



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TLEMCEEN  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

LABORATOIRE DE PRODUITS NATURELS

## Mémoire

En vue de l'obtention du  
**Diplôme de Magister**  
En Biologie

Option : **Substances naturelles, activités biologiques et synthèse**

Présentée par

M<sup>elle</sup> KANOUN KHADIDJA

**Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des  
extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de  
Tlemcen (Honaine)**

### Jury

---

M <sup>r</sup> BENMANSOUR A.	Président	Professeur à l'Université de Tlemcen
M <sup>me</sup> BENDIMERAD N.	Examinatrice	Maitre de Conférences à l'Université de Tlemcen
M <sup>r</sup> LAZOUNI A.	Examineur	Maitre de Conférences à l'Université de Tlemcen
M <sup>me</sup> ATIK BEKKARA F.	Promotrice	Professeur à l'Université de Tlemcen

Année Universitaire : 2010-2011

# Remerciements

*J'exprime d'abord mes profonds remerciements, ma vive reconnaissance et ma sincère gratitude à **Mme Atik Bekkara F.**, professeur à la faculté des sciences, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen pour avoir accepté de m'encadrer et pour ses conseils et ses précieuses orientations qu'elle n'a cessé de m'apporter tout au long de ce travail.*

*J'adresse mes sincères remerciements à **Mr Benmansour A.**, professeur à la faculté des sciences, Université Abou bekr belkaid de Tlemcen pour l'honneur qu'il me fait de présider le jury de ce mémoire.*

*Je tiens à remercier **Mr Lazouni A.**, maitre de conférences à la faculté des science Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, pour avoir accepté de juger ce modeste travail.*

*Je remercie également **Mme Bendimerad N.**, maitre de conférences à la faculté des sciences, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen de me fait l'honneur d'accepter d'examiner ma thèse de magister.*

*Un remerciement particulier va à **Mme Benhamou N.**, pour leur aide qu'elles n'hésitèrent jamais à me proposer dans les moments difficiles. Je la remercie pour sa bienveillance et ces conseils.*

*Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à tous mes amis du laboratoire pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble.*

*A toute la promotion de magister « Produits naturels », année 2008-2009.*

*Enfin je remercie gracieusement toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

# Dédicace

- ▼ *A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*
- ▼ *A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère qui ma apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.*
- ▼ *A mon cher père qui ma appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements.*
  - ▼ *A ma très chère sœur Ismahene*
  - ▼ *A mes frères : Anwar et Réda*
  - ▼ *A mon très cher fiancé Mohammed Réda*
  - ▼ *A toute la famille KANOUN et KERZABI*
    - ▼ *A mes amis*

---

## الملخص

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

يهدف عملنا هذا إلى الدراسة الفيتو كيميائية و النشاط المضاد للأكسدة لمستخلصات ثلاث أجزاء من *Myrtus communis* L. (أوراق، ساق، ثمار).

الفحص الفيتو كيميائي المحقق سمح لنا بإظهار الفلافونويدات، تانا، ستيروول و تريটারبان في الأجزاء الثلاثة للنبته و بوجود الأنتوسيانات في الثمار فقط.

كمية الفينولات متنوعة. مستخلص الأوراق يمثل الكمية المرتفعة (119.23مغ مع معادل حمض الغاليك/غ). بالنسبة للساق فتمثل (112.96 مغ مع معادل حمض الغاليك/غ). أما بالنسبة للثمار فتمثل (70.26 مغ مع معادل حمض الغاليك/غ). كمية الفلافونويدات تمثل (6.56 و 6.11 مغ مع معادل الكاتشين/غ). بالنسبة للأوراق والساق على الترتيب أما بالنسبة للثمار فتمثل (3.87 مغ مع معادل الكاتشين/غ). الكمية العالية للتانا شاهدناها في الثمار (27.20 مغ مع معادل الكاتشين/ غ) ثم الساق (22.47 مغ مع معادل الكاتشين/غ) و الأوراق (13.78 مغ مع معادل الكاتشين/غ).

أظهر التحليل الكروماتوغرافي على الطبقة الرقيقة للفلافونويدات عن وجود الكاتشين في الأوراق و الساق، الكارستين في الثمار، كما قام بإظهار وجود حمض الغاليك في معظم المستخلصات المفحوصة.

تمت دراسة النشاط المضاد للأكسدة لمختلف المستخلصات بواسطة طريقتين، إرجاع الحديد وتثبيط الجذر الحر DPPH. القدرة على إرجاع الحديد معتبرة عند أنتوسيانات الثمار و المستخلصات الفلافونودية للأوراق كما يمثل مستخلص خلات الإيثيل نشاط مضاد للأكسدة ذو أهمية كبيرة ( $IC_{50} = 0.098$  مغ/مل) وقدرته على تثبيط الجذر الحر DPPH عالية بالمقارنة مع حمض الأسكوربيك ( $IC_{50} = 0.12$  مغ/مل)

**الكلمات المفتاحية:** *Myrtus communis* L.: دراسة فيتوكيميائية فلافونويدات، تانا، أنتوسيانات،

النشاط المضاد للأكسدة، DPPH و FRAP.

---

---

## Résumé

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

Notre travail vise à faire une étude phytochimique et l'activité antioxydante des extraits de trois parties de *Myrtus communis* L. Feuilles, tiges et fruits.

Les tests phytochimiques réalisés ont permis de mettre en évidence des flavonoïdes, des tanins, des stérols et triterpènes dans les trois parties de la plante ainsi que la présence des anthocyanes dans les fruits.

La teneur en phénols totaux est variable. L'extrait brut des feuilles a présenté la teneur la plus élevée, (119,23 mg GAE/g), pour les tiges, elle est de (112,96 mg GAE/g), alors que pour les fruits, elle est de (70,26 mg GAE/g). Les flavonoïdes ont été obtenus avec des teneurs de (6,56 et 6,11 mg EC/g) respectivement pour les feuilles et les tiges, alors que pour les fruits la teneur est de (3,87 mg EC/g). La teneur la plus élevée des tanins est observé dans les fruits (27,20 mg EC/g) puis les tiges (22,47 mg EC/g) et les feuilles (13,78 mg EC/g).

L'analyse qualitative des flavonoïdes des trois parties de la plante par chromatographie sur couche mince a révélé la présence de la catéchine dans les feuilles et les tiges, la quercétine dans les fruits ainsi on a pu identifier la présence de l'acide gallique dans la majorité des fractions testées.

L'activité antioxydante des différents extraits a été évaluée par deux méthodes ; la réduction du fer et le piégeage du radical libre DPPH. La capacité de réduction de fer est remarquable dans l'extrait des anthocyanes des fruits et dans les deux fractions flavoniques des feuilles. La fraction acétate d'éthyle des feuilles a présenté une activité antioxydante intéressante ( $IC_{50} = 0.098$  mg/ml) et qui est supérieur à la capacité du piégeage du radical DPPH de l'acide ascorbique dont  $IC_{50} = 0.12$  mg/ml.

**Mots clés :** *Myrtus communis* L., étude phytochimique, flavonoïdes, tanins, anthocyanes, activité antioxydante, FRAP et DPPH.

---



---

## Abstract

Most of interest of current research relates to study the natural antioxidant molecules.

Our work aim is to study a phytochemical and antioxidant activity of *Myrtus communis* L. Leaves, stems, and berries.

The phytochemical tests realized can be to highlight the flavonoides, tannins, sterols and triterpenes in the three parts of the plant as well as the presence of the anthocyanes in the berries.

The total phenol content was varied. Leaves extract presented higher total phenol contents (119,23 mg GAE/g) than stems (112,96 mg GAE/g) and berries (70,26 mg GAE/g). The flavonoides contents (6,56 et 6,11 mg EC/g) respectively for leaves and stems, so the berries contents were (3,87 mg EC/g). The highest contents of tannins were observed in berries ( $27,20 \pm 0,25$  mg EC/g), stems (22,47 mg EC/g) and leaves (13,78 mg EC/g).

The Qualitative analysis of the flavonoids of the three parts of plant by thin layer chromatography exposed us the presence of catechin in leaves and stem, quercetin in the berries, thus , we could identify the presence of a gallic acid in the majority of fractions tested.

The antioxidant activity were evaluated using different extracts including : reducing power and free radical scavenging activity. The capacity of reducing power was important in anthocyanins of berries and the two flavonic fractions of leaves. The ethyl acetate fraction of leaves presented an interesting antioxidant activity ( $IC_{50} = 0.098$  mg/ml) which was higher than the capacity of DPPH free radical scavenging of ascorbic acid ( $IC_{50} = 0.12$  mg/ml).

**Key words :** *Myrtus communis* L., phytochemical study, flavonoids, tannins, anthocyanins antioxidant activity, FRAP and DPPH.

---

## *Abréviations*

<b>% :</b>	Pourcentage
<b>AA :</b>	Acide ascorbique
<b>ABTS<sup>•+</sup> :</b>	2, 2'-azynobis-[3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid]
<b>AFR:</b>	Anthocyane fruit
<b>AlCl<sub>3</sub>:</b>	Trichlorure d'aluminium
<b>AND:</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>°C:</b>	Degré celsius
<b>CCM :</b>	Chromatographie sur couche mince
<b>CLHP :</b>	Chromatographie en phase liquide
<b>DPPH :</b>	Radical 2.2 diphényle-1-picrylhydrazyl
<b>EBF :</b>	Extrait brut feuille
<b>EBT :</b>	Extrait brut tige
<b>EBFR :</b>	Extrait brut fruit
<b>EC :</b>	Equivalent de catéchine
<b>FAEF :</b>	Fraction acétate d'éthyle feuille
<b>FAET :</b>	Fraction acétate d'éthyle tige
<b>FAEFR :</b>	Fraction acétate d'éthyle fruit
<b>FBF :</b>	Fraction butanolique feuille
<b>FBT :</b>	Fraction butanolique tige
<b>FBFR :</b>	Fraction butanolique fruit
<b>Fe<sup>2+</sup> :</b>	Ions ferreux
<b>Fe<sup>3+</sup> :</b>	Ions ferriques
<b>Fe :</b>	Fer
<b>FeCl<sub>3</sub>:</b>	Chlorure de fer
<b>FRAP:</b>	Ferric reducing antioxidant power
<b>g:</b>	Gramme
<b>GAE :</b>	Equivalent d'acide gallique
<b>G6PD:</b>	Glucose -6-phosphate- déshydrogénase
<b>GPX</b>	Glutathion peroxydase
<b>GSH:</b>	Glutathion réduit
<b>GSSG :</b>	Glutathion oxydé
<b>h:</b>	Heure
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b>	Le peroxide d'hydrogène
<b>H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub> :</b>	Acide phosphotungstique
<b>H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub> :</b>	Acide phosphomolybdique
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> :</b>	Acide sulfurique
<b>IC<sub>50</sub> :</b>	Concentration permettant d'inhiber 50 % du radical DPPH
<b>l:</b>	Litre
<b>mg :</b>	Milligramme
<b>ml:</b>	Millilitre
<b>m/v:</b>	Masse/Volume
<b>nm :</b>	Nanomètre
<b>NADPH :</b>	Nicotinamide-Adenine-dinucleotide-Phosphate
<b>NO :</b>	Oxyde d'azote
<b>NO<sub>2</sub> :</b>	Dioxyde d'azote



<b>O<sub>2</sub> :</b>	Oxygène moléculaire
<b>O<sub>2</sub><sup>-•</sup> :</b>	Le radical superoxyde
<b>1O<sub>2</sub>:</b>	L'oxygène singulet
<b>OH<sup>•</sup>:</b>	Le radical hydroxyle
<b>K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> :</b>	Ferricyanure de potassium
<b>NBT<sup>2+</sup>:</b>	Nitro-Blue Tétrazolium
<b>RMN :</b>	Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire
<b>ROO<sup>•</sup>:</b>	Le radical peroxyde
<b>ROOH:</b>	Hydroperoxydes organiques
<b>ROS:</b>	Reactive Oxygen Species
<b>R :</b>	Radicaux
<b>SM:</b>	Spectrométrie de masse
<b>SOD:</b>	Superoxyde dimustase
<b>TF :</b>	Tanin feuille
<b>TT :</b>	Tanin tige
<b>TFR :</b>	Tanin fruit
<b>TPTZ:</b>	2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-s-triazine
<b>μl:</b>	Microlitre
<b>UVA:</b>	Radiations ultra-violettes
<b>UV/VIS:</b>	Radiation ultraviolette/ Visible
<b>v:</b>	Volume

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Les systèmes de défense contre les radicaux libres .....	7
<b>Figure 2</b> : Principales étapes de la défense enzymatique contre les espèces réactives de l'oxygène .....	9
<b>Figure 3</b> : Structure de la vitamine E .....	9
<b>Figure 4</b> : Structure de la vitamine C.....	10
<b>Figure 5</b> : Structure de la $\beta$ -carotène .....	10
<b>Figure 6</b> : Quelques dérivés de l'acide hydroxybenzoïque .....	15
<b>Figure 7</b> : Quelques dérivés de l'acide hydroxycinnamique .....	15
<b>Figure 8</b> : Structure de base de coumarine .....	16
<b>Figure 9</b> : Structure de quelques tanins .....	17
<b>Figure 10</b> : Structure de base des flavonoïdes .....	18
<b>Figure 11</b> : Biosynthèse des flavonoïdes .....	19
<b>Figure 12</b> : Structure de quelques classes de flavonoïdes .....	20
<b>Figure 13</b> : Structure générale des anthocyanes .....	21
<b>Figure 14</b> : Structure de quelques alcaloïdes .....	22
<b>Figure 15</b> : Quelques exemples de différents types de terpenoides.....	23
<b>Figure 16</b> : Structures des anthocyanes, des flavonols simples et glycosides et des flavanols .....	34
<b>Figure 17</b> : Carte géographique de la région de Tlemcen.....	36
<b>Figure 18</b> : Tests phytochimiques 1 .....	38
<b>Figure 19</b> : Tests phytochimiques 2 .....	40
<b>Figure 20</b> : Tests phytochimiques 3 .....	42
<b>Figure 21</b> : Protocole d'extraction des extraits bruts.....	43
<b>Figure 22</b> : Protocole d'extraction des flavonoïdes .....	44
<b>Figure 23</b> : Protocole d'extraction des tanins.....	46
<b>Figure 24</b> : Protocole d'extraction des anthocyanes .....	46
<b>Figure 25</b> : Réaction d'un donneur d'hydrogène (antioxydant) avec le radical DPPH .....	50
<b>Figure 26</b> : Rendements en extraits obtenus à partir des trois parties de la plante.....	56
<b>Figure 27</b> : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux .....	57
<b>Figure 28</b> : Teneurs en phénols totaux pour les trois parties de la plante étudiée .....	57
<b>Figure 29</b> : Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des flavonoïdes .....	58
<b>Figure 30</b> : Teneurs en flavonoïdes pour les trois parties de la plante étudiée .....	58
<b>Figure 31</b> : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tannins .....	59
<b>Figure 32</b> : Teneurs en tanins pour les trois parties de la plante étudiée .....	59
<b>Figure 33</b> : Pouvoir réducteur des extraits bruts et de l'acide ascorbique par la méthode FRAP .....	65
<b>Figure 34</b> : Pouvoir réducteur des flavonoïdes (fraction acétate d'éthyle) et de l'acide ascorbique par la méthode FRAP .....	66
<b>Figure 35</b> : Pouvoir réducteur des flavonoïdes (fraction butanolique) et de l'acide ascorbique par la méthode FRAP .....	66
<b>Figure 36</b> : Pouvoir réducteur des tanins et de l'acide ascorbique par la méthode FRAP.....	67
<b>Figure 37</b> : Pouvoir réducteur des anthocyanes et de l'acide ascorbique par la méthode FRAP. ....	67

<b>Figure 38</b> : Histogramme des valeurs des concentrations nécessaires pour la réduction de 50 % du fer des différents extraits en mg/ml .....	68
<b>Figure 39</b> : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les extraits bruts de trois parties étudiées de <i>Myrtus communis L.</i> .....	70
<b>Figure 40</b> : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les fractions acétates d'éthyles de trois parties étudiées de <i>Myrtus communis L.</i> .....	71
<b>Figure 41</b> : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les fractions butanoliques de trois parties étudiées de <i>Myrtus communis L.</i> .....	72
<b>Figure 42</b> : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les tanins de trois parties étudiées de <i>Myrtus communis L.</i> .....	73
<b>Figure 43</b> : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les anthocyanes des fruits de <i>Myrtus communis L.</i> .....	74
<b>Figure 44</b> : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'acide ascorbique. ....	74
<b>Figure 45</b> : Histogramme des valeurs des concentrations inhibitrices 50 des différents extraits en mg/ml. ....	76

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Activités biologiques des composés polyphénoliques .....	14
<b>Tableau 2 :</b> situation géographique .....	36
<b>Tableau 3 :</b> Résultats des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques recherchés dans la poudre de différentes parties de la plante. ....	54
<b>Tableau 4 :</b> les rendements en extraits obtenus à partir des trois parties de la plante .....	55
<b>Tableau 5 :</b> Résultats de la chromatographie sur couche mince de <i>Myrtus communis</i> L., Acétate d'éthyle/acide formique/eau (65 :15 :20), gel de silice .....	61
<b>Tableau 6 :</b> résultats de la chromatographie sur couche mince des témoins utilisés sur gel de silice, acétate d'éthyle/acide formique/ eau (65 :15 :20) .....	62
<b>Tableau 7 :</b> Composés identifiés par CCM.....	63
<b>Tableau 8 :</b> valeurs des IC <sub>50</sub> trouvées pour les extraits des trois parties de la plante .....	75

## Liste des photos

<b>Photo 1</b> : <i>Myrtus communis</i> L. ....	30
<b>Photo 2</b> : Les feuilles .....	31
<b>Photo 3</b> : Les tiges .....	31
<b>Photo 4</b> : Les fruits .....	31
<b>Photo 6</b> : Plaque de CCM prise après révélation à la lumière UV (365 nm) pour les témoins utilisés. ....	62

# Table des matières

<b>Introduction</b> .....	2
---------------------------	---

## *1<sup>ère</sup> partie : Etude bibliographique*

<b>Chapitre I : Les antioxydants</b> .....	5
1. Les radicaux libres et le stress oxydant.....	5
2. Les radicaux libres dans les systèmes biologiques .....	5
3. Les antioxydants.....	6
3.1. Classification des antioxydants par rapport à leur mécanisme d'action .....	6
3.2. Classification des antioxydants suivant la nature chimique .....	7
3.2.1. Les antioxydants naturels .....	8
3.2.1.1. Les antioxydants enzymatiques .....	8
a) Les superoxydes dismutases (SOD) .....	8
b) Les catalases .....	8
c) Les glutathions peroxydases et réductases (GSHPX) .....	8
3.2.1.2. Les antioxydants non enzymatiques .....	9
a) La vitamine E .....	9
b) La vitamine C (acide ascorbique) .....	10
c) La $\beta$ -carotène .....	10
d) Glutathion .....	10
e) Les oligoéléments .....	11
f) Les composés phénoliques issus des végétaux .....	11
3.2.2. Les antioxydants synthétiques .....	11
<b>Chapitre II : Les métabolites secondaires</b> .....	12
1. Introduction .....	12
2. Définition et fonctions des métabolites secondaires .....	12
3. Classification des métabolites secondaires .....	12
3.1. Les composés phénoliques .....	13
3.1.1. Classification des composés phénoliques .....	14
3.1.1.1. Les acides phénoliques .....	14
3.1.1.2. Les coumarines : .....	16
3.1.1.3. Les quinones .....	16
3.1.1.4. Les tanins .....	16
3.1.1.5. Les flavonoïdes .....	18
3.1.1.6. Les anthocyanes .....	21
3.2. Les alcaloïdes .....	21
3.3. Les isoprénoides (Terpénoides) .....	22
4. Propriétés pharmacologiques des métabolites secondaires .....	23
<b>Chapitre III : Evaluation de l'activité antioxydante</b> .....	25
1. Introduction .....	25
2. Méthodes de piégeage des radicaux libres oxygénés .....	26
2.1. Piègeage du radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) .....	26
2.2. Piègeage du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ scavenging activity) .....	26

2.3. Piégeage du radical hydroxyle (HO <sup>•</sup> ) .....	26
2.4. Piégeage du radical peroxy (ROO <sup>•</sup> ) .....	27
3. Méthodes de piégeage des radicaux stables et évaluation de leur capacité de réduction ...	27
3.1. Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH <sup>•</sup> ) .....	27
3.2. Piégeage du ABTS (2,2'-azynobis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]) ..	28
3.3. Réduction de fer: FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) .....	28
4. Activité antioxydante par la méthode de décoloration du bêta-carotène (β-carotène bleaching method) .....	28
<b>Chapitre IV : Etude botanique de <i>Myrtus communis</i> L.</b> .....	30
1. La famille des myrtacées .....	30
2. <i>Myrtus communis</i> L. ....	30
2.1. Description botanique .....	30
2.2. Position systématique .....	32
2.3. Utilisation médicinale et traditionnelle .....	32
2.4. Aspect économique .....	32
2.5. Travaux antérieurs .....	32

## *2<sup>ème</sup> partie : Matériel et méthodes*

1. Matériel végétal .....	36
2. Tests phytochimiques .....	37
2.1. Epuisement du matériel végétal avec de l'eau chaude .....	37
2.1.1. Amidon .....	37
2.1.2. Saponosides .....	37
2.1.3. Tanins .....	37
2.2. Epuisement du matériel végétal avec l'éthanol .....	39
2.2.1. Flavonoïdes .....	39
2.2.2. Tanins .....	39
2.2.3. Composés réducteurs .....	39
2.3. Autres métabolites secondaires .....	41
2.3.1. Coumarines .....	41
2.3.2. Stérols et triterpènes .....	41
2.3.3. Alcaloïdes .....	41
2.3.4. Anthocyanes .....	41
3. Extraction des composés phénoliques .....	43
3.1. Préparation des extraits bruts méthanoliques .....	43
3.2. Extraction des flavonoïdes (fractions acétate d'éthyle et 1-butanol) .....	44
3.3. Extraction des tanins .....	45
3.4. Extraction des anthocyanes .....	46
4. Dosage des composés phénoliques .....	46
4.1. Dosage des phénols totaux .....	46
4.2. Dosage des flavonoïdes .....	47
4.3. Dosage des tanins .....	47
5. Chromatographie sur couche mince .....	48
6. Activité antioxydante .....	49
6.1. Réduction du fer : FRAP ( <i>Ferric reducing antioxidant power</i> ) .....	49
6.2. Piégeage du radical libre DPPH <sup>•</sup> (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) 3 .....	49

### 3<sup>ème</sup> partie : Résultats et discussion

1. Screening phytochimique .....	53
2. Les rendements en extraits secs .....	55
3. Dosage des phénols totaux .....	57
4. Dosage des flavonoïdes .....	58
5. Dosage des tanins .....	59
6. Analyse chromatographique sur couche mince des deux fractions organiques acétate d'éthyle et 1-butanol de <i>Myrtus communis</i> L. ....	60
6.1. Essai d'identification des composés par CCM .....	61
7. Etude de l'activité antioxydante .....	65
7.1. Réduction du fer : FRAP (Ferric reducing antioxidant power).....	65
7.1.1. Extraits bruts .....	65
7.1.2. Flavonoïdes.....	66
7.1.3. Tanins .....	67
7.1.4. Anthocyanes .....	67
7.2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl) .....	69
7.2.1. Extraits bruts.....	70
7.2.2. Flavonoïdes.....	71
7.2.3. Tanins .....	73
7.2.4. Anthocyanes .....	74
7.2.5. Acide ascorbique .....	74
<b>Conclusion</b> .....	79
<b>Références bibliographiques</b> .....	82
<b>Annexes</b> .....	96



# Introduction

On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. L'isolement de principes actifs datant du XIX<sup>ème</sup> siècle, en améliorant la connaissance des structures, a fait progressivement se séparer et parfois s'opposer une phytothérapie traditionnelle souvent empirique avec une thérapeutique officielle incluant les principes chimiques et végétaux dont la pharmacologie était mieux connue. Cette thérapeutique officielle accepte parfois avec une certaine méfiance l'emploi de végétaux ou d'extraits complexes de végétaux dont l'action est confirmée par l'usage sans être attribuée de façon certaine à une molécule type **(Bahorun, 1997)**.

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

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

Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits. Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tannins **(Boizot et Charpentier, 2006)**.

En Algérie, l'industrie pharmaceutique, mais également des médecins et des chimistes cherchent à mieux connaître le patrimoine des espèces spontanées utilisées en médecine traditionnelle. Leurs modes d'utilisation, leurs indications dans diverses pathologies ainsi les principes actifs sont étudiés depuis une vingtaine d'années **(Djebaili, 1984, Bouattoura, 1988, Maizak et al, 1993)**.

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

Ces dernières années, nous avons assisté à un regain d'intérêt des consommateurs pour les produits naturels. C'est pour cela que les industriels développent de plus en plus des procédés mettant en œuvre des extraits et des principes actifs d'origine végétale. Parmi ces nouveaux composés potentiellement intéressants, les antioxydants, tels que les flavonoïdes, ont été particulièrement étudiés en raison de leur utilisation dans les domaines

pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires pour leurs effets bénéfiques pour la santé **(Chebil, 2006)**.

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

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

C'est pourquoi nous nous sommes intéressé de faire une étude phytochimique de la plante *Myrtus communis* L. poussant à l'état spontané dans les monts de la région de Tlemcen et à évaluer l'activité antioxydante de leur extraits.

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

Notre travail a été divisé en trois parties ; nous aborderons dans une première partie une étude bibliographique qui regroupe quatre chapitres dont le premier concerne les antioxydants. Le deuxième chapitre est consacré aux métabolites secondaires, leurs classifications et leurs propriétés pharmacologiques. Nous donnerons dans le troisième chapitre quelques méthodes d'évaluations de l'activité antioxydante, et une description détaillée de la plante étudiée sera donnée dans le dernier chapitre.

La deuxième partie décrit le matériel et les méthodes utilisées dans ce travail qui porte sur :

- Ø Les tests phytochimiques des différentes parties de la plante ;
- Ø L'extraction des flavonoïdes, des tanins, et des anthocyanes ;
- Ø Essai d'identification des composés par CCM ;
- Ø Dosage des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins,
- Ø Une étude de l'activité antioxydante des extraits de cette plante, par deux méthodes, la réduction de fer et le piégeage du radical libre DPPH.

Enfin dans la troisième partie nous présenterons les résultats obtenus et leurs discussions.

Première partie  
Etude bibliographique

# Chapitre I : Les antioxydants

## 1. Les radicaux libres et le stress oxydant

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

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

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

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

## 2. Les radicaux libres dans les systèmes biologiques

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

Les radicaux libres sont principalement produits par des sources endogènes, telles que les chaînes de transport d'électron, les peroxyosomes et le système de cytochrome P-450. Ces radicaux sont responsables de l'altération de l'ADN, du vieillissement cellulaire qui est à la

base de certaines maladies comme l'athérosclérose, le cancer, maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson (**Favier, 2003**).

### **3. Les antioxydants**

De nombreuses espèces oxydantes sont produites et bien qu'elles soient souvent indispensables à l'organisme, elles ne sont pas moins responsables de dégâts importants. Pour faire face à ces produits oxydants délétères, le corps humain possède tout un arsenal de défenses que l'on qualifie d'antioxydants. Mais bien que le terme « antioxydant » soit fréquemment utilisé, il est difficilement définissable car il couvre un large nombre de molécules et des domaines très divers comme l'alimentation, l'industrie chimique, l'industrie pharmaceutique (**Halliwell et Gutteridge, 1999**).

Un antioxydant est toute substance, présente à une concentration inférieure à celle du substrat oxydable, qui est capable de retarder ou de prévenir l'oxydation de ce substrat. (**Halliwell et Gutteridge, 1999**). Les antioxydants sont des composés puissants qui peuvent neutraliser les radicaux libres impliqués dans la dégradation cellulaire, et nous aident ainsi à garder une vie active et saine. Quelques antioxydants sont fabriqués par le corps humain, d'autres tels les vitamines et poly phénols, doivent être apportés par notre alimentation. (**Pincemail et Defraigne, 2004**).

La classification de tous les antioxydants connus est difficile, ils sont classés généralement par leur mécanisme d'action ou par leur nature chimique.

#### **3.1. Classification des antioxydants par rapport à leur mécanisme d'action**

Indépendamment de leur localisation, les antioxydants peuvent agir à deux niveaux : en prévenant la formation de radicaux libres oxygénés ou en épurant les radicaux libres oxygénés. En complément de cette double ligne de défense, l'organisme est en outre capable de réparer ou d'éliminer les molécules endommagées par l'attaque radicalaire (**Gardès-Albert, 2003**).

##### **Groupe I**

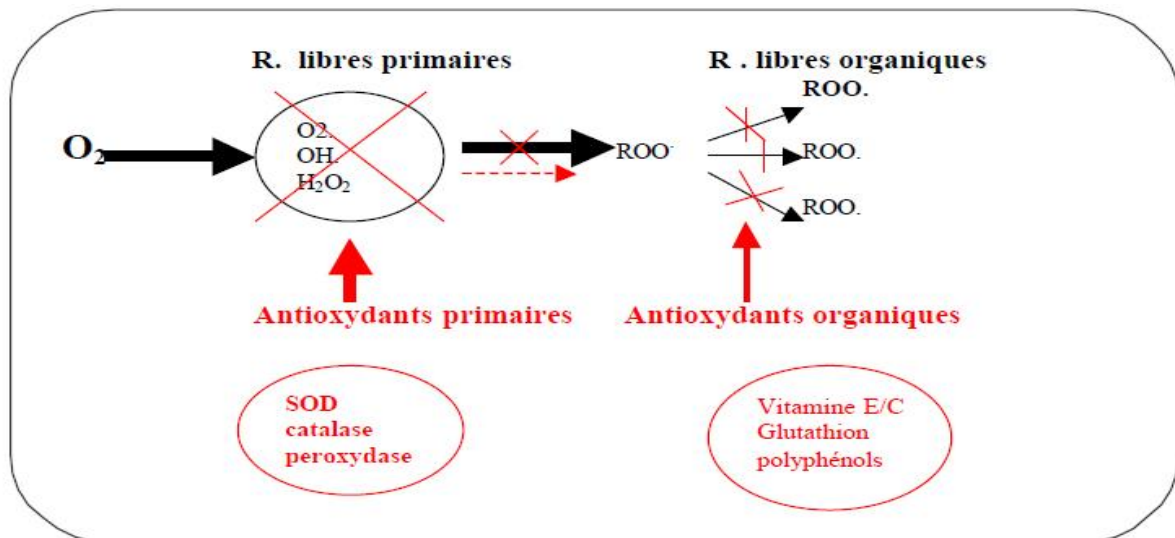
Plusieurs noms ont été attribués à ce groupe par exemple, antioxydants primaires, chain breaking, piègeur des radicaux libres. Ce genre d'antioxydants peut inhiber la réaction d'initiation et la propagation de l'oxydation en participant au processus d'oxydation et en convertissant les radicaux libres vers leurs formes inactives. Les antioxydants primaires sont généralement des composés phénoliques (AH) capables de donner un atome d'hydrogène au radical libre et le convertir en un composé stable non radicalaire. Les antioxydants de ce groupe réagissent de façon prédominante avec les radicaux peroxylés, pour deux raisons : la concentration élevée de ces radicaux et la faible énergie du groupement (ROO·), en comparaison avec les autres radicaux comme le (RO·) et la faible concentration du piègeur du radical libre dans l'aliment. Un piègeur du radical libre, même à des concentrations faibles, entre en compétition avec les lipides pour rendre le radical libre inactif par l'intermédiaire

d'une réaction de libération d'un électron, suivie d'une déprotonation (Frankel *et al*, 2000 ; Huang *et al*, 2005).

