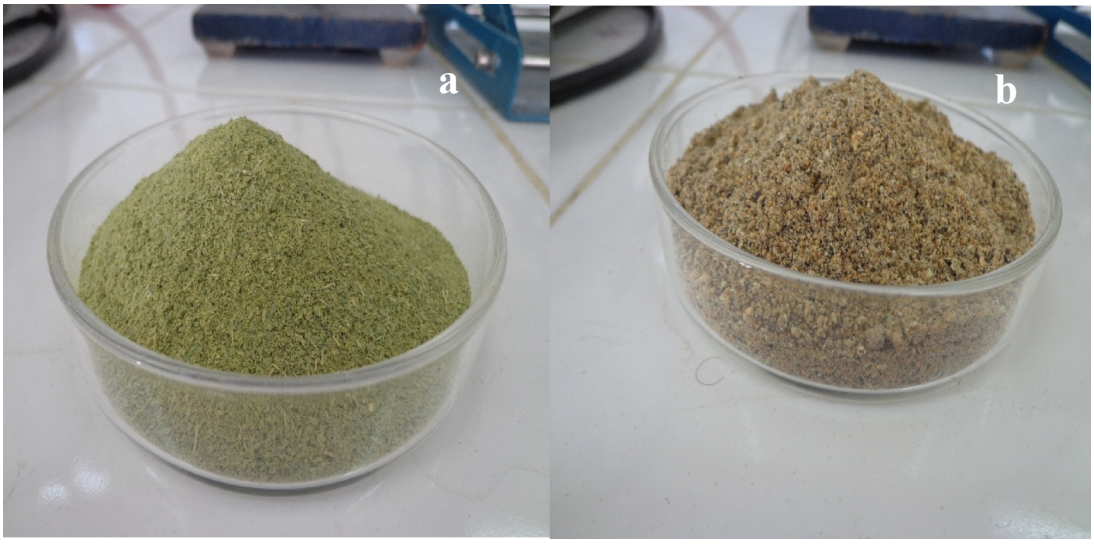


Figure 7 : la poudre des feuilles (a), et des fruits (b) du Myrte **(Original,2018)**

- **Conservation** : la poudre ainsi obtenu est conservée dans des boites en verre hermétiquement fermées.

2.3.2 Etude phytochimique

2.3.2.1 Caractérisations physico-chimiques de la plante

✓ **le taux d'humidité de la poudre végétale**

Le taux d'humidité de la poudre végétale est l'un des indices importants qui caractérisent la bonne qualité de celle-ci. Les plantes médicinales ne doivent pas contenir une quantité d'humidité dépassant la norme décrite par la pharmacopée européenne **(Pharmacopée européenne, 2002).**

Nous avons mis 1g de poudre végétale dans un creuset en porcelaine préalablement séché et pesé ; l'ensemble est placé dans une étuve réglée entre 100 et 105°C durant deux heures.

On calcule le pourcentage d'eau contenue dans la poudre par la formule suivant **(Pharmacopée européenne, 2005) :**

$$\mathbf{X\%=\frac{M-M'}{M}\times 1}$$

X% : Taux d'humidité de la poudre.

M : Masse de prise d'essai en gramme.

M′: Masse de prise d'essai après séchage en gramme.

✓ **la teneur en substances extractibles**

Les substances extractibles sont des substances organiques et inorganiques extraites à partir des matières végétales par un solvant.

❖ **Substances extractible par l'eau**

Nous avons introduit dans un ballon 1g de chaque poudre avec 20 ml d'eau distillée, porter le mélange à ébullition pendant 15 minutes. Laisser refroidir pendant 20 minutes ensuite nous avons filtré. Le filtrat est mis dans un bécher préalablement pesé, après évaporation à sec, nous avons pesé à nouveau le bécher avec le résidu.

La teneur en substances extractibles par l'eau, exprimée en pourcentage, est calculée par la formule suivante **(Diarra, 2003) :**

$$\textbf{T.S.E (\%)} = (m' - m) / Pe \times 1$$

P : Masse de la prise d'essai.

m : Masse du bécher vide.

m' : Masse du bécher avec le résidu.

- **Substances extractibles par l'éthanol 80%**

Nous avons introduit dans un erlenmeyer 1g de chaque poudre végétale avec 20ml d'éthanol 80%, laissé macérer pendant 24 heures à la température du laboratoire, après l'avoir recouvert à l'aide d'un verre de montre. Ce mélange est ensuite filtré avec du papier filtre.

Nous avons pesé le bécher vide avant d'y mettre le filtrat, après évaporation à sec, nous avons repesé le bécher avec le résidu .La teneur en substances extractibles par l'éthanol, exprimée en pourcentage, est calculée par la formule suivante **(Togola, 2002) :**

$$\textbf{Substances extractibles par l'éthanol} = \frac{m' - m}{P} \times 1$$

P : Masse de la prise d'essai.

m : Masse du bécher vide.

m' : Masse du bécher avec résidu.

Remarque : toutes ces manipulations sont répétées 3 fois pour calculer la moyenne.

- ✓ **Détermination des cendres totales**

La détermination des cendres est une méthode utilisée pour mesurer la quantité des substances résiduelles inorganiques contenues dans une drogue lorsque la poudre est complétement calciné.

Nous avons pesé 1g de chaque poudre végétale, que nous avons distribuée uniformément dans un creuset préalablement taré. La température est augmentée progressivement au cours de l'incinération au four à moufle durant les deux premières heures, puis elle est maintenue à 800°C pendant 4 heures.

L'échantillon est refroidie durant une nuit, une fois sortie du four, la capsule est placée dans un dessiccateur pendant 15 minutes puis pesée. Le calcul du pourcentage des cendres totales par gramme de poids sec se fait selon la formule suivante **(Pharmacopée européenne, 2002).**

$$C\% = \frac{P - P}{P} \times 1$$

P : Poids du creuset après calcination.

Pc : Poids du creuset vide.

Pe : Masse de la prise d'essai.

2.3.2.2 Screening phytochimique des métabolites

Le screening phytochimique est un ensemble de réactions chimiques simples, permettant d'orienter rapidement vers l'étude détaillée de quelques types de constituants chimiques **(Girre, 1980).** Dans le but de connaitre les principales familles de métabolites présents dans les baies et les feuilles. Ces tests sont effectués soit sur la poudre végétale, soit sur l'infusé.

- ✓ **Recherche des substances poly phénoliques**
- ▪ **Solution à analyser : (préparation de l'infusé 5%)**

Nous avons introduit 5g de la poudre végétale dans un erlenmeyer de 250ml contenant 100ml d'eau distillée bouillante. Nous avons arrêté l'ébullition et fermé avec un verre de montre ,après infusion pendant 15minutes, nous avons filtré et rincé avec un peu d'eau chaude de manière à obtenir un volume final de 100ml de filtrat **(Diallo,2005) (figure 8).**

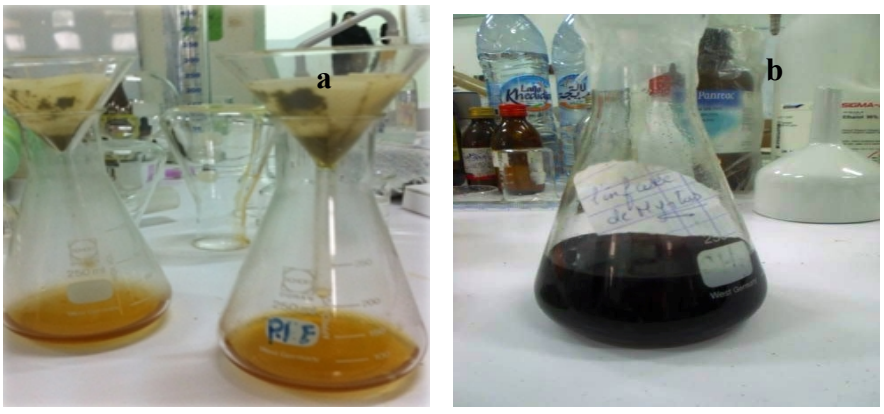


Figure 8 : l'infusé 5%des feuilles (a) et des baies(b) du myrte **(Original ,2018).**

- **Les composées phénoliques**

Nous avons pris 5ml d'infusé auquel on ajoute quelques gouttes d'HCL. La réaction donne une couleur rouge en présence des poly phénols. **(Diallo, 2005).**

- **Les Anthocyanes**

5ml d'infusé sont introduit dans un tube à essai auquel quelques gouttes d'ammoniaque$\frac{1}{2}$ sont ajoutés. La réaction donne une coloration bleue en présence des anthocyanes**.(Pharmacopée URSS, 1991).**

- **Les Tanins**

Nous avons introduit 5ml d'infusé dans un tube à essai, nous avons ajouté 1ml d'une solution aqueuse diluée de $FeCl_3$ (5%). En présence des tanins, il se développe une coloration bleu noirâtre **(Diallo, 2005).**

- **les Tanins catéchiques**

Nous avons introduit 5ml d'infusé dans un tube à essai, ajouter 1 ml d'alcool chlorhydrique, porter à ébullition 15 minutes, en présence des tanins catéchiques, il se forme un précipité rouge **(Diallo, 2005).**

- **Les Flavonoïdes**

Nous avons introduit dans un tube à essai 5ml d'infusé, auquel on ajoute 5ml d'HCL, 1ml de butanol puis quelques copeaux de magnésium.il se produit une réaction de crépitation durant quelque minutes **(Diallo, 2005).** L'apparition d'une coloration rouge-orange indique la présence des flavonoïdes.

- **Les Glycosides**

A 2g de poudre végétale, nous avons ajouté quelques gouttes d'acide sulfurique, la formation d'une coloration violette indique la présence des glycosides **(Pharmacopée URSS ,1991).**

- **Les Coumarines**

Selon **(Diallo, 2005),** la préparation de l'extrait se fait comme suit :

-faire bouillir 1g de poudre dans 10ml éthanol pendant 7minutes puis filtrer.

-A 1ml du filtrat, rajouter 5 gouttes de la solution alcoolique de KOH à 10% et quelques gouttes d'HCL à 10%.

-la formation d'un trouble indique la présence des coumarines.

- ✓ **Recherche de Mucilage**

Nous avons introduit 1ml de l'infusé dans un tube, ajouter 5ml d'éthanol, après 10minutes, l'obtention d'un précipité floconneux indique la présence des mucilages **(Diallo, 2005).**

2.3.3 Extraction et purification des flavonoïdes et des tanins

2.3.3.1. Extraction et purification des flavonoïdes

Pour l'extraction des flavonoïdes, nous avons suivi le protocole décrit par **Guignard(2000) (Figure 9)**. Il se réalise en plusieurs étapes :

- **Macération et évaporation**

Nous avons fait macérer 15g de poudre végétale avec 100ml de méthanol pendant 72heures. Après filtration, le méthanol s'évaporeà sec (40-50c°) et le résidu sec obtenu est traité par 25ml d'eau tiède, afin d'obtenir un extrait aqueux.

- **Extractions liquide-liquide**

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

a : Elimination de la chlorophylle et des lipides par chloroforme

On verse l'extrait aqueux dans l'ampoule à décanter, auquel on ajout 15ml de chloroforme. On élimine la phase organique, cette étape est refaite 3 fois jusqu'à l'élimination totale de la fraction lipidique et chlorophyllienne, ensuite on récupère la phase aqueuse.

b : Elimination des génines libres

On ajouter à la phase aqueuse récupérée 15ml d'éther diethylique, et on laisse décanter. Après la formation de deux phases, on récupère la phase inférieure (phase aqueuse).Et on élimine ensuite la phase supérieure (éther diethylique + quelques génines libres). On refait cette étape 3 fois jusqu'à l'élimination totales des génines.

c : Eliminationdes monosides

On verse 15ml d'acétate d'éthyle dans l'ampoule qui contient l'extrait aqueux, après décantation, on suit les mêmes démarches que celles réalisées pour l'élimination des génines libres, jusqu'à l'élimination totale des monosides.

d : Récupération des flavonoïdes et évaporation du butanol

Pour la séparation des flavonoïdes, on ajoute 15ml de butanol à 3 reprises à l'extrait aqueux et on récupère la phase butanolique qui contient les flavonoïdes. Ensuite nous avons effectué une évaporation à sec du butanol (à 55c°) pour l'obtention d'un résidu sec des flavonoïdes.

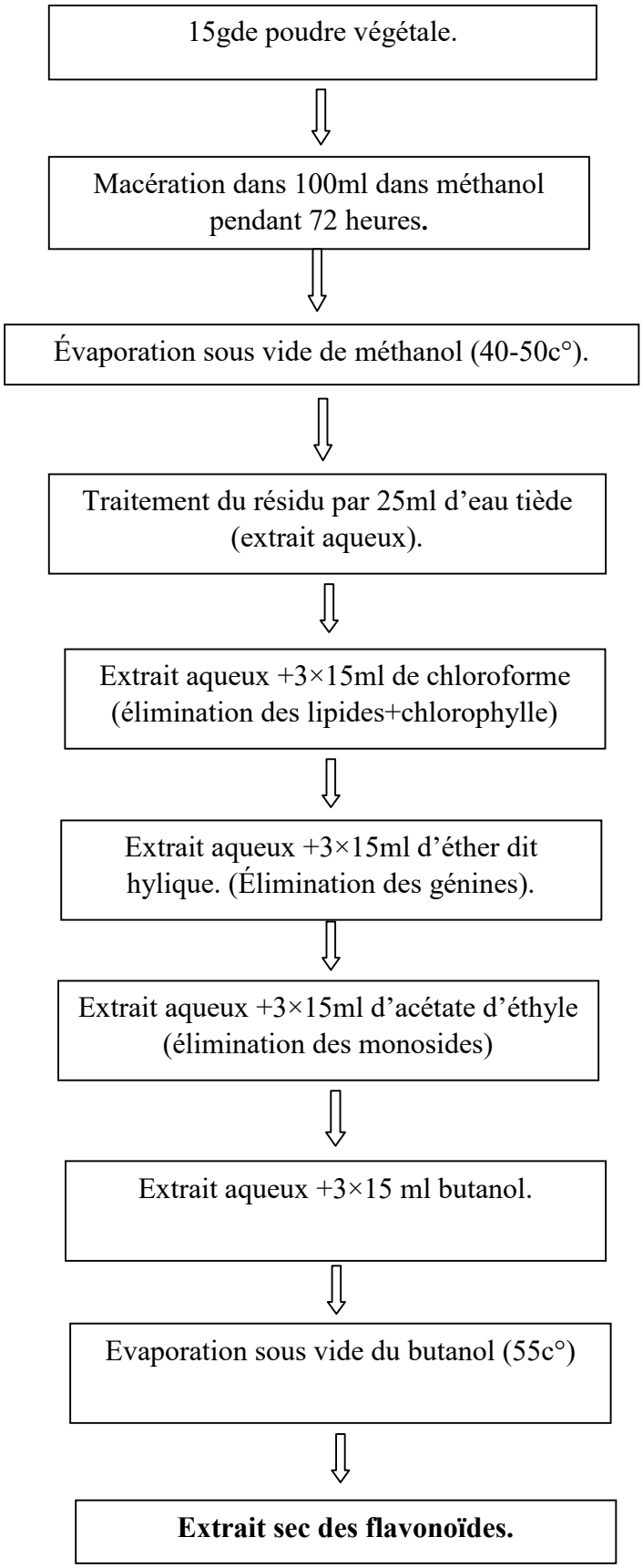


Figure 9 : protocole d'extraction des flavonoïdes **(Guignard ,2000).**

- **Détermination du rendement des flavonoïdes**

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

$$R\% = \frac{M\ (b\ +e\ )-M}{M\ \ 'e}$$

2.3.3.2. Extraction et purification des tanins

Le protocole expérimental que nous avons suivi est décrit par **(Guignard ,2000).** Il consiste à additionner 30g de poudre végétale avec un mélange benzène/chloroforme (100ml/100ml) et laisser macérer pendant 72 heures, pour éliminer la chlorophylle et la fraction lipidique. Ensuite après filtration, la poudre végétale retenue par le papier filtre est épuisée avec 100ml d'éther diéthylique pour l'élimination de l'acide oxybutyrique et les catéchines. La poudre végétale est récupérée à nouveau et épuisée avec 100ml d'acétate d'éthyle, pour éliminer les leuco-anthocyanes et les pro-anthocyanes.

