



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

UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA -1

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOTECHNOLOGIE ET AGROECOLOGIE

Projet de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master
Spécialité

Biotechnologie et valorisation des plantes

Thème

Valorisation d'une plante médicinale et aromatique
(Myrtuscommunis)

Présenté par :

- HADEF Chaima
- HADJALLAH Selma

Devant le jury :

Dr GHANAI	R	USDB -1-	MCB	Présidente
Dr ARAR	K	USDB -1-	MAA	Promotrice
Dr AYADI	R	USDB -1-	MCA	Examinatrice

ANNÉE UNNIVERSITAIRE 2020/2021

Remercîments

En préambule à ce mémoire, nous tenons tout d'abord à remercier **ALLAH** le tout puissant et miséricordieux, qui nous aide et qui nous a donné la force, le courage et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à remercier notre promotrice **Mme ARAR K**, pour ses précieux conseils, son aide, sa disponibilité, ses compétences scientifiques, son soutien et sa gentillesse durant toute la période du travail.

Nos vifs remerciements vont à **Mme GHANAI R** qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de mémoire, hommages respectueux.

Nos sincères remerciements vont également s'adressent à madame l'examinatrice **AYADI R**.

Nos remerciements s'étendent également à tous nos enseignants durant les années des études.

Nos remerciements également **Mr LOUNIS ARSLENE** co promoteur à CRD SAIDAL pour nous avoir guidés dans la réalisation de ce travail, qui' il trouve ici l'expression de notre sincères reconnaissance.

Nous remercions nos très chers parents qui ont toujours été là pour nous.

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

Merci à tous et à toutes.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études,

*A mes chères sœurs **IMENE, ZOLA, MALEK, CHAHRAZAD, FAIZA, KHAOULA**, et mon unique frère **YOUCEF** pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral, et leur encouragement,*

*A tous mes amis **MANEL, FAROUDJA, KHADIDJA, MOHAMED, ACHRAF, DHYAA** et **ABDOU** qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de succès.*

*A mes collègues **SELMA ET SARA***

Merci d'être toujours là pour moi.

Merci pour tous les personnes qui m'ont donné une aide ou une critique qui aurait pu améliorer mon travail

Hadef Chaima

Dédicaces

A la mémoire de mon grand - père Hadjala Ahmed et de ma grand - mère Tobji Fatma Zohra qui nous ont quittés en laissant un grand vide dans nos cœurs, que dieu accueille en son vaste paradis.

A la lumière de ms jours, mon exemple eternel, a ceux qui me sont les plus chères ou monde, mes parents Farid et Naima que dieu les protèges, en témoignage de mon amour, respect et admiration, ce travail est en partie le fruit de leur soutien et de leurs encouragements.

A ma grand mère Fatma Zohra que dieu la préserve et a mon grand - père qui nous à quittés Abderrahmane.

A mes frères Nadir, Toufik et Mohamed que j'aime plus que tous,

A mes belles sœurs Amina, Khaoula et Djihene

A mes tentes, mes oncles, mes cousins et cousines.

A mes meilleurs amies, Sara, Rania , Wardia , Maissa Fatima et Amina , merci de toujours être la pour moi, merci pour votre soutien et vos encouragement tout au long du chemin

A mes rencontrés d L'USDB , merci d'avoir fait de ces 5 années la période la plus belle et enrichissante de ma vie.

Enfin merci a tous ceux et celles qui nous ont aides d'une façon ou d'une autre dans notre travail, merci du fond du cœur

Hadjallah Selma

Résumé :

Appartenant de la famille des myrtacées, Myrtus Communis L. Espèces des hauts montagnes Algériens, est riche en huiles essentielles étudiée pour leurs activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique).

Le procédé d'hydro distillation a donné un rendement important calculé à 0.27% et le screening chimique montre que la plante riche en flavonoïdes, et en alcaloïde, et une quantité moyenne des tanins, glucosides, proanthocyanidols. L'amidon, saponosodes et l'Iridoïde sont totalement absents dans la partie des feuilles .Ainsi, L'activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique) montre que les huiles essentielle de Myrtus Communis L à une activité contre une large gamme de bactérie et levures .

Formulation d'une pommade à base d'huiles essentielle de Myrtus Communis L, contrôler sa Ph et sa densité. C'est une pommade antibactérienne.

Mots-clés :

Huiles essentielle, Myrtus Communis L, Antifongique, Antibactérienne, Pommade.

Promotion of a medicinal and aromatic plant (Myrtus communis)

Summary

Myrtus Communis L belongs to the family Myrtaceae.

An Algerian high mountain species, rich in essential oils that have been studied for their antimicrobial (antibacterial and antifungal) activity.

The hydrodistillation process gave a high extraction yield of 0.27% and the chemical examination showed that the plant is rich in flavonoids, alkaloids and an average amount of tannins, glucosides and proanthocyanidols. Starch, saponin and iridoids are completely absent in the leaf part. Thus, the antimicrobial activity (antibacterial and antifungal) demonstrates that the essential oils of Myrtus Communis L have activity against a wide range of bacteria and yeasts.

The formulation of the ointment based on the essential oils of Myrtus COMMUNIS controls the pH and density. It is an antibacterial ointment.

Keywords :

Essential oils, Myrtus Communis L, antifungal, antibacterial ointment.

الترويج لنبات طبي وعطري (*Myrtus communis*)

ملخص

Myrtaceae تنتمي الى عائلة Myrtus Communis L

من انواع اعالي الجبال الجزائرية غنية بالزيوت الاساسية التي تمت دراستها لنشاطها كمضاد للمكروبات (مضاد للجراثيم و مضاد للفطريات).

اعطت عملية التقطير المائي انتاجية عالية محسوبة بنسبة 0.27% و اظهر الفحص الكيميائي ان النبات غني بلفلافونويد و القلويد و متوسط كمية التانينات و الجلوكوزيدات و البروانثوسيانيدول. النشا السابونوزود و القزحية غائبة تماما في جزء الاوراق. و هكذا فان النشاط المضاد للمكروبات (ضاد للبكتيريات و مضاد للفطريات) يوضح ان الزيوت الاساسية من *Myrtus Communis L* لها نشاط ضد مجموعة وايعة من البكتيريا و الخمائر.

تتحطم تركيبة المرهم عاى اساس الزيوت الاساسية من *Myrtus Communis L* في درجة الحموضة و الكثافة. انه مرهم مضاد للبكتيريا.

الكلمات المفتاحية :

Myrtus Communis L مضاد للبكتيريا مرهم ,, مضاد للفطريات, زيوت عطرية

Table des matière :

Remerciements / Dédicaces	
Résumé	
Liste des figures / Liste des tableaux	
Liste des annexes / Liste des abréviations	
Glossaire	
Introduction	2

Partie I : Etude bibliographique

Chapitre 1 : Généralité sur les plantes aromatiques et médicinales

1.1. Définition des plantes aromatiques et médicinales	4
1.2. Importance des plantes aromatiques et médicinales	4
1.2.1. Composées des plantes aromatiques et médicinales	4
1.2.2. Phytothérapie	6
1.2.3. Les métabolismes secondaires	7

Chapitre 2 : Synthèse bibliographique sur *Myrtus communis*

2. Présentation de la plante étudiée (<i>Myrtus</i>)	9
2.1. Description botanique de la plante <i>Myrtus communis</i> L.	9
2.1.1. Le genre <i>Myrtus</i> L.	9
2.1.2. L'espèce <i>Myrtus communis</i> L.	9
2.1.3. Position systématique	10
2.1.4. Classification phylogénétique	10
2.2. Localisation et répartition géographique	11
2.2.1. Dans le monde	11
2.2.2. En Algérie	11

2.3. Culture : Exigences du sol et conditions climatiques	12
2.3.1. Caractéristiques du sol	12
2.3.2. Caractéristiques climatiques	12

Chapitre : Les huiles essentielles

3.1. Les huiles essentielles	14
3.1.1. Définitions des huiles essentielles	14
3.1.2. Composition chimique d'HE de Myrtus	14
3.1.3. Propriété pharmacologiques de l'HE de Myrtus	14
3.1.4. Propriété physico-chimiques des HE	15
3.2. Méthodes d'extractions des huiles essentielles	16
3.2.1. L'hydro-distillation	16
3.2.2. La distillation par entrainement à la vapeur	17
3.2.3. L'extraction par pression à froid ou expression	17
3.2.4. L'extraction au CO2 supercritique	18
3.2.5. L'extraction par solvant	19
3.2.6. Conservation Des HE	19
3.2.7. Précaution des HE	20

Partie II : Partie expérimentale

Chapitre 1 : Matériels et méthodes

1. Matériel végétal	23
1.1. Récolte et identification	23
1.2. Les caractéristiques du Myrtus	24
2. Préparation des extraits	25
2.1. Extraction par hydro-distillation	25
2.2. Extraction par solvant (solide-liquide)	26

2.3. Extraction a froid par macération	28
3. Test phytochimique (screening chimique)	29
4. Analyse quantitative des composés phénoliques de Myrtus communis	31
4.1. Dosage des polyphénols totaux	31
4.2. Dosage des flavonoïdes totaux	33
5. Etude de l'activité antimicrobienne des deux extraits d'huile essentielle et l'extrait par solvant	34
5.1. Les souches microbiennes utilisées	34
5.1.1 Souches bactériennes	34
5.1.2. Souches fongiques	35
5.2. Les milieux de cultures utilisés	35
5.3. Repiquages des souches microbiennes	35
5.4. Protocole expérimental	36
5.5. Expression des résultats	38
6. Réalisation d'une formulation pharmaceutique	39
6.1. Formulation d'une pommade	39
6.2. La pommade anti-inflammatoire	39
6.3. Méthodologie de travail	39
6.4. Mode opératoire	40
6.4.1. Description du procédé de formulation	40
6.5. Les tests et les activités effectués sur la pommade	41
6.5.1. Contrôle du ph	41

Chapitre 2 : Résultats et discussion

1. Rendement en huiles essentielles	44
-------------------------------------------	----

2. Test phytochimique (screening chimique)	45
3. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles	47
3.1. Dosage des phénols totaux	47
3.2. Dosage des flavonoïdes totaux	48
4. Activités antimicrobiennes de l'huiles essentielle et de l'extrait méthanolique	49
5. Caractères organoleptiques.....	53
Conclusion	55
Références bibliographiques	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : caractéristiques du Myrtus	24
Tableau 2 : Analyse quantitative des composés phénolique de Myrtus communi.....	31
Tableau 3 : Les souches microbiennes utilisées lors de l'évaluation de l'activité Antimicrobien.....	35
Tableau 4 : Composition de produit préparé à base d'huile essentielle de Myrtus communis	39
Tableau 5 : caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle	44
Tableau 6 : Rendement en pourcentage d'huile essentielle	44
Tableau 7 Résultats des testes phytochimiques (screening chimique)	47
Tableau 8 : Résultats du dosage des phénols totaux	48
Tableau 9 : Résultats du dosage des flavonoïdes totaux	49
Tableau 10 : Résultats de l'aromatogramme	52
Tableau 11 : les caractéristique organoleptiques de pommade.....	53