## Groupe II

Les composés de ce groupe sont catalogués comme préventifs ou antioxydants secondaires. Ils englobent une large gamme de différentes substances chimiques qui inhibent l'oxydation des lipides par différents mécanismes et ne transfèrent pas le radical libre sous sa forme non-radicalaire. Avec quelques exceptions, les antioxydants secondaires sont généralement reliés à l'inhibition de facteurs initiant l'oxydation. Le groupe II inclut : des chélateurs de métaux pro-oxydatifs, des désactivateurs de l'oxygène singulet, des piègeurs de la molécule d'oxygène, inhibiteurs des enzymes pro-oxydative, enzymes antioxydantes et destructeurs des hydroperoxides. (Figure1)

Parfois, quelques antioxydants peuvent exercer plusieurs fonctions anti-oxydatives, par exemple, l'acide ascorbique peut être un piègeur du radical libre, désactivateur des oxygènes singlets dans une solution aqueuse et effectivement régénérer du tocophérol. Plusieurs flavonoïdes sont des piègeurs de radicaux libres et chélateurs de métaux (Miller *et al*, 1996).



**Figure 1** : Les systèmes de défense contre les radicaux libres (Binov, 2001).

### 3.2. Classification des antioxydants suivant la nature chimique

Plusieurs antioxydants synthétiques et quelques composés naturels (tocophérol, acide ascorbique, Béta-carotène) sont officiellement autorisés pour l'utilisation dans l'alimentation. Leur présence s'avère également nécessaire au sein des produits pharmaceutiques et de cosmétiques afin d'éviter leur dégradation.

Cependant, des études toxicologiques ont jugé certains antioxydants synthétiques comme sources de danger (Barlow, 1990; Evans *et al*, 1992). La recherche de nouveaux antioxydants naturels est l'objectif de nombreux industriels et scientifiques. Dans la littérature, des milliers de publications ayant pour sujet les antioxydants naturels ainsi que leur

effet sur l'organisme humain peuvent être consultées (Namiki, 1990; Wanasundara et al, 1994; Larson, 1997; Pietta, 2000; Moure et al, 2001).

### 3.2.1. Les antioxydants naturels

L'organisme possède des systèmes de défense très efficaces, de deux types : les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non enzymatiques. Ces antioxydants sont d'autant plus importants que certains peuvent être utilisés en thérapeutique pour tenter de prévenir le stress oxydatif (Diplock, 1991).

#### 3.2.1.1. Les antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques (La superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion reductase) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ROS. (Figure 2).

##### a) Les superoxydes dismutases (SOD)

La famille des superoxyde dismutases comporte trois isoformes (SOD1, SOD2, SOD3) dont le rôle est la dismutation de deux anions superoxyde en espèces oxygénées moins réactives que sont H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et O<sub>2</sub> (Antwerpen, 2006).

L'activité des SOD est dépendante des apports nutritionnels en cuivre et à un moindre degré en zinc (Goudable et Favier, 1997).



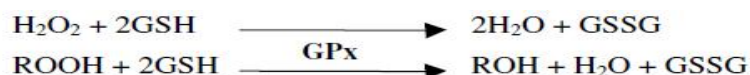
##### b) Les catalases

Elles réduisent le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en libérant de l'oxygène et de l'eau. Elles sont localisées surtout dans les peroxysomes. Elles n'éliminent pas la totalité du peroxyde d'hydrogène, mais leur rôle est très important surtout en présence d'ions ferreux (Lindau-Sehpar et Shaffer, 1993).



##### c) Les glutathions peroxydases et réductases (GSHPX)

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. Le rôle de la glutathion peroxydase (GPx) est de réduire d'une part le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau, et d'autre part les hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools. Lors de cette réaction, qui demande l'intervention de deux molécules de glutathion (GSH), celles-ci se transforment en glutathion-disulfure (GSSG) (Marfak, 2003) :

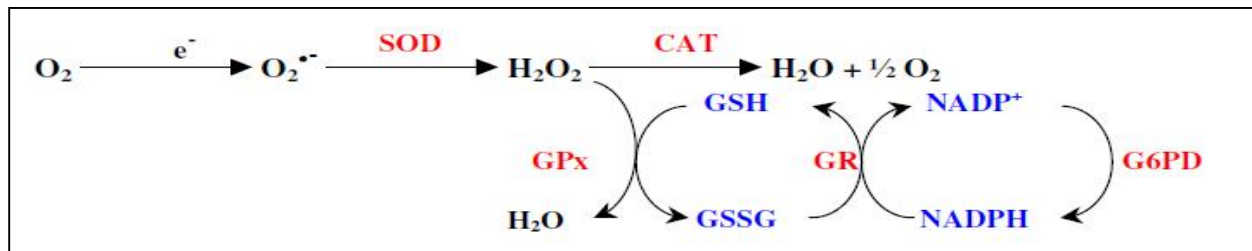




La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG. Au cours de cette réaction, la glutathion réductase utilise un cofacteur, le NADPH :



Cette réaction produit du NADP<sup>+</sup> qui sera régénéré en NADPH pour une utilisation ultérieure, par une autre enzyme, le G6PD (glucose-6-phosphate-déshydrogénase) :



**Figure 2 :** Principales étapes de la défense enzymatique contre les espèces réactives de l'oxygène.

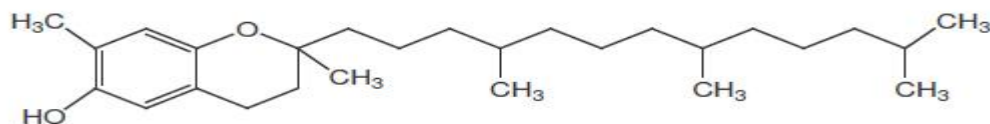
### 3.2.1.2 Les antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons les oligoéléments, la glutathion réduit (GSH), les vitamines E et C et les polyphénols.

#### a) La vitamine E

La vitamine E désigne un groupe de nombreux composants présents dans la nature : les  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - et  $\delta$ -tocophérols et tocotriénols (Ohrvall *et al*, 1996). Elle intervient directement au niveau des membranes biologiques où elle piège les radicaux libres avant qu'ils n'atteignent leurs cibles (Goussard, 1999).

La vitamine E étant liposoluble, elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique. (Figure 3) (Evans, 2002 ; Packer *et al*, 1997).



**Figure 3 :** Structure de la vitamine E

### b) La vitamine C (acide ascorbique)

La vitamine C ou acide ascorbique est l'antioxydant hydrosoluble majeur (Curtay et Robin, 2000). Elle se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire ; elle peut capter directement l' $O_2^{\cdot -}$  et l' $OH^{\cdot}$ . Elle peut aussi réduire le radical  $\alpha$ -tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E (Figure 4) (Evans, 2002 ; Packer *et al*, 1997).

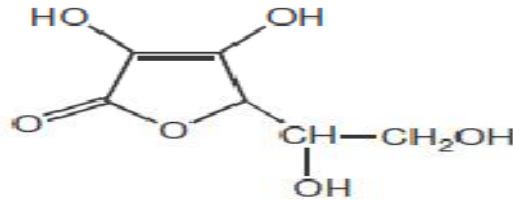


Figure 4 : Structure de la vitamine C

### c) La $\beta$ -carotène

La  $\beta$ -carotène est apporté par l'alimentation. Elle est douée de plusieurs capacités : elle est précurseur de la vitamine A, elle capte l'oxygène singulet sous faible pression d'oxygène et, avec les autres caroténoïdes, elle a le pouvoir de terminer les réactions en chaîne de lipoperoxydation. Elle protège les structures cellulaires contre l'agression oxydante : elle s'oppose à la génotoxicité de nombreux agents (Allard *et al*, 1994).

La présence de nombreuses doubles liaisons au sein de leurs structures (Figure 5) en fait des antioxydants reconnus, notamment par leur effet protecteur vis-à-vis des radiations solaires (UVA) (Biesalski *et al*, 1996).

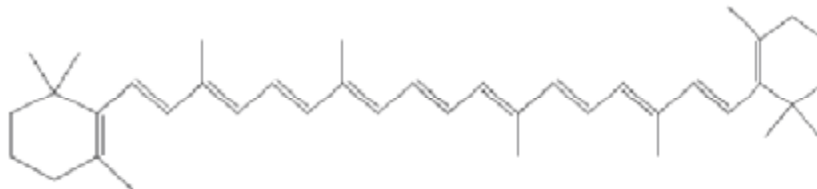


Figure 5 : Structure de la  $\beta$ -carotène

### d) Glutathion

Le glutathion joue un rôle majeur dans la protection des lipides, des protéines et des acides nucléiques contre l'oxydation. (Stamler et Slivka, 1996). En situation de stress oxydant, son rôle protecteur et détoxifiant résulte principalement de sa fonction de coenzyme des GSHPX. Il fait aussi l'objet d'interactions synergiques avec d'autres composants du système de protection antioxydante tels que la vitamine C ou la vitamine E. (Gerard-Monnier et Chaudière, 1996).

### **e) Les oligoéléments**

Le cuivre, le zinc, le manganèse, le sélénium et le fer sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium (**Garait, 2006**).

### **f) Les composés phénoliques issus des végétaux**

Les polyphénols suscitent depuis une dizaine d'année un intérêt croissant de la part des nutritionnistes, des industriels de l'agro-alimentaire et des consommateurs. Une des raisons principales est la reconnaissance de leurs propriétés antioxydantes et ainsi leur implication probable dans la prévention des diverses pathologies associées au stress oxydant. Un très grand nombre de données expérimentales plaide aujourd'hui en faveur de leur implication dans la prévention des maladies dégénératives telles que cancers, maladies cardio-vasculaires, ostéoporose ou maladies inflammatoires (**Rock., 2003**). Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tanins (**Boizot et Charpentier, 2006**).

#### **3.2.2. Les antioxydants synthétiques**

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT) gallate propylée (PG) et le tétra-butylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matière de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture (**Lisu et al, 2003**). Cependant, il a été montré que ces antioxydants de synthèse pouvaient être toxiques (**Yu et al, 2000**). En effet, le BHA convertirait certains produits ingérés en substances toxiques ou carcinogènes en augmentant la sécrétion des enzymes microsomaux du foie et des organes extra-hépatiques (**Barlow, 1990**). Le BHT présenterait des effets carcinogènes chez le rat (**Ito et al, 1985**).

# Chapitre II : Les métabolites secondaires

## 1. Introduction

La plante est le siège d'une intense activité métabolique aboutissant à la synthèse de principes actifs les plus divers. Ce processus métabolique est lié aux conditions mêmes de vie de la plante : la plante doit faire face à de multiples agressions de l'environnement dans lequel elle vit : prédateurs, microorganismes pathogènes, etc. On conçoit donc que la plante puisse développer un métabolisme particulier lui permettant de synthétiser les substances les plus diverses pour se défendre : les métabolites secondaires (**Kansole, 2009**).

## 2. Définition et fonctions des métabolites secondaires

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**).

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

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

## 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 :

### 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, méthylque, ester, sucre...) **(Bruneton, 1993)**.

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

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

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

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

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

### 3.1.1. Classification des composés phénoliques

#### 3.1.1.1. Les acides phénoliques

Ils ne possèdent pas de squelette flavane. Ils sont solubles dans l'éther. Ils peuvent être associés à la lignine, présents sous forme d'ester, ou bien localisés dans la partie de la feuille insoluble dans l'alcool (**Barboni, 2006**). Ils présentent des propriétés biologiques intéressantes : antiinflammatoires, antiseptiques urinaire, antiradicalaires, cholagogues, hépatoprotecteurs, cholérétiques, immunostimulants (**Bruneton, 1999**). On distingue :

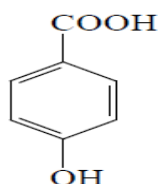
Les dérivés de l'acide benzoïque (constitués d'un squelette à sept carbones).

Les dérivés d'esters hydroxycinnamiques (constitués d'une structure de type C6-C3). (**Barboni, 2006**).

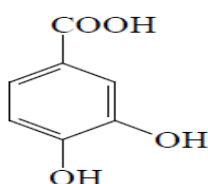
#### Ø Les acides benzoïques

Les acides benzoïques sont formés d'un squelette à sept atomes de carbones. Ils sont principalement représentés par les acides p-hydroxybenzoïques, protocatéchiques, vanilliques, galliques, syringiques, salicyliques, o-hydroxybenzoïques et gentisiques. Les acides protocatéchiques et galliques (Figure 6) ont probablement une origine et des fonctions

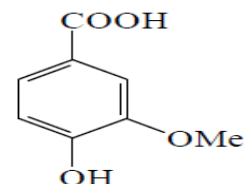
différentes dans la plante. Le premier est très largement répandu, le second est plus rare, on le rencontre dans la nature surtout sous forme de dimère (**Ribereau, 1968**).



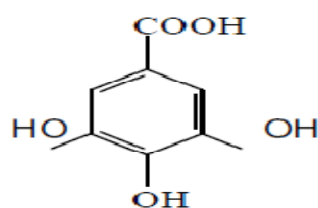
Acide p-hydroxybenzoïque



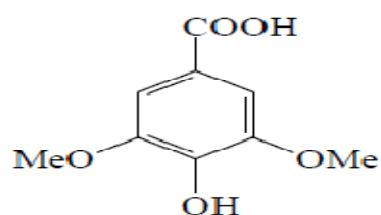
Acide protocatéchique



Acide vanillique



Acide gallique

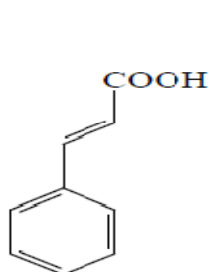


Acide syringique

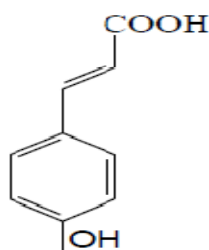
**Figure 6:** Quelques dérivés de l'acide hydroxybenzoïque

### Ø Les acides cinnamiques

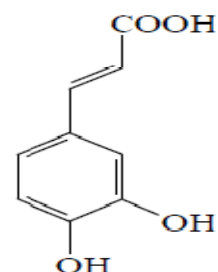
Ces acides possèdent une structure du type C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>. Les composés les plus fréquents sont l'acide p-coumarique, l'acide caféique, l'acide fertarique et l'acide cinnamique (**Ribereau, 1968**).



Acide cinnamique



Acide p-coumarique



Acide caféique

**Figure 7 :** Quelques dérivés de l'acide hydroxycinnamique

### 3.1.1.2. Les coumarines :

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

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

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

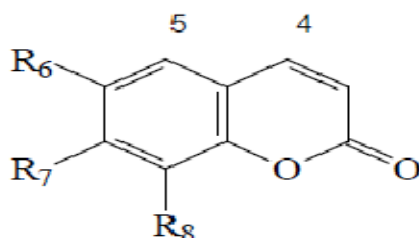


Figure 8 : Structure de base de Coumarine

### 3.1.1.3. Les quinones

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

### 3.1.1.4. Les tanins

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

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

Les tanins sont divisés en deux groupes :

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



## Ø Les tanins condensés (flavan-3-ols)

Les tanins condensés, appelés aussi polyphénols ou proanthocyanidine, sont largement répandus dans l'alimentation humaine. Ces tanins sont des oligomères ou polymères de flavan-3-ols qui ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide à chaud par rupture de la liaison inter monomérique (**Guigniard, 1996**).

- **Structure**

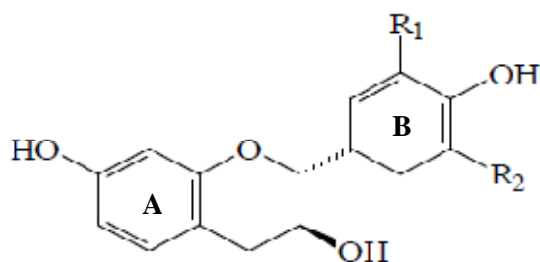
La structure complexe des tanins condensés est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leur centre asymétrique et leur degré d'oxydation. Les formes naturelles monomériques des flavan-3-ols se différencient par la stéréochimie des carbones asymétriques C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub> et par le niveau d'hydroxylation du noyau B (Figure 9). On distingue ainsi les catéchines (dihydroxylées) des gallocatéchines (trihydroxylées) (**Bessas et al, 2007**).

## Ø Les tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des esters de glucides ou d'acide phénols, ou de dérivés d'acides phénols ; la molécule glucidique est en général du glucose, mais dans certains cas des polysaccharides. Ce groupe de tanins est caractéristique des Dicotylédones. Ces tanins en raison de leurs nombreux groupements OH se dissolvent plus ou moins (en fonction de leur poids moléculaire) dans l'eau, en formant des solutions colloïdales (**Guigniard, 1996**).

- **Structure**

Les tanins hydrolysables sont constitués d'un noyau central -le glucose- et de chaînes latérales (en position 1, 2, 3, 4 ou 6 sur le glucose) comprenant 1 à n monomère(s) d'acide phénol. Des liaisons carbone à carbone entre noyaux (liaisons biphenyle réalisées par couplage oxydatif), conduisent à des molécules ramassées plus rigides de solubilité diminuée dites les tanins éllagiques (**Bessas et al, 2007**).



R<sub>1</sub> - R<sub>2</sub> - H : Afzéléchol

R<sub>1</sub> - OH ; R<sub>2</sub> - H : Catéchol

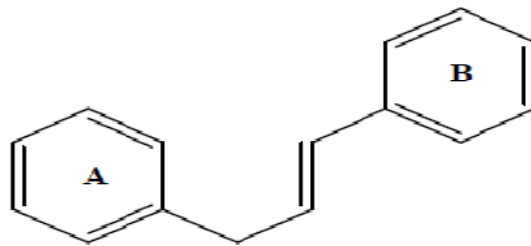
R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = OH : Gallocatéchol

**Figure 9** : Structure de quelques tanins

### 3.1.1.5. Les flavonoïdes

- **Structure**

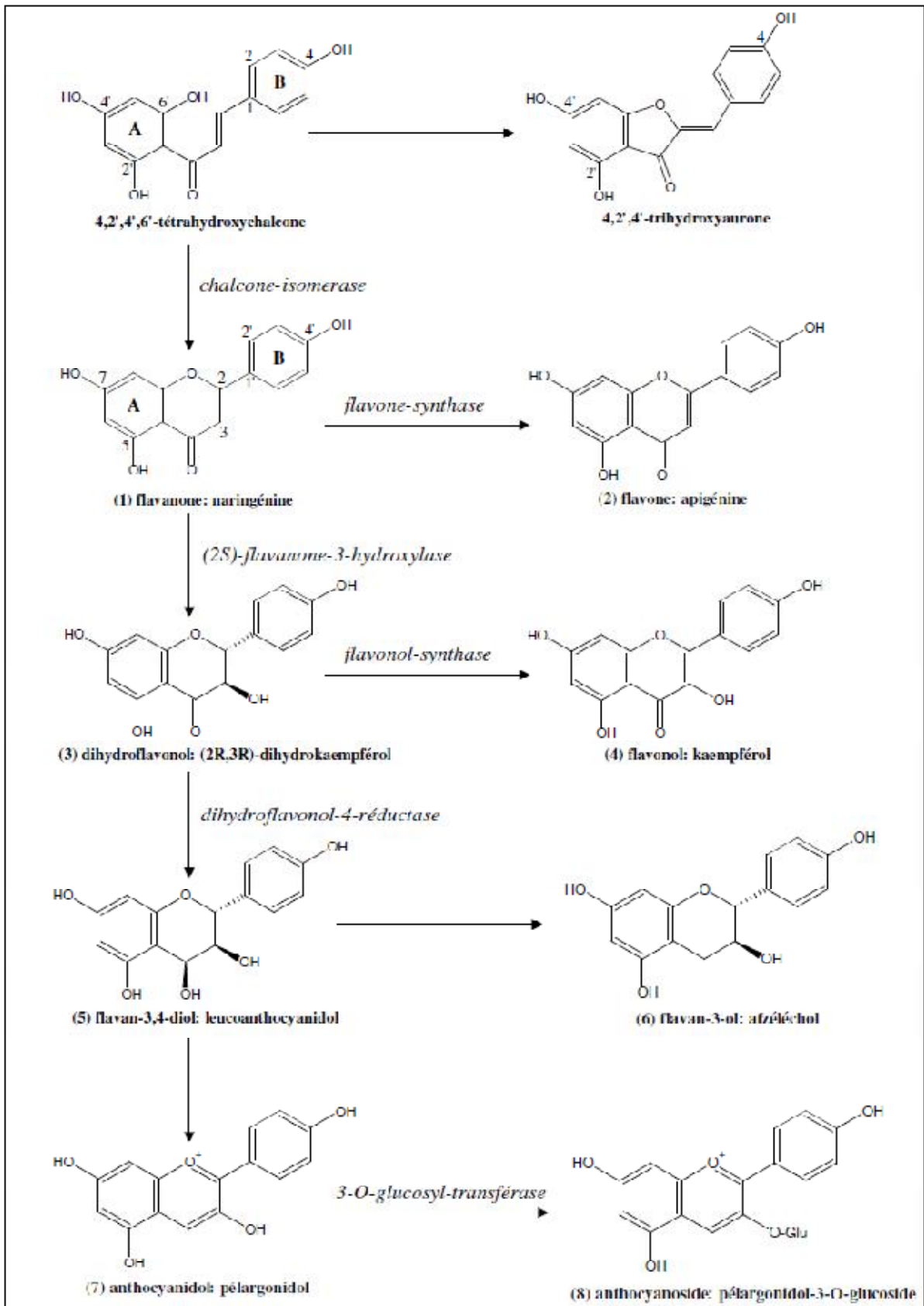
Les flavonoïdes sont des molécules très répandues dans le règne végétal. Ils font partie de la classe des polyphénols, principaux métabolites secondaires des plantes. Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, présentent le même élément structural de base (sauf exceptions : chalcones, aurones, isoflavones), à savoir quinze atomes de carbone constitués de deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3 (noyau 2-phényl-1-benzopyrane) (Figure 10) (**Bruneton, 1999**).



**Figure 10** : Structure de base des flavonoïdes

- **Biosynthèse des flavonoïdes**

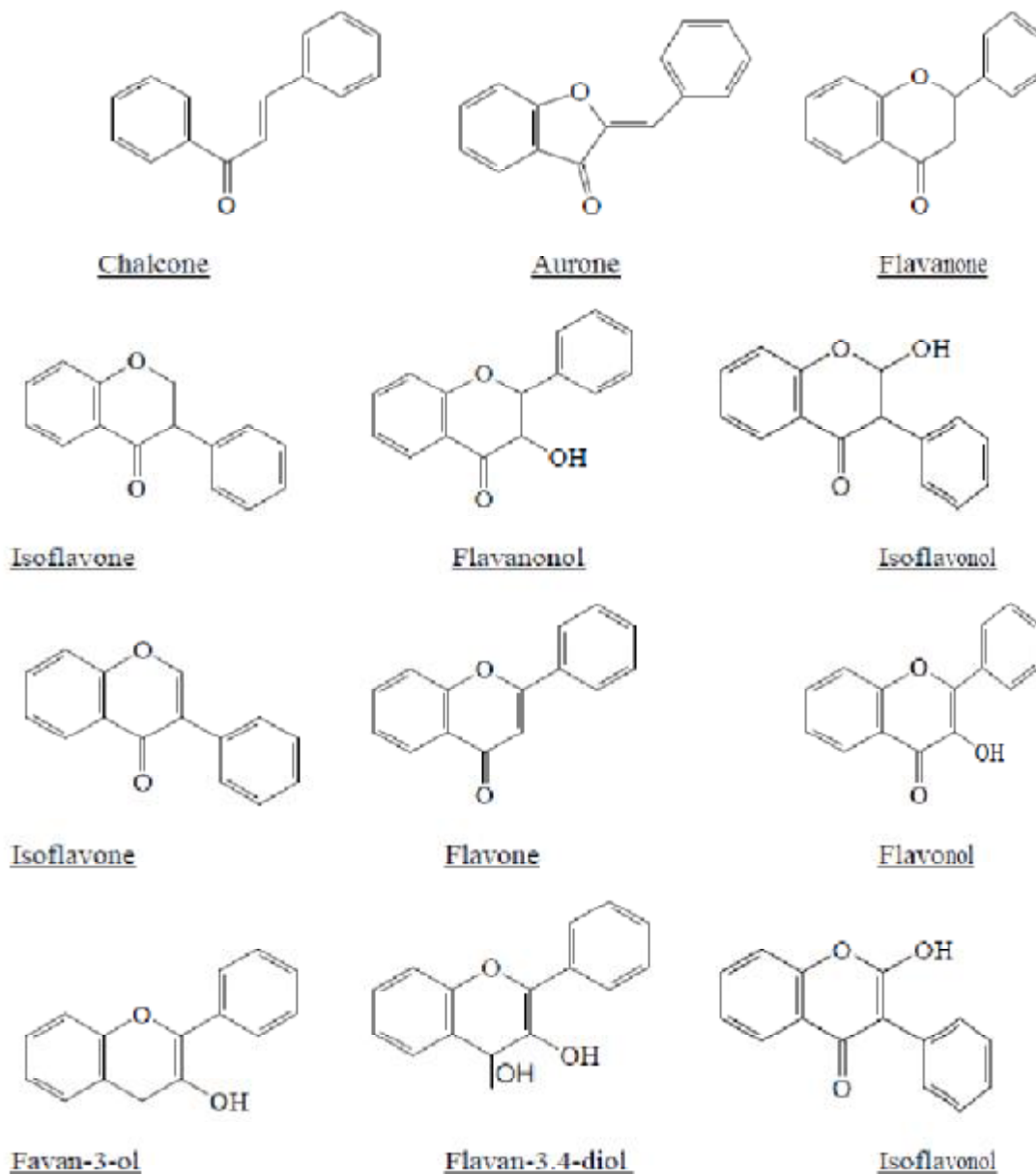
Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune dérivant de la voie de l'acide shikimique. Le précurseur de ces molécules est le 4-hydroxycinnamate-coenzyme A synthétisé à partir de la phénylalanine (**Bruneton, 1999**). La voie biosynthétique de ces polyphénols est présentée dans la figure 11.



**Figure 11 : Biosynthèse des flavonoïdes**

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

La famille des flavonoïdes peut se diviser en six classes qui diffèrent par leurs structures chimiques: flavanols, flavones, flavonols, flavanones, isoflavones et anthocyanidines (Figure 12) Medic Sanic *et al*, 2004).



**Figure 12** : Structure de quelques classes de flavonoïdes

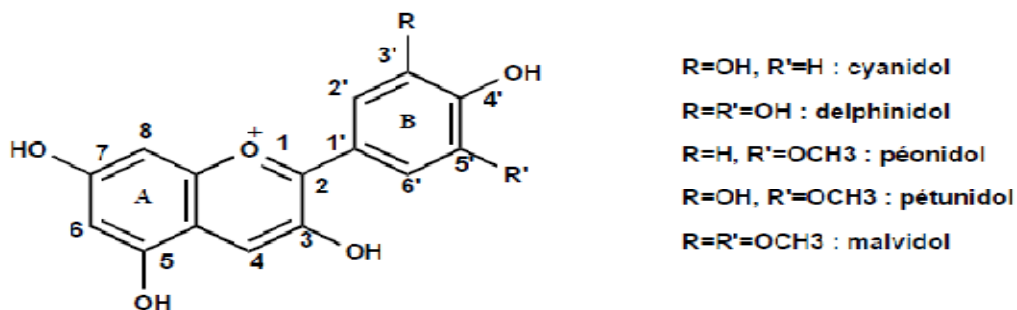
Parmi les nombreux pigments dérivants de cette structure, il convient de citer notamment:

### 3.1.1.6. Les anthocyanes

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

- Structures

Leur structure de base est caractérisée par un noyau "flavon" généralement glucosylé en position C<sub>3</sub>. Les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule. L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment (Figure 13) (**Bessas et al., 2007**).



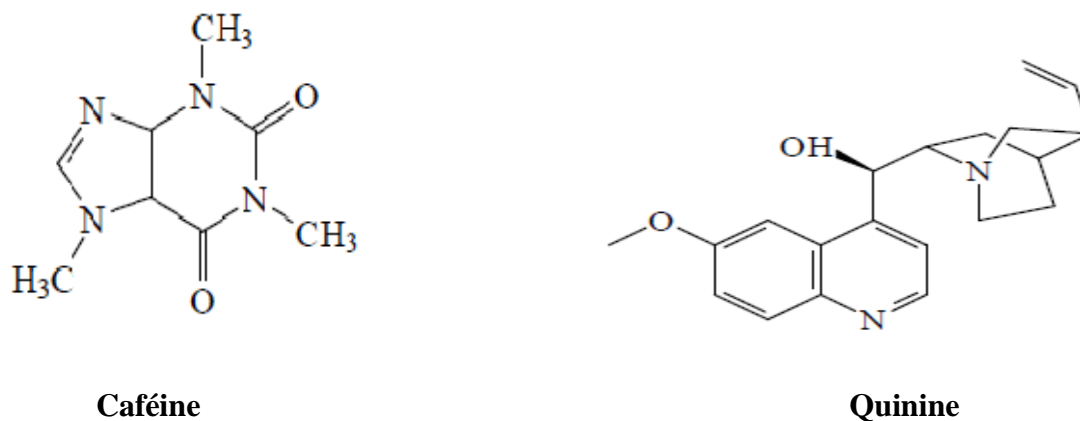
**Figure 13** : Structure générale des anthocyanes (Le cation flavylum)

### 3.2. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont un groupe de composés azotés et faiblement basiques issus principalement des végétaux (Figure 14). Ils présentent des réactions communes de précipitation. Après extraction, ils sont détectés par des réactions générales de précipitation fondées sur leur capacité de se combiner avec des métaux. La caractérisation de la présence d'alcaloïde peut se faire par précipitation à l'aide de : Réactif silicotungstique : réactif de Bertrand, Réactif Tétraiodomercure de potassium : réactif de Valsler-Mayer, Iodobismuthate de potassium : réactif de Dragendorff (**Kansole, 2009**).

- **Propriétés**

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

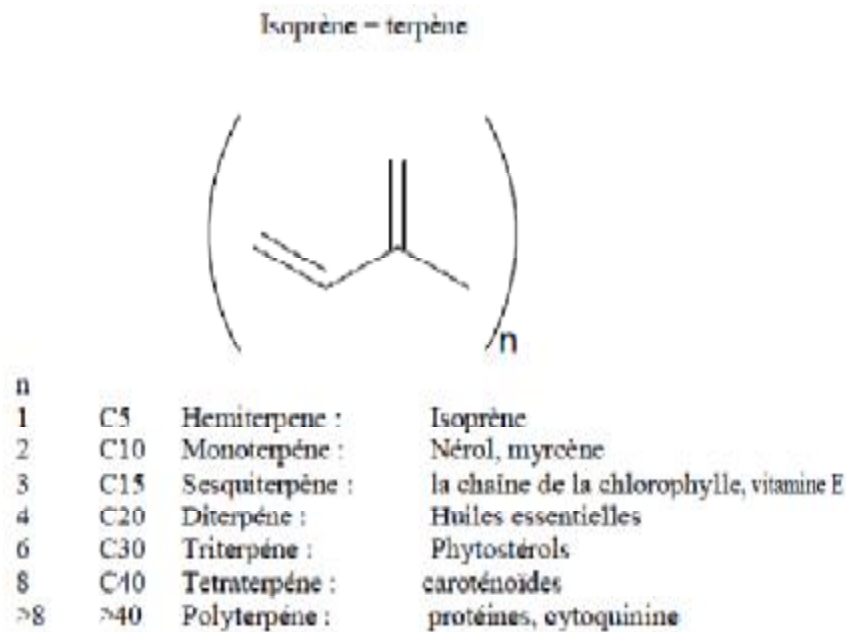


**Figure 14 :** Structure de quelques alcaloïdes

### 3.3. Les isoprénoides (Terpénoides)

Les isoprénoides sont des composés issus de la condensation d'unités de base à 5 carbones de type isoprène. On parle également de composés terpéniques ou terpenoïdes, l'unité monoterpène correspondant à des molécules à 10 carbones formées à partir de deux unités isoprènes (Figure 15).