La poudre végétale est récupérée une dernière fois et macérée dans 100ml méthanol pendant45minutes. Après filtration, Le filtrat obtenu est évaporé à sec (40-50°C) pour récupérer le résidu sec des tanins **(Figure 10).**

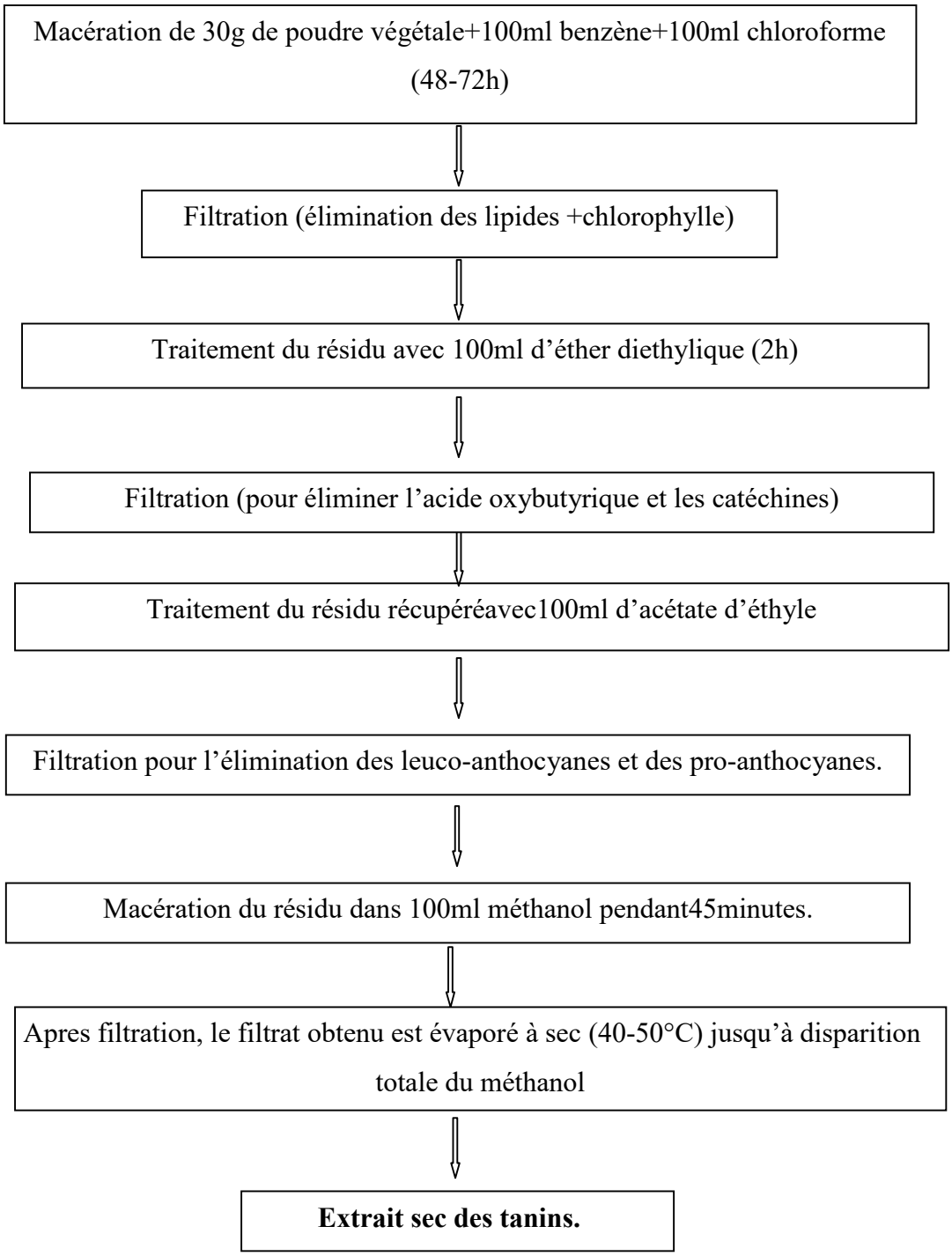


Figure 10 : protocole d'extraction des tanins **(Guignard ,2000).**

- **Détermination du rendement des tanins**

Le rendement (R%) des tanins est évalué après l'obtention du résidu sec des tanins, en appliquant la formule suivante :

$$R\% = \frac{M\ (b\ +e\ )-M}{M\ 'e}$$

2.3.3.3. Préparation de l'extrait aqueux des flavonoïdes et des tanins

Pour évaluer les effets biologiques des flavonoïdes, nous avons préparé un extrait aqueux ayant une concentration de 40mg/ml de la manière suivante :

-la solution solubilisant est préparée en mélangeant 100ml d'eau distillée dans une fiole avec 1ml de Tween 80, ce mélange est maintenu à l'étuve pour quelques minutes (afin de faciliter la dissolution du Tween 80 dans l'eau).

- Après refroidissement de cette solution solubilisant, on prélève le volume désiré pour faire solubiliser l'extrait sec (des flavonoïdes et des tanins) qui est pesé avec une balance de précision. De telle sorte à obtenir une concentration finale de 40mg/ml.

Exemple : une masse de 120mg d'extrait sec est dissoute dans 3ml de solution solubilisant (eau distillée + tween 80) pour avoir une solution ayant une concentration de 40mg/ml.

40mg (extrait sec) ⟶ 1ml (solution solubilisant)

120mg (extrait sec) ⟶ X = 3ml

2.3.4 Extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation

L'hydrodistillation c'est l'une des plus anciennes et plus faciles techniques d'extraction des huiles essentielles

- **Principe**

Consiste à immerger le matériel végétal directement dans un ballon rempli d'eau placé sur une source de chaleur (chauffe-ballon). Le tout est ensuite porté à ébullition. Les cellules végétales éclatent et libèrent les molécules odorantes, lesquelles sont entrainées par la vapeur d'eau crée. Elles passent par un réfrigérant à eau ou elles sont condensées, puis sont récupérées dans un récipient **(figure 11).**

L’huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau (sauf quelques rares exceptions), elle surnage au-dessus de l'hydrolat.

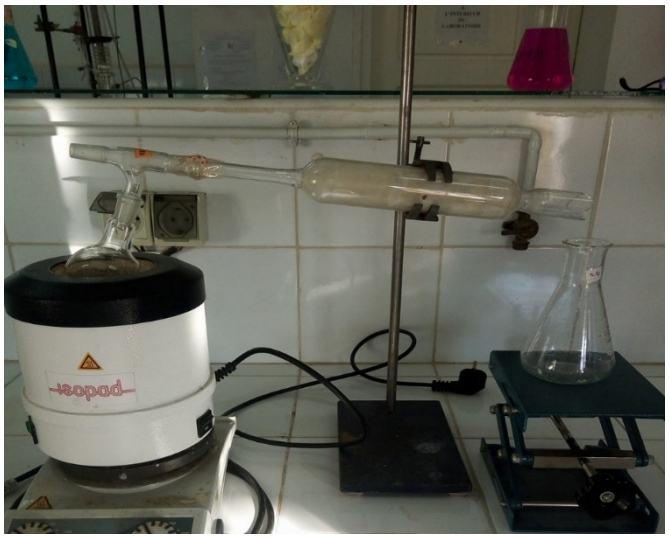


Figure 11 : montage de l’hydrodistillation **(Original, 2018)**

- **Protocole expérimental**

* Peser 10g de végétal préalablement séché et broyé et les introduire dans le ballon de 150 ml.

* ajouter 100ml d’eau distillée.

*ajouter quelques graines de pierre de ponce (afin d’homogénéiser la température du mélange).

* réaliser le montage d’hydrodistillation puis mettre en route la circulation d’eau dans le réfrigérant.

*porter le mélange à ébullition.

*Arrêter le chauffage après obtention d’environ 70-80ml du distillat dans l’erlenmeyer.

*le distillat obtenu ne permet pas la récupération de l’HE par simple décantation, on va procéder à une extraction par solvant : extraction liquide/liquide.

*ajouter environ 3g de chlorure de sodium (Na cl) au distillat et agiter avec une baguette en verre pour dissoudre le sel.

*transverse la solution dans une ampoule à décanter et y ajouter environ 10ml de (diethyl-ether) à l’aide d’un bêcher.

*agiter l’ampoule à décanter en n’oubliant pas de la dégazer assez régulièrement.

*laisser reposer.

*identifier laquelle des deux phases contient l'huile essentielle (phase organique) et la recueillir dans un bêcher sec.

*conserver l'HE dans un flacon opaque, hermétiquement fermé pour préserver de l'air et de la lumière et mise à 4°C.

*Le rendement en huile essentielle a été déterminé par rapport à la matière fraiche, en utilisant la formule suivante :

$$\mathbf{R(\%) = [m_h/m_v]\times 100}$$

R : rendement en huile essentielle

m_h : masse en grammes d'huile essentielle.

m_v : Masse en grammes de la matière végétale sèche

2.3.4.1 caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle

- ✓ **analyses physiques**
- ➢ **La densité relative :**

C'est le rapport entre la masse d'un volume d'huile essentielle et la masse d'un volume égal d'eau à 20 °C.

- **Mode opératoire :**

Après avoir nettoyé le tube du densimètre avec de l'eau distillée, nous l'avons plongé dans la solution d'huile essentielle. Les valeurs de la densité et de la température sont affichées sur l'écran du densimètre. La densité relative est mesurée par la formule suivante :

$$\boldsymbol{d = \frac{m \quad - m}{m \quad - m}}$$

m1 : poids du pycnomètre avec HE.

m2 : poids du pycnomètre avec l'eau distillée.

m : poids du pycnomètre vide.

➢ **Le pouvoir rotatoire :**

Le pouvoir rotatoire est une caractéristique importante de la pureté des huiles essentielles. Il permet d'indiquer si elles possèdent une activité optique dextrogyre (+) ou lévogyre (-).(AFNOR ,2000).Il est calculé par la formule suivante

$$[\alpha]_d^{20} = \frac{\alpha}{L \times [C]}$$

Dont :
α : degré d'angle (lu sur l'appareil)
L : longueur du tube du polarimètre
[C] : concentration de l'huile essentielle (g/100ml).

- **Mode opératoire :**

Pour la détermination du pouvoir rotatoire nous avons utilisé un polarimètre. Pour cela nous avons rempli la cellule de l'appareil avec 1g d'huile et 24 ml d'éthanol. L''angle de rotation est lu directement après apparition d'une image claire.

➢ **Indice de réfraction :**

L'indice de réfraction est le rapport entre les sinus de l'angle d'incidence de longueur d'onde déterminée **(AFNOR,2000)** et **(Chavanne, 1986).**L'indice de réfraction d'un milieu déterminé pour une radiation monochromatique est égal au rapport suivant :

$$\eta = \frac{\sin i}{\sin r}$$

- **Mode opératoire :**

Le réfractomètre dispose d'une lame en verre sur laquelle l'échantillon est déposé. L'appareil a d'abord été ajusté avec de l'eau distillée, puis séché. On place ensuite une goutte d'huile essentielle sur le prisme du réfractomètre et on effectue la mesure.

L'indice de réfraction final est donné par l'équation suivante :

$[n]_D^{t'} = n_D^t + 0.0004\ [t'-t]$

n_D^t : Indice de réfraction de référence ;

$[n]_D^{t'}$: Indice de réfraction mesuré ;

t : Température (20°C) ;

t' : Température au moment de la mesure.

- ✓ **analyses chimiques**
- ➢ **pH (potentiel hydrogène)**

Le pH mesure l'activité chimique des ions H^+en solution, plus couramment, le pH mesure l'acidité ou la basicité d'une solution, ce paramètre est très important pour déterminer la qualité de notre huile **(Mohandi, 2006)**

$$pH = -\log[H_3O^+]$$

- ➢ **Indice d'acidité :**

C'est la masse en mg de KOH nécessaire pour la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'huile essentielle. La teneur en acides libres des corps gras augmente avec le temps, l'indice d'acide permet donc de juger de leur état de détérioration **(Mohandi, 2006)**

$$RCOOH + OH^- \text{ ----------} RCOO^- + H_2O$$

Cet indice est calculé selon l'équation :

$$I_A = \frac{V \times \frac{M}{m}}{100} \quad \text{mg KOH/1g d'huile}$$

Avec :

V : Volume de KOH (0,01N) versé (mL) ;

M : Masse molaire de KOH (g/mol) ;

m : Masse d'huile essentielle (g).

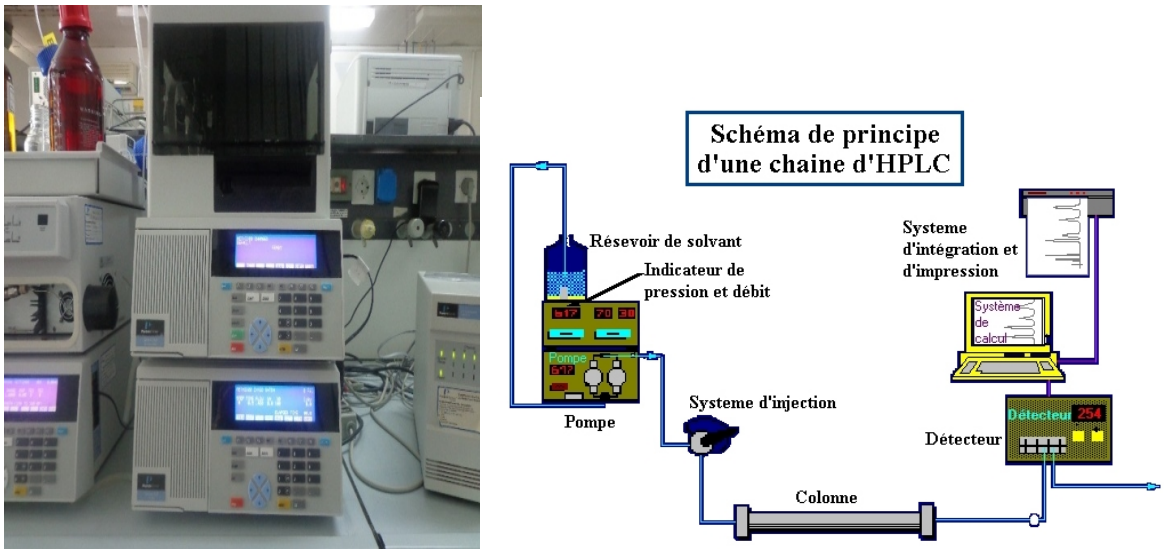
2.3.5 Analyse des extraits obtenus par HPLC

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est une technique plus performante (**Figure12**), utilisée pour la séparation des produits non volatils thermo-dégradables, tels que les composés phénoliques. Elle ne demande qu'une faible quantité

d'échantillon végétal et permet de combiner en une seule opération les analyses qualitatives et quantitatives d'un extrait complexe **(Pietta *et al.*, 2003).**

- **Principe de fonctionnement**

Au départ, le mélange est déposé en une couche mince au sommet d'une colonne ou s'entasse la phase stationnaire sous forme de particules de petite taille, l'échantillon à analyser est poussé par un débit élevé de la phase mobile ; ce qui entraine une augmentation de la pression dans le système. Le mélange à séparer se déplace progressivement vers le haut .en descendant, les composés de ce mélange ont tendance à se séparer quand ils atteignent l'extrémité inférieure de la colonne. A cet endroit, la phase mobile traverse un dispositif de détection qui permet de déceler la présence des composés dans la phase mobile et de tracer un chromatogramme (évolution des pics à une longueur d'onde donnée en fonction du temps, les pics obtenus sont plus étroits donc la résolution est améliorée, le seuil de détection est également plus bas **(Lindsay, 1987).**



(a) **(b)**

Figure 12 :a)dispositif utilisé **(original, 2018),** b**)** schéma du principe de fonctionnement d'une chaine d'HPLC **(Lindsay, 1987).**

- **Mode Opératoire**

Analyse quantitative par HPLC :

L'analyse des extraits préparés est réalisée par un HPLC (*VS SHIMADZU LIQUID CHROMATOGRAPH).* 20 µl de chaque extrait ont été injectés sur une colonne de type phase inverse C18 de dimensions égales à 125 mm ×4.6.la phase mobile est constituée de deux

éluant : l'eau distillée, méthanol, (40 :60) (v/v) .le gradient d'élution appliqué est le type isocratique étalé sur 10min. le débit est de 1ml/min **(Amarowicz et *al.*, 2005).** La détection a été effectuée par un détecteur UV-Vis à une longueur d'onde égale 254 nm.