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :Myrtus communis L.	09
Figure 2 : organes de la plante Myrtus communis L.	10
Figure 3 : Distribution géographique de l'espèce Myrtus communis L. dans le monde d'après (Médaileal200)	11
Figure 4 : Montage d'hydro-distillation : de type Clevenger.	16
Figure 5 : Distillation par entrainement à la vapeur	17
Figure 6 :Extraction par pression à froid ou expression	18
Figure 7 :Extraction au CO2 supercritique	18
Figure 8 :Extraction par solvant : de type Soxhlet	19
Figure 9 : Feuilles de Myrtus communis	23
Figure 10 : Fleurs de Myrtus communis	24
Figure 11 : Tige de Myrtus communis	24
Figure 12 : Dispositif du Clevenger	25
Figure 13 :Méthode de préparation d'extrait d'HE	26
Figure 14 : Dispositif du type Soxhlet	27
Figure 15 : Méthode de préparation d'extrait par solvant	28
Figure 16 : Méthode d'extraction par macération	29
Figure 17 : Méthode de préparation de l'infusé	30
Figure 18 :Etape de préparation des extraits	32
Figure 19 : Résultats de dosage des poly-phénols des extraits méthanolique de la plante à différentes concentrations	32
Figure 20 : Résultats de dosage des flavonoïdes des extraits méthanolique de la plante à différentes concentrations.	33
Figure 21 : Détermination de l'activité antimicrobienne	38

Figure 22 : Présentation et mode d'administration des médicaments	39
Figure 23 : Procédé de formulation	41
Figure 24 : Appareillage de mesure de PH	42
Figure 25 : Huile essentielle de Myrtus communis	44
Figure 26 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	48
Figure 27 : Courbe d'étalonnage de quercitrine	49
Figure 28 : Moyennes des diamètres des Zones d'inhibition des huiles essentiels et de l'extrait méthanolique des feuilles de Myrtus communis relatives aux souches antibactériennes.....	50
Figure 29 : Moyennes des diamètres des Zones d'inhibition des huiles essentiels et de l'extrait méthanolique des feuilles de Myrtus communis relatives aux souches antifongiques	51

CRD : centre de recherche et développement

DMSO :Diméthylsulfoxyde

DO : Densité optique

Eq :Equivalent de quercitrine

EtOH : Ethanol

FeCl₃ :Trichloride de fer

H₂SO₄ : Acide sulfurique

HCl : Acide chlorohydrique

HE : Huile essentiel

MH : Mueller Hinton

mHE : masse de l'huile essentielle obtenue en gramme

mVS : masse du végétale sec en gramme

NaBH₄ : Sodium borohydride

nm :Nanomètre

O.M.S : L'organisation mondiale de la santé

ORL : Oto-rhino-laryngologie

PAM :Programme alimentaire mondial

PF : Poids frais

pH : Potentiel hydrogène

R(%) : Rendement en huile essentielle en pourcentage

µg : Microgramme

µl : Microlitre

µm : Micromètre

INTRODUCTION

Introduction

La phytothérapie repose sur l'utilisation de plantes médicinales et aromatiques à des fins thérapeutiques. En médecine classique, les fabricants pharmaceutiques extraient le principe actif des plantes pour en faire des médicaments. En phytothérapie, la plante est utilisée en partie ou entière, sous plusieurs formes.

Algérie connaît une grande diversité biologique et possède l'un des écosystèmes les plus riches du monde. Elle est caractérisée actuellement par la grande diversité de sa topographie, de ses paysages et de son climat, ce qui a favorisé une différenciation très remarquable de ses espèces végétales et animales dans des habitats naturels très diversifiés. Parmi ces espèces on a choisi *Myrtus Communis* L de famille myrtacées.

Notre travail consiste à extraire l'huile essentielle et à formuler une pommade médicinale en évaluant son effet biologique antimicrobienne

Ceci dit, notre travail sera composé principalement de deux parties

Ainsi, la première partie concernera, au premier lieu, les études bibliographiques ; qui englobe les données théoriques ; la phytothérapie, les plantes médicinales et aromatiques, l'identification de la plante étudiée, les huiles essentielles

En deuxième lieu, concernera la partie expérimentale ; l'extraction des huiles essentielles, le screening chimique, le dosage des polyphénols totaux et le dosage des flavonoïdes, l'activité antibactérienne (antifongique et antimicrobienne)

A la fin la formulation d'un produit, est une pommade antibactérienne à la base des principes actifs de *Myrtus Cominus* L.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : GENERALITE SUR LES PLANTES AROMATIQUES ET MEDICINALES

1.1. Définition des plantes aromatiques et médicinales

Les plantes médicinales sont des drogues végétales au sens de la Pharmacopée européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Il est peu fréquent que la plante soit utilisée entière, le plus souvent, il 'agit d'une ou de plusieurs parties qui peuvent avoir chacune des utilisations différentes (**J. Vercauteren, 2012**).

Depuis la plus haute antiquité, les hommes se sont soignés avec les plantes qu'ils avaient à leur disposition. Plusieurs théoriciens ont entrepris d'expliquer l'action des plantes sur l'organisme (**A.Chevallier, 2001**). Les grandes civilisations anciennes ont eu recours aux PAM pour leurs propriétés médicinales, parfumantes ainsi que des utilisations rituelles (**H. Bhar et A. Balouk, 2011**).

Les plantes médicinales ont été toujours associées aux comportements et au savoir traditionnel culturels. Selon les statistiques de 2003 de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 80% de la population mondiale a recours aux médecines traditionnelles pour satisfaire des besoins en soins de santé primaire (**H. Bhar et A. Balouk, 2011**). Il pousse dans le monde plus de 20000 espèces de végétaux, à usages condimentaires, médicinaux ou cosmétiques, dont 50% est utilisée en industrie pharmaceutique (**L.Bermness, Larousse,2005**).

Le criblage des plantes utilisées dans la médecine traditionnelle marocaine présente une base de la pharmacopée botanique. D'ailleurs le Maroc dispose, sur les 7000 espèces et sous-espèces existantes, 537 sont endémiques du pays et 1625 rares ou menacées (**H. Bhar et A. Balouk, 2011**).

1.2. Importance des plantes aromatiques et médicinale

1.2.1. Composées des plantes aromatiques et médicinales

✓ Les phénols

Il existe une très grande variété de phénols, de composés simples comme l'acide salicylique, molécule donnant par synthèse l'aspirine, à des substances plus complexes comme les composés phénoliques auxquels sont rattachés les glucosides. Les phénols sont anti-inflammatoires et antiseptiques (**A.Chevallier, 2001**).

✓ Les anthocyanes

Qui donnent aux fleurs et aux fruits leurs teintes bleue, rouge ou pourpre Ces puissants antioxydants nettoient l'organisme des radicaux libres Ils maintiennent une bonne circulation, notamment dans les régions du cœur, des mains, des pieds et des yeux **(M. Sebai et M. Boudali, 2012; A.Chevallier, 2001).**

✓ Les tanins

Toutes les plantes contiennent des tanins à un degré plus ou moins élevé Ceux-ci donnent un goût amer à l'écorce ou aux feuilles et les rendent impropres à la consommation pour les insectes ou les bétails. Le tanin c'est un phénol qui est associé à un sucre. Un des tanins de base est l'acide gallique. Ils précipitent (agglutiner, coaguler) les protéines et la gélatine ce qui est beaucoup plus rare. On peut en outre les utiliser en cas d'empoisonnement par des alcaloïdes, car il les précipite et les rend inoffensifs **(M. Sebai et M. Boudali, 2012; A. Chevallier, 2001).**

✓ Les flavonoïdes

Les flavonoïdes, présents dans la plupart des plantes, ils entrent dans la composition de nombreux pigments végétaux et en particulier les pigments jaunes et orange (calendula) et aussi dans les pigments bleus. Ils sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne circulation, certains flavonoïdes ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et antivirales **(M. Sebai et M. Boudali, 2012; A. Chevallier, 2001).**

✓ Les saponines

Principaux constituants de nombreuses plantes médicinales (savon -saponaire, l'herbe à savon; le réglisse; le bouillon blanc; le Modène), des hétérosides naturels dont la matière est un composé soluble à l'eau qui la rend moussante comme une eau de savon **(M. Sebai et M. Boudali, 2012).**

✓ Les vitamines

Les vitamines sont des substances qui agissent à faibles doses, de nombreuses plantes médicinales sont particulièrement riches en vitamines, on distingue les vitamines hydrosolubles et liposolubles. Le citronnier notamment contient des doses

élevées de vitamine C et la carotte est riche en bêta-carotène (pro vitamine A) **(A.Chevallier, 2001)**.

✓ Les glucosides

Les glucosides sont des substances décomposées par des enzymes spécifiques, donnent un sucre et un «aglycone» thérapeutiquement actifs, souvent toxique. Elles sont liées soit à une fonction phénol soit à un dérivé nitré ou soufré qui entraînera des propriétés particulières de la molécule **(L.Bermness, Larousse, 2005)**.

✓ Les minéraux

De nombreuses plantes médicinales sont très riches en minéraux. Ils sont nécessaires à divers fonctions métaboliques, à la différence des enzymes, non catalyseurs. Les plantes, notamment celles issues de l'agriculture biologique, tirent les minéraux du sol et les transforment en une structure aisément assimilable par l'organisme **(L.Bermness, Larousse,2005)**.

1.2.2. La phytothérapie

Le mot phytothérapie provient de deux mots grecs qui signifient essentiellement «soigner avec les plantes». La phytothérapie ou bien «la thérapie par les plantes» est demandé de façon incroyable, les gens font confiance aveugle à cette médecine sans prise compte de danger de ces plantes et herbes sur leur santé **(S. Gahbich, 2009; M. Sebai et M. Boudali, 2012)**.

A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales **(A.Chevallier, 2001)**. Beaucoup de remèdes phytothérapeutiques sont nés des observations, de l'inspiration et de l'expérience des guérisseurs, devenus des personnages révéérés dans toutes les tribus et chez tous les peuples **(L.Bermness, Larousse 2005)**.

De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme. On estime que 10 à 20% des hospitalisations sont dues aux effets secondaires des médicaments chimiques. C'est pour cela on voit que la phytothérapie qui propose des remèdes naturels et bien acceptés par l'organisme, est souvent associée aux traitements classiques. Elle offre aussi de multiples avantages malgré les énormes

progrès réalisés par la médecine moderne. L'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend des plantes leurs effets en fonction de leurs principes actifs **(A.Chevallier, 2001)**.

Le ou les principes actifs d'une plante médicinale sont les composants naturellement présents dans cette plante; ils lui confèrent son activité thérapeutique. Il se peut que des principes actifs se trouvent dans toutes les parties de la plante, mais de manière inégale. Et tous les principes actifs d'une même plante n'ont pas les mêmes propriétés (ex: l'oranger: ses fleurs sont sédatives et son écorce est apéritive) **(M. Sebai et M. Boudali, 2012)**.

Les éléments actifs des plantes: les phénols, les flavonoïdes, les tanins, les anthocyanes, les saponines, les vitamines, les glucosides et les minéraux **(M. Sebai et M. Boudali, 2012; A. Chevallier, 2001)**.

1.2.3. Métabolisme secondaire

1.2.3.1 Définition

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées par les plantes autotrophes **(BOUDJOUREF, 2011)**. Ce sont caractérisés généralement par de faible concentration dans les tissus végétaux **(NEWMAN et CRAGG, 2012)**. Aussi n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de la plante **(GUIGNARD, 1996)**. Bio synthétisés à partir de métabolites primaires et jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement, contribuant ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème **(PEEKING et al., 1987)**. En 1987 Plus de 8500 métabolites secondaires sont déjà connus. Les plus grands groupes sont les alcaloïdes, les terpénoïdes, les stéroïdes et les composés phénoliques. Ils présentent une énorme valeur économique (en particulier pour l'industrie pharmaceutique et la cosmétique) **(PEEKING et al., 1987)**.