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



**Figure 15 :** Quelques exemples de différents types de terpenoïdes

#### 4. Propriétés pharmacologiques des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont reconnus par leurs activités biologiques nombreuses qui comprennent des activités antibactériennes, anticancéreuses, antifongiques, analgésiques, anti-inflammatoires, diurétiques gastro-intestinales, antioxydantes.... (**Harborne, 1998 ; Bruneton, 1999**).

Parmi les principaux métabolites secondaires, on peut citer les flavonoïdes qui sont des composés qui possèdent de fortes propriétés anti-oxydantes (**Rice-Evans, 1995**). Ils sont synthétisés par les plantes lors de l'invasion microbienne (**Dixon et al, 1983**), il est par conséquent logique, qu'ils agissent comme substances antimicrobiennes efficaces in vitro contre les microorganismes (**Cowan, 1999 ; Recio et al, 1989**).

Les flavonones et les et les flavonols représentent environ 80% des flavonoïdes connus. La principale activité attribuée à ces composés est une propriété vitaminique P veino-active. Ils diminuent la perméabilité des capillaires sanguins et renforcent leur résistance. Souvent anti-inflammatoires, ils peuvent être antiallergiques, hépato-protecteurs, antispasmodiques, diurétiques, antibactériens, antiviraux (**Bruneton, 1999**).

Les isoflavones sont des flavonoïdes dont leurs distribution est restreinte, ce sont des phytoalexines (substances produites par la plante en réponse à une infection par un agent pathogène ; champignon par exemple). Ce sont donc des produits de défense naturelle, de puissants oestrogènes, insecticides, antitumoraux, réducteurs des manifestations de la ménopause (bouffée de chaleur) (**Kansole, 2009**).

Les flavones et les anthocyanes augmentent la réponse à la lumière visible de forte intensité. Ils sont probablement synthétisés par les végétaux dans le but d'atténuer l'intensité de la lumière qui atteint les cellules photosynthétiques. Ce sont néanmoins les radiations UV qui induisent la synthèse des flavonoïdes (**Lois, 1994**).

Les anthocyanes ont des propriétés pharmacologiques très proches de celle des flavonoïdes vu leurs structures très semblable. L'effet antioxydant des anthocyanes est expliqué en partie par piégeage des radicaux libres et la chélation des métaux. Les anthocyanes inhibent les enzymes protéolytiques de dégradation du collagène (élastase, collagénase), ce qui explique leurs propriétés vasoprotectrices et anti-oedémateuse. Il s'agit, en outre, de composés veino-actifs doués d'une propriété vitaminique P (**Bruneton, 1999**).

Les acides phénols sont des dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique. Ils sont antiinflammatoires, antiseptiques urinaire, antiradicalaires, cholagogues, hépatoprotecteurs, cholérétiques, immunostimulants (**Bruneton, 1999**).

Les coumarines connues pour ses propriétés anti-oedémateuses, a fait l'objet d'études cliniques chez les patients atteints de cancers avancés car elle est rapidement métabolisée au niveau du foie en 7-hydroxycoumarine (**Fujioka et al, 1999**). Il n'est pas exclu que les propriétés anti inflammatoires et analgésiques attribués au frêne soient dues aux coumarines (**Chen et al, 1995 ; Garcia-Agaezet al, 2000**). L'action commune des coumarines de différente origine est celle contre les différents types de troubles gastriques (**Resch et al, 1998**) antivirale (**Yoshikawa et al, 1994**) antimicrobienne (**Kayser et Kolodziej, 1997**).

Les tanins sont des substances d'origine organique que l'on trouve dans pratiquement tous les végétaux, et dans toutes leurs parties (écorces, racines, feuilles, etc.), caractérisées par leur astringence. Ils ont la propriété de précipiter les protéines (fongiques ou virales) et les métaux lourds. Ils favorisent la régénération des tissus et la régulation de la circulation veineuse, tonifient la peau dans le cas des rides (**Kansole, 2009**).

Les effets thérapeutiques des alcaloïdes sont nombreux et peuvent être aussi des poisons mortels. Au niveau du système nerveux central ils agissent comme dépresseurs (morphine, scopolamine) ou comme stimulants (caféine, strychnine,...). Au niveau du système nerveux autonome comme sympathomimétiques (éphédrine), anticholinergiques (atropine). Certains jouent le rôle d'anesthésiques locaux (cocaïne), d'antipaludiques (quinine) (**Kansole, 2009**).

Les corps terpéniques (le terpène se trouve dans le menthol, le camphre etc...) eux même forment la base des stéroïdes qu'on retrouve dans de nombreuses vitamines. Ils sont connus par leurs activités cytostatiques, insecticides, anti-inflammatoires, molluscicides et analgésiques (**Bruneton, 1999**).

### **Chapitre III : Evaluation de l'activité antioxydante**



## 1. Introduction

Les méthodes d'évaluation du caractère antioxydant sont nombreuses et peuvent être qualitatives ou quantitatives. Les méthodes qualitatives, utilisées pour repérer l'activité antioxydante de Composés, sont relativement peu nombreuses et font intervenir en général, la coloration ou la décoloration d'un réactif spécifique en présence d'agents antioxydants. Une des méthodes les plus utilisées pour la détection d'antioxydants est la chromatographie sur couche mince (CCM), qui donne naissance à des réactions colorées en présence de tels composés (**Li et al, 1999**).

D'autres méthodes, moins pratiques, nécessitent la pulvérisation successive de deux solutions différentes. Une méthode à phase inversée de la chromatographie (CCM), combinée avec la détection visuelle pour l'évaluation de l'activité de balayage de radical libre des fractions antioxydantes en employant le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) (**Maamri, 2008**).

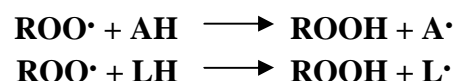
En ce qui concerne l'évaluation quantitative de l'activité antioxydante, beaucoup de méthodes peuvent être appliquées pour estimer directement l'activité antioxydante. La génération de radical libre est directement reliée avec l'oxydation dans les nourritures et les systèmes biologiques. Les méthodes principales comportent le balayage des radicaux de superoxyde ( $O_2^{\cdot}$ ); le balayage de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ); le balayage d'acide hypochloreux (HOCl); le balayage du radical d'hydroxyle (OH) ou le balayage du radical de peroxyde (ROO) (**Maamri, 2008**).

La plupart des méthodes sont basées sur l'utilisation de systèmes générant des radicaux très variés. Ce sont principalement des méthodes dites "d'inhibition" dans lesquelles une espèce chimique capable de générer des radicaux libres est utilisée avec une substance capable de détecter ces espèces. L'échantillon dont on souhaite mesurer le pouvoir antioxydant est capable d'inhiber la génération des radicaux. Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il n'existe pas de méthode unique qui permettrait de refléter le profil antioxydant d'un échantillon. C'est pourquoi, on effectue différents tests de mesure de pouvoir antioxydant (**Belkheiri, 2010**).

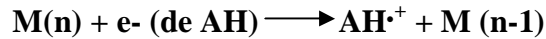
Les antioxydants peuvent réagir à différentes étapes du procédé d'oxydation et ils peuvent avoir plus d'un mécanisme d'action, ce qui ne facilite pas leur classification (**Frankel et Meyer, 2000**).

Selon **Huang et al, (2005)**, les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante in vitro peuvent être divisées en deux grandes catégories suivant les réactions mises en jeu :

Les tests basés sur le transfert d'un atome d'hydrogène (HAT, Hydrogen Atom Transfer), dans lequel l'antioxydant et le substrat sont en compétition pour les radicaux peroxydes  $ROO^{\cdot}$ :



Les tests basés sur le transfert d'un électron (SET, Single Electron Transfer), dans le cadre desquels on mesure la capacité d'un antioxydant à réduire un oxydant, qui change de couleur quand il est réduit :



Il existe de nombreuses méthodes de mesure de l'activité antioxydante (**Diouf et al, 2006**).

## 2. Méthodes de piégeage des radicaux libres oxygénés

### 2.1. Piégeage du radical superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )

Cet essai évalue la capacité d'un produit à capturer un radical libre, l'anion superoxyde  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Ce radical est généré *in vitro* par le système hypoxanthine/xanthine oxydase. Dans cette méthode, le radical réduit le  $\text{NBT}^{2+}$  (Nitro-Blue Tétrazolium) de couleur jaune, en bleu de formazan de couleur pourpre qui absorbe à 560 nm.

Ainsi un composé anti-oxydant capable de capturer l'anion superoxyde empêchera la formation du bleu de formazan et la solution restera jaune. Les absorbances obtenues permettent de calculer un pourcentage d'inhibition de la réduction du  $\text{NBT}^{2+}$  par rapport à un témoin constitué du milieu réactionnel dépourvu de composé anti-oxydant. On peut ensuite tracer une courbe représentant le logarithme du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en composé testé, et déterminer la  $\text{CI}_{50}$  (concentration inhibant 50% de l'activité) du composé (**Parejo et al, 2002**).

### 2.2. Piégeage du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ scavenging activity)

Une des méthodes les plus communes pour évaluer la capacité du piégeage du peroxyde d'hydrogène est basée sur l'absorption de cette molécule dans le domaine de l'UV. Comme la concentration de  $\text{H}_2\text{O}_2$  diminue par les composés piègeurs la valeur d'absorbance de ce dernier à 230nm diminue également. Néanmoins il est tout à fait normal que les échantillons absorbent également à cette longueur d'onde, exigeant ainsi l'exécution d'une mesure blanche (**Malgalhaes et al, 2008**).

### 2.3. Piégeage du radical hydroxyle ( $\text{HO}^{\cdot}$ )

La capacité des substances à piéger le radical hydroxyle est souvent évaluée par le pourcentage d'inhibition de la réaction du radical  $\text{OH}^{\cdot}$  avec une molécule détectrice. (**Clement et Armstrong, 1972**). Les molécules détectrices utilisées dans la littérature, sont nombreuses. On peut citer le désoxyribose (**Halliwell et al, 1987**), la dopamine (**Slivka et Cohen, 1985**), la thymine (**Hicks et Gebick, 1986**), la 4- nitrosodiméthylaniline (**Kraljic et Yrumbore, 1965**), etc...

Le radical hydroxyle est produit par réaction entre le fer ( $\text{Fe}_2^+$ / EDTA) et le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en présence d'acide ascorbique. Le désoxyribose, par action du radical hydroxyle, va être dégradé en malondialdéhyde (MDA) (**Cheeseman et al, 1988**) dont l'apparition est suivie par réaction avec l'acide thiobarbiturique (TBA). Le produit ainsi formé

est détectable par une mesure d'absorbance à 532 nm. La capture du radical (HO•) par la substance à étudier, se fait par compétition avec le désoxyribose. Ainsi une diminution de la quantité du chromogène formé est observée se traduisant par une diminution de l'absorbance (**Read et Randat, 1988**).

## 2.4. Piégeage du radical peroxy (ROO•)

La mesure de l'ORAC (Oxygen-Radical Absorbance Capacity) développée par **Cao et al, 1993** est une méthode simple et reproductible permettant d'évaluer la capacité antioxydante de différentes molécules (**Benderitter et al, 2003**). La  $\beta$ -PE (Porphyrinium cruentum  $\beta$  Phycoerythrin ou Phycoérythrine) est une protéine fluorescente extrêmement sensible au stress oxydatif. En présence d'AAPH [(2,2'-azobis(2-amidinopropane)dichloride), un donneur du radical peroxy], la structure tétramérique de la  $\beta$ -PE est modifiée, elle se dimérise. Cette dimérisation dépendante de la concentration en radicaux peroxy du milieu réactionnel peut être suivie en mesurant la décroissance de la fluorescence de la  $\beta$ -PE en fonction du temps. Cette cinétique de décroissance de la fluorescence est directement liée à la concentration de radicaux libres présents dans le volume réactionnel dans ces conditions définies de temps et de concentrations de la  $\beta$ -PE est d'AAPH.

## 3. Méthodes de piégeage des radicaux stables et évaluation de leur capacité de réduction

### 3.1. Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•)

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ( $\alpha,\alpha$ -diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques (**Blois, 1958 ; Brand-Williams et al, 1995**). La réduction du radical DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517nm provoquée par la présence des extraits phénoliques. Le DPPH est initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie. Cette décoloration est représentative de la capacité des composés phénoliques à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques. Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir antiradicalaire direct de différentes substances phénoliques des extraits (**Molyneux, 2004**).

### 3.2. Piégeage du ABTS (2,2'-azynobis-[3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonic acid])

Dans la méthode TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), l'activité antioxydante totale d'une molécule est déduite de sa capacité à inhiber le radical ABTS<sup>•+</sup>, obtenu à partir de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) comparativement à un antioxydant de référence : le Trolox® (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique), dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E. L'obtention du radical cation résulte du contact de l'ABTS avec une enzyme de peroxydation (peroxydase metmyoglobine (**Miller et Rice-**

**Evans, 1997**) ou horseradish peroxidase) (**Arnao et al., 2001**) en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou d'un oxydant (dioxyde de manganèse (**Benavente-Garcia, 2000 ; Miller et al, 1996**) ou persulfate de potassium (**Re et al, 1999**). Le radical ABTS<sup>•+</sup>, en contact avec un donneur de H<sup>•</sup> conduit à l'ABTS<sup>+</sup> et à la décoloration à 734 nm de la solution (**Lien et al, 1999**).

D'autres auteurs utilisent l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), ou ABTS<sup>•-</sup>, à la place de son sel d'ammonium et analysent l'inhibition du radical ABTS<sup>•-</sup>, produit par un initiateur de radicaux thermolabiles, l'ABAP (2,2'-azobis-(2-amidinopropane)HCl) (**Van Den Berg et al, 2000**). La cinétique de réaction de l'antioxydant étudié doit être examinée préalablement pour déterminer la fin de réaction. La capacité antioxydante en équivalent Trolox® (TEAC) correspond à la concentration (mmole/l ou mg/l) de Trolox® ayant la même activité qu'une même concentration unitaire de substance à tester, jus de fruit par exemple (**Miller et Rice-Evans, 1997**).

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

Comme son nom l'indique, cette technique a été développée pour mesurer la capacité du plasma à réduire le fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) en fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>). En effet le Fe<sup>3+</sup> participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. Le Fe<sup>2+</sup> à un pH faible forme un complexe avec la 2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-s-triazine (TPTZ) de couleur bleue qui a une absorption maximale à 594 nm. Ainsi, la formation de ce complexe indiquera un pouvoir réducteur et déterminera la capacité d'un composé à se comporter comme un anti-oxydant. Les valeurs sont obtenues par comparaison de l'absorbance à 594 nm du mélange réactionnel contenant l'échantillon à tester avec celle d'un mélange réactionnel contenant une concentration connue en Fe<sup>2+</sup> (**Benzie et Strain, 1996 ; Pulido et al, 2000**). Ce test nous servira à évaluer l'activité anti-oxydante des composés purs uniquement.

## **4. Activité antioxydante par la méthode de décoloration du bêta-carotène (β-carotene bleaching method)**

Cette technique de spectrophotométrie dans l'ultraviolet a initialement été développée par **Marco (1968)**, puis légèrement modifiée par **Miller (1971)**. Elle consiste à mesurer, à 470 nm, la décoloration du β-carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique. La dispersion de l'acide linoléique et du β-carotène dans la phase aqueuse est assurée par du Tween. L'oxydation de l'acide linoléique est catalysée par la chaleur (50 °C) de manière non spécifique. L'addition d'antioxydants purs (**Von Gadow et al, 1997**) ou sous forme d'extraits végétaux (**Moure et al, 2000 ; Koleva et al, 2001**) induit un retard de la cinétique de décoloration du β-carotène. Cette méthode est sensible, rapide et simple s'agissant d'une mesure spectrophotométrique dans le visible. Elle présente également l'avantage de pouvoir être couplée à la chromatographie sur couche mince (**Pratt et Miller, 1984**). Après séparation chromatographique, un mélange de β-carotène et d'acide linoléique est pulvérisé sur la plaque, celle-ci étant alors exposée plusieurs heures à la lumière du jour ou aux UV jusqu'à décoloration du fond jaune. Les bandes où la couleur jaune persiste, indiquent la présence de substances antioxydantes.

Cependant, l'oxydation induite par voie thermique est non contrôlée et donc non spécifique, ce qui conduit bien souvent à une variabilité des résultats. Pour contourner ce problème, certains auteurs ont remplacé la chaleur par des agents oxydants conduisant à des résultats plus reproductibles, comme l'AAPH (**Parejo et al, 2003**) ou la lipoxygénase de soja (**Chaillou et Nazareno, 2006**). Cette méthode est d'autre part sujette au parasitage de composés absorbants dans la fenêtre spectrale du  $\beta$ -carotène. **Frankel (1998)** a également critiqué l'utilisation d'acides gras libres qui ne représentent pas des modèles lipidiques réalistes. Enfin, l'interprétation des données n'est pas aisée car le  $\beta$ -carotène est lui-même un antioxydant, sensible à l'oxygène de surcroît.

## Chapitre IV : Etude botanique de *Myrtus communis* L.

### 1. La famille des Myrtacées

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

Selon **Quezel et Santa (1963)**, les Myrtacées sont des plantes à feuilles entières, opposées. Fleurs axillaires hermaphrodites. Calice cupuliforme. Etamines très nombreuses, insérées avec les pétales au sommet du tube calycinal. Gynécée infère ou semi- infère à 5 carpelles uniloculaires, à ovules nombreux, à placentation axile. Fruits bacciformes bleuâtres globuleux, de 5-8 mm de diamètre.

### 2. *Myrtus communis* L.

#### 2.1. Description botanique

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



**Photo 1 : *Myrtus communis* L.**

C'est un arbuste de un à deux mètres de hauteur ; en buissons denses d'un vert brillant. Il se remarque par ses fleurs blanches très ouvertes et ses nombreuses étamines en touffe ébouriffée. Son odeur aromatique forte et particulière est l'un de ses traits de caractère.

La plante renferme de nombreuses poches sécrétrices surtout au niveau des feuilles. Ces dernières sont ovoïdes lancéolées, 2 à 3 fois plus longue que larges, à nervation pennée persistantes, opposées, à très court pétiole, coriaces et d'un vert brillant.

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

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

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



**Photo 2 : Les feuilles**



**Photo 3 : Les tiges**



**Photo 4 : Les fruits**

## 2.2. Position systématique

<b>Règne :</b>	Plantae
<b>Sous-règne :</b>	Eucaryotes
<b>Embranchement :</b>	Spermaphytes
<b>Sous-embranchement :</b>	Angiospermes
<b>Classe :</b>	Dicotylédones
<b>Ordre :</b>	Myrtales
<b>Famille :</b>	Myrtaceae
<b>Genre :</b>	Myrtus
<b>Espèce :</b>	<i>Myrtus Communis</i> L. (Quezel et Santa, 1963).

**Nom vernaculaire :** Rayhan, Mersin

## 2.3. Utilisation médicinale et traditionnelle

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

## 2.4. Aspect économique

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

## 2.5. Travaux antérieurs

Nous reprenons, ci-dessous, les principaux travaux relatifs à l'étude des composés phénoliques du Myrte commun.

Les premières études sur les composés phénoliques ont été réalisées en 1967 par El-Sissi et El-Ansary et concernent l'analyse des flavonoïdes contenus dans les feuilles.



En 1987, **Diaz et Abeger** analysent les composés phénoliques simples et principalement les flavonoïdes et les acides phénoliques contenus dans les feuilles du myrte. Après extraction au méthanol, l'extrait est passé dans une colonne ouverte pour l'isolement des molécules. Les fractions ainsi récoltées sont soumises à des études chromatographiques, spectrophotométriques et spectrofluométriques.

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

**Romani et al (1999)** ont étudié la composition des polyphénols extraits au solvant (éthanol à 70 %) à partir des feuilles du myrte. L'extrait est purifié puis l'analyse qualitative et quantitative se fait par CLHP-DAD et CLHP/SM. Les principaux composés identifiés sont donnés dans la figure 16.

Récemment, en 2006a, **Montoro et al**, ont travaillé sur la stabilité et l'activité antioxydante des polyphénols extraits des baies du myrte pour la préparation des liqueurs en Sardaigne et en Italie. Ils ont dosé les flavonoïdes et les anthocyanes par CLHP-UV-VIS et l'identification par LC/SM-ESI (couplage de la chromatographie en phase liquide à la spectrométrie de masse en mode ionisation : Electrospray), en se plaçant à deux longueurs d'ondes caractéristiques de ces deux classes de composés polyphénoliques à savoir 350 nm et 520 nm. La macération s'est déroulée en laissant les baies au contact de l'éthanol à 70% pendant 40 jours. Ils ont pu identifier 14 composés, parmi lesquels 8 anthocyanes et 6 flavonoïdes dont les majoritaires sont représentés dans la figure 16.

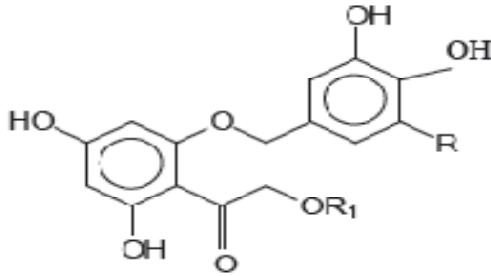
**Montoro et al. (2006b)** utilisent différentes techniques pour l'identification (RMN et LCES/ MS) et la quantification (CLHP-UV-VIS en utilisant des standards internes) des anthocyanes présents dans les baies du myrte.

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

Ø Flavonols simples et glycosides (Romani et al, 1999).

Flavanols

myricétine-3-O-galactoside, R=OH, R<sub>1</sub>=galactose



myricétine-3-O-arabinoside, R=OH, R<sub>1</sub>=arabinoose

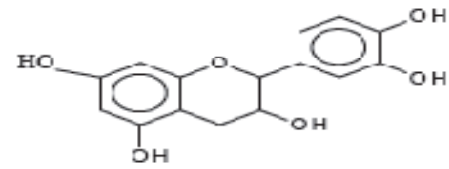
myricétine-3-O-rhamnoside, R=OH, R<sub>1</sub>=rhamnose

quercétine-3-O-rhamnoside, R=H, R<sub>1</sub>=rhamnose

quercétine-3-O-glucoside, R=H, R<sub>1</sub>=glucose

myricétine, R=OH, R<sub>1</sub>=H

quercétine, R=H, R<sub>1</sub>=H



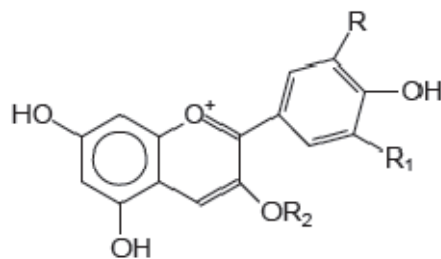
isomères :

catéchine, R=H

épicatéchine, R=H

épigallocatechine, R=H

Ø Anthocyanes (Montoro et al, 2006a).



delphinidine-3-O-glucoside, R=R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=glucose

pétunidine-3-O-glucoside, R=OH, R<sub>1</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=glucose

cyanidine-3-O-glucoside, R=OH, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=glucose

paéonidine-3-O-glucoside, R=OCH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=glucose

malvidine-3-O-glucoside, R=R<sub>1</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=glucose

delphinidine-3-O-arabinoside, R=R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=arabinoose

pétunidine-3-O-arabinoside, R=OH, R<sub>1</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=arabinoose

malvidine-3-O-arabinoside, R=R<sub>1</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=arabinoose

Figure 16 : Structures des anthocyanes, des flavonols simples et glycosides et des flavanols.

Deuxième partie  
Matériel et Méthodes

## 1. Matériel végétal

La plante étudiée *Myrtus communis* L., a été récolté durant le mois de décembre 2009 jusqu'au février 2010 dans la région de Honaine à environ 69 Km au nord de la wilaya de Tlemcen (Figure 17). Les paramètres géographiques de cette région sont représentés dans le tableau 2.

**Tableau 2 :** Situation géographique (www. Google.com)

Station	Altitude	Latitude	Longitude	Etage biochimique
Honaine	380 m	35° 0,5' N	1° 27' W	Semi-aride à hivers frais

Les différents organes du matériel végétal (feuilles, tiges, fruits) ont été séchés à l'ombre et à l'abri de l'humidité à température ambiante pendant quelques jours. Une fois séchées les trois parties de la plante ont été réduites en poudre puis soumises à l'extraction.



**Figure 17 :** Carte géographique de la région de Tlemcen (www. Google.com)

★ : Station de récolte

## 2. Tests phytochimiques

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

Dans un ballon monocol, surmonté d'un réfrigérant, 10 g de matériel végétal est mis en présence de 60 ml d'eau. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Ensuite, le mélange est filtré et l'extrait aqueux est soumis aux tests suivants (Figure 18) :

#### 2.1.1. Amidon

Le test effectué consiste :

- Chauffer 5 ml de l'extrait aqueux avec 10 ml d'une solution de NaCl saturée dans un bain-marie jusqu'à ébullition ;
- Ajouter quelques gouttes du réactif d'amidon. (Annexe 1).

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

#### 2.1.2. Saponosides

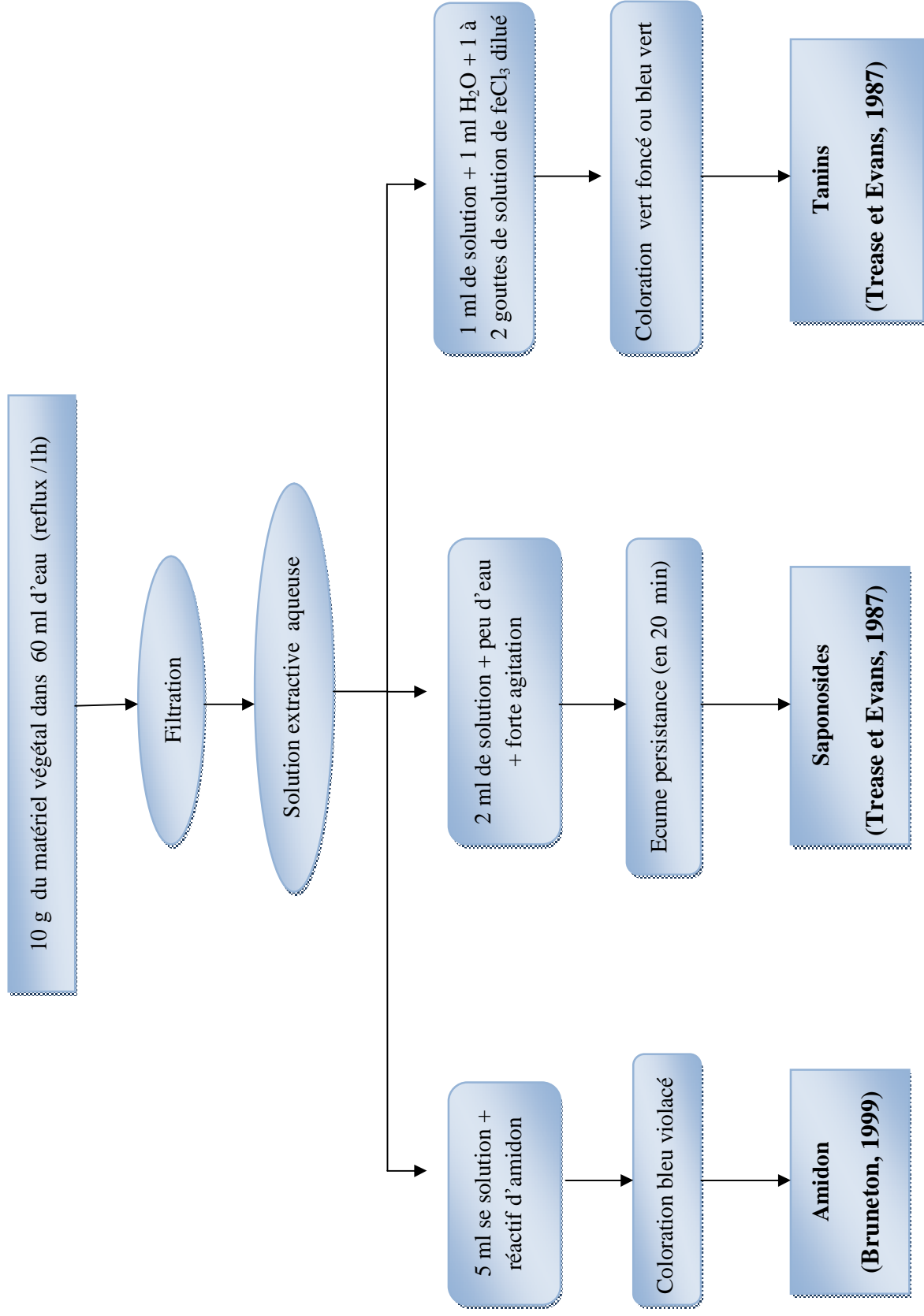
La détection des saponosides est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2 ml de l'extrait aqueux, puis la solution est fortement agitée. Ensuite, le mélange est laissé pendant 20 minutes et la teneur en saponosides est évaluée :

- Pas de mousse = test négatif
- Mousse moins de 1 cm = test faiblement positif
- Mousse de 1-2 cm = test positif
- Mousse plus de 2 cm = test très positif (**Trease et Evans, 1987**)

#### 2.1.3. Tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, 1 ml de l'extrait aqueux, 1 ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de  $\text{FeCl}_3$  diluée. L'apparition d'une coloration vert foncée ou bleu-vert indique la présence des tanins (**Trease et Evans, 1987**)

**Figure 18 : Tests phytochimiques 1**



## **2.2. Epuisement du matériel végétal avec l'éthanol**

Dans un ballon monocol, surmonté d'un réfrigérant, 10 g de matériel végétal est mis en présence de 60 ml d'éthanol. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Ensuite, le mélange est filtré et l'extrait éthanolique est soumis aux tests suivant (Figure 19) :

### **2.2.1. Flavonoïdes**

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

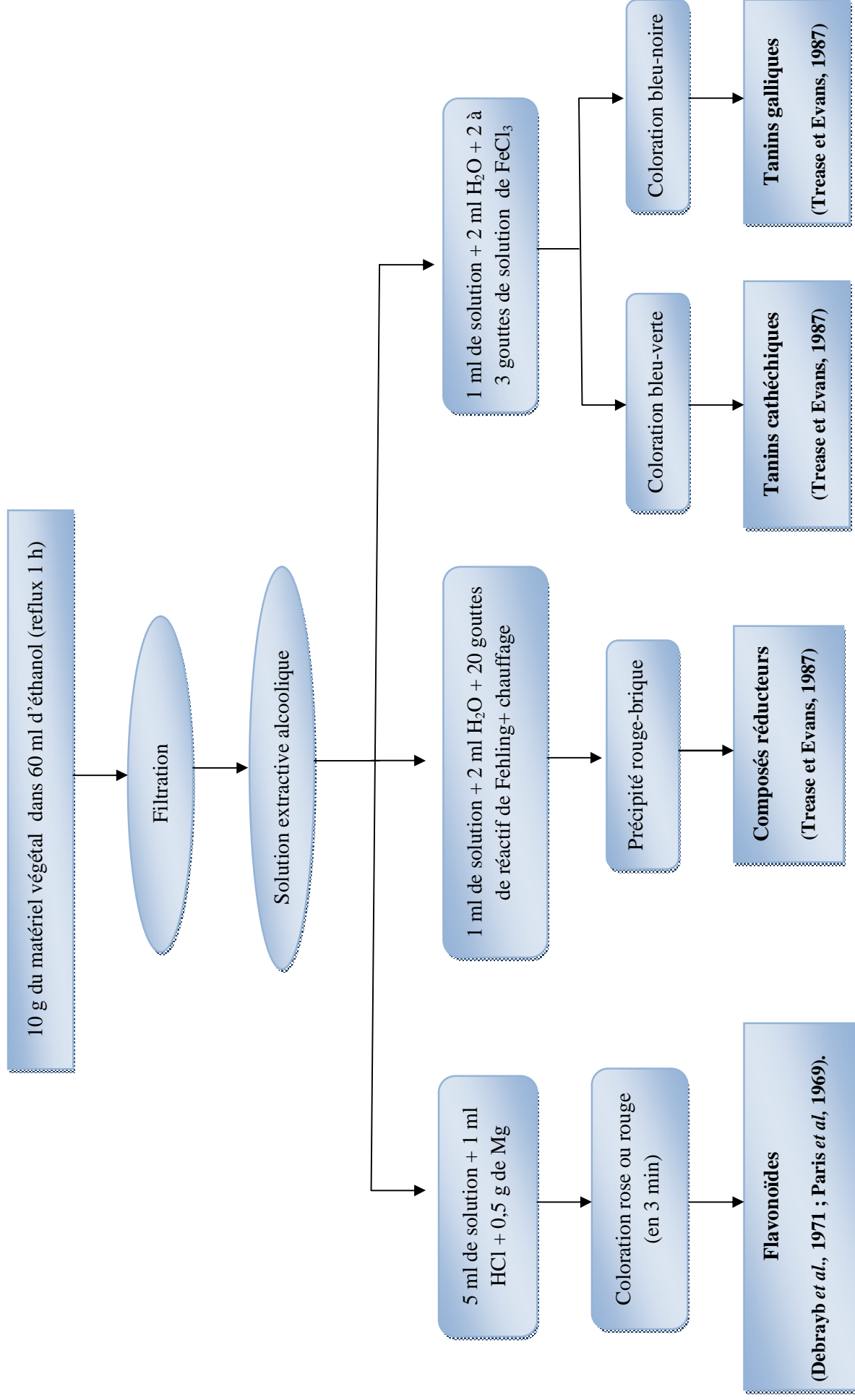
### **2.2.2. Tanins**

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

### **2.2.3. Composés réducteurs**

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

**Figure 19 : Tests phytochimiques 2**





## **2.3. Autres métabolites secondaires**

### **2.3.1. Coumarines**

1 g d'échantillon de la poudre végétal est placé dans un tube à essai en présence de quelque gouttes d'eau distillée. Le tube est recouvert avec un papier imbibé d'une solution de NaOH et porté dans un bain marie pendant quelques minutes. Puis on ajoute 0,5 ml de NH<sub>4</sub>OH dilué (10%) et on va mettre deux taches sur un papier filtre qui sont examinées sous la lumière ultraviolette. La fluorescence des taches confirme la présence des coumarines (Figure 20) (**Rizk, 1982**).