Expression des résultats :

Les flavonoïdes et les tanins contenus dans chaque extrait analysé ont été identifiés par la comparaison de temps de rétention obtenus avec ceux des témoins (acide gallique, acide tannique et al rutine).

2.3.6 Analyse de la composition de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) :

2.3.6.1 Chromatographie en phase gazeuse :

La chromatographie en phase gazeuse est une technique de séparation chromatographique reposant sur la distribution différentielle des molécules entre deux phases non miscibles, une phase stationnaire contenue dans une colonne et un gaz vecteur comme phase mobile **(pharmacopée européenne, 2005).**

Elle est applicable aux composes gazeux ou susceptibles d'être vaporise par chauffage sans décomposition. Elle permet l'analyse des mélanges éventuellement très complexes, de nature et de volatilité très diverses **(tranchât, 1995).**

2.3.6.2 Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est fondée sur la mesure direct du rapport de la masse au nombre de charge élémentaire m/z des ions en phase gazeuse, obtenus à partir de la substance à analyser. **(Hoffman et Stroobant, 2007).**

De manière schématique la spectroscopie de masse s'effectue en plusieurs étapes :

- L'échantillon est d'abord vaporise.
- Puis il subit une ionisation par impact électronique.
- Les ions formes sont détectés après séparation en fonction de leur masse.
- Enfin, l'abondance relative de ces ions est mesurée puis enregistrée sous forme d'un spectre de masse**. (Badja, 2003).**

2.3.6.3 conditions opératoires :

Les conditions opératoires du chromatographe : **Hewlett Packard N° 6890** sont comme suit :

-injection de 1 µl en mode split (1/50)

-température de l'injection : 250°C

-colonne capillaire HP5MS (30m×0.25mm×0.25 µl)

-programmation de température : 60°C pendant 1 min, 2°C/min jusqu'à 130°C, 130°C pendant 1min, 6°C/min jusqu'à 250°C.

-débit du gaz : hélium (1ml/min).

2.3.6.4 Identification des composés :

L'identification des différents constituants est réalisée à partir de leurs indices de rétention selon **(Kovats, 1965).** Une confirmation est apportée à l'aide des spectres de masse en comparaison avec ceux des composes standards de la banque de données informatisée **(Adams, 2001,in Adams, 2007).** La composition chimique de l'huile essentielle de la plante sélectionnée est répertoriée dans la partie résultats et discussion.

2.3.7 Etude de l'activité antifongique

2.3.7.1 Méthode de diffusion sur milieu solide

- **Principe**

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits végétaux, nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé (solide) en utilisant des disques. Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide dans une boite de Pétri déjà ensemencée par une culture microbienne (champignon). L'effet antimicrobien du produit sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition, la souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante.

- **Protocole expérimental**

- préparer le milieu de culture Sabouraud **(Annexe II),** c'est un milieu très recommandé et commode pour la culture des champignons saprophytes et pathogènes **(Deba et *al.*, 2007).**

- Couler aseptiquement le milieu de culture gélosé (Sabouraud) en surfusion dans des boites de Pétri à raison de 15mL par boite. On laisse le milieu refroidir et solidifier sur la paillasse (sous la hotte).

- Dans le cadre de la mise en évidence de l'effet antifongique, nous avons testé plusieurs dilutions des chaque extrait à analyser (**100%(**40mg/ml) ,**80%**(32mg/ml), **50%**(20mg/ml) ,**30%**(12mg.ml) ,**10%**(4mg/ml)) **(Annexe III)**

- pour tester l'activité antifongique de l'huile essentielle, nous avons dilué notre HE à 50%, 25% et 12,5%. **(Annexe IV).**

- nous avons comparé nos résultats a trois témoins : **(T1)** : eau distillée stérile, **(T2)** : tween 80 et **(T3)** : mélange eau distillée/tween 80 (100 ml/1ml).

- préparer l'inoculum à partir d'une culture pure et jeune de 18 à 24 heures sur milieu d'isolement, prélever à l'aide d'une anse en platine stérile, 3à5 petites colonies bien isolées et parfaitement identiques, que l'on introduit dans 10ml d'eau physiologie stérile à 0.9%. Bien homogénéiser la suspension fongique préparée, son opacité doit être équivalente à une D.O de 0.3 à longueur d'onde de 625nm, qui correspond environ à 10^8 germes par ml pour les champignons. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologie stérile s'il est trop concentré. L'inoculum préparé doit être ensemencé dans les 15min qui suivent sa préparation.

- Ensemencer 1mL de chaque suspension de cultures fongiques utilisées à la surface du milieu gélosé à l'aide d'un écouvillon.

- A l'aide d'une pince stérile, imbiber des disques stériles de 6mm de diamètre dans l'un des extraits à tester (et ensuite par le deuxième extrait et ainsi de suite) ainsi que dans les différentes concentrations de l'huile essentielle, et les poser sur la gélose. Les boites de Pétri sont ensuite fermées et laisser l'extrait diffuser à température ambiante pendant 30min, et mises à l'incubation pendant 72 heures à 37ºC.

- Dans les boites de contrôle (témoins), les disques sont imbibés dans de l'eau distillée stérile.

- L'expérience est répétée 2 fois pour chaque extrait et pour chaque souche fongique.

- La lecture se fait par la mesure du diamètre (en mm) de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle. Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisée par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des extraits **(Ponce *et al.*, 2003).**

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14mm
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20mm.

2.3.7.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI de façon générale est la plus faible concentration d'antimicrobien capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24 heures.

- **principe**

Le principe de cette méthode consiste à réaliser plusieurs dilutions de chaque extrait **(annexe III)** et de l'huile essentielle **(annexe IV),** et les incorporer dans le milieu gélosé fondu, et à tester les souches bactériennes à étudier sur ces milieux. Ce test donne un intervalle de valeurs de la concentration minimale inhibitrice de chaque souche.

- **Protocole expérimental** (**Figure 13**)

- Préparer le milieu Sabouraud (**Annexe II**)

- Couler le milieu dans les boites de Pétri à l'ordre de 15mL par boite, laisser refroidir et solidifier.

- Préparer les dilutions de chaque extrait **(annexe III)**

- Préparer les dilutions de l'huile essentielle **(annexe IV)**

- Préparer des tubes à essais avec 3 ml du milieu Sabouraud et 1ml de chaque concentration des extraits et de HE, laisser les tubes dans un bain Marie pour éviter que le milieu ne se solidifie.

- Agiter manuellement les tubes, puis verser le contenu des tubes dans les boites contenant la première couche de gélose, étaler rapidement en pivotant la boite sur elle-même pour avoir une surface uniforme laisser refroidir jusqu'à solidification.

- Ensemencer les boites de Pétri avec les souches fongiques à étudier ainsi que chaqu'un des trois témoins (**T1**, **T2** et **T3**) et les mettre à incubation à 37ºC pendant 72heures.



Figure 13 : Coulage des boites Pétri (**a**), dilutions des extraits aqueux (**b**), dilutions de HE(**c**) et tubes contenant 3ml de milieu sabouraud (**d**) **(Original, 2018).**

Chapitre III : Résultats et Discussion

3.1Résultats de l'étude phytochimique de la plante étudiée

3.1.1Résultatsdes caractérisations physico-chimiques

- **Résultats du taux d'humidité dans la poudre végétale**

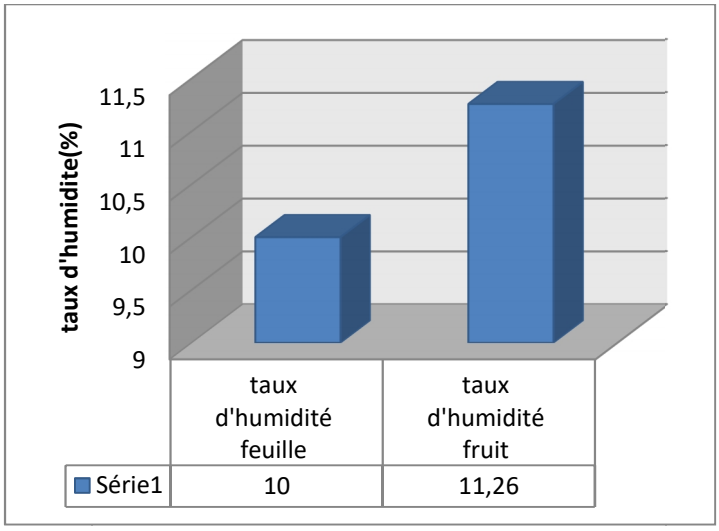


Figure 14 : résultats du taux d'humidité dans la poudre végétale des feuilles et des fruits de *Myrtus communis L.*

Nous avons trouvé un taux d'humidité qui avoisine **10 %** en moyenne dans la poudre des feuilles et **11.26%** dans la poudre des baies de l'espèce végétale étudiée **(tableaux 1, 2 ; annexe V)**. Ceci montre que la poudre végétale avec laquelle nous avons travaillé a été soumis à des bonnes conditions de conservation. De plus, ce taux d'humidité obtenus répond à la norme décrit par **(La Pharmacopée européenne, 2002).**Qui doit impérativement être inférieur à **15 %** la poudre obtenue est donc de bonne qualité.

- **Résultats de la teneur en substances extractibles**

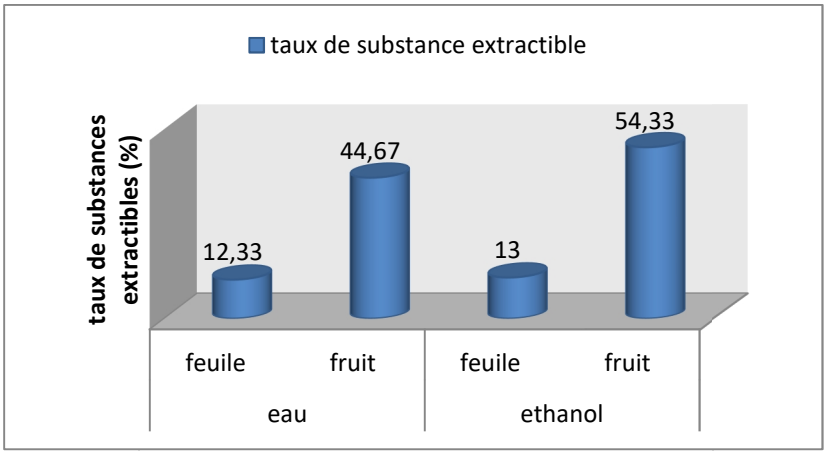


Figure15 : résultats de la teneur en substances extractibles par l'eau et par l'éthanol

Le taux du résidu sec de la plante extrait par l'eau (infusion) représente **12.33%** dans les feuilles et **44.67 %** dans les baies en moyenne pour la poudre de *Myrtus communis L.* **(tableau 3 ; annexeV).**

L'extrait sec obtenu par macération dans l'éthanol affiche **13 %**dans les feuilles et **54.33%** dans les baies en moyenne pour la poudre de *Myrtus communis L.* **(tableau 4; annexe V)**

Nous avons remarqué que le taux des substances extraites par l'éthanol est légèrement plus élevé que celles extraites par l'eau pour notre espèce *Myrtus communis L.*

❖ **Résultats de taux des cendres totales**

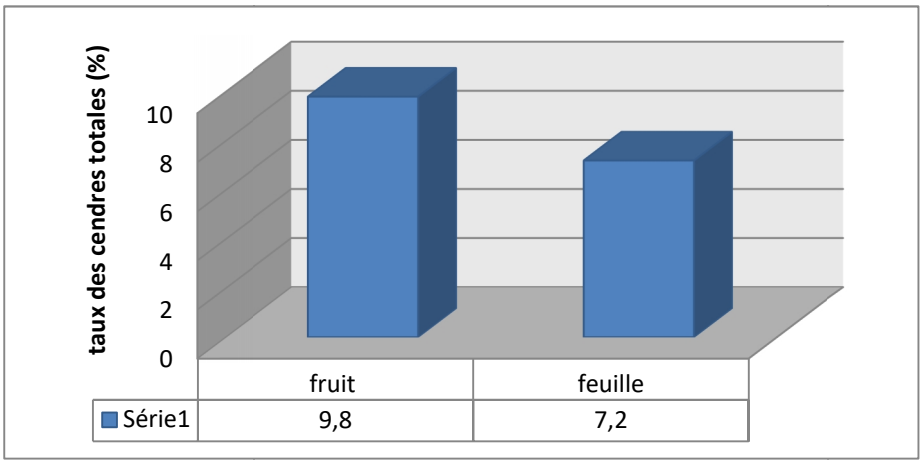


Figure16 : résultats du taux des cendres totales

Le taux moyen des cendres de la poudre végétale des baies de *Myrtus communis L.* est estimé à **9.8%** età**7.2%** pour la poudre des feuilles **(annexe VI).** Ce taux se montre nettement supérieur à celui retrouvé par **Guellil et Sidhoum (2013)** dans les rameaux feuillés de *Myrtus communis L.***(6%).**

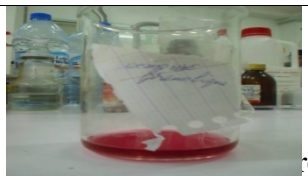
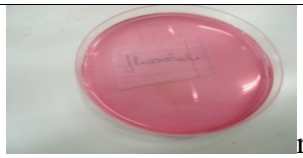
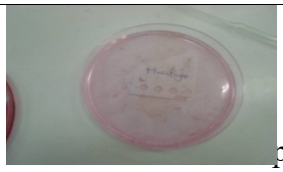
Ammar et *al* (2005) rapportent que la matière organique représente **957g/kg** des feuilles de*Myrtuscommunis L.*, soit un taux de cendres égal à **4.3 %.**

Cela indique que les baies de myrte présentent une forte teneur en minéraux par rapport aux feuilles de cette plante.