**CHAPITRE 2 : SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE SUR MYRTUS
COMMUNIS**

2. Présentation de la plante étudiée (*myrtus*)

2.1. Description botanique de la plante *Myrtus Communis* L.

2.1.1. Le genre *Myrtus Communis* L.

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

2.1.2. L'espèce *Myrtus Communis* L.

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



Figure 1 : *Myrtus Communis* L.

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

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

Les fleurs apparaissent au début de l'été ; elles sont grandes 10-15 mm ;

solitaires sur un long pédoncule à l'aisselle des feuilles et très odorantes et pourvues à la base de bractées très petites, rapidement caduques.

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

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



a : Les feuilles



b : Les tiges



c : Les fruits

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

2.1.3. Position systématique

- **Règne** : Plantae
- **Sous-règne** : Eucaryotes
- **Embranchement** : Spermaphytes
- **Sous-embranchement** : Angiospermes
- **Classe** : Dicotylédones
- **Ordre** : Myrtales
- **Famille** : Myrtaceae Genre : *Myrtus*
- **Espèce** : *Myrtus communis* L.
- **Nom vernaculaire** : Rayhan, Mersin

2.1.4. Classification phylogénétique

- **Clade** : Angiospermes
- **Clade** : Dicotylédones vraies
- **Clade** : Rosidées
- **Ordre** : Myrtales

- **Familles** :Myrtaceae
- **Genre** :Myrtus
- **Espèce** :Myrtuscommunis L.

2.2. Localisation et répartition géographique

2.2.1. Dans le monde

Le myrte est un représentant typique de la flore méditerranéenne, qui pousse dans les forêts du pin et dans plusieurs régions situées à 600 m d'altitude (**Cevat et Musa, 2007**). Cette plante aromatique, très odorante, est également présente dans l'Asie occidentale, Amérique du Sud et l'Australie (**Laurent, 1980**). Il pousse sauvagement dans les régions côtières, les collines internes et les zones forestières du Nord de la Tunisie (**Pottier-Alapetite, 1979**). En Turquie, le myrte se trouve dans les forêts de pins et des rives, en particulier dans les montagnes du Taurus, juste au-dessus de 500-600 m d'altitude (**Ozek et al., 2000**).

2.2.2. En Algérie

L'espèce *Myrtus communis* L. est présente au Tell, sur les pentes des collines et sur les zones côtières, parfois dans des zones reculées. L'espèce du désert, *Myrtus nivellei* L. se trouve couramment dans le Hoggar et le Tassili. Ses feuilles sont très appréciées par les Touaregs en tant que médicament à base de plantes (**Quézel et Santa, 1963**).



Figure 3 : Distribution géographique de l'espèce *Myrtus communis* L. dans le monde d'après (**Médail et al, 2009**)

2.3. Culture : Exigences du sol et conditions climatiques

2.3.1. Caractéristiques du sol

Toute terre raisonnablement riche en nutriments réussit au *Myrtus communis* tant qu'elle est bien drainée. Pour son sol, le myrte supporte des pH neutres et alcalins mais Moreno-Jiménez et al montrent que le myrte a une meilleure survie à pH <5. *Myrtus communis* ne supporte pas les sols humides. En 2013, Benjelloun et al démontrent à nouveau la résistance au stress hydrique du myrte. Cette résistance va varier avec l'origine du myrte, en effet le myrte prélevé en France est moins résistant au stress hydrique que celui du Maroc et de Tunisie. En 2006, Tattini et al montrent une certaine tolérance au sel du myrte sans le considérer comme halophile. Tattini et al expliquent cette tolérance par un mécanisme qu'ils nomment « sel-exclusion ». Il consiste à séquestrer les ions potentiellement toxiques pour la plante dans des organes moins sensibles comme la tige et les feuilles mortes.

2.3.2. Caractéristiques climatiques

Myrtus communis a besoin de beaucoup de lumière. Il ne supporte que très peu d'ombre. En revanche c'est une plante qui s'acclimate facilement aux températures élevées et supporte des températures minimales allant de -5 à -10°C.

CHAPITRE 3 : LES HUILES ESSENTIELLES

3.1. Les huiles essentielles

3.1.1 Définitions des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances obtenues à partir de plantes, par entraînement à la vapeur d'eau, par hydro-distillation ou par expression. Une huile essentielle est composée de plusieurs constituants aromatiques plus ou moins volatils qui appartiennent aux différentes classes de la chimie organique : hydrocarbures (composés terpéniques), alcools (géraniol), aldéhydes (citral) (Billerberck et al. 2007).

3.1.2. Composition chimique d'huile essentielle de *Myrtus Communis* L

Les méthodes d'analyses chromatographiques employées au cours de cette étude ont permis d'identifier 45 composés. L' α -pinène (10%), le 1,8-cinéole (43%) et l'acétate de myrtenyl (25%) sont les constituants majoritaires de cette essence et qui représentent environ les trois quarts de la composition chimique totale. D'autres composés sont aussi présents avec un taux moyen comme le γ -terpinène (2,9%) et l'acétate de geranyl (2,8%). En général, l'huile du Myrte marocain est constituée de quatre groupes de produits:

- les mono terpènes (α -pinène, sabinène, myrcène...),
- les sesquiterpènes (α -copaène, 6-patchoulène ...),
- les esters isobutyriques (isobutyrate de geranyl et de cétronellyl),
- les acétates de l' α -terpényle, geranyl, isoeugénol, myrtenyle, carvyle, verbenyle et linalyle)
- et les alcools terpéniques (α -terpénol, linalol, fenchol, terpinène-4-ol, geraniol, myrtenol...) (Chalchat & Garry, 1992).

3.1.3. Propriétés pharmacologiques de l'huile essentielle *Myrtus Communis*

Les déficiences immunitaires : La contribution de l'huile essentielle au système antioxydant et sa capacité immunomodulatrice permet d'augmenter globalement la réponse immunitaire aux agressions extérieures. Elle est donc conseillée en diffusion dans les chambres de malades, en cas de convalescence, d'épidémies et d'infections virales ou bactériennes.

Les troubles ORL et respiratoires : Grâce aux propriétés expectorantes, mucolytiques et antitussives du myrte vert, les infections ORL figurent parmi les indications de l'huile en inhalation, en diffusion ou en massage : bronchite, sinusite, toux avec mucosités, toux sèche spasmodique.

Les troubles cutanés : Ses propriétés antibactériennes et antiseptiques incitent à l'utiliser en cas d'eczéma, de mycose cutanée ou de parasitose.

Les douleurs articulaires et musculaires : Le potentiel anti-inflammatoire du myrte vert permet de soulager l'arthrose, les rhumatismes et les douleurs musculaires/articulaires.

La digestion difficile : Grâce à ses vertus antispasmodiques, le myrte vert peut servir à traiter plusieurs troubles comme les spasmes, les ballonnements, les gaz, etc.

Inflammation de la prostate : diluer dans une huile végétale et masser le bas-ventre.

3.1.4. Propriété physico-chimiques des huiles essentielle

En ce qui concerne les propriétés physico-chimiques, les huiles essentielles forment un groupe très homogène (**Bernard et al., 1988**). Où selon **Desmares et al., (2008)** leurs principales caractéristiques sont:

- Liquides à température ambiante et possèdent une température d'ébullition variant de 160°C à 240°C.
- N'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes ;
- Volatiles et très rarement colorées ;
- Une densité faible pour les huiles essentielles à forte teneur en monoterpènes ;
- Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé, cependant une teneur élevée en dérivés oxygénés produira l'effet inverse ;

- Solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé et dans la plupart des solvants organiques mais peu solubles dans l'eau ;
- Douées d'un pouvoir rotatoire puisqu'elles sont formées principalement de composés asymétriques ;
- Très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux, il convient alors de les conserver à l'abri de la lumière et de l'air.

3.2. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Il existe plusieurs méthodes d'extraction des huiles essentielles. Le choix de la méthode la mieux adaptée se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, de caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire, de l'usage de l'extrait et l'arôme du départ au cours de l'extraction (**Meyer, 1999**).

3.2.1. L'hydro-distillation

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel rempli d'eau placé sur une source de chaleur. tout est ensuite porté à l'ébullition. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotrope. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité. Au laboratoire, le système équipé d'une cohobe généralement utilisé pour l'extraction des huiles essentielles est le Clevenger (**EIHaib, 2011**).

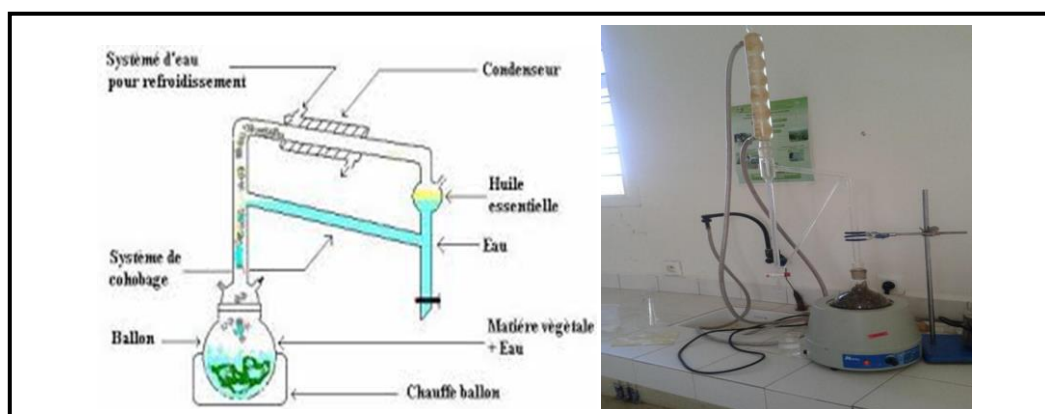


Figure 4 : Montage d'hydro-distillation : de type Clevenger.

3.2.2. La distillation par entrainement à la vapeur

Il consiste à faire passer un courant de vapeur d'eau dans une cuve contenant les plantes. Sous l'action de l'humidité et de la chaleur les huiles essentielles volatiles se libèrent. Ensuite cette vapeur d'eau et d'huile essentielle passe dans un serpentin refroidi par de l'eau. La vapeur se condense alors dans le serpentin, et retourne à l'état liquide. Ce liquide, mélange d'eau et d'huile essentielle est recueilli dans un essencier qui sépare les deux éléments. En effet, l'huile essentielle est non miscible à l'eau et plus légère donc elle se retrouve dans la partie supérieure de l'essencier.

L'ensemble du dispositif utilisé pour l'hydro-distillation est l'alambic :

Ce dispositif est composé d'une cuve dans laquelle on place les plantes à distiller. Les plantes sont dissociées de l'eau dans la même cuve. La cuve est chauffée et recouverte par un chapiteau qui est prolongé par un col de cygne, celui-ci est raccordé à un serpentin de refroidissement.

Pour cela, celui-ci est plongé dans une cuve d'eau froide. Le serpentin débouche sur l'essencier, muni de deux robinets. Celui du bas permet de recueillir l'hydrolat ou eau florale et celui du haut l'huile essentielle.