### **2.3.2. Stérols et triterpènes**

Elle se fait sur une macération de 24 h à 5 % dans l'éther. L'extrait éthérique est ensuite évaporé à sec et repris avec de l'anhydride acétique puis du chloroforme. Déposer au fond du tube contenant l'extrait de l'acide sulfurique. En cas de réaction positive il se forme un anneau rouge-brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides, la couche surnageante était verte ou violette (Figure 20) (**Trease et Evans, 1987**).

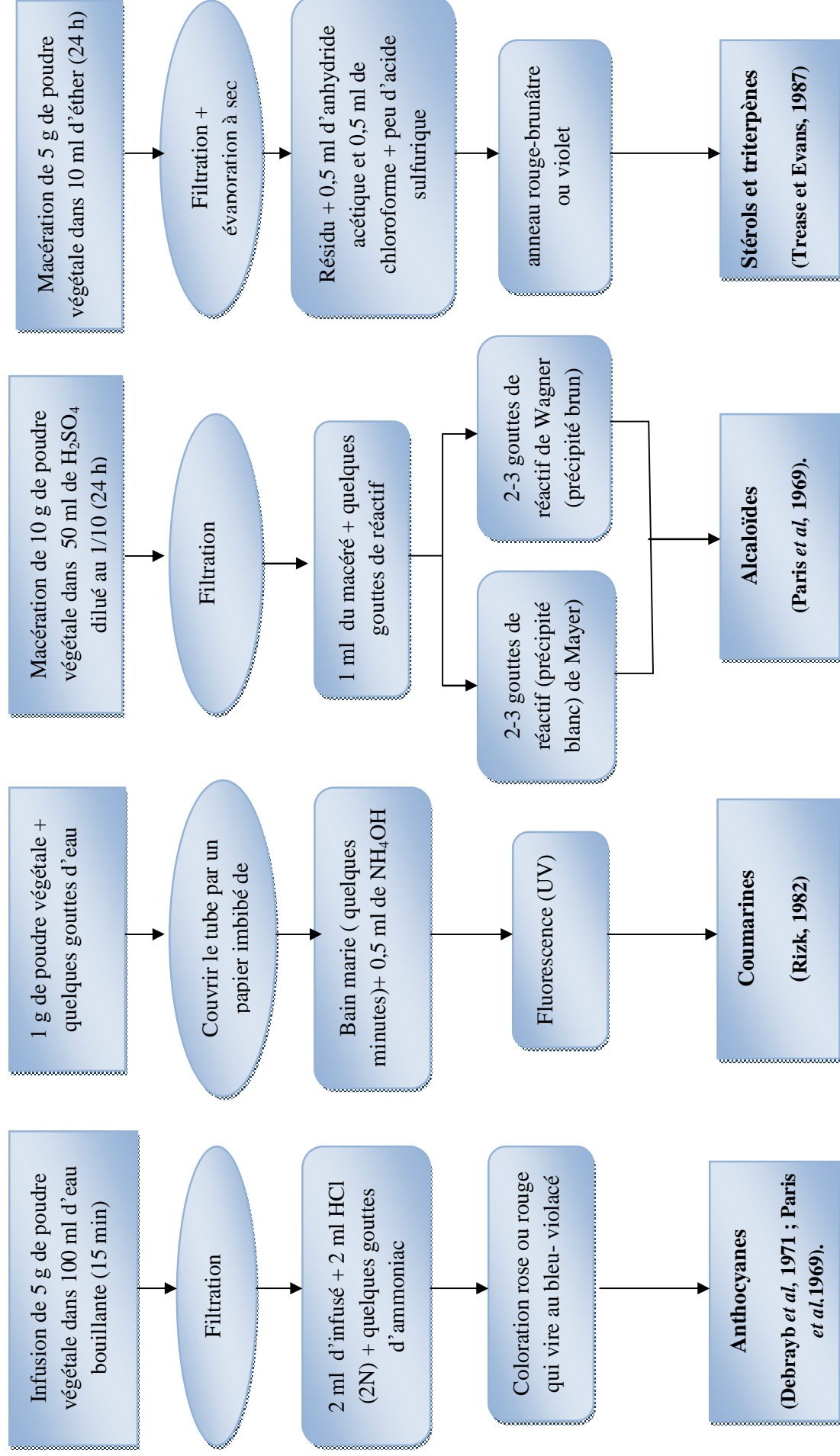
### **2.3.3. Alcaloïdes**

Nous avons procédé à une macération sous agitation pendant 24 h de 10 g de la poudre végétale dans 50 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dilué au 1/10 à la température ambiante du laboratoire. Après filtration sur un papier lavé à l'eau distillée et de manière à obtenir environ 50 ml de filtrat, 1 ml du macéré est introduit dans deux tubes à essai puis 5 gouttes de réactif de Mayer ont été ajouté dans le premier tube et 5 gouttes de réactif de Wagner ont été ajouté dans le deuxième. La présence d'une turbidité ou d'un précipité, après 15 minutes indique la présence d'alcaloïdes (Figure 20) (**Paris et al, 1969**).

### **2.3.4. Anthocyanes**

2 ml d'infusé aqueux sont ajoutés à 2 ml de HCl 2N. L'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu violacé par addition d'ammoniac indique la présence d'anthocyanes (Figure 20) (**Debrayb et al, 1971 ; Paris et al, 1969**).

**Figure 20 : Tests phytochimiques 3**



### 3. Extraction des composés phénoliques

#### 3.1. Préparation des extraits bruts méthanoliques

1g de matériel végétal de chaque partie de la plante (feuille, tige et fruit) est placé dans un erlenmeyer dans 20 ml de méthanol pendant 24 h, après filtration, les solutions méthanoliques sont évaporées à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif type Buchi R-200 à 60°C. Les résidus secs pesés sont repris par 3 ml du méthanol (Figure 21).

Avant l'extraction des différents composés phénoliques, les feuilles de *Myrtus communis* L., vont subir une macération dans le chloroforme pendant 6 heures afin d'éliminer la chlorophylle (Matkowski et Piotrowska, 2006).

#### Ø Calcul des rendements en extraits secs

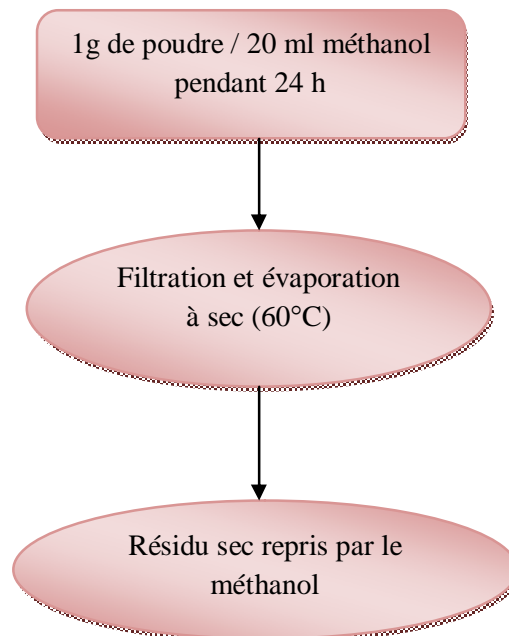
Nous pouvons déterminer le rendement de la plante en extrait sec en calculant le rapport suivant :

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

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

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

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



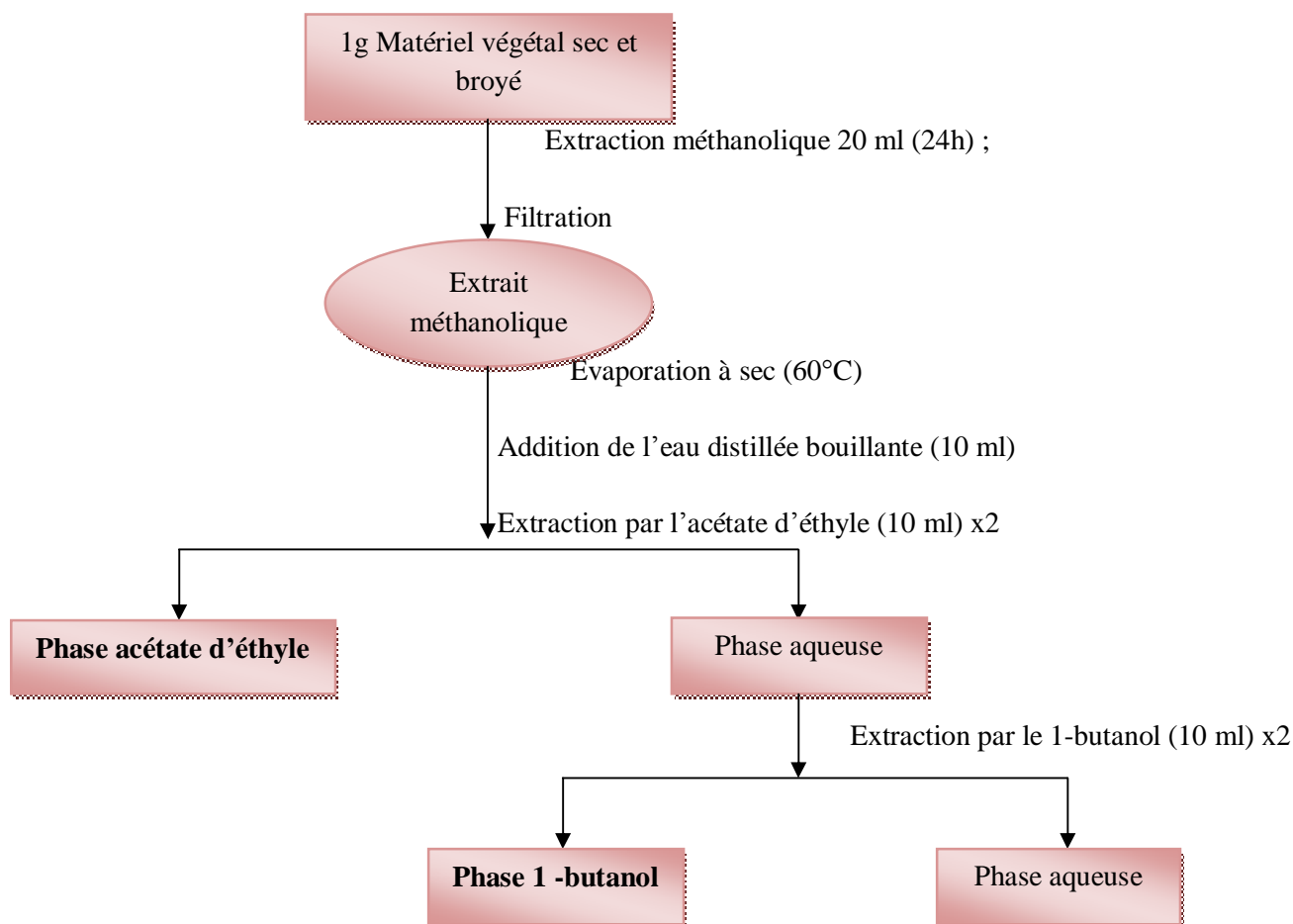
**Figure 21** : Protocole d'extraction des extraits bruts

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

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

Les résidus secs obtenus par évaporation du filtrat méthanolique de chaque partie de la plante étudiée, sont partagés entre 10 ml d'acétate d'éthyle et le même volume d'eau distillée dans une ampoule à décanter. Après agitation et décantation des deux phases, la phase d'acétate d'éthyle est récupérée et la phase aqueuse est à nouveau partagée avec 10 ml d'acétate d'éthyle. La phase d'acétate d'éthyle est récupérée, additionnée à la précédente et séchée par un évaporateur rotatif sous pression réduite à 60°C. Le résidu sec est repris par quelques millilitres de méthanol et conservé à 4°C. Cette fraction est la phase d'acétate d'éthyle.

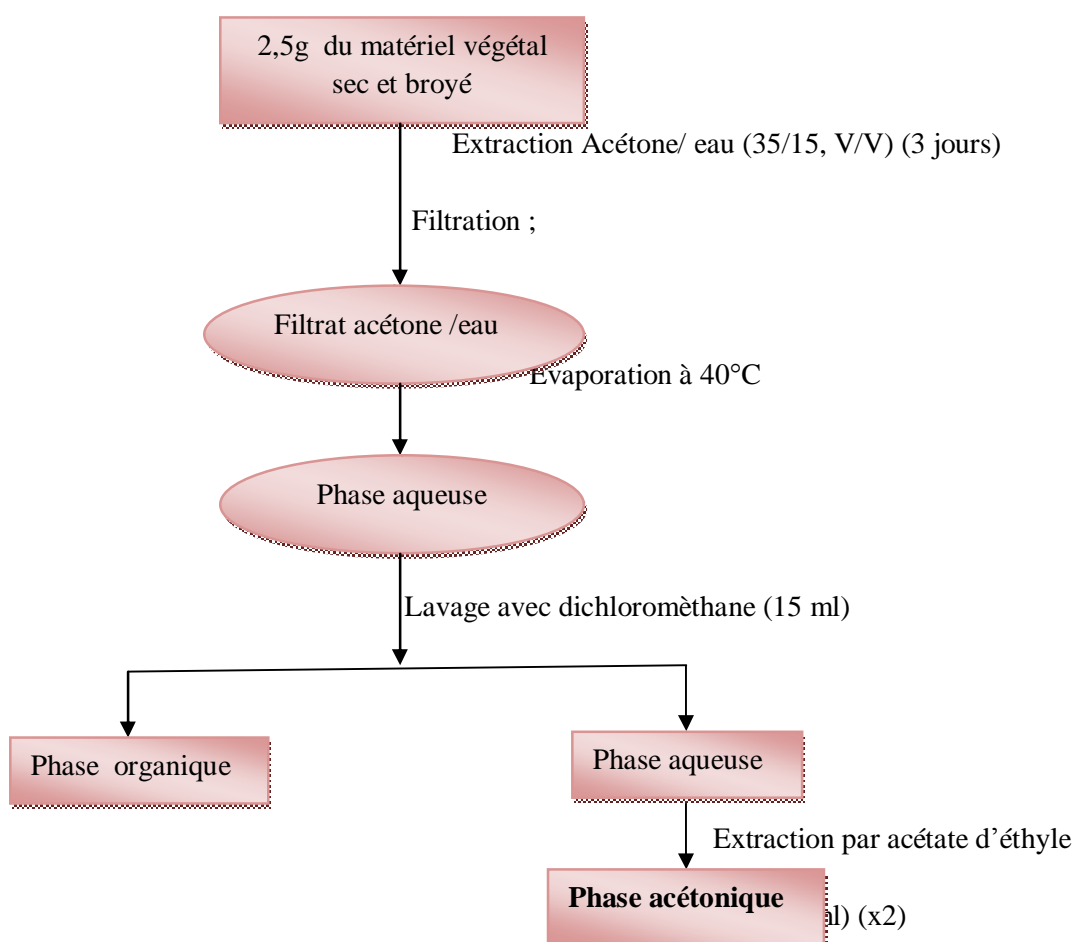
La phase aqueuse issue de l'extraction avec l'acétate d'éthyle est, quant à elle partagée avec 10 ml du 1-butanol. L'opération est répétée deux fois et la phase 1-butanol est séchée au rotavapeur à 60°C. Le résidu sec est repris par quelques millilitres du méthanol et conservé à + 4°C. Cette fraction est la phase butanolique (Figure 22).



**Figure 22 :** Protocole d'extraction des flavonoïdes

### 3.3. Extraction des tanins

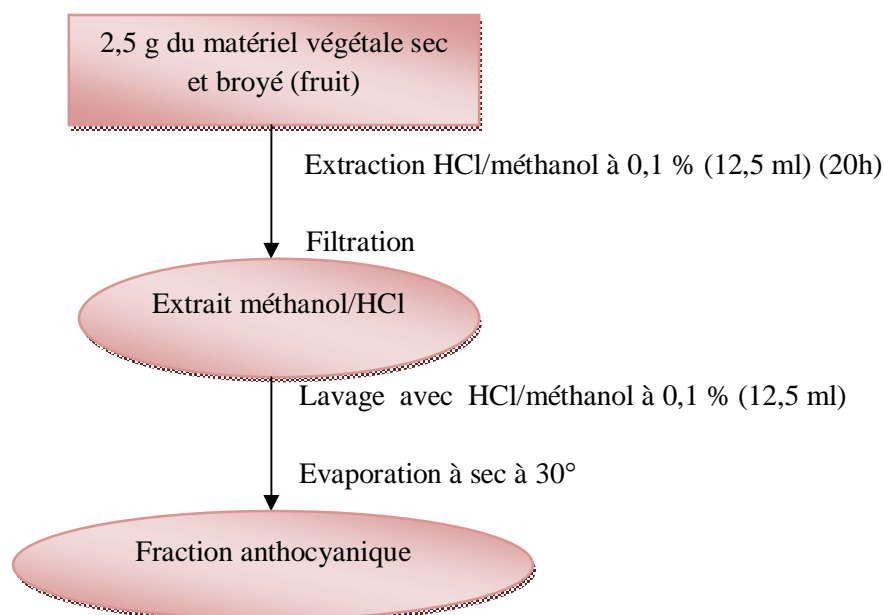
L'extraction des tanins a été effectuée selon la méthode adaptée par **Zhang *et al*, 2008**. 2,5g de poudre de matériel végétal (feuille, tige et fruits) a été extraite par 50 ml du mélange acétone/eau distillée (35/15, V/V) durant trois jours à une température ambiante. La solution est filtrée et évaporée à 40°C par un rotavapeur type buchi r-200 pour éliminer l'acétone puis, la phase aqueuse est lavée par 15 ml de dichlorométhane afin d'éliminer les pigments et les lipides. Après la séparation de la phase organique, la phase aqueuse a été extraite deux fois avec 15 ml d'acétate d'éthyle. Le mélange des deux phases est évaporé à sec à 40°C par un rotavapeur type Buchi R-200 puis pesé et repris par 3 ml de méthanol (Figure 23).



**Figure 23 :** Protocole d'extraction des tanins

### 3.4. Extraction des anthocyanes

L'extraction des anthocyanes a été réalisée selon la méthode décrite par **Longo *et al*, 2007**. Après la mise en évidence des anthocyanes dans les fruits de Myrte, l'extraction a été faite par une macération de 2,5 g des fruits en poudre dans 12,5 ml d'une solution de d'HCl/méthanol (v/v) à 0,1% pendant 20 h à une température ambiante. Après filtration le résidu ainsi obtenu est lavé avec 12.5 ml de d'HCl/méthanol (v/v) à 0,1%, puis l'extrait a été évaporé à sec par un rotavapeur type Buchi R-200 à 30°C. Le résidu sec est repris par 3 ml du méthanol (Figure 24).



**Figure 24** : Protocole d'extraction des anthocyanes

## 4. Dosage des composés phénoliques

### 4.1. Dosage des phénols totaux

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tannins. Le dosage des polyphénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit dès **1965 (Singleton et Rossi)**.

Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (**Ribéreau-Gayon, 1968**). La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 750 nm est

proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux. (**Boizot et Charpentier, 2006**).

#### Ø Mise en œuvre pratique

Un volume de 200 µl de l'extrait brut méthanolique de chaque partie de la plante (feuille, tige, fruit) est introduit dans des tubes à essai, le mélange (1ml du réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois et 0,8 ml de carbonate de sodium à 7.5%) est additionné. Les tubes sont agités et conservés durant 30 minutes à la température ambiante. L'absorbance est mesurée à 765 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre Jenway 6504 UV/VIS.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif.

Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme de la matière végétale sèche. (mg GAE/g).

#### 4.2. Dosage des flavonoïdes :

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode adaptée par **Zhishen et al, (1999)** avec le trichlorure d'aluminium et la soude. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose absorbe dans le visible à 510 nm.

#### Ø Mise en œuvre pratique :

500 µl de l'extrait brut méthanolique de chaque partie de la plante (feuille, tige, fruit) convenablement dilué sont mélangés avec 1500 µl d'eau distillée, suivis de 150 µl de nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub>) à 5%. Après 5 min, 150 µl de trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) à 10% (m/v) est rajouté au mélange. Après 6 min d'incubation à la température ambiante, 500 µl d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4% est additionné. Immédiatement, le mélange est complètement agité afin d'homogénéiser le contenu. L'absorbance de la solution de couleur rosâtre est déterminée à 510 nm contre un blanc.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant de la catéchine comme contrôle positif.

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits de plante étudiée est exprimée en milligramme (mg) équivalent de la catéchine par gramme de la matière végétale sèche (mg EC/g).

#### 4.3. Dosage des tanins :

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode à la vanilline en milieu acide (**Price et al, 1978**). Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré mesuré à 500 nm. La réactivité de la vanilline avec les tanins n'implique que la première unité du polymère. Les quantités des tannins sont estimées en utilisant la méthode de vanilline décrite par **Julkunen-Titto (1985)**.

### Ø Mise en œuvre pratique :

Un volume de 50 µl de l'extrait brut est ajouté à 1500 µl de la solution vanilline/méthanol (4%, m/v) puis mélangé à l'aide d'un vortex. Ensuite, 750 µl de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) est additionné. Le mélange obtenu est laissé réagir à la température ambiante pendant 20 min. L'absorbance est mesurée à 550 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre Jenway 6504 UV/VIS.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant de la catéchine comme contrôle positif.

Les résultats de la plante étudiée sont exprimés en milligramme (mg) équivalent de la catéchine par gramme de la matière végétale sèche (mg EC/g).

### 5. Chromatographie sur couche mince :

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse. Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

Les principaux éléments d'une séparation chromatographique sur couche mince sont:

- La cuve chromatographique : un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche.
- La phase stationnaire : une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant est fixée sur une plaque de verre à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté (plâtre de Paris) l'amidon ou un polymère organique.
- L'échantillon : environ un microlitre (µl) de solution diluée (2 à 5 %) du mélange à analyser, déposé en un point repère situé au-dessus de la surface de l'éluant.
- L'éluant : un solvant pur ou un mélange : il migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon (**Antonot et Marchal, 1998**).

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

$$R_f = d/D$$

**d**: Distance parcourue par le constituant

**D** : Distance parcourue par le front de l'éluant

Le Rf est caractéristique d'une substance donnée pour un éluant déterminé sur un support « phase stationnaire » donné.

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

Le Rf ne dépend pas de la concentration du constituant dans le mélange (**Lagnika., 2005**).



Dans notre travail, nous avons utilisé des plaques de chromatographie sur couche mince de taille 20x20 cm pour la séparation des fractions acétate d'éthyle et 1-butanol.

Après plusieurs essais, nous avons choisi le système d'éluion suivant qui a été réalisé sur une plaque de CCM de gel de silice sur un support en plastique.

Système utilisé : Acétate d'éthyle/ Acide formique/Eau distillée (65 :15 :20) (**Males et Medic-Saric, 2001**).

## **6. Activité antioxydante**

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

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

#### **Ø Mise en œuvre pratique**

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

L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience dans les mêmes conditions opératoires.

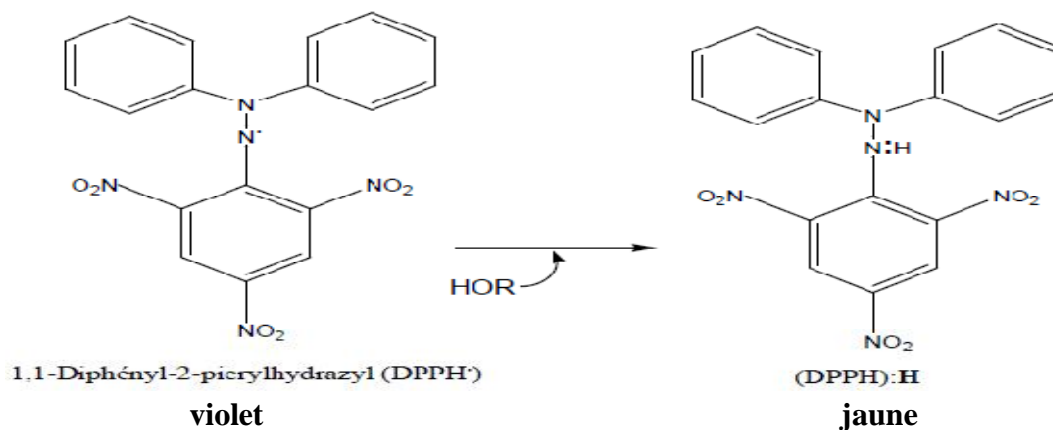
#### **Ø Expression des résultats**

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

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

Le DPPH• (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH•

est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH<sup>•</sup>, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon (Figure 25). (Parejo *et al*, 2002).



**Figure 25 :** Réaction d'un donneur d'hydrogène (antioxydant) avec le radical DPPH<sup>•</sup>

### Ø Mise en œuvre pratique

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

Un volume de 50 µl de différentes concentrations de chaque extrait est ajouté à 1,950 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,025 g/l) fraîchement préparée. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 50 µl du méthanol avec 1950 ml d'une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée. Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à la température ambiante la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

### Ø Expression des résultats :

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

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

$$I \% = ((Ac-At)/Ac)*100$$

**Ac** : absorbance du contrôle ;

**At** : absorbance du test effectué

### **ü Calcul des IC<sub>50</sub> :**

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

Troisième partie  
Résultats et Discussion

## 1. Screening phytochimique

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur différents extraits préparés à partir des feuilles, des tiges et des fruits de *Myrtus communis* L. en utilisant des solvants de polarité différente et des réactifs spécifiques de révélation.

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux de notre plante. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité, un changement de couleur spécifique ou un examen sous la lumière ultraviolette.

Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques réalisés sur le matériel végétal broyé de différentes parties de *Myrtus communis* L. mentionnés dans le tableau 3, montrent la présence des flavonoïdes, des tanins, des stérols et triterpènes dans les fruits, les tiges, et les feuilles ainsi que la présence des anthocyanes que dans les fruits avec des intensités variables.

La mise en évidence des flavonoïdes dans l'extrait éthanolique de trois parties de la plante est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge intense en contact avec la tournure de magnésium

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

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

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

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

On remarque aussi la présence des saponosides dans les tiges et les fruits mais avec une quantité faiblement importante ainsi l'absence totale des alcaloïdes, d'amidon, des composés réducteurs dans les trois parties de la plante.

**Tableau 3** : Résultats des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques recherchés dans la poudre de différentes parties de la plante.