3.1.2. Résultats du screening phytochimique

Ces tests ont été effectués pour mettre en évidence la présence de certains groupements chimiques, qui peuvent être responsables des activités biologiques étudiées. Les résultats sont indiqués dans **le tableau 4.**

Tableau 4 :Résultats du screening phytochimique de la poudre des feuilles et des baies.

Métabolites secondaires	Feuilles	Baies	Colorations
Poly phénols	+++	+++	 rouge
Anthocyanes	+++	+++	 bleu
Tanins totaux	+++	+++	 Bleu noirâtre
Tanins caté chiques	++	++	 précipité rouge
Flavonoïdes	+++	+++	 rouge orangé
Glycosides	+++	+++	 violette
Coumarines	++	++	 formation d'un trouble
Mucilages	+++	+++	 précipité floconneux

(+++) : Réaction très positive / **(++)** : Réaction moyennement positive / **(+)** : Réaction faiblement positive / **(-)** : Réaction négative.

Le test phytochimique réalisé sur la poudre et l'infusé des baies et des feuilles de *Myrtus communis L*. révèle la présence de plusieurs familles de métabolites.

Le nombre de signes **(+)** est en fonction de l'intensité de la coloration et/ou des précipités. Les composés les plus abondants chez *Myrtuscommunis L.* sont essentiellement : les polyphénols telle que les tanins ; les flavonoïdes ; les anthocyanes ainsi quelques glycosides. Cette plante est moyennement riche en coumarines. Aussi on indique une présence remarquable des mucilages.

3.2. Résultats de l'extraction des flavonoïdes et des tanins

3.2.1. Résultat de l'extrait sec des flavonoïdes

La poudre végétale des baies de la plante étudiée a donné une masse en extrait flavonoîdique sec importante (**m = 4.88 g**). Alors que la poudre végétale des feuilles a donné une masse relativement faible (**m= 0.15g**). Du point de vue rentabilité, nous avons obtenu un rendement de **32.53%** pour les baies et **1%** pour les feuilles.

Cet extrait présent un aspect poudreux, friable, de couleur jaune orange pour les baies et vert pour les feuilles de *Myrtus communis L.*

3.2.2. Résultat de l'extrait sec des tanins

La poudre des baies de *Myrtus communis L.* a donné une masse en extrait sec de tanins relativement moyenne **(m=2.70 g).**Ainsi que la poudre végétale des feuilles a donné une masse moyenne**(m= 2.41g**). Donc nous avons obtenu un rendement de **9%** pour les baies et **8.03%** pour les feuilles de *Myrtus communis L.*

Cet extrait présente un aspect poudreux, friable, de couleur violacé pour les baies et vert pour les feuilles de *Myrtus communis L.*

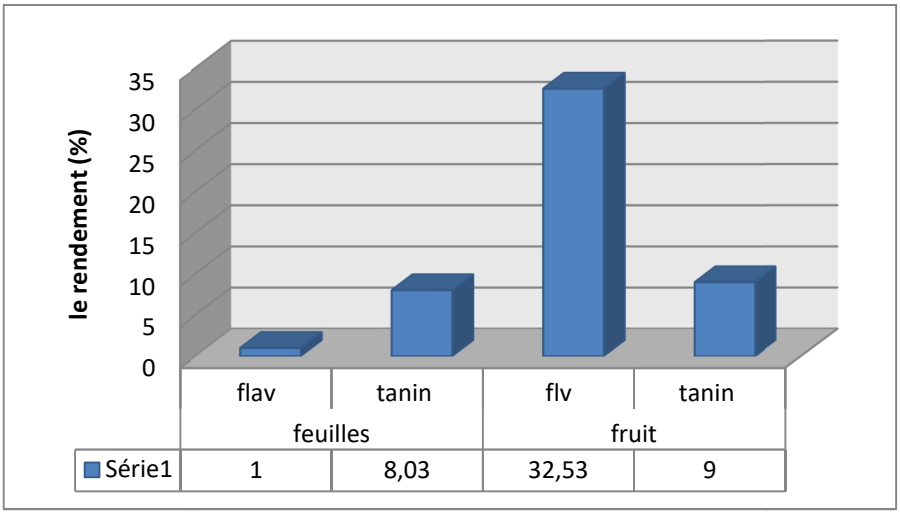


Figure 17 :le rendement des extraits secs obtenus

3.3. Résultats de l'extraction de l'huile essentielle

3.3.1. Rendement de l'HE

Tableau 5 : résultats du rendement de l'huile essentielle

Quantité de la matière végétale sèche (g)	Quantité d'HE obtenue (g)	Rendement (%)
70	3,2	4,571

Nous avons obtenu un rendement de **4,57%**qui est considéré comme important en le comparant aux résultats de **(Merabet et Menaifi, 2015)** dont le rendement est**1.5 %** et de **(Bouaita et Djermouli, 2017)** avec **2,34%**de rendement en HE .

3.3.2 Résultats des caractérisations physico chimiques de l'HE :

- **Résultats des analyses physiques**
  - **La Densité relative**

La densité est une caractéristique physique d'une grande importance lors de l'évaluation de la qualité d'une huile.

Selon **AFNOR, 2000,** les normes de la densité relative d'une huile essentielle est [0.82-0.99].

D'après nos résultats, nous avons trouvé une valeur de 0,88 pour ce paramètre, une valeur qui est conforme à la norme **AFNOR ,2000.**

- **Le pouvoir rotatoire**

Nous avons déterminé un pouvoir rotatoire de l'huile essentielle de *Myrtus communis L.* égal a **+ 33,171** dont la norme selon **(Atta, 2003)** est **+15< α <+45**.

- **L'indice de réfraction**

L'indice de réfraction est une caractéristique de pureté et de qualité des huiles essentielles. Il dépend de la composition chimique des huiles essentielles, qui augmente en fonction des longueurs des chaînes d'acides gras, et aussi de leur degré d'instauration et de la température. Il varie essentiellement avec la teneur en mono-terpènes, et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en mono-terpènes donnera un indice de réfraction élevé.

Dans notre cas l'indice de réfraction de notre HE est de **1,4585**. Une valeur qui est conforme à la norme **(AFNOR ,2000)**[**1,45-1,47]** ce qui confirme que notre huile se réfracte faiblement par la lumière monochromatique, ce qui favorise son utilisation en cosmétologie.

❖ **Résultats des analyses chimiques**

➢ **pH (potentiel hydrogène)**

Il ressort des résultats que le pH de notre huile est acide **(4.30),** et répond aux normes données par **la pharmacopée européenne[3.8 à 5]**.

➢ **l'indice d'acide**

Ce paramètre est calculé par la formule :

$$I_A = \frac{V \times \frac{M}{m}}{100} \qquad \text{mg KOH/1g d'huile}$$

Le volume de la solution de KOH versé est de 3,5 ml et la masse de l'huile est de 1g. La valeur de l'indice d'acide (IA) obtenue dans le cas de notre huile essentielle est de **1,963mg KOH/ 1g** d'huile, elle est dans le domaine de la norme fixé par la **''ANSM''** (France) **< 2** pour les huiles essentielles à usage médical.

3.4. Résultats d'analyse des extraits par HPLC

L'analyse par HPLC a été réalisée avec des extraits fraichement préparés, nous avons comparé les spectres obtenus des extraits à étudier avec ceux de deux solutions standards préparés dans les même conditions :l'acide gallique, et la rutine, afin de confirmer la présence des métabolites recherchés dans les extraits. Les chromatogrammes d'HPLC des standards et des différents extraits sont présentés ci-dessous (**figures18, 19, 20, 21)**

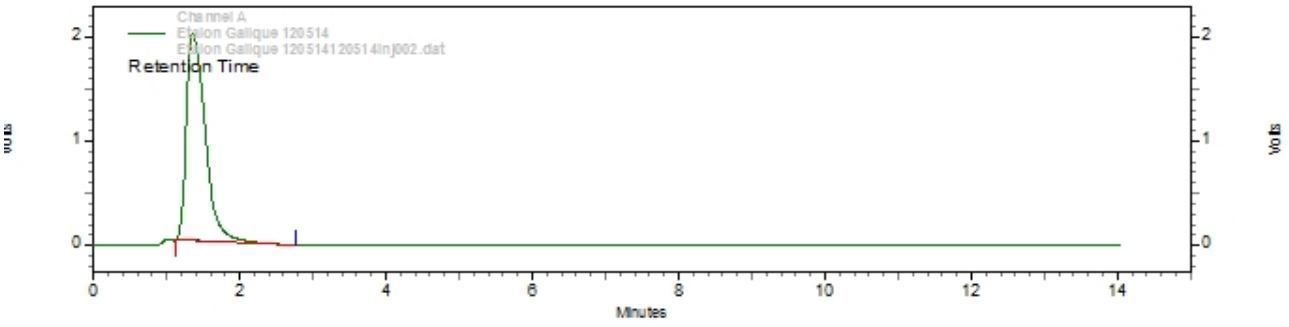


Figure18 : spectre chromatographique de l'acide gallique obtenu par HPLC à 254nm.

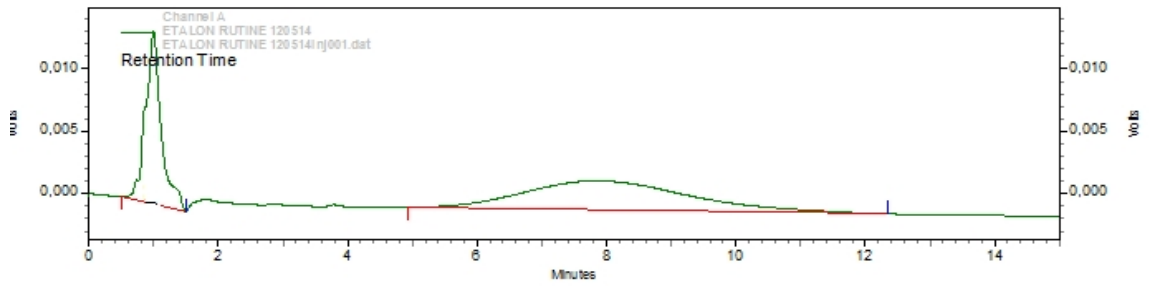


Figure19 : spectre chromatographique de la rutine obtenu par HPLC à 254nm.

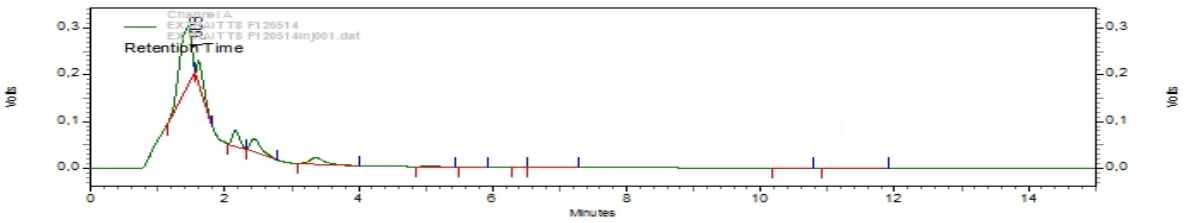


Figure 20 : spectre chromatographique de l'extrait aqueux des tanins des fruits de myrte obtenu par HPLC à 254nm.

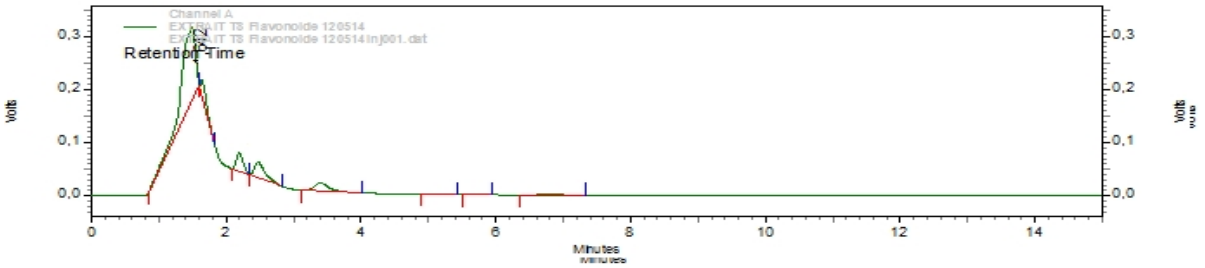


Figure 21 : spectre chromatographique de l'extrait aqueux des flavonoïdes des fruits de myrte obtenu par HPLC à 254nm.

La comparaison des temps de rétention des standards avec ceux enregistrés dans les différents chromatogrammes, permet d'identifier certains composés dans nos extraits.

Les résultats montrent la présence de l'acide gallique dans les deux extraits des fruits (extrait tannique et flavonoidique), et la présence de la rutine dans l'extrait flavonoidique.

Les autres pics des extraits n'ont pas été identifiés vu la difficulté d'obtention des étalons de références pour l'identification.

Nous avons trouvé d'autres difficultés aussi concernant l'analyse des deux extraits (flavonoidique et tannique) des feuilles de myrte.

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de **Kanoun K., 2011**, dont la présence de l'acide gallique dans les trois parties (fruits, tiges, feuilles) du *Myrtus communis L.*

Les travaux de**(Wannes et al, 2010 ;in Kanoun, 2011)**sur identification et l'analyse des composés phénoliques de *Myrtus communis L.* par HPLC ont montré la présence de 5 acides phénoliques qui sont l'acide gallique, l'acide caféique, syningique, vanillique, et férulique.

Les principaux composés identifiés par **(Romani et *al.*,1999 ;in Kanoun,2011)** de l'extrait des feuilles de *Myrtus communis L.* sont principalement l'acide gallique, l'acide caféique, l'acide éllagique,

Les analyses chromatographiques, spectrophotométriques et spectroflurométriques réalisées par **(Diaz et Abeger,1987 ; in Kanoun,2011)**des composés phénoliques simples et principalement les flavonoïdes et les acides phénoliques contenus dans les feuilles du Myrte, ont permis d'identifier les acides ellagique et gallique, la quercétine et la patulétine.

3.5. Résultats de la composition de l'huile essentielle par CG/SM

Le chromatogramme obtenu par CG/SM de l'huile essentielle de *Myrtus communis L.* donne une distribution des différents composés identifiés et non identifiés. Selon les proportions obtenues, nous pouvons distinguer les composés majoritaires à partir desquels nous pourrons déterminer le chémotype de cette espèce.

L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle de Myrte par CG/SM a révélé la présence de 62 composés, caractérisée par 5 pics majoritaires **(tableau 6).**

On note la présence d'une forte proportion en mono terpènes hydrocarbonés dont on cite les deux fractions majoritaires : **le limonène** et **l'alpha pinène** avec des valeurs respectives de **16.22%** et **15.93%**.

Un autre composé majoritaire est observé, appartenant à la famille des alcools, il s'agit de **l'octadienol** avec un taux de **15.04%,** suivi par le **1,8 cinéole**à**9,12%.**

Trois sesquiterpènes hydrocarbonés : **lebornylène**, **l'alpha caryophyllène** et **l'alpha patcoulene** ont été identifiés avec des valeurs respectives de **4.64%**,**4.14%** et **1.38%.**

Trois alcools mono terpéniques ont été détectés dans cette huile essentielle, il s'agit du **linalool(7.49%),** du **bergamiol (3.13%)** et de l'**alpha terpinéol (4.30%).**

Les composés non identifiés représentent un taux inférieurà**5%.**

A la lumière de ces résultats nous pouvons déduire que l'HE de l'espèce *Myrtus communis L.* appartient au chémotype : ***limonène /alpha pinène*** avec une présence remarquable de l'**octadienol** et du **cinéol**.