Figure 5 : La distillation par entrainement à la vapeur

3.2.3. L'extraction par pression à froid ou expression

Cette technique s'applique aux huiles citronnées et agrumes (comme le citron, l'orange, la mandarine). Les écorces ou les zestes sont pressés par une machine ou à la main pour en recueillir les huiles. L'extrait alors recueilli se nomme

« essence aromatique » et non « huile essentielle » car il n'y a aucune modification chimique.



Figure 6 : L'extraction par pression à froid ou expression

3.2.4. L'extraction au CO₂ supercritique

Très moderne, très coûteuse, cette méthode consiste à faire passer un courant de CO₂ à haute pression qui fait éclater les poches à essence et entraîne les substances aromatiques.



Figure 7 : L'extraction au CO₂ supercritique

3.2.5. L'extraction par solvant

L'appareillage Soxhlet permet l'extraction aux solvants « en continu » d'espèces chimiques contenues dans une matrice solide. L'échantillon, placé dans une cartouche poreuse à l'intérieur de l'extracteur, est traversé par les vapeurs de solvant. Celles-ci passent du ballon 13 chauffé au tube adducteur puis se condensent dans le réfrigérant. Le condensat s'accumule dans le corps de l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du siphon, entraînant alors le retour du liquide dans le ballon. Au fil des cycles, le solvant s'enrichit en substances extraites jusqu'à épuisement de l'échantillon en substances d'intérêt. Par comparaison avec les macérations classiques, cette technique permet de réduire le temps d'extraction, d'une part, et requiert nettement moins de solvant et d'échantillon pour une efficacité d'extraction supérieure, d'autre part .



Figure 8 : L'extraction par solvant : de type Soxhlet

3.2.6. Conservation Des huiles essentielles

Toujours à l'abri de la lumière et dans leur emballage d'origine en verre. Éloigner aussi de toute source de chaleur. Les huiles essentielles sont fragiles et peuvent s'altérer dans de mauvaise condition de stockage.

Conserver hors de portée des enfants (armoire sous clef). Veiller à garder une étiquette lisible afin d'éviter toute confusion.

3.2.7. Précaution des huiles essentielles

Ne jamais verser les HE pures dans l'eau, utilisées de cette manière elle peuvent entraîner une irritation des tissus.

Certaines HE peuvent être dangereuses pour les femmes enceintes et qui allaitent. Eviter l'automédication. Demander conseil à votre médecin aromathérapeute.

Avant utilisation il est conseillé de vérifier par un test cutané la tolérance aux HE (appliquer sur l'intérieur du poignet).

- Déconseillées pour les enfants de moins de 3 ans.

- Une grande attention doit toujours être portée aux patients présentant un terrain allergique connu

Les projections oculaires imposent d'urgence d'essuyer l'oeil avec un coton largement imbibé d'huile végétale pure ou mettre plusieurs gouttes de cette dernière sur le globe oculaire.

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 1 : MATERIELS ET METHODES

Matériel et méthodes

Notre étude expérimentale a été réalisée au sein du laboratoire de recherche des plantes aromatiques et médicinales de l'université de Blida¹ et au centre de recherche et développement (CRD) du groupe SAIDAL dans le laboratoire.

1. Matériel végétal

1.1. Récolte et identification

Nous avons choisi pour notre travail une plante aromatique et médicinale qui est connue pour ses propriétés antimicrobiennes, antibactériennes et antifongiques.

La récolte des échantillons du Myrte a été effectuée en mars 2021 au niveau de la région de Bouarfaa située dans la région de Blida ville, Wilaya de Blida a une altitude approximative de 100 m.

La plante a été identifiée au niveau de laboratoire d'université de Saad Dahleb de Blida, il s'agit de la plante et de feuilles de *Myrtus communis* (figure 9, 10, 11).



Figure 9 : Feuilles de *Myrtus communis*



Figure 10 : Fleurs de Myrtus communis



Figure 11 : Tige de Myrus communis

1.2. Les caractéristiques du Myrtus

Tableau 1 : Les caractéristiques du Myrtus

Type	arbuste à fleurs, arbuste fruitier
Hauteur	de 1 à 2 m, de 2 à 5 m
Couleurs des fleurs	Blanc
Exposition souhaitée:	ensoleillée, semi-ombragée
Type de sol	sableux, caillouteux, drainé, riche en humus
Feuillage	Persistant
Entretien	facile d'entretien
Assainissant	Non

2. Préparation des extraits

Les feuilles séchées de *Myrtus communis* sont broyées à l'aide d'un mixeur jusqu'à leur réduction en poudre pour le type d'extraction par solvant, et les feuilles sèche finement découpées, sont les suivants :

2.1. Extraction par hydro-distillation

L'extraction par hydro-distillation a été réalisée au moyen d'un extracteur de type Clevenger au sein du laboratoire de recherche et d'amélioration des plantes.

Notre dispositif expérimental (figure 12) était constitué de la matière suivante :

- Chauffe ballon
- Ballon d'une capacité de 100 ml
- Réfrigérant
- Becher
- Balance



Figure 12 : dispositif du Clevenger

Mode opératoire de l'hydro-distillation

100 g des feuilles de *Myrtus cummins* sèches, finement découpées afin de réduire la surface d'échange vapeur-feuilles, sont mises dans un ballon à fond rond de 250 ml, additionnées de 100 ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition pendant environ 3 heures. L'huile essentielle est alors entraînée par la vapeur d'eau. Elle est ensuite condensée en passant par le condensateur. Le liquide recueilli résulte en un distillat avec une couche d'huile mince à la surface qui sera par la suite récupérer, après repos du liquide.

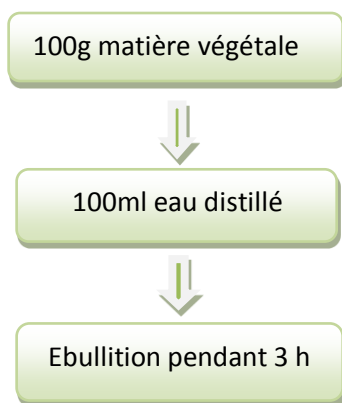


Figure 13 : méthode de préparation d'extrait d'HE

Calcul et détermination du rendement en huiles essentielles

Le rendement en huile essentielle pour chaque échantillon correspond à la quantité d'huile essentielle obtenue par rapport à la masse de matière sèche servant à l'extraction. La teneur en eau de la matière végétale a été déterminée parallèlement à chaque hydro-distillation. Le rendement en huiles essentielles est exprimé en pourcentage.

Le rendement est calculé d'après la formule suivante :

$$R(\%) = \frac{mHE}{mVS} \times 100$$

R(%): Rendement en huile essentielle en pourcentage.

mHE : masse de l'huile essentielle obtenue en gramme.

mVS : masse du végétal sec en gramme.

2.2. Extraction par solvant (solide-liquide)

L'extraction par solvant a été réalisée au moyen d'un extracteur de type Soxhlet au sein du laboratoire de recherche et d'amélioration des plantes.

Notre dispositif expérimental (figure 14) est constitué du matériel suivant :

- Chauffe ballon
- Ballon d'une capacité de 100 ml
- Réfrigérant
- Becher
- Balance



Figure 14 : Dispositif du type : Soxhlet

Mode opératoire de l'extraction par solvant

Il se compose d'un corps en verre dans lequel est positionnée une cartouche en papier-filtre épais, d'un tube siphon et d'un tube d'adduction. Dans le montage, l'extracteur est positionné sur un ballon contenant 100ml de solvant d'extraction (Méthanol). Dans l'extracteur est insérée une cartouche dans laquelle est placée 100g de poudre; puis un réfrigérant est adapté au dessus de l'extracteur.

Lorsque le ballon est chauffé, les vapeurs de solvant passent par le tube adducteur, se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps de l'extracteur, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant (chauffé par les vapeurs se trouvant en dessous). Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube-siphon, qui provoque alors le retour du liquide dans le ballon, accompagné des substances extraites, et le solvant contenu dans le ballon s'enrichit par conséquent progressivement en composés solubles. Le solvant continue alors de s'évaporer, tandis que les substances extraites restent dans le ballon.

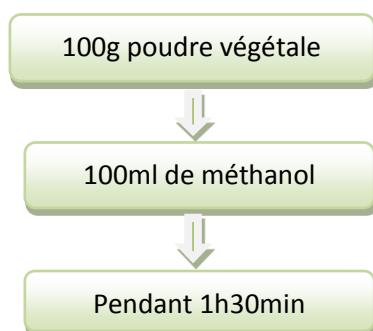


Figure 15 : Méthode de préparation d'extrait par solvant

2.3. Extraction a froid par macération

L'extraction par macération a été réalisée au sein du laboratoire de recherche et d'amélioration des plantes.

Notre dispositif expérimental (figure 16) est constitué du matériel suivant :

- Erlenmeyer
- Agitateur magnétique
- Papier filtre
- Balance
- Eprouvette

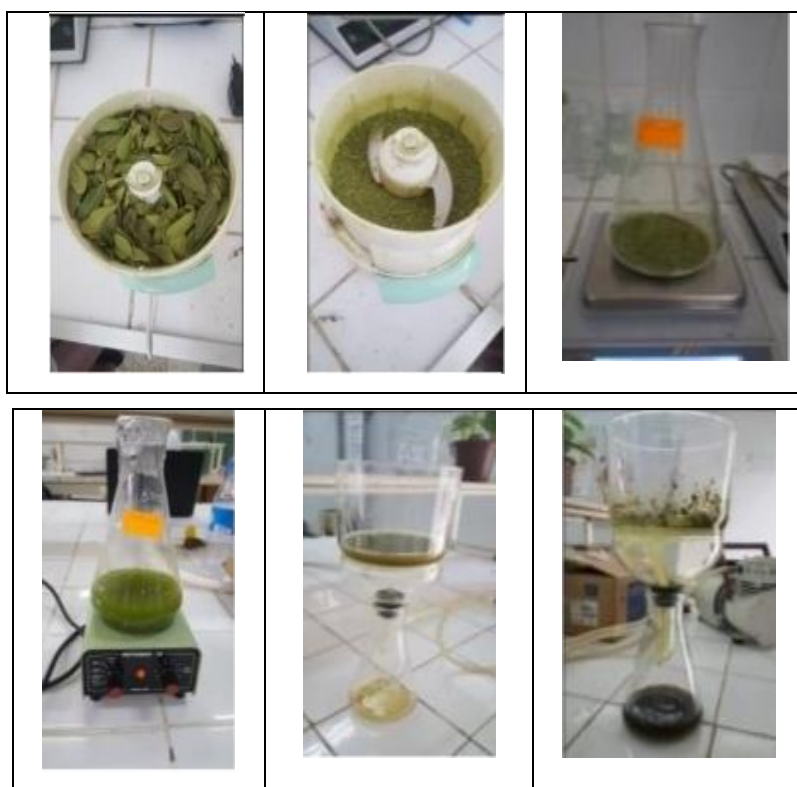


Figure 16 : Méthode d'extraction par macération

Mode opératoire

10g de poudre végétale sont pesés puis additionnés à 100ml d'eau distillé bouillante, laissés infuser pendant 15min avec agitation de temps en temps, après filtrés pour éliminer la matière insoluble.