Recherche de		Feuilles	Tiges	Fruits
Extrait aqueux	Amidon	-	-	-
	Saponosides	-	+	+
	<b>Tanins</b>	+++	+++	+++
Extrait éthanolique	<b>Flavonoïdes</b>	+++	+++	+++
	<b>Tanins</b>	+++	+++	+++
	Composés réducteurs	-	-	-
	Alcaloïdes	-	-	-
	Coumarines	-	+	-
	<b>Stérols et triterpènes</b>	+++	+++	+++
	<b>Anthocyanes</b>	-	-	+++

Réaction fortement positive : +++  
 Réaction moyennement positive : ++

Réaction faiblement positive : +  
 Réaction négative : -

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

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

## 2. Les rendements en extraits secs

Les extractions des différents composés phénoliques les plus abondant dans notre plante nous a permis de calculer le rendement de chaque extrait notamment les extraits bruts méthanoliques, les flavonoïdes (fraction acétate d'éthyle et 1-butanol), les tanins et les anthocyanes. Le rendement qui a été déterminé par rapport à 100 g de matériel végétal sec et broyé est exprimé en pourcentage. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 4:

**Tableau 4** : Les rendements en extraits obtenus à partir des trois parties de la plante

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

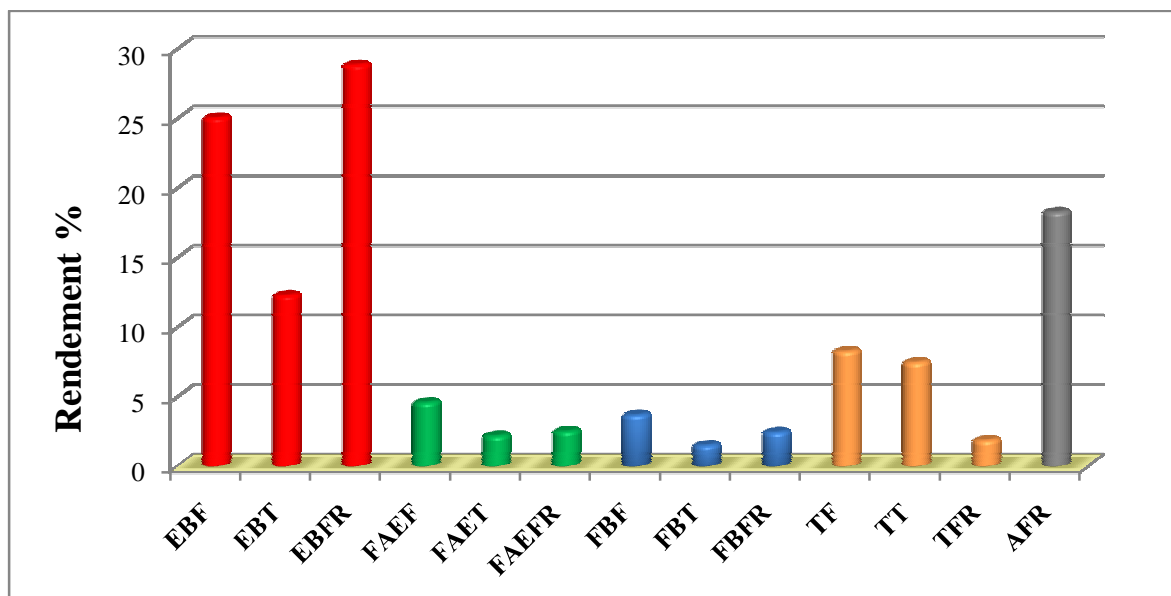
Les résultats obtenus pour les extraits bruts méthanoliques, montrent que le rendement le plus élevé est celui de l'extrait brut des fruits de *Myrtus communis* L. (28,83%) suivi des feuilles (25,03%) et des tiges (12,27%).

Cependant nous avons remarqué que le rendement en extrait sec des anthocyanes des fruits est celui le plus élevé par rapport aux autres composés phénoliques des trois parties de la plante, notamment les flavonoïdes et les tanins (18,26%).

Nous avons observé aussi que le rendement trouvé dans l'extraction des tanins est plus important dans les feuilles (8,26%) suivi des tiges et des fruits, (7,46%) et (1,86%) respectivement.

De même la fraction acétate d'éthyle des feuilles dans l'extraction des flavonoïdes a donné un meilleur rendement par rapport aux autres parties de la plante. Les résultats obtenus de chaque partie sont donnés par l'ordre décroissant suivant : feuilles > fruits > tiges qui sont de l'ordre de 4,58 ; 2,51 et 2,18 % respectivement dans la fraction d'acétate d'éthyle et 3,68 ; 2,44 et 1,50 % respectivement dans la fraction 1-butanol.

Les différents rendements illustrés dans la figure 26 viennent confirmer les intensités des résultats des tests phytochimiques et nous pouvons dire que l'extrait brut des fruits est essentiellement constitué d'anthocyanes par rapport aux autres composés phénoliques notamment les flavonoïdes et les tanins.



**Figure 26 :** Rendements en extraits obtenus à partir des trois parties de la plante

**EBF :** extrait brut feuille

**FAEF :** fraction acétate d'éthyle feuille

**FBF :** fraction butanolique feuille

**TF :** tanin feuille

**AFR :** anthocyane fruit

**EBT :** extrait brut tige

**FAET :** fraction acétate d'éthyle tige

**FBT :** fraction butanolique tige

**TT :** tanin tige

**EBFR :** extrait brut fruit

**FAEFR :** fraction acétate d'éthyle fruit

**FBFR :** fraction butanolique fruit

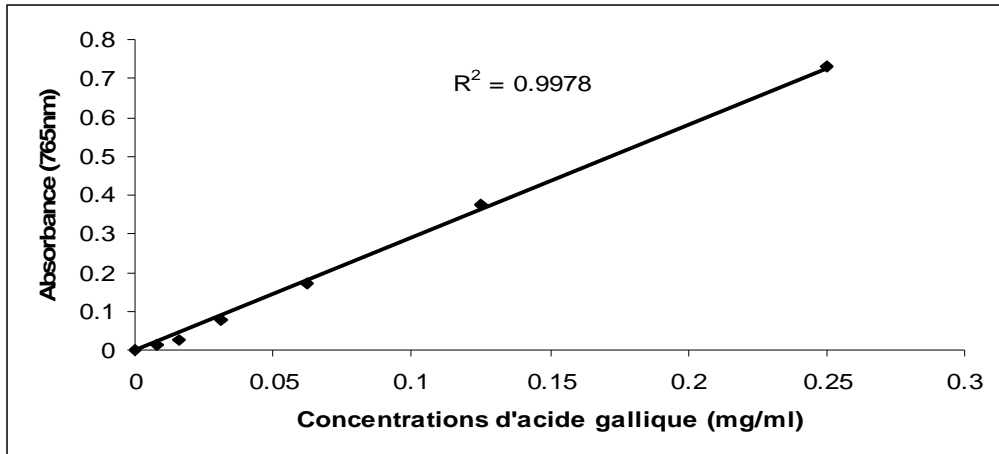
**TFR :** tanin fruit



### 3. Dosage des phénols totaux

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

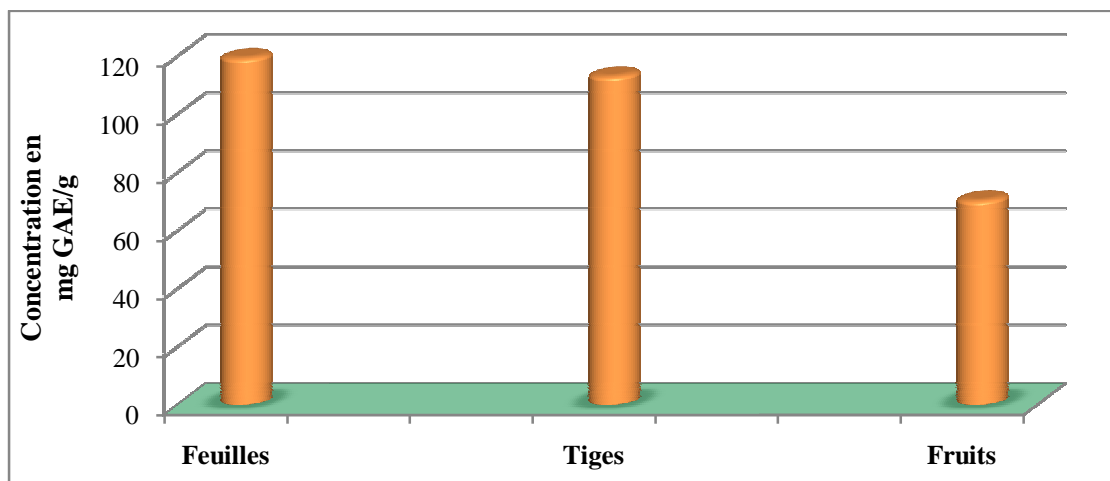
Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg GAE/g), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique. (Figure 27)



**Figure 27** : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.

Pour les trois parties de la plante étudiée *Myrtus communis* L nous avons remarqué une variabilité des teneurs en phénols totaux (La figure 28). La teneur la plus élevée est constatée dans les feuilles, elle est de l'ordre de  $119,23 \pm 0,77$  mg GAE/g suivi par les tiges avec une teneur de  $112,96 \pm 0,53$  mg GAE/g, puis les fruits avec une teneur de  $70,26 \pm 0,71$  mg GAE/g.

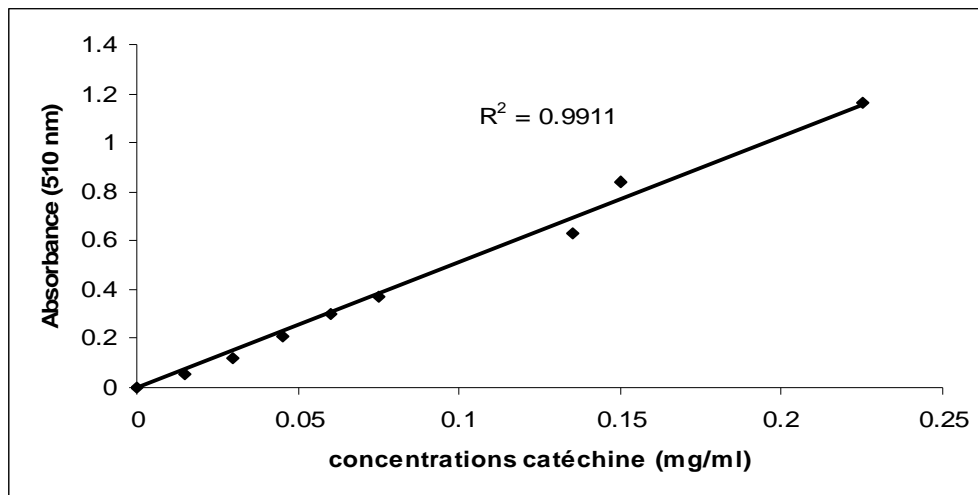
Ces résultats importantes reflètent les données trouvés dans la figure 26 où nous avons enregistré des rendements élevés des extraits bruts ce qui prouve la richesse de chaque partie de la plante en polyphénols à savoir les flavonoïdes, les tanins et les anthocyanes.



**Figure 28** : Teneurs en phénols totaux pour les trois parties de la plante étudiée

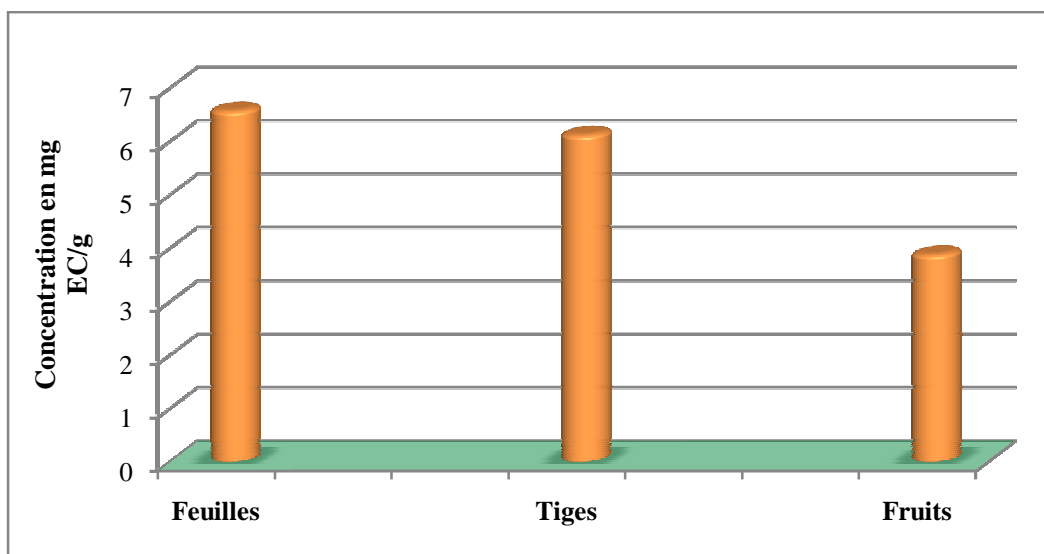
#### 4. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la méthode colorimétrique décrite par **Zhishen *et al*, (1999)**. La catéchine considérée comme contrôle positif a permis de réaliser une courbe d'étalonnage, d'où on a calculé la teneur en flavonoïdes des différentes parties de la plante qui est exprimé en mg équivalent de catéchine (EC) par gramme de matière végétale sèche. (Figure 29).



**Figure 29** : Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

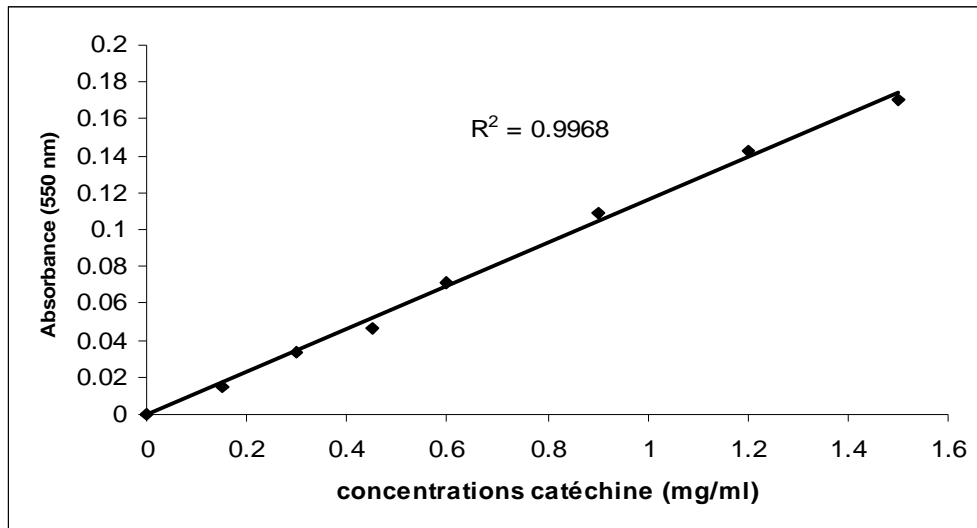
D'après l'histogramme illustré dans la figure 30, nous avons observé des teneurs rapprochées en flavonoïdes dans les parties feuilles et tiges, elles représentent une valeur de  $6,56 \pm 0,57$  et  $6,11 \pm 0,30$  mg EC/g respectivement, suivis par les fruits avec une teneur de  $3,87 \pm 0,25$  mg EC/g.



**Figure 30** : Teneurs en flavonoïdes pour les trois parties de la plante étudiée

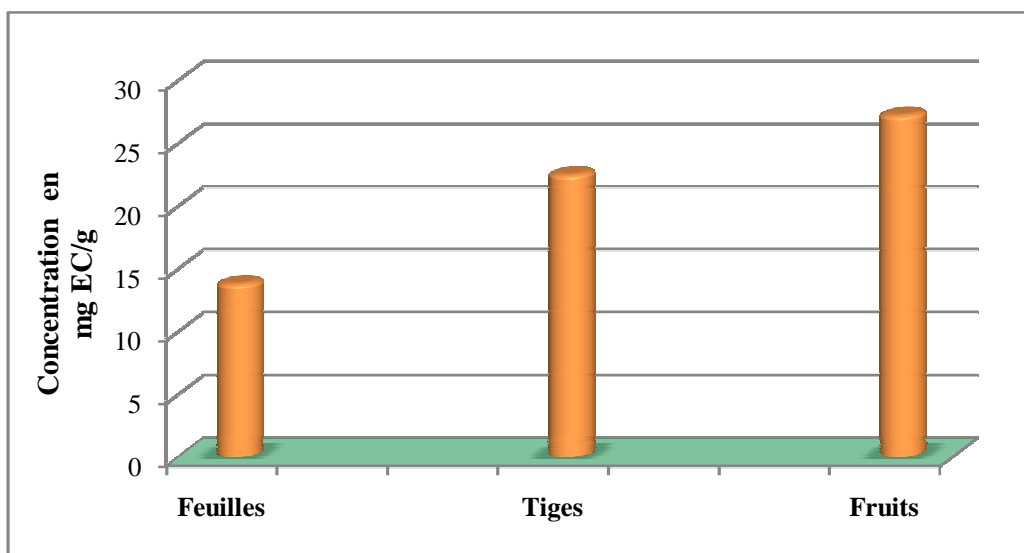
## 5. Dosage des tanins

La quantification des tanins a été effectuée par une méthode adaptée par **Zhang et al (2008)**. Une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant de la catéchine comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) équivalent de la catéchine par gramme de la matière végétale sèche (mg EC/g). (Figure 31)



**Figure 31 :** Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins.

Comme le montre l'histogramme dans la figure 32 les concentrations des tanins sont classées comme suit : fruits > tiges > feuilles qui sont de l'ordre de  $27,20 \pm 1,086$  ;  $22,47 \pm 0,70$  et  $13,78 \pm 0,89$  mg EC/g respectivement dont nous avons remarqué que la teneur enregistrée dans les fruits est la plus importante.



**Figure 32 :** Teneurs en tanins pour les trois parties de la plante étudiée

La quantité en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins est variable entre les différentes parties de *Myrtus communis* L. Les tiges et les fruits étaient particulièrement riches en tanins par rapport aux feuilles qui représentent une teneur moyennement faible, tandis que les fruits apparaissent pauvres en flavonoïdes par rapport aux tiges et feuilles qui présentent des teneurs plus ou moins importantes.

Une étude faite par **Wannes et al, (2010)** montre que la teneur des phénols totaux la plus élevée est remarquée dans les feuilles de *Myrtus communis var. italica* (33,67 mg GAE/g) suivi des fleurs (15,70 mg GAE/g) puis des tiges (11,11 mg GAE /g). Un autre travail réalisé par **Amensour et al, 2009** qui ont trouvé une valeur de 31,2 mg GAE/g dans les feuilles de Myrte du Portugais. Ces teneurs sont inférieures à nos résultats, par contre la teneur des phénols totaux des feuilles de Myrte de la Grèce est nettement supérieur par rapport a notre plante, elle est de l'ordre de 373 mg GAE/g (**Chryssavgi et al, 2008**).

Le dosage des tanins de *Myrtus communis var. italica* représente des valeurs de 26,55 mg GAE/g dans les feuilles, 11,95 mg GAE/g dans les fleurs et 3.33 mg GAE/g dans les tiges (**Wannes et al, (2010)**). On remarque que la teneur la plus élevée est trouvée dans les feuilles, par contre dans notre travail les fruits apparaissent les plus riches en tanins.

Concernant le dosage des flavonoïdes de *Myrtus communis* L., nous avons mentionné que les feuilles et les tiges ont donné des valeurs rapprochés ( $6,56 \pm 0,57$  et  $6,11 \pm 0,30$  mg EC/g respectivement) et plus élevées par rapport aux fruits. De même les résultats trouvés dans les travaux de **Wannes et al, (2010)** ont montré que la teneur des flavonoïdes dans les tiges et les feuilles de *Myrtus communis var. italica* est de l'ordre 1,99 et 1,22 mg EC/g respectivement. Mais ces teneurs apparaissent inférieurs par rapport à nos résultats.

## **6. Analyse chromatographique sur couche mince des deux fractions organiques acétate d'éthyle et 1-butanol de *Myrtus communis* L.**

Pour un essai d'analyse qualitative du contenu phénolique de nos différents extraits on a eu recours à l'utilisation de la chromatographie sur couche mince (CCM) puisqu'elle est l'une des méthodes de séparation des différents constituants d'un extrait végétal et qui est plutôt simple à mettre en œuvre.

Dans notre étude, nous avons réalisé une chromatographie sur couche mince pour les fractions d'acétate d'éthyle et butanoliques des trois parties de la plante étudiée sur une plaque de gel de silice en utilisant le système suivant : Acétate d'éthyle/acide formique/eau (65 :15 :20).

Par le biais de ce système, nous avons pu mettre en évidence : cinq composés pour la partie feuille, trois composés pour la partie tige et un composé pour la partie fruit dans la phase acétate d'éthyle. Concernant la phase 1-butanol, six composés pour la partie feuille, trois composés pour la partie tige et cinq composés pour la partie fruit. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 5.

**Tableau 5** : Résultats de la chromatographie sur couche mince de *Myrtus communis* L. Acétate d'éthyle/acide formique/eau (65 :15 : 20), gel de silice.

	La phase acétate d'éthyle			La phase 1-butanol		
	Rf	Couleurs des spots (UV à 365 nm)	Suggestion des classes de flavonoides (Markham, 1982)	Rf	Couleurs des spots (UV à 365 nm)	Suggestion des classes de flavonoides (Markham, 1982)
<b>Feuilles</b>	0.63	Violet	Flavone	0.60	Violet	Flavone
	0.66	Violet	Flavone	0.64	Violet	Flavone
	0.82	Violet	Flavone	0.67	Violet	Flavone
	0.87	Violet	Flavone	0.82	Violet	Flavone
	0.89	Violet	Flavone	0.87	Violet	Flavone
<b>Tiges</b>	0.81	Rose	Anthocyanidine 3,5-diglycosides	0.82	Violet	Flavone
	0.87	Bleu blanc fluorescent	Flavonol, flavone, Flavanone, Isoflavone	0.87	Bleu blanc fluorescent	Flavonol, flavone, Flavanone, Isoflavone
	0.90	Violet	Flavone	0.90	Violet	Flavone
<b>Fruits</b>	0.90	Violet	Flavone	0.71	Mauve	anthocyanidine 3-glycosides
				0.75	Mauve	anthocyanidine 3-glycosides
				0.78	Mauve	anthocyanidine 3-glycosides
				0.82	Violet	Flavone
				0.90	Violet	Flavone

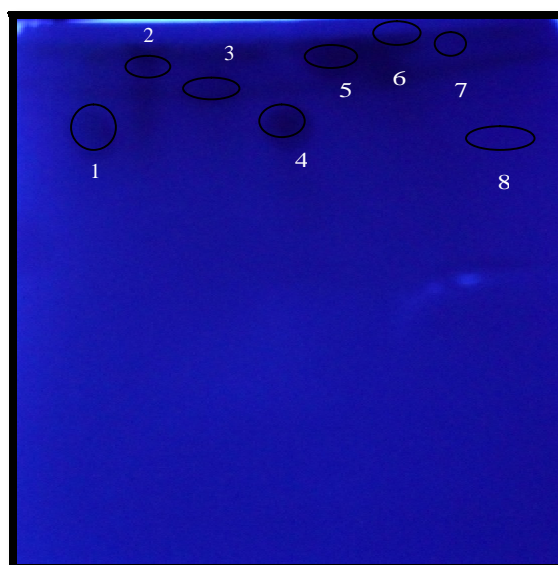
Le système d'élution choisi pour ce support est pris d'une étude faite par **Males et Medic-Saric (2001)**, qui ont testé treize systèmes d'élution et ils ont trouvé que le système : acétate d'éthyle/ acide formique/eau présente le meilleur rendement.

### 6.1. Essai d'identification des composés par CCM :

Nous avons pu mettre en évidence quelques composés par le biais des témoins utilisés. Pour l'essai d'identification des composés par CCM, nous avons utilisé huit témoins. Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 6.

**Tableau 6 :** Résultats de la chromatographie sur couche mince des témoins utilisés sur gel de silice, acétate d'éthyle/acide formique/ eau (65 :15 : 20)

Témoin	Couleur	Rf	Classes phénoliques
Acide gallique	Bleu	0.90	Acide phénol
Acide férulique	Bleu	0.95	Acide phénol
Acide syringique	Bleu	0.94	Acide phénol
Quercetine	Violet	0.75	Flavonol
Catechine	Violet	0.87	Flavanol
Quercetagine	Violet	0.76	Flavonol
Acide para- coumarique	Bleu	0.92	Acide phénol
Rutine	Violet	0.74	Flavone glycoside



- 1 : Quercétine
- 2 : Acide gallique
- 3 : Catéchine
- 4 : Quercetagine
- 5 : Acide para- coumarique
- 6 : Acide férulique
- 7 : Acide syringique
- 8 : Rutine

**Photo 5 :** Plaque de CCM prise après révélation à la lumière UV (365 nm) pour les témoins utilisés.

Grace au système d'éluion et aux témoins utilisés, nous avons pu mettre en évidence dans les fractions acétate d'éthyle et 1-butanol des trois parties de la plante étudiée, quelques composés rapportés dans le tableau 7.

**Tableau 7** : Composés identifiés par CCM

Parties étudiées	Phase acétate d'éthyle		Phase 1-butanol	
	Composé	Rf	Composé	Rf
Feuilles	Acide gallique	0.90	Catéchine	0.87
Tiges	Acide gallique Catéchine	0.90 0.87	Acide gallique Catéchine	0.90 0.87
Fruits	Acide gallique	0.90	Acide gallique Quercétine	0.90 0.75

L'étude de l'identification des composés phénoliques de notre plante et à l'aide de quelques témoins utilisés, nous a permis de mettre en évidence la présence de l'acide gallique qui est un acide phénol dans les trois parties de la plante, comme nous avons identifié aussi la présence de la catéchine dans les tiges de la fraction acétate d'éthyle.

Concernant la fraction 1- butanol nous avons pu identifier la catéchine qui est de la classe des flavanols dans les feuilles, ainsi nous avons pu mettre en évidence de l'acide gallique et la catéchine dans les tiges. Cette fraction a révélé aussi la présence de la quercétine qui est de la classe des flavonols et qui existe uniquement dans les fruits avec de l'acide gallique.

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

Les principaux composés identifiés par **Romani et al, (1999)**, de l'extrait des feuilles de Myrte par l'analyse qualitative et quantitative CLHP-DAD et CLHP/SM sont l'acide gallique, l'acide caféique, l'acide éllagique, la (-) catéchine, la (-) épicatechine, la (-) épigallocatechine, la myricétine-3-O-galactoside, la myricétine-3-O-rhamnoside, la quercétine-3-O-galactoside et la quercétine-3-O-rhamnoside. L'analyse est réalisée à plusieurs longueurs d'ondes à savoir : 254 nm, 280 nm, 310 nm, 330 nm et 360 nm.

En **2006**, **Montoro et al**, ont dosé les flavonoïdes et les anthocyanes des baies du Myrte par CLHP-UV-VIS et l'identification par LC/SM-ESI (couplage de la chromatographie en phase liquide à la spectrométrie de masse en mode ionisation : Electrospray). Ils ont pu identifier 14 composés, parmi lesquels 8 anthocyanes dont les majoritaires sont la delphinidine-3-O-glucoside, la pétunidine-3-O glucoside et la cyanidine-3-O-glucoside. À des teneurs plus faibles, on trouve la cyanidine-3-O-glucoside, la paéonidine-3-O-glucoside, la

delphinidine-3-O-arabinoside, la pétunidine-3-O arabinoside, la malvidine-3-O-arabinoside, la paéonidine-3-O-arabinoside et la delphinidine-3-O arabinoside. Ils indiquent aussi la présence de 6 flavonoïdes, dont les composés majoritaires sont la myricétine-3 Ogalactoside, la myricétine-3-O-rhamnoside et la quercétine-3-O glucoside. À des concentrations plus faibles, on note la présence de la myricétine-3-O-arabinoside, de la quercétine-3-O-rhamnoside et de la myricétine.

Les travaux de **Wannes *et al*, (2010)** sur identification et l'analyse des composés phénoliques de *Myrtus communis var. italica* par RP-HPLC ont montré la présence de 5 acides phénoliques qui sont l'acide gallique, l'acide cafeique, syningique, vanillique, et férulique. Ils ont identifié aussi 8 flavonoïdes : myricétine-3 Ogalactoside, la myricétine-3-O-rhamnoside, la quercétine-3-O galactoside, la quercétine-3-O rutinoside, la quercétine-3-O rhamnoside, la quercétine, la myricétine et la catéchine.

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



## 7. Etude de l'activité antioxydante

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

- Ø L'extrait brut des feuilles, des tiges et des fruits ;
- Ø Les deux fractions de flavonoïdes : acétate d'éthyle et 1-butanol des feuilles, des tige, et des fruits ;
- Ø Les tanins des feuilles, des tiges, et des fruits,
- Ø Les anthocyanes des fruits.

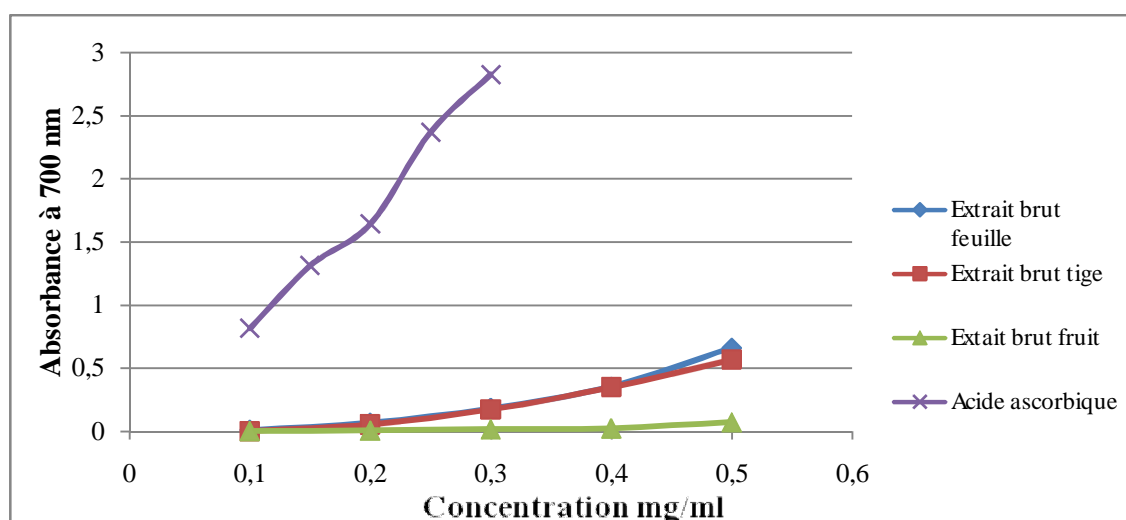
L'acide ascorbique est connu pour leurs propriétés antioxydantes est utilisé comme contrôle positif.

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

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

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

#### 7.1.1. Extraits bruts



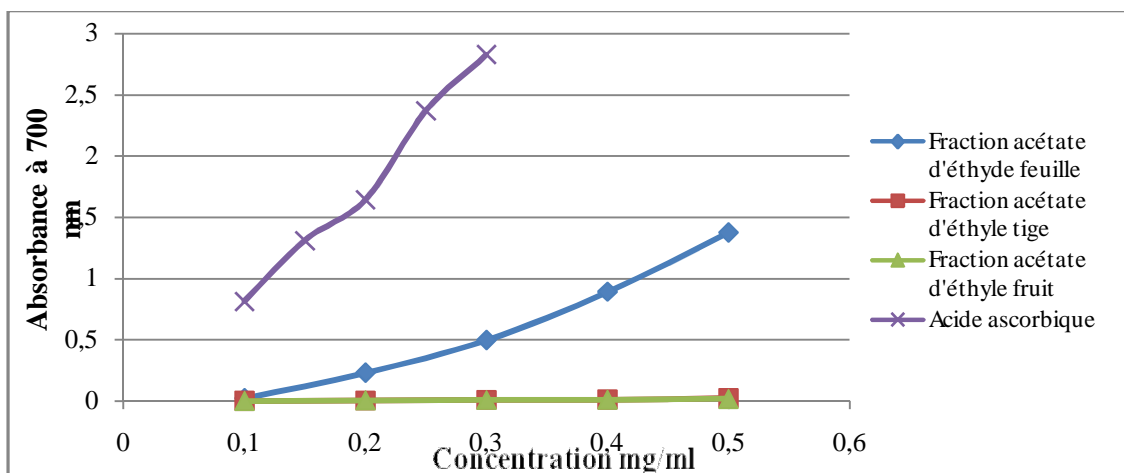
**Figure 33 :** Pouvoir réducteur des extraits bruts et de l'acide ascorbique par la méthode FRAP

Les résultats obtenus dans la figure 33, montrent que la capacité à réduire le fer est presque la même pour l'extrait brut des feuilles et des tiges et elle est plus élevée par rapport à l'extrait brut des fruits qui a présenté une très faible activité avec des valeurs observées de densités optiques (DO) qui ne dépassent pas le 1 (DO = 0,66 et DO = 0,56 pour les feuilles et les tiges respectivement) à une concentration de 0,5 mg/ml, mais elle est nettement inférieure

à celle de l'acide ascorbique qui présente une DO de 0.81 mg/ml à la concentration 0.1 mg/ml seulement.