Tableau 6 : Composés majoritaires de l'huile essentielle de *Myrtus communis L*. obtenus par CG/SM

N°	**Temps de rétention (min)**	**Composésidentifiés**	**Pourcentage (%)**	**Nature chimique**
1	6,75	Alpha pinène	**15,93**	Monoterhydroc
2	11,04	Limonène	**16,22**	Monoterhydroc
3	13,03	1,8 cinéol	9,12	Monoterhydroc
4	16,66	octadienol	**15,04**	alcool
5	20,63	Bornylène	4,64	Sesquiterhydroc
6	21,40	Alpha terpinéol	4,30	Alcool monoter
7	24,97	Linalool	7,49	Alcool monoter
8	32,75	Bergamiol	3,12	Alcool monoter
9	33,71	Benzen, 1,2dimethoxy-4-(2propenyl)	5,06	Monoteroxyge
10	35,88	Alpha caryophyllène	4,14	Sesquiterhydroc
11	43,55	Alpha patcoulène	1,38	Sesquiterhydroc
Chémotypeétudié			***Limonène/alpha pinène***	

On constate que l'HE de cette espèce est très riche en monoterpènes et en sesquiterpènes, qui représentent les deux principaux groupes de terpènes. En revanche, certains aldéhydes et alcools identifiés occupent une position secondaire. Les esters, les acides et les cétones sont minoritaires, dont certains sont sous forme de traces (acides benzendicarboxylique, dodecatrienol, acide hexadecanoique).

Le chémotype **limonène/alpha pinène** de l'huile essentielle de l'espèce *Myrtus communis L*. que nous avons détecté, concorde avec les résultats de l'analyse chimique de l'huile essentielle de *Myrtus* en Turquie, en Tunisie, et en suède, qui ont tous révélé la présence de cette race chimique **(Touaibia M.2011)**

Cependant, nos résultats montrent que la composition chimique de l'huile essentielle de *Myrtus communis L.* Algérien est complétement différente de celle de l'huile essentielle de Myrte de Grèce. En effet, cette dernière est caractérisée par une prédominance en acétate de myrtenyl (39%), en 1,8 cinéole (13,5%), en alpha pinène (10,9%) et en linalool (7,7%) d'où le chémotype **acétatedemyrtenyl/cinéole. (Gardeli et *al*,. 2008).**

3.6. Résultat des activités biologiques

3.6.1. Résultat de l'activité antifongique

3.6.1.1. Résultat de diffusion sur milieu solide

Le pouvoir antimicrobien des différents extraits (de feuilles et fruits) et d'HE de *Myrtus communis L.* a été étudié *in vitro* par la méthode de diffusion sur milieu solide par disques. Pour l'évaluer, nous avons préféré de tester nos extraits contre deux champignons phytopathogènes (*Penicillium sp* et *Aspergillus niger*).

L'estimation de l'activité antifongique de nos extraits est basée sur la mesure de diamètre des halos d'inhibition de la croissance par les champignons testés**(annexe VII).**Les résultats sont mentionnés dans les tableaux suivants.

L'activité antifongique a été calculée en une moyenne de deux répétitions, pour chaque extrait et pour chaque champignon.

D'après les résultats obtenus (tableaux 7,8,9,10 et 11) et selon l'échelle de sensibilité des souches vis-à-vis des extraits**(Ponce *et al.,* 2003),** il apparaît que :

- ✓ Les trois témoins testés (T1, T2 et T3) n'ont pas une activité antifongique vis-à-vis les deux souches fongiques étudiées ce qui confirme que les résultats obtenus traduisent uniquement l'effet antifongique de nos extraits et notre HE.
- ✓ toutes les souches fongiques testées sont de sensibles a très sensibles vis-à-vis les différents extraits aqueux ainsi que l'huile essentielle de *Myrtus communis L.*

Tableau 7 : Résultats de l'activité antifongique de l'HE de *Myrtus communis L.* par diffusion sur milieu solide.

Souches fongiques	HE 100%	HE 50%	HE 25%	HE 12.5%	T1	T2	T3
Penicillium sp	14mm	14mm	13mm	11mm	6mm	7mm	8 mm
Aspergillus niger	13 mm	13mm	11mm	11mm	7mm	7mm	7 mm

L'huile essentielle de Myrte montre une activité inhibitrice importante sur les deux souches de champignons phytopathogènes testées (jusqu'à 14mm sur *Penicillium sp*).

Tableau 8 :Résultats de l'activité antifongique de l'extrait aqueux des flavonoïdes des feuilles (F_{fl}) de *Myrtus communis L.* par diffusion sur milieu solide.

Souches fongiques	40mg/ml	32mg/ml	20mg/ml	12mg/ml	04mg/ml	T1	T2	T3
Penicillium sp	14 mm	12mm	13mm	13mm	12mm	7mm	7mm	6mm
Aspergillus niger	13mm	13mm	12mm	11mm	11mm	8mm	7mm	7mm

L'extrait aqueux flavonoidique des feuilles de *Myrtus communis L*. présente une action anti fongique importante sur les deux champignons testés notamment *Penicillium sp* (14mm).

Tableau9 : Résultats de l'activité antifongique de l'extrait aqueux des flavonoïdes des fruits (F_{fr}) de *Myrtus communis L.* par diffusion sur milieu solide.

Souches fongiques	40mg/ml	32mg/ml	20mg/ml	12mg/ml	04mg/ml	T1	T2	T3
Penicillium sp	18mm	16mm	16mm	15mm	14mm	8mm	6mm	6mm
Aspergillus niger	16mm	16mm	15mm	13mm	13mm	7mm	6mm	7mm

L'extrait aqueux flavonoidique des fruits de *Myrtuscommunis L*. présente une action anti fongique importante sur les deux souches fongiques surtout sur *Penicillium sp* (18mm).

On remarque que l'activité antifongique de l'extrait aqueux flavonoidique des fruits de Myrte est plus importante par rapport celle de l'extrait flavonoidique des feuilles.

Tableau 10 : Résultats de l'activité antifongique de l'extrait aqueux des tanins des feuilles (T_{fl}) de*Myrtuscommunis L.* par diffusion sur milieu solide.

Souches fongiques	40mg/ml	32mg/ml	20mg/ml	12mg/ml	04mg/ml	T1	T2	T3
Penicillium sp	15mm	14mm	13mm	12mm	10mm	7mm	7mm	6mm
Aspergillus niger	14mm	12mm	12mm	11mm	9mm	7mm	6mm	8mm

L'extrait aqueux des tanins des feuilles de *Myrtus communis L.* a révélé une action antifongique très importante sur les souches fongiques phytopathogènes testées surtout contre *Penicillium sp*(15mm).

Tableau 11 : Résultats de l'activité antifongique de l'extrait aqueux des tanins des fruits (T_{fr}) de *Myrtus communis L.* par diffusion sur milieu solide.

Souches fongiques	40mg/ml	32mg/ml	20mg/ml	12mg/ml	04mg/ml	T1	T2	T3
Penicillium sp	20mm	19mm	15mm	13mm	12mm	8mm	6mm	8mm
Aspergillus niger	18mm	19mm	14mm	11mm	11mm	7mm	7mm	7mm

- Le diamètre des disques est inclus (6mm) pour tous les résultats cités.

L'extrait aqueux des tanins des fruits de Myrte montre un effet antifongique trèsremarquable sur les deux champignons phytopathogènes testés surtout contre *Penicillium sp* (20mm).

On constate que l'activité antifongique des tanins extrais a partir des fruits de *Myrtus communis L.* est plus importante par rapport celles des tanins extrais a partie des feuilles de cette plante.

Penicillium sp a été plus sensibles que *Aspergillus niger* avec un diamètre de zone d'inhibition de croissance jusqu'à 20mm.

Les extraits des fruits de *Myrtus communis L.* (flavonoïdes et tanins) ont été plus efficaces contre les champignons phytopathogènes testés en comparaison avec ceux des feuilles.

En comparant les extraits flavonoidiques (feuilles et baies) avec les extraits tanniques, on trouve que les tanins ont une activité antifongique plus importante que les flavonoïdes.

Mahboubi et GhazianBidgolien **2010** évaluent l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Myrtus communis L.* contre *Candida albicans* et d'autres espèces (*Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, et six isolats d'*Aspergillus flavus*).

En outre, **Bianchi et *al.,* 2003,** testent l'action de l'HE de *Myrtus communis L.*, in vitro, contre des champignons phytopathogènes tels que *Rhizoctoniasolani, Fusariumsolani* et *Colletotrichumlindemuthianum.* L'huile essentielle de *Myrtus communisL.* inhibe la croissance de champignons de 60% à une concentration de 1600 ppm. L'observation microscopique révèle que l'huile essentielle de *Myrtus communis L.* a provoqué des modifications morphologiques des hyphes de tous les champignons testés.

Selon **Shan *et al.*,(2007),**les polyphénols, tels que les tannins et les flavonoïdes sont des substances antibactériennes importantes**.**

Les tanins ont un très grand pouvoir antimicrobien **(Bassene et *al.,* 1995).**

Plusieurs revues montrent que des composés isolés de plantes appartenant aux différents groupes chimiques caractérisés dans notre plante (principalement, tanins, flavonoïdes et autres composés phénoliques, terpènes, stéroïdes ou saponosides) possèdent une activité inhibitrice de la croissance *in vitro* de la majorité des souches microbiennes testées **(Bassene et *al.,* 1995).**

La concentration des extraits influe l'activité antimicrobienne, **Rasooli et *al.*, (2008)**ont remarqué que l'inhibition de la croissance est plus forte en augmentant les concentrations des extraits ou des huiles essentielles.

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne influe aussi les résultats, **Natarajanet*al.*,(2005) et Fazeli et *al.*, (2007)**ont constaté que la méthode de diffusion sur milieu gélosé est plus adaptée pour étudier l'activité des extraits aqueux et des huiles essentielles .

Ces résultats sont en accord avec ceux de **Lutsenko *et al.*,2010.**

3.6.1.2. Résultats de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Selon le protocole utilisé par le groupe Saidal –Médéa-, lorsque le diamètre des halos d'inhibition est supérieur à 11mm on passe à une autre technique, c'est celle de la CMI pour évaluer la concentration minimale de l'extrait qui inhibe totalement la croissance des champignons.La lecture des résultats se fait par transparence à travers la boîte de gélose : si la souchemicrobienne n'est pas développée, la gélose reste limpide.

Les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux suivants :

Tableau12 : Les CMI de l'extrait flavonoidique des feuilles (F_{fl}) vis-à-vis les souches fongiques testées.

souches	la [c] minimale inhibitrice
Penicillium sp	20mg/ml
Aspergillus niger	20mg/ml

Tableau13 : Les CMI de l'extrait flavonoidique des fruits (F_{fr}) vis-à-vis les souches fongiques testées.

souches	la [c] minimale inhibitrice
Penicillium sp	20mg/ml
Aspergillus niger	20mg/ml

D'après les **tableaux 12 et 13,** les deux extraits flavonoidiques de *Myrtus communis L.* (feuilles et fruits) ont inhibé totalement la croissance des champignons phytopathogènes testés *Aspergillus niger* et *Penicillium sp* à 20mg/ml. On prend cette valeur en tant que la concentration minimale inhibitrice pour ces deux extraits flavonoidiques .

Tableau 14 : Les CMI de l'extrait tannique des feuilles (T_{fl}) vis-à-vis les souches fongiques testées.

souches	la [c] minimale inhibitrice
Penicillium sp	12mg/ml
Aspergillus niger	20mg/ml

D'après le **tableau 14** la souche *Penicillium sp* est plus sensible à l'extrait aqueux des tanins des feuilles de *Myrtuscommunis L.* qu'*Aspergillus niger*. Dont elle est sensible à une faible concentration utilisée (12mg/ml), alors qu'*Aspergillus niger*. n'est sensible qu'à partir de 20mg/ml.

Tableau15 : Les CMI de l'extrait tannique des fruits (T_{fr}) vis-à-vis les souches fongiques testées.

souches	la [c] minimale inhibitrice
Penicillium sp	12mg/ml
Aspergillus niger	12mg/ml

D'après le **tableau15,** l'extrait tannique des fruits de *Myrtuscommunis L.* a inhibé la croissance totale des deux champignons phytopathogènes testés *Aspergillusniger*et *Penicillium sp*à 12mg/ml.

Les tannins extraient des feuilles et des fruits *Myrtuscommunis L*. ont plus d'activité antifongique que les flavonoïdes.

Tableau16 : Les CMI de l'huile essentielle (HE) vis-à-vis les souches fongiques testées.

souches	la [c] minimale inhibitrice
Penicillium sp	25%
Aspergillus niger	25%

L'huile essentielle de Myrte à une activité antifongique importante **tableau 16** dont une concentration de 25% était suffisante pour inhibée totalement la croissance des deuxchampignons phytopathogenes testes *Aspergillus niger*et *Penicillium sp*.

dans une étude de **Ouelhadj et *al.*, 2014** ,avec une huile essentielle composée principalement de 1;8-Cineole (46.98 %) et Cis-Geraniol (25.18 %), rapportent que l'huile essentielle de *Myrtus communis L.* est plus active contre *Penicillium sp*. Et *Aspergillus Niger* (respectivement 59,5 mm et 46 mm), à la valeur de CMI la plus faible pour les deux agents pathogènes (125µl/ ml).

3.7 Etudes statistiques :

On constate que la souche 1 (s1) *Penicillium sp* , les extraits de tanins des fruits de myrte ont donné des taux d'inhibition supérieurs à celui des feuilles et de flavonoïdes aussi à celui des HE .