L'extraire aqueux de *Myrtus communis* est d'une couleur marron

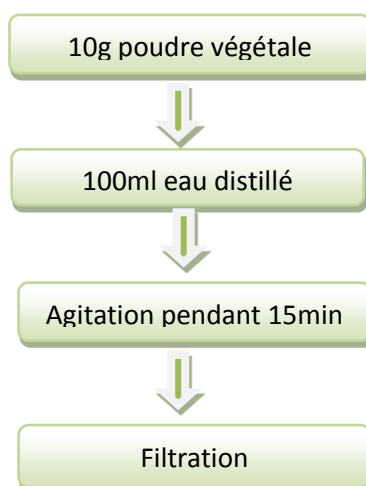


Figure 17 : Méthode de préparation de l'infusé

3. Test phytochimique (screening chimique)

Le but de ces tests est de connaître la composition en métabolites secondaires, ils sont effectués soit sur la poudre de broyat, soit sur un infusé (**Bouyer T, 1996**).

Matériel

- Erlenmeyer
- Entonnoir
- Papier filtre
- Agitateur
- Balance
- Broyeur
- Tube en verre stériles
- Micropipette 1000 μ l
- Portoir
-

❖ Préparation de l'infusé

10 g de poudre végétale sont pesés puis additionnés à 100ml d'eau distillée bouillante, laissé infuser pendant 15 min avec agitation de temps en temps, après filtrés pour éliminer la matière insoluble.

L'extrait aqueux de *Myrtus communis* est d'une couleur marron.

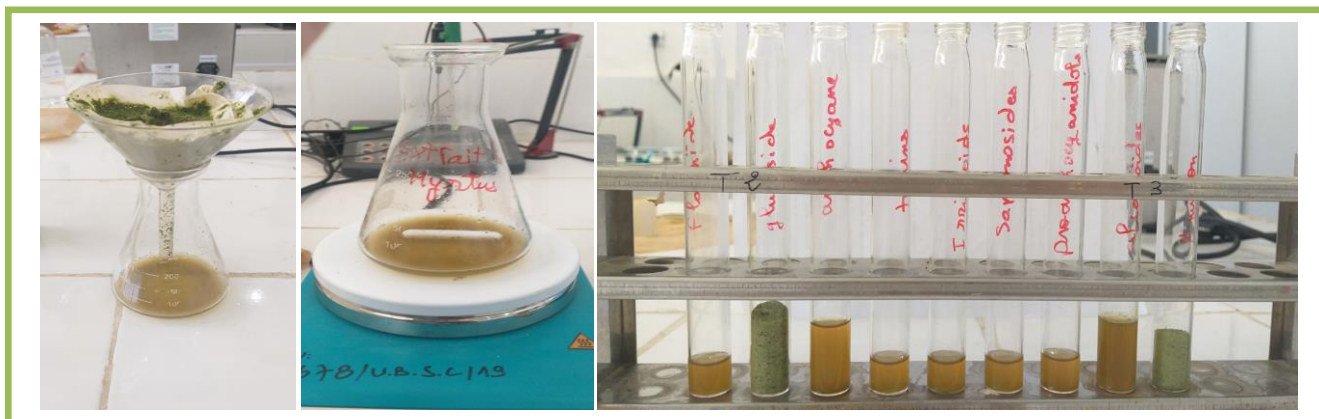


Figure 18 : Etapes de préparation des extraits

- **Recherche des flavonoïdes :** 2 ml d'extrait + 1 ml l'eau distillé + 1 ml Acide chlorhydrique + quelques fragment de magnésium + bain glacé .La réaction positive donne une coloration rouge orangée .

(Earnsworth et al., 1974).

- **Recherche des glucosides :** on ajoute quelque gouttes de H_2SO_4 à 2 g de poudre végétale. La formation d'une coloration rouge brique ensuite violette indique la présence des glucosides. **(Paris et al.,1969)**

- **Recherche des anthocyanes :** on rajoute quelques gouttes de HCL à 5ml d'infusé, la réaction positive donne une coloration rouge en présence des anthocyanes. **(Debray et al., 1971).**

- **Recherche des tanins :** à 2ml de la solution à testé, 2 à 3 gouttes de la solution de $FeCl_3$ à 2% sont ajoutés. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-noire et un précipité (laisser reposer qlq min).

Les tests de (Tona et al.,1998 ;Longaga et al.,2000)

- **Recherche des iridoïdes :** 2ml de l'infusé + quelques gouttes de HCL puis chauffé le mélange. Coloration bleu.

- **Recherche des saponosides :** 2ml de l'infusé+ quelques gouttes d'acétate plomb. Précipitation blanc.

- **Recherche des proanthocyanidols** : 2 ml de l'infusé+2 ml de HCL . Laisser 5min au bain marie.Coloration rouge.
- **Recherche des alcaloïdes** : 5ml de l'infusé + quelques gouttes de dragendroff. Coloration rouge ou précipitation rouge orangée.
- **Recherche d'amidon** : 2g de poudre+ quelques gouttes d'iode.Coloration bleu violette

4. Analyse quantitative des composés phénoliques de *Myrtus communis*

Tableau 2 : Analyse quantitative des composés phénolique de *Myrtus communis*

Polyphénols	Activité
Phénols	Antibactérienne Antifongique
Flavonoïdes	Antitumorale Anti-inflammatoire

Matériel

- Micropipette de 1000 μ l
- Micropipette de 10 μ l
- Embouts en plastique stériles
- Agitateur
- Spectrophotomètre
- Tubes en verre stériles

4.1.Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été déterminé par spectrophotométrie, selon la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu . Ce dosage est basé

sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait. (V.L.Singleton,1999).

Méthodes

Dans des tubes à hémolyse en verre, 10 μ l de l'extrait sont mélangés , avec 10 μ l de réactif Folin-Ciocalteu, laisser reposer 1 à 8 min.

Ajouter 30 μ l de solution Na₂CO₃ 20% puis compléter le volume à 200 μ l par l'eau puis incuber le mélange bleu pendant 2 h à température ambiante,4 répétitions pour chaque échantillon.

La lecture est faite à 760 nm , la concentration en composés phénoliques totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard.



Figure 19: Résultats de dosage des polyphénols des extraits méthanolique de la plante à différentes concentrations

4.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La méthode de dosage des flavonoïdes repose sur la capacité de ces composés à former des complexes chromogènes avec la chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) (**Zhishen et al. (1999)**).

Méthode

1ml de solution éthanolique $AlCl_3$ (2%) sont mélangés avec 1ml d'extrait de plante puis incubés 30 mn à température ambiante.

L'absorbance est mesurée après 15 min à 430 nm , la concentration des flavonoïdes est calculée en se référant à une courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercitrine comme standard.



Figure 20 : Résultats de dosage des flavonoïdes des extraits méthanolique de la plante à différentes concentrations.

5. Etude de l'activité antimicrobienne des deux extraits d'huile essentielle et l'extrait par solvant

Notre travail sur cette partie consiste à mettre en évidence le pouvoir antimicrobien (antibactérien et antifongique) de nos deux échantillons de l'huile essentielle et de l'extrait, et cela à l'aide de la méthode quantitative, en procédant à des tests sur une

sélection de souches de références bactérienne et fongique connue , et qualifiées comme dangereuses pour l'homme et l'animal . Cette évaluation a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé en utilisant des disques stériles.

Principe

La technique consiste à utiliser des disques de papier absorbant stérile, et de les déposer à la surface d'une gélose inculée et uniformémentensemencée par la suspension bactérienne à étudier. La diffusion de l'huile essentielle et de l'extrait à partir du disque au sein de la gélose détermine un gradient de concentration .Les micro-organismes poussent sur toute la surface de gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'huile essentielle et de l'extrait suffisante pour inhiber leurs croissance dont on observe après incubation tout autour des disques une zone circulaire claire indemne de colonies , appelée zone d'inhibition . Plus le diamètre de cette zone est grand , plus la souche microbienne est sensible au produit testé. Plus il est petit la souche microbienne est résistante (**Fauchère et Avril , 2002**).

Cette méthode est appelée aromatoگرامme dont le principe est le même que titrage des antibiotiques (antibiogramme).

5.1. Les souches microbiennes utilisées

5.1.1. Souches bactériennes

4 souches bactériennes ont été choisie pour leur pathogénicité et leur implication fréquente dans plusieurs infections. Ces souches ont été fournies par le laboratoire de microbiologie de CHU Blida.

- Trois souches de références : Les souches bactériennes de références utilisées sont obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC) , il s'agit de : *Escherichia coli* (ATCC25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC6538) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853).
- Une souche clinique : La souche utilisées :*Bacillus cereus*.

5.1.2. Souches fongiques

- Les souches utilisées sont : *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida tropicalis*, *Candida duboisii*.

Tableau 3 : Les souches microbiennes utilisées lors de l'évaluation de l'activité antimicrobienne

Souches		Type	Références	Familles
Bactéries	<i>Escherichia coli</i> ATCC	Bactéries à Gram négatif	25922	Enterobacteriaceae
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		27853	Pseudomonadaceae
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Bactéries à Gram positif	6538	Staphylococcaceae
	<i>Bacillus cereus</i>		Non référencié	Bacillaceae
Levure	<i>Candida albicans</i> ,	/	10231	Saccharomycetaceae
	<i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida duboisii</i> .		Non référencié	

5.2. Les milieux de cultures utilisés

- La gélose Muller Hinton pour l'étude de la sensibilité des Bactéries.
- La gélose Sabouraud pour l'étude de la sensibilité des Levures aux différentes huiles essentielles.

5.3. Repiquages des souches microbiennes

Les différentes bactéries et levures utilisées ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 35°C pendant 24h et à 25°C pendant 48h respectivement pour les bactéries et levures afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.

Matériels

- Flacon en verre de 250ml
- Micropipette de 1000µl
- Autoclave
- Micropipette de 10µl
- Bec benzène

- Spectrophotomètre
- Boîte de Pétri stériles
- -Etuve à 37°C
- Pipette pasteur
- Vortex
- Écouvillon
- Tubes en verre stériles
- Pincés stériles
- Embouts stériles
- Disques stériles de 6 mm
- lecteur de zone d'inhibition
- Portoir

5.4. Protocole expérimental

❖ Préparation de l'extrait testé

- Préparer une dilution de 50mg/ml de DMSO de l'extrait testé.
- Agiter le mélange à l'aide d'un vortex pendant 5 min.
- Filtrer la solution obtenue à l'aide de filtre seringue 0.45µm.
- Conserver la solution à l'abri de la lumière à 4°C jusqu'à l'utilisation.

❖ Préparation du milieu de culture

- Faire fondre la Gélose Mueller Hinton (MH) dans un bain marie.
- Couler la gélose MH dans les boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4mm.
- Laisser sécher avant l'emploi.

❖ Préparation de l'inoculum

- A partir d'une culture pure de 18 h sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Détacher l'anse dans 5ml d'eau physiologique stérile à 0.9%.

-Homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland ou à une DO de 0.08 à 0.10 lue à 625nm.

-L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum.

❖ **Réalisation de l'ensemencement**

-Tromper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.

-L'essorer en le pressant fermement (en tournant) sur la paroi interne du tube, à fin de le décharger au maximum.

-Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas en stries serrées.

❖ **Imprégnation des disques**

-Imprégner les disques cellulose de 6 mm de diamètre avec 25µl de la solution DMSO de l'extrait testé.

❖ **Application des disques**

-Déposer et presser les disques chargés par l'extrait à testé à l'aide d'une pince stérile sur la surface gélosée.

❖ **Incubation**

-Incuber les boîtes ensemencées à 35°C pendant 24h et à 25°C pendant 48h respectivement pour les bactéries et levures.