### 7.1.2. Flavonoïdes :

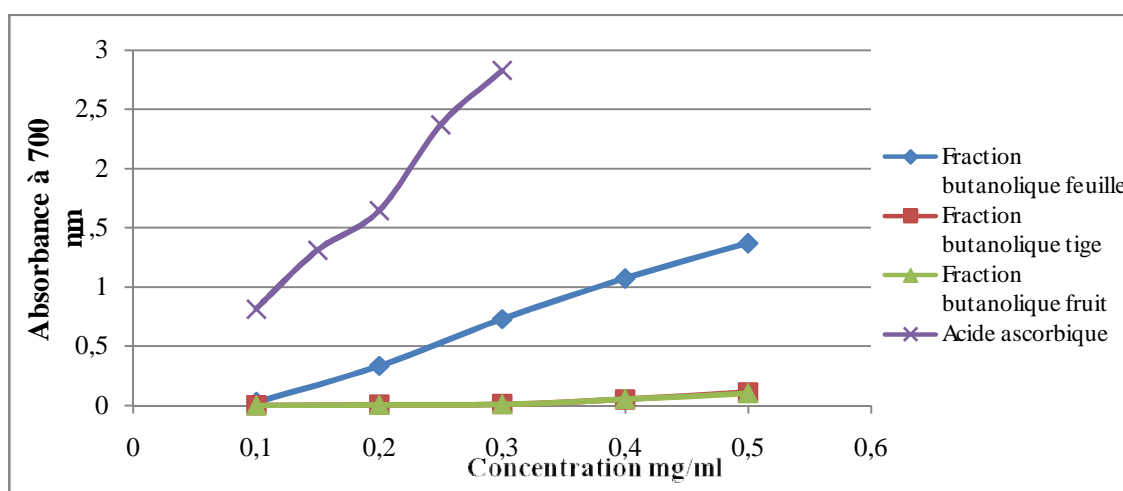
#### Ø Fraction d'acétate d'éthyle :



**Figure 34 :** Pouvoir réducteur des flavonoïdes (fraction acétate d'éthyle) et de l'acide ascorbique par la méthode FRAP

Nous remarquons que la phase acétate d'éthyle de la partie feuille a présenté le plus d'activité pour réduire le fer avec une densité optique maximale de 1.37 à une concentration de 0.5 mg/ml. Elle est plus ou moins similaire à celle de l'acide ascorbique qui présente une densité optique de 1.31 mais à une concentration de 0.15 mg/ml. Nous observons aussi que la capacité à réduire le fer est très faible pour la fraction acétate d'éthyle des tiges et des fruits. (Figure 34).

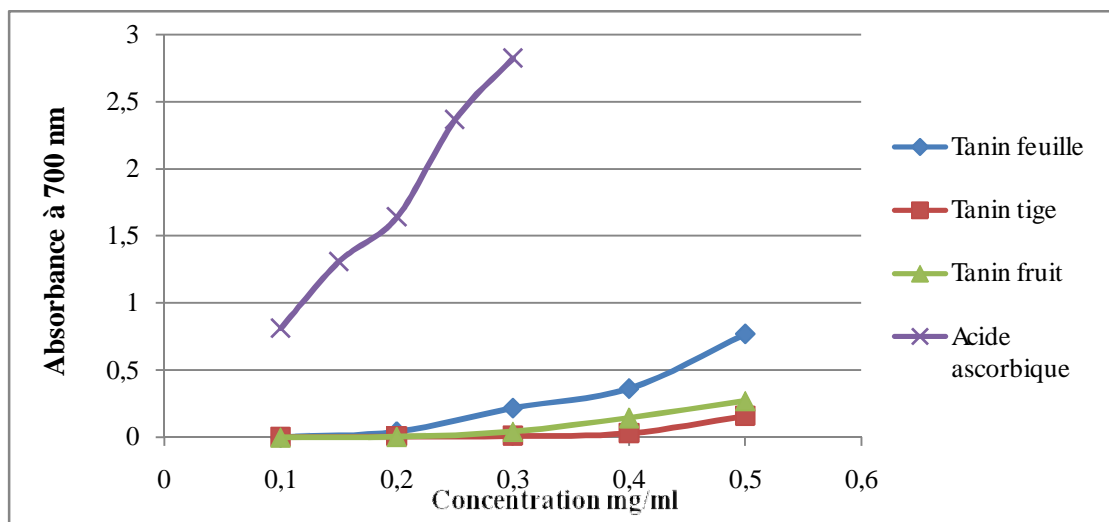
#### Ø Fraction butanolique



**Figure 35 :** Pouvoir réducteur des flavonoïdes (fraction butanolique) et de l'acide ascorbique par la méthode FRAP

Les résultats obtenus dans la figure 35 montrent que la fraction butanolique des feuilles représente l'activité la plus élevée pour réduire le fer avec une densité optique maximale de 1.37 à la concentration 0.5 mg/ml par rapport aux autres fractions qui ont présenté une très faible activité, mais cette capacité est nettement inférieure à celle de l'acide ascorbique.

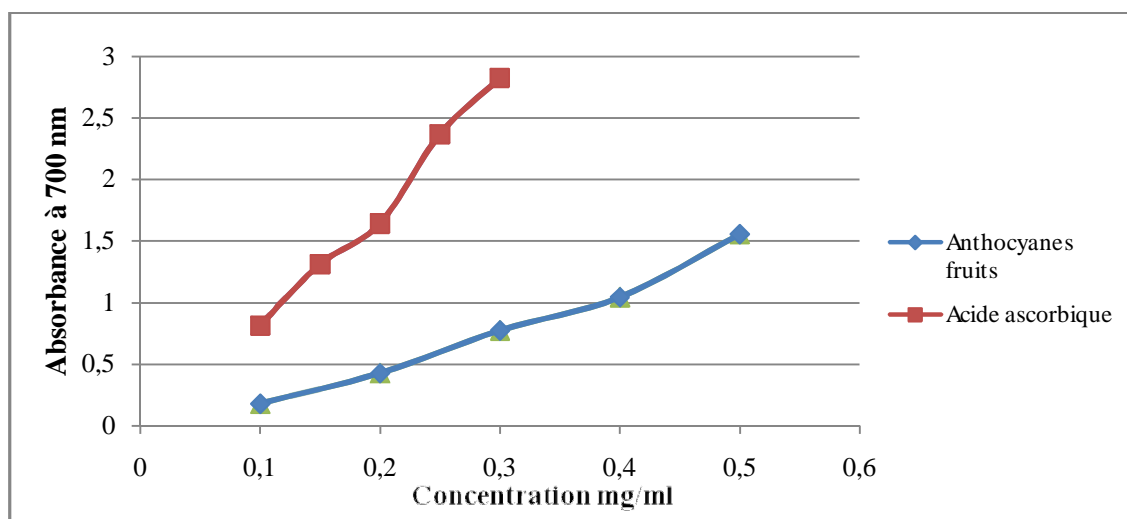
### 7.1.3. Tanins



**Figure 36 :** Pouvoir réducteur des tanins et de l'acide ascorbique par la méthode FRAP

Nous remarquons dans les graphes illustrés dans la figure 36 que la capacité à réduire le fer des tanins de la partie feuilles est la plus importante si nous avons la comparé avec les autres fractions qui représentent une très faible activité avec des densités optiques qui ne dépasse pas le 1 à la concentration 0.5 mg/ml (DO = 0.77 pour les feuilles, DO = 0.16 pour les tiges et DO = 0.27 pour les fruits) mais elle reste toujours inférieur à celle de l'acide ascorbique.

### 7.1.4. Anthocyanes

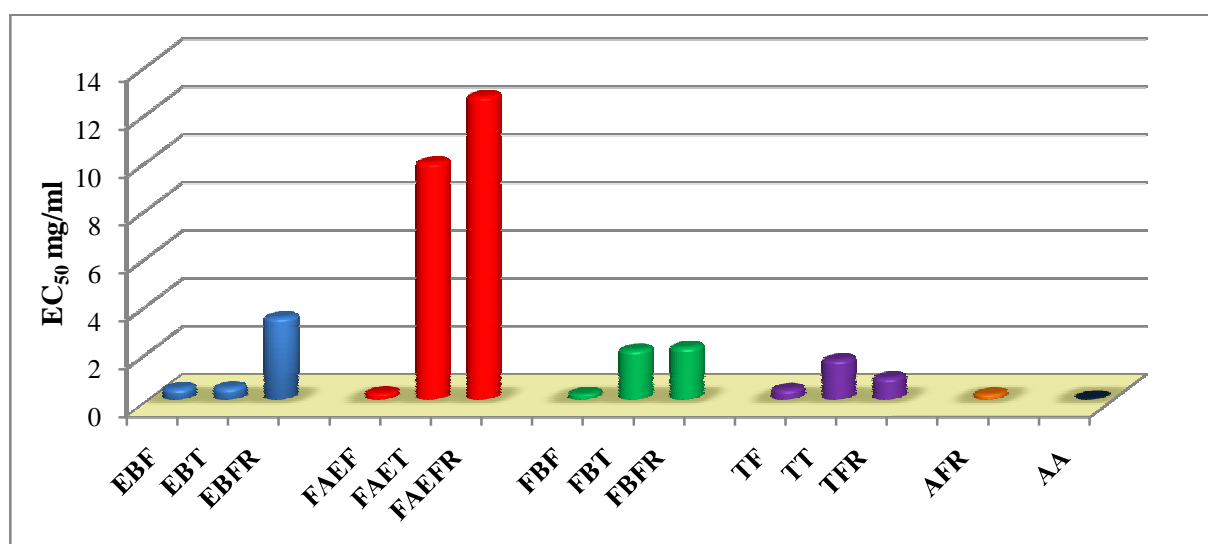


**Figure 37 :** Pouvoir réducteur des anthocyanes et de l'acide ascorbique par la méthode FRAP

L'extrait des anthocyanes des fruits présente une capacité intéressante pour réduire le fer avec une densité optique de l'ordre de 1.55 à une concentration de 0.5 mg/ml, plus ou moins similaire à celle de l'acide ascorbique (DO = 1.64) mais à la concentration 0.2 mg/ml. C'est l'extrait qui a présenté l'activité la plus élevée par rapport à tous les autres extraits testés par cette méthode mais cette capacité reste toujours inférieure à celle du contrôle positif. (Figure 37).

Afin de comparer l'activité antioxydante des extraits des trois parties de la plante par cette méthode, nous avons calculé  $EC_{50}$  qui est défini comme la concentration nécessaire pour réduire 50 % du fer. Les résultats obtenus sont illustrés sous forme d'histogramme dans la figure 38. Nous remarquons que la capacité à réduire le fer est variable entre les différentes parties de la plante, elle est beaucoup plus importante dans l'extrait des anthocyanes des fruits ( $EC_{50} = 0.21 \pm 1.59$  mg/ml) suivi de la fraction butanolique et acétate d'éthyle des feuilles ( $EC_{50} = 0.24 \pm 0.0076$  mg/ml et  $EC_{50} = 0.27 \pm 0.0048$  mg/ml respectivement) par rapport aux autres extraits qui représentent une très faible activité. Nous pouvons déduire que tous les extraits de *Myrtus communis L* ont la capacité pour réduire le fer mais elle est inférieure à celle de l'acide ascorbique ( $EC_{50} = 0.063 \pm 0.002$  mg/ml).

Nous pouvons classer la puissance de réduction de fer des différents extraits comme suit : **acide ascorbique** > anthocyanes des fruits > fraction butanolique des feuilles fraction acétate d'éthyle des feuilles > tanins des feuilles > extrait brut des feuilles > extrait brut des tiges > tanins des fruits > tanins des tiges > fraction butanolique des tiges > fraction butanolique des fruits > extrait brut des fruits > fraction acétate d'éthyle des tiges > fraction acétate d'éthyle des fruits.



**Figure 38** : Histogramme des valeurs des concentrations nécessaires pour la réduction de 50 % du fer des différents extraits en mg/ml

**EBF** : extrait brut feuille

**FAEF** : fraction acétate d'éthyle feuille

**FBF** : fraction butanolique feuille

**TF** : tanin feuille

**AFR** : anthocyane fruit

**EBT** : extrait brut tige

**FAET** : fraction acétate d'éthyle tige

**FBT** : fraction butanolique tige

**TT** : tanin tige

**AA** : acide ascorbique

**EBFR** : extrait brut fruit

**FAEFR** : fraction acétate d'éthyle fruit

**FBFR** : fraction butanolique fruit

**TFR** : tanin fruit

La capacité réductrice d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (Yang et al, 2008).

Beaucoup de publications ont indiqué qu'il y a une corrélation directe entre les activités antioxydantes et la puissance de réduction des composants de quelques plantes (Yildirim et al., 2001).

Les travaux de Wannés et al (2010) montrent que la capacité de réduction de fer des extraits méthanoliques des différentes parties du *Myrtus communis var. italica* est plus importante par rapport à nos extraits. Seulement l'extrait méthanolique des feuilles qui a présenté l'activité la plus élevée pour réduire le fer ( $EC_{50} = 0.01$  mg/ml) à celle de l'acide ascorbique ( $EC_{50} = 0.04$  mg/ml). Une activité modérée est enregistrée dans les fleurs ( $EC_{50} = 0.05$  mg/ml) et des tiges ( $EC_{50} = 0.15$  mg/ml).

## 7.2. Piégeage du radical libre DPPH<sup>·</sup> (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) :

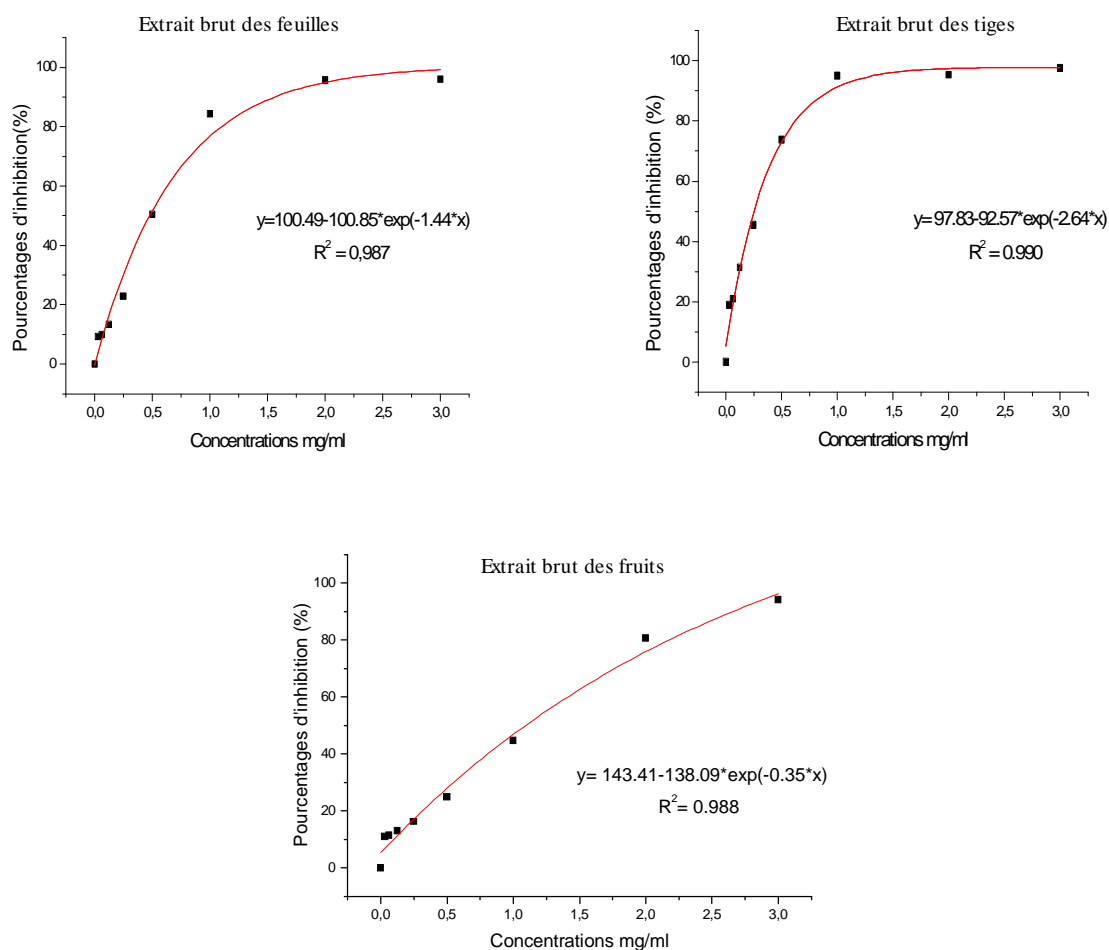
Le radical DPPH<sup>·</sup> est l'un des substrats les plus utilisés généralement pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicalaire et la simplicité de l'analyse (Bozin et al., 2008). L'activité antioxydante est déterminée par la diminution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



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

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

### 7.2.1. Extraits bruts

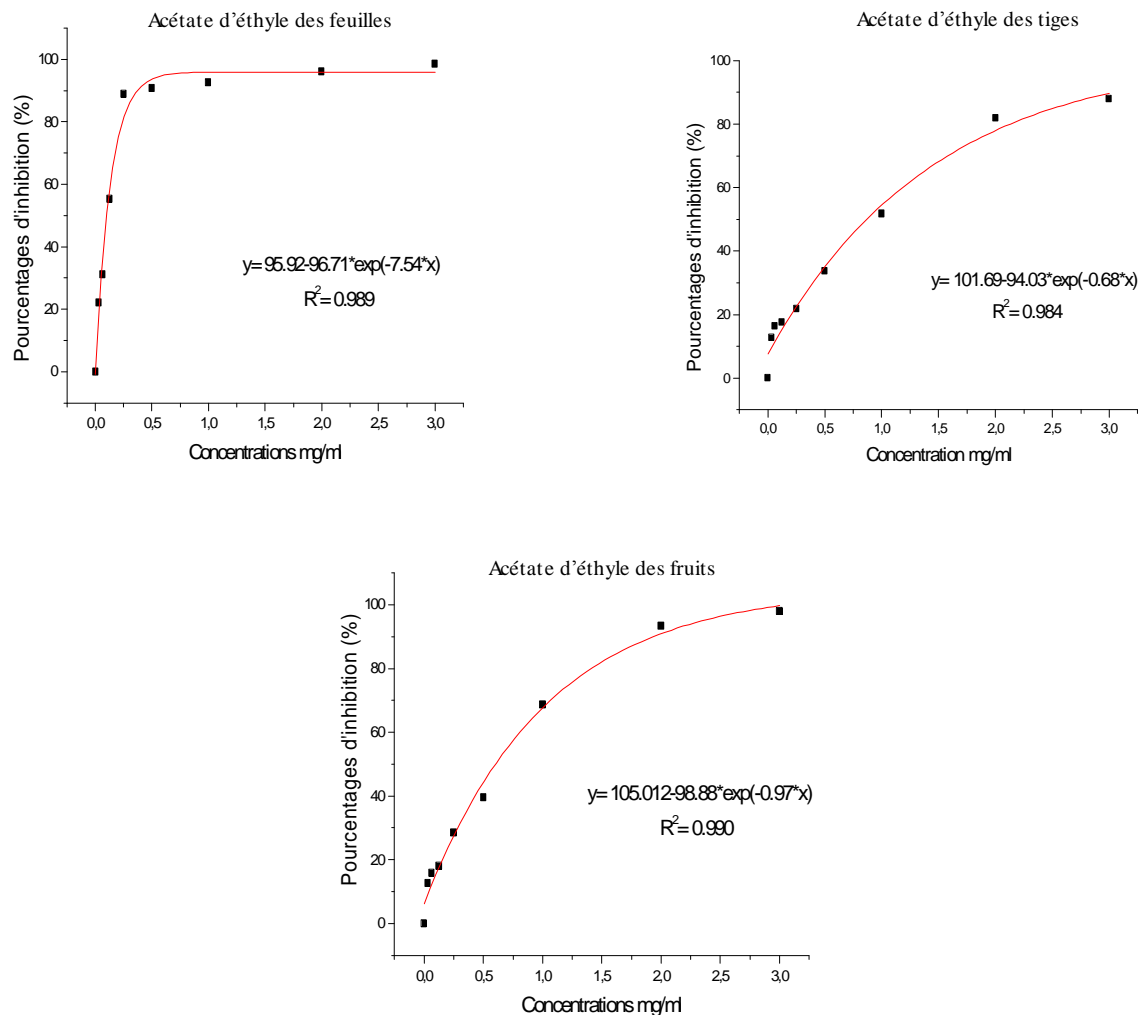


**Figure 39 :** Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations utilisées pour les extraits bruts de trois parties étudiées de *Myrtus communis* L.

L'extrait brut des tiges et des feuilles a montré un pouvoir de piégeage du radical DPPH• plus important par rapport à l'extrait brut des fruits, ceci est démontré par l'allure des graphes qui trace une courbe exponentielle avec la présence d'une phase stationnaire qui définit la réduction presque totale du DPPH• en sa forme non radicalaire. Ces deux extraits ont présenté à très faibles concentrations des pourcentages d'inhibitions élevés. A une concentration de 1 mg/ml les pourcentages d'inhibitions sont de l'ordre de 94.96 % et de 84.29 % pour l'extrait brut des tiges et des feuilles respectivement, suivi par l'extrait brut des fruits avec un pourcentage de 44.66 %. (Figure 39).

## 7.2.2. Flavonoïdes

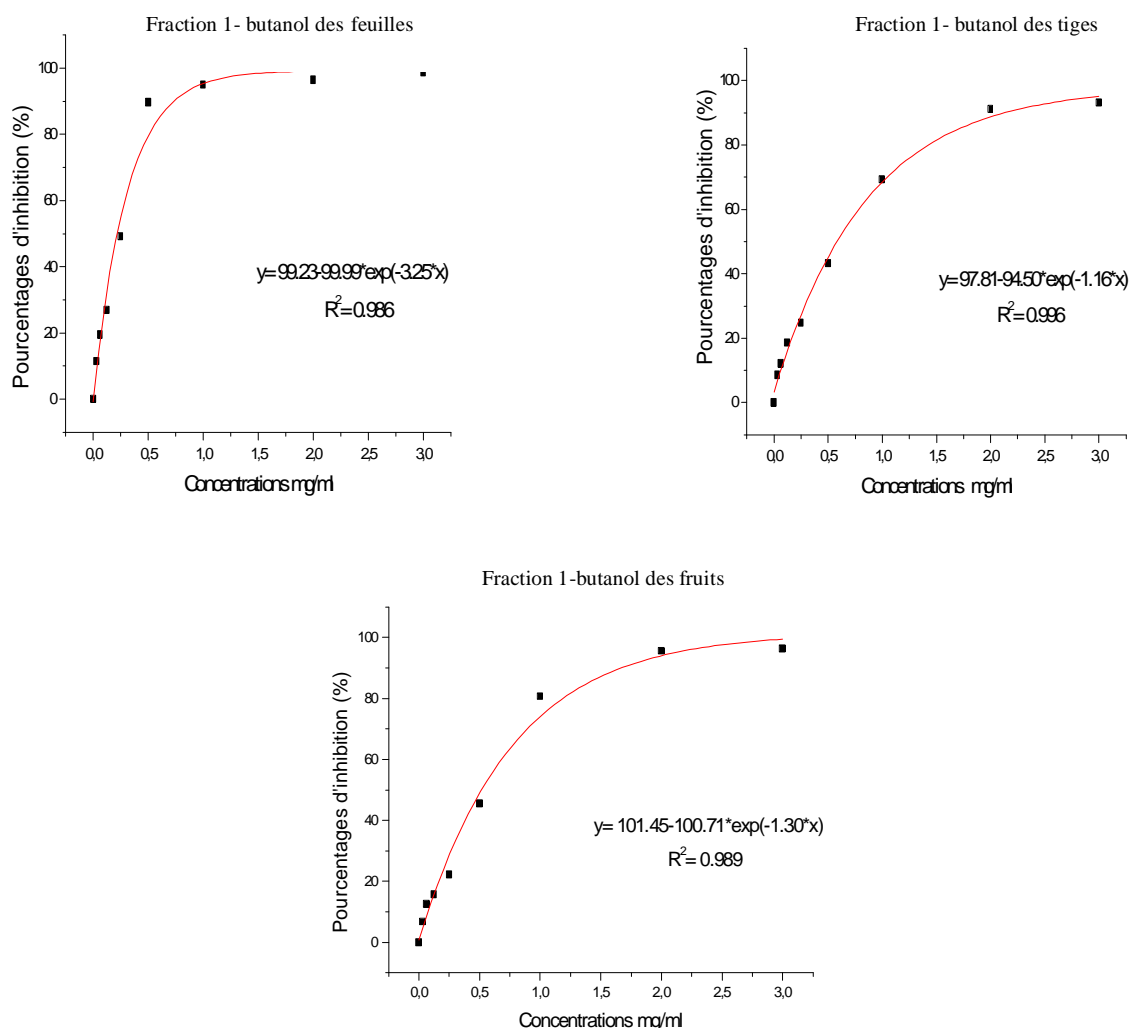
### Ø Fraction acétate d'éthyle



**Figure 40 :** Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations utilisées pour les fractions acétates d'éthyles de trois parties étudiées de *Myrtus communis L.*

La phase acétate d'éthyle des feuilles a montré une activité très élevée de piégeage du radical DPPH• par rapport à l'extrait brut des tiges et des fruits. Elle est même supérieure à celui de l'acide ascorbique. A une concentration de 0.25 mg/ml le pourcentage d'inhibition de la fraction acétate d'éthyle des feuilles est de 88.93%. La réduction du DPPH• est presque complète à partir de cette concentration. En comparant avec l'acide ascorbique, le pourcentage d'inhibition est de 75.58 % à une concentration de 0.2 mg/ml. Concernant la fraction acétate d'éthyle des fruits et des tiges le pourcentage d'inhibition est de l'ordre de 93.45 % et de 81.85 % respectivement à une concentration de 2 mg/ml. Ces deux fractions ont donné des activités plus faibles à celle de l'acide ascorbique. (Figure 40)

## Ø Fraction butanolique

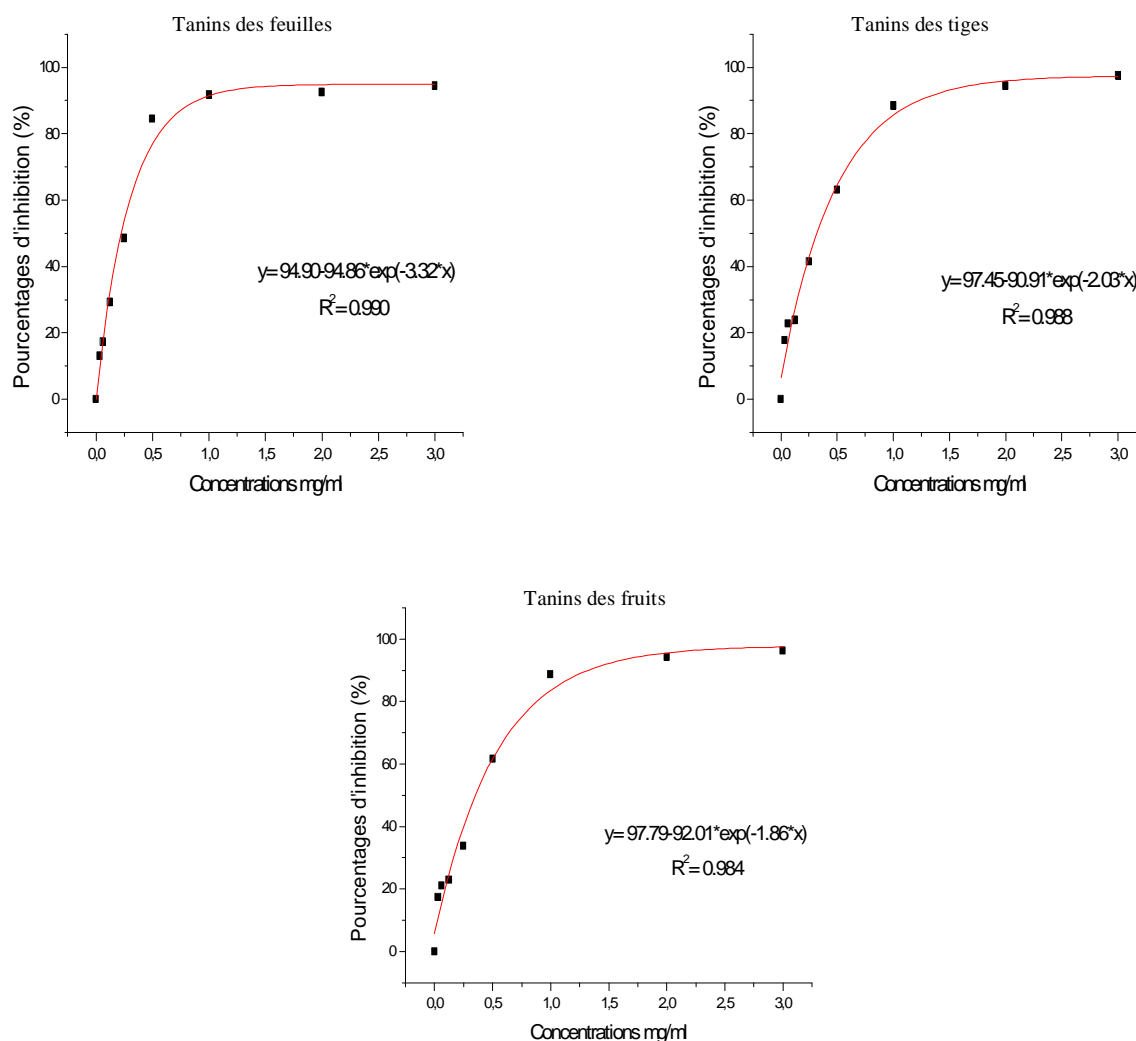


**Figure 41 :** Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations utilisées pour les fractions butanoliques de trois parties étudiées de *Myrtus communis* L.

Pour les fractions butanoliques, le meilleur résultat obtenu est celui de la fraction butanolique des feuilles qui a donné un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 89.71 % à une concentration de 0.5 mg/ml, ceci est démontré par l'allure du graphe qui trace une courbe exponentielle avec la présence d'une phase stationnaire, qui définit la réduction presque totale du radical DPPH•. En ce qui concerne les fractions butanoliques des tiges et des fruits nous constatons une activité similaire mais inférieure à la fraction des feuilles et de l'acide ascorbique. (Figure 41).



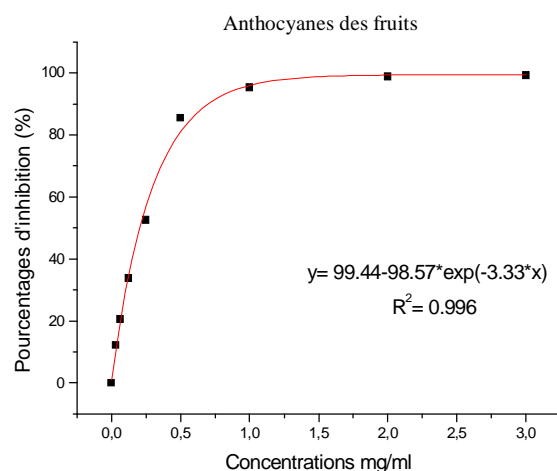
### 7.2.3. Tanins



**Figure 42 :** Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations utilisées pour les tanins de trois parties étudiées de *Myrtus communis* L.