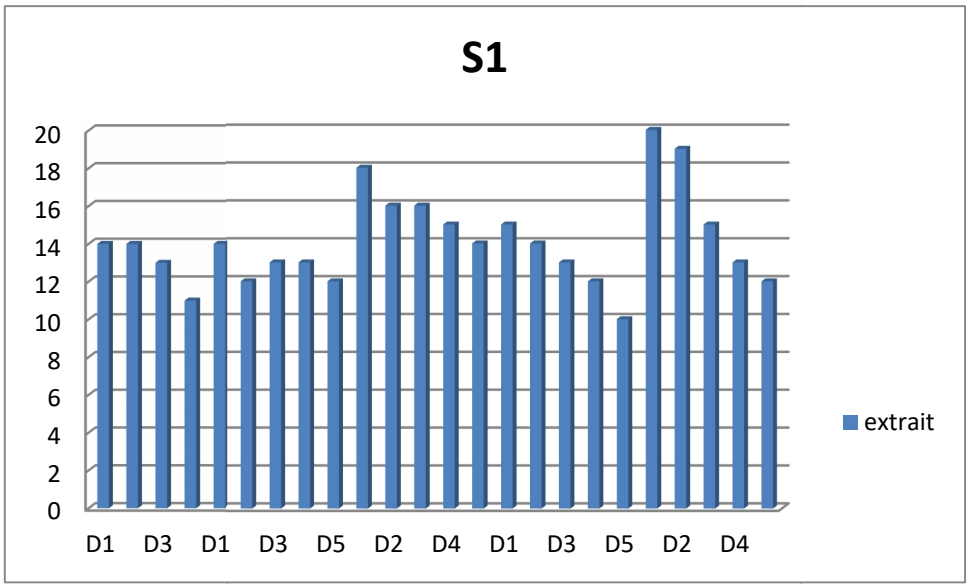


Figure22 : l'effet antifongique de HE, des extraits flavonoîdiques et tannique du myrte sur *Penicillium sp*

En parallèle on a constaté que la souche 2 (s2) *Aspergillus niger* , les extraits de tanins des fruits de myrte ont donné des taux d'inhibition supérieurs à celui des feuilles et de flavonoïdes aussi à celui des HE

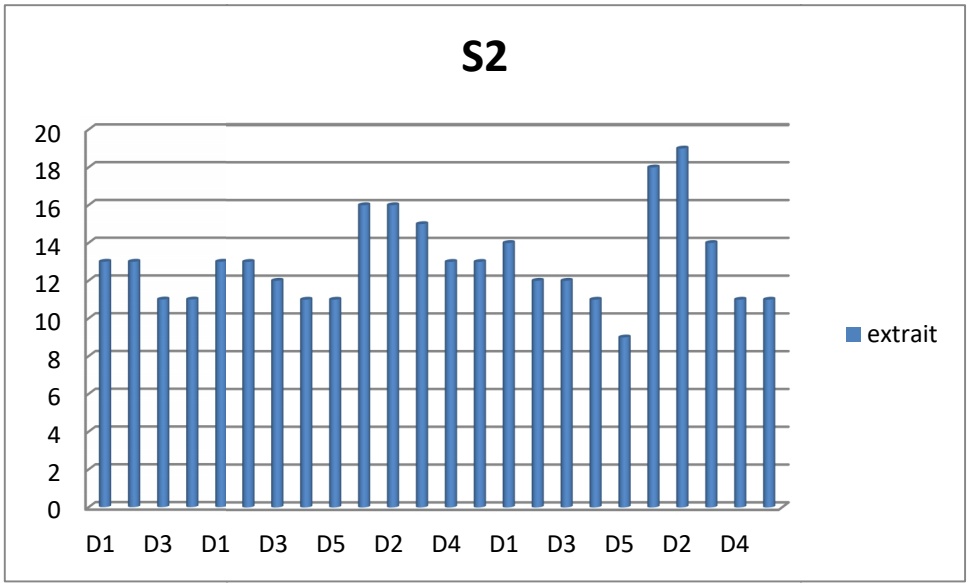


Figure 23: l'effet antifongique de HE, des extarits flavonoidique et tannique du myrte sur *Aspergillus niger*

L'analyse de la variance des taux inhibition de la croissance fongique de deux espèces (*Penicillium sp ,Aspergillus niger*) montré une différence hautement significative($p \geq 0.05$), la sensibilité à l'effet des quatre doses de HE et cinq doses d'extrait très élevé pour les deux souches (P=0.06),la souche 2était moins sensible avec un taux d'inhibition13% ,alors que la souche 1 (Penicillium sp)était plus sensible.

Les doses testées ont présenté une variation hautement significatif (p=0.00) avec un taux d'inhibition élevé quel que soit s1 (*Penicillium sp*)ou s2 (*Aspergillus niger*).Ainsi la variation selon les feuilles et les fruits et les différents extraits est hautement significatif (p=0.00) dont extraits flavonoîdiques des feuilles de myrte sont les plus efficaces.

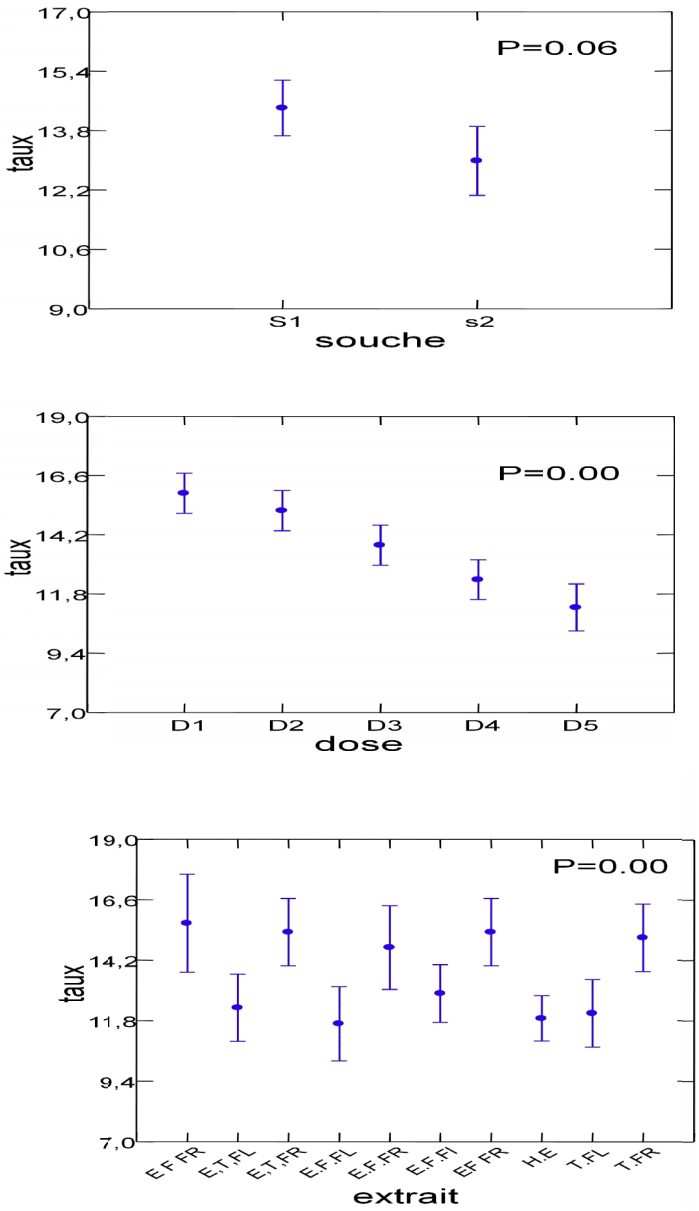


Figure 24 : activités antifongique des extraits et de HE de *Myrtus communis L.* en modèle GLM selon l'extrait, la dose et les souches fongiques testés

Conclusion

La découverte de ressources naturelles du règne végétal reste capital pour la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutiques.

Afin de contribuer à la valorisation de la flore méditerranéenne, la présente étude a porté sur le myrte commun *Myrtus communis L*., une espèce très répandue dans le territoire méditerranéen ,qui appartient à la famille des Myrtaceae .

L'analyse des extraits aqueux (flavonoïdes et tanins) des feuilles et des fruits de *Myrtus communis L*. ainsi que son huile essentielle , en utilisant des méthodes analytiques différentes (HPLC , CG/SM) a permis de mettre en évidence la richesse des extraits en métabolites secondaires notamment les composés phénoliques, principalement les flavonoïdes et les tanins .

Ces métabolites secondaires ont de grandes valeurs thérapeutiques.

Les extraits aqueux des feuilles et des fruits ainsi l'HE de *Myrtus communis L.* présentent une activité antifongique très importante contre les deux souches fongiques testées *Penicillium sp* et *Aspergillus niger*.

D'autre part la concentration inhibitrice minimale (CMI) de l'extrait aqueux des tanins des feuilles de *Myrtus communis L.* vis-à-vis *Penicilium sp.* Etait à 30 %. Et celle d'HE était à 25%.

Pour conclure, cette étude reste préliminaire, de ce fait, elle nécessite des études approfondies par des méthodes d'analyse plus performante pour déterminer les composes de *Myrtus communis L.* qui peuvent être responsable de ses effets thérapeutiques importantes.

Nous espérons par ce travail avoir apporté notre modeste contribution à la valorisation de la flore Algérienne.

Références bibliographiques

1/ADAMS R.P., 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy.4eme edition. Allured publishing corporation, Carol Stream. 803p.

2/ADRIAN J., FRANGNE R., 1991. La science Alimentaire de A à Z, Ed. Lavoisier, Paris

3/AFSSA,2006. « evaluation des risques lies a la presence des mycotoxines dans les chaines alimentaires humaine et animale ». Rapport synthetique

4/AHERNE S.A., O'BRIEN N.M., 2002. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism; Nutrition 18 (1) pp. 75-81.

5/AMAROWIEZ R., TROSZYNSKA A., SHAHIDI F., 2005. Antioxydant activity of almond seed extract and its fractions. Food lipids. Vol 12 .pp344-358.

6/AMMAR H., LOPEZ S. ET GONZALEZ J.S., 2005. Assessment of the digestibility of some Mediterranean shrubs by *in vitro* techniques. Animal feed sciences and technology, Vol 119. pp. 323-331.

7/ATTA M.B., 2003. Some characteristics of nigella *(Nigella sativa L.)* seed cultivated in Egypt and its lipid profile. Food Chemistry Vol 83 n 1. pp 63-68.

8/AZOUJ S., 1999. Valorisation des huiles essentielles de quelques espèces d'origanum et de Thymus spontanées en Algérie, Mémoire Ing., université Saad Dahleb Blida .68p.

9/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.

10/BARDEAU F., 2009. Les huiles essentielles : découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale. Ed. Lanore. France. 333p.

11/BARRY T.N., FORSS D.A., 1983. The condensed tannin content of vegetative Lotus pedunculatus, its regulation by fertiliser application, and effect upon protein solubility. J.Sci. Food. Agric., vol 34, pp 1047-1056.

12/BELAICHE P. « traité phytothérapie et d'aromathérapie ».Tome I. Edition Maloine .Paris.

13/BELLAKHDAR, 1997. Médecine arabe ancienne et savoir populaires, la pharmacopée traditionnelle marocaine, Ed Ibis Press , Paris , France , 67p.

14/BELOUED A., 2001. Les plantes médicinales d'Algérie, Edition OPU. Alger.277p.

15/BETA, T., NAM S., DEXTER J.E., et SAPIRSTEIN H.D., 2005. Phenolic content and antioxidant activity of pearled ulreat and roller – milled fractions, *CrealChem,* pp 390 -393.

16/ BIANCHI A., CURINI M. , EPIFANO F., BRUNI R., TORTA L. et ZAMBONELLI A.,2003. Composition and in vitro antifungal activity of essential oils of *Erigeron canadensis* and *Myrtus communis* from France. Chem Nat Compd, 39 (2) , p191-194.

Références bibliographiques

17/BIANCHINI F. et AZZUR C.P., 1975. Le guide vert des plantes médicinales Edition Fernand Nathan Paris. 243p.

18/BOUAITA S., DJERMOULI Y., 2017. Extraction et caractérisation des huiles essentielles du myrte vert sauvage, mémoire de master, Université A. MIRA – Bejaïa Faculté des Sciences Exactes, Algérie, 70p.

19/BRUNETON J., 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3eme Ed Lavoisier Paris. 1120 p.

20/CHAVANNE M., 1986. « Chimie organique Expérimentale », Edition Modulo Canada.

21/CUENDET M., 1999. Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie : « *Fagraeablumei*» (Loganiaceae) et de trois plantes d'altitude : « *Bartsiaalpina*» (Scrophulariaceae), « *Loiseleuriaprocumbens*» (Ericaceae) et Camp, Thèse de doctorat, p 24.

22/DAWIDAR A.M., AMER M.A. et FAYEZ M.B., 1974. Constituents of local plants. XVII. The triterpenoid constituents of *Cornulacamonacantha*, Planta Med. 289p.

23/DEBA F., XUAN T.D., YASUDA M., TAWATU S., 2008. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidenspilosa*. Linn Var Radiata Food contrl. vol 19 .pp 346–352.

24/DIALLO A., 2005.étude de la phytochimie et des activités biologiques de Syzygiumguineense. Thèse de doctorat en pharmacie . Université de Bamako .Mali . pp 38-47.

25/DIARRA M.N., 2003. Etude phytochimique d'une plante antipaludique : spilanthesoleracea. Thèse de doctorat en pharmacie, université BAMAKO. Mali. 78p.

26/DOMART J.B. 1981. Nouveau Larousse médicale Edition Larousse. 532p.

27/EMERENCIANO V.P., BARBOSA K.O., SCOTTI M.T. et FERRIRO M.J.P., 2007. Self organisating maps in chemotaxonomic studies of *Asteraceae*: a classification of tribes using flavonoid data. Journal of Brazilian chemical society. vol 18 .pp891-899.

28/ERDMAN J.R. , BALENTINE D.,ARAB L., BEECHER G., DWYER J.T., FOLTS J., HARNLY J., HOLLMAN P., KEEN C.L., MAZZA G., MESSINA M., SCALBERT A., VITA J., WILLIAMSON G., BURROWES J., 2007. Flavonoids and heart health, Proceedings of the ILSI North America flavonoids workshop, May 31-June 1, 2005, Washington, DC. J Nutr 137 (3 Suppl. 1), 718S–737S.

29/FAHN A.,1979. « secretory tissues in plants ».Edition Boca Raton.florida.102p.

30/FLEURIET A., JAY-ALLEMAND C., MACHEIX J.J.,2005. Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes* pp 121-216.

Références bibliographiques

31/GARDELI C., VASSILIKI P., ATHANASIOS M., KIBOURIS T. et KOMALTIS M., 2008."Essential oil composition of *Pistasialentiscus L.* and *Myrtuscommunis L.*: evaluation of antioxidant capacity of methanolicextracts "food chemistry. Vol 107. pp 1120-1130.

32/GARNERO J., 1991. « Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation » .Edition Tec & Doc .180p.

33/GIRRE I., 1980. Connaitre et reconnaitre les plantes médicinales. Edition ouest. France. 332p.

34/GOETZ P., GHEDIRA K., 2012. *Myrtuscommunis L*. (Myrtaceae) : Myrte, in : Phytothérapie anti-infectieuse, Collection Phytothérapie Pratique. Springer Paris, pp. 313–320.

35/GONZALEZ-VARO J.P., ARROYO J., APARICIO A., 2009. Effects of fragmentation on pollinator assemblage, pollen limitation and seed production of Mediterranean myrtle (*Myrtuscommunis*). Biological Conservation 142, 1058–1065.

36/GOVARETS M.; LUCAS E., 2008. World checklist of *myrtaceae*, royal botanic gardens, kew. XV, p455.

37/GRAVOT A., (2008). Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Equipe Pédagogique Physiologie Végétale, UMR 118 APBV. Université de Rennes 1 – L2.

38/GUIGNARD J.L. 2000.biochimievégétale edition Masson 2eme edition Paris .p281.

39/HARBORNE J.B., MABRY T.J., MABRY H., 1975. The Flavonoids. Edition Chapman & Hall, London.

40/HART P.H., BRAND C., CARSON C.F., RILEY T.V., PRAGER R.H. and FINALY-JONES J.J.,2008. 'Terpinen-4-ol, The Main Component of the Essential Oil of *MelaleucaAlternifolia* (Tea tree oil), Suppresses Inflammatory Mediator Production by Activated Human Monocytes', Inflammation Research, Vol. 49, N°11, pp. 619 – 626.

41/HITARA T., FUJII M., AKITA K., YANAKA N.,OGAWA K., KUROYANAGI M., HONGO D., 2009. Identification and physiological evaluation of the components from *Citrus* fruits as potential drugs for anti-corpulence and anticancer. *Bioorganic &Medicial Chemistry* 17: pp 25- 28.

42/HOFFMANN E., STROOBANT V., 2007. Masse spectrometry. Principales and applications john wiley et sons, inc., chichester .royaumeuni . pp1203-1210 .