❖ **Dépôt des disques**

- Des disques d'antibiotiques de référence de Tétracycline 30µg/MI (contrôle +) et des disques imprégnés de DMSO (contrôle-) ont été testés afin de comparer leurs activités avec l'extrait testé.

Toutes les étapes ont été effectuées dans des conditions stériles. Le test a été réalisé en triplicata.

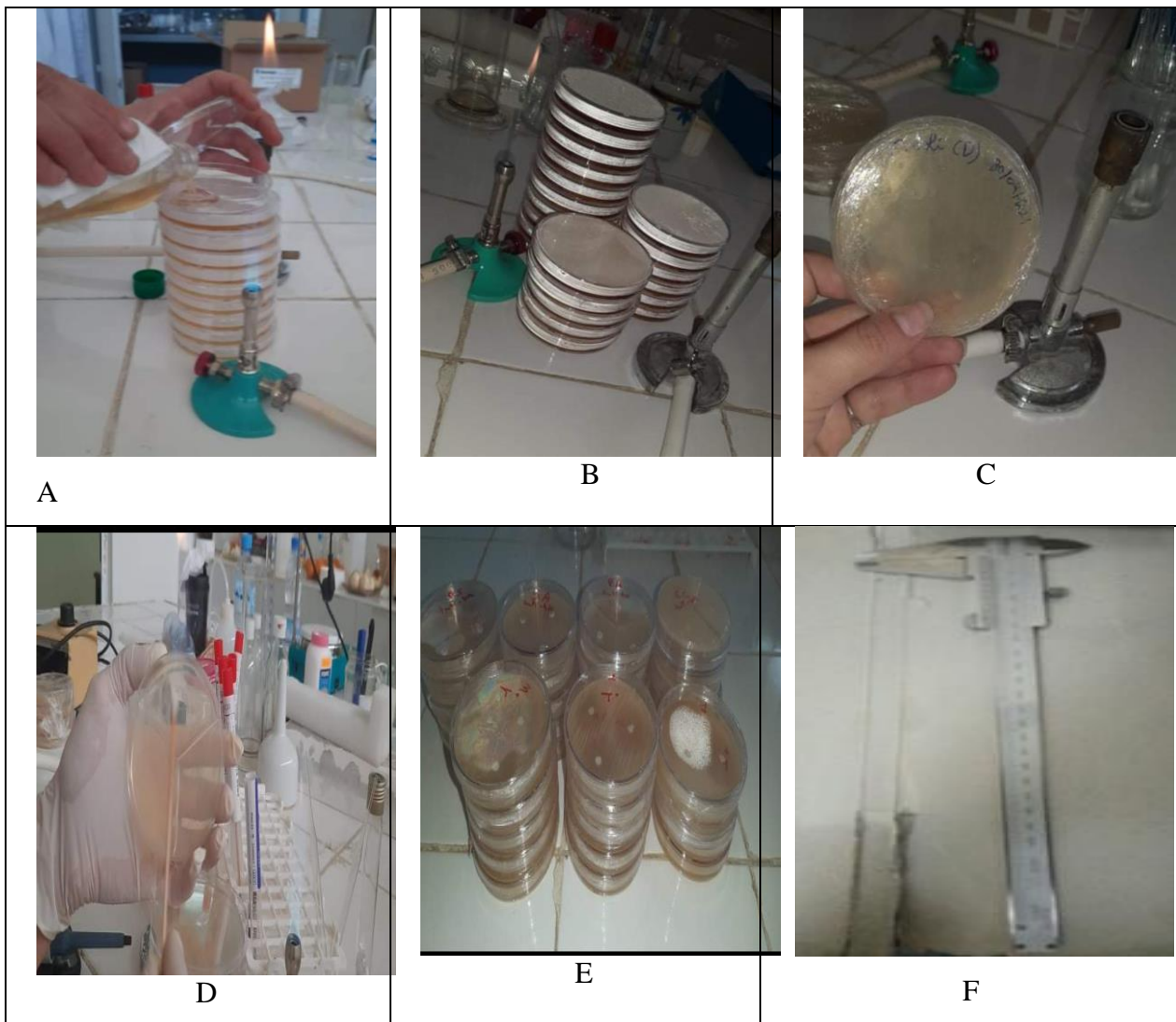


Figure 21 : Détermination de l'activité antimicrobienne

5.5. Expression des résultats

L'évaluation qualitative des HE et d'extrait naturel de plantes est exprimée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition obtenues après incubations pour chaque souche microbienne.

Les pouvoirs antimicrobiens ont été classés en fonction des diamètres des zones d'inhibitions de la croissance microbienne. **(Rodriguez et al., 2007).**

- Diamètres $\geq 28\text{mm}$ = Fortement inhibitrice (souches extrêmement sensible)
- $16\text{mm} \leq \text{diamètres} \leq 28\text{mm}$ = Modérément inhibitrice (souche très sensible)

- 10mm ≤ diamètres ≤ 16mm = Légèrement inhibitrice(souche sensible)
- Diamètre < 10 = Non inhibitrice (souche résistante)

6. Réalisation d'une formulation à base des huiles de *Myrtus communis*

6.1. Formulation d'une pommade

La formulation correspond au mélange de différentes substances qui entrent dans la composition des produits finis.

Dans la formulation on distingue deux types de composés : le principe actif et les excipients

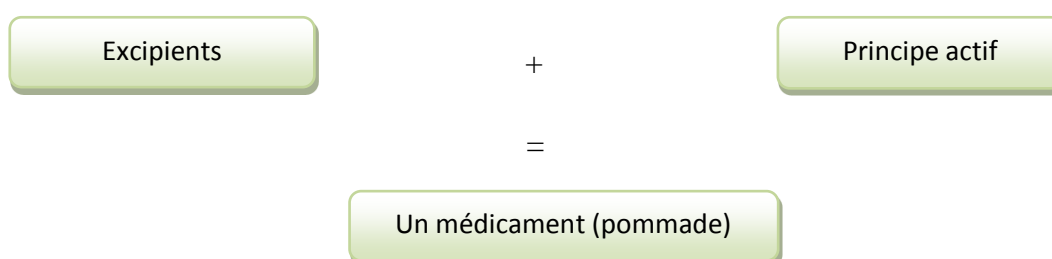


Figure 22 : formulation générale de pommade

6.2. La pommade antimicrobienne

Est un produit médical utilisé en application locale sur la peau, obtenue de mélange des substances grasses dans une solution aqueuse, à des principes actifs destinés à combattre les microorganismes, utilisée pour soigner les douleurs musculaires et articulaires d'origines inflammatoires.

6.3. Méthodologie de travail

Les principaux constituants de notre pommade sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau 4 : Composition de produit préparé à base d'huile essentielle de *Myrtus communis*

Constituants	Rôle
Huile essentielle	Principe actif
Glycérol	Humectant
Emulsifiant	Phase huileuse
Co émulsifiant	Phase huileuse
L'huile de vaseline	Phase huileuse

Acide salicylique	Conservateur
Eau purifié	Phase aqueuse (véhicule)

6.4. Mode opératoire :

6.4.1. Description du procédé de formulation

Matériel

- Becher
- Agitateur
- Balance
- Spatule
- Plaque chauffante
- Eprovette

Formule :

Phase huileuse :

- Emulsifiant et co émulsifiant 6g
- Acide surbique 0.1%
- Glycérol 0.5 g
- Huile de vaseline liquide 1 g

Phase aqueuse :

- Eau distillé
- 0.1 paraben

Additifs :

- 2 ml d'huile essentielle de Myrtus Communis
- 2 ml d'huile de citron

Protocole de fabrication :

- Faire fondre la phase huileuse au bain marie ou micro-onde
- Laisser le mélange se refroidir un peu pendant quelques minutes
- Elever la température de la phase huileuse
- Réunir les deux phases à la même température
- Mélanger les deux phases à l'aide d'un agitateur jusqu'à prise en masse.
- Ajouter l'huile essentielle de Myrtus Communis
- Ajouter l'arôme
- Laisser refroidir complètement puis mettre dans des lots en verre.
- Etiqueter



Figure 23 : Procédé de formulation d'une pommade antimicrobienne

6.5. Les tests et les activités effectués sur la pommade**6.5.1. Contrôle du pH**

Le pH permet d'évaluer la concentration de l'ion hydrogène dans une solution. Cette grandeur chimique mesure le caractère acide ou basique d'une solution aqueuse.

Plus la solution est acide, plus la valeur du pH est faible et inversement.

La mesure de pH se fait à l'aide du pH mètre



Figure 24 : L'appareillage de mesure de pH

CHAPITRE 2 : RESULTATS ET DISCUSSION

1. Rendement en huiles essentielles

Les huiles essentielles des feuilles de l'espèce végétale *Myrtus communis* sont obtenues par hydro-distillation. Elles sont de couleur jaune claire, presque incolore avec un aspect liquide et caractérisée par une forte odeur.

Tableau 5 : les caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle

Huile essentielle	Aspect	Couleur	Odeur
<i>Myrtus Communis</i>	Liquide	Jaune claire	Forte, fraîche

L'hydro-distillation de *Myrtus communis*, nous a permis d'obtenir un rendement de 0,27%, ce dernier est proche de celui obtenu par Bardeau, (1978) et Guenther, (1972); qui citent que, les feuilles sont employées pour la distillation et le rendement en essences est de 0.25 à 0.35 %.

$$R(\%) = \frac{0.27g}{100g} \times 100 = 0.27\%$$

Tableau 6 : rendement en pourcentage d'huile essentielle

Espèce L'huile essentielle	<i>Myrtus Communis</i>
Rendement (%)	0.27



Figure 25 : L'huile essentielle de *Myrtus communis*

2. Test phytochimique (screening chimique)

Le but des tests phytochimiques est la mise en évidence des principaux phytoconstituants dans les feuilles de Myrte.

Ce screening a permis de détecter les différentes familles de composés par des réactions de caractérisation en utilisant des réactifs spécifiques de révélation :

+ : Le réactif présente une légère opacité (présence en faible quantité).

++ : Le réactif produit une turbidité et non une floculation (présence en quantité moyenne).

+++ : Le réactif produit une floculation ou un précipité lourd (présence en forte quantité).

- : Absence de turbidité et de floculation.







Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques réalisés dans *Myrtus Communis* révèlent la richesse de cette plante en flavonoïdes, et en alcaloïdes dans les feuilles de la plante étudiée. Les feuilles enregistrent une quantité moyenne de Tanins, Glucosides et de Proanthocyanidols. Une légère présence est constatée dans la feuille de myrte en Anthocyanes.




L'amidon, Saponosides et l'Iridoïde sont totalement absents dans la partie de feuille de plante étudiée.

Les résultats des tests phytochimiques réalisés sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 7 : Résultats des tests phytochimiques (screening chimique)

**

Test (recherche)	Réaction	Résultat
Flavonoïdes	Coloration rouge orangé	+++ 
Glucosides	Coloration Rouge brique	++ 
Anthocyanes	Coloration rouge	+ 
Tanins	Coloration bleu-noire et précipité	++ 
Iridoïde	Coloration bleu	- 
Saponosides	Précipitation bleu	- 

Proanthocyanidols	Coloration rouge	++ 
Alcaloïdes	Coloration rouge et précipitation rouge orangée	+++ 
Amidon	Coloration bleu violette	- 

D'après les résultats obtenus, on constate que les feuilles de *Myrtus communis* présentent une diversité moléculaire en métabolites secondaires, riches en flavonoïdes, en tanins totaux, en glucosides, en Anthocyanes, en Proanthocyanidols et en Alcaloïdes. Par contre, une absence totale des irridoïdes, des Saponosides et de l'amidon .

3. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

Les teneurs en phénols totaux, et en flavonoïdes ont été déterminées dans les extraits bruts méthanoliques de feuilles de notre plante étudiée.

Les dosages des phénols totaux, des flavonoïdes totaux sont déterminés à partir des équations de la régression linéaire de chaque courbe d'étalonnage exprimées en mg équivalent d'acide gallique ,mg équivalent de quercitrine.

3.1. Dosage des phénols totaux

La teneur en phénols totaux est de 292 mg/eqAG ce qui montre que l'extrait méthanolique enregistre un maximum de phénols.

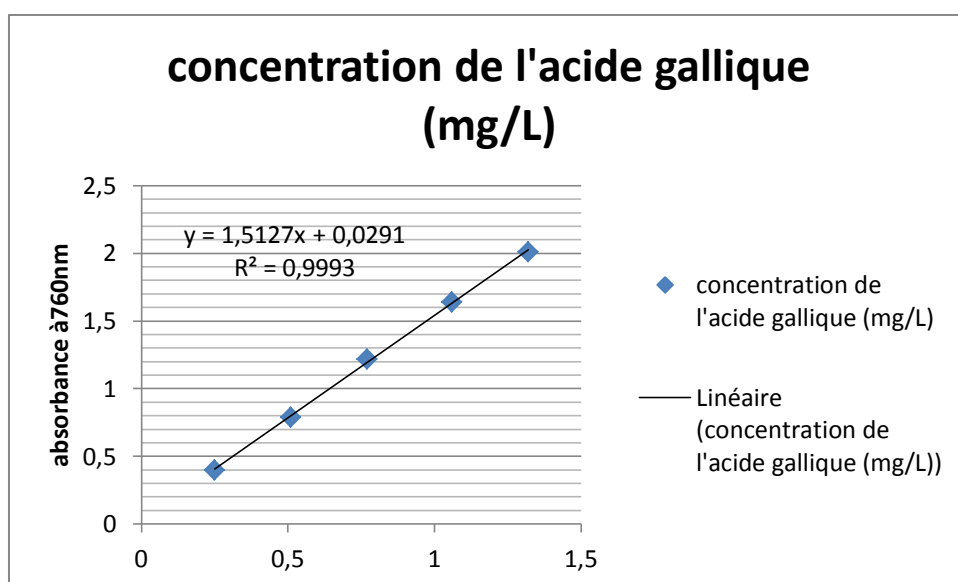


Figure 26 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

absorbance à 760 nm	concentration de l'acide gallique (mg/L)
0,25	0,4
0,51	0,79
0,77	1,22
1,06	1,64
1,32	2,01

Tableau 8 : Résultats du dosage des phénols totaux

3.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux est : 51.4 mg/eqQ ce qui montre que l'extrait méthanolique enregistre un maximum de flavonoïdes.

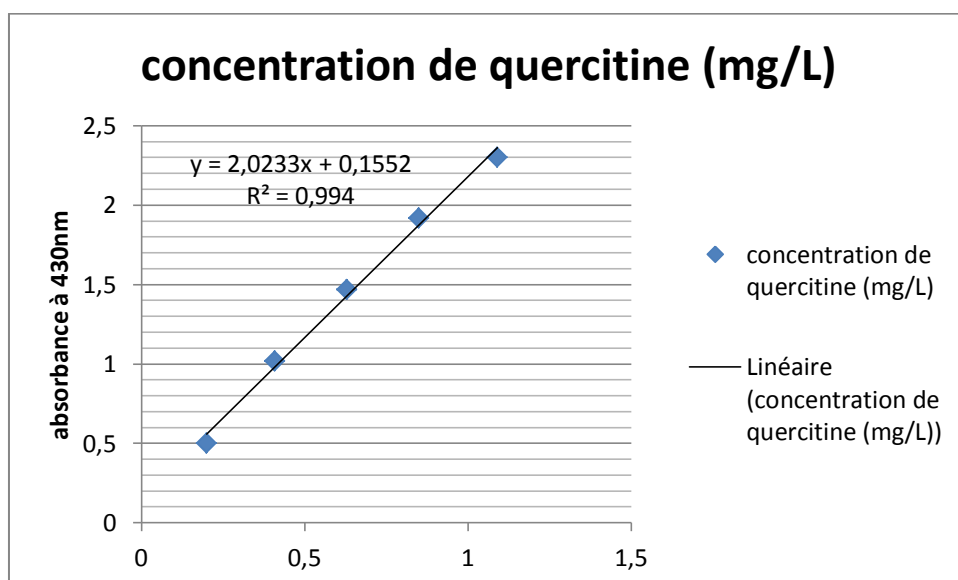


Figure 27 : Courbe d'étalonnage de quercitrine


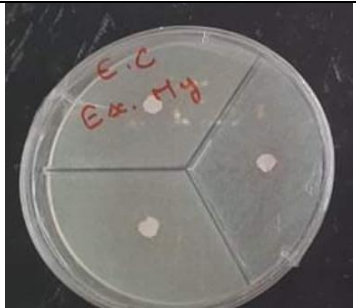

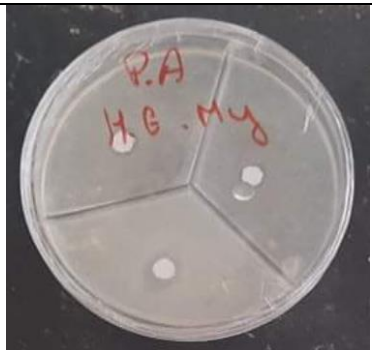


absorbance à 430 nm	concentration de quercitrine (mg/L)
0,2	0,5
0,41	1,02
0,63	1,47
0,85	1,92
1,09	2,3

Tableau 9 : Résultats du dosage des flavonoïdes totaux

-La présente étude s'est proposé de réaliser la quantification de composées poly phénoliques de notre extrait sec des feuilles de plante étudiée.

Les résultats obtenus nous permettent de déduire que l'emploi récurrent de cette plante serait le résultats de leur richesse en constituants poly phénoliques.

4.Activités antimicrobiennes de l'huiles essentielle et de l'extrait méthanolique

Huile essentielle Myrtus	Extrait Myrtus	Antibiotique
		
Escherichia coli		
		
Pseudomonas aeruginosa		

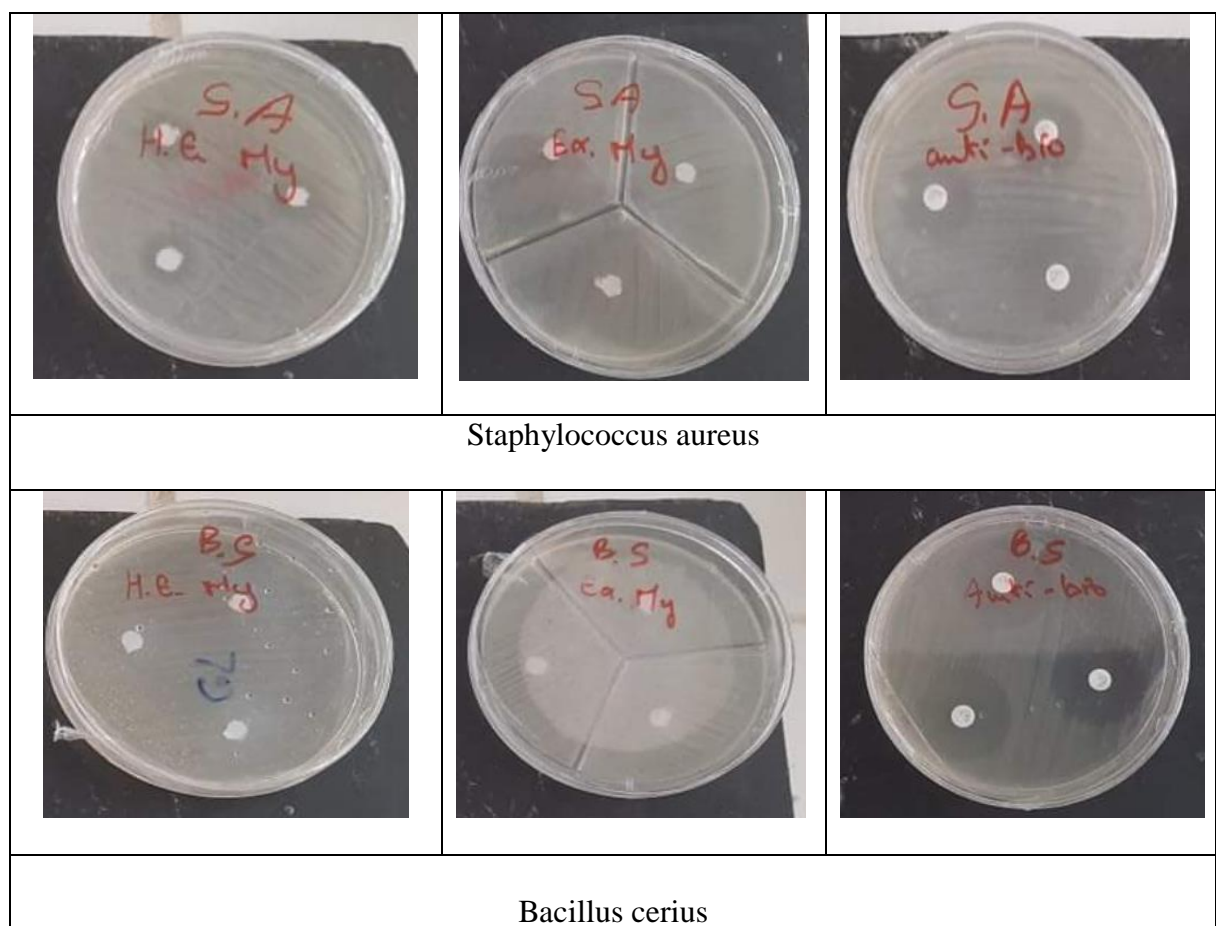


Figure 28: Moyennes des diamètres des Zones d'inhibition des huiles essentielles et de l'extrait méthanolique des feuilles de Myrtus communis relatives aux souches antibactériennes.


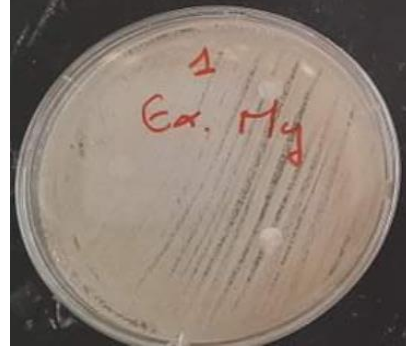





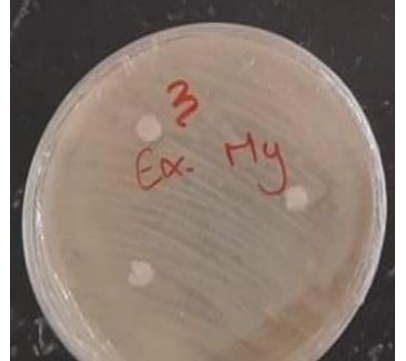

Huile essentielle Myrtus	Extrait Myrtus	Antifongique
		
Candidat albicans		
		
Candidat tropicalis		
		
Candidat duboisi		

Figure29 : Moyennes des diamètres des Zones d'inhibition des huiles essentielles et de l'extrait méthanolique des feuilles de Myrtus communis relatives aux souches antifongiques.