Les tanins des feuilles ont montré un pouvoir du piégeage du radical DPPH• plus élevé à celui des tanins des tiges et des fruits qui ont présenté une activité similaire mais inférieur à celle de l'acide ascorbique. Nous remarquons à une concentration de 1 mg /ml le pourcentage d'inhibition est de l'ordre de 91.70 % ; 88.72 % et 88.50 % pour les tanins des feuilles, des fruits et des tiges respectivement. La réduction du DPPH• est presque totale à partir de cette concentration. (Figure 42).

#### 7.2.4. Anthocyanes

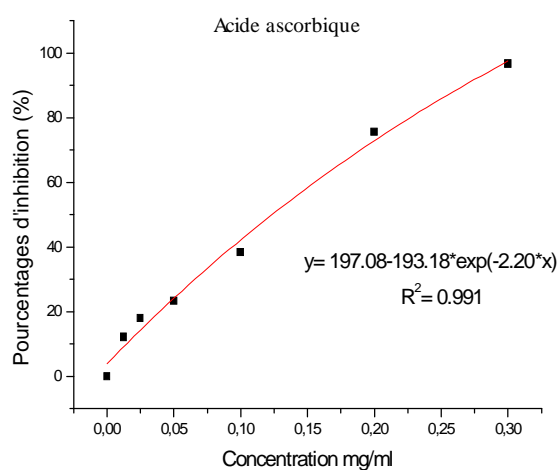


**Figure 43 :** Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations utilisées pour les anthocyanes des fruits de *Myrtus communis L*

L'extrait des anthocyanes des fruits a montré une activité de piégeage du radical DPPH• intéressante, ceci est démontré par l'allure du graphe qui trace une courbe exponentielle avec la présence d'une phase stationnaire qui définit la réduction presque totale du DPPH• en sa forme non radicalaire à partir d'une concentration de 0.5 mg/ml qui présente un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 85.45%. (Figure 43).

#### 7.2.5.

#### Acide ascorbique



**Figure 44 :** Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'acide ascorbique

### Ø Calcul des IC<sub>50</sub> :

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

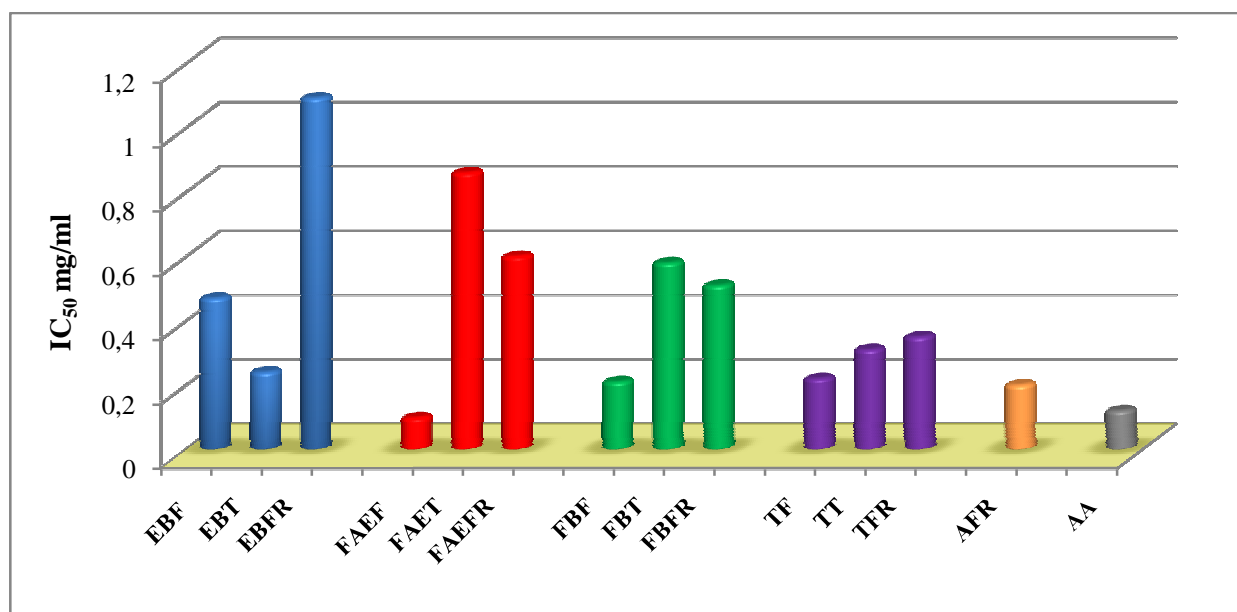
Les valeurs des IC<sub>50</sub> trouvées pour tous les extraits testés sont représentées dans le tableau 10 et dans la figure sous forme d'histogramme.

**Tableau 8** : valeurs des IC<sub>50</sub> trouvées pour les extraits des trois parties de la plante

Les parties étudiées de la plante	IC50 exprimées en mg/ml				
	Extraits bruts	Fraction acétate d'éthyle	Fraction butanolique	Tanins	Anthocyanes
Feuilles	0,47	0,098	0,21	0,22	-
Tiges	0,24	0,86	0,58	0,31	-
Fruits	1,093	0,60	0,51	0,35	0,20
Acide ascorbique	0,12				

La valeur d'IC<sub>50</sub> de l'acide ascorbique que nous avons trouvé (0.12 mg/ml) est proche à celle trouvé par Benhammou et al, (2009). (De l'ordre de 0.11 mg/ml).

En comparant les IC<sub>50</sub> des différents extraits testés des trois parties de *Myrtus communis* L. par rapport à celle de l'acide ascorbique, nous avons remarqué une activité antioxydante élevée de la fraction acétate d'éthyle des feuilles qui est supérieur à la capacité du piégeage du radical DPPH• de l'acide ascorbique. Il en est de même pour la fraction butanolique des feuilles, des anthocyanes des fruits, des tanins des feuilles et l'extrait brut des tiges qui représentent une activité antioxydante presque similaire et intéressante par rapport au control positif.



**Figure 45 :** Histogramme des valeurs des concentrations inhibitrices 50 des différents extraits en mg/ml

**EBF :** extrait brut feuille

**FAEF :** fraction acétate d'éthyle feuille

**FBF :** fraction butanolique feuille

**TF :** tanin feuille

**AFR :** anthocyane fruit

**EBT :** extrait brut tige

**FAET :** fraction acétate d'éthyle tige

**FBT :** fraction butanolique tige

**TT :** tanin tige

**AA :** acide ascorbique

**EBFR :** extrait brut fruit

**FAEFR :** fraction acétate d'éthyle fruit

**FBFR :** fraction butanolique fruit

**TFR :** tanin fruit

D'après l'histogramme illustré dans la figure 45, nous pouvons classer les extraits par ordre de réactivité décroissante : Fraction acétate d'éthyle des feuilles > **acide ascorbique** > anthocyane des fruits > fraction butanolique des feuilles > tanins des feuilles > extrait brut des tiges > tanins des tiges > tanins des fruits > extrait brut des feuilles > fraction butanolique des fruits > fraction butanolique des tiges > fraction acétate d'éthyle des fruits > fraction acétate d'éthyle des tiges > extrait brut des fruits.

Les résultats expérimentaux obtenus montrent que la fraction acétate d'éthyle des feuilles présente l'activité la plus importante avec une IC<sub>50</sub> de 0.098 mg/ml. Cette valeur est inférieure à celle de l'acide ascorbique (IC<sub>50</sub> = 0.12 mg/ml), ceci suggère que cette plante possède des flavonoïdes doués d'activité antioxydante élevée, comme est signalé dans la publication (Umadevi, et al, 1988 ; Romani et al, 2002 ; Chryssavgi et al, 2008). En comparant l'activité antioxydante des deux phases de flavonoïdes dans les feuilles de notre plante, nous avons remarqué que la phase acétate d'éthyle présente plus d'activité par rapport à la phase butanolique. Nos résultats confirment ceux publiés par Tian et al, (2009) et Fabri et al, (2009).

D'après l'étude de Chryssavgi et al, (2008) l'activité antioxydante la plus intéressante est remarquée dans le mois d'Aout dans l'extrait méthanolique des feuilles de *Myrtus communis* L. avec un IC<sub>50</sub> de l'ordre de 0.0095 ± 0.93 mg/ml. De même Wannan et al (2010) viennent de confirmer également que l'extrait méthanolique des feuilles de *Myrtus*

*communis* var. *italica* présente l'activité la plus élevée par rapport aux autres extraits testés avec un IC<sub>50</sub> de 0.008 ± 0.73 mg/ml

Les travaux de **Romani et al 1999; 2004** ont montré que les flavonols (myricétine et ces dérivés) et les flavanols (catéchine et ces dérivés) des feuilles de *Myrtus communis* L qui sont trouvés à des teneurs élevées sont responsables de l'activité antioxydante. De même la présence de quercétine et ces dérivés et les acides phénols participent au piégeage des radicaux libres malgré qu'ils existent à des concentrations faibles.

Nous avons constaté aussi que les anthocyanes des fruits présentent une activité remarquable vis-à-vis du piégeage du DPPH• avec un IC<sub>50</sub> de 0.20 mg/ml. Ce résultat est confirmé dans la publication de **Montoro et al (2006)** qui ont montré que les flavonoïdes et les anthocyanes sont les composés majeurs des baies de Myrte et ils présentent une activité antioxydante élevée.

L'étude de **Yoshimura et al (2008)** sur l'activité antiradicalaire des composés phénoliques des feuilles de myrte a révélé que les tanins hydrolysables, parmi lesquels 4 composés majoritaires sont Oenotheine B, Eugeniflorine D2, Tellimagrandine I et Tellimagrandine II présentent une activité intéressante. Ce qui est comparable à notre plante dont la valeur d'IC<sub>50</sub> des tanins des feuilles est de l'ordre de 0.22 mg/ml.

Les résultats obtenus dans l'essai d'identification des composés flavoniques par la chromatographie sur couche mince nous ont permis de conclure que les composés phénoliques identifiés dans les différents extraits des trois parties de la plante sont responsables de l'activité antioxydante et renforcent la capacité de ces extraits à céder un proton pour réduire le DPPH et de libérer un électron pour réduire le fer ce qui est prouvé par **Montoro et al, (2006b)**. Ces auteurs ont suggéré que l'activité antioxydante des extraits d'une plante est en corrélation avec leur composition en polyphénols. **Schlesier et al, (2002)** ont montré également que l'acide gallique est le composé le plus actif dans les tests DPPH et FRAP par comparaison avec d'autres anti-oxydants. D'autres études ont montré que les substances phénoliques, comme les flavonoïdes et les acides phénoliques, sont considérablement plus anti-oxydants que la vitamine C et la vitamine E (**Cao et al, 1997 ; Vinson et al, 1995**).

# Conclusion

Les plantes aromatiques et médicinales sont la source de la majorité des antioxydants naturels et elles restent encore sous exploitées dans le domaine médicale. Dans l'industrie pharmaceutique, sachant que les antioxydants sembleraient de manière significative à la prévention des maladies, le développement de nouveaux médicaments à base d'antioxydants d'origine naturelle doit être à l'ordre de jour.

Dans ce contexte nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et du pouvoir antioxydant de différents extraits de *Myrtus communis* L de la région de Tlemcen.

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

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

La teneur des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins est variable entre les différentes parties de *Myrtus communis* L. La teneur la plus élevée des polyphénols est constatée dans les feuilles  $119,23 \pm 0,77$  mg GAE/g suivi par les tiges avec une teneur de  $112,96 \pm 0,53$  mg GAE/g, puis les fruits avec une teneur de  $70,26 \pm 0,71$  mg GAE/g. Concernant les flavonoïdes, nous avons observé des teneurs rapprochées dans la partie feuille et tige de la plante, elles représentent une teneur de  $6,56 \pm 0,57$  et  $6,11 \pm 0,30$  mg EC/g respectivement, suivis par les fruits avec une teneur de  $3,87 \pm 0,25$  mg EC/g. Alors pour le dosage des tanins, les teneurs obtenues sont classées comme suit : fruits > tiges > feuilles qui sont de l'ordre de  $27,20 \pm 1,086$  ;  $22,47 \pm 0,70$  et  $13,78 \pm 0,89$  mg EC/g respectivement dont nous avons remarqué que la teneur enregistrée dans les fruits est la plus importante.

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

En outre, l'analyse qualitative des flavonoïdes des deux fractions acétates d'éthyle et 1-butanol des trois parties de la plante par chromatographie sur couche mince grâce au système d'éluion choisi a révélé la présence de la catéchine dans les feuilles et les tiges, la quercétine dans les fruits ainsi la présence de l'acide gallique dans la majorité des fractions testées.

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

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

Cependant, pour le piégeage du radical libre DPPH• et en comparant les IC<sub>50</sub> des différents extraits testés des trois parties de *Myrtus communis* L par rapport à celle de l'acide ascorbique, nous avons remarqué une activité antioxydante très importante de la fraction acétate d'éthyle des feuilles (IC<sub>50</sub> = 0,098 mg/ml) qui est supérieur à la capacité du piégeage du radical DPPH• de l'acide ascorbique (IC<sub>50</sub> = 0,12 mg/ml). Il en est de même pour la fraction butanolique des feuilles, des anthocyanes des fruits, des tanins des feuilles et l'extrait brut des tiges qui représentent une activité antioxydante presque similaire et intéressante. L'étude du pouvoir antioxydant par la méthode de DPPH a confirmé les propriétés puissantes que possèdent les flavonoïdes à piéger les radicaux libres.

Selon les résultats obtenus dans cette étude, nous pouvons dire que les extraits de *Myrtus communis* L ont une bonne activité antioxydante et une capacité de piégeage de radicaux libres intéressante en particulier la fraction acétate d'éthyle des feuilles. Cette analyse trouve une importante application dans l'industrie pharmaceutique comme elle peut trouver aussi une application dans l'industrie alimentaire.

L'analyse des différents extraits flavoniques par la méthode de chromatographie sur couche mince, nous conduira dans la perspective future de notre étude, de compléter et d'approfondir ce travail par une étude phytochimique avancée. Dans un premier temps de faire un fractionnement de ces extraits et d'identifier les molécules responsables du pouvoir antioxydant en utilisant des techniques d'identification plus performantes.

Dans un deuxième temps, il serait intéressant d'évaluer l'activité antioxydante par d'autres méthodes et de faire des tests in vivo afin de déterminer de nouveaux agents thérapeutiques.



# Références Bibliographiques

- Adrian, J ; Frangne, R (1991).** La science Alimentaire de A à Z, Ed. *Lavoisier, Paris*.
- Allard, J; Royall, D; Kurian, R; Muggli, R; Jeejee bhoy, K. (1994).** Effects of  $\beta$ -carotene supplementation on lipid peroxidation in humans, *Amj Clim Nutr*, 59: 884 – 90.
- Alamanni, M.C ; Cossu, M. (2004).** Radical scavenging activity and antioxydant activity of liquors of Myrtle (*Myrtus communis* L) berries and leaves Italian, *Journal of Food Science*, 16: 197 – 208.
- Amensour, M; Sendra, E; Abrini, J; Bouhdid, S; Pérez-Alvarez, J.A; Fernndez- López, J. (2009).** Total phenolic content and antioxidant activity of myrtle (*Myrtus communis*) extracts, *Nat. Prod. Commun.* 4 (6): 819–824.
- Anderson, K.J; Teuber, SS; Gobeille, A; Cremin, P; Waterhouse, A.L; Steinberg, F.M. (2001).** Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. Biochemical and molecular action of nutriments. *J Nutrition*, 131: 2837–42.
- Antonot, E; Marchal, R. (1998).** Chromatographie. Stage MAPEN, p 5.
- Antwerpen, P.V. (2006).** Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système mycloperoxydase / Peroxyole d'hydrogène / Clilorure. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Science Pharmaceutiques Bruxelles.
- Arnao, M.B ; Cano, A ; Acosta, M. (2001).** The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity, *Food Chem* , 73 : 239-44.
- Baba Aissa, F. (1999).** Encyclopedie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb. Substances végétales d'Afrique d'orient et d'occident, p 181.
- Bahorun, T. (1997).** Substances Naturelles actives: La flore mauricienne une source d'approvisionnement potentielle. Université de Maurice. AMAS, *Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius* , p 83.
- Barboni, T. (2006).** Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de Corse, p26.
- Barlow, S.M. (1990).** Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. Ed. Hudson, B.J.F, *Food Antioxidants*: 253-307.
- Baytop, T. (1999).** Therapy with medicinal Plants in Turkey (Past and Present), *Nobel Tip Kitapevleri Press*, Istanbul.
- Belkheiri, N. (2010).** Dérivés phénoliques et activités antiathérogènes. Thèse en vue de l'obtention du Doctorat de l'université de Toulouse, p 113.

**Bekkara, F; Jay, M; Viricel, M.R. (1998).** Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of tow *Vicia faba* cvs differing in their seedtannin content, and study of their seed and root phenolic exudation, *Journal Plant and Soil*, 203: 27-36.

**Benderitter, M; Vincent-Genod, L; Pouget, J.P; Voisin, P. (2003).** The cell membrane as a biosensor of oxidative stress induced by radiation exposure: a multiparameter investigation, *Radiat Res* 159:471-483.

**Benhammou, N; Atik Bekkara, F; Kadifkova, P. (2007).** Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L. and *Pistacia atlantica* Desf, *Advances in Food Sciences*, 29(3), 155-161.

**Benhammou, N; Atik Bekkara, F; Kadifkova Panovska, T. (2009).** Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*, *C. R. Chimie* 12: 1259–1266.

**Benavente-Garcia, O ; Castillo, J ;Lorente, J ; et al. (2000).** Antioxidant activity of phenolics extracted from *olea europaea* L leaves, *Food Chem*, 68 : 457-62.

**Benzieet, I.F.F; Strain, J.J. (1996).** The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxydant Power”: The FRAP Assay. *Anal Biochem*, 239: 70- 6.

**Bessas, A; Benmoussa, L; Kerarma, M. (2007).** Dosage biochimique des composés phénoliques dans les dattes et le miel récoltés dans le sud Algérien. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en biologie.

**Beta, T; Nam, S; Dexter, J.E; Sapirstein, H.D. (2005).** Phenolic content and antioxidant activity of pearled ulreat and roller – milled fractions, *Creal Chem*: 390 -393.

**Biesalski, H.K; Hemmes,C; Hopfenmaller, W; Schmid, C; Gollnick, H.P. (1996).** Effects of controlled exposure of sunlight on plasma and skin levels of  $\beta$ -carotene, *Free Radio Res*, 24 : 215-224.

**Binov, L. (2001).** Oxydants/Antioxydants : Un équilibre important.

**Blois, M.S. (1958).** Antioxydant determination by the use of stable free radical, *Nature*, 181.

**Boizot, N ; Charpentier, J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour d'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, *INRA*, 79-82.

**Bouattoura, N. (1988).** Les ressources phytogénétiques. Importance Préservation-Utilisation. Annales, INA, El Harrach-Alger, vol 12 (1), T 1: pp. 43-63.

**Bozin, B; Mimica-Duric, N; Samojlik, I; Goran, A; Igic, R. (2008).** Phenolics as antioxydants in garlic (*Allium sativum* L. Alliaceae), *Food Chemistry*, 111: 925-929.

**Brand-Willims, W; Cuvelier, M. E; Berset, C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxydant activity, *Lebensmittel-Wissenschaft und technologie*, 28 : 25-30.

- Bravo, L. (1998).** Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance, *Nutr Rev*, 56: 317– 33.
- Bruneton, J. (1993).** Pharmiognosie et phytochimie, plantes médicinales, *Tec et Doc Lavoisier*. Paris, p 278-279.
- Bruneton, J. (1999).** Pharmiognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2eme édition, Paris : Editions médicales internationales, *Tec et Doc Lavoisier*, p 1120.
- Burillo, J; Codina, C. (2002).** Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants, *J Agric Food Chem*, 50: 6882–90.
- Cao, G ; Alessio, H.M ; Cutler, R.G. (1993).** Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants, *Free Radic Biol Med* 14: 303-311.
- Cao, G; Sofic, E; Prior, R.L. (1997).** Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure activity relationships. *Free Radic Biol Med*; 22: 749–60.
- Cavin, A. (1999).** Investigation phytochimique de trois plantes Indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires: *Tinos poracispa* (Menispermacées), *Merremia emarginata* (Convolvulacées) et *Oropea enneanda* (Annonacées). Thèse de doctorat Lausanne, p 241 .
- Chaillou, L.L ; Nazareno, M.A. (2006).** New method to determine antioxidant activity of polyphenols, *J Agric Food Chem*, 54 : 8397- 402.
- Chebil, L. (2006).** Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* : études cinétique, structurale et conformationnelle. Thèse en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'institut national polytechnique de Lorraine. INPL, Nancy.
- Cheeseman, K.H ; Beavis, A ; Esterbauer, H. (1988).** Hydroxyl-Radical-induced iron-catalysed degradation of 2-deoxyribose, *J. Biochem*, 252 : 649- 653.
- Chen, Y.F; Tsai, H.Y; Wu, T.S. (1995).** Anti-Inflammatory and analgesic activities from the roots of *Angelica pubescens*, *Planta Med.*, 61: 2-8.
- Chryssavgi, G; Vassiliki, P; Athanasios, M; Kibouri, T; Michael, K. (2008).** Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts, *Food Chemistry*, 107: 1120–1130.
- Clement, J.R; Armstrong, D.A. (1972).** Pulse Radiolysis of aqueous papin, *Can J. Chem. Q*, 2833-2840.
- Cowan, M.M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents, *Clin. Microbiol. Rev*, 12 : 564-582.

**Cuendet, M. (1999).** Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie : « *Fagraea blumei* » (Loganiaceae) et de trois plantes d'altitude : « *Bartsia alpina* » (Scrophulariaceae), « *Loiseleuria procumbens* » (Ericaceae) et Camp, Thèse de doctorat, p 24.

**Curtay, J.P ; Robin, J.M. (2000).** Intérêt des complexes antioxydants. Centre d'étude et développement de la nutrithérapie.

**Da Silva Pinto, M; Maria Lajolo, F; Innés Genovese, M. (2008).** Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananasa* Duch), *Food Chemistry*, 107: 1629-1635.

**Debray, M ; Jacquemin, H ; Razafindrambo, R. (1971).** Travaux et documents de l'Orstom. (Paris, N°8).

**Diaz, A.M ; Abeger, A. (1987).** Contribution à l'étude des composés phénoliques des graines de *Myrtus communis* L. *Plantes médicinales et phytothérapie*, 21(4) : 317-322.

**Diaz, A.M; Abeger, A. (1987).** *Myrtus communis* composition quimicay actividad biologica de sus extractos, Una revision, *Fitoterapia* 8: 167 – 174.

**Diouf, P.-N; Merlin, A; and Perrin, D. (2006).** Antioxidant properties of wood extracts and colour stability of woods. *Annals of Forest Science*, 63: 525-534.

**Diplok, A.T. (1991).** Antioxydant nutriments and disease prevention: an Overview. *Am J Clin Nutr*: 53 (suppl): 189S-93S.

**Dixon, R.A; Dey, P. M; Lamb, C. J. (1983).** Phytoalexins: Enzymology and molecular biology, *Adv. Enzymol* ,55 : 1-136.

**Djebaili, S ; (1984).** Steppe algérienne. Phytosociologie et écologie. Ed. OPU, Ben-Aknoun, Alger, p177.

**El-Sissi, H.I ; El-Ansary, H. (1967).** *Planta Medica*, 1 : 41-51.

**Evans, R.J ; Reynhout, G.S. (1992).** Alternates to synthetic antioxidants, *Food Science and human Nutrition*, 29: 27-42.

**Evans, J.L; Goldfine, I.D; Maddux, B.A; Grodsky, G.M. (2002).** Oxidative stress and stress- activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabets, *Endocr Rev*, 23: 599-622.

**Fabri, R.L; Nogueira, M.S; Braga, F.G; Coimbra, E.S. (2009).** *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidant effects, *Bioresource Technology*, 100: 428-433.

**Favier, A. (2003).** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité en chimie*, 108-115.

**Fujioka, T ; Furumi, K ; Fujii, H ; Okabe, H ; Mihashi, K ; Nakano, Y ; Mastunga, H ; Katano, M. et Mori, M. (1999).** Antiproliferative constituents from umbelliferae plants., V. A., New furanocoumarin and faltarindiol furanocoumarin ether from the root of *Angelica japonica*, *Chem. Pharm. Bull*, 47,96-100.

**Franco, M.A ; Versini, G ; Mattivi, F ; Dalla Sena, A ; Vacca, V. et Manca, G. (2002).** Analytical characterization of myrtle berries, partially processed products and commercially available liqueurs, *Journal of Commodity Science*, 41: 143 – 267.

**Frankel, E.N. (1998).** Lipid oxidation. Dundee, UK : The Oily Press.

**Frankel, E. N; Meyer. A. S. (2000).** "The problems of using one-dimensional methods to evaluate multidimensional food and biological antioxidants", *Journal of Science and Food Agriculture*, 80: 1925-1941.

**Garait, B. (2006).** Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la Glisodin. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université Joseph Fourier-Grenoble.

**Garcia-Agaez, A. N ; Apan, T. O. R ; Delgado, H. P ; Velazquez, G. et Maetinez-Vazquez, M. (2000).** Anti-Inflammatory activity of coumarins from *Decatropis bicolor* on TPA ear mice model, *Planta Med*, 66: 279-281.

**Gerard-Monnier, D ; Chaudière, J., (1996).** Métabolisme et fonction antioxydante du glutathion, *Path Biol* , 44 : 77 – 85.

**Gonzalez, A. G ; Estevez-Braun, A. (1997).** Coumarins, *Nat. Prod. Reprod*, 14 : 465-475.

**Goudable, J. et Favier, A. (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. Laboratoire de biochimie C, hôpital Edouard, Herriot, Lyon, GREPO, Université de Grenoble, la Tronche.

**Goussard, J. P. (1999).** Les radicaux libres et antioxydants, p 7-11.

**Govaerts, R; Lucas, E. (2008).** World Checklist of Myrtaceae, Royal Botanic Gardens, Kew. Xv, p 455.

**Gravot, A. (2008).** Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Equipe pédagogique Physiologie Végétale, UMR 118 APBV. Université de Rennes 1 – L2.

**Guingard, J. (1996).** Biochimie végétale, Ed. Lavoisier, Paris, p 175-192. UE PHR.

**Gutteridge, J.M. (1993).** Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence, *Free Radic Res Commun*, 19:141-158.

**Halliwell, B; Gutteridge, J.M.C. (1999).** Free radicals in biology and medicine, Oxford, UK.

**Halliwell, B; Gutteridge, J.M.C; Aruoma, O. (1987).** The deoxyribose method: a simple .test-tube. assay for determination of rate constant for reaction of hydroxyl Radicals, *Anal. Biochem*, 1215-219.

**Harborne, J.B. (1998).** Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. Third Edition. ISBN: 0-412-57260-5 (HB) and 0-412-57270-2 (PB).

**Hemingway, R.W. (1992).** Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In: Lpant polyphenols: synthesis, proprieties, significande. Laks P.E, Hemingway R.W New York.

**Hicks, M; Gebicki, J.M. (1986).** Rate constants for reaction of hydroxyl Radicals with tris, tricine and hepes buffers, *FEBS Lett*, 92-94.

**Hinou, J ; Lakkas, N ; Philianos, S. (1988).** Les constituants polyphénoliques de *Myrtus communis* L, *Plantes médicinales et phytothérapies* 22 : 98 – 103.

**Hirasa, K; Takemasa, M; (1998).** Spice science and technology. New York: Marcel Dekker.

**Huang, D; Ou, B; Prior, R.L. (2005).** "The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (6): 1841-1856.

**Hubert, A.J. (2006).** Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaine, Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse, école doctorale des Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries, spécialité : qualité et sécurité des aliments, p 174.

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

**Igor Passi, L.B. (2002).** Etude des activités biologique de *Fagara zanthoxyloïdes, lam* (Rutaceae). Thèse de pharmacie, Bamako, p 133.

**Ito, N ; Fukushima, S ; Tsuda, H. (1985).** "Carcinogenicity and modification of the carcinogenic responses by BHA, BHT and other antioxidants". *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 15: 109-150.

**Julkunen-Titto, R. (1985).** Phenolic constituents in the leaves of northern willows : methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 33 : 213-217.

**Kansole, M.M.R. (2009).** Etude ethnobotanique, phytocuinique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de *Leucas martinicansis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia oppossta vahl* et *Orthosiphon pallidus royle ex benth*. Mémoire pour obtenir un diplôme Diplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso.

- Karagozler, A; Erdag, B; Calmaz Emek, Y. (2008).** Antioxydant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*, *Food Chemistry*, 111: 400-407.
- Kayser, O; Kolodziej, H. (1997).** Antibacterial activity of extrats and constituents of *Pelargomun sidoides* and *Plelargonium reniforme*, *Planta Med*, 63: 509-510.
- Koleva, I.I ; Van Beek, T.A ; Linssen, J.P.H ; De Groot, A ; Evstatieva, L.N. (2001).** Screening of plant extracts for antioxidant activity : a comparative study on three testing methods, *Phytochem Anal*, 13 : 8-17.
- Kraljic, I; Yrumbore, C.N. (1965).** P-Nitrosodimethylaniline as an OH Radical scavenger in Radiation chemistry. *J. Am. Chem. Soc. Z* 2547-2550, 1965.
- Lagnika, L. (2005).** Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises, Thèse pour obtueur le titre de docteur en Sciences de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg : Faculté de pharmacie, p 248.
- Larson, R.A. (1997).** Naturally occuring antioxidants, Ed. Boca raton.
- Lebham, (2005).** Thèse au laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues au sein de l'Institut Universitaire Européen de la Mer. (IVEM). Université de Bretagne Occidentale (UBO).
- Lesgards, J.F. (2000).** Contribution à l'étude du statut antioxydant de l'homme ; aspect chimiques et biochimique. Thèse de doctorat, 19-20.
- Li, P ; Anu, H ; Jari, S ; Teijo, Y ; Heikki, V ; (1999).** TLC method for evaluation of free radical scavenging activity of rapeseed meal by video scanning technology , *Chemistry and Nutrition*, 10 : 123-187.
- Lien, E.J ; Ren, S ; Bui, H.H ; Wang, R. (1999).** Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants, *Free Radic Biol Med*, 26 : 285-94.
- Lindau-sehpard, B; Shaffer, J. (1993).** Expression of human catalase in acatalasemic murine SVB2 cells confers protection from oxiadative damage, *Free rad boil Med* , 15:581-8.
- Lisu. W; Jui-Hung, Y; Hsiao-Ling, L; Ming-Jiuan, W. (2003).** Antioxydant effect of methanol extracts from Lotus Plumule and Blossom (*Nelumbo nucifeca* Gertn), *Journal of food and drug analysis*, 11(1): 60-66.
- Liuk, L; Sun, Y; Laura, T; Liang, X; Ye, H; Zeng, X. (2009).** Determination of polyphenolic content and antioxydant activity of Kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng, *Food chemistry*, 112: 35-4.
- Lois, R. (1994).** Accumulation of UV-absorbing flavonoids induced by UV-B radiation in *Arabidopsis thaliana* L. I. Mechanisms of UV resistance in *Arabidopsis*, *Planta*; 194: 498-503.



**Longo, L; Scardino, A; Vasapollo ,G. (2007).** Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L, *Phillyrea latifolia* L. and *Rubia peregrine* L. *Innovative, Food Science and Emerging Technologies*, 8: 360-364.

**Lugasi, A ; Hovari, J ; Sagi, K.V ; et Biro, L. (2003).** The role of antioxidant phytonutriments in the prevention of diseases. *Acta. Biologica Szegedientsis* 1-4: 119-125.

**Maamri, S. (2008).** Etude de *Pistacia atlantica* de deux régions de sud algérien : Dosage des lipides, dosage des polyphénols, essais antileishmaniens. Mémoire en vue de l'obtention de diplôme de Magister en biochimie et microbiologie appliqués, p 26.

**Maisuthisakul, P; Suttajit, M; Pongsawatmmit, R. (2007).** Assessment of phenolic content and free radical scavenging capacity of some that indigenous plants, *Food Chemistry*, 100: 1409-1418.

**Maizak, K ; Brac, De La Perriere et Hammiche, V. (1993).** Pharmacopée traditionnelle: Sahara septentrional. Actes du 2e colloque européen d'ethnopharmacologie, Heidelberg, p 169-181.

**Males, Z; Medic-Saric, M. (2001).** Optimization of TLC analysis of flavonoids and phenolic acids of *Helleborus atrorubens*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24: 253-359.

**Malgalhae, L.M; Segundo, M.A; Reis, S; Lima, J. (2008).** Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties, *Analytica Chemical Acta*, 613: 1-19.

**Marco, G.L. (1968).** A rapid method for evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc*, 45 : 594-8.

**Marfak, A. (2003).** Radiolyse gamma des flavonoides, etude de leur réactivité avec les radicaux libres issus des alcools : Formation de depsides. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de Limoges.

**Markham, K.R. (1982).** Paper chromatography and the recognition of flavonoids, flavonoid structure information from p.c. data, Technique of flavonoid identification, *Biological Techniques Series*, 135-189.

**Martin- Lopez, T; Rubio, B; Villaescusa, L; Fernandez, L; Diaz A.M., (1999).** polyphenolic compounds from pericarps of *Myrtus cummunis*, *Pharmaceutical Biology*, 37, 28-31.

**Matkowski, A; Piotrowska, M. (2006).** Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae, *Fitoterapia*, 77: 346-353.

**Meddleton, E; Kardasnami, J.C. (1993).** The flavonoids Advances. In: research since 1986. J B Harborne, Chapman and Hall, London,p 617-652 .

**Medic Sanic, M; Jasprica, I; Smolcic Bubalo, A; et Mornar, A. (2004).** Optimization of chromatographic conditions in thin layer chromatography of flavonoides and phenolic acids, *Croatica Chemica Acta*, p 361-366 .

**Milane, H ; (2004).** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres, études et applications thérapeutiques. Thèse en vue de l'obtention du grade de docteur en science. Université Louis Pasteur. Strasbourg.

**Miller, H.E. (1971).** A simplified method for the evaluation of antioxidants, *J Am Oil Chem Soc*, 48 : 91.

**Miller, N.J ; Sampson, J ; Candeias, L.P., et al. (1996).** Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls, *FEBS Lett*, 384 : 240-2.

**Miller, N.J ; Rice-Evans, C.A. (1997).** The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink, *Food Chem*, 60 : 331-7.

**Mimica-Dukić, N ; Bugarin, D ; Grbović, S ; Mitić-Ćulafić, D ; Vuković-Gačić ,B ; Orčić, D ; Jovin, E ; et Couladis, M. (2010).** Essential Oil of *Myrtus communis* L. As a Potential Antioxidant and Antimutagenic Agents, 15: 2759-2770.

**Molyneux, P; (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Song Klama Karin J.Sci. Technol*, 26 (2): 211-219.

**Montoro, P; Tuberoso, C.I.G; Perrone, A; Piacente, S; Cabras, P; Pizza, C. (2006a).** Characterisation by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry of anthocyanins in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur, *J. Chromatogr. A*, 1112, 232–240.

**Montoro, P; Tuberoso, C.I.G; Piacente, S; Perrone, A; De Feo, V; Cabras, P; Pizza, C. (2006b).** Stability and antioxidant activity of polyphenols in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur, *J. Pharm. Biomed. Anal*, 41: 1614–1619.

**Moure, A ; Franco, D ; Sineiro, J ; Domínguez, H ; Núñez, M.J, Lema, J.M. (2000).** Evaluation of extracts from Gevuina avellana hulls as antioxidants, *J Agric Food Chem*, 48 : 3890-7.

**Moure, A; Cruz, J.M; Franco, D; Dominguez , J.M. et Sineiro, J. (2001).** Natural antioxidants from residual sources, *Food Chemistry*, 72: 145-171.

**Namiki, M. (1990).** Antioxidants/Antimutagens in Food. CRC critical reviews in *Food Science and Nutrition*, 29: 273-300.

**Ohrvall, M; et al. (1996).** Tocopherols and heart disease nutrition report: 20/ Gamma, but not alpha, tocopherol levels in serum are reduced in coronary heart disease patients, *Journal of Internal Medicine*, 239:111-117.

**Oyaizu, M. (1986).** Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine, *Japanese Journal of Nutrition*, 44: 307-315.

**Ozturk, M; Aydogmus-Ozturk, F; Duru, M.E; Topcu, G. (2007).** Antioxidant activity of stem and root extracts of rhubarb (*Rheum ribes*): an edible medicinal plant, *Food Chemistry*, 106: 1264-1270.

**Packer, L; Tritschler, H.J; and Wessel ,K .(1997).** Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha – lipoic acid, *Free Radic Biol Med*, 22: 359 – 378.

**Parejo I; Viladomat F; Bastida J; Rosas-Romero A; Flerlage N; Burillo J; Codina C. (2002).** Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *J Agric Food Chem*; 50: 6882–90.

**Parejo, I ; Viladomat, F ; Bastida, J ; et al. (2003).** Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity, *Life Sci*, 73 : 1667-81.

**Paris , R ; et Moyses, H. (1969).** Précis de matière médicinale. Paris : Masson.

**Pietta, P.G. (2000).** Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63: 1035-1042.

**Pincemail ,J ; Defraigne, J.D. ( 2004).** Les antioxydants un vaste réseau de défenses pour lutter contre les effets toxiques de l'oxygène. Service de Chirurgie Cardio-vasculaire, Pro biox SA. Sart Tilman 4000 Liège, Belgique.

**Pokorny, J; Yanishlieva, N; Gordon, M. (2001).** Antioxydants in food, Practical applications. Woolhead Publishing Limited. ISBN: 185573-463X.

**Pratt, D; Miller, E. (1984).** A flavonoid antioxidant in spanish peanuts (*Arachia hypogoea*), *J Am Oil Chem Soc*; 61: 1064-7.

**Price, M.L; Van scoyoc, S; et Butler, L.G. (1978).** A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain, *J. Agric. Food Chem*, 26: 1214-1218.

**Pulido, R; Bravo, L; Saura-Calixto, F. (2000).** Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay, *J Agric Food Chem*, 48 (8): 3396 -3402.

**Quezel, P ; et Santa, S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionale. Tome II Edition. CNRS. Paris.

**Re, R ; Pellegrini, N ; Proteggente, A ; et al. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic Biol Med*, 26 : 1231-7.

**Read, G ; Randat, R. (1988).** Structure and properties of thiobarbituric acid malonaldehyde chromogen, *J. Chem. Soc*, 1103-1105.

- Recio, M.C; Rios, J. L; Villar, A. (1989).** A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988, *Phototherapy. Res.*, 3, 117-125.
- Resch, M; Steigel, A; Chem, Z . L; et Bauer, R. (1998).** 5-Lipoxygenase and cyclooxygenase-1 inhibitory active compounds from *Atractylodes lancea*, *J. Nat. Prod.*, 61 : 347-350.
- Ribereau, G.P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux, Dunod, Paris, p254.
- Rice-Evans, C.A; Miller, N. J; Bolwer, P.G; Bramley, P.M. and Ridham, J.B. (1995).** The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids, *Free Rad. Res.*, 22: 375-383.
- Rizk, A.M. (1982).** Constituents of plants growing in Qatar. *Fitoterrapia*, 52 (2) : 35-42.
- Rock, E. (2003).** Stress oxydant, micronutriments et santé. Inra – CRNH, unité des maladies métaboliques et micronutriments 63122 St Genès Champanelle. Université d'été de nutrition – Clermont- Fenand , 37-42.
- Romani, A ; Pinelli, P ; Mulinacci, N ; Vincieri, F.F ; Tattini, M ; (1999).** Identification and quantitation of polyphenols in leaves of *Myrtus communis* L, *Chromatographia* 49: 17–20.
- Romani, A ; Pinelli, P ; Galardi, N ; Mulinacci, N ; & Tattini, M. (2002).** Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L, *Phytochemical Analysis*, 13: 79 86.
- Romani, A ; Coinu, R ; Carta, S ; Pinelli, P ; Galardi, C ; Vincieri, F ; et al. (2004).** Evaluation of Antioxidant effect of different extracts of *Myrtus communis* L, *Free Radical Research*, 38: 97–103.
- Schlesier, K; Harwat, M; Böhm, V; Bitsch, R. (2002).** Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods, *Free Radic Res*; 36(2): 177–87.
- Singleton, V.L ; Rossi, J.A .(1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158.
- Slivka, A; Cohen, G; (1985).** Hydroxyl Radical attack on dopamine, *J. Biol. Chem.*, 15466-15472.
- Stamler, J.S; slivka, A. (1996).** Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular- related disease, *Nuts Rev* , 54: 1 – 30.
- Su, M.S ; Shyu, Y.T ; Chien, P.J. (2008).** Antioxydant activities of vtrus herbal product extracts, *Food Chemistry*, 111: 892-896.
- Thomas, O.P. (2009).** Métabolisme secondaire et Biosynthèse. Master 2 VEM. Univesité Nice Sophia Antipolis.

**Tian ,F; Li ,B; Yang, J; Zhang ,G; Chen , Y; Luo, Y. (2009).** Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities, *Food Chemistry*, 113: 173-179.

**Trease, E; et Evans, W.C .(1987).** Pharmacognosie, Billiaire Tindall. London 13 th Edition. P 61-62. In Karumi Y, Onyeyili PA et Ogugduaja VO, 2004. Identification des principes actifs de l'extrait de feuilles de *M. balsamia* (Baume du pomme). *Journal of Medicine and scientific*. 4(3), 179-182. Nigeria. ISSN 1682-4474.

**Umadevi, I ; Daniel, M ; Sabnis, S. D. (1988).** Chemotaxonomic studies on some members of Anardiaceae. In Proceedings of the Indian Academy of Sciences – Plant sciences, 98(3), p. 205–208.

**Van Den Berg, R ; Haenen, G.R ; Van Den Berg, H ; et al. (2000).** The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay, *Food Chem*, 70 : 391-5.

**Velioglu ,Y.S; Mazza, G; Gao ,L; Oomah, B.D. (1998).** Antioxidant activity and total phenolics in; selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agric Food Chem*, 46: 4113–17.

**Vermerris, W. (2006).** Phenolic compound biochemistry, Springer, Dordrecht. ISBN-10 1-4020-5163-8 (HB).

**Vinson, J.A; Dabbagh, Y.A; Serry, M.M., Jang ,J. (1995).** Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *J Agric Food Chem*; 43: 2800–02.

**Von Gadow, A; Joubert, E; Hansmann, C.F. (1997).** Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*),  $\alpha$ -tocopherol, BHT, and BHA. *J Agric Food Chem*, 45 : 632-8.

**Wanasundara, U.N; Shahidi, F. (1994).** Stabilization of canola oil with flavonoids. *Food Chemistry*, 50: 393-396.

**Wannes ,W.A; Mhamdi, B; Sriti ,J; Ben Jemia ,M; Ouchikh ,O; Hamdaoui ,G; Kchouk ,me; Marzouk, B. (2010).** Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis var. italica* L.) leaf stem and flower, *Food and Chemical Toxicology*, 48: 1362–1370.

**Yan, J; Guo, J; Yuan ,J .(2008).** In vitro antioxyadnt properties of rutin, *LWT*, 41: 1060-1066.

**Yildirim, A; Mavi ,A; Kara, A.A. (2001).** Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4083-4089.

**Yoshikawa, M; Harada, E; Naitoh, Y; Inoue, K; Matsouda, H; Shimoda, H; Yamahara, J. et Murakami, N. (1994).** Developpement of bioactive Function in *Hydrangeae dulcis*

folium. III. On the antiallergic and antimicrobial Principles of *Hydrangeae dulcis folium*, *Chem. Pharm. Bull*, 42: 2225-2230.

**Yoshimura, M; Amakura, Y; Tokuhara, M; Yoshida, T. (2008).** Polyphenolic compounds isolated from the leaves of *Myrtus communis*. *J. Nat. Med.* 62: 366–368.

**Yu, R; Mandlekar, S; Tony Kong, A.N. (2000).** "Molecular mechanisms of butylated hydroxyanisoleinduced toxicity: induction of apoptosis through direct release of cytochrome c". *Molecular Pharmacology*, 58: 431- 437. EPHE

**Zhang, S.Y; Zheng, C.G; Yan, X.Y; Tian, W.X. (2008).** Low concentration of condensed tannins from catechu significantly inhibits fatty acid synthase and growth of MCF-7 cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 371: 654-658.

**Zhishen, J; Mengcheng, T; Jianming, W. (1999).** The determination of flavonoid contents in mulberry and their scanenging effects on superoxide radicals, *Food chemistry*, 64 (4): 555-559.

# Annexes

## Annexe 1 : Réactifs de caractérisation

### Ø Amidon

L'amidon est caractérisé par un réactif spécifique connu sous le nom d'amidon. Ce dernier a été préparé comme suit :

- ü Dissoudre 1,2 g d'iode dans 50 ml d'eau distillée contenant 2,5 g d'iodure de potassium ;
- ü Chauffer pendant 5 minutes ;
- ü Diluer jusqu'à 500 ml.

La détection d'amidon s'effectue comme suit :

- ü Chauffer 5 ml de la solution à tester avec 10 ml d'une solution de NaCl saturée dans un bain-marie jusqu'à ébullition ;
- ü Ajouter le réactif d'amidon.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-violacée.

### Ø Alcaloïdes

La caractérisation des alcaloïdes se fait par :

- **Réactif de Mayer** : la préparation de ce réactif s'effectue comme suit :
  - ü Dissoudre 1,358 g de  $HgCl_2$  dans 60 ml d'eau ;
  - ü Dissoudre 5 g de KI dans 10 ml d'eau ;
  - ü Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100 ml d'eau.

Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un précipité blanc

- **Réactif de Wagner** : ce réactif a été préparé comme suit :
  - ü Dissoudre 2 g de KI et 1,27 de  $I_2$  dans 75 ml d'eau ;
  - ü Ajuster le volume total à 100 ml d'eau.

Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un précipité brun.



**Annexe 2 : Calculs des teneurs des phénols totaux de différentes parties de *Myrtus communis* L**

<b>Parties étudiées</b>	<b>Densité optique moyenne</b>	<b>Concentrations à partir de l'équation (mg/ml)</b>	<b>Concentration des phénols totaux (mg/g)</b>
<b>Feuilles</b>	0,386	39,746	119,23 ± 0,77
<b>Tiges</b>	0,366	37,654	112,96 ± 0,53
<b>Fruits</b>	0,227	23,422	70,26 ± 0,71

**Annexe 3 : Calculs des teneurs des flavonoïdes de différentes parties de *Myrtus communis* L**

<b>Parties étudiées</b>	<b>Densité optique moyenne</b>	<b>Concentrations à partir de l'équation (mg/ml)</b>	<b>Concentration des phénols totaux (mg/g)</b>
<b>Feuilles</b>	0,111	2,187	6,56 ± 0,57
<b>Tiges</b>	0,104	2,037	6,11 ± 0,30
<b>Fruits</b>	0,066	1,292	3,87 ± 0,25

**Annexe 4 : Calculs des teneurs des tanins de différentes parties de *Myrtus communis* L**

<b>Parties étudiées</b>	<b>Densité optique moyenne</b>	<b>Concentrations à partir de l'équation (mg/ml)</b>	<b>Concentration des phénols totaux (mg/g)</b>
<b>Feuilles</b>	0,533	4,593	13,78 ± 0,89
<b>Tiges</b>	0,869	7,490	22,47 ± 0,70
<b>Fruits</b>	1,053	9,069	27,20 ± 1,086

**Annexe 5 : Résultats de l'analyse FRAP trouvés pour les extraits bruts des trois parties de *Myrtus communis L***

Extrait étudié	Concentrations (g/l)	Feuilles	Tiges	Fruits
		Densité optique		
Extrait brut	0,1	0,021±0,010	0,0015±0,0007	0,0015±0,0007
	0,2	0,230± 0,016	0,0055± 0,0007	0,0055± 0,0007
	0,3	0,497±0,007	0,0105±0,0007	0,0095±0,0007
	0,4	0,891±0,108	0,012±0,001	0,0115±0,0007
	0,5	1,375±0,050	0,0245±0,006	0,0185±0,0021

**Annexe 6 : Résultats de l'analyse FRAP trouvés pour les fractions acétate d'éthyle (Flavonoïdes) des trois parties de *Myrtus communis L***

Extrait étudié	Concentrations (g/l)	Feuilles	Tiges	Fruits
		Densité optique		
Fraction acétate d'éthyle	0,1	0,0215±0,010	0,0015±0,0007	0,0015±0,0007
	0,2	0,2305± 0,016	0,0055± 0,0007	0,0055±0,0007
	0,3	0,4975±0,007	0,0105±0,0007	0,0095±0,0007
	0,4	0,8915±0,108	0,012±0,0014	0,0115±0,0007
	0,5	1,375±0,050	0,0245±0,0063	0,0185±0,0021

**Annexe 7 : Résultats de l'analyse FRAP trouvés pour les fractions butanoliques (Flavonoïdes) des trois parties de *Myrtus communis L***

Extrait étudié	Concentrations (g/l)	Feuilles	Tiges	Fruits
		Densité optique		
Fraction n-butanol	0,1	0,028±0,001	0,0015±0,0007	0,001±00
	0,2	0,3335± 0,004	0,0055±0,002	0,0045±0,0007
	0,3	0,729±0,084	0,011±0,001	0,011±00
	0,4	1,0725±0,060	0,0525±0,007	0,0535±0,0007
	0,5	1,37±0,001	0,11±0,002	0,1025±0,0190

**Annexe 8 : Résultats de l'analyse FRAP trouvés pour les extraits des tanins des trois parties de *Myrtus communis L***

Extrait étudié	Concentrations (g/l)	Feuilles	Tiges	Fruits
		Densité optique		
Tanins	0,1	0,0015±0,0007	0,0025±0,0007	0,0015±0,0007
	0,2	0,043±0,0008	0,0065±0,0007	0,0045±0,0007
	0,3	0,22±0,0038	0,011±0,001	0,0445±0,012
	0,4	0,365±0,090	0,032±0,001	0,1465±0,016
	0,5	0,771±0,012	0,16±0,001	0,2715±0,013

**Annexe 9 : Résultats de l'analyse FRAP trouvés pour l'extrait des anthocyanes des trois parties de *Myrtus communis L***

Extrait étudié	Concentrations (g/l)	Fruits
		Densité optique
Anthocyanes	0,1	0,1815±0,00063
	0,2	0,429±00
	0,3	0,775±0,029
	0,4	1,045±0,028
	0,5	1,5555±0,016

**Annexe 10 : Résultats du piégeage du radical libre DPPH trouvés pour les extraits bruts des trois parties de *Myrtus communis* L**

Extrait étudié	Feuilles			Tiges			Fruits		
	[C] mg/ml	DO	% I	[C] mg/ml	DO	% I	[C] mg/ml	DO	% I
Extrait brut	3	0,0275	95,92±0,104	3	0,017	97,48±0,419	3	0,04	94,07±0,838
	2	0,03	95,55±0,209	2	0,032	95,25±0,209	2	0,131	80,59±0,209
	1	0,106	84,29±1,88	1	0,034	94,96±0,209	1	0,3735	44,66±0,942
	0,5	0,335	50,37±2,095	0,5	0,1775	73,70±2,828	0,5	0,507	24,88±0,209
	0,25	0,5215	22,74±1,361	0,25	0,368	45,48±5,447	0,25	0,5655	16,22±0,523
	0,125	0,585	13,33±0,628	0,125	0,463	31,40±0,209	0,125	0,5875	12,96±0,104
	0,0625	0,6085	9,85±0,733	0,0625	0,5335	20,96±0,733	0,0625	0,598	11,40±0,209
	0,03125	0,6125	9,25±0,523	0,03125	0,5475	18,88±0,523	0,03125	0,601	10,96±0,209

**Annexe 11 : Résultats du piégeage du radical libre DPPH trouvés pour les fractions acétate d'éthyle (Flavonoïdes) des trois parties de *Myrtus communis* L**

Extrait étudié	Feuilles			Tiges			Fruits		
	[C] mg/ml	DO	% I	[C] mg/ml	DO	% I	[C] mg/ml	DO	% I
Fraction Acétate d'éthyle	3	0,0085	98,49±0,125	3	0,068	87,96±0,25	3	0,0115	97,96±0,375
	2	0,0225	96,01±0,625	2	0,1025	81,85±0,87	2	0,037	93,45±1,501
	1	0,042	92,56±0,750	1	0,2725	51,76±1,126	1	0,1765	68,76±1,626
	0,5	0,0525	90,70±0,625	0,5	0,374	33,80±0,50	0,5	0,3415	39,55±0,375
	0,25	0,0625	88,93±0,625	0,25	0,4415	21,85±2,628	0,25	0,4035	28,58±11,63
	0,125	0,2525	55,30±0,375	0,125	0,4655	17,61±0,375	0,125	0,463	18,05±0,250
	0,0625	0,389	31,15±2,252	0,0625	0,472	16,46±0,250	0,0625	0,4755	15,84±0,625
	0,03125	0,44	22,12±00	0,03125	0,493	12,74±050	0,03125	0,494	12,56±0,750

**Annexe 12 : Résultats du piégeage du radical libre DPPH trouvés pour les fractions butanoliques (Flavonoïdes) des trois parties de *Myrtus communis* L**

Extrait étudié	Feuilles			Tiges			Fruits		
	[C] mg/ml	DO	% I	[C] mg/ml	DO	% I	[C] mg/ml	DO	% I
Fraction n-butanol	3	0,0095	98,72±0,095	3	0,0515	93,07±0,285	3	0,0275	96,30±0,475
	2	0,0265	96,43±0,095	2	0,066	91,12±1,141	2	0,033	95,56±0,570
	1	0,037	95,02±0,190	1	0,228	69,33±1,521	1	0,144	80,63±4,374
	0,5	0,0765	89,71±2,758	0,5	0,422	43,24±1,711	0,5	0,4055	45,46±3,328
	0,25	0,3785	49,09±1,616	0,25	0,560	24,68±2,472	0,25	0,578	22,25±0,951
	0,125	0,5435	26,89±0,285	0,125	0,6055	18,56±4,660	0,125	0,6265	15,73±0,285
	0,0625	0,599	19,43±0,760	0,0625	0,6535	12,10±0,855	0,0625	0,6505	12,50±1,236
	0,03125	0,6585	11,43±1,236	0,03125	0,680	8,54±0,380	0,03125	0,693	6,79±0,570

**Annexe 13 : Résultats du piégeage du radical libre DPPH trouvés pour les extraits des tanins des trois parties de *Myrtus communis* L**

Extrait étudié	Feuilles			Tiges			Fruits		
	[C] mg/ml	DO	% I	[C] mg/ml	DO	% I	[C] mg/ml	DO	% I
Tanins	3	0,0385	94,4±0,102	3	0,0175	97,45±0,102	3	0,026	96,21±0,617
	2	0,0515	92,50±0,102	2	0,0385	94,4±0,719	2	0,039	94,32±0,205
	1	0,057	91,70±0,205	1	0,079	88,50±0,617	1	0,0775	88,72±0,925
	0,5	0,1065	84,50±0,308	0,5	0,254	63,05±0,205	0,5	0,264	61,6±0,411
	0,25	0,354	48,50±0,205	0,25	0,4025	41,45±2,777	0,25	0,455	33,81±1,439
	0,125	0,4865	29,23±3,188	0,125	0,5235	23,85±0,308	0,125	0,5295	22,98±1,542
	0,0625	0,569	17,23±2,159	0,0625	0,531	22,76±0,205	0,0625	0,5425	21,09±0,308
	0,03125	0,598	13,01±0,205	0,03125	0,5655	17,74±0,308	0,03125	0,5685	17,30±0,102

**Annexe 14 : Résultats du piégeage du radical libre DPPH trouvés pour l'extrait des anthocyanes des fruits de *Myrtus communis* L**

Extrait étudié	Fruits		
	[C] mg/ml	DO	% I
Anthocyanes	3	0,0085	99,12±0,072
	2	0,012	98,76±0,290
	1	0,046	95,27±0,290
	0,5	0,1415	85,45±0,654
	0,25	0,462	52,51±1,744
	0,125	0,644	33,81±1,598
	0,0625	0,7735	20,50±1,380
	0,03125	0,8545	12,17±0,218

## الملخص

جزء كبير من البحوث المهمة حاليا تعمل على دراسة الجزئيات الطبيعية المضادة للأكسدة. يهدف عملنا هذا إلى الدراسة الفيتو كيميائية و النشاط المضاد للأكسدة لمستخلصات ثلاث أجزاء من *Myrtus communis* L. (أوراق، ساق، ثمار).

الفحص الفيتو كيميائي المحقق سمح لنا بإظهار الفلافونويدات، تانان، ستيروول و تريটারبان في الأجزاء الثلاثة للنبتة و بوجود الأنتوسيانان في الثمار فقط. كمية الفينولات متنوعة. مستخلص الأوراق يمثل الكمية المرتفعة (119.23 مغ مع معادل حمض الغاليك/غ). بالنسبة للساق فتمثل (112.96 مغ مع معادل حمض الغاليك/غ). أما بالنسبة للثمار فتمثل (70.26 مغ مع معادل حمض الغاليك/غ). كمية الفلافونويدات تمثل (6.56 و 6.11 مغ مع معادل الكاتشين/غ). بالنسبة للأوراق والساق على الترتيب أما بالنسبة للثمار فتمثل  $0.25 \pm 3.87$  مغ مع معادل الكاتشين/غ. الكمية العالية للثمار شاهدناها في الثمار (27.20 مغ مع معادل الكاتشين/غ) ثم الساق (22.47 مغ مع معادل الكاتشين/غ) و الأوراق (13.78 مغ مع معادل الكاتشين/غ). أظهر التحليل الكروماتوغرافي على الطبقة الرقيقة للفلافونويدات عن وجود الكاتشين في الأوراق و الساق، الكارستين في الثمار، كما قام بإظهار وجود حمض الغاليك في معظم المستخلصات المفحوصة.

تمت دراسة النشاط المضاد للأكسدة لمختلف المستخلصات بواسطة طريقتين، إرجاع الحديد و تثبيط الجذر الحر DPPH. القدرة على إرجاع الحديد معتبرة عند أنتوسيانان الثمار و المستخلصات الفلافونودية للأوراق كما يمثل مستخلص خلاص الإيتيل نشاط مضاد للأكسدة ذو أهمية كبيرة ( $IC_{50} = 0.098$  مغ/مل) و قدرته على تثبيط الجذر الحر DPPH عالية بالمقارنة مع حمض الأسكوربيك ( $IC_{50} = 0.12$  مغ/مل)

**الكلمات المفتاحية:** *Myrtus communis* L.: دراسة فيتوكيميائية فلافونويدات، تانان، أنتوسيانان، النشاط المضاد للأكسدة، DPPH و FRAP

## Résumé

Une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude de molécules antioxydantes d'origine naturelle. Notre travail vise à faire une étude phytochimique et l'activité antioxydante des extraits de trois parties de *Myrtus communis* L. Feuilles, tiges et fruits.

Les tests phytochimiques réalisés ont permis de mettre en évidence des flavonoïdes, des tanins, des stérols et triterpènes dans les trois parties de la plante ainsi que la présence des anthocyanes dans les fruits.

La teneur en phénols totaux est variable. L'extrait brut des feuilles a présenté la teneur la plus élevée, (119,23 mg GAE/g), pour les tiges, elle est de (112,96 mg GAE/g), alors que pour les fruits, elle est de (70,26 mg GAE/g). Les flavonoïdes ont été obtenus avec des teneurs de (6,56 et 6,11 mg EC/g) respectivement pour les feuilles et les tiges, alors que pour les fruits la teneur est de (3,87 mg EC/g). La teneur la plus élevée des tanins est observé dans les fruits (27,20 mg EC/g) puis les tiges (22,47 mg EC/g) et les feuilles (13,78 mg EC/g).

L'analyse qualitative des flavonoïdes des trois parties de la plante par chromatographie sur couche mince a révélé la présence de la catéchine dans les feuilles et les tiges, la quercétine dans les fruits ainsi on a pu identifier la présence de l'acide gallique dans la majorité des fractions testées.

L'activité antioxydante des différents extraits a été évaluée par deux méthodes ; la réduction du fer et le piégeage du radical libre DPPH. La capacité de réduction de fer est remarquable dans l'extrait des anthocyanes des fruits et dans les deux fractions flavoniques des feuilles. La fraction acétate d'éthyle des feuilles a présenté une activité antioxydante intéressante ( $IC_{50} = 0.098$  mg/ml) et qui est supérieur à la capacité du piégeage du radical DPPH de l'acide ascorbique dont  $IC_{50} = 0.12$  mg/ml.

**Mots clés :** *Myrtus communis* L., étude phytochimique, flavonoïdes, tanins, anthocyanes, activité antioxydante, FRAP et DPPH.

## Abstract

Most of interest of corrent research relates to study the natural antioxydant molecules. Our work aim is to study a phytochemical and antioxydant activity of *Myrtus communis* L. Leaves, stems, and berries.

The phytochemical tests realized can be to highlight the flavonoïdes, tannins, sterols and triterpenes in the three parts of the plant as well as the presence of the anthocyanes in the berries.

The total phenol content was varied. Leaves extract presented higher total phenol contents (119,23 mg GAE/g) than stems (112, mg GAE/g) and berries (70,26 mg GAE/g). The flavonoïdes contents (6,56 et 6,11 mg EC/g) respectively for leaves and stems, so the berries contents were (3,87 mg EC/g). The highest contents of tannins were observed in berries (3,87 mg EC/g), stems (22,47 mg EC/g) and leaves (13,78 mg EC/g).

The Qualitative analysis of the flavonoids of the three parts of plant by thin layer chromatography exposed us the presence of catechin in leaves and stem, quercetin in the berries, thus , we could identify the presence of a gallic acid in the majority of fractions tested.

The antioxydant activity were evaluated using different extracts including : reducing power and free radical scavenging activity. The capacity of reducing power was important in anthocyanins of berries and the two flavonic fractions of leaves. The ethyl acetate fraction of leaves presented an interesting antioxydant activity ( $IC_{50} = 0.098$  mg/ml) which was higher than the capacity of DPPH free radical scavenging of ascorbic acid ( $IC_{50} = 0.12$  mg/ml).

**Key words :** *Myrtus communis* L., phytochemical study, flavonoids, tannins, anthocyanins antioxydant activity, FRAP and DPPH.