43/HUTZLER P., FISCHBACH R., HELLER W., JUNGBLUT T.P., REUBER S., SCHMITZ R., VEIT M., WEISSENBOCK G., SCHNITZLER J.P., 1998. Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. J Exp Bot.;4:953–965. doi: 10.1093/jxb/49.323.953.

44/JEAN BLAIN C.,1998. aspect nutritionnels et toxicologiques des tannins .RevMedVet. 149p.

Références bibliographiques

45/KANOUN K., 2011. Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis L.* (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine). mémoire de magister. Université ABOUBEKR BELKAID Tlemcen. Algérie 81p.

46/KANSOLE M.M.R., 2009. Etude ethnobotanique, phytocuimique et activités biologiques de quelques *lamiaceae* du Burkina Faso : cas de *Leucasmartinicansis (Jacquin) R. Brown, Hoslundiaopposstavahl*et *Orthosiphonpallidusroyle ex benth*. Mémoire pour obtenir unDiplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso.

47/KHABABAEE k. et VAN REE T.,2001.tannins : classification and definition . nat. prod. Rep., vol 18. pp 641-649.

48/KOVATS E.,1965. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system ,adv . chromatogr. Vol 1, 229p.

49/KSOURI R., FALLEH H., MEGDICHE W., TRABELSI N., MHAMDI B., CHAIEB K., BAKROUF A., MAGNE C., ABDELLY C., 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarixgallica L*. and related polyphenolic constituents. Food Chem. Toxicol. 47: 2083- 2091.

50/KUMAR R. et D'MELLO J.P.F., 1995. Anti-nutritional factors in forage legumes. In : J.P.F. D'Mello and C.Devendra (eds), tropical legumes in animal nutrition , vol 95, p133, Wallingford , oxon: CAB International.

51/LAHOUEL M., 2005. Interaction flavonoïdes – mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat de l'université Mentouri de Constantine, Algérie. p196.

52/LEBHAM 2005. Mémoire du Laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues au sein de l'Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM)- Université de Bretagne Occidentale (UBO).

53/LINDSEY K., JAGER A.K., RADIOO D.M., VAN STADEN J.,1999. Screening of plants used by South African traditional healers in the treatment of dysmenorhoea for prostaglandin syntesisinhibitors and uterine relaxing activity. Journal of ethnopharmacology. Vol 64(1), pp9-14.

54/ MAHBOUBI M. GHAZIAN BIDGOLI F., 2010. In vitro synergistic efficacy of combination of amphotericin B with *Myrtus communis* essential oil against clinical isolates of *Candida albicans*. Phytomedicine, 17, p771-774

55/MERABET C., MENAIFI H., 2015. Etude phytochimique et évaluation des activités antioxydante et anti-inflammatoire de l'espèce : *Myrtuscommunis L.* mémoire de master, Université des Frères Mentouri Constantine, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Algérie. 70p.

56/MIDDLETON E., KANDASWAMI C., THEOHARIDES T.C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacol.Rev, 52(4), pp 673-751.

Références bibliographiques

57/MIGLIORE J., 2011. Empreintes des changements environnementaux sur la phylogéographie du genre *Myrtus* en méditerranée et au Sahara. Thèse de Doctorat. Université Paul Cézanne Aix-Marseille III. Faculté des Sciences et Techniques, Discipline Biologie des populations et Ecologie.

58/MIGLIORE J., 2007. « Évolution et persistance des végétaux méditerranéens face à une aridification croissante du climat : le cas du genre *Myrtus (Myrtaceae)* poster Imepseminaire conservation, valorisation et gestion des populations ».

59/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'obtentiondu grade de docteur en science. Université Louis Pasteur. Strasbourg.

60/MOHANDI Z.,2006. « Etude du pouvoir antioxydant des huiles essentielles et flavonoides de quelques plantes de la région de Telemcen », thèse doctorat ,Université de AboubakerBelkaid Telemcen faculté des sciences, pp89-92.

61/MORIGANE J., 2010. Grimoire des plantes Edition Paris, p123.

62/NARAYANA K.R., REDDY M.S., CHALUVADI M.R. et KRISHNA D.R., 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. Indian journal of pharmacology .vol 33, pp2-16.

63/OGURE R., 1994. A research about myrtle tree (*myrtuscommunis L*.). Ecology journal vol 10. pp21-25.

64/OUELHADJ A., KAHINA B., DJENANE D., 2014 .Chemical composition and Antifungal activity of the *Myrtus communis* and *Pistacia lentiscus* essential oils of Mediterranean regions in laboratory medium and Strawberry fruit.

65/PARIS R.R. et MOYSE H., 1967. Précis de matière médicale. Edition Masson et Cie ; vol 416. pp29-31.

66/PEYREFITTE G., MARTINI M.C., 2008. Esthétique cosmétique CAP, Ed Masson , 241p.

67/PIETTA P.G., 2003. Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*. 63: 1035-1042.

68/PIOCHON M., 2008. Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. Mémoire de maitre (ressources renouvelable). Université du Québec à Chicoutimi, pp : 12-30.

69/PITT J.I.,1988. «laboratory guide to common Penicillium species» academia Press editor , London .

70/PONCE A.G., FRITZ R., DEL VALLE C. et ROURA S.I., 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. Lebensmittel-Wissenschaft and Technologic, 36, 679-684.

Références bibliographiques

71/PORTER N.,2001. "Essential oils and their production". crop and food res. Vol 39. pp :32-38

72/QUEZEL P. et SANTA S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II Edition CNRS. Paris. 559p.

73/RAI M.K., ACHARYA D. et WADEGAONKAR P.,2003. "Plant derived antimycotics: Potential of asteraceous plants" .In : " plant –derived anti mycotics : current trends and future prospects ".Haworth Press . vol 24.pp :165-185.

74/RAMDANI I., 1994. Contribution à l'étude de la flore médicinale de la région d'Alger. Thèse d'ingénieur en agronomie . INA. Alger .144p.

75/RAPER K., FENNELL D.J. 1965. « the genus *Aspergillus* » , Williams and Wilkins editors , baltimore .

76/RASOOLI I., MOOSAVI M.L., REZAEE M.B., JAIMAND K., 2002. Susceptibility of microorganisms to *Myrtuscommunis L.* Essential Oil and its Chemical Composition. Journal of Agricultural Science and Technology 4, 127–133.

77/RICHTER G.,1993. « Métabolisme des végétaux :physiologie et biochimie » . Press polytechnique et universitaire. Recomande.France.515p.

78/ROMANI A.,COINU R., CARTA S., PINELLI P., GALARDI C., VINCIERI F., 2004. Evaluation of antioxydant effect of different extracts of *myrtuscommunis L.*, free radical research, vol 38. pp 197-208.

79/ROUX D., CHAUMONT J.P., MILLET J., MOREL J.M., 2008. Conseil en aromathérapie, 2eme Edition pro – officina, pp : 14,15 ,31.

80/SALLE J.L., 1991. Les huiles essentielles. Edition frison roche. Paris. 167P.

81/SAMOUELIAN F., GAUDIN V., BOCCARA M., 2009. Genetiquemoleculaire des plantes. Edition Quae, 208p.

82/SARNI-MANCHADO P., et CHEYNIER V., 2006. Les polyphénols en agroalimentaire. Ed. Tec & Doc, Paris, p. 2-10.

83/SMALLFIELD B., 2001. «Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and calinary purposes ».crop and food research .vol45.pp :14-17

84/TAKEOKA G., 1998. «flavor chemistry of vegetables : Thirty years of progress ».Edition cluwer Academic –Plenum Publishers.New York.304p.

85/THOMAS O.P., 2009. Métabolisme secondaire et Biosynthèse. Master 2 VEM. Université Nice Sophia Antipolis.

86/TOGOLA A. ,2002.étude de la phytochimie et de l'activité antipaludique de alchorneacordifoliaschmach. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako .mali .100p.

Références bibliographiques

87/TOUAIBIA M .2011. Contribution à l'étude de deux plantes médicinales : *myrtuscommunis L.* et *MyrtusnivelleiBatt et Trab* obtenus in situ et in vitro. Mémoire de magister en sciences biologiques, université SAAD DAHLEB de Blida .221p.

88/VALNET J., 1985. Phytothérapie : traitement des maladies par les plantes. Edition malouine. Paris . 568p.

89/VERHOEYEN M.E., BOVY A., COLLINS G., MUIR S., ROBINSON S. , DE VOS C.H.R. et COLLIVER S., 2002.increasingantioxydant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthesis pathway. Journal of experimental botany, vol 53 .pp209-210.

90/VERMERRIS W., 2006. Phenolic compound biochemistry, Springer, Dordrecht. ISBN-10 1-4020-5163-8 (HB).

Autres références :

91/AFNOR NFT75-113- 2000. «Huiles essentielles » échantillonnage et méthodes d'analyses Monographiques relatives aux huiles essentielles (Tome 02).

92/CANNAS A. www.ansci.cornell.edu/plants/ toxicagents/tannin/pos_effects.html - 6k -.

93/FAO. Quantification of tannins in tree foliage. A laboratory manual. website: www.i.aea.org/programmes/nafa/d3/index.Html(2000).

94/PHARMACOPEE EUROPEENNE,2005.tome I. conseil de l'Europe. Strasbourg. 3343p.

95/PHARMACOPEE EUROPEENNE, 2002 : 4eme Edition. Conseil de l'Europe. Strasbourg. 2060p.

96/PIQUEMAL G. 2008. Les flavonoïdes (en ligne) :
http://www.detoursante.com/index.php? Option=com_content&view=article&id=166&Itemid=215'

Glossaire

Angiosperme : Plante à graines dont l'ovule, fécondé par l'intermédiaire d'un tube pollinique, se transforme en un fruit clos. (Les *angiospermes* portent généralement des fleurs typiques. Elles forment un sous-embranchement, s'opposant aux gymnospermes.)

Astringente : (latin *astringens ,* de *astringere ,* resserrer). Se dit d'une substance qui resserre et assèche les tissus, et peut faciliter leur cicatrisation.

Se dit d'un vin trop chargé en tanins et qui resserre les papilles gustatives.

Antiputride : Qui empêche la putréfaction (bas latin *putrefactio,* du latin classique *putrefacere,* putréfier) Décomposition de matières organiques par des bactéries et des champignons.)

Décoction : (latin *decoctio, -onis,* de *decoquere,* faire cuire) Opération qui consiste à extraire les principes actifs d'une substance par action d'un liquide porté à ébullition.

Dicotylédone : Plante angiosperme dont la graine possède deux cotylédons, généralement égaux.

Furoncles : (latin *furunculus*) Infection aiguë et suppurée d'un follicule pilo-sébacé par un staphylocoque.

Génines : Partie non glucidique d'un hétéroside, autrefois appelée aglucone ou aglycone.

Infusion : (latin *infusio, -onis*) préparation liquide obtenue par l'action de l'eau bouillante sur une substance (souvent une plante) dont les principes solubles actifs se diffusent dans l'eau par macération.

Leucorrhées : écoulements blanc, jaune ou vert dépourvu de sang, provenant des voies génitales de la femme.

Rhinorrhée : écoulement de liquide provenant des fosses nasales ou des sinus.

Spermaphytes : ou spermatophyte Nom d'embranchement donné aux plantes supérieures à graines.

Vulnéraire : Légumineuse fourragère et ornementale, autrefois utilisée pour soigner les plaies.

Annexe 1

Photos de quelques appareils utilisés



Figure 25 : Densimètre électronique.



Figure 26 : Polarimètre.



Figure 27 : Réfractomètre.



Figure 28 : HPLC



Figure : 29 Agitateur magnétique



Figure 30 : balance

Annexe 1

Quelque matériel non biologique utilisé

Appareillage

- Balance analytique
- Agitateur magnétique
- Bain Marie
- Etuve
- Broyeur électrique
- autoclave
- HPLC
- Réfractomètre.
- Polarimètre.
- Densimètre électronique

Petit materiel

- Microseringue
- Papier filtre
- Seringue 5ml
- Des gants

Reactifs /Produits

- eau physiologique à 0,9%
- eau distillée
- Acide sulfurique (H_2SO_4) concentré
- Ammoniaque
- Benzène
- Acétate d'éthyle
- Butanol
- Chloroforme
- Chlorure ferrique ($FeCL_3$)
- Ethanol
- Hydroxyde de potassium (KOH)
- methanol
- ether diethylique $(C_2H_5)_2O$
- tween 80
- Acide chlorhydrique HCl

Verreries

- Boites Pétri
- bécher
- ampoule a décanter
- tubes à assai
- Erlenmeyer

Annexe 1

Annexe 2

Préparation du milieu Sabouraud

- Mettre en suspension 65g de Sabouraud dextrose agar (en poudre) dans 1L de l'eau distillée.

- Bien mélanger.

- Chauffer en agitant fréquemment et faire bouillir pendant une minute jusqu'à dissolution complète.

- Stériliser en Autoclave à 121 ºC pendant 1h30 minutes.
- Laisser refroidir pour quelques secondes.
- Couler aseptiquement le milieu préparé dans des boites de Pétri a raison de 15ml par boite.
- Laisser solidifier sur la paillasse.

Annexe 3

Préparation des extraits aqueux (flavonoïdes et tanins) des feuilles et des fruits de *Myrtus communis L.*

Remarque : pour 100ml d'eau distillée nous avons ajouté 1ml de solution tween pour obtenir une solution mère.

Pour une concentration des extraits : 40mg/ml

Flavonoïdes (baies)

Bécher vide =117.170g

Bécher avec résidu =122.058g

Poids net des résidus =4.888g

40mg ⟶ 1ml

4888mg ⟶ ?

4888/40=122ml d'eau ⟹ Solution mère

Flavonoïdes (feuilles)

Bécher vide =102.40g

Bécher avec résidu =102.559g

Poids net des résidus =0.159g

40mg ⟶ 1ml

159mg ⟶ ?

159/40=3.975 ml d'eau ⟹ Solution mère

Annexe 3

Tanin (baies)

Bécher vide =104.120g

Bécher avec résidu =106.827g

Poids net des résidus =2.707g

40mg ⟶ 1ml

2707mg ⟶ ?

2707/40=67.67 ml d'eau ⟹ Solution mère

Tanins (feuille)

Bécher vide = 117.348g

Bécher avec résidu =119.764g

Poids net des résidus =2.416g

40mg ⟶ 1ml

2416mg ⟶ ?

2416/40=60 ml d'eau ⟹ Solution mère

Annexe 3

La dilution des extraits (l'activité antifongique)

On prend :

Extrait à 100% ⟹ 40mg/ml (extrait pur)

Pour obtenir les dilutions souhaitées : 80%, 50%, 30% et 10%

80% : on prend 8 ml de chaque extrait et on ajuste le volume jusqu'au 10ml avec l'eau distillée stérile (2ml).

50% : on prend 5 ml de chaque extrait et on ajuste le volume jusqu'au 10ml avec l'eau distillée stérile (5ml).

30% : on prend 3 ml de chaque extrait et on ajuste le volume jusqu'au 10ml avec l'eau distillée stérile (7ml).

10% : on prend 1 ml de chaque extrait et on ajuste le volume jusqu'au 10ml avec l'eau distillée stérile (9ml).

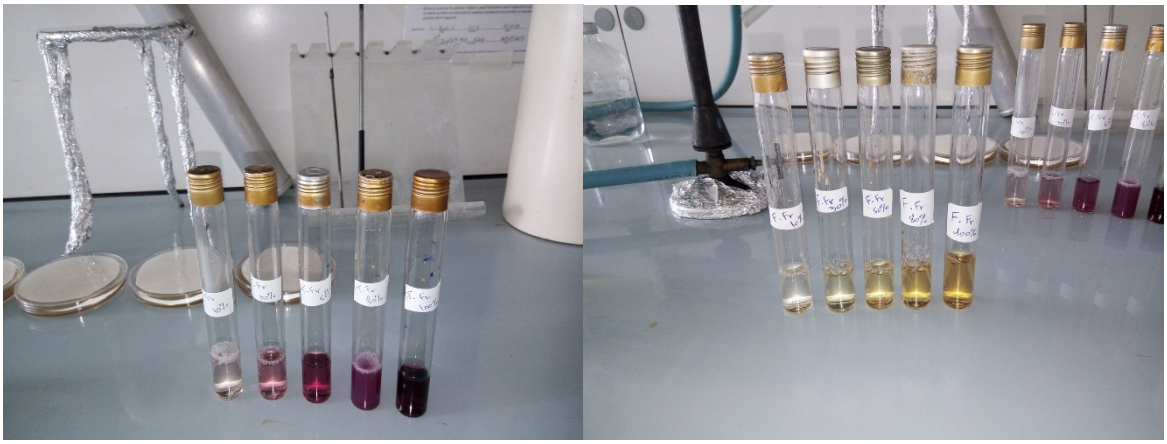


Figure 24 : les dilutions obtenues des extraites aqueux (original, 2018).

Annexe 3

Calcul des concentrations des différentes dilutions des extraits aqueux (activité antifongique)

Extrait à 100% ⟹ 40mg/ml (extrait pur)

Extrait à 80% :

100% ⟹ 40 mg/ml

80% ⟹ x

X= 80×40 /100 ⟹ X= 32

Donc :

La concentration de l'extrait aqueux à **80%** est à **32mg/ml**

En suivant la même méthode de calcul on obtient les concentrations des différentes dilutions

La concentration de l'extrait aqueux à **50%** est à **20mg/ml**

La concentration de l'extrait aqueux à **30%** est à **12mg/ml**

La concentration de l'extrait aqueux à **10%** est à **4mg/ml**

Annexe 4

Préparation des dilutions de l'huile essentielle

La dilution d'HE se fait par Tween 80.

-On prend 1ml de notre huile +1ml de tween 80 pour obtenir une dilution appelée la dilution mère (DM) correspond à 100%. (Pour augmenter la quantité)

-pour obtenir HE à 50%, on prend 1ml de DM 100% +1ml de tween 80.

-pour obtenir HE à 25%, on prend 1ml de DM 50% +1ml de tween 80.

-pour obtenir HE à 12,5%, on prend 1ml de DM 25% +1ml de tween 80.

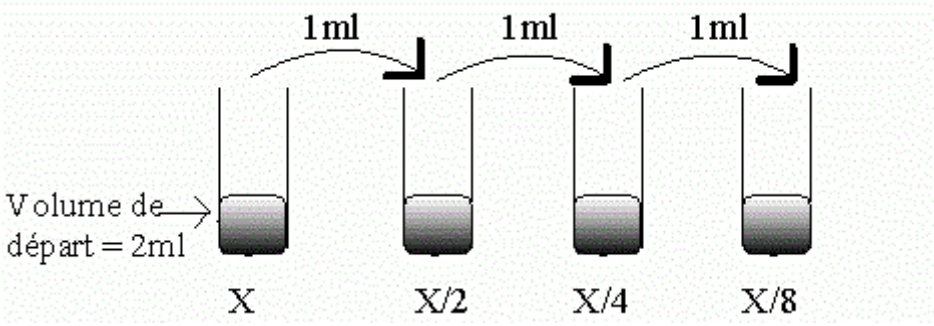


Figure 31 : le principe d'obtention des dilutions de l'HE par Tween 80.



Figure 32 : les dilutions obtenues de l'HE (original, 2018).

Annexe 5

Résultats détaillés obtenus

1/Le taux d'humidité

$$\mathbf{X\%=\frac{M-M'}{M}\times 1}$$

X% : Taux d'humidité de la poudre.

M : Masse de prise d'essai en gramme.

M′: Masse de prise d'essai après séchage en gramme.

Tableau 1 : le taux d'humidité dans la poudre végétale de baies de *Mytrus communis L* .

Essai	**1**	**2**	**3**
Avant le séchage (M)	7.75g	7.75	7.75
Après séchage (M᾽)	6.89g	6.87g	6.87g
Taux d'humidité	11.09%	11.35%	11.35%
moyenne		**11.26%**	

Tableau 2 : le taux d'humidité dans la poudre végétale des feuilles de *Mytrus communis L.*

Essai	**1**	**2**	**3**
Avant le séchage (M)	7.75	7.75	7.75
Après séchage (M᾽)	7.03	6.92	6.96
Taux d'humidité	9.25%	10.62%	10.13%
Moyenne		**10%**	

Annexe 5

2/ le taux des substances extractibles dans l'eau et l'éthanol 80

$$\textbf{T.S.E (\%)} = (m' - m) / Pe \times 1$$

P : Masse de la prise d'essai.

m : Masse du bécher vide.

m': Masse du bécher avec le résidu.

Tableau 3 : le taux des substances extractibles dans l'eau

a/Baies

Essai	**1**	**2**	**3**
Après l'évaporation à sec (m ')	7.18g	7.2g	7.21g
Le poids de bécher vide (m)	6.75g	6.75g	6.75g
Taux de substance extractible dans l'eau	43%	45%	46%
Moyenne		**44.67%**	

Annexe 5

b/Feuilles

Essai	**1**	**2**	**3**
Après l'évaporation à sec (m ')	6.64	6.63	6.64
Le poids de bécher vide (m)	6.52	6.52	6.52
Taux de substance extractibles dans l'eau	12.14%	11.95%	12.9%
Moyenne		**12.33%**	

Tableau 4 : le taux des substances extractibles dans l'éthanol 80%

a/Baies

Essai	**1**	**2**	**3**
Après l'évaporation à sec (m ')	7.24g	7.37g	7.27g
Le poids de bécher vide (m)	6.75g	6.75g	6.75g
Taux de substance extractibles dans l'éthanol	49%	62%	52%
Moyenne		**54.33%**	

Annexe 5

b/Feuilles

Essai	**1**	**2**	**3**
Après l'évaporation à sec (m ')	6.64	6.65	6.65
Le poids de bécher vide (m)	6.52	6.52	6.52
Taux de substance extractibles dans l'eau	12.82%	12.93%	13.25%
Moyenne		**13%**	

Tableau 5 : temps de rétention des standards et des extraits obtenus par HPLC à 254nm.

Temps de rétention (min)			
Ac. gallique	**Rutine**	**Extrait tannique (baies)**	**Extrait flavonoidique (baies)**
2.4	**6.0**	**2.4**	1.5
-	**-**	2.7	1.6
-	**-**	3.6	2.2
-	**-**	4.1	2.4
-	**-**	5.7	3.4
-	**-**	8.5	5.08
-	**-**	9.4	**6.0**
-	**-**	10.2	6.81

Annexe 6

❖ Caractérisation physico-chimique :

- **Détermination des cendres totales**

Baies

C% = (P-Pc) /Pe ×100

P= 6.734g

Pc=6.636g

Pe=1g

C% = (6.73-6.638)/1 ×100 = 9.8

C%=9.8%

Feuilles

C% = (P-Pc) /Pe ×100

P= 5.624g

Pc=5.552g

Pe=1g

C% = (5.624-5.552)/1 ×100 = 7.2

C% =7.2%

Annexe 7

Activité antifongique

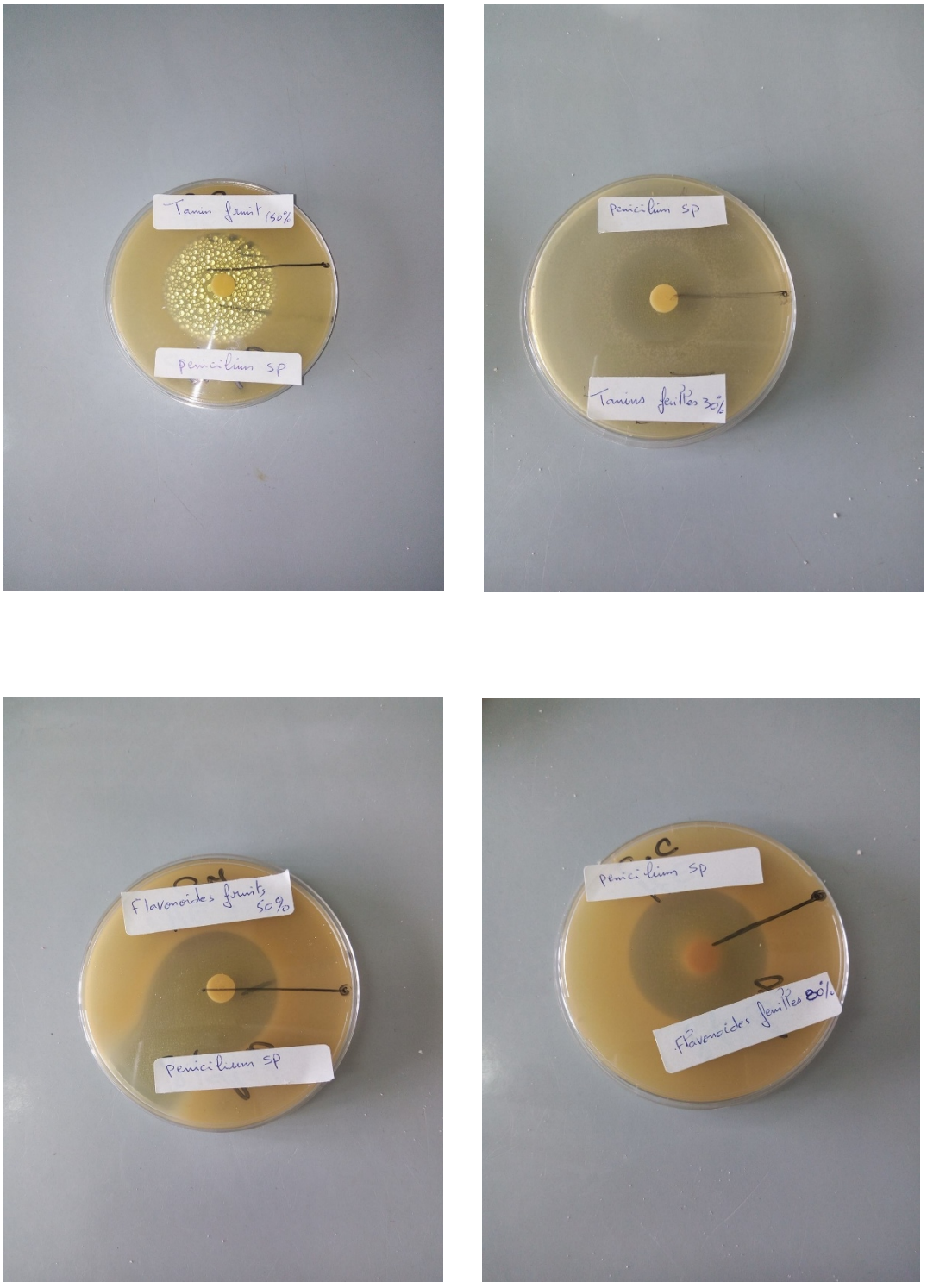


Figure 33 : Les zones d'inhibitions de la croissance de *penicilium sp* obtenus vis à vis les différents extraits aqueux de *Myrtus communis L.*

Annexe 7

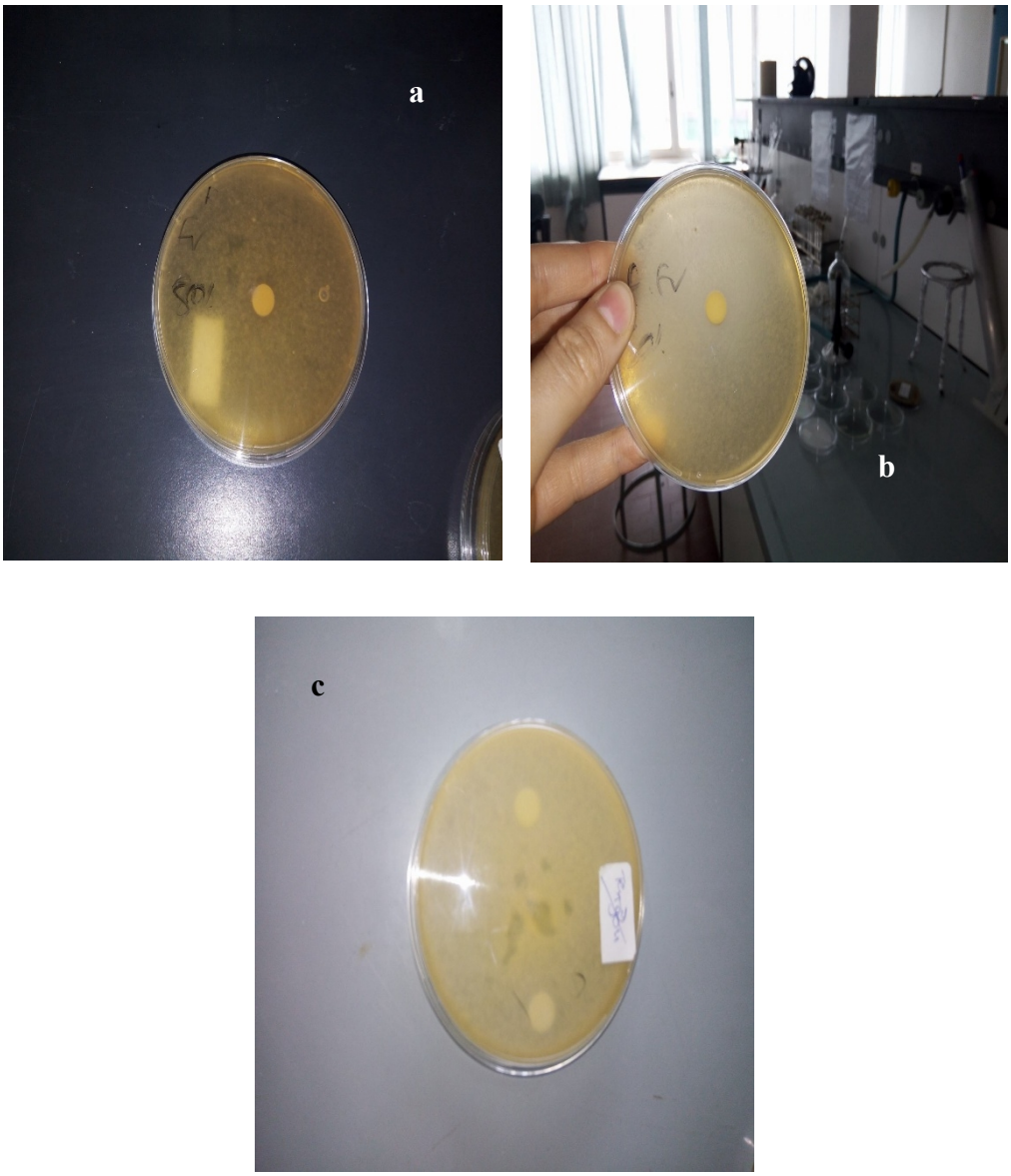


Figure 28 : Les zones d'inhibitions de la croissance de *penicillium sp.* obtenues vis-à-vis les différents témoins **a)** eau distillée stérile **b)** tween 80 **c)** eau distillée stérile + tween80 (100ml/1ml)