Tableau 10 : Résultats de l'aromatogramme

Souches utilisées	Zone d'inhibition (mm)			
	Huile essentielle	Extrait Myrtus	Antibiotique	Antifongique
Escherichia coli	R -6	R -6	08	
Pseudomonas aeruginosa	11	R -6	32	
Staphylococcus aureus	19	R -6	18	
Bacillus cerius	R -6	R -6	27	
Candidat albicans	11	R -6		22
Candidat tropicalis	10	R -6		20
Candidat duboisi	10	R -6		30

Interprétation :

-L'huile essentielle et l'extrait méthanolique et les antibiotiques testés présentent différents degrés d'activité antibactérienne contre les pathogènes bactéries testés.

- L'huile essentielle et l'extrait méthanolique n'ont provoqué aucune zone d'inhibition contre les souches Escherichia coli et Bacillus cerius
- L'huile essentielle a provoqué des zones d'inhibition les plus élevées contre les souches Pseudomonas aeruginosa et Staphylococcus aureus qui étaient 11mm et 19mm.
- Les souches Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus et Bacillus cerius ont été inhibées d'une manière significative par les antibiotiques avec des zones d'inhibition de 8mm, 32mm, 18mm, 27mm.

-Aussi présentent différents degrés d'activité antifongiques contre les pathogènes levures testés.

- Les souches antifongiques Candidat albicans et Candidat tropicalis et Candidat duboisi ont été inhibées par l'huile essentielle et par l'antifongique avec des

zones d'inhibition remarquables de 11mm,10mm,10mm pour les huiles essentielles et 22mm ,20mm ,30mm pour les antifongiques.

- L'extrait de Myrte n'a provoqué aucune zone d'inhibition des souches bactériennes et antifongiques ce qui montre que ce dernier est moins important que celle provoqué par l'huile essentielle et par l'antibiotique et l'antifongique.
- La puissante activité antimicrobienne de Myrtus communis démontrée au cours de cette étude peut être attribuer à 1.8-cinéole qui est le composé principale de son huile essentielle.
- L'huile essentielle de Myrtus à une activité contre une large gamme de bactéries et levures gram+ et gram- .
- L'antibiotique et l'antifongique sont capable d'identifier la sensibilité des bactéries et levures.

- Les résultats de notre travail d'activitéantimicrobiennepeuvent varier selon plusieurs facteurs :
 - ✓ La méthode et les conditions d'extraction.
 - ✓ Les conditions de conservation, de stockage et de transport
 - ✓ La nature du matériel d'extraction (risque d'oxydation).
 - ✓ La diffusion des extraits à travers la gélose.

5. Caractères organoleptiques

Ph	Odeur	texture	Couleur
5.5	forte	lisse	Blanc

Tableau 11 : Les caractéristiques organoleptiques de pommade

CONCLUSION

Conclusion

Le travail a porté sur l'étude d'activité biologique (antimicrobienne) d'huile essentielle et d'extrait aqueux de *Myrtus communis* préparé après extraction par hydro-distillation et par macération. Ces extraits sont fréquemment utilisés dans la médecine traditionnelle en Algérie grâce à ses propriétés thérapeutiques.

L'extraction d'huile essentielle de Myrte par la méthode d'hydro-distillation a permis de donner une masse acceptable et rentable à l'échelle industrielle avec un rendement de 0.27%.

Le screening phytochimique a révélé la richesse des feuilles de *Myrtus communis* en composants actifs (les flavonoïdes, les tanins, les glucosides, les anthocyanes, les proanthocyanidols, et les alcaloïdes) ainsi que l'absence totale (les, irridioïdes, amidon et les Saponosides).

L'activité antimicrobienne selon la méthode de diffusion sur disques, a révélé que les micro organismes (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candidat albicans*, *Candidat tropicalis*, *Candidat duboisi*) sont sensibles vis-à-vis l'huile essentielle appart *Escherichia coli* et *Bacillus cerius* qui sont résistantes, par contre pour l'extrait aqueux auqu'un micro organisme étaient sensibles.

Les substances naturelles de *Myrtus communis* sont de bons agents antimicrobiens, on peut déduire donc, que l'huile essentielle de cette plante agisse comme un antibiotique.

La pommade est préparée à base d'huile essentielle qui à une utilisation dans le traitement antifongique par application topique. La soumission du produit fini à différents tests de qualité (homogénéité, pH) a montré qu'il est de bonne qualité.

Étant donné que notre pays possède une biodiversité spontanée immense, son exploitation dans le domaine de phytothérapie par les recherches est très demandée, et en perspective il est recommandé de proposer :

- D'étudier l'activité anti-inflammatoire in-vivo des huiles essentielles de *Myrtus communis*.
- D'appliquer le produit phyto-thérapeutique formulé sur les souris et les rats.

Nous proposons une étude pratique sur cette partie restante dans les années prochaines en raison de son importance.

Annexes



Figure 1 : l'appareillage de Spectrophotomètre

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

1 Baba Aissa F., 1999. Encyclopédie des plantes utiles, Flore d'Algérie et du Maghreb. Ed.Edas, 368 p.

2 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 de doctorat : Chimie théorique, physique et analytique. Université di Corsica – Pasquale Paoli. France, 293.

3 Bardeau F, 1978. La Médecine par les fleurs, éd. Robert Laffont, S.A. Paris 75006 440 p

4 Bernard, J. K. ; Amos, H. E. ; Froetschel, M. A., 1988. Influence of supplemental energy and protein on protein synthesis and crude protein reaching the abomasum. *J. Dairy Sci.*, 71 (10): 2658–2669

5 BHAR H., BALOUK A., 2011. Centre de Recherche Forestière et l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatique., Les plantes Aromatiques et médicinales, Ces plantes odorantes qui soulagent la douleur

6 Billerbeck V.G. (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*. 5, 249 – 253.

7 BOUDJOUREF, 2011. Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisiacampestris* L., Université Ferhat Abbas, Sétif, Algérie

8 Bouyer T, 1996 , Notes sur les Lycaenidae *Aphnaeus* avec description d'une espèce nouvelle. Etude sur les Lycaenidae: note n°3. (Lepidoptera). *Entomologia Africana* 1 : 25-28

9 Cevat A. & Musa Ö.(2007). Determination of nutritional and physical properties of myrtle (*Myrtus communis* L) fruits growing wild in Turkey. *Journal of Food Engineering*. 79, 453- 458.

10 Chalchat J.C. & P. Gary, 1992. Les huiles essentielles du Myrte du pourtour méditerranéen. *Rivista Ital. EPPOS*, no special 10"5 journées internationales des huiles essentielles, Digne-les-Bains, 5-7/9/1991, 524- 532

11 CHEVALLIER, 2001.Encyclopedia des plantes médicinales. Edit.La rousse, Paris, pp16, 293, 295.

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

13 Debray,, M., H. Jacqiemini & R. Razafindrabo (1971). Contribution 1 l'inventaire des plantes médicinales de Madagascar. nav. & Documents ORSTOM 8. 150 pp., 68 pp. notes, 41 pp. tests, 2 index.

14 Desmares C., Laurent A., Delerme A., 2008. Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles, AFSSAPS : pp.17

15 Earnsworth, N.R., Berderka, J.P., Moses, M. Screening of Medicinal plants. , 1974. Journal of Pharmaceutical Science, vol. 63, pp. 457-459.

16 El Haib, A., (2011). Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques thèse de doctorat en Chimie organique et catalyse.Université Toulouse III. Paul Sabaier . P. 9-12.

17 Fauchère,J.L., Avril J.L. (2002). Bactériologie générale et médicale.Elleipsesédition Marketing, ISBN : 2-7298-0747-0

18 GahbicheSadok, 2009. La phytothérapie, ecolesuperieure des sciences et techniques de la sante de sousse.

19 Guenther E, 1972. The essential oils, Tome I, éd. Robert et Krieger, Florida.

20 Guignard, J.L. (1996). Biochimie végétale. Ed. Masson, Paris. France. 274 p.

21 L.Bermness, Larousse,2005. Plantes aromatiques et médicinales.

22 Longaga A. Otshudi, Vercruysse A. &Foriers A., (2000). Contribution to the ethnobotanical, phytochemical and pharmacological studies of traditionally used medicinal plants in the treatment of dysentery and diarrhoea in Lomola area, Democratic Republic of Congo (RDC). *J. Ethnopharmacol.* 71:411-423

23 Meyer,B.G .(1999). Extraction au CO₂ : Nouvelles applications pour l'industrie alimentaire.Bios(Paris), vol21,N° 3,pp 47-51.

- 24 Mimica-Dukić N., Bugarin D., Grbović S., Mitić-Ćulafić D., Vuković-Gačić B., Orčić D., Jovin E. & Couladis M. (2010).** Essential oil of *Myrtus communis* L. as a potential antioxidant and antimutagenic agents. *Molécules*. 15(4), 2759-2770.
- 25 Newman D.J. et CRAGG G.M, 2012.** Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* 75, 311-335.
- 27 Özek T., Demirci B., Baser K.H.C. (2000).** Chemical Composition of Turkish Myrtle Oil. *Journal of Essential Oil Research*, 12, 541-544.
- 28 Paris et al., 1969** Précis de matière médicale (Tome 3). Paris: Masson et Cie, 1969.
- 29 Peeking, A., Picand, B., Hacene, K., Lokiec, F. & Guerin, P. (1987).** Oligomères procyanidoliques (Endotélon) et système lymphatique. Artères et Veines. Publications médicales AGCF, 6, 512-513.
- 30 Pottier-Alapetite, 1979.** Programme flore et végétation Tunisiennes, pt. 1. Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique et le Ministère de l'Agriculture, 1979-1981. Tunisie.
- 31 Quézel P & Santa S. (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Ed : CNRS. Paris. France, 636.
- 32 Quezel P., 1956.** Contribution à l'étude des forêts de chênes à feuilles caduques d'Algérie. *Mém. Soc. Hist. Nat. Afr. Nord*, 1, 57 p.
- 33 Quézel P., Santa S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionale. Tome II Edition, CNRS, Paris, 636- 637.
- 35 Rodriguez – vaquero, M.J. ,Tomassini Serravalle, L. R., Manca de Nadra, M.C., Stresser de Saad, A.M (2007).** Antioxidant capacity and antibacterial activity of phenolic compounds from Argentinean herbs infusions. *Food CONTROL* ? 21 / 779-785.
- 36 Rodriguez, E., Towers, G.H et Mitchell, J. C. 2007.** Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry* 15, 1573- 1580.
- 37 Sebai M, et Boudali M, 2012.** LA PHYTOTHERAPIE ENTRE LA CONFIANCE ET MEFIANCE, Institut de formation paramédical CHETTIA, Algérie.

38 Tona L., Kambu K., Ngimbi N., Cimanga K. & Vlietinck A. J., (1998). Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *J. Ethnopharm.* 61:57-65.

39 V.L.Singleton ,R.Orthofer , R.M.Lamuella-Raventos, 1999. "Analysis of total phenols and other oxidant substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent" *Methods Enzymol* , Vol. (299), page: 152.

40 Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, vol. 64, pp. 555-559.

41 Vercauteren J, 2012

42 Laurent, 